

Deutsches Institut für Ernährungsforschung  
Abteilung Ernährungstoxikologie

**Sulfotransferase-vermittelte Genotoxizität von  
benzylischen Metaboliten alkylierter polyzyklischer  
aromatischer Kohlenwasserstoffe**

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

vorgelegt von

**Claudia Donath**

geboren am 15.06.1979 in Bernburg/Saale

Fürstenfeldbruck, November 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/2009/2971/>  
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-29717](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-29717)  
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-29717>]

**FÜR HENDRIK**



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe .....	1
1.1.1 Bedeutung und Historisches.....	1
1.1.2 Bildung, Vorkommen und Aufnahmepfade .....	2
1.1.3 Metabolismus und Bioaktivierung .....	3
1.1.4 Alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe .....	4
1.1.4.1 Vorkommen .....	4
1.1.4.2 Metabolismus, Bioaktivierung und biologische Aktivität.....	5
1.1.4.3 1-Methylpyren .....	6
1.2 Sulfotransferasen.....	8
1.2.1 Bedeutung, Substratspezifität und Gewebeverteilung.....	8
1.2.2 Sulfotransferase-vermittelte Bioaktivierung .....	11
1.3 Genotoxizitätsprüfungen.....	12
1.3.1 Prüfung auf kovalente DNA-Bindung (DNA-Addukte) .....	12
1.3.2 <i>Salmonella</i> -Mutagenitätstest (Ames-Test).....	13
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Material.....	20
3.1.1 Geräte.....	20
3.1.2 Chemikalien .....	20
3.1.3 Puffer und Lösungen .....	22
3.1.4 Enzyme .....	22
3.1.5 Testsubstanzen .....	23
3.1.6 Bakterienstämme .....	24
3.1.7 Tiere.....	25
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 <i>In vitro</i> -Adduktierung von DNA .....	25
3.2.2 Mutagenitätstest in <i>Salmonella typhimurium</i> (Ames-Test).....	26
3.2.3 Tierversuche .....	27
3.2.4 DNA-Isolierung aus tierischen Geweben.....	29

3.2.5	Bestimmung von DNA-Addukten mittels <sup>32</sup> P-Postlabelling .....	30
3.2.6	Statistik .....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	DNA-Adduktbildung durch benzyliche Schwefelsäureester alkylierter PAK im zell- und enzymfreien System .....	34
4.1.1	DNA-Adduktmuster .....	34
4.1.2	Nukleotidspezifität der DNA-Addukte des 1-SMP und 1-SM-8-MP .....	35
4.1.3	DNA-Adduktniveaus .....	38
4.2	Mutagenität von benzylichen Schwefelsäureestern alkylierter PAK in SULT-defizienten <i>Salmonella typhimurium</i> .....	39
4.3	Mutagenität von benzylichen Alkoholen alkylierter PAK in SULT-exprimierenden <i>Salmonella typhimurium</i> .....	42
4.4	DNA-Adduktbildung durch benzyliche Metabolite alkylierter PAK <i>in vivo</i> .....	47
4.4.1	DNA-Adduktmuster in Geweben der Ratte .....	47
4.4.2	DNA-Adduktniveaus in Geweben der Ratte .....	48
4.5	Modulation der DNA-Adduktbildung durch benzyliche Alkohole alkylierter PAK <i>in vivo</i> .....	49
4.5.1	Auswahl von Metaboliten .....	49
4.5.2	Optimierung der Dosis und Zeit zwischen Applikation und Tötung .....	50
4.5.3	Einfluss von Enzyminhibitoren und -substraten auf die DNA-Adduktbildung durch 1-HMP und 1-HM-8-MP .....	52
4.5.3.1	Einfluss der SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol und Quercetin .....	52
4.5.3.2	Einfluss des ADH-Inhibitors 4-Methylpyrazol und des ADH-Substrates Ethanol .....	54
4.5.3.3	Einfluss des ALDH-Inhibitors Disulfiram .....	55
4.5.4	Einfluss eines Inhibitors der renalen Sekretion organischer Anionen auf die DNA-Adduktbildung durch 1-HMP und 1-HM-8-MP .....	56
4.5.5	DNA-Adduktmuster in Geweben der Ratte nach Verabreichung von 1-HMP und 1-HM-8-MP .....	58
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1	<i>In vitro</i> -Genotoxizität benzylicher Metabolite alkylierter PAK .....	60
5.1.1	DNA-Adduktbildung und Mutagenität benzylicher Schwefelsäureester .....	60
5.1.2	Modulation der Mutagenität benzylicher Schwefelsäureester durch niedermolekulare Verbindungen im Expositionsmedium .....	63
5.1.3	Mutagenität benzylicher Alkohole .....	65
5.1.3.1	Mutagenität benzylicher Alkohole bei Expression humaner SULT-Formen... ..	66
5.1.3.2	Mutagenität benzylicher Alkohole bei Expression von SULT-Formen der Ratte .....	68

---

5.2	<i>In vivo</i> -Genotoxizität benzyliischer Metabolite alkylierter PAK .....	70
5.2.1	Gewebeverteilung und Ausmaß der DNA-Adduktbildung durch benzyliche Alkohole und Schwefelsäureester .....	70
5.2.2	Gewebeverteilung und Ausmaß der DNA-Adduktbildung durch den benzylichen Alkohol 1-HM-8-MP im Vergleich zum 1-HMP .....	72
5.2.3	Modulation der DNA-Adduktbildung durch Enzyminhibitoren .....	74
5.2.3.1	Modulation der DNA-Adduktbildung durch SULT-Inhibitoren .....	74
5.2.3.2	Modulation der DNA-Adduktbildung durch ADH/ALDH-Inhibitoren .....	77
5.2.4	Modulation der DNA-Adduktbildung durch Hemmung der renalen Sekretion .....	79
5.3	Relevanz einer SULT-vermittelten Bioaktivierung alkylierter PAK für den Menschen .....	83
6	Zusammenfassung/Summary .....	85
7	Literaturverzeichnis .....	91
8	Anhang .....	104

## Abkürzungsverzeichnis

1- $\alpha$ -HEP	1- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren
1- $\alpha$ -SEP	1- $\alpha$ -Sulfoxyethylpyren
1-CMP	1-Chloromethylpyren
1-HMP	1-Hydroxymethylpyren
1-HM-6-MP	1-Hydroxymethyl-6-methylpyren
1-HM-8-MP	1-Hydroxymethyl-8-methylpyren
1-MP	1-Methylpyren
1-SMP	1-Sulfoxymethylpyren
1-SM-6-MP	1-Sulfoxymethyl-6-methylpyren
1-SM-8-MP	1-Sulfoxymethyl-8-methylpyren
1,8-DMP	1,8-Dimethylpyren
2- $\alpha$ -HEP	2- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren
2- $\alpha$ -SEP	2- $\alpha$ -Sulfoxyethylpyren
2-HMP	2-Hydroxymethylpyren
2-SMP	2-Sulfoxymethylpyren
4- $\alpha$ -HEP	4- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren
4- $\alpha$ -SEP	4- $\alpha$ -Sulfoxyethylpyren
4-HMP	4-Hydroxymethylpyren
4-SMP	4-Sulfoxymethylpyren
6- $\alpha$ -HEAA	6- $\alpha$ -Hydroxyethylanthanthren
6- $\alpha$ -HEBP	6- $\alpha$ -Hydroxyethylbenzo[a]pyren
6-HMAA	6-Hydroxymethylanthanthren
6-HMBP	6-Hydroxymethylbenzo[a]pyren
6-MBP	6-Methylbenzo[a]pyren
6-SMBP	6-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren
10-HMBP	10-Hydroxymethylbenzo[a]pyren
10-SMBP	10-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren
11-HMBP	11-Hydroxymethylbenzo[a]pyren
11-SMBP	11-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren
ADH	Alkoholdehydrogenasen
ALDH	Aldehyddehydrogenasen
BP	Benzo[a]pyren
CPM	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
CYP	Cytochrom P450
dAp	Desoxyadenosinmonophosphat
dCp	Desoxycytidinmonophosphat



dGp	Desoxyguanosinmonophosphat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
HCPBA	11-Hydroxycyclopenta[ <i>pqr</i> ]benz[ <i>a</i> ]anthracen
HCPBP	10-Hydroxycyclopenta[ <i>mno</i> ]benzo[ <i>a</i> ]pyren
HCPC	4-Hydroxycyclopenta[ <i>def</i> ]chrysen
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.p.	intraperitoneal
KM	Körpermasse
MDR	multidrug resistance proteins
MN	Mikrokokkus-Nuklease
MRP	multidrug resistance-associated proteins
MW	Mittelwert
NADP/NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NAT	N-Acetyltransferase
NP1	Nuklease P1
OAT	Organische Anionen Transporter (organic anion transporters)
OH-AAF	<i>N</i> -Hydroxy-2-acetylaminofluoren
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCP	Pentachlorphenol
pdGp	5'- <sup>32</sup> P-markiertes 2'-Desoxyguanosin-3',5'-biphosphat
PEI	Polyethylenimin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCPBA	11-Sulfoxycyclopenta[ <i>pqr</i> ]benz[ <i>a</i> ]anthracen
SCPBP	10-Sulfoxycyclopenta[ <i>mno</i> ]benzo[ <i>a</i> ]pyren
SCPC	4-Sulfoxycyclopenta[ <i>def</i> ]chrysen
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SPD	Phosphodiesterase
SULT	Sulfotransferase
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
Tp	Thymidinmonophosphat
U	Einheit (Unit)
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase



# 1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2007). Die Ursache für die Erkrankung ist nur sehr selten bekannt, da die Bevölkerung gegenüber vielen kanzerogenen physikalischen und chemischen Noxen exponiert ist und zumeist eine lange Latenzzeit zwischen Einwirkung der Noxe und Manifestation der Krebserkrankung besteht. Über epidemiologische Studien, insbesondere über Untersuchungen am Arbeitsplatz, konnten jedoch Expositionen gegenüber bestimmten in der Umwelt des Menschen vorkommenden Substanzen natürlichen und anthropogenen Ursprungs mit einem erhöhtem Risiko für bestimmte Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden.

Nach heutigem Verständnis stellt die chemische Kanzerogenese einen Mehrstufenprozess dar, der in die Stadien Initiation, Promotion und Progression gegliedert werden kann (Barrett 1993). In der ersten Phase werden über genotoxische Chemikalien DNA-Schäden in kritischen Genen einer Zelle gesetzt, die im sogenannten initiierten Status der Zelle resultieren. Nachfolgend auftretende promovierende Stimuli beispielsweise in Form tumorpromovierend wirkender Chemikalien verschaffen selektiv initiierten Zellen einen Wachstumsvorteil und führen zur Bildung präneoplastischer und neoplastischer Zellanhäufungen (Läsionen). Die Progressionsphase der chemischen Kanzerogenese, die letztlich zur Bildung maligner Tumore führt, verläuft dann weitgehend autonom und unabhängig von exogenen Faktoren. Je nach Wirkmechanismus und dem Stadium, an dem die Substanzen bevorzugt angreifen, unterscheidet man genotoxische (Initiation), epigenetische (Promotion) und Komplettkanzerogene (beide Stadien).

Eine chemische Stoffklasse, die für die Erforschung der chemischen Kanzerogenese von großem Interesse ist, weil sie die größte Gruppe bekannter chemischer Kanzerogene darstellt, ist die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe.

## 1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

### 1.1.1 Bedeutung und Historisches

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen eine große Gruppe von Verbindungen dar, deren Struktur mindestens zwei kondensierte aromatische Ringe enthält. Neben dem aromatischen Ringsystem können auch nichtaromatische Teilstrukturen wie Alkylseitenketten oder partiell hydrierte Ringe enthalten sein.

Die Bedeutung der PAK und das große Interesse an deren Bildung, Vorkommen und Metabolismus resultiert aus der Tatsache, dass sich viele Vertreter dieser Verbindungsklasse wie z.B. Benzo[a]pyren, Dibenz[a,h]anthracen oder Dibenzo[a,l]pyren im Tierversuch als kanzerogen erwiesen haben (IARC Monographie Vol. 92 2006). Einige PAK-

haltige Substanzgemische wie Steinkohlenteer, Teerpech, unbehandelte Mineralöle und Tabakrauch wurden von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC Monographie Vol. 33, 34 1984; IARC Monographie Vol. 35 1985; IARC Monographie Vol. 38 1986) als humankanzerogen (Gruppe 1) eingestuft, wobei die kanzerogene Wirkung zum Großteil auf die enthaltenen PAK zurückgeführt wird. Vor kurzem wurde mit dem Benzo[a]pyren die erste Reinsubstanz dieser Stoffklasse von der IARC als humankanzerogen eingestuft (IARC Monographie Vol. 92 2006).

Den ersten Hinweis auf ein kanzerogenes Potenzial PAK-haltiger Matrices gab 1775 die Beobachtung des britischen Chirurgen Percival Pott, dass bei Kaminfeuern gehäuft Skrotumtumore auftraten, die er auf deren hohe Exposition gegenüber Ruß zurückführte (Pott 1775). 1874 berichtete Volkmann über eine erhöhte Inzidenz von Hauttumoren bei Arbeitern in der Teerindustrie (Volkmann 1874). Mit dem PAK Dibenz[a,h]anthracen wurde durch Kennaway & Hieger (1930) zum ersten Mal eine chemisch einheitliche Substanz zur experimentellen Induktion von Tumoren am Versuchstier (Tumore am Kaninchenohr nach Aufpinselung) eingesetzt. Drei Jahre später folgten analoge Befunde zum Benzo[a]pyren (Cook *et al.* 1933), dem bis heute toxikologisch am besten untersuchten PAK.

### 1.1.2 Bildung, Vorkommen und Aufnahmepfade

PAK entstehen im Zuge der geochemischen Diagenese organischer Sedimente (z.B. Torf, Kohle, Erdöl) sowie bei jeglichen unvollständigen Verbrennungsprozessen organischen Materials natürlichen und anthropogenen Ursprungs. Sie sind daher ubiquitär in der Umwelt vorhanden. PAK werden stets in Form von komplexen Substanzgemischen gebildet, wobei je nach Temperatur unterschiedliche Verbindungen entstehen. Bei hoher Temperatur (> 1000°C) entstehen fast ausschließlich rein aromatische PAK wie Pyren oder Benzo[a]pyren, während bei niedrigeren Temperaturen (unterhalb 700°C) auch große Mengen an alkylierten Kongeneren gebildet werden.

Waldbrände und Vulkanausbrüche sind natürliche Quellen für den Eintrag von PAK in die Atmosphäre, die jedoch nur lokal von Bedeutung sind. Einen quantitativ wichtigeren Beitrag leisten anthropogene Quellen wie Bergbau, Kokereien, Kraftwerke und vor allem Verkehr (Abgase, Abrieb von Reifen, Asphalt und Teer) und Heizungen (Boström *et al.* 2002). Des Weiteren entstehen PAK auch beim Rauchen von Tabak.

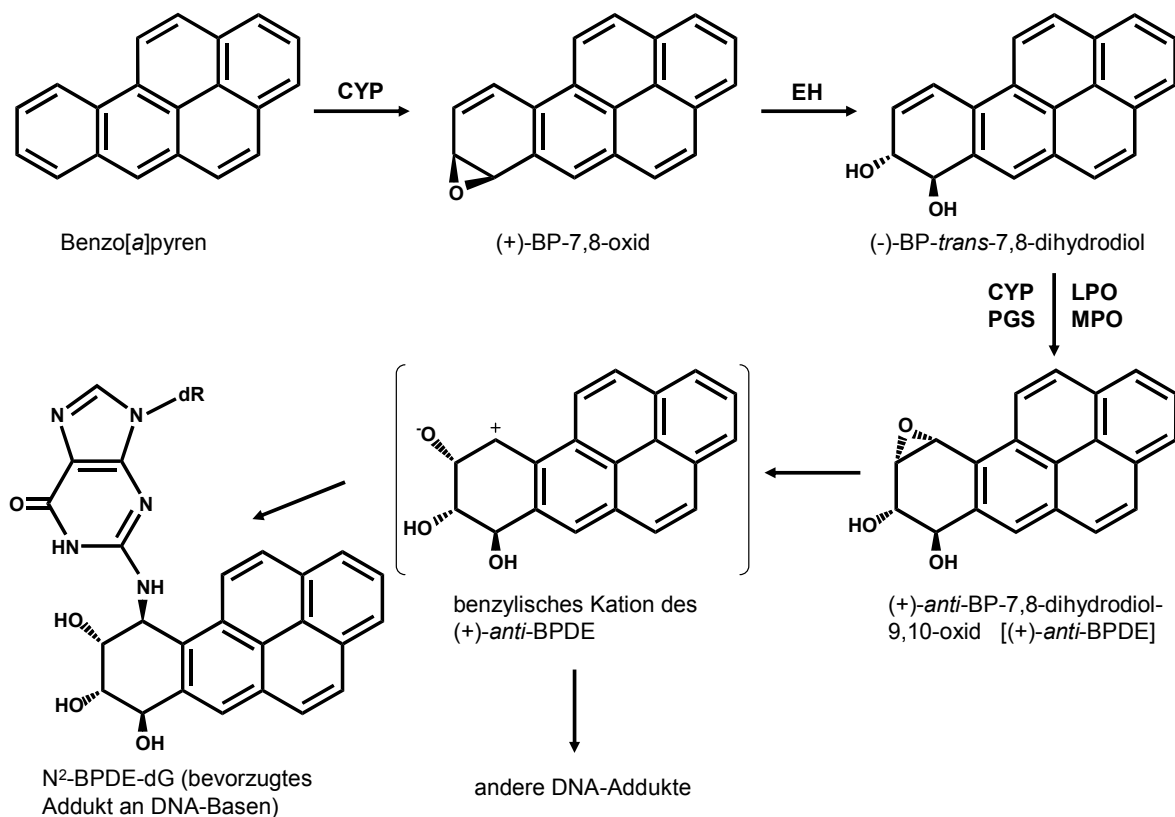
Für nicht beruflich exponierte Personen und Nichtraucher ist die Aufnahme über die Nahrung der wichtigste Expositionspfad, der die inhalative Aufnahme über mit PAK kontaminierte Umgebungsluft etwa um den Faktor 10 übersteigt (Lodovici *et al.* 1995). In verschiedenen Studien wurde die in Europa täglich pro Person über die Nahrung aufgenommene Menge von PAK auf 3 bis 17 µg berechnet (Dennis 1983; Lodovici *et al.* 1995; de Vos *et al.* 1990), was nach Schätzungen ca. 96% der Gesamtaufnahme ausmacht (Menzie *et al.* 1992). Den quantitativ wichtigsten Beitrag liefern hierbei Getreideprodukte,

Obst und Gemüse sowie Fette und Öle (Phillips 1999). Die PAK-Gehalte in Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln werden vor allem auf Umweltkontamination durch Ablagerung von PAK-haltigen Partikeln aus der Umgebungsluft zurückgeführt (Phillips 1999). Des Weiteren können PAK auch während der Verarbeitung und Zubereitung in Lebensmittel gelangen wie z.B. in Fleischwaren während des Grillens über offenem Feuer (Panalaks 1976) oder des Räucherns (Gomaa *et al.* 1993). Bei beruflich exponierten Personen z.B. Arbeitern in Kokereien oder im Straßenbau treten zusätzliche PAK-Belastungen durch Inhalation oder dermale Exposition auf (Unwin *et al.* 2006). Auch das Rauchen von Tabak führt zu einer zusätzlichen inhalativen PAK-Exposition, wobei beim Rauchen von 20 Zigaretten im Hauptstrom etwa soviel PAK anfallen wie täglich über die Nahrung aufgenommen werden (Menzie *et al.* 1992; Lodovici *et al.* 2004).

### 1.1.3 Metabolismus und Bioaktivierung

PAK sind lipophile Verbindungen geringer chemischer Reaktivität, die erst nach Umsetzung zu reaktiven Metaboliten eine genotoxische bzw. kanzerogene Wirkung entfalten. Metabolismus und Bioaktivierung von PAK im Säugerorganismus sollen am Beispiel des Benzo[a]pyren (BP) vorgestellt werden. Der initiale Metabolisierungsschritt des BP besteht in einer CYP (Cytochrom P450)-vermittelten Epoxidierung, die an verschiedenen Positionen erfolgen kann (z.B. Bildung des 4,5-, 7,8- und 9,10-Oxid). Die Epoxide können spontan zu Phenolen isomerisieren oder katalysiert über die mikrosomale Epoxidhydrolase zu trans-Dihydrodiolen hydrolysieren. Daneben ist auch eine Konjugation der Epoxide mit Glutathion, katalysiert über GST (Glutathion-S-Transferasen), möglich. Trans-Dihydrodiol- und Phenole des BP können weiter oxidativ zu Chinonen umgesetzt werden, die wiederum über GST konjugiert werden können. Phenole und Dihydrodiol- sind des weiteren Substrate für SULT (Sulfotransferasen) und UGT (UDP-Glucuronosyltransferasen), die diese in der Regel zu wasserlöslichen, stabilen Sulfo- bzw. Glucuronsäurekonjugaten umsetzen.

Einige Chinone des Benzo[a]pyren zeigten in Säugerzellen in Kultur ein genotoxisches Potenzial (Flowers-Geary *et al.* 1996). Untersuchungen zum genotoxischen und kanzerogenen Potenzial einer großen Zahl von BP-Metaboliten führten jedoch zur Identifizierung eines anderen BP-Metaboliten, des Bay-Region Dihydrodiol-epoxid (+)-*anti*-BP-7,8-dihydrodiol-9,10-oxid ((+)-*anti*-BPDE), als dem wesentlichen ultimalen kanzerogenen BP-Derivat (Thakker *et al.* 1985). Der Bioaktivierungsmechanismus zum (+)-*anti*-BPDE ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die genotoxische Wirkung dieses Metaboliten beruht auf der Reaktion mit nukleophilen Zentren von DNA-Basen, wobei vor allem die exozyklische Aminogruppe des Guanin als Bindungsstelle dient (Jernstrom & Graslund 1994). Die auf diese Weise gebildeten DNA-Addukte können zu Mutationen und in Folge dessen zur Tumorentwicklung führen.



### Abbildung 1.1 Bioaktivierung des Benzo[a]pyren

CYP Cytochrome P450, EH mikrosomale Epoxidhydrolase, PGS Prostaglandin-H-Synthetase, LPO Lipoxygenase, MPO Myeloperoxidase

## 1.1.4 Alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

### 1.1.4.1 Vorkommen

Alkylierte PAK-Kongeneren werden in Temperaturbereichen von 700°C und niedriger neben rein aromatischen Verbindungen zu großen Anteilen gebildet. Sie wurden in vielen Matrices gefunden, so z.B. in Abgasen von Diesel- und Benzinmotoren (Hilpert 1975; Rogge 1993), in Tabakrauchkondensat (Snook *et al.* 1978) und als Kontaminanten in einer Reihe von Lebensmitteln wie Räucherkäse (Guillen & Sopelana 1994a), Olivenöl (Guillen & Sopelana 1994b) und Grillfleisch (Larsson 1983). Untersuchungen zum Vorkommen ausgewählter alkylierter PAK mit Hilfe deuterierter Standards zeigten hohe Gehalte insbesondere von Methylpyrenen in Diesel-Feinstaub, gebrauchtem Motorenöl, Zigarettenrauchkondensat und Grillfleisch (Seidel & Glatt, unveröffentlichte Daten).

In einigen Matrices können alkylierte PAK-Kongeneren sogar in höheren Konzentrationen gefunden werden als rein aromatische Verbindungen. So wurde in einer Studie in Zigarettenrauchkondensat ein höherer Gehalt an 1-Methylpyren als an Benzo[a]pyren gefunden (56 bzw. 17 ng pro Zigarette) (Lee *et al.* 1976). Da nur ca. 1–3% der kanzerogenen Aktivität von Zigarettenrauchkondensat durch rein aromatische PAK-

Kongenere erklärt werden können und alkylierte PAK in hohen Konzentrationen in Fraktionen mit kanzerogener Aktivität gefunden wurden, könnten diese eine große Bedeutung für die durch Zigarettenrauch ausgelöste Kanzerogenese haben (Hoffmann & Wynder 1971).

#### 1.1.4.2 Metabolismus, Bioaktivierung und biologische Aktivität

Alkylierte PAK sind im Vergleich zu rein aromatischen Verbindungen nur wenig untersucht und die Daten zu Vorkommen, Metabolismus und toxikologischen Wirkungen beschränken sich auf wenige Kongenere. Dennoch wird aus den vorhandenen Daten ersichtlich, dass Alkylsubstituenten das metabolische Profil und die biologische Aktivität von PAK drastisch verändern können. Mögliche Ursachen hierfür bestehen in Verschiebungen der Positionen, an denen oxidativer Stoffwechsel stattfindet, in elektronischen und sterischen Effekten der Alkylsubstituenten auf die biologische Aktivität homologer Metaboliten und in der Bildung reaktiver Metaboliten an der Seitenkette (Glatt 2006).

Der Einfluss von Alkylsubstituenten auf die biologische Aktivität von PAK wird insbesondere anhand von Daten aus Kanzerogenitätstudien deutlich. So sind die methylierten PAK 9-Methylantracen, 9,10-Dimethylantracen und 1-Methylpyren im Gegensatz zu ihren rein aromatischen Homologen Anthracen und Pyren im Tierversuch kanzerogen (LaVoie *et al.* 1985; Rice *et al.* 1987). Auch das 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen ist sehr viel stärker kanzerogen als das rein aromatische Benz[*a*]anthracen (Coombs *et al.* 1976).

Alkylsubstituenten können auch das metabolische Profil stark verändern. So wird Benz[*a*]anthracen zu 96% zu Dihydrodiolen umgesetzt, während 3-Methylcholanthren, ein alkyliertes Kongener dieses PAK, durch Rattenlebermikrosomen hauptsächlich im Bereich der Alkanobrücke oxidiert wird und Dihydrodirole weniger als 1% der Gesamtmetabolite ausmachen (Thakker *et al.* 1985).

Die Bioaktivierung von alkylierten PAK zu genotoxischen und kanzerogenen Metaboliten kann analog zu rein aromatischen PAK über Epoxidierung und die Bildung von vizinalen Bay-Region-Dihydrodiolepoxiden erfolgen, was beispielsweise für das 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen belegt ist (Miyata *et al.* 1999). In anderen Fällen wie z.B. beim 1-Methylpyren kann dieser Bioaktivierungsmechanismus nicht für die kanzerogene Aktivität verantwortlich sein, da das aromatische System des alkylierten PAK keinen terminalen Benzolring enthält und somit die Bildung von vizinalen Dihydrodiolepoxiden nicht möglich ist. Für alkylierte PAK wurde ein alternativer Bioaktivierungsweg über benzyliche Hydroxylierung der Alkylseitenkette und anschließende Bildung reaktiver Ester wie z.B. Sulfaten vorgeschlagen (Flesher & Sydnor 1973). Tatsächlich belegen zahlreiche Studien *in vitro* und *in vivo* eine Aktivierung des 1-Methylpyren über benzyliche Hydroxylierung und anschließende SULT-vermittelte Sulfonierung zu einem benzylichen Schwefelsäureester

mit stark genotoxischem Potenzial (siehe 1.1.4.3), der in der Maushaut Tumore initiiert (Surh *et al.* 1990a). Ein genotoxisches und/oder kanzerogenes Potenzial konnte auch für die benzyllischen Alkohole bzw. Schwefelsäureester weiterer alkylierter PAK gezeigt werden wie z.B. 6-Methylbenzo[*a*]pyren (Surh *et al.* 1990b; Rogan *et al.* 1986), 9-Hydroxymethyl-10-methylantracen (Surh *et al.* 1990a; Rogan *et al.* 1986) und Cyclopenta[*c,d*]pyren (Surh *et al.* 1993; Rogan *et al.* 1986).

Da 1-Methylpyren und dessen benzyllische Metaboliten in der vorliegenden Arbeit als Referenzsubstanzen dienten, sind im Folgenden der Metabolismus, die SULT-vermittelte Bioaktivierung sowie das genotoxische Potenzial dieses alkylierten PAK näher dargestellt.

#### 1.1.4.3 1-Methylpyren

1-Methylpyren ist im Gegensatz zum Pyren, das als nichtkanzerogen angesehen wird (IARC Monographie Vol. 92 2006), ein Hepatokarzinogen in neugeborenen Mäusen (Rice *et al.* 1987). Dies legt nahe, dass die Bioaktivierung des 1-Methylpyren zu einem Karzinogen an der Alkylseitenkette erfolgt.

1-Methylpyren wird durch hepatische mikrosomale Fraktionen von Ratte und Mensch sowie durch V79-Zelllinien, die verschiedene humane und Ratten-CYP-Formen heterolog exprimieren, zum benzyllischen Alkohol 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) umgesetzt, wobei vor allem die humanen CYP-Formen eine ausgesprochene Präferenz für die Hydroxylierung der benzyllischen Position zeigen (Engst *et al.* 1999). Neben dem benzyllischen Alkohol wurden auch die 1-Pyrenylcarbonsäure sowie verschiedene ringhydroxylierte Metabolite gebildet.

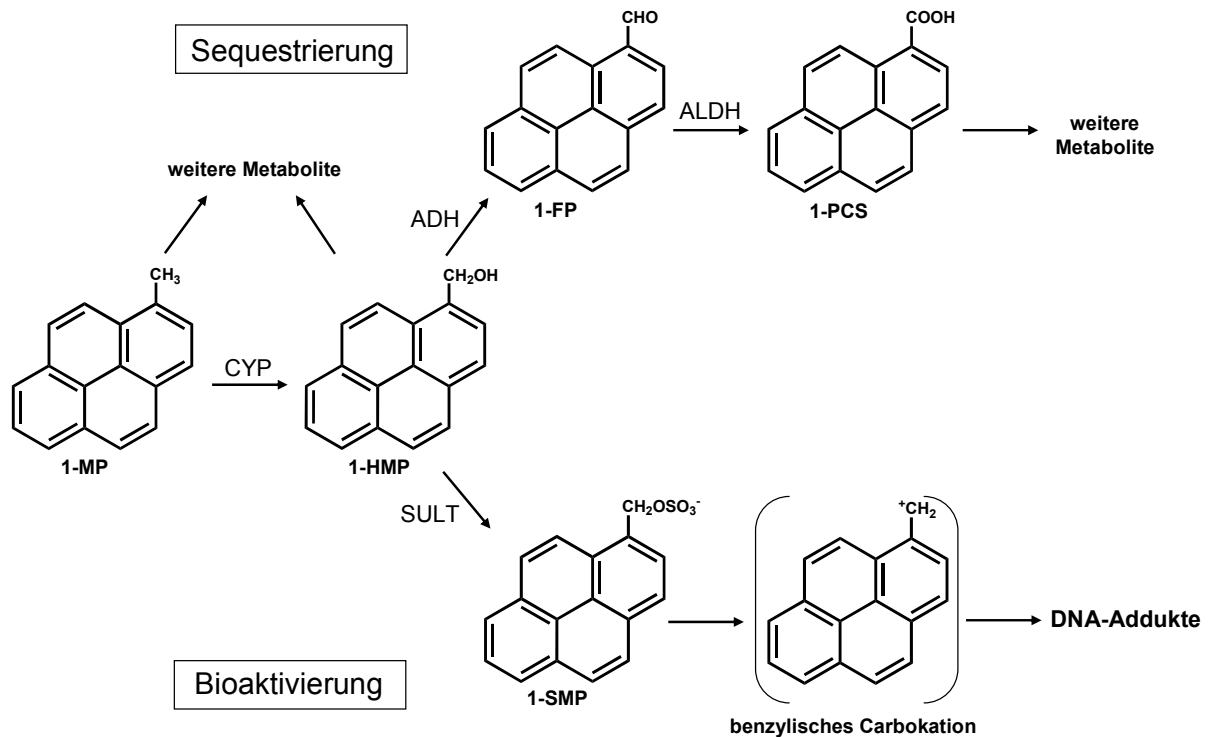
Der benzyllische Alkohol 1-HMP ist in *S. typhimurium* TA98 in Anwesenheit von mit 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)-angereichertem Cytosol aus humaner oder Rattenleber stark mutagen (Glatt *et al.* 1994b; Glatt *et al.* 1994c). Ebenso wird 1-HMP in *S. typhimurium*-Stämmen und V79-Zelllinien, die verschiedene Sulfotransferasen des Menschen und der Ratte exprimieren, zu einem mutagenen Schwefelsäureester aktiviert (Glatt *et al.* 2003). Der authentische benzyllische Schwefelsäureester des 1-Methylpyren, 1-Sulfoxymethylpyren (1-SMP), ist ein sehr kurzlebiger, reaktiver Metabolit ( $t_{1/2} < 3$  min). Dieser reagiert über heterolytische Abspaltung der Sulfatgruppe und Bildung eines Mesomerie-stabilisierten, stark elektrophilen Carbokations mit zellulären Nucleophilen wie DNA-Basen ( $S_N1$ -Mechanismus) und bildet im zellfreiem System DNA-Addukte (Glatt *et al.* 1994d; Monnerjahn *et al.* 1993).

Das DNA-Adduktmuster in Geweben von Ratten, die mit 1-HMP behandelt wurden, ist dem *in vitro*-DNA-Adduktmuster des 1-SMP sehr ähnlich (Ma *et al.* 2002), was zeigt, dass auch *in vivo* eine SULT-vermittelte Bioaktivierung zum reaktiven 1-SMP stattfindet. Nach Verabreichung von 1-HMP an Ratten wurden deutlich geringere DNA-Adduktniveaus gefunden als nach Verabreichung von 1-SMP (Kuhlow 2001). Dies deutet darauf hin, dass



1-HMP nur zu einem geringen Prozentsatz zum 1-SMP aktiviert wird und dass alternative Metabolisierungswege mit der Bioaktivierung zum 1-SMP konkurrieren. Untersuchungen zum Metabolismus mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem 1-HMP zeigten, dass *in vivo* in der Ratte vor allem eine Oxidation der benzyllischen Hydroxylgruppe zur 1-Pyrenylcarbonsäure stattfindet. Freie 1-Pyrenylcarbonsäure, ihr Glucuronsäurekonjugat sowie phenolische Sulfate ringoxidierter 1-Pyrenylcarbonsäure machten ca. 80% der Metabolite in Urin und Fäzes aus (Ma 2001). Weiterführende *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass die Oxidation des 1-HMP von  $\text{NAD}^+$ -abhängigen cytosolischen und mitochondrialen Enzymen katalysiert wird und dass Substrate bzw. Inhibitoren von Alkoholdehydrogenasen (ADH) oder Inhibitoren von Aldehyddehydrogenasen (ALDH) diesen Metabolismusweg hemmen können (Ma 2001). Auch *in vivo* in der Ratte konnte die detoxifizierende benzyllische Oxidation des 1-HMP durch Vorbehandlung mit den genannten Substraten bzw. Inhibitoren gehemmt und gleichzeitig die aktivierende Sulfonierung zum reaktiven 1-SMP gesteigert werden. Dies zeigte sich in einem dramatischen Anstieg der hepatischen DNA-Adduktniveaus mit 1-SMP-spezifischem Adduktmuster sowie einer gesteigerten Ausscheidung von Methylpyrenylmercaptursäure (Ma *et al.* 2002), einem Metaboliten, der nach GST-vermittelter Reaktion von 1-SMP mit Glutathion gebildet wird.

Untersuchungen zur Gewebeverteilung von DNA-Addukten nach Applikation von 1-HMP oder 1-SMP an Ratten ergaben hohe DNA-Adduktniveaus in der Niere, gefolgt von Leber und Lunge. Da die SULT-Expression und die HMP-Aktivierungskapazität in Ratten auf die Leber fokussiert ist (Glatt *et al.* 2003; Kuhlow 2001), deuteten diese Ergebnisse auf einen hepatischen Export des 1-SMP und einen Transport zu extrahepatischen Geweben über die Blutbahn. Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass 1-SMP im Blut von Ratten auch noch Stunden nach Applikation von 1-SMP nachgewiesen werden konnte (Ma *et al.* 2003), obwohl das Sulfat unter physiologischen Bedingungen negativ geladen und in wässriger Lösung sehr kurzlebig ist. 1-SMP erwies sich als Bindungspartner für Serumalbumin, wobei diese reversible Bindung in einer Stabilisierung und drastischen Erhöhung der Halbwertszeit des 1-SMP resultierte (Ma *et al.* 2003). Als Ursache für die hohen DNA-Adduktniveaus in der Niere wurde eine Transporter-vermittelte renale Aufnahme des 1-SMP diskutiert (Kuhlow 2001).



**Abbildung 1.2 Metabolismus des 1-Methylpyren (Erläuterung siehe oben)**

1-MP 1-Methylpyren, 1-HMP 1-Hydroxymethylpyren, 1-FP 1-Formylpyren, 1-PCS 1-Pyrenyl-carbonsäure, 1-SMP 1-Sulfoxymethylpyren, CYP Cytochrome P450, SULT Sulfotransferasen, ADH Alkoholdehydrogenasen, ALDH Aldehyddehydrogenasen

## 1.2 Sulfotransferasen

### 1.2.1 Bedeutung, Substratspezifität und Gewebeverteilung

Sulfotransferasen katalysieren die Übertragung der Sulfogruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf nukleophile Gruppen (Hydroxyl-, Thiol-, Aminogruppen) von Akzeptormolekülen. Gemäß ihrer Substratspezifität können Sulfotransferasen in drei Gruppen klassifiziert werden. Protein-Tyrosin-Sulfotransferasen und Kohlenhydrat-Sulfotransferasen sulfonieren Proteine bzw. Glykoproteine und Glykolipide, wohingegen die dritte Gruppe relativ kleine endogene Moleküle (z.B. Steroide, Catecholamine) sowie Fremdstoffe sulfoniert. Die fremdstoffmetabolisierenden Sulfotransferasen (SULT) sind zytosolisch lokalisierte Enzyme und gehören zu einer gemeinsamen Enzym/Gen-Superfamilie. Gemäß der Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz werden die SULT in Familien (45% Übereinstimmung) und Subfamilien (60% Übereinstimmung) gegliedert. In Mensch und Ratte sind bis heute jeweils 13 verschiedene SULT-Gene identifiziert worden (Blanchard *et al.* 2004; Freimuth *et al.* 2004; Hildebrandt *et al.* 2004). Die humanen SULT umfassen vier Familien: SULT1 (1A1, 1A2, 1A3/1A4; 1B1; 1C1, 1C2, 1C3; 1E1), SULT2 (2A1, 2B1), SULT4 (4A1) und SULT6 (6B1).

Eine Expression auf RNA- und/oder Proteinebene in menschlichen Geweben konnte bislang für alle SULT-Gene außer SULT1C3 nachgewiesen werden (Glatt 2002; Freimuth *et al.* 2004), wobei die SULT-Gene 1A3 und 1A4 für identische Proteine kodieren (Hildebrandt *et al.* 2004) und ausgehend vom SULT2B1-Gen aufgrund alternativen Splicings zwei verschiedene Proteine (2B1a und 2B1b) gebildet werden (Fuda *et al.* 2002).

Die SULT-Formen einer Spezies unterscheiden sich jeweils in ihrer Substratspezifität sowie ihrer Gewebeverteilung. Dies gilt ebenso für orthologe SULT-Formen verschiedener Spezies. Ein herausragender Unterschied zwischen Mensch und Ratte besteht hinsichtlich der Gewebeverteilung von SULT. Während beim Menschen SULT-Formen auch in extrahepatischen Geweben auf hohem Niveau exprimiert werden (Glatt 2002), ist die SULT-Expression in der Ratte auf die Leber fokussiert (Dunn & Klaassen 1998). Des Weiteren bestehen bei der Spezies Ratte im Gegensatz zum Menschen deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression bestimmter SULT-Familien. So weisen die Formen der Familie SULT1 in Männchen und die der Familie SULT2 in Weibchen ein hohes Expressionsniveau auf (Liu & Klaassen 1996a; Liu & Klaassen 1996b). Die Tabellen 1.1 und 1.2 geben einen Überblick über Charakteristika der SULT-Formen des Menschen und der Ratte.

Neben Funktionen im endogenen Stoffwechsel (Sulfonierung von Hormonen, Neurotransmittern) sind SULT wichtige Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Durch die Übertragung einer unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Sulfogruppe auf nukleophile Akzeptoren wird in der Regel deren Wasserlöslichkeit erhöht und die Fähigkeit zur passiven Membranpenetration vermindert. Dies ermöglicht einerseits eine gerichtete Ausscheidung über Galle oder Niere und bedeutet andererseits, dass ein Import bzw. Export in bzw. aus Zellen an Transporter gebunden ist. Ein Transmembrantransport von sulfatierten Konjugaten konnte für verschiedene membranständige Transportsysteme wie beispielsweise ATP-abhängige MRP (multidrug-resistance associated proteins) (Jedlitschky *et al.* 1996) und OAT (organic anion transporter) (Burckhardt & Burckhardt 2003) gezeigt werden. Diese Transportproteine besitzen unterschiedliche Substratspezifität und Gewebeverteilung. Sie sind zudem in der Zellmembran polarer Zellen (Hepatozyten, Nierentubulizellen) nicht gleichmäßig exprimiert (König *et al.* 1999; Burckhardt & Burckhardt 2003), was die Exkretionsroute verschiedener Sulfate beeinflussen könnte.

**Tabelle 1.1 Charakteristika humaner SULT-Formen <sup>a</sup>**

SULT-Form <sup>b</sup>	Gewebeverteilung <sup>c</sup>	Substrat	Polymorphismen auf Proteinebene
1A1	Leber >> extrahepatische Gewebe	Phenole, Paracetamol, 1-HMP	vorhanden
1A2	<i>Leber, Gehirn, Lunge, Niere, Darm</i>	4-Nitrophenol, 1-HMP, OH-AAF, aromatische Hydroxylamine	vorhanden
1A3/1A4	Jejunum- und Kolonmukosa > weitere Gewebe (außer Leber)	Phenole, Catecholamine, Paracetamol	vorhanden
1B1	Gastrointestinaltrakt (vor allem Kolonmukosa), Leber	4-Nitrophenol, Iodothyronine, Diethylstilbestrol, 6-HMBP	vorhanden
1C1	<i>Niere, Magen, Schilddrüse, Ovar, Gehirn; fötale Niere und Lunge</i>	4-Nitrophenol	vorhanden
1C2	<i>Niere, Ovar, Rückenmark; fötale Niere und Lunge</i>	4-Nitrophenol, OH-AAF, 1-HMP	vorhanden
1C3	nicht bekannt	1-HMP, 1- $\alpha$ -HEP, 6-HMBP	nicht bekannt
1E1	Leber, Endometrium, Jejunum; <i>Dünndarm, Haut, Gehirn; fötale Leber, Niere und Lunge</i>	Estradiol, Estron, Iodothyronine, DHEA, 1-Naphthol, 1- $\alpha$ -HEP	vorhanden
2A1	Leber, Nebenniere, Jejunum; fötale Nebenniere	DHEA, Pregnenolon, Testosteron, Cholesterol, benzyliche Alkohole	vorhanden
2B1a/2B1b	<i>Plazenta, Prostata, Trachea</i>	DHEA, Pregnenolon (2B1a), Cholesterol (2B1b)	vorhanden
4A1	Gehirn	nicht bekannt	nicht bekannt
6B1	<i>Hoden</i>	nicht bekannt	vorhanden

<sup>a</sup> Die Angaben entstammen den Publikationen von Glatt (2002), Glatt & Meinel (2004a), Meinel *et al.* (2002), Meinel *et al.* (2008), Hildebrandt *et al.* (2004) sowie Hildebrandt *et al.* (2007).

<sup>b</sup> Die hier verwendete Nomenklatur für Sulfotransferasen folgt den Vorschlägen von Blanchard *et al.* (2004) mit der Ausnahme, dass die bei Blanchard *et al.* (2004) als humane SULT1C2 und SULT1C4 bezeichneten Formen hier als humane SULT1C1 bzw. SULT1C2 bezeichnet werden.

<sup>c</sup> Kursive Schrift zeigt einen Nachweis der Expression auf RNA-Ebene an.

**Tabelle 1.2 Charakteristika einiger SULT-Formen der Ratte<sup>a</sup>**

SULT-Form <sup>b</sup>	Geschlechtsselektivität <sup>c</sup>	Gewebeverteilung <sup>d</sup>
1A1	m > w	Leber > Lunge, Niere, Herz, Gehirn, Nebenniere, Testis
1B1	m ~ w	Leber > Darm, Niere
1C1	m >> w	Leber >> Niere, Milz
1E2	m >> w	Leber >> Herz
2A1 (ST-20/21)	w >> m	Leber >> Nebenniere
2A3 (ST-40/41)	w > m	Leber
2A4 (ST-60)	w >> m	Leber >> Nebenniere

<sup>a</sup> Die Angaben entstammen den Publikationen von Dunn & Klaassen (1998) sowie Liu & Klaassen (1996a) und Liu & Klaassen (1996b).

<sup>b</sup> Die hier verwendete Nomenklatur folgt den Vorschlägen von Blanchard *et al.* (2004). Angaben in Klammern entsprechen der Nomenklatur nach Yamazoe *et al.* (1994).

<sup>c</sup> Die Angaben gelten für die Leber. m Männchen, w Weibchen

<sup>d</sup> Die Gewebsexpression wurde auf RNA-Ebene untersucht.

### 1.2.2 Sulfotransferase-vermittelte Bioaktivierung

Eine Sulfonierung führt nicht in allen Fällen zur Bildung von stabilen Sulfokonjugaten. Die durch Sulfonierung gebildeten Sulfat-, Thiosulfat- und Sulfamat-Gruppen sind elektronenziehend und daher in bestimmten chemischen Verbindungen gute Abgangsgruppen. Durch heterolytische Abspaltung der Gruppen werden elektrophile Carbonium- bzw. Nitreniumionen gebildet. Dies ist insbesondere dann begünstigt, wenn die entsprechenden Kationen Mesomerie-stabilisiert sind.

Der erste elektrophile Metabolit eines Kanzerogens, der entdeckt wurde, war der Schwefelsäureester 2-Acetylaminofluoren-*N*-sulfat (DeBaun *et al.* 1968). In der Folge wurde eine SULT-vermittelte Bioaktivierung auch für weitere kanzerogene aromatische Amine, Alkenylbenzene und benzyllische Alkohole alkylierter PAK gezeigt (Miller 1994).

Eine SULT-vermittelte Bioaktivierung zu genotoxischen Metaboliten wird in Standard-Mutagenitätstests in der Regel nicht erfasst, da SULT in den Indikatororganismen nicht exprimiert werden oder der für die SULT-Aktivität notwendige Kofaktor PAPS fehlt oder nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung steht (Glatt & Meini 2005). Auch bei Verwendung eines externen metabolischen Systems, das mit PAPS angereichert ist, kann die Erfassung genotoxischer Effekte durch eine ungenügende Membranpenetration aktiver Metabolite erschwert sein, die aus der negativen Ladung und der Kurzlebigkeit der Sulfate resultiert

(Glatt & Bartsch 1996). Eine Möglichkeit zur Berücksichtigung SULT-vermittelter Aktivierung bei Standard-Mutagenitätstests besteht in der Verwendung gentechnisch veränderter Indikatororganismen mit heterologer Expression verschiedener SULT-Formen aus verschiedenen Spezies. Unter Verwendung dieser Organismen konnte eine SULT-abhängige Mutagenität vieler Verbindungen (benzylische und allylische Alkohole, aromatische Hydroxylamine und Hydroxamsäuren, sekundäre Nitroalkane) nachgewiesen werden (Glatt 2000). Eine SULT-vermittelte Bioaktivierung zu genotoxischen Metaboliten wurde insbesondere auch für alkylierte PAK wie das 1-Methylpyren gezeigt (siehe 1.1.4.3).

### 1.3 Genotoxizitätsprüfungen

Genotoxizitätsprüfungen dienen der Untersuchung von Substanzen im Hinblick auf mögliche DNA-schädigende Wirkungen. Durch chemische Substanzen induzierte Veränderungen des Erbguts (Mutationen) können zu degenerativen Erkrankungen und Krebserkrankungen beim Träger dieser Veränderung sowie bei Auftreten in der Keimbahn zu genetisch bedingten Krankheiten bei dessen Nachkommen (Erbkrankheiten) führen. Daher sind sie ein wichtiger Bestandteil toxikologischer Prüfungen im Rahmen der Anmeldung bzw. Zulassung von beispielsweise Chemikalien, Pharmaka, Medizinprodukten und Nahrungsmittelzusatzstoffen.

Genotoxizitätsprüfungen umfassen Mutagenitätsprüfungen, über die Mutationen nachgewiesen werden, und Indikatortests, über die Effekte, die mechanistisch mit der Entstehung von Mutationen verknüpft sind, erfasst werden. Im Folgenden sollen zwei Genotoxizitätsprüfverfahren, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, näher erläutert werden.

#### 1.3.1 Prüfung auf kovalente DNA-Bindung (DNA-Addukte)

Unter dem Begriff DNA-Addukt versteht man ein durch ein elektrophiles Molekül kovalent modifiziertes Nukleotid, wobei vorwiegend die nukleophilen Zentren von DNA-Basen betroffen sind. Die DNA-reaktiven Moleküle können endogenen Ursprungs sein wie z.B. Produkte der Lipidperoxidation wie Malondialdehyd oder endogene Alkylantien wie S-Adenosyl-Methionin. Des Weiteren können viele Fremdstoffe im Zuge ihrer Metabolisierung zu reaktiven, elektrophilen Metaboliten umgesetzt werden, die mit zellulären Nukleophilen wie den nukleophilen Zentren der DNA-Basen reagieren und zur Bildung von DNA-Addukten führen.

DNA-Addukte sind primäre DNA-Läsionen, die DNA-Reparaturmechanismen zugänglich sind. Daher stellt der Nachweis von DNA-Addukten lediglich einen Indikatortest dar. Dennoch konnte bei vielen genotoxischen Kanzerogenen sowohl ein Zusammenhang zwischen DNA-Addukten und der Entstehung von Mutationen als auch zwischen der Bildung von DNA-Addukten und dem Auftreten von Tumoren festgestellt werden. So werden DNA-

Addukte, die *in vitro* durch Inkubation mit reaktiven Substanzmetaboliten in eine als Shuttle-Vektor dienende Plasmid-DNA eingeführt wurden, durch anschließende Transfektion in Säugerzellen in diesen zu Mutationen umgesetzt (Bigger *et al.* 2000). Des Weiteren zeigen Tiermodelle, bei denen eine Aktivierung von Substanzen zu genotoxischen Metaboliten aufgrund des Fehlens von aktivierenden Enzymen nicht möglich ist, dass ein Ausbleiben von DNA-Adduktbildung auch mit fehlender Tumorigenität verknüpft ist (Ogawa *et al.* 1999). Der Zusammenhang zwischen DNA-Addukten, Mutagenese und Kanzerogenese wird auch in transgenen Tiermodellen wie z.B. dem Big Blue-System deutlich, die eine simultane Analyse von DNA-Addukten, Mutationen und dem Auftreten von Tumoren erlauben, obwohl eine direkte quantitative Korrelation häufig nicht besteht (Sills *et al.* 2001; Nagao *et al.* 2001). Eine Veröffentlichung von Otteneder & Lutz (1999), in der die 50%ige Tumorzinzidenz in Kanzerogenitätsprüfungen mit simultan bestimmten DNA-Adduktniveaus korreliert wurde, zeigt auf, dass das tumorigene Potenzial der DNA-Addukte verschiedener Substanzen in der Ratte um den Faktor 40 variiert. Zudem werden DNA-Addukte nicht nur in Zielorganen kanzerogener Aktivität, sondern zumeist auch in Organen gefunden, in denen keine Tumore auftreten. Daher müssen noch weitere beispielsweise organspezifische tumorpromovierende Effekte für die Organotropismen der kanzerogenen Aktivität vieler Substanzen verantwortlich sein. DNA-Addukte sind somit bei vielen genotoxischen Kanzerogenen als eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung für Kanzerogenität anzusehen (Hemminki 2000).

Die Bedeutung des Nachweises von DNA-Addukten *in vivo* in Geweben von Mensch und Versuchstier liegt somit darin, dass sie das Potenzial für biologische Konsequenzen wie Mutationen und Kanzerogenität anzeigen und zudem Marker der biologisch effektiven Dosis einer DNA-reaktiven Substanz im untersuchten Gewebe darstellen und eine Aussage zur Gewebeverteilung der reaktiven Substanz erlauben.

Zum Nachweis von DNA-Addukten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung wie beispielsweise Radiolabelling, Immunassays (RIA, ELISA), HPLC-MS, <sup>32</sup>P-Postlabelling und AMS (Accelerator Mass Spectrometry). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Addukte mittels <sup>32</sup>P-Postlabelling analysiert (siehe auch 3.2.5).

### 1.3.2 *Salmonella*-Mutagenitätstest (Ames-Test)

Der *Salmonella*-Mutagenitätstest ist ein Genmutationstest, bei dem verschiedene *Salmonella typhimurium*-Stämme eingesetzt werden. Aufgrund einer Mutation in einem an der Histidin-Biosynthese beteiligten Gen sind diese nicht mehr in der Lage, Histidin selbst zu synthetisieren und können daher in Abwesenheit von Histidin nicht wachsen und keine Kolonien bilden (Histidin-Auxotrophie). Bei Inkubation dieser Stämme mit Mutagenen werden mit bestimmter Wahrscheinlichkeit im Bereich oder in der Nähe der bereits bestehenden Mutation neue Mutationen erzeugt, die die Genfunktion wiederherstellen. Die zur Histidin-Prototrophie mutierten Bakterien (Revertanten) können auch in Abwesenheit von Histidin auf

Mangelnährböden wachsen und sichtbare Kolonien ausbilden. Eine durch eine Substanz induzierte Erhöhung der Zahl an Revertantenkolonien gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Spontanrevertanzahl) zeigt ein mutagenes Potenzial der Substanz an.

Der *Salmonella*-Mutagenitätstest wurde von Bruce N. Ames und Mitarbeitern ausgehend von Untersuchungen zur Identifizierung und Lokalisierung der an der Histidin-Biosynthese beteiligten Gene entwickelt. 1966 stellten Ames & Whitfield eine Testprozedur zum Screening von Chemikalien auf Mutagene mit Hilfe einer Batterie an Histidin-Mutanten-Stämmen vor. Das Testprotokoll basierte anfänglich auf dem sogenannten Spot-Test. Später wurde dann der Platteninkorporationstest entwickelt, der eine Steigerung der Sensitivität und die Möglichkeit einer quantitativen Beurteilung des mutagenen Potenzials der Testsubstanzen brachte (Ames *et al.* 1973b). Eine weitere wesentliche Verbesserung des Testsystems bestand in der Berücksichtigung des Säugermetabolismus durch die zusätzliche Zugabe eines externen metabolisierenden Systems (Ames *et al.* 1973a). Da viele Substanzen nicht per se mutagen sind, sondern erst durch fremdstoffmetabolisierende Säugerenzyme zu mutagenen Metaboliten umgesetzt werden, wurde hierdurch eine bedeutende Sensitivitätssteigerung erreicht. Als metabolisierendes System wird in der Regel postmitochondrialer Überstand von Leberhomogenat der Ratte, der mit einem NADPH-generierenden System angereichert wird (S9-Mix), eingesetzt. Eine weitere Modifikation stellt die Präinkubationsmethode dar (Maron & Ames 1983), bei der eine Lösung der Testsubstanz, die Bakterien und das Expositionsmedium (S9-Mix oder Puffer) zunächst über einen definierten Zeitraum (20 bis 60 min) vorinkubiert werden. Die Präinkubationsmethode zeigt in allen Fällen die gleiche oder sogar eine gesteigerte Sensitivität, was auf eine erhöhte Konzentration der Testsubstanz, der Bakterien sowie des S9-Mix während der Inkubation zurückgeführt wird (Prival *et al.* 1979).

Eine Sensitivitätssteigerung wurde auch durch Weiterentwicklung der Teststämme erreicht. Neben der Mutation im Histidin-Operon tragen alle Standard-Teststämme (außer TA102) eine Deletionsmutation durch das *uvrB*-Gen, was im Verlust eines Proteins der DNA-Nukleotid-Exzisions-Reparatur resultiert und die Sensitivität der Stämme für viele Mutagene erhöht (Ames *et al.* 1973b). Zur Steigerung der Sensitivität gegenüber großen hydrophoben Molekülen wurde eine weitere Mutation eingeführt (*rfa*), die zum Verlust eines großen Teils der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Zellmembran führt (Ames *et al.* 1973b). Einige Stämme (TA97, TA98, TA100, TA102) tragen zusätzlich das R-Faktor-Plasmid pKM101, das ein in den Bakterien natürlicherweise vorkommendes irrtumsträchtiges DNA-Reparatursystem verstärkt und die Detektion von Mutagenen ermöglicht, die in Stämmen ohne pKM101 nicht oder nur schwach ansprechen (McCann *et al.* 1975; Levin *et al.* 1982a; Levin *et al.* 1982b). Bedingt durch die unterschiedlichen Mutationen im Histidin-Operon erkennen die Stämme unterschiedliche Arten von Mutagenen. So detektieren die Stämme



TA1535 und TA100 mit der Basenpaarsubstitution *hisG46* Substanzen, die Basenpaarsubstitutionen verursachen, wobei TA100 auch durch Frameshift-Mutagene revertiert wird (Ames *et al.* 1973b; McCann *et al.* 1975). Die Stämme TA1538 und TA98 tragen die Frameshift-Mutation *hisD3052* und detektieren verschiedene Frameshift-Mutagene. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die Genotypen häufig für Mutagenitätsprüfungen eingesetzter *Salmonella typhimurium*-Stämme.

**Tabelle 1.3 Genotypen gebräuchlicher *S. typhimurium*-Teststämme**

Stamm	Histidin-Mutation	LPS-Status	DNA-Reparatur	Plasmid
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101
TA1538	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-
TA97	<i>hisO1242</i> <i>hisD6610</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101
TA102	<i>hisG428</i>	<i>rfa</i>	+	pKM101, pAQ1

Alle Stämme stammen von *S. typhimurium* LT-2 ab. Wild-Typ-Gene sind durch + gekennzeichnet. Die Deletion ( $\Delta$ ) durch *uvrB* umfasst auch die Nitratreduktase- (*chl*) und Biotin (*bio*)-Gene. Die *rfa uvrB*-Stämme weisen eine einzelne Deletion durch *gal chl bio uvrB* auf. Stamm TA102 (*rfa*, DNA-Reparatur +) hat eine Mutation in *galE* (Maron & Ames 1983).

Neben der Prüfung des mutagenen Potenzials von Substanzen kann der Ames-Test auch für mechanistische Untersuchungen, beispielsweise zur Untersuchung der Kapazität verschiedener Gewebe zur Bioaktivierung bestimmter Substanzen (Glatt *et al.* 1994b; Glatt *et al.* 1994c) oder zur Aufklärung von Metabolismushwegen durch simultane Verabreichung bestimmter Enzyminhibitoren, eingesetzt werden. So wurde beispielsweise mittels Ames-Test die Kapazität verschiedener Gewebe männlicher und weiblicher Ratten zur Sulfotransferase-abhängigen Aktivierung des benzyllischen Alkohols 1-HMP zu einem Mutagen untersucht (Glatt *et al.* 2003).

Ein Problem des Ames-Tests wie auch anderer Genotoxizitätstests stellt die Zugabe des externen metabolisierenden Systems dar. Da die Bioaktivierung der Testsubstanzen außerhalb der Zielzellen erfolgt, müssen die reaktiven Metabolite zunächst die Zellmembran der Bakterien überwinden, um die zelluläre DNA erreichen zu können. Insbesondere bei großen, geladenen Molekülen oder bei sehr instabilen Metaboliten könnte die Penetration der bakteriellen Zellmembran behindert sein, was zu einer Unterschätzung des mutagenen

Potenzials der Testsubstanz führt (Glatt *et al.* 1990). Eine Möglichkeit, das Problem von Membranbarrieren zu vermeiden, besteht in der heterologen Expression der aktivierenden Säugerenzyme direkt in den Indikatorzellen. Heute existieren bereits eine Vielzahl an *S. typhimurium*-Stämmen, die Formen von CYP (Fujita *et al.* 2002), NAT (Muckel *et al.* 2002) oder SULT (Glatt & Meinl 2005) verschiedener Spezies und insbesondere auch des Menschen exprimieren. Da über Anwendung dieser Stämme immer nur ein ganz spezifischer Metabolismusweg berücksichtigt wird, eignen sie sich gut für mechanistische Untersuchungen.

In der Routinetestung unter Verwendung von S9-Mix oder anderer subzellulärer Fraktionen zur Berücksichtigung des säugerspezifischen Metabolismus sind im Expositionsmedium neben den Enzymen alle weiteren zellulären Komponenten insbesondere auch niedermolekulare anorganische Verbindungen enthalten. In einer Untersuchung zum Einfluss der experimentellen Bedingungen auf die Mutagenität von 1-HMP und 1-SMP im *S. typhimurium*-Stamm TA98 konnten Glatt *et al.* (1990) zeigen, dass die mutagenen Effekte beider Substanzen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Expositionsmediums stark variierten. Die stärksten mutagenen Effekte wurden in Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von Chlorid-Anionen gemessen, was auf eine Reaktion des zugegebenen oder metabolisch aus 1-HMP gebildeten reaktiven 1-SMP mit Chlorid zurückgeführt wurde. Das gebildete ebenfalls sehr reaktive Substitutionsprodukt 1-Chlormethylpyren (1-CMP) konnte aufgrund der fehlenden Ladung die bakterielle Zellmembran leichter durchdringen als das negativ geladene 1-SMP und agierte somit als dessen Transportform. In Abwesenheit von Chlorid waren die mutagenen Effekte von zugegebenem oder metabolisch gebildetem 1-SMP stark reduziert.

## 2 Zielstellung

Alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind im Gegensatz zu rein aromatischen Kongeneren hinsichtlich Metabolismus und Bioaktivierung nur wenig untersucht. Sie werden jedoch in vielen PAK-haltigen Matrices neben rein aromatischen Kongeneren gefunden und sind zum Teil in höheren Konzentrationen enthalten als der Referenz-PAK Benzo[a]pyren. Damit könnten alkylierte PAK einen wesentlichen Beitrag zur kanzerogenen Aktivität PAK-haltiger Matrices wie beispielsweise Tabakrauch leisten. Während rein aromatische PAK über Bildung vizinaler Dihydrodiolepxide bioaktiviert werden, können alkylierte PAK zusätzlich über die Alkylseitenkette über benzyliche Hydroxylierung und eine nachfolgende, durch Sulfotransferasen (SULT) katalysierte Sulfonierung zu reaktiven Schwefelsäureestern umgesetzt werden. Die Bioaktivierung zu einem genotoxischen Schwefelsäureester wurde für den benzylichen Alkohol 1-HMP des Hepatokanzerogens 1-Methylpyren (1-MP) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Ratte gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die benzylichen Alkohole weiterer alkylierter PAK über Sulfonierung zu genotoxischen Schwefelsäureestern umgesetzt werden. Hierzu wurde eine Gruppe von 17 Modellsubstanzen ausgewählt, innerhalb der typische Strukturen systematisch variiert wurden, um die Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu ermöglichen (siehe Abb. 2.1).

Zunächst sollte das genotoxische Potenzial benzylicher Metaboliten der Modellsubstanzen in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen vergleichend überprüft werden. Zur Ermittlung des genotoxischen Potenzials authentischer Schwefelsäureester der Testsubstanzen sollten als Endpunkte die DNA-Adduktbildung im zell- und enzymfreien System mittels <sup>32</sup>P-Postlabelling sowie das mutagene Potenzial im *Salmonella*-Mutagenitätstest (Ames-Test) untersucht werden. Die DNA-Adduktbildung der authentischen Schwefelsäureester im zell- und enzymfreiem System sollte zudem als Maß für deren Reaktivität sowie zur Erfassung der substanzspezifischen DNA-Adduktmuster dienen.

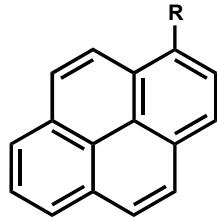
Als ein weiteres Testsystem dienten gentechnisch veränderte *S. typhimurium*-Stämme mit heterologer Expression verschiedener SULT-Formen des Menschen und der Ratte, die für Mutagenitätsprüfungen der benzylichen Alkohole der Testsubstanzen eingesetzt werden sollten. Da die in diesem System beobachteten mutagenen Effekte als Produkt der Reaktivität der gebildeten Schwefelsäureester und der Substratspezifität der exprimierten SULT-Form anzusehen sind, erlaubten diese zudem eine Abschätzung des Umsatzes der einzelnen benzylichen Alkohole durch verschiedene SULT-Formen.

Zur Verifizierung der in den *in vitro*-Testsystemen erhobenen Befunde im Tierversuch sollten einige benzyliche Metabolite alkylierter PAK für *in vivo*-Untersuchungen mit Ratten eingesetzt werden. Ziel der *in vivo*-Untersuchungen war die Überprüfung einer SULT-

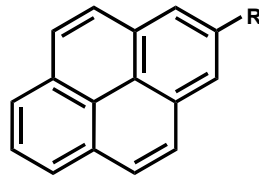
vermittelten Bioaktivierung zu reaktiven Schwefelsäureestern sowie die Erfassung der Bioverfügbarkeit und Gewebeverteilung dieser Metaboliten. Als Endpunkt sollte die DNA-Adduktbildung in verschiedenen Geweben in qualitativer und quantitativer Hinsicht ermittelt werden.

Untersuchungen zum Metabolismus des 1-HMP sowie Inhibitionsstudien in der Ratte hatten gezeigt, dass Oxidationen der Seitenkette, an denen Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Aldehyddehydrogenasen (ALDH) beteiligt sind, den dominierenden Stoffwechselweg und einen Detoxifizierungsmechanismus *in vivo* darstellen. Als ein weiterer Aspekt sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Gabe von ADH/ALDH-Inhibitoren den oxidativen Stoffwechsel von ausgewählten benzylichen Alkoholen alkylierter PAK hemmen bzw. deren SULT-abhängige Aktivierung steigern kann. Parallel galt es mit den ausgewählten Substanzen zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß eine Hemmung des SULT-abhängigen Aktivierungsweges durch Gabe verschiedener SULT-Inhibitoren möglich ist und ob dies zu einer generellen Protektion gegenüber DNA-Schädigungen oder zu einer veränderten Gewebeverteilung dieser führt. Des Weiteren war zu untersuchen, ob die Gabe eines Inhibitors der renalen Sekretion organischer Anionen (Probenecid) die Gewebeverteilung von DNA-Addukten nach Verabreichung der ausgewählten Testsubstanzen beeinflusst. Als Modellsystem für obig beschriebene Untersuchungen sollte wie in vorangegangenen Experimenten die Ratte dienen. Als Endpunkt sollte das DNA-Adduktniveau in verschiedenen Geweben als indirektes Maß für die Bildung reaktiver benzylicher Schwefelsäureester bestimmt werden.

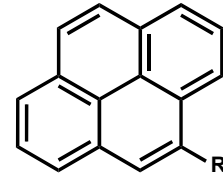
Die genannten Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der Bedeutung einer SULT-vermittelten Bioaktivierung für das genotoxische Potenzial alkylierter PAK beitragen und der Identifizierung kritischer Strukturelemente dienen.



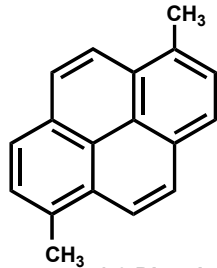
1-Methylpyren R = CH<sub>3</sub>  
1-Ethylpyren R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



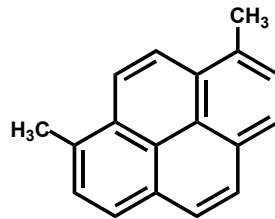
2-Methylpyren R = CH<sub>3</sub>  
2-Ethylpyren R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



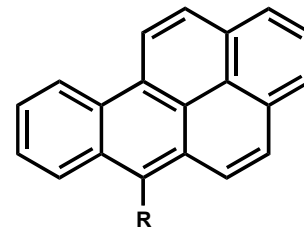
4-Methylpyren R = CH<sub>3</sub>  
4-Ethylpyren R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



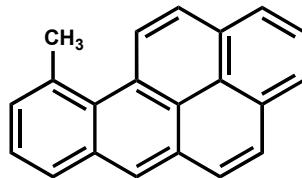
1,6-Dimethylpyren



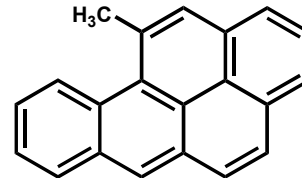
1,8-Dimethylpyren



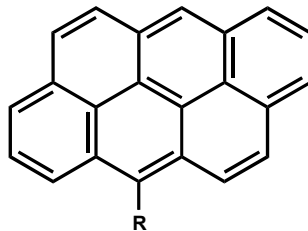
6-Methylbenzo[a]pyren R = CH<sub>3</sub>  
6-Ethylbenzo[a]pyren R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



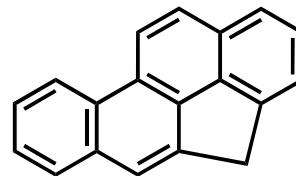
10-Methylbenzo[a]pyren



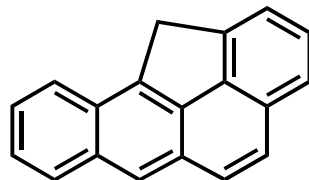
11-Methylbenzo[a]pyren



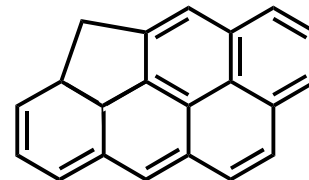
6-Methylanthanthren R = CH<sub>3</sub>  
6-Ethylanthanthren R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



Cyclopenta[def]chrysen



Cyclopenta[pqr]benz[a]anthracen



Cyclopenta[mno]benzo[a]pyren

Abbildung 2.1 Als Modellsubstanzen ausgewählte alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Brutschrank WTC (Binder, Tuttlingen)

Counter Artek 880 (Fa. Dynatech Laboratories, Chantilly, USA)

DC-Fertigfolien Polygram CEL300 PEI 20x20 cm, Charge 06/04 (Fa. Machery-Nagel, Düren)

Inkubationsblock Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Inkubations-Schüttelschrank Certomat BS-1 (Fa. Braun Biotech, Melsungen)

InstantImager<sup>®</sup> (Fa. Canberra Packard, Meriden, USA)

Schüttelwasserbad Typ 1083 (Fa. Labotec, Wiesbaden)

Speed Vac<sup>®</sup> Concentrator CS 110 (Fa. Savant Instruments, Holbrook, USA) mit  
Kühlfalle RVT 100 und Pumpe RS15 (Fa. Brand, Wertheim)

Spektrophotometer Gene Quant II (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Spektrophotometer Nano Drop ND-1000 (Fa. Peqlab, Erlangen)

Spektrophotometer Ultrospec-plus 4054 (Fa. LKB, Cambridge, GB)

Ultra-Turrax T25 (Fa. IKA Labortechnik, Staufen)

Wasserbad Julabo SW-21C (Fa. Julabo, Seelbach)

Zentrifuge Biofuge primoR (Fa. Kendro, Hanau)

Zentrifuge Centrifuge 5403 (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge SIGMA 4K10 (Fa. Braun Biotech, Melsungen)

#### 3.1.2 Chemikalien

1-Hydroxymethylpyren (1-Pyrenylmethanol) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2-Ethoxyethanol (Fa. Roth, Karlsruhe)

2-Propanol (Fa. Roth, Karlsruhe)

4-Methylpyrazol, Hydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ameisensäure (Fa. Roth, Karlsruhe)

Ammoniumhydroxid, 5 N (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ampicillin, Natriumsalz (Fa. Biomol, Hamburg)

Bacto-Agar (Fa. Difco, Detroit, USA)

Bacto Nutrient Broth (Fa. Difco, Detroit, USA)

Benzo[*a*]pyren-4,5-oxid (Dr. A. Seidel, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene,  
Grosshansdorf)

Bernsteinsäure (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Bicine (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

D-Biotin (Fa. Merck, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (Fa. Roth, Karlsruhe)  
Disulfiram (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Dithiotreitol (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
EDTA (Fa. Roth, Karlsruhe)  
Ethanol (Fa. Roth, Karlsruhe)  
 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, > 7000 Ci/mmol (Fa. Hartmann Analytik, Braunschweig)  
Gas für Instant Imager<sup>®</sup>: 96,5% Argon, 1% Isobutan, 2,5% CO<sub>2</sub> (Fa. Linde, München)  
Harnstoff p.a. (Fa. Roth, Karlsruhe)  
Heringsperma-DNA, Natriumsalz (Fa. Boehringer, Mannheim)  
L-Histidin (Fa. Merck, Darmstadt)  
Lithiumchlorid (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Lithiumhydroxid-Monophosphat (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
L-Tryptophan (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Natriumdihydrogen-Phosphat-Dihydrat (Fa. Roth, Karlsruhe)  
Nutrient Broth No. 2 (Fa. Oxoid, Basingstoke, Großbritannien)  
Pentachlorphenol, Natriumsalz (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Probenecid (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Quercetin, Dihydrat (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Reinstwasser: MilliQ<sup>®</sup> Anlage (Fa. Millipore, Billerica, USA)  
Spermidin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Fa. Serva, Heidelberg)  
TRIS (Fa. Roth, Karlsruhe)

Alle übrigen verwendeten Chemikalien waren mindestens von p.a. Qualität und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Für sämtliche wässrige Lösungen wurde Reinstwasser aus der MilliQ®-Anlage genutzt, das im Folgenden als Reinstwasser bezeichnet wird.

D1-Fließmittel:	1 M Natriumdihydrogenphosphat, pH 6,0
D3-Fließmittel:	3,5 M Lithiumformiat, 8,5 M Harnstoff, pH 3,5
D4-Fließmittel:	0,8 M Lithiumchlorid, 0,5 M Tris, 8,5 M Harnstoff, pH 8,0
D4 <sup>+</sup> -Fließmittel:	1 M Ammoniumhydroxid
Fließmittel NN:	0,3 M Ammoniumsulfat, 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
Kinasepuffer:	200 mM Bicine, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Dithiotreitol, 10 mM Spermidin, pH 9,0
Natriumsuccinat-Puffer:	100 mM Natrium-Succinat, 50 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6,0
Natriumcitratpuffer:	0,15 mM Natriumcitrat, 1,5 mM NaCl, pH 7,5
Lysispuffer:	50 mM TRIS, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH 8,0
Nährmedium:	25 g Nutrient Broth No. 2 in 1000 ml Reinstwasser
Resuspensionsmedium:	1,6 g Bacto Nutrient Broth, 5 g NaCl in 1000 ml Reinstwasser
HBT-Lösung:	500 µM L-Histidin, 500 µM D-Biotin, 500 µM L-Tryptophan in 250 mM Phosphatpuffer pH 7,4
Topagar:	30 g Bacto-Agar, 30 g NaCl in 5000 ml Reinstwasser
Minimalagar:	15 g/l Agar, 20 g/l Glukose in Vogel-Bonner E Medium

### 3.1.4 Enzyme

Mikrokokkus-Nuklease (MN) aus *Staphylococcus aureus* (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Phosphodiesterase II aus Kalbsmilz (SPD) (Fa. Calbiochem, Schwalbach)

Nuklease P1 aus *Penicillium citrinum* (Fa. MP Biomedicals, Heidelberg)

T4-Polynukleotidkinase (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Proteinase K aus *Tritirachium album* (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen und Fa. Roth, Karlsruhe)

RNase A aus bovinem Pankreas (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)



### 3.1.5 Testsubstanzen

Die als Testsubstanzen verwendeten benzyliche Alkohole und Schwefelsäureester alkylierter PAK wurden mit Ausnahme von 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP), das von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen wurde, von Dr. Albrecht Seidel, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Grosshansdorf synthetisiert. Die Reinheit der benzylichen Alkohole betrug > 99% und die der benzylichen Schwefelsäureester > 95%, analysiert über HPLC-UV.

**Tabelle 3.1 Als Testsubstanzen verwendete Metabolite alkylierter PAK**

Benzyliche Alkohole (Abkürzung)	Benzyliche Schwefelsäureester (Abkürzung)
1-Hydroxymethylpyren (1-HMP)*	1-Sulfoxymethylpyren (1-SMP)
2-Hydroxymethylpyren (2-HMP)	2-Sulfoxymethylpyren (2-SMP)
4-Hydroxymethylpyren (4-HMP)	4-Sulfoxymethylpyren (4-SMP)
1-Hydroxymethyl-6-methylpyren (1-HM-6-MP)	1-Sulfoxymethyl-6-methylpyren (1-SM-6-MP)
1-Hydroxymethyl-8-methylpyren (1-HM-8-MP)	1-Sulfoxymethyl-8-methylpyren (1-SM-8-MP)
1- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren (1- $\alpha$ -HEP)	
2- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren (2- $\alpha$ -HEP)	2- $\alpha$ -Sulfoxyethylpyren (2- $\alpha$ -SEP)
4- $\alpha$ -Hydroxyethylpyren (4- $\alpha$ -HEP)	4- $\alpha$ -Sulfoxyethylpyren (4- $\alpha$ -SEP)
6-Hydroxymethylbenzo[a]pyren (6-HMBP)	6-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren (6-SMBP)
6- $\alpha$ -Hydroxyethylbenzo[a]pyren (6- $\alpha$ -HEBP)	
10-Hydroxymethylbenzo[a]pyren (10-HMBP)	10-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren (10-SMBP)
11-Hydroxymethylbenzo[a]pyren (11-HMBP)	11-Sulfoxymethylbenzo[a]pyren (11-SMBP)
4-Hydroxycyclopenta[def]chrysen (HCPC)	4-Sulfoxycyclopenta[def]chrysen (SCPC)
10-Hydroxycyclopenta[mno]benzo[a]pyren (HCPBP)	10-Sulfoxycyclopenta[mno]benzo[a]pyren (SCPBP)
11-Hydroxycyclopenta[pqr]benz[a]anthracen (HCPBA)	11-Sulfoxycyclopenta[pqr]benz[a]anthracen (SCPBA)
6-Hydroxymethylanthanthren (6-HMAA)	
6- $\alpha$ -Hydroxyethylanthanthren (6- $\alpha$ -HEAA)	

\* bezogen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.1.6 Bakterienstämme

Bei den in dieser Arbeit für Mutagenitätsprüfungen verwendeten *Salmonella typhimurium*-Stämmen handelte es sich um den Stamm TA1538a, einen in der Arbeitsgruppe herangezogenen Substamm des Stammes TA1538 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. N. Ames, Berkeley, Kalifornien), sowie weitere in der Arbeitsgruppe auf Grundlage des Stammes TA1538 bzw. TA1538a hergestellte Stämme, die verschiedene Formen zytosolischer Sulfotransferasen (SULT) des Menschen (Präfix: h) bzw. der Ratte (Präfix: r) exprimieren (Tabelle 1.2).

**Tabelle 3.2 Bakterienstämme für *Salmonella*-Mutagenitätsprüfungen <sup>a</sup>**

Bakterienstamm	exprimierte SULT-Form
TA1538a-hST1A1*1Y	hSULT1A1
TA1538a-hST1A2*1Z	hSULT1A2
TA1538-hM-PST	hSULT1A3
TA1538-hST1B2	hSULT1B1
TA1538-hST1C1	hSULT1C1
TA1538a-hST1C2	hSULT1C2
TA1538a-hST1C3	hSULT1C3
TA1538a-hEST	hSULT1E1
TA1538a-hHST	hSULT2A1
TA1538-hST2B1a	hSULT2B1a
TA1538a-hST2B1b*1X	hSULT2B1b
TA1538a-rST1A1-DD	rSULT1A1
TA1538a-rST1B1	rSULT1B1
TA1538a-rST20	rSULT2A1 (ST-20/21)
TA1538-rHSTa	rSULT2A3 (ST-40/41)
TA1538a-rST60	rSULT2A4 (ST-60)

<sup>a</sup> Nähere Angaben zur Herstellung der SULT-exprimierenden Stämme sind Glatt & Meinel (2005), Glatt & Meinel (2004b), Meinel *et al.* (2002), Glatt *et al.* (1998) sowie Hagen *et al.* (1998) zu entnehmen. In allen Fällen wurde die Referenz (Wildtyp)-Aminosäuresequenz exprimiert, obwohl in einigen Fällen aus verschiedenen technischen Gründen stille Nukleotidaustausche in einige cDNAs eingeführt wurden (Meinel *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur für Sulfotransferasen folgt den Vorschlägen von Blanchard *et al.* (2004) mit der Ausnahme, dass die bei Blanchard *et al.* (2004) als humane SULT1C2 und SULT1C4 bezeichneten Formen in dieser Arbeit als humane SULT1C1 bzw. SULT1C2 bezeichnet werden.

### 3.1.7 Tiere

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden von den Charles River Laboratories, Sulzfeld, männliche Wistar (Han)-Ratten bezogen (CrI:WI(Han)), bei denen es sich um konventionelle Auszuchttiere handelt. Die Tiere wurden im Alter von ca. 6 Wochen und einem Gewicht von  $100 \pm 20$  g angeliefert und nach zehntägiger Adaptionszeit für die Versuche eingesetzt. Während der Adaption und der Versuche wurden die Tiere unter konventionellen Bedingungen gehalten:

Licht/Dunkel-Regime:	06/18 Uhr
Raumtemperatur:	$22 \pm 2$ °C
Luftfeuchtigkeit:	$55 \pm 5$ %
Futter:	Altromin 1326 <i>ad libitum</i>
Trinkwasser:	Leitungswasser <i>ad libitum</i>
Einstreu:	Altromin 3-4

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 *In vitro*-Adduktierung von DNA

Zur *in vitro*-Adduktierung wurden benzyllische Schwefelsäureester in einer Konzentration von 30 mM zur Erfassung von DNA-Adduktmustern bzw. von 1 mM zur Ermittlung der Nukleotidspezifität sowie zur quantitativen Bestimmung von DNA-Addukten in DMSO gelöst und jeweils 2 µl dieser Lösungen zu 100 µl einer wässrigen Lösung von Heringsperma-DNA (1 µg/µl) gegeben. Nach kurzem Mischen mittels Vortexer und kurzer Anzentrifugation wurden die Inkubationsansätze für 60 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Inkubationsansätze auf Eis gestellt. In der Lösung verbliebener Schwefelsäureester wurde nun durch einmaliges Ausschütteln mit 200 µl n-Butanol und durch Hydrolyse gebildeter benzyllischer Alkohol sowie weitere lipophile Degradationsprodukte durch einmaliges Ausschütteln mit 200 µl n-Heptan entfernt. Zur weiteren Aufreinigung der adduktierten DNA wurde diese durch Zugabe von 10 µl kaltem 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 150 µl eiskaltem 2-Ethoxyethanol, 30-minütige Standzeit bei -80°C und anschließende Zentrifugation bei 20000 g für 30 min bei 4°C gefällt. Nach Abnahme des Überstandes wurde die DNA in 100 µl Reinstwasser gelöst und die DNA-Konzentration mit einer wässrigen 1:20-Verdünnung photometrisch über Messung der Absorption bei 260 nm gegen Wasser bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm wurde hierbei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt.

### 3.2.2 Mutagenitätstest in *Salmonella typhimurium* (Ames-Test)

Zur Untersuchung der Mutagenität der benzyllischen Schwefelsäureester im SULT-defizienten Stamm TA1538a sowie der Mutagenität der benzyllischen Alkohole in den SULT-profizienten TA1538(a)-Stämmen wurde der Mutagenitätstest nach der Standard-Präinkubationsmethode durchgeführt (Maron & Ames 1983). Die Stämme wurden am Vortag der Testdurchführung aus Kryokulturen in Nährmedium ohne (TA1538a) bzw. mit (SULT-profiziente TA1538(a)-Stämme) Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 150 rpm und 37°C geschüttelt. Für den Einsatz im Test wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 4°C, 9200 g) und in Resuspensionsmedium aufgenommen. Nach Einstellung der Bakteriendichte auf  $10^8$  bis  $10^9$  Koloniebildende Einheiten/ml Medium (optische Dichte bei 691 nm =  $0,70 \pm 0,05$ ) wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert. Für Mutagenitätsstudien der Schwefelsäureester wurden die Bakterien in 1/5 Volumen Reinstwasser und für Mutagenitätsstudien der benzyllischen Alkohole in 1/5 Volumen Resuspensionsmedium aufgenommen und in dieser Form für die Tests eingesetzt (fünffach höhere Bakteriendichte als ursprünglich von Ames vorgeschlagen).

Zur Bestimmung der Mutagenität der Schwefelsäureester wurden jeweils 500 µl Expositionsmedium (Reinstwasser oder 150 mM KCl) mit 100 µl der eingestellten Bakteriensuspension in Glasröhrchen gemischt und für 2 min bei 37°C vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der Testsubstanz gelöst in jeweils 10 µl DMSO und es wurde für weitere 20 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jede Testsubstanz wurde in mehreren geeigneten Konzentrationsstufen getestet und pro Konzentrationsstufe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Lösungsmittelkontrollen wurden lediglich 10 µl DMSO zugegeben. Als Positivkontrolle diente die Substanz Benzo[*a*]pyren-4,5-oxid, die bereits ohne metabolische Aktivierung mutagen ist. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu jedem Ansatz 2 ml zu 10% mit HBT-Lösung angereicherter Topagar gegeben, kurz gemischt und die Lösung auf Minimalagar-Platten ausplattiert. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurden die auf den Platten sichtbaren Kolonien (= Revertanten) ausgezählt.

Mutagenitätsstudien der benzyllischen Alkohole erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll mit folgenden Änderungen: als Expositionsmedium diente eine Lösung von 100 mM Magnesiumsulfat (Sulfatquelle für PAPS-Synthese in *S. typhimurium*) und die Inkubation erfolgte über 60 min bei 37°C.

In jedem Versuch wurden parallel eine Keimzahlbestimmung sowie eine Überprüfung der Ampicillin-Resistenz (kodiert über Plasmid pKK233-2, das die SULT-cDNA-Sequenz trägt) der Stämme durchgeführt. Werte für Keimzahl, Ampicillin-Resistenz und Spontanrevertanzahl im Bereich historischer Kontrolldaten bzw. Literaturdaten waren Akzeptanzkriterien für einen durchgeführten Test.

Als Maß für das mutagene Potenzial der Testsubstanzen wurde für jedes Experiment die spezifische Mutagenität der Testsubstanz, ausgedrückt in Revertanten pro nmol, ermittelt. Hierzu wurden die Dosisstufen herangezogen, bei denen die Zahl der Revertanten mindestens das Doppelte der Revertanzahl der Lösungsmittelkontrolle (Spontanrevertanzahl) betrug. Von den entsprechenden Revertanzahlen wurde die Spontanrevertanzahl abgezogen und der dann erhaltene Wert durch die zugehörige Dosis der Testsubstanz (in nmol) dividiert. Der höchste auf diese Weise erhaltene Wert, dessen zugehörige Revertanzahl mehr als das Doppelte der Spontanrevertanzahl betrug und innerhalb des initialen linearen Dosis-Wirkungsbereichs lag, wurde als spezifische Mutagenität der Testsubstanz definiert.

### 3.2.3 Tierversuche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Tierversuche mit konventionellen jungen männlichen Wistar (Han)-Ratten durchgeführt. Charakteristika der Tiere sowie die Haltungsbedingungen sind unter Punkt 3.1.7 beschrieben. Die Tiere wurden nach einer Adaptionsphase von 10 Tagen für die Versuche eingesetzt und hatten während dieser Zeit und während des Versuchs freien Zugang zu Futter und Wasser. Lediglich vor Applikationen, die mittels Schlundsonde durchgeführt werden sollten, wurde den Tieren zur Sicherstellung einer maximalen Resorption der verabreichten Substanzen am Abend vor der Applikation das Futter entzogen. Die während des Versuchs notwendigen Applikationen wurde ohne Narkose durchgeführt. Alle Tiere wurden bei Versuchsende ohne Narkose durch Dekapitation getötet und makroskopisch untersucht. Leber, Nieren und Lunge wurden entnommen und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Organe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für den unter 4.4.2 beschriebenen Versuch wurden mit Ausnahme des 1-SMP, für das lediglich  $27,8 \mu\text{mol/kg}$  KM eingesetzt wurden, pro Testsubstanz drei Tiere mit  $250 \mu\text{mol/kg}$  Körpermasse (KM) Testsubstanz gelöst in jeweils  $500 \mu\text{l}$  DMSO intraperitoneal (i.p.) appliziert. Kontrolltiere erhielten nur  $500 \mu\text{l}$  des Lösungsmittels DMSO. Nach drei Stunden wurden die Tiere getötet.

Für den unter 4.5.2 beschriebenen Versuch wurde 1-HM-8-MP in Dosen von  $250 \mu\text{mol/kg}$  KM und  $83,3 \mu\text{mol/kg}$  KM, gelöst in je  $500 \mu\text{l}$  DMSO, jeweils vier Tieren i.p. appliziert und je zwei Tiere nach eineinhalb und drei Stunden getötet. Analog zum 1-HM-8-MP wurde beim 1-HMP verfahren, das jedoch nur in einer Dosis von  $83,3 \mu\text{mol/kg}$  KM appliziert wurde. Auf die Applikation einer Dosis von  $250 \mu\text{mol/kg}$  KM wurde verzichtet, da Daten zum zeitlichen Verlauf der DNA-Adduktbildung bei dieser Dosis bereits aus früheren Arbeiten vorlagen (Kuhlow 2001) bzw. in der vorliegenden Arbeit untersucht worden waren (siehe 4.4.2).

Für die unter 4.5.3 und 4.5.4 beschriebenen Versuche wurde zunächst jeweils einer der Modulatoren an zehn Tiere verabreicht und nach definierten Zeitspannen einmalig 1-HMP oder 1-HM-8-MP jeweils fünf Tieren in einer Dosis von 83,3  $\mu\text{mol/kg}$  KM gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) i.p. appliziert. Eine Übersicht über das Behandlungsprotokoll in den Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen im Modulatorenversuch geben die Tabellen 3.3 und 3.4.

**Tabelle 3.3 Behandlungsprotokoll der Versuchsgruppen**

Modulator				Anzahl Tiere	
				Benzylischer Alkohol (BA)	
Substanz	Dosis/kg KM	Applikation	Zeit bis BA- Applikation	1-HMP	1-HM-8-MP
PCP	40 $\mu\text{mol}$ in 10 ml Wasser	oral	40 min	5	5
Quercetin	40 $\mu\text{mol}$ in 10 ml Wasser	oral	1,5 h	5	5
4-Methyl- pyrazol	1 mmol in 10 ml Wasser	oral	10 min	-	5
Ethanol	35 mmol in 10 ml Wasser	oral	10 min	-	5
Disulfiram	0,25 mmol in 2,5 ml DMSO	i.p.	16 h	-	5
Probenecid	0,7 mmol in 10 ml 0,9% NaCl	i.p.	30 min	5	5

**Tabelle 3.4 Behandlungsprotokoll der Kontrollgruppen**

Modulator-Lösungsmittel				Anzahl Tiere	
				Benzylischer Alkohol (BA)	
Art	Dosis	Applikation	Zeit bis BA- Applikation	1-HMP	1-HM-8-MP
Trinkwasser <sup>a</sup>	10 ml/kg KM	oral	40 min	5	5
DMSO <sup>b</sup>	2,5 ml/kg KM	i.p.	16 h	-	5
0,9% NaCl <sup>c</sup>	10 ml/kg KM	i.p.	30 min	5	5

<sup>a</sup> Kontrollgruppe für Pentachlorphenol, Quercetin, 4-Methylpyrazol und Ethanol

<sup>b</sup> Kontrollgruppe für Disulfiram

<sup>c</sup> Kontrollgruppe für Probenecid

### 3.2.4 DNA-Isolierung aus tierischen Geweben

Zur Isolierung von DNA aus Tiergeweben für DNA-Adduktanalysen mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling wurden drei Methoden ausgetestet: Phenol-Chloroform-Extraktion (Methode nach Gupta 1984), DNA-Isolierung über Qiagen Genomic DNA-Kit (laut Handbuch) sowie Salzextraktion (siehe unten). Da alle drei Methoden bei gleicher Zeitdauer der Inkubation mit Proteinase K vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich DNA-Ausbeute, DNA-Reinheit ( $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis) sowie der DNA-Adduktniveaus lieferten, wurde die Salzextraktion als schnellste Methode für die DNA-Isolierung ausgewählt.

Zur DNA-Isolierung über Salzextraktion wurde jeweils das gesamte Organ in ein stabiles Glasröhrchen überführt und nach Zugabe von 1,5 ml 10 mM EDTA pH 8,0 mit einem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert. Ein Aliquot des Homogenats (ca. 150  $\mu\text{l}$ ) wurde in ein 15-ml-Falcon überführt und zur Entfernung von eventuell im Organ verbliebenen Restmengen an reaktiver Testsubstanz bzw. reaktiven Metaboliten zunächst zweimal mit je 600  $\mu\text{l}$  n-Butanol und anschließend einmal mit 600  $\mu\text{l}$  n-Heptan ausgeschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml Lysispuffer wurde das Homogenat nochmals kurz mit dem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert, dann weitere 2 ml Lysispuffer und 100  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung (10 mg/ml in 10 mM EDTA pH 8,0) zugegeben und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dieses Verfahren wurde für Organe aus dem unter Punkt 4.4 beschriebenen Tierversuch angewandt. Bei den Organen aus den übrigen Tierversuchen wurde auf einen zusätzlichen Extraktionsschritt verzichtet und das Organhomogenataliquot direkt dem Proteinase K-Inkubationsschritt (Zugabe 3 ml Lysispuffer und 100  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung) zugeführt, da in den entsprechenden Organen keine Testsubstanz- bzw. Metaboliten-Restmengen gefunden wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lysat für 10 min auf Eis gestellt, dann zur Fällung der Proteine mit 1,5 ml einer 5 M NaCl-Lösung versetzt und zum Mischen mehrmals invertiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 11200 g pelletiert. Nach Abnahme von 3 ml des Überstandes wurden 10  $\mu\text{l}$  RNase A-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,4) zugegeben und zum Abbau der enthaltenden Ribonukleinsäuren für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 2 ml 2-Propanol und mehrmaliges Invertieren die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 11200 g pelletiert. Nach Waschen des DNA-Pellets mit 70%igem eiskaltem Ethanol und 5-10-minütigem Trocknen wurde das DNA-Pellet in geeigneten Volumina Natrium-Citratpuffer aufgenommen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit geeigneten Verdünnungen photometrisch über Messung der Absorption bei 260 nm, wobei eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gleichgesetzt wurde.

### 3.2.5 Bestimmung von DNA-Addukten mittels $^{32}\text{P}$ -Postlabelling

Die qualitative und quantitative Bestimmung von DNA-Addukten erfolgte über das  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling-Verfahren gemäß den von Phillips & Castegnaro (1999) vorgeschlagenen Modifikationen. Hierzu wurden DNA-Proben in einer Menge von 1-5  $\mu\text{g}$  zunächst bis zur Trockne eingedampft und dann mittels eines Enzymgemisches aus Mikrokoccus-Nuklease und Milz-Phosphodiesterase in Pufferlösung bei  $37^\circ\text{C}$  über 4 h inkubiert und dabei zu den entsprechenden 3'-Phosphomononukleotiden hydrolysiert. Nach Ablauf von 2 h der Inkubationszeit wurde das Enzymgemisch aufgrund Instabilität der verwendeten Phosphodiesterase nochmals frisch zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des Enzyms Nuklease P1 in Pufferlösung und es wurde für eine weitere Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zugabe von Nuklease P1 diente der Hydrolyse normaler Nukleotide zu den entsprechenden Nucleosiden und damit der Anreicherung von mit PAK-Molekülen adduktierten 3'-Phosphomononukleotiden. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 0,5 M Tris abgestoppt und die Proben bis zur Labelling-Reaktion auf Eis aufbewahrt. Die  $^{32}\text{P}$ -Markierung von mit PAK adduktierten 3'-Phosphomononukleotiden erfolgte über das Enzym T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK), welches 3'-Phosphomononukleotide in  $[\text{}^{32}\text{P}]$  3',5'-Biphosphomononukleotide überführt. Die T4-PNK wurde gemeinsam mit  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -Adenosyltriphosphat als  $^{32}\text{P}$ -Quelle in Pufferlösung zum Inkubationsmix gegeben, der für weitere 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert wurde. Das genaue Inkubationsschema der bisher beschriebenen enzymatischen Reaktionen ist unten nochmals dargestellt.

Die Aufreinigung und Auftrennung der verschiedenen adduktierten Nukleotide erfolgte im Anschluss mittels multidirektionaler Dünnschichtchromatographie. Hierzu wurde von jeder Probe ein Aliquot von 9  $\mu\text{l}$  auf einen definierten Bereich (Auftragspunkt) einer mit PEI-Cellulose beschichtete Dünnschichtchromatographie-Karte (10 x 20 cm), an deren Oberkante ein Filterpapier (10 x 10 cm) befestigt worden war, aufgetragen und über Nacht mit dem Fließmittel D1 in D1-Richtung chromatographiert (siehe Schema Dünnschichtchromatographie). Dieser erste Chromatographieschritt diente der Ablösung von markierten normalen Nukleotiden und überschüssigem  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP vom Auftragspunkt, wobei die adduktierten Nukleotide aufgrund der vom gebundenen Fremdstoffmolekül vermittelten Hydrophobität am Auftragspunkt verblieben. Nach diesem ersten Chromatographieschritt wurde jeweils die obere Kartenhälfte mit dem Filterpapier abgeschnitten und die verbliebenen Kartenstücke mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Auftrennung der am Auftragspunkt verbliebenen adduktierten Nukleotide erfolgte anschließend durch Chromatographie in Richtung D3 mit Fließmittel D3 und zweimalige Chromatographie in D4-Richtung mit Fließmittel D4 bzw. D4+, wobei die Karten jeweils vor dem Einstellen in ein neues Fließmittel zunächst mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet wurden.



Nach dem letzten Chromatographieschritt wurden die Karten getrocknet und im InstantImager<sup>®</sup> vermessen.

Der InstantImager<sup>®</sup> ist ein direkter Beta/Gamma-Counter, der über einen angeschlossenen Rechner und eine entsprechende Software Echtzeitaufnahmen der vermessenen Proben liefert und die Chromatogramme direkt in elektronischer Form verfügbar macht (elektronische Autoradiographie). Die auf den DC-Karten befindlichen mit <sup>32</sup>P markierten adduktierten Nukleotide erscheinen in den elektronischen Chromatogrammen als schwarze Adduktstellen. Neben der Visualisierung ermöglicht die Imager-Software eine Quantifizierung von DNA-Addukten, indem die Adduktstellen manuell markiert und vom Programm die in den Flecken enthaltenen Aktivitäten in CPM (counts per minute) angegeben werden. Über den von der Imager-Software gelieferten CPM-Wert wurde das zugehörige DNA-Adduktniveau auf Grundlage der spezifischen Aktivität des verwendeten  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP berechnet. Die spezifische Aktivität des  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in CPM/fmol wurde für jede T4-PNK-Charge nach Reddy & Randerath (1986) experimentell bestimmt. Hierzu wurden 2,5 pmol 2'-Deoxyguanosin-3'-monophosphat (dGp) wie die DNA-Proben gelabelt, mit Wasser verdünnt und Aliquote auf PEI-Cellulose-Karten zweimal eindimensional mit dem Fließmittel für normale Nukleotide (NN) entwickelt. Aus der Aktivität des pdGp-Fleckes wurde die spezifische Aktivität in CPM/fmol berechnet.

Die Berechnung der Adduktniveaus erfolgte nach der Formel:

$$DNA - Addukte / 10^8 \text{ Nukleotide} = \frac{CPM \times 33 \times AF}{\text{Spezif. Aktivität (CPM / fmol)} \times \mu\text{g DNA}}$$

CPM:	CPM-Wert der Adduktstellen
33:	Umrechnungsfaktor (1 fmol Addukt / $\mu\text{g DNA} = 33 \text{ Addukte} / 10^8 \text{ Nukleotide}$ )
AF:	Aliquotfaktor (Verhältnis Gesamtvolumen zu aufgetragenem Volumen)
$\mu\text{g DNA}$ :	eingesetzte DNA-Menge

Von allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Lag der Variationskoeffizient beider Bestimmungen einer Probe > 40% wurde die Probe nochmals gelabelt.

Um die interexperimentelle Variation in qualitativer und quantitativer Hinsicht so gering wie möglich zu halten, wurden Proben, die miteinander verglichen werden sollten, innerhalb eines möglichst engen zeitlichen Rahmens analysiert und die gleichen Chargen an Enzymen, Pufferlösungen und Chromatographiekarten genutzt. Zudem wurde in jedem Experiment eine Standard-DNA (*in vitro* mit 20  $\mu\text{M}$  1-SMP adduktierter Heringsperma-DNA) in Doppelbestimmung mitgeführt.

Inkubationsschema <sup>32</sup>P-PostlabellingDNA-Verdau 4 h bei 37°C

Lösung	µl pro Probe
Reinstwasser	2,8
Natrium-Succinatpuffer	0,8
Mix aus Mikrokoccus-Nuklease und Milz-Phosphodiesterase (MN/SPD; MN: 90 mU/µl, SPD: 2 mU/µl)	1,2 nach 2 h: 1,2
	Σ 6

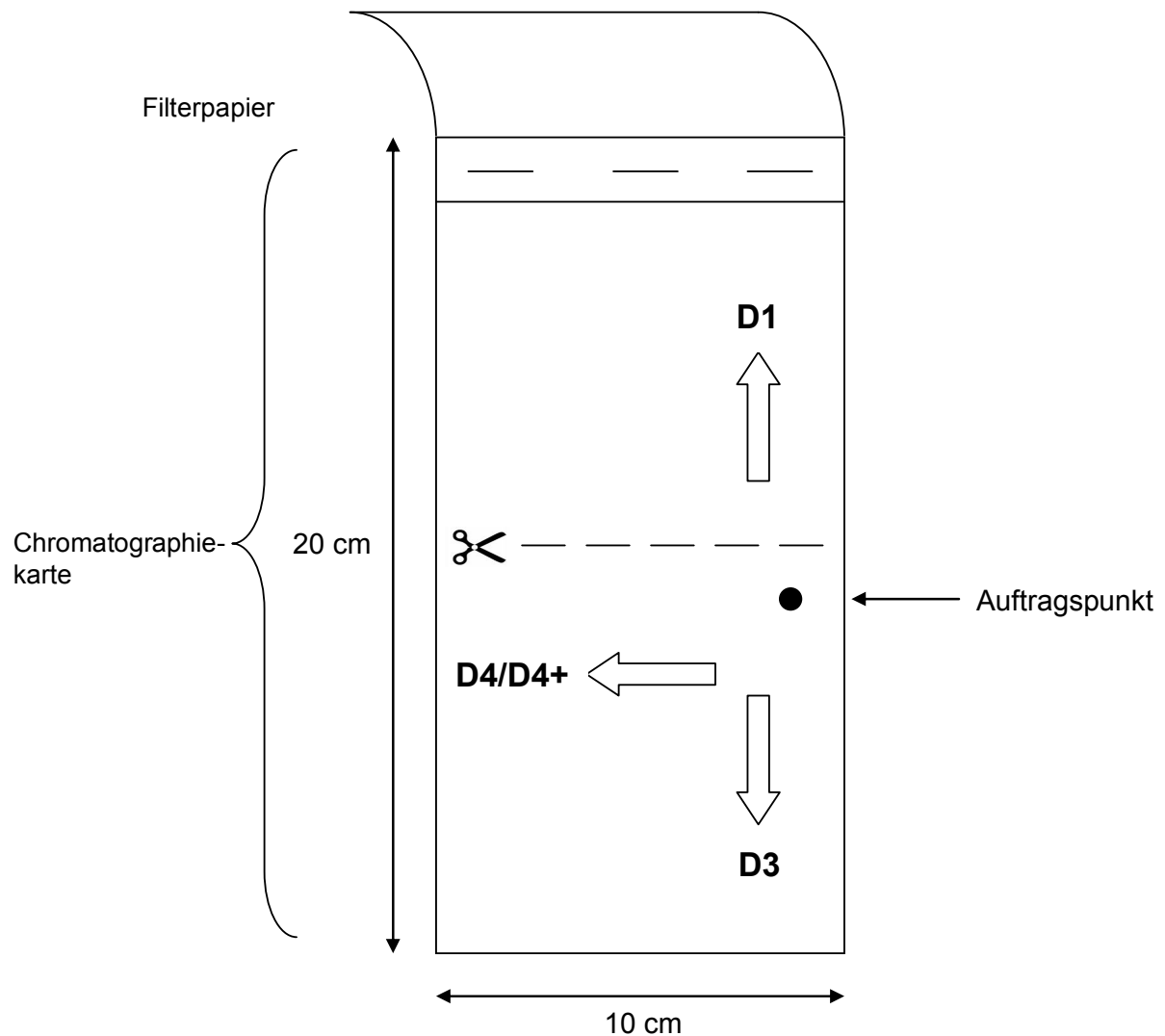
Nuklease P1-Anreicherung 1 h bei 37°C

Lösung	µl pro Probe
Natriumacetat (0,25 M, pH 5,0)	2,4
ZnCl <sub>2</sub> (0,3 mM)	1,44
NP1 (0,25 U/µl)	0,96
	Σ 4,8

Abstoppen Reaktion: 0,5 M Tris 1,92 µl

Labelling-Reaktion 30 min bei 37°C

Lösung	µl pro Probe
Kinasepuffer	1
T4-PNK (10 U/µl)	0,6
γ- <sup>32</sup> P-ATP	50 µCi entsprechendes Volumen

Schema Chromatographie**3.2.6 Statistik**

Zur Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurde der Mann-Whitney Rangsummentest durchgeführt. Aufgrund der gewählten Bedingungen (zweiseitig,  $\alpha = 0,05$ ) war eine Mindestanzahl von vier Tieren pro Gruppe notwendig, um den Signifikanztest durchführen zu können.

## 4 Ergebnisse

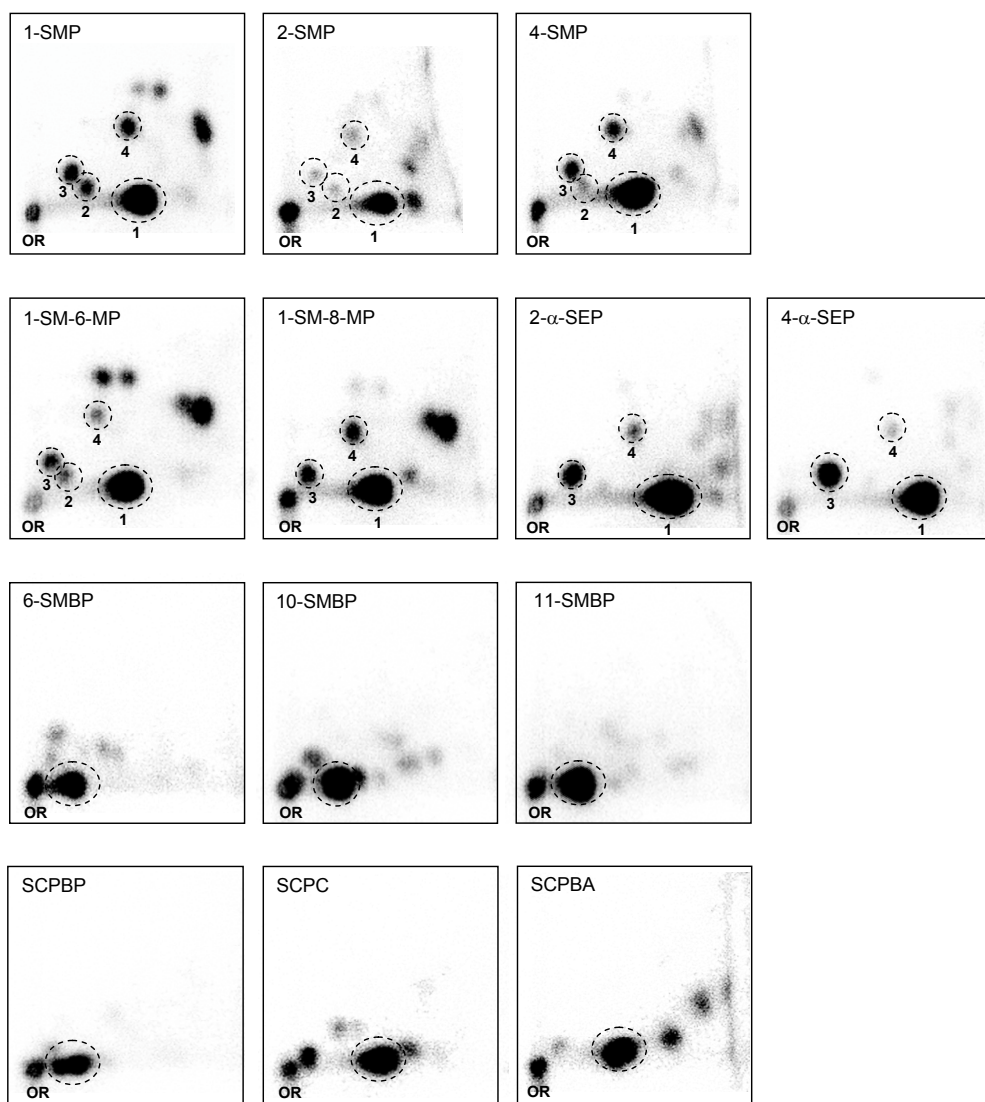
### 4.1 DNA-Adduktbildung durch benzyliche Schwefelsäureester alkylierter PAK im zell- und enzymfreien System

Die Untersuchung der DNA-Adduktbildung durch die benzylichen Schwefelsäureester der ausgewählten alkylierten PAK im zell- und enzymfreien System diente zum einen der Erfassung des substanzspezifischen DNA-Adduktmarkers (qualitativer Aspekt) und zum anderen der vergleichenden Erfassung der Reaktivität der Schwefelsäureester (quantitativer Aspekt). Hierzu wurden die Schwefelsäureester in einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  zur Erfassung des Adduktmarkers bzw. 20  $\mu\text{M}$  zur Bestimmung der Nukleotidspezifität sowie der quantitativen Erfassung der DNA-Reaktivität mit Heringsperma-DNA (1 mg/ml) in wässriger Lösung für 60 min bei 37°C inkubiert. Die gebildeten DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling und Auftrennung der DNA-Addukte über multidirektionale Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Visualisierung der  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Addukte erfolgte über elektronische Autoradiographie (InstantImager®).

#### 4.1.1 DNA-Adduktmarker

Abbildung 4.1 zeigt die typischen DNA-Adduktmarker aller untersuchten Schwefelsäureester der Testsubstanzen. Die Schwefelsäureester der PAK 1-Ethylpyren, 6- $\alpha$ -Ethylbenzo[a]pyren, 6-Methylanthanthen sowie 6-Ethylanthanthen wurden aufgrund extremer Instabilität bzw. Nichtverfügbarkeit bis zum Abschluss der Untersuchungen nicht untersucht.

Die DNA-Adduktmarker der Sulfate der Methylpyrenkongenere (1-SMP, 2-SMP, 4-SMP, 1-SM-6-MP, 1-SM-8-MP) und Ethylpyrenkongenere (2- $\alpha$ -SEP, 4- $\alpha$ -SEP) zeigten alle eine typische Anordnung der Adduktmarker, die mit 1, 3 und 4 gekennzeichnet sind, wobei der mit 1 gekennzeichnete Fleck in allen Fällen das Hauptaddukt darstellte, das durchschnittlich 80% der Gesamtaktivität auf dem Chromatogramm in sich vereinigte. Des Weiteren waren bei diesen Sulfaten noch weitere Adduktmarker auf der rechten äußeren Seite des Chromatogramms bzw. oberhalb von Fleck 4 vorhanden. Die Adduktmarker der Sulfate der Benzo[a]pyrenkongenere (6-SMBP, 10-SMBP, 11-SMBP, SCPBP) zeigten jeweils einen Hauptadduktmarker im unteren Bereich des Chromatogramms (in Abbildung 4.1 markiert), der etwa 80% der Gesamtaktivität aufwies. Dieser lag jedoch sehr viel näher am Auftragspunkt (OR) als der Hauptadduktmarker der Sulfate der Methyl- und Ethylpyrenkongenere. Die zusätzlich vorhandenen zumeist schwach ausgeprägten Adduktmarker befanden sich in der unteren Hälfte des Chromatogramms, zumeist in Nähe des Hauptadduktes. Die Adduktmarker der Sulfate SCPC und SCPBA wiesen ebenfalls einen Hauptadduktmarker im unteren Chromatogrammbereich auf (in Abbildung 4.1 markiert), unterschieden sich jedoch sowohl voneinander als auch von den Adduktmarkern der Sulfate der alkylierten Pyren- und Benzo[a]pyrenkongenere.



**Abbildung 4.1 DNA-Adduktensystemen benzylicher Schwefelsäureester nach Inkubation mit Heringssperma-DNA im zell- und enzymfreien System.** Jeweils 2,5 bis 5 µg adduktisierte DNA wurden zum  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling eingesetzt (siehe 3.2.5). OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. Alle übrigen schwarzen Flecken stellen verschiedene adduktisierte Nucleotide dar. In den oberen sieben Abbildungen kennzeichnen die markierten Adduktstellen eine bei all diesen Substanzen auftretende typische Anordnung von Adduktstellen. In den unteren sechs Abbildungen ist jeweils der Hauptaddukt markiert.

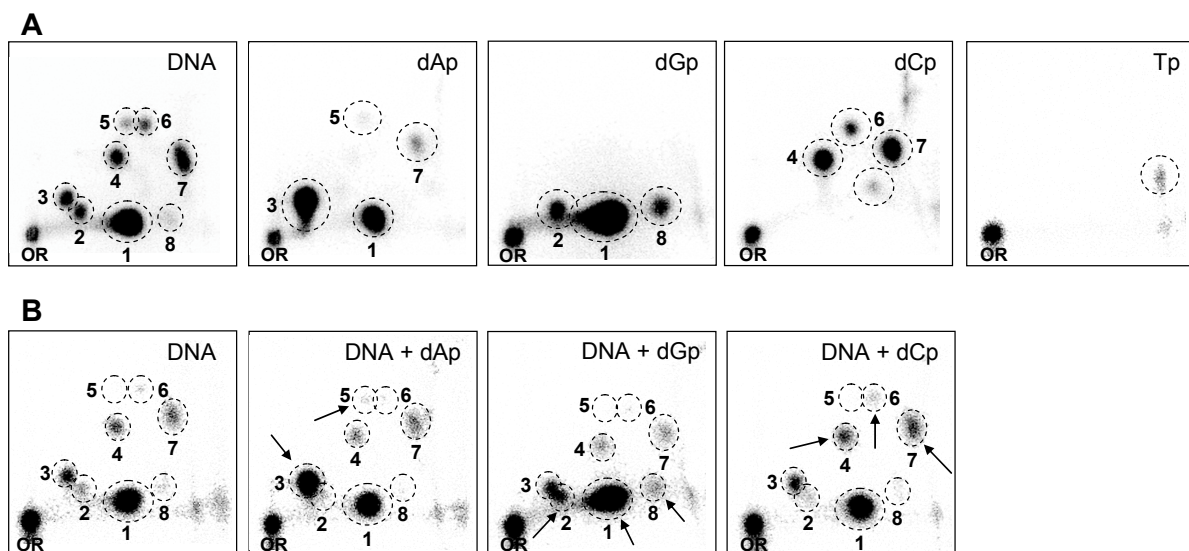
Der Vergleich der DNA-Adduktensystemen zeigt, dass zwischen den Schwefelsäureestern mit unterschiedlichem aromatischem Grundgerüst deutliche Unterschiede bestanden. Aber auch die Adduktensystemen verschiedener Kongenere eines alkylierten PAK wiesen zwar starke Ähnlichkeit auf, waren jedoch nicht identisch. So variierten im Fall der Sulfate der alkylierten Pyrenkongenere sowohl die relative Intensität der Adduktstellen 1, 3 und 4 zueinander als auch Anzahl, Position und Intensität der zusätzlichen Flecken.

#### 4.1.2 Nucleotidspezifität der DNA-Addukte des 1-SMP und 1-SM-8-MP

Die Beteiligung der vier Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin an der Ausbildung von DNA-Addukten wurde für die Schwefelsäureester 1-SMP und 1-SM-8-MP untersucht. Hierzu wurden die Schwefelsäureester mit wässrigen Lösungen der

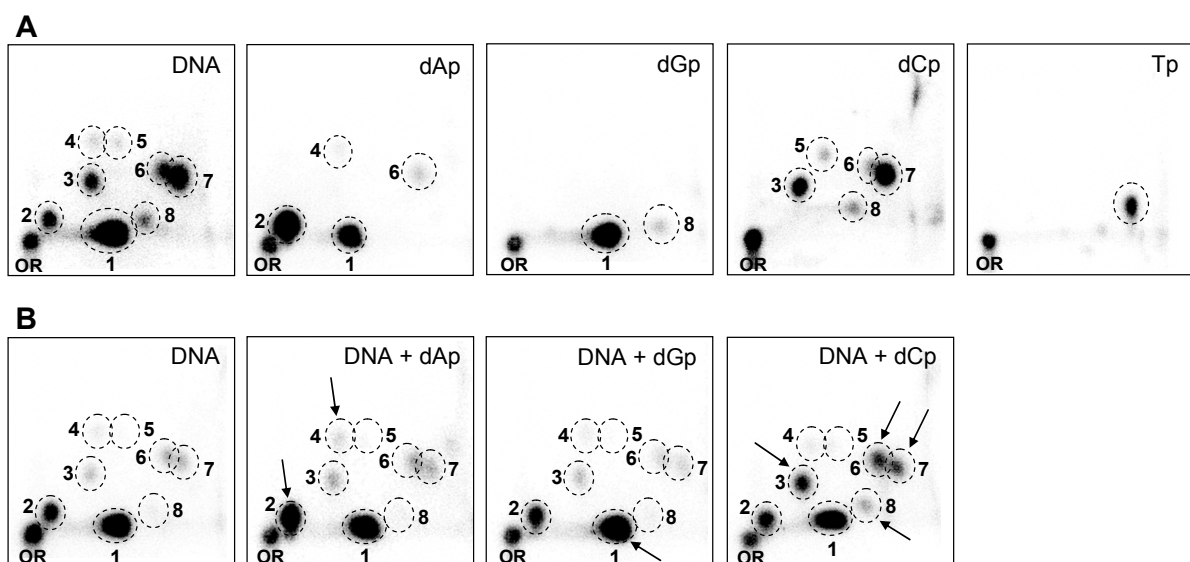
Desoxyribonukleosidmonophosphate inkubiert und das resultierende Adduktmuster mit dem DNA-Adduktmuster hinsichtlich der Position der Adduktstellen verglichen. Des Weiteren wurden Ko-Chromatographien gleicher Anteile von addukturierter Heringsperma-DNA und adduktirten Desoxyribonukleosidmonophosphaten durchgeführt.

Das DNA-Adduktmuster des 1-SMP zeigte acht Adduktstellen (Abbildung 4.2 A und B, ganz links). Der Hauptadduktstelle 1 des DNA-Adduktusters war hinsichtlich seiner Position im Chromatogramm sowohl im Adduktmuster des Desoxyadenosinmonophosphats (dAp) als auch des Desoxyguanosinmonophosphats (dGp) enthalten. Nach Ko-Chromatographie von DNA mit dAp bzw. dGp (Abb. 4.2 B) war Fleck 1 nur im Muster des dGp deutlich verstärkt (angedeutet durch einen Pfeil), was auf einen Hauptanteil eines Guaninadduktes in diesem Fleck hindeutete. Die Adduktstellen 3 und 5 konnten anhand ihrer Position im Chromatogramm (Abb. 4.2 A) und aufgrund von Intensitätsverstärkung bei Ko-Chromatographie (Abb. 4.2 B) dem Adenin, die Adduktstellen 2 und 8 dem Guanin und die Adduktstellen 4, 6 und 7 dem Cytosin zugeordnet werden. Adduktstelle 7 könnte anhand des Positionsvergleichs noch ein weiteres Adeninaddukt enthalten (Abb. 4.2 A), das mit dem Cytosinaddukt an entsprechender Stelle komigrierte. Ein viertes Cytosinaddukt sowie ein durch Reaktion von 1-SMP mit Thyminmonophosphat gebildetes Addukt waren im DNA-Adduktmuster nicht enthalten.



**Abbildung 4.2 Nukleotidspezifität der Adduktbildung des 1-SMP ermittelt über Inkubation mit Desoxyribonukleosidmonophosphaten im zell- und enzymfreien System (A) sowie Ko-Chromatographie (B).** Jeweils 2,5 µg adduktirte DNA oder Desoxyribonukleosidmonophosphate (A) bzw. 1,5 µg adduktirte DNA und 1,5 µg adduktirtes Desoxyribonukleosidmonophosphat (B) wurden zum  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling eingesetzt (siehe 3.2.5). OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. Adduktstellen sind mit durchbrochenen Kreisen markiert und bei Zugehörigkeit zum 1-SMP-DNA-Adduktmuster nummeriert. Pfeile kennzeichnen Adduktstellen, die bei Ko-Chromatographie (B) verstärkt sind.

1-SM-8-MP bildete mit DNA ebenfalls acht nachweisbare Addukte aus (Abbildung 4.3 A und B, ganz links). Der Hauptadduktflleck 1 war wie im Fall des 1-SMP sowohl im Adduktmuster des dAp als auch des dGp enthalten. Die Ko-Chromatographie von addukturierter DNA mit dAp bzw. dGp (Abb. 4.3 B) zeigte eine deutliche Verstärkung dieses AdduktflECKS im Fall des dGp, was auf einen Hauptanteil eines Guaninaddukts an der Ausbildung von Fleck 1 hindeutete. Die AdduktflECKen 2 und 4 konnten anhand ihrer Position im Chromatogramm (Abb. 4.2 A) und aufgrund von Intensitätsverstärkung bei Ko-Chromatographie (Abb. 4.2 B) dem Adenin und die Flecken 3, 6, 7 und 8 dem Cytosin zugeordnet werden, wobei Fleck 6 auch ein komigrierendes Adeninaddukt enthalten könnte. AdduktflECK 5 konnte aufgrund seiner Position als Cytosinaddukt identifiziert werden und AdduktflECK 8 könnte ein weiteres Guaninaddukt beinhalten, das mit dem Cytosinaddukt an entsprechender Position komigrierte. Die Reaktion von 1-SM-8-MP mit Thymidinmonophosphat lieferte ein Addukt, das im DNA-Adduktmuster nicht nachweisbar war.



**Abbildung 4.3 Nukleotidspezifität der Adduktbildung des 1-SM-8-MP ermittelt über Inkubation mit Desoxyribonukleosidmonophosphaten im zell- und enzymfreien System (A) sowie Ko-Chromatographie (B).** Jeweils 2,5 µg adduktierter DNA oder Desoxyribonukleosidmonophosphate (A) bzw. 1,5 µg adduktierter DNA und 1,5 µg adduktirtes Desoxyribonukleosidmonophosphat (B) wurden zum  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling eingesetzt (siehe 3.2.5). OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. AdduktflECKen sind mit durchbrochenen Kreisen markiert und bei Zugehörigkeit zum 1-SM-8-MP-DNA-Adduktmuster nummeriert. Pfeile kennzeichnen AdduktflECKen, die bei Ko-Chromatographie (B) verstärkt sind.

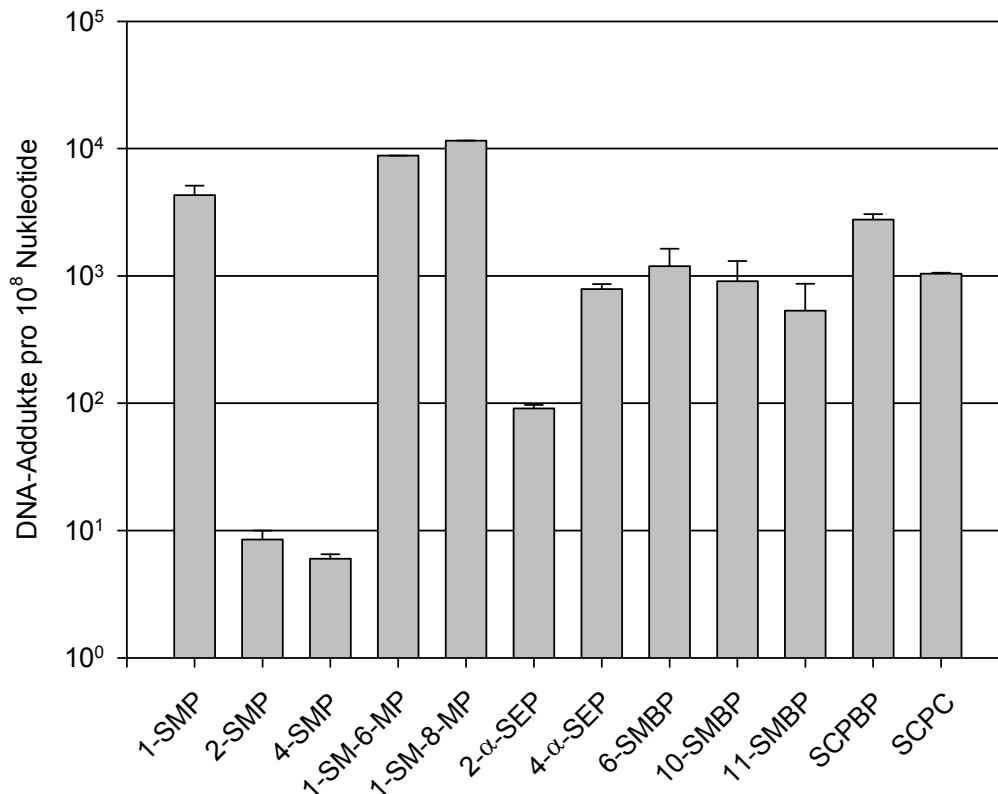
### 4.1.3 DNA-Adduktniveaus

Zum Vergleich der DNA-Reaktivität der Sulfate wurde die Gesamtaktivität auf einem Chromatogramm, d.h. die Summe der in den einzelnen Adduktflecken vorhandenen Aktivitäten, bestimmt und über die unter 3.2.5 beschriebene Formel das zugehörige DNA-Adduktniveau berechnet. Da sich nach Abschluss der Untersuchungen herausstellte, dass die verwendete Charge des Sulfates SCPBA zum Zeitpunkt der Bestimmung des DNA-Adduktniveaus bereits zu einem großen Anteil zerfallen war, sind zu dieser Substanz keine Daten zum DNA-Adduktniveau vorhanden. Abbildung 4.4 zeigt das DNA-Adduktniveau der untersuchten Sulfate nach *in vitro*-Inkubation mit reiner Heringsperma-DNA in wässriger Lösung.

Es wird deutlich, dass sich die untersuchten Sulfate in ihrer DNA-Reaktivität stark unterschieden. Die aus Inkubation mit Heringsperma-DNA resultierenden DNA-Adduktniveaus umfassten einen Bereich von wenigen Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden bis mehreren Tausend Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden. Die höchsten Adduktniveaus von mehreren Tausend Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden wurden von den Sulfaten 1-SMP, 1-SM-6-MP, 1-SM-8-MP sowie SCPBP erzeugt. Ein mittleres Adduktniveau zwischen ca. 100 und 1000 Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden verursachten die Sulfate 4- $\alpha$ -SEP, 6-SMBP, 10-SMBP, 11-SMBP sowie SCPC. Ein niedriges Adduktniveau von unter 100 Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden zeigten 2-SMP, 4-SMP sowie 2- $\alpha$ -SEP.

Ein Vergleich der DNA-Adduktniveaus der Sulfate der verschiedenen Kongenere des Methylpyrens zeigt den Einfluss von Strukturänderungen auf die DNA-Reaktivität. So erzeugte 1-SMP ein hohes DNA-Adduktniveau von 4300 Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden. Befand sich die Methylgruppe dagegen in Position 2 oder 4 am Pyren-Grundgerüst, sank die DNA-Reaktivität der entsprechenden Sulfate 2-SMP bzw. 4-SMP dramatisch auf nur noch sehr geringe DNA-Adduktniveaus von 9 bzw. 6 Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden ab. War dagegen zusätzlich zur sulfatierten Methylgruppe in Position 1 eine weitere Methylgruppe in Position 6 oder 8 vorhanden, stieg die DNA-Reaktivität des zugehörigen Sulfates relativ zum 1-SMP nochmals stark an, im Fall des 1-SM-6-MP auf 8800 und im Fall des 1-SM-8-MP auf 11500 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide. Auch die Struktur der Alkylseitenkette beeinflusste die Reaktivität. So zeigten 2- $\alpha$ -SEP und 4- $\alpha$ -SEP, die eine in  $\alpha$ -Position sulfatierte Ethylgruppe aufweisen, ein um den Faktor 10 bzw. 132 höheres Adduktniveau als die entsprechenden Sulfate der methylierten Pyrenkongenere 2-SMP und 4-SMP. Die Sulfate der alkylierten Benzo[a]pyrenkongenere erzeugten DNA-Adduktniveaus zwischen 530 (11-SMBP) und 2800 Addukten pro  $10^8$  Nukleotiden (SCPBP). Die Unterschiede innerhalb der Gruppe von alkylierten Benzo[a]pyrenkongeneren waren somit deutlich geringer ausgeprägt als innerhalb der Gruppe der alkylierten Pyrenkongenere.





**Abbildung 4.4 DNA-Adduktniveau benzylicher Schwefelsäureester nach Inkubation mit Heringsperma-DNA im zell- und enzymfreien System.** Jeweils 2,5 bis 5 µg adduktierter DNA wurden zum <sup>32</sup>P-Postlabelling eingesetzt (siehe 3.2.5). Zur Quantifizierung wurde die in allen Adduktstellen vorhandene Aktivität aufsummiert und das Adduktniveau wie unter 3.2.5 beschrieben berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte ± SE aus zwei bis sieben unabhängigen Inkubationen.

## 4.2 Mutagenität von benzylichen Schwefelsäureestern alkylierter PAK in SULT-defizienten *Salmonella typhimurium*

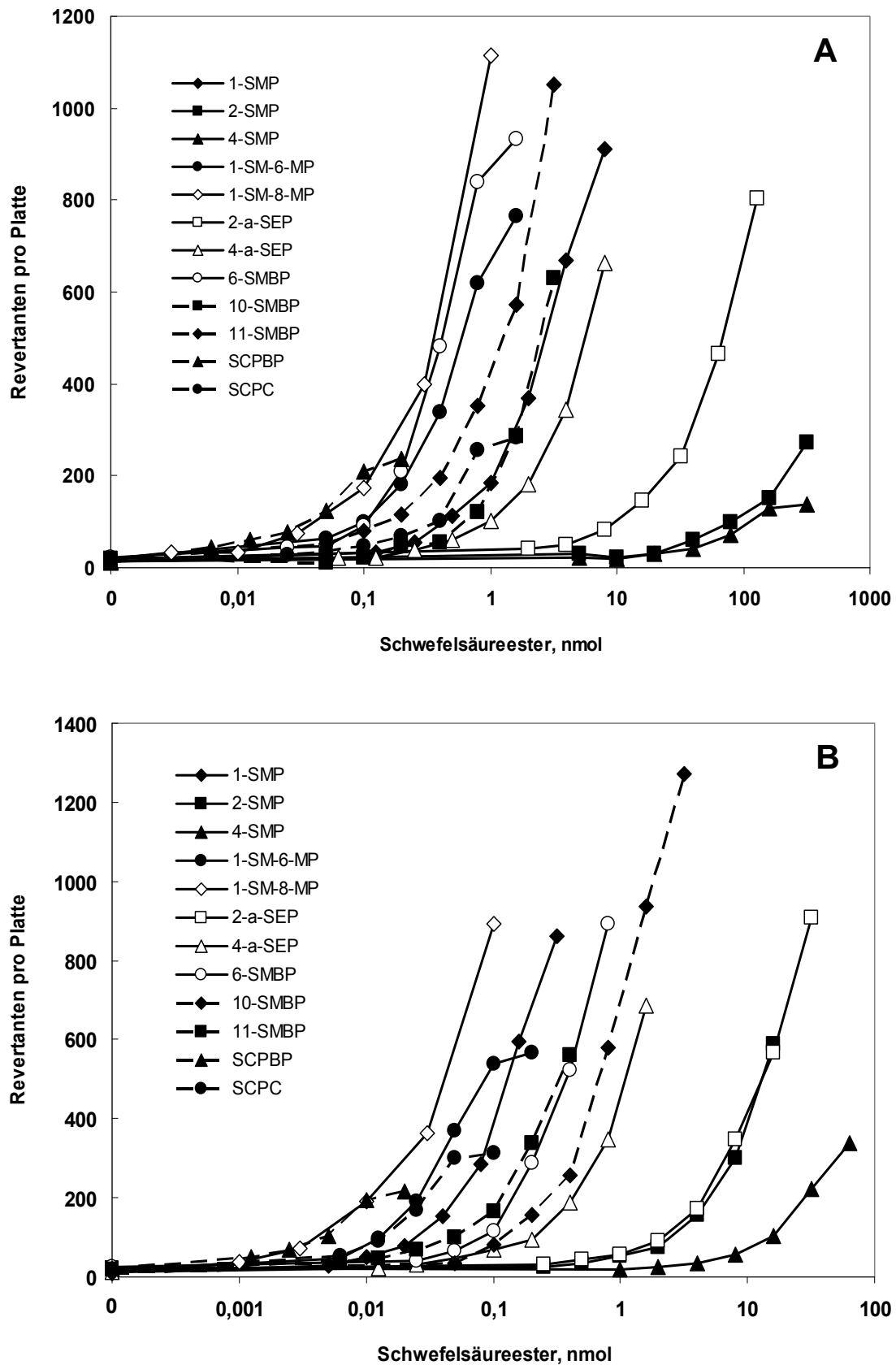
Das mutagene Potenzial von reaktiven Schwefelsäureestern alkylierter PAK kann durch Medienkomponenten entscheidend beeinflusst werden. Daher wurden als Expositionsmedien sowohl Reinstwasser als auch eine Lösung von 150 mM KCl verwendet. Tabelle 4.1 zeigt die spezifischen Mutagenitäten der untersuchten Schwefelsäureester und Abbildung 4.5 typische Dosis-Wirkungs-Beziehungen mutagener Effekte. Es ist ersichtlich, dass die Schwefelsäureester analog zur ermittelten DNA-Reaktivität auch hinsichtlich ihres mutagenen Potenzials große Unterschiede aufwiesen. In Wasser als Expositionsmedium zeigten 1-SM-8-MP und SCPBP eine sehr hohe Mutagenität von mehreren Tausend Revertanten pro nmol. Die Sulfate 1-SMP, 1-SM-6-MP, 4-α-SEP, 6-, 10-, und 11-SMBP sowie SCPC wiesen ein hohes mutagenes Potenzial zwischen 100 und 1000 Revertanten pro nmol auf. Die Sulfate 2- und 4-SMP sowie 2-α-SEP waren mit weniger als 10 Revertanten pro nmol unter diesen Bedingungen schwach mutagen. Damit spiegelten die im Ames-Test ermittelten mutagenen Effekte benzylicher Schwefelsäureester deren Fähigkeit zur DNA-Adduktbildung wider.

Mit 150 mM KCl als Expositionsmedium zeigten alle Sulfate einen Anstieg der spezifischen Mutagenität gegenüber dem wässrigen Expositionsmedium, wobei dieser Effekt bei 6-SMBP am schwächsten (Faktor 1,6) und bei dem Sulfat 2-SMP am stärksten ausgeprägt war (Faktor 32,5). Das höchste mutagene Potenzial zeigten auch unter diesen Bedingungen die Sulfate 1-SM-8-MP und SCPBP mit über 20000 Revertanten pro nmol, gefolgt von den Schwefelsäureestern 1-SMP, 1-SM-6-MP, 11-SMBP und SCPC mit mehreren Tausend Revertanten pro nmol. Eine hohe spezifische Mutagenität zwischen 700 und 1500 Revertanten pro nmol wiesen 4- $\alpha$ -SEP, 6-SMBP und 10-SMBP auf. Das unter diesen Bedingungen niedrigste mutagene Potenzial hatten wiederum 2- und 4-SMP sowie 2- $\alpha$ -SEP mit weniger als 100 Revertanten pro nmol.

**Tabelle 4.1 Spezifische Mutagenität benzylicher Schwefelsäureester in *S. typhimurium* TA1538a in Wasser oder 150 mM KCl als Expositionsmedium.** Die Durchführung der Mutagenitätsprüfungen sowie die Bestimmung der spezifischen Mutagenität erfolgten wie unter 3.2.2 beschrieben. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus zwei bis sechs unabhängigen Untersuchungen.

Schwefelsäureester	Spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol) $\pm$ SE	
	Wasser	KCl
1-SMP	290 $\pm$ 110	7100 $\pm$ 2700
2-SMP	2 $\pm$ 1	65 $\pm$ 30
4-SMP	5 $\pm$ 3	15 $\pm$ 4
1-SM-6-MP	640 $\pm$ 140	5800 $\pm$ 1000
1-SM-8-MP	1850 <sup>a</sup>	26380 <sup>a</sup>
2- $\alpha$ -SEP	6 $\pm$ 2	50 $\pm$ 8
4- $\alpha$ -SEP	190 $\pm$ 40	1100 $\pm$ 300
6-SMBP	870 $\pm$ 160	1400 $\pm$ 100
10-SMBP	130 $\pm$ 20	750 $\pm$ 50
11-SMBP	540 $\pm$ 130	2300 $\pm$ 700
SCPBP	4000 $\pm$ 100	20700 $\pm$ 2500
SCPC	270 $\pm$ 40	5500 $\pm$ 300

<sup>a</sup> Es werden nur die Daten aus einem Experiment berichtet. Daten aus weiteren Experimenten konnten nicht herangezogen werden, da ein Zerfall der verwendeten Substanzcharge aufgezeigt wurde.



**Abbildung 4.5 Mutagenität benzylicher Schwefelsäureester in *S. typhimurium* TA1538a in Wasser (A) und 150 mM KCl (B) als Expositionsmedium.** Die Durchführung der Mutagenitätsprüfungen erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von drei Platten aus einer Untersuchung.

### 4.3 Mutagenität von benzyllischen Alkoholen alkylierter PAK in SULT-exprimierenden *Salmonella typhimurium*

Als weiteres Testsystem zur Untersuchung des mutagenen Potenzials von benzyllischen Schwefelsäureestern alkylierter PAK dienten gentechnisch veränderte *S. typhimurium*-Stämme TA1538 mit heterologer Expression verschiedener humaner SULT sowie SULT-Formen der Ratte, die in Ames-Mutagenitätsprüfungen mit den benzyllischen Alkoholen der alkylierten PAK eingesetzt wurden. Getestet wurden die benzyllischen Alkohole aller 17 ausgewählten alkylierten PAK mit *S. typhimurium* TA1538(a)-Stämmen, die die humane SULT1A1, 1A2, 1A3, 1B1, 1C1, 1C2, 1C3, 1E1, 2A1, 2B1a oder die humane SULT2B1b heterolog exprimieren. Der Anteil der exprimierten SULT-Form an der Gesamtheit an zytosolischem Protein beträgt in diesen Stämmen 0,5 bis 11% (Meinl *et al.* 2006). Zur Erfassung der intrinsischen mutagenen Aktivität der benzyllischen Alkohole wurden jeweils auch Mutagenitätsprüfungen mit dem SULT-defizienten Stamm TA1538a durchgeführt. Die benzyllischen Alkohole ethylierter und methylenüberbrückter PAK, für die jeweils zwei Enantiomere existieren, wurden in Form des Racemats getestet. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die ermittelten spezifischen Mutagenitäten der benzyllischen Alkohole in humane SULT exprimierenden *S. typhimurium* sowie dem SULT-defizienten Stamm TA1538a.

Innerhalb der Gruppe der benzyllischen Alkohole der alkylierten Pyrenkongenere zeigten 1-HMP, 1-HM-6-MP, 1-HM-8-MP sowie 1- $\alpha$ -HEP mutagene Effekte in allen SULT-exprimierenden Stämmen mit Ausnahme der Stämme mit heterologer Expression der SULT2B1a, SULT2B1b und SULT1C3 (nur 1-HM-8-MP). Diese Effekte waren im Fall des 1-HMP und 1-HM-6-MP im *S. typhimurium*-Stamm mit Expression der SULT1A1 und im Fall des 1-HM-8-MP sowie 1- $\alpha$ -HEP bei Expression der SULT1E1 am stärksten ausgeprägt (mehrere Tausend Revertanten pro nmol Testsubstanz). Im SULT-defizienten Stamm TA1538a wurde kein mutagener Effekt und damit keine intrinsische mutagene Aktivität der Alkohole beobachtet. 2- und 4-HMP zeigten sowohl im SULT-defizienten Stamm als auch in den SULT-exprimierenden Stämmen keine bzw. nur sehr schwach ausgeprägte mutagene Effekte. Die benzyllischen Alkohole der entsprechenden ethylierten Kongenere, 2- $\alpha$ -HEP und 4- $\alpha$ -HEP, waren in den Stämmen mit Expression der SULT1A1, 1A2 und 1E1 bzw. der 1A1, 1B1, 1C2, 1E1 und 2A1 mutagen. Den stärksten mutagenen Effekt zeigte 2- $\alpha$ -HEP bei Expression der Form 1A1 (250/280 Revertanten pro nmol) und 4- $\alpha$ -HEP bei Expression der 1E1 (300/510 Revertanten pro nmol). Die spezifischen Mutagenitäten lagen jedoch deutlich unter denen, die für 1-HMP, 1-HM-6-MP, 1-HM-8-MP sowie 1- $\alpha$ -HEP ermittelt wurden. Im Stamm TA1538a war kein mutagenes Potenzial von 2- und 4- $\alpha$ -HEP nachweisbar.

In der Gruppe der benzyllischen Alkohole der alkylierten Benzo[a]pyrenkongenere zeigte 6-HMBP ein hohes mutagenes Potenzial in verschiedenen SULT-exprimierenden Stämmen.

Der stärkste mutagene Effekt von mehr als 10000 Revertanten pro nmol Substanz wurde im Stamm mit heterologer Expression der SULT1B1 beobachtet. Die übrigen Alkohole dieser Gruppe zeigten in den meisten SULT-exprimierenden Stämmen kein oder ein nur schwach ausgeprägtes mutagenes Potenzial. 6- $\alpha$ -HEBP zeigte lediglich bei Expression der SULT1E1 und 2A1, 10-HMBP bei Expression der SULT1A1 und 11-HMBP bei Expression der SULT1B1 einen deutlich mutagenen Effekt. HCPBP zeigte schwach ausgeprägte mutagene Effekte in den Stämmen mit heterologer Expression der SULT1A1, 1A3, 1C1 und 1E1. Ein stark mutagenes Potenzial konnte jedoch im Stamm mit Expression der SULT1B1 (ca. 2000 Revertanten pro nmol Substanz) beobachtet werden. Die benzyllischen Alkohole der Benzo[a]pyrenkongenere waren mit Ausnahme des 6-HMBP (2 Revertanten pro nmol Substanz) im SULT-defizienten Stamm TA1538a nicht mutagen.

Der benzyllische Alkohol des methylenüberbrückten Cyclopentachrysen, HCPC, sowie der benzyllische Alkohol des methylenüberbrückten Cyclopentabenz[a]anthracen, HCPBA, waren im Stamm TA1538a und in den meisten SULT-exprimierenden Stämmen nicht mutagen. Nur im *S. typhimurium*-Stamm mit heterologer Expression der SULT1B1 zeigten beide Alkohole einen stark mutagenen Effekt (2160 bzw. 7200 Revertanten pro nmol). HCPC war zusätzlich im Stamm mit Expression der SULT1C1 marginal mutagen (2 Revertanten pro nmol).

Der benzyllische Alkohol 6- $\alpha$ -HEAA, einer der Alkohole der beiden untersuchten alkylierten Anthanthrenkongenere, zeigte nur in den Stämmen mit Expression der SULT1A3, 1C1 und 2A1 ein schwach mutagenes Potenzial. Im Gegensatz dazu zeigte 6-HMAA als einziger der untersuchten benzyllischen Alkohole sowohl im Stamm TA1538a als auch in allen SULT-exprimierenden Stämmen ein starkes bis sehr starkes mutagenes Potenzial, das bei Expression der SULT1A1 am deutlichsten ausgeprägt war (mehrere Tausend Revertanten pro nmol).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle untersuchten benzyllischen Alkohole zumindest in einem SULT-exprimierenden *S. typhimurium*-Stamm mutagen waren. Eine intrinsische Mutagenität im SULT-defizienten Stamm TA1538a zeigten nur die benzyllischen Alkohole 6-HMBP und 6-HMAA mit 2 bzw. 87 Revertanten pro nmol. Einige benzyllische Alkohole, insbesondere die der alkylierten Pyrenkongenere sowie 6-HMBP und 6-HMAA wurden von mehreren humanen SULT-Formen zu genotoxischen Sulfaten, angezeigt durch mutagene Effekte in den entsprechenden *Salmonella*-Stämmen, umgesetzt. Des Weiteren war auffällig, dass die geprüften Alkohole der alkylierten Pyrenkongenere die stärksten mutagenen Effekte in Stämmen mit Expression der SULT1A1, 1A2 oder 1E1 zeigten, während die benzyllischen Alkohole mit Benzo[a]pyren-, Chrysen- und Benz[a]anthracenstruktur vor allem durch die SULT1B1 und 2A1 zu genotoxischen Sulfaten umgesetzt wurden.

**Tabelle 4.2 Spezifische Mutagenität benzylischer Alkohole in SULT-defizienten *S. typhimurium* TA1538a und in humane SULT exprimierenden *S. typhimurium* TA1538(a).** Die Durchführung der Mutagenitätsprüfungen sowie die Berechnung der spezifischen Mutagenität erfolgten wie unter 3.2.2 beschrieben. Die angegebenen Werte entstammen unabhängigen Einzeluntersuchungen.

Alkohol	Spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol) in <i>S. typhimurium</i> TA1538(a) mit Expression der humanen SULT-Form											
	keine	1A1	1A2	1A3	1B1	1C1	1C2	1C3	1E1	2A1	2B1a	2B1b
1-HMP	0 <sup>a</sup>	17600 16000 18300 20700	420	51	120	8	560	2	7240 8990	350	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2-HMP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
4-HMP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
1-HM-6-MP	0 <sup>a</sup>	42800	1490	56	34 42	14	190	0 <sup>a</sup> < 1 <sup>b</sup>	4000	180	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
1-HM-8-MP	0 <sup>a</sup>	47500	1130	13	100 210	11	2930	0 <sup>a</sup> 0 <sup>a</sup>	112000	180	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
1- $\alpha$ -HEP	0 <sup>a</sup>	18300	1730	22	100	8	580	33	24800	240	0 <sup>a</sup>	< 1 <sup>b</sup>
2- $\alpha$ -HEP	0 <sup>a</sup>	250 280	86	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup> 8	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
4- $\alpha$ -HEP	0 <sup>a</sup>	42 46	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	16	0 <sup>a</sup>	120	0 <sup>a</sup>	300 510	10	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
6-HMBP	2	4 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	9 <sup>c</sup>	10800 <sup>c</sup> 15300 <sup>c</sup> 9300 <sup>c</sup> 12300 <sup>c</sup>	28 <sup>c</sup> 6 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	190 <sup>c</sup>	270 <sup>c</sup> 200 <sup>c</sup>	3800 <sup>c</sup> 1200 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup> 4 <sup>c</sup>

Fortsetzung Tabelle 4.2

Alkohol	Spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol) in <i>S. typhimurium</i> TA1538(a) mit Expression der humanen SULT-Form											
	keine	1A1	1A2	1A3	1B1	1C1	1C2	1C3	1E1	2A1	2B1a	2B1b
6- $\alpha$ -HEBP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	16	26	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
					0 <sup>a</sup>				20	21		
					0 <sup>a</sup>				27			
10-HMBP	0 <sup>a</sup>	36	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
					5							
11-HMBP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	150	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2	0 <sup>a</sup>	3	3
		0 <sup>a</sup>							3	2		
HCPBP	0 <sup>a</sup>	37	< 1 <sup>b</sup>	6	1980	28	2	0 <sup>a</sup>	8	< 1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
		44			1690	23						
HCPC	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2160	2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
HCPBA	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7190	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
		0 <sup>a</sup>			7230							
6-HMAA	87	10300 <sup>c</sup>	53 <sup>c</sup>	43 <sup>c</sup>	4070 <sup>c</sup>	190 <sup>c</sup>	110 <sup>c</sup>	510 <sup>c</sup>	2280 <sup>c</sup>	1210 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
		5490 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	23 <sup>c</sup>	4690 <sup>c</sup>		93 <sup>c</sup>	590 <sup>c</sup>	940 <sup>c</sup>	1330 <sup>c</sup>		0 <sup>c</sup>
		8670 <sup>c</sup>						230 <sup>c</sup>				
6- $\alpha$ -HEAA	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7	0 <sup>a</sup>	2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	21	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
										22		

<sup>a</sup> Die mittlere Revertanzahl erreichte bei keiner getesteten Konzentrationsstufe den doppelten Wert der Spontanrevertantenrate und es war keine Dosis-Wirkungs-Beziehung abzuleiten.

<sup>b</sup> Die mittlere Revertanzahl erreichte bei mindestens einer getesteten Konzentrationsstufe den doppelten Wert der Spontanrevertantenrate, die spezifische Mutagenität lag jedoch unter 1 Revertante/nmol.

<sup>c</sup> Vom Wert der spezifischen Mutagenität im SULT-exprimierenden *S. typhimurium*-Stamm wurde der Wert der spezifischen Mutagenität im SULT-defizienten Stamm TA1538a (= intrinsische Mutagenität des benzylichen Alkohols) abgezogen.

1-HMP und 1-HM-8-MP wurden auch in Mutagenitätsprüfungen mit Stämmen mit Expression verschiedener Formen von SULT der Ratte eingesetzt (Tabelle 4.3). Hierbei wurden sowohl die männlich-dominante SULT1A1, die weiblich-dominanten SULT2A-Formen als auch die in beiden Geschlechtern exprimierte SULT1B1 untersucht.

1-HMP zeigte in allen Stämmen mit Ausnahme des Stammes mit heterologer Expression der rSULT2A4 mäßig bis stark mutagene Effekte. Ebenso wurde auch 1-HM-8-MP durch alle untersuchten Ratten-SULT mit Ausnahme der rSULT2A4 zum mutagenen Sulfat 1-SM-8-MP umgesetzt. Das stärkste mutagene Potenzial zeigten beide Alkohole im Stamm mit heterologer Expression der weiblich-dominanten SULT-Form 2A3. In diesem Stamm lag die spezifische Mutagenität beider Metabolite etwa um den Faktor zwei höher als im Stamm mit Expression der männlich-dominanten SULT1A1. Mit Ausnahme der rSULT2A1, bei deren Expression 1-HMP einen deutlich stärkeren mutagenen Effekt hatte als 1-HM-8-MP, zeigten beide Alkohole bei Expression der anderen Ratten-SULT-Formen kaum Unterschiede in den spezifischen Mutagenitäten.

**Tabelle 4.3 Spezifische Mutagenität benzyllischer Alkohole in Ratten-SULT exprimierenden *S. typhimurium* TA1538(a).** Die Durchführung der Mutagenitätsprüfungen sowie die Berechnung der spezifischen Mutagenität erfolgten wie unter 3.2.2 beschrieben. Die angegebenen Werte entstammen unabhängigen Einzeluntersuchungen.

Alkohol	Spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol) in <i>S. typhimurium</i> TA1538(a) mit Expression der Ratten-SULT-Form				
	1A1	1B1	2A1	2A3	2A4
1-HMP	650	41 25	190	790 1590	1
1-HM-8-MP	740	57	5	1210	0

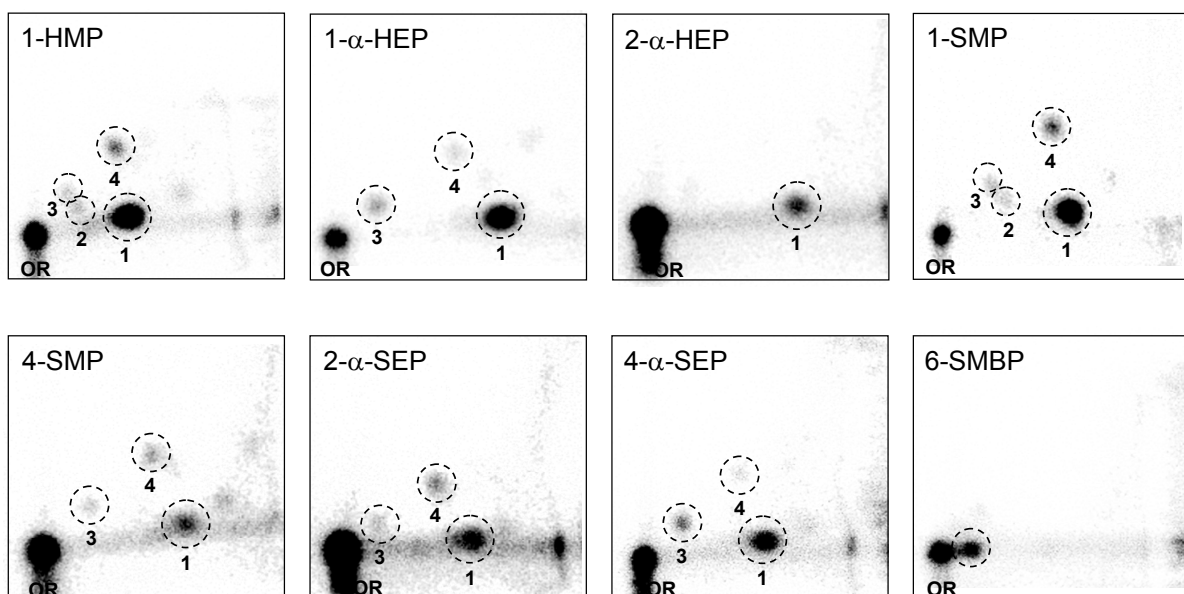


#### 4.4 DNA-Adduktbildung durch benzyliche Metabolite alkylierter PAK *in vivo*

Bioverfügbarkeit, Gewebeverteilung und genotoxisches Potenzial einiger ausgewählter benzylicher Alkohole und Schwefelsäureester wurden *in vivo* in der Wistar-Ratte untersucht. Als Endpunkt zur Erfassung der genannten Parameter wurde die Bildung von DNA-Addukten in verschiedenen Geweben (Leber, Niere, Lunge) behandelter Ratten in qualitativer und quantitativer Hinsicht ermittelt. Hierzu wurden die benzylichen Alkohole 1-HMP, 1- $\alpha$ -HEP, 2- $\alpha$ -HEP und 4- $\alpha$ -HEP sowie die benzylichen Schwefelsäureester 1-SMP, 4-SMP, 2- $\alpha$ -SEP, 4- $\alpha$ -SEP und 6-SMBP wie unter 3.2.3 beschrieben an männliche Ratten verabreicht.

##### 4.4.1 DNA-Adduktmuster in Geweben der Ratte

Abbildung 4.6 zeigt DNA-Adduktmuster in der Leber von Wistar-Ratten, die mit benzylichen Metaboliten alkylierter PAK behandelt wurden. Die *in vivo*-DNA-Adduktmuster zeigten große Ähnlichkeit mit den *in vitro*-DNA-Adduktmustern der benzylichen Schwefelsäureester im zell- und enzymfreien System (siehe Abbildung 4.1). Zwar waren in den *in vivo*-Adduktmustern bei allen Substanzen und in allen Geweben stets weniger Adduktstellen als in den entsprechenden *in vitro*-Adduktmustern der Schwefelsäureester sichtbar, die charakteristische Anordnung der Hauptadduktstellen sowie deren relative Intensität zueinander blieb jedoch stets erhalten. Daher konnten die beobachteten DNA-Addukte den verabreichten benzylichen Metaboliten alkylierter PAK zugeschrieben werden.



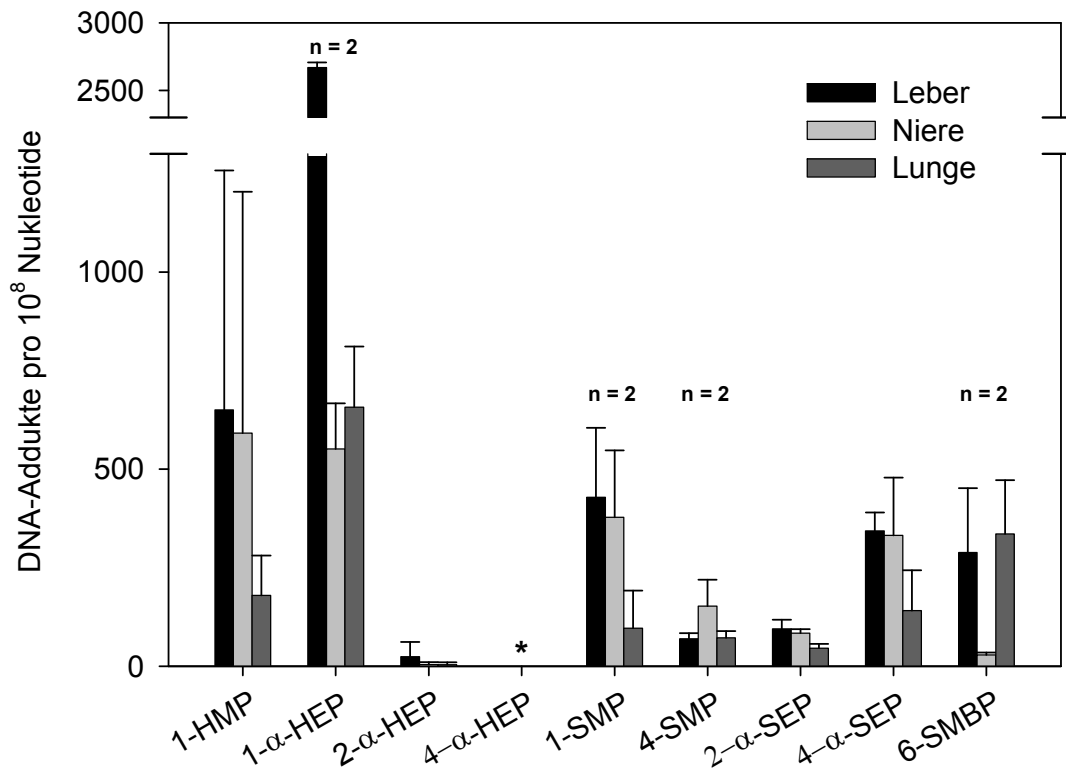
**Abbildung 4.6 DNA-Adduktmuster in der Leber männlicher Wistar-Ratten nach Applikation verschiedener benzylicher Metaboliten alkylierter PAK.** Die Tiere wurden einmalig i.p. mit 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM Testsubstanz (1-SMP: 27,8  $\mu\text{mol/kg}$  KM) behandelt und nach 3 h getötet. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling wie unter 3.2.5 beschrieben analysiert. OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. Die Hauptadduktstellen sind mit durchbrochenen Kreisen markiert.

#### 4.4.2 DNA-Adduktniveaus in Geweben der Ratte

Abbildung 4.7 zeigt die DNA-Adduktniveaus in Geweben der mit den verschiedenen Metaboliten alkylierter PAK behandelten Tiere. DNA-Addukte konnten nach Applikation aller Metaboliten ausgenommen nach Applikation des 4- $\alpha$ -HEP in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. In Organen von Kontrolltieren, die nur mit DMSO behandelt worden waren, wurden keine DNA-Addukte gefunden. Einige Tiere mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die makroskopische Untersuchung direkt nach der Tötung der Tiere eine Fehlapplikation der Testsubstanz in Caecum bzw. Dünndarm offenbarte. Dies betraf jeweils ein Tier aus den Dreier-Gruppen, die mit 1-SMP, 4-SMP, 6-SMBP sowie 1- $\alpha$ -HEP behandelt worden waren und ist in Abbildung 4.7 mit dem Hinweis n = 2 verdeutlicht.

Nach Applikation von 1-HMP wurden die höchsten Adduktniveaus in der Leber, dicht gefolgt von der Niere gefunden. Die Adduktniveaus in der Lunge lagen um den Faktor drei niedriger. Die Alkohole 1- $\alpha$ -HEP und 2- $\alpha$ -HEP zeigten die höchsten DNA-Adduktniveaus ebenfalls in der Leber, die Adduktniveaus der Niere und der Lunge lagen jeweils um den Faktor fünf niedriger. Unter den benzyllischen Alkoholen bildete 1- $\alpha$ -HEP die höchsten Adduktniveaus. In Leber und Lunge lagen diese um den Faktor vier höher als beim 1-HMP, während das Adduktniveau der Niere mit dem des 1-HMP vergleichbar war. 2- $\alpha$ -HEP zeigte sehr niedrige Adduktniveaus, die um den Faktor 26 (Leber), 45 (Lunge) bzw. 130 (Niere) geringer waren als die des 1-HMP.

Die Schwefelsäureester 1-SMP, 2- und 4- $\alpha$ -SEP bildeten die höchsten Adduktniveaus in Leber und Niere, die Adduktniveaus der Lunge lagen um den Faktor zwei bis vier niedriger. 4-SMP zeigte das höchste DNA-Adduktniveau in der Niere, das um den Faktor zwei höher lag als in Leber und Lunge. 6-SMBP bildete in Leber und Lunge ca. zehnfach höhere Adduktniveaus als in der Niere. 1-SMP, 4- $\alpha$ -SEP und 6-SMBP zeigten trotz unterschiedlicher Gewebeverteilung jeweils in den Geweben mit hoher DNA-Adduktbildung vergleichbare Adduktniveaus, wobei berücksichtigt werden muss, dass 1-SMP in einer neunfach niedrigeren Dosis als 4- $\alpha$ -SEP und 6-SMBP verabreicht wurde. Die DNA-Adduktniveaus nach Verabreichung von 4-SMP und 2- $\alpha$ -SEP lagen um den Faktor zwei bis vier niedriger als nach Applikation der anderen drei Sulfate.



**Abbildung 4.7 DNA-Adduktniveaus in Geweben männlicher Wistar-Ratten nach Applikation verschiedener benzylischer Metaboliten alkylierter PAK.** Jeweils drei Tiere wurden einmalig i.p. mit 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM (1-SMP: 27,8  $\mu\text{mol/kg}$  KM) Testsubstanz behandelt und nach 3 h getötet. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* Es konnten keine DNA-Addukte nachgewiesen werden (Detektionslimit: ca. 1 Addukt/ $10^8$  Nukleotide).

## 4.5 Modulation der DNA-Adduktbildung durch benzylische Alkohole alkylierter PAK *in vivo*

### 4.5.1 Auswahl von Metaboliten

Als eine Testsubstanz wurde 1-HMP ausgewählt, da dieser Alkohol und das zugehörige Sulfat 1-SMP in allen vorhergehenden *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen als Referenzsubstanzen dienten und Gewebeverteilung und Zeitabhängigkeit der DNA-Adduktbildung durch 1-HMP bereits umfassend untersucht worden waren (Kuhlow 2001). Da auch Daten die Modulation der DNA-Adduktbildung durch ADH- und ALDH-Inhibitoren betreffend bereits vorlagen (Ma 2001; Ma *et al.* 2002), wurden die Untersuchungen zum 1-HMP auf die SULT-Inhibitoren sowie den Probenecid-Versuch beschränkt.

Als zweiter benzylischer Alkohol wurde 1-HM-8-MP ausgewählt, da dieser durch eine Vielzahl humaner SULT-Formen als auch SULT-Formen der Ratte in *Salmonella*-Mutagenitätstests zum genotoxischen Sulfat bioaktiviert wurde. Das Sulfat 1-SM-8-MP erwies sich zudem in *in vitro*-Testsystemen als hoch DNA-reaktiv und mutagen. Die DNA-Adduktbildung durch 1-HM-8-MP *in vivo* in der Ratte war zwar in dem unter 4.4

beschriebenen Tierexperiment aufgrund Nicht-Verfügbarkeit der Substanz noch nicht untersucht worden, in einem Vorversuch zum Metabolismus des Ausgangs-PAK 1,8-Dimethylpyren (1,8-DMP) in der Ratte wurden jedoch auch noch nach 24 h nach Verabreichung der Substanz niedrige Adduktniveaus in Leber und Niere gefunden (Daten siehe Anhang Tabelle 8.2). 1-HM-8-MP sollte nach Vorbehandlung mit SULT-, ADH- und ALDH-Inhibitoren sowie Probenecid an männliche Wistar-Ratten verabreicht werden.

#### 4.5.2 Optimierung der Dosis und Zeit zwischen Applikation und Tötung

In dem unter Punkt 4.4 dieser Arbeit beschriebenen Versuch wurden benzyllische Metaboliten alkylierter PAK in einer hohen Dosis von 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM verabreicht. Die Wahl dieser Dosis basierte auf früheren Arbeiten (Kuhlow 2001; Ma 2001; Surh *et al.* 1990a). Die makroskopische Untersuchung der mit diesen hohen Substanzdosen behandelten Tiere zeigte, dass zum Teil Substanzpräzipitationen im Bauchraum auftraten. Es wurde daher geprüft, ob über eine Reduktion der Dosis um den Faktor drei und eine Anpassung der Zeitspanne zwischen Applikation und Tötung noch gut analysierbare DNA-Adduktniveaus nach Verabreichung der benzyllischen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP erreicht werden und gleichzeitig das Problem der Substanzpräzipitation vermieden wird.

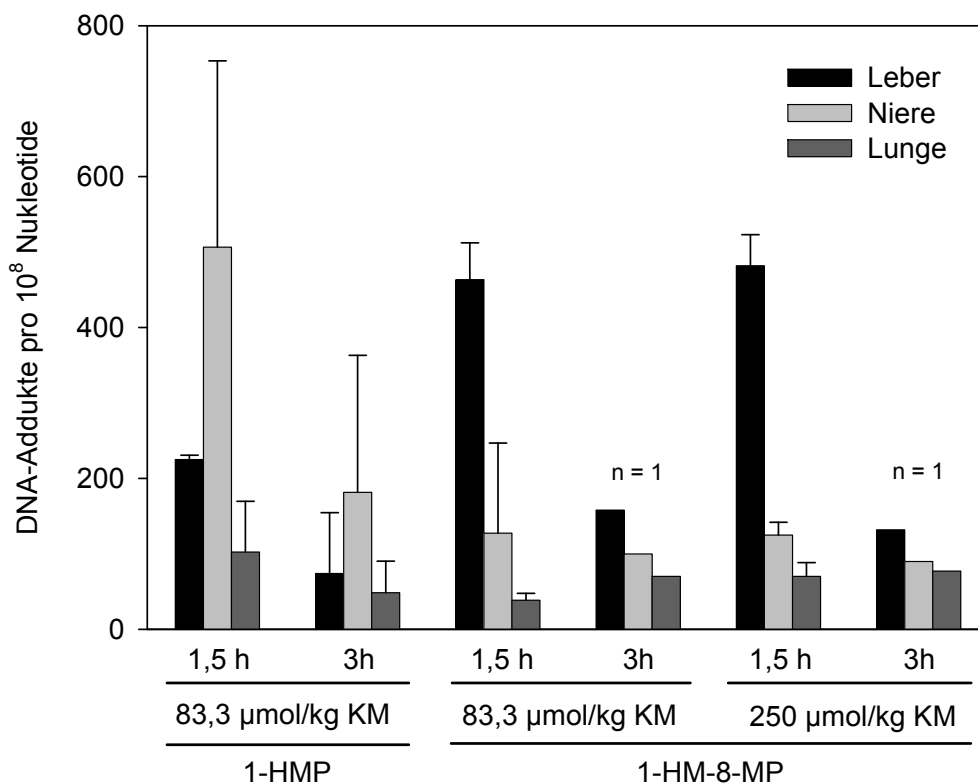
Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Abbildung 4.8 zeigt die in Leber, Niere und Lunge der Tiere ermittelten DNA-Adduktniveaus. In zwei Versuchsgruppen musste jeweils ein Tier aufgrund von Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen werden. Dies ist in Abbildung 4.8 durch die Angabe  $n = 1$  gekennzeichnet.

Bei Verabreichung von 83,3  $\mu\text{mol/kg}$  KM 1-HMP zeigte die makroskopische Untersuchung der Tiere keine Substanzpräzipitationen in der Bauchhöhle. DNA-Addukte konnten sowohl nach 1,5 h als auch nach 3 h nach Applikation in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wobei die DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere nach 3 h um den Faktor drei und in der Lunge um den Faktor zwei geringer waren als nach 1,5 h. Die höchsten DNA-Adduktniveaus wurden bei beiden Zeitpunkten in der Niere gefunden. Diese lagen um den Faktor zwei höher als in der Leber und um den Faktor fünf (1,5 h) bzw. vier (3 h) höher als in der Lunge.

Nach Verabreichung von 1-HM-8-MP wurden bei einer Dosis von 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM bei allen Tieren und bei einer Dosis von 83,3  $\mu\text{mol/kg}$  KM noch bei einigen Tieren Substanzpräzipitationen beobachtet. Im Gegensatz zum 1-HMP wurden die höchsten DNA-Adduktniveaus bei beiden Dosierungen und beiden Zeitpunkten in der Leber gefunden, gefolgt von Niere und Lunge. Bei beiden Dosierungen konnte nach 3 h eine deutliche Reduktion der hepatischen Adduktniveaus um den Faktor vier im Vergleich zu den Adduktniveaus nach 1,5 h festgestellt werden, wohingegen die DNA-Adduktniveaus der Niere nach 3 h nach Applikation kaum und die der Lunge nach 3 h nicht gegenüber den

1,5 h-Werten vermindert waren. Überraschenderweise konnten zu beiden Zeitpunkten keine Unterschiede im DNA-Adduktiveau zwischen den beiden Dosisgruppen beobachtet werden. Die DNA-Adduktiveaus bei Verabreichung von 83,3  $\mu\text{mol/kg}$  KM waren genauso hoch wie nach Verabreichung von 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM. Als eine mögliche Ursache hierfür ist die massive Präzipitation des 1-HM-8-MP im Bauchraum der Tiere bei Verabreichung in hohen Dosen anzuführen, was die Resorption eines Großteils der Substanz beeinträchtigt haben könnte.

Ausgehend von diesen Resultaten wurde beschlossen, in den weiteren Tierexperimenten eine Dosis von 83,3  $\mu\text{mol/kg}$  KM zu verabreichen, um das Problem von Substanzpräzipitation weitestgehend zu vermeiden und dennoch Adduktiveaus zu erreichen, die sowohl einen durch die gleichzeitige Gabe von Modulatoren bedingten Anstieg als auch einen starken Abfall erkennen lassen. Die Zeitspanne zwischen Applikation und Tötung wurde zur weiteren Absicherung des Erreichens eines ausreichend hohen DNA-Adduktiveaus auf 1,5 h festgelegt.



**Abbildung 4.8 Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der DNA-Adduktbildung in männlichen Wistar-Ratten nach Applikation von 1-HMP oder 1-HM-8-MP.** Die Tiere wurden einmalig i.p. mit 83,3 bzw. 250  $\mu\text{mol/kg}$  KM Testsubstanz behandelt und nach 1,5 bzw. 3 h getötet. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Wenn nicht anders angegeben, sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von zwei Tieren gezeigt.

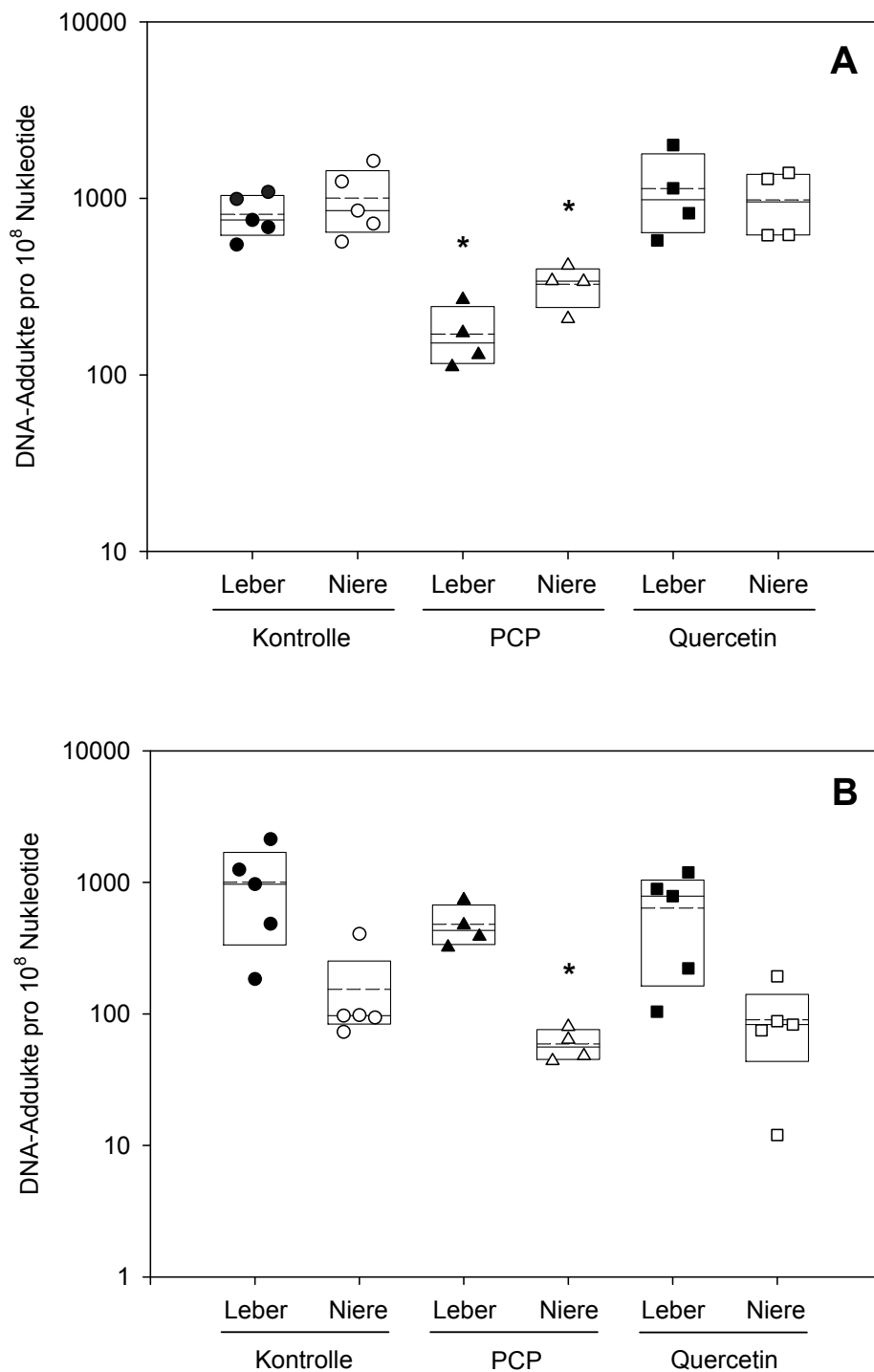
### 4.5.3 Einfluss von Enzyminhibitoren und -substraten auf die DNA-Addukt-bildung durch 1-HMP und 1-HM-8-MP

#### 4.5.3.1 Einfluss der SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol und Quercetin

Als SULT-Hemmstoffe wurden Pentachlorphenol (PCP) als häufig diagnostisch eingesetzter, gut etablierter *in vivo*-SULT-Inhibitor und Quercetin, das in der Nahrung weit verbreitet ist und verschiedene SULT-Formen *in vitro* hemmt, eingesetzt. Die Behandlung der Tiere (fünf pro Gruppe) erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Je ein Tier aus der mit Pentachlorphenol bzw. Quercetin behandelten Gruppe musste aufgrund Fehlapplikation von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die makroskopische Untersuchung eine Panktion des Caecum zeigte. Abbildung 4.9 A und 4.9 B zeigen die DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere männlicher Wistar-Ratten bei Vorbehandlung mit den SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol und Quercetin vor Verabreichung der benzyliischen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP.

Im Fall des 1-HMP führte die Gabe von Pentachlorphenol zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Adduktniveaus in Leber und Niere im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ). Die Adduktniveaus in der Leber waren im Mittel um den Faktor fünf und die der Niere um den Faktor drei erniedrigt. Nach Gabe von Quercetin war das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere 1-HMP-behandelter Tiere gegenüber Kontrolltieren nicht statistisch signifikant verändert.

Im Fall des 1-HM-8-MP führte die Vorbehandlung mit Pentachlorphenol zu einer Erniedrigung der DNA-Adduktniveaus in der Leber (Faktor zwei) und der Niere (Faktor drei) relativ zu den Kontrolltieren. Dies war jedoch nur für die Niere statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Gabe von Quercetin führte ebenfalls zu schwachen Abnahmen der DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere, die nicht statistisch signifikant waren.

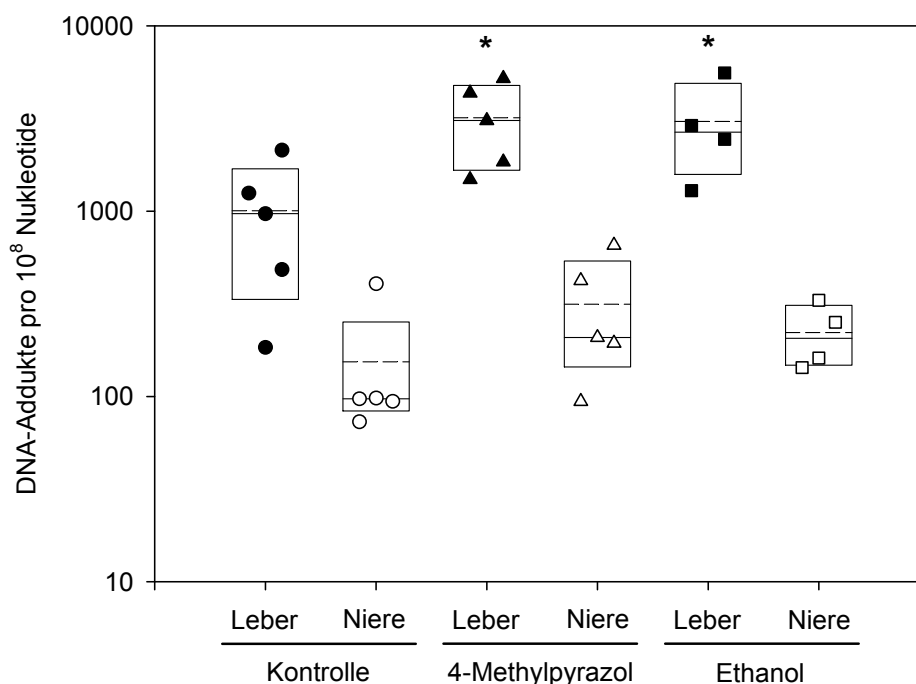


**Abbildung 4.9 Einfluss der SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol (PCP) und Quercetin auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere männlicher Wistar-Ratten nach Behandlung mit 1-HMP (A) und 1-HM-8-MP (B).** Die Behandlung der Tiere erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Gezeigt sind die Adduktniveaus der Einzeltiere in Leber (gefüllte Symbole) und Niere (offene Symbole) sowie der Median (durchgezogene Linie), der arithmetische Mittelwert (unterbrochene Linie) und die 25ste und 75ste Perzentile (Box). Sterne zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5.3.2 Einfluss des ADH-Inhibitors 4-Methylpyrazol und des ADH-Substrates Ethanol

Zur Hemmung des oxidativen Stoffwechsels des benzyllischen Alkohols 1-HM-8-MP wurden der ADH-Inhibitor 4-Methylpyrazol und das ADH-Substrat Ethanol vor Applikation des benzyllischen Alkohols wie unter 3.2.3 beschrieben jeweils fünf Tieren verabreicht. Ein Tier der Ethanol-Gruppe musste aufgrund von Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

Die Gabe des kompetitiven ADH-Inhibitors 4-Methylpyrazol bzw. des kompetitiven ADH-Substrates Ethanol führte zu statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhten DNA-Adduktniveaus in der Leber 1-HM-8-MP behandelter Tiere, im Mittel jeweils um den Faktor drei (Abb. 4.10). Das DNA-Adduktniveau der Niere war nach Verabreichung von 4-Methylpyrazol um den Faktor zwei und nach Verabreichung von Ethanol um den Faktor 1,4 relativ zu den Kontrolltieren erhöht. In beiden Fällen war der Anstieg des Adduktniveaus jedoch nicht statistisch signifikant.



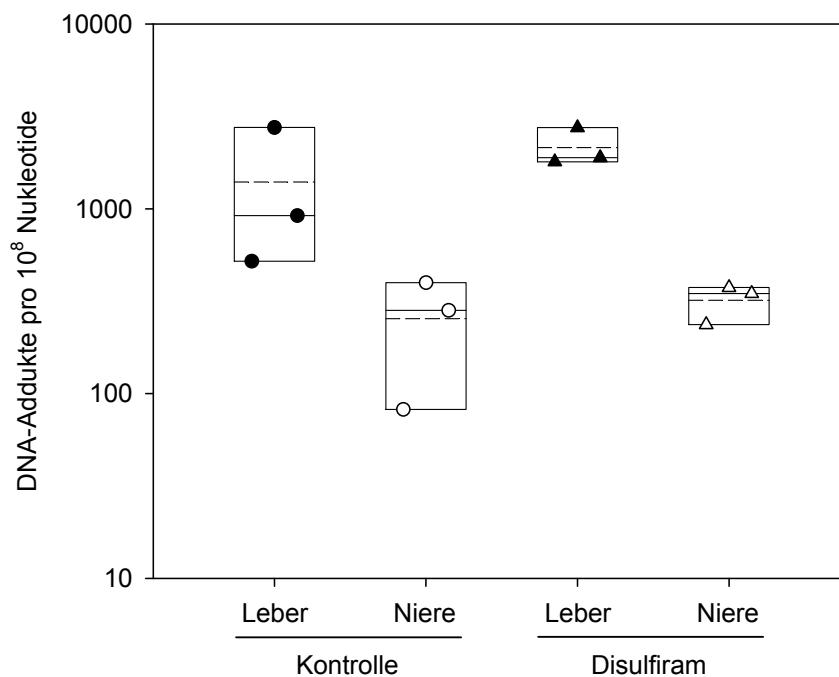
**Abbildung 4.10 Einfluss des ADH-Inhibitors 4-Methylpyrazol und des ADH-Substrates Ethanol auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere männlicher Wistar-Ratten nach Behandlung mit 1-HM-8-MP.** Die Behandlung der Tiere erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. DNA-Addukte wurden mittels <sup>32</sup>P-Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Gezeigt sind die Adduktniveaus der Einzeltiere in Leber (gefüllte Symbole) und Niere (offene Symbole) sowie der Median (durchgezogene Linie), der arithmetische Mittelwert (unterbrochene Linie) und die 25ste und 75ste Perzentile (Box). Sterne zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,05$ ).



#### 4.5.3.3 Einfluss des ALDH-Inhibitors Disulfiram

Zur Untersuchung der Bedeutung von Aldehyddehydrogenasen für den oxidativen Stoffwechsel des benzylichen Alkohols 1-HM-8-MP wurden männliche Ratten wie unter 3.2.3 beschrieben mit dem ALDH-Inhibitor Disulfiram vor Applikation von 1-HM-8-MP vorbehandelt.

Die Verabreichung von Disulfiram führte zu einem leichten mittleren Anstieg der DNA-Adduktniveaus in der Leber (Faktor 1,5) und Niere (Faktor 1,3) der mit 1-HM-8-MP behandelten Ratten (Abb. 4.11). Eine Signifikanzprüfung konnte aufgrund des geringen Stichprobenumfangs von jeweils drei Tieren nicht durchgeführt werden (Verlust von jeweils zwei Tieren in Kontroll- und Behandlungsgruppe aufgrund Fehlapplikation). Dennoch zeichnete sich eine Tendenz zu erhöhten DNA-Adduktniveaus nach Verabreichung von Disulfiram ab.



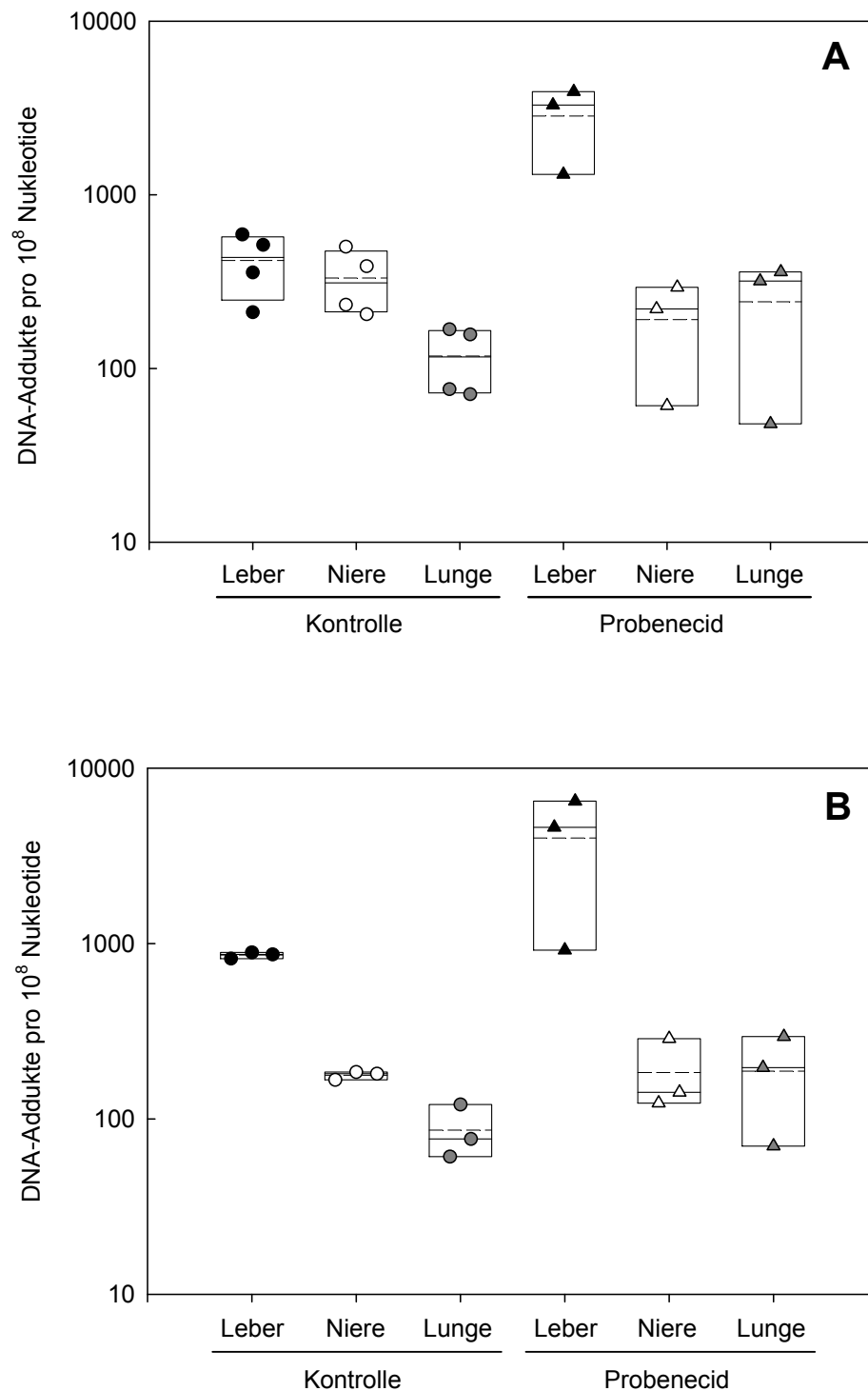
**Abbildung 4.11 Einfluss des ALDH-Inhibitors Disulfiram auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere männlicher Wistar-Ratten nach Behandlung mit 1-HM-8-MP.** Die Behandlung der Tiere erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Gezeigt sind die Adduktniveaus der Einzeltiere in Leber (gefüllte Symbole) und Niere (offene Symbole) sowie der Median (durchgezogene Linie), der arithmetische Mittelwert (unterbrochene Linie) und die 25ste und 75ste Perzentile (Box).

#### **4.5.4 Einfluss eines Inhibitors der renalen Sekretion organischer Anionen auf die DNA-Adduktbildung durch 1-HMP und 1-HM-8-MP**

Zur Untersuchung der Bedeutung der renalen Sekretion für die Gewebeverteilung von DNA-Addukten wurden männliche Ratten vor der Applikation von 1-HMP und 1-HM-8-MP mit Probenecid, einem Inhibitor der renalen Sekretion organischer Anionen, vorbehandelt (siehe 3.2.3). Abbildung 4.12 A und 4.12 B zeigen die DNA-Adduktniveaus in Leber, Niere und Lunge männlicher Wistar-Ratten.

Die Gabe von Probenecid führte zu einem deutlichen siebenfachen Anstieg des mittleren DNA-Adduktniveaus in der Leber 1-HMP-behandelter Tiere relativ zu den Kontrolltieren. Das mittlere DNA-Adduktniveau der Lunge zeigte ebenfalls einen leichten Anstieg um den Faktor zwei, während das mittlere DNA-Adduktniveau der Niere um den Faktor zwei erniedrigt war. Eine Überprüfung der Signifikanz der beobachteten Unterschiede war aufgrund des zu kleinen Stichprobenumfangs der Probenecid-Gruppe durch Verlust zweier Tiere aufgrund Fehlapplikation nicht möglich.

Die Vorbehandlung mit Probenecid führte auch bei 1-HM-8-MP behandelten Tieren zu einem deutlichen Anstieg des mittleren DNA-Adduktniveaus in der Leber um den Faktor fünf. Ebenso war auch das DNA-Adduktniveau der Lunge um den Faktor zwei erhöht. Das mittlere DNA-Adduktniveau der Niere war nach Vorbehandlung mit Probenecid gegenüber Kontrolltieren unverändert. Wie im Fall des 1-HMP konnte die Signifikanz der beobachteten Unterschiede aufgrund des zu kleinen Stichprobenumfangs beider Gruppen nicht überprüft werden.



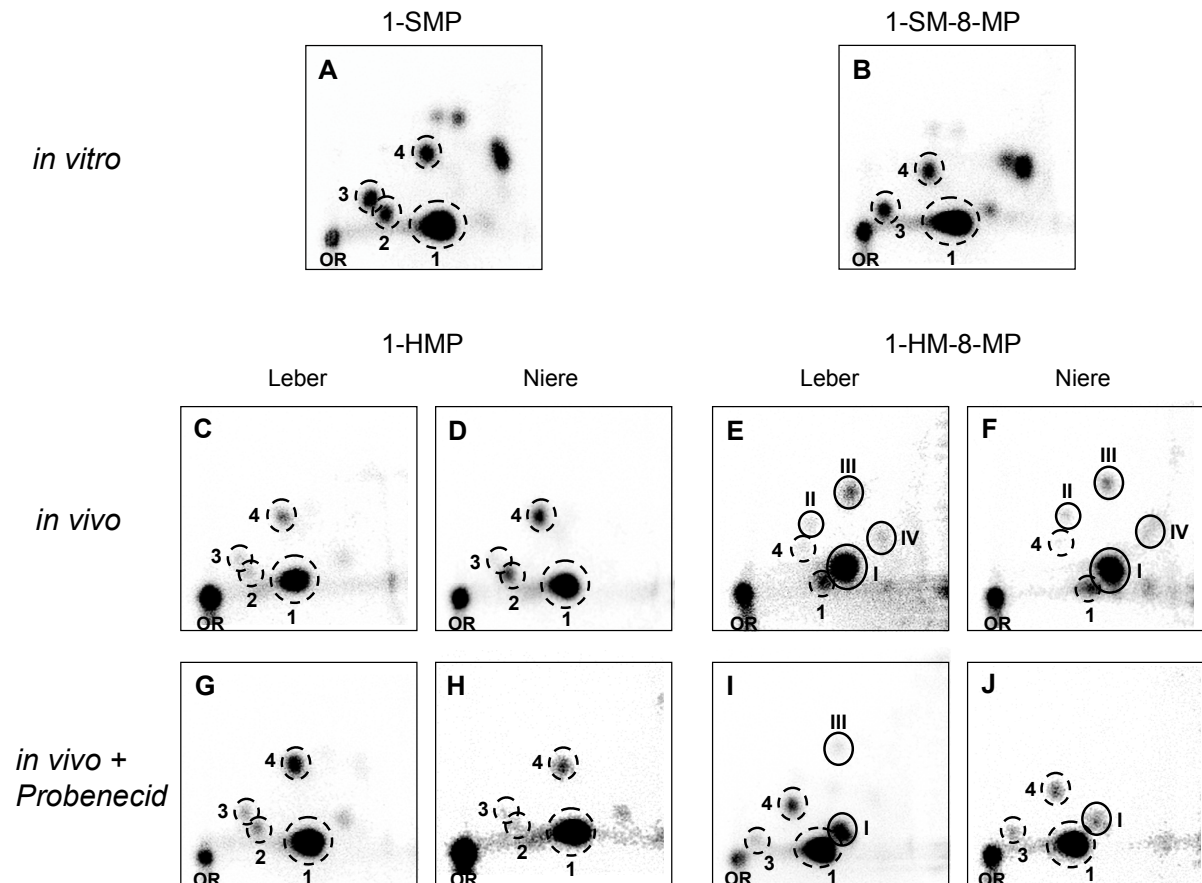
**Abbildung 4.12 Einfluss von Probenecid auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere männlicher Wistar-Ratten nach Behandlung mit 1-HMP (A) und 1-HM-8-MP (B).** Die Behandlung der Tiere erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. DNA-Addukte wurden mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysiert (siehe 3.2.5). Gezeigt sind die Adduktiveaus der Einzeltiere in Leber (gefüllte Symbole), Niere (offene Symbole) und Lunge (grau unterlegte Symbole) sowie der Median (durchgezogene Linie), der arithmetische Mittelwert (unterbrochene Linie) und die 25ste und 75ste Perzentile (Box).

#### 4.5.5 DNA-Adduktmuster in Geweben der Ratte nach Verabreichung von 1-HMP und 1-HM-8-MP

Nach Verabreichung benzyliischer Metabolite alkylierter PAK an Wistar-Ratten im Rahmen der unter Punkt 4.4 und 4.5 beschriebenen Versuche entsprachen die beobachteten DNA-Adduktmuster im Wesentlichen den Adduktmustern, die nach Inkubation der authentischen Schwefelsäureester mit DNA im zell- und enzymfreien System erhalten wurden. Zwar waren *in vivo* zumeist nur die Hauptadduktflecken sichtbar (vermutlich bedingt durch geringere Konzentration *in vivo* und Reparaturprozesse), die charakteristische Anordnung der Hauptadduktflecken sowie die relative Intensität dieser Flecken zueinander blieb jedoch stets erhalten (siehe Abb. 4.6).

Eine Ausnahme hiervon bildete jedoch das 1-HM-8-MP (Abb. 4.13). Das *in vitro*-DNA-Adduktmuster des Sulfates 1-SM-8-MP (Abb. 4.13 B) zeigte eine charakteristische Anordnung der Adduktflecken 1, 3 und 4. Diese Anordnung konnte jedoch in Geweben 1-HM-8-MP-behandelter Ratten nicht beobachtet werden. Nach Behandlung der Tiere mit 1-HM-8-MP allein oder bei Vorbehandlung mit Lösungsmitteln (Kochsalzlösung, Wasser, DMSO) oder den Modulatorsubstanzen PCP, Quercetin, 4-Methylpyrazol, Ethanol oder Disulfiram wurde stets das in Abb. 4.13 E und F gezeigte Adduktmuster gefunden. Dies unterschied sich qualitativ deutlich von dem *in vitro*-Adduktmuster des 1-SM-8-MP. Über Ko-Chromatographie-Experimente konnten lediglich die Adduktflecken 1 und 4 des *in vitro*-Adduktusters in schwacher Intensität im *in vivo*-Adduktmuster wieder gefunden werden. Die übrigen Adduktflecken des *in vivo*-Adduktusters (in Abb. 4.13 mit durchgezogenen Kreisen und römischen Ziffern markiert) komigrierten nicht mit Adduktflecken des *in vitro*-Musters. Bei Vorbehandlung von Tieren mit Probenecid vor Verabreichung von 1-HM-8-MP tauchte die charakteristische Anordnung der Adduktflecken 1, 3 und 4 des *in vitro*-Adduktusters in den Adduktmustern der Gewebe wieder auf (Abb. 4.13 I und J). Aber auch zwei der Adduktflecken des typischen *in vivo*-Musters waren im Probenecid-Adduktmuster enthalten. Es erschien daher als eine Überlagerung des 1-SM-8-MP-*in vitro*-Adduktusters (Abb. 4.13 B) und des *in vivo*-Adduktusters (Abb. 4.13 E und F).

Im Gegensatz dazu war im Fall des 1-HMP die charakteristische Anordnung der Adduktflecken 1 bis 4 des *in vitro*-DNA-Adduktusters des 1-SMP (Abb. 4.13 A) auch in den DNA-Adduktmustern von Geweben 1-HMP-behandelter Ratten (Abb. 4.13 C, D, G, H) zu sehen. Hierbei war es unerheblich, ob die Tiere nur den benzyliischen Alkohol 1-HMP oder eine Vorbehandlung mit einem Lösungsmittel wie physiologischer Kochsalzlösung oder einer Modulatorsubstanz wie z.B. Probenecid erhielten. Das charakteristische DNA-Adduktmuster blieb stets erhalten.



**Abbildung 4.13 Vergleich der DNA-Adduktmuster des 1-SMP und 1-SM-8-MP im zellfreien System und der DNA-Adduktmuster in Geweben von Ratten nach Behandlung mit 1-HMP und 1-HM-8-MP.** Jeweils 5 µg DNA wurden zum  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling eingesetzt und mit  $^{32}\text{P}$  markierte DNA-Addukte mittels multidirektionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe 3.2.5). OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. Die beiden oberen Abbildungen zeigen *in vitro*-Adduktmuster des 1-SMP (A) bzw. 1-SM-8-MP (B). Die mittleren Abbildungen stellen *in vivo*-Adduktmuster nach Behandlung von Ratten mit 1-HMP (C, D) bzw. 1-HM-8-MP (E; F) dar. Die unteren Abbildungen zeigen *in vivo*-Adduktmuster nach Behandlung von Ratten mit 1-HMP (G, H) bzw. 1-HM-8-MP (I, J) und Probenecid. Unterbrochene Kreise und arabische Ziffern kennzeichnen Adduktflecken, die sowohl im *in vitro*- als auch im *in vivo*-Adduktmuster zu finden sind. Durchgezogene Kreise und römische Ziffern kennzeichnen Adduktflecken des *in vivo*-Adduktusters, die keinem Fleck des *in vitro*-Musters zugeordnet werden konnten.

## 5 Diskussion

Die Sulfo-Konjugation (Sulfonierung) stellt eine wichtige Phase II-Reaktion im Metabolismus zahlreicher Fremdstoffe dar. Sie wird im Allgemeinen mit einer Detoxifizierung assoziiert, da die gebildeten Sulfokonjugate in der Regel wasserlöslicher sind und eine geringere passive Membrangängigkeit besitzen als die Ausgangsstoffe, was deren Ausscheidung begünstigt. Für bestimmte Substanzen wie beispielsweise benzyliche Alkohole alkylierter PAK sowie allyliche Alkohole wurde jedoch gezeigt, dass deren Sulfonierung mit einer Bioaktivierung einhergeht, da die gebildete Sulfatgruppe in der Verbindung eine gute Abgangsgruppe darstellt und über heterolytische Abspaltung dieser eine Reaktion mit zellulären Nucleophilen erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktivität sowie das genotoxische Potenzial benzylicher Alkohole und authentischer benzylicher Schwefelsäureester verschiedener ausgewählter alkylierter PAK *in vitro* und *in vivo* vergleichend untersucht.

### 5.1 *In vitro*-Genotoxizität benzylicher Metabolite alkylierter PAK

#### 5.1.1 DNA-Adduktbildung und Mutagenität benzylicher Schwefelsäureester

Benzyliche Schwefelsäureester stellen die ultimal reaktiven Metaboliten einer SULT-vermittelten Bioaktivierung alkylierter PAK dar. Die Bestimmung deren genotoxischen Potenzials erfolgte über die Untersuchung der Endpunkte DNA-Adduktbildung und Mutagenität im Ames-Test.

Hinsichtlich der Beteiligung der einzelnen Nucleobasen an der DNA-Adduktbildung ist bekannt, dass reaktive Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe bevorzugt mit der exozyklischen Aminogruppe des Guanin und Adenin reagieren (Dipple 1995). Für die Sulfate 1-SMP und 1-SM-8-MP wurde im Rahmen dieser Arbeit die Nucleotidspezifität der DNA-Addukte überprüft (siehe 4.1.2). Bei beiden Sulfaten konnte der Hauptadduktblock, der ca. 80% der Gesamtaktivität des Chromatogramms vereinigte, dem Guanin zugeordnet werden. Weitere Adduktblocken des DNA-Adduktblockmusters konnten dem Guanin, Adenin und Cytosin zugeordnet werden. Die Resultate zum 1-SMP sind denen einer früheren Arbeit hinsichtlich der Zahl der beobachteten Adduktblocken als auch der Zuordnung zu den einzelnen Nucleobasen vergleichbar (Kuhlow 2001). Lediglich das mit 8 nummerierte Desoxyguanosinaddukt (siehe 4.1.2) war in der früheren Arbeit für 1-SMP nicht beschrieben. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine geringere Sensitivität der Methode in der früheren Arbeit aufgrund der Verwendung anderer Enzymchargen oder TLC-Karten-Chargen sein. Eine weitere Strukturaufklärung der DNA-Addukte des 1-SMP und 1-SM-8-MP erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht, da entsprechende Adduktstandards nicht zur Verfügung standen. Monnerjahn *et al.* (1993) konnten jedoch mit Hilfe eines synthetischen

Oligonukleotids, das ein  $N^2$ -(1-Methylpyren)-desoxyguanosin enthielt, nachweisen, dass dieses und das nach Inkubation mit 1-SMP gebildete Hauptaddukt komigrierten. Dies deutet darauf hin, dass auch das in dieser Arbeit beobachtete Hauptaddukt das  $N^2$ -(1-Methylpyren)-desoxyguanosin-Addukt darstellt. Monnerjahn *et al.* (1993) räumten ebenso ein, dass ein weiteres Adenin-Addukt zu einem unbekanntem Anteil mit dem Haupt-Guanin-Addukt komigrierte, was ebenfalls den Beobachtungen dieser Arbeit entspricht, da ein Adenin-Addukt positionär dem Hauptadduktflack 1 zugeordnet werden konnte (siehe 4.1.2).

Die quantitative Auswertung der Endpunkte DNA-Adduktbildung und Mutagenität zeigte große Unterschiede sowohl zwischen Substanzen mit verschiedenen aromatischen Systemen als auch zwischen verschiedenen Positionsisomeren einer Verbindung, wobei eine gute Korrelation zwischen DNA-Adduktbildung und Mutagenität bestand. Die Substanzen mit hohem DNA-Adduktbildungspotenzial zeigten auch eine hohe Mutagenität und umgekehrt, was auf einen Kausalzusammenhang zwischen der Ausbildung von DNA-Addukten und der Induktion von Mutationen durch Schwefelsäureester alkylierter PAK hinweist.

Wie sind die mehrere Größenordnungen umfassenden Reaktivitätsunterschiede der untersuchten Sulfate zu erklären? Die Reaktion einiger benzylicher Schwefelsäureester wie des 1-SMP mit nukleophilen Strukturen scheint über heterolytische Abspaltung der elektronenziehenden Sulfatgruppe und intermediäre Bildung eines reaktiven elektrophilen Carbokations, d.h. über einen  $S_N1$ -Mechanismus zu erfolgen (Landsiedel *et al.* 1996a). In reinem Wasser ist die Reaktivität einer benzylichen Verbindung abhängig von der Stabilisierung des Carbokations durch das aromatische System sowie von der Bindungsstärke zwischen dem benzylichen C-Atom und der Abgangsgruppe. Bei Verbindungen mit gleicher Abgangsgruppe wie der Sulfatgruppe im Fall der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Schwefelsäureester korreliert die Reaktivität mit der Stabilisierungsenergie des benzylichen Carbokations (Landsiedel *et al.* 1996b). Über die PMO-Theorie (Dewar & Dougherty 1975) kann die Stabilisierung des Carbokations über Berechnung der Delokalisationsenergie ( $\Delta E_{\text{deloc}}/\beta$ ) abgeschätzt werden. Nach dieser Theorie steigt die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Carbokations und damit die Reaktivität einer Substanz mit zunehmender Delokalisationsenergie des gebildeten Carbokations. Landsiedel *et al.* (1996b) berechneten die Delokalisationsenergien verschiedener Positionsisomere methylierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1 Kalkulierte Delokalisationsenergien ( $\Delta E_{\text{deloc}}/\beta$ ) für die Bildung des benzyllischen Carbokations aus methylierten aromatischen Kohlenwasserstoffen**

PAK	$\Delta E_{\text{deloc}}/\beta$ für das benzyllische Kation in der angegebenen Position											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pyren	0.794	0.488	a	0.714	a	a	a	a	a	a	a	a
Benz[a]-anthracen	0.593	0.600	0.540	0.671	0.722	0.722	0.879	0.738	0.593	0.614	0.722	0.833
Chrysen	0.662	0.533	0.580	0.623	0.623	0.719	a	a	a	a	a	a
Benzo[a]-pyren	0.866	0.500	0.845	0.775	0.775	1.000	0.775	0.545	0.691	0.658	0.658	0.800
Anthanthren	1.000	0.509	0.974	0.805	0.805	1.087	a	a	a	a	a	a

Die Angaben entstammen Landsiedel *et al.* (1996b).

<sup>a</sup> Nicht existent oder identisch mit einer anderen Position, für die ein Wert gegeben ist.

Nach diesen Berechnungen ergibt das Isomer des Methylpyrens mit der Methylgruppe in Position 1 das stabilste Carbokation und damit den reaktivsten Schwefelsäureester gefolgt von Position 4 und 2. Tatsächlich waren das DNA-Adduktbildungspotenzial sowie die Mutagenität des als Referenzsubstanz genutzten Schwefelsäureesters 1-SMP um Größenordnungen höher als die des 2- oder 4-SMP. Ein sehr viel höheres mutagenes Potenzial des 1-SMP als das seines Positionsisomers 2-SMP wurde auch von Enders *et al.* (1993) und Glatt *et al.* (1994b) beobachtet. Ausgehend von der Delokalisationsenergie wurde ebenso ein Unterschied im genotoxischen Potenzial von 2- und 4-SMP erwartet. Dieser war jedoch anhand der Bestimmung der DNA-Adduktbildung sowie der Mutagenität im Ames-Test nicht abzulesen. Über parallel durchgeführte Bestimmungen der Halbwertszeit in wässriger Lösung im Rahmen einer anderen Dissertationsschrift (Batke 2008) wurde aber für das 4-SMP eine Halbwertszeit von 67 h gegenüber einer Halbwertszeit von über sechs Tagen für das 2-SMP gemessen und damit eine geringere Reaktivität des 2-SMP aufgezeigt. Ein noch höheres genotoxisches Potenzial als 1-SMP zeigten die beiden Sulfate 1-SM-6-MP und 1-SM-8-MP. Dies kann auf die elektronenliefernde induktive Wirkung der weiteren am aromatischen System gebundenen Methylgruppe, die in einer verstärkten Stabilisierung der reaktiven Carbokationen resultiert, zurückgeführt werden.

Für die beiden getesteten isomeren Sulfate des Ethylpyrens, 2- $\alpha$ -SEP und 4- $\alpha$ -SEP, wurde eine höhere DNA-Reaktivität und Mutagenität des 4- $\alpha$ -SEP aufgezeigt, was mit der von Landsiedel *et al.* (1996b) kalkultierten Reaktivitätsreihenfolge Position 4 > Position 2 übereinstimmt. Zudem lag das genotoxische Potenzial dieser Sulfate jeweils höher als das der entsprechenden methylierten Sulfate 2- und 4-SMP, was aus der elektronenliefernden Wirkung der zusätzlich am benzyllischen C-Atom gebundenen Methylgruppe resultiert.



Für die verschiedenen Positionsisomere des Methylbenzo[*a*]pyrens ergibt sich anhand der Delokalisationsenergien eine theoretische Reaktivitätsreihenfolge von Position 6 > Position 10 = Position 11 (Tabelle 5.1). Dies spiegelte sich darin wider, dass 6-SMBP sowohl ein etwas höheres DNA-Adduktniveau als auch eine um den Faktor 6,7 bzw. 1,6 höhere spezifische Mutagenität als 10- und 11-SMBP zeigte. Ebenso war auch die Halbwertszeit des 6-SMBP deutlich niedriger (1,2 min) als die des 10-SMBP (56 min) (Batke 2008). 10-SMBP und 11-SMBP zeigten für die Endpunkte DNA-Adduktbildung und Mutagenität inkonsistente Ergebnisse. So bildete 10-SMBP mehr DNA-Addukte als 11-SMBP (Faktor 1,7), zeigte aber eine um den Faktor 4 geringere spezifische Mutagenität in wässriger Lösung als 11-SMBP. Die Ursache hierfür kann in der nur bedingten Vergleichbarkeit beider Testsysteme begründet liegen. Bei der Reaktion mit gereinigter DNA im zellfreien System sind weder weitere Reaktionspartner (abgesehen von Wasser) präsent noch liegen zwischen reaktiver Substanz und der DNA als Zielmolekül Barrieren in Form von Zellmembranen vor wie im *Salmonella*-Mutagenitätstest. Bei den übrigen Sulfaten war allerdings eine gute Korrelation zwischen deren DNA-Adduktbildungspotenzial im zellfreien System und der Mutagenität in *S. typhimurium* festzustellen. Eine weitere Ursache für die inkonsistenten Ergebnisse im Fall des 10- und 11-SMBP könnte die hohe interexperimentelle Variation der Postlabelling-Methode sein.

Das Sulfat des methylenüberbrückten Benzo[*a*]pyrenkongeners CPBP zeigte eine höhere DNA-Reaktivität als 6-SMBP und die höchste spezifische Mutagenität aller Sulfate im wässrigen Milieu. Ebenso war auch das Sulfat des methylenüberbrückten Cyclopenta[*def*]chrysen stark genotoxisch. Offenbar erfolgte nach heterolytischer Abspaltung der am überbrückenden doppelt benzyllischen C-Atom positionierten Sulfatgruppe die Bildung eines optimal stabilisierten Carbokations, was einerseits in einer hohen DNA-Reaktivität resultierte und andererseits auch das Erreichen der Zielstruktur über größere Entfernungen und über Membranbarrieren hinweg erlaubte.

### **5.1.2 Modulation der Mutagenität benzyllischer Schwefelsäureester durch niedermolekulare Verbindungen im Expositionsmedium**

Das mutagene Potenzial der Sulfate im *Salmonella*-Mutagenitätstest wurde nicht nur in rein wässriger Lösung, sondern auch in einer Lösung von 150 mM KCl ermittelt. Die Wahl dieses Expositionsmediums basierte auf Untersuchungen mit 1-SMP, die eine deutliche Beeinflussung der Mutagenität dieses Sulfates durch verschiedene Medienkomponenten, insbesondere durch Halogen-Ionen aufzeigten (Glatt *et al.* 1990; Enders *et al.* 1993). In Anwesenheit von Chlorid-Ionen im Expositionsmedium zeigte sich ein dramatischer Anstieg des mutagenen Potenzials von 1-SMP um den Faktor 400 (Enders *et al.* 1993). Dieser Effekt konnte auf eine spontan erfolgende Substitutionsreaktion zurückgeführt werden, die in der Bildung des sekundär reaktiven 1-Chlormethylpyren (1-CMP) resultierte (Glatt *et al.* 1990).

1-CMP zeigte bei vergleichbarer intrinsischer DNA-Reaktivität (Surh *et al.* 1990; Glatt *et al.* 1994d) ein noch höheres mutagenes Potenzial als 1-SMP, was auf dessen bessere Membrangängigkeit zurückgeführt wurde (Glatt *et al.* 1990).

In der vorliegenden Arbeit zeigten alle getesteten Sulfate einen Anstieg der spezifischen Mutagenität in Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von Chlorid-Ionen, was auf ablaufende Substitutionsreaktionen und die Bildung sekundär reaktiver, besser permeabler Chlorderivate der Sulfate hindeutet. Enders *et al.* (1993) hatten einen derartigen Anstieg des mutagenen Potenzials in chloridhaltigem Medium für die benzylischen Schwefelsäureester 1-SMP (Faktor 400), 1- $\alpha$ -SEP (Faktor 4), 2-SMP (Faktor 240) und 2- $\alpha$ -SEP (Faktor 9) beobachten können. Die in dieser Arbeit beobachteten Anstiege für das Referenzsulfat 1-SMP sowie 2-SMP lagen allerdings deutlich niedriger (Faktor 24 bzw. 33), wohingegen die für 2- $\alpha$ -SEP in rein wässrigem und chloridhaltigem Expositionsmedium beobachteten mutagenen Effekte mit den von Enders *et al.* (1993) publizierten Werten übereinstimmten. Zu den Abweichungen im Fall des 1- und 2-SMP könnten die interexperimentelle Variabilität sowie Unterschiede in der experimentellen Durchführung, beispielsweise das Ausmaß der Entfernung von Chloridionen aus dem Anzuchtmedium, was Einfluss auf die Finalkonzentration von Chloridionen im Expositionsmedium hat, beitragen. Weitere mögliche Ursachen für die Abweichung könnten die Verwendung unterschiedlicher Ames-Teststämme (TA98 bei Enders *et al.* (1993) und TA1538 in dieser Arbeit) sowie die Verwendung unterschiedlicher Chargen von Testsubstanzen sein. So konnten Glatt *et al.* (1990) bei Verwendung des gleichen Stammes TA98 für 1-SMP einen nur etwa 50fachen Anstieg der Mutagenität in KCl beobachten, was mit der unterschiedlichen Qualität der Substanzchargen erklärt wurde (Enders *et al.* 1993). Da die Reinheit der bei Enders *et al.* (1993) und in dieser Arbeit verwendeten Sulfatchargen ähnlich war (> 90% bzw. > 95%) sind die beobachteten Unterschiede eher auf die höhere Sensitivität des Teststammes TA98 zurückzuführen.

Die Sulfate der Benzo[a]pyrenkongenere zeigten im Vergleich zu den Sulfaten der Pyrenkongenere nur moderate Anstiege der spezifischen Mutagenität in Anwesenheit von Chlorid, wobei der geringste Anstieg beim 6-SMBP auftrat (Faktor 1,6). Die Untersuchungen von Enders *et al.* (1993) zeigten im Fall des 6-SMBP in chloridhaltigem Expositionsmedium keinen Anstieg und die von Surh *et al.* (1990b) sogar eine Abnahme der Mutagenität um den Faktor 2. Dies kann mit der hohen Reaktivität des in Anwesenheit von Chlorid gebildeten Chlorderivates erklärt werden, die sich in einer extrem niedrigen Halbwertszeit äußert (Surh *et al.* 1990b). Die hohe Reaktivität bedingt auch eine hohe Reaktionsrate mit anderen Nukleophilen vor Erreichen der bakteriellen DNA, was die effektive Konzentration an der DNA verringert und zu einer geringeren Mutagenität führt als bei Sulfaten, deren Chlorderivate weniger reaktiv sind wie beispielsweise beim 1-SMP. Den Einfluss

verschiedener weiterer Substituenten auf die Mutagenität des 6-SMBP verdeutlichen die Untersuchungen von Enders *et al.* (1993). In Anwesenheit von Bromid war die Mutagenität von 6-SMBP gegenüber einer rein wässrigen Lösung oder einer Lösung von KCl um den Faktor 3 verringert, wohingegen in Anwesenheit von Acetat die Mutagenität um den Faktor 2,4 gesteigert war. Diese Effekte beruhen auf der höheren nukleophilen Stärke von Bromid, die in einer hohen Reaktivität der Bromoderivate resultiert, wohingegen Acetat eine nur schwache Abgangsgruppe darstellt und zu weniger reaktiven, aber mutageneren Derivaten führt (Landsiedel *et al.* 1996b).

Der Einfluss von KCl auf die Mutagenität benzyllischer Sulfate könnte jedoch nicht nur allein durch die Chloridsubstitution verursacht sein. Glatt *et al.* (1991) beobachteten eine verringerte Mutagenität von 7-Methylbenz[*a*]anthracen-5,6-oxid in einer Lösung von KCl im Vergleich zur Durchführung in reinem Wasser, die sie auf einen Kalium-vermittelten Einfluss auf die Bakterienzellen zurückführten. Die Autoren postulierten einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Substanz beispielsweise durch eine Veränderung der Struktur und Permeabilität der bakteriellen Zellmembran oder Zellwand oder durch eine Modulation von Transportsystemen. Ein derartiger Einfluss von Kalium auf das mutagene Potenzial wurde auch für andere lipophile Substanzen gezeigt (Glatt *et al.* 1994a).

Für benzyllische Sulfate alkylierter PAK wurde wie obig erläutert zumeist eine Steigerung des mutagenen Potenzials beobachtet. Da es sich bei den negativ geladenen Sulfaten um hydrophilere Substanzen handelt, könnten sich die Kalium-vermittelten Effekte weniger stark auswirken oder sie könnten über den Effekt der simultan erfolgenden Chlorid-Substitution maskiert werden.

Die nach Inkubation in einer Lösung von KCl beobachteten mutagenen Effekte der getesteten Sulfate ergeben sich somit als Integral deren intrinsischer chemischer Reaktivität, des Ausmaßes der Substitutionsreaktion mit Chlorid, der Reaktivität und Lipophilie der gebildeten Chlorderivate sowie möglicher Effekte der Kaliumkationen auf die Bakterienzellen.

### 5.1.3 Mutagenität benzyllischer Alkohole

Die Untersuchung des mutagenen Potenzials benzyllischer Schwefelsäureester im *Salmonella*-Mutagenitätstest bei externer Zugabe bzw. externer Bildung durch ein metabolisierendes System wird dadurch erschwert, dass diese unter den Testbedingungen eine negative Ladung tragen, die deren Penetration der bakteriellen Zellmembran beeinträchtigt und damit zu einer Unterschätzung des mutagenen Potenzials führen kann.

Das Problem von Membranbarrieren kann vermieden werden, wenn die Bioaktivierung zu genotoxischen Sulfaten innerhalb der Bakterienzellen stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Mutagenitätsprüfungen der benzyllischen Alkohole der ausgewählten alkylierten PAK mit gentechnisch veränderten *S. typhimurium*-Stämmen durchgeführt, die verschiedene SULT-Formen des Menschen und der Ratte heterolog exprimieren. Die mit

diesem Testsystem beobachteten mutagenen Effekte stellten das Produkt der Substratspezifität der jeweils exprimierten SULT-Form und der intrinsischen Reaktivität der gebildeten benzyllischen Schwefelsäureester dar. Unter der Voraussetzung eines ausreichend hohen genotoxischen Potenzials des gebildeten Schwefelsäureesters sollten die mutagenen Effekte eines benzyllischen Alkohols in verschiedenen SULT-exprimierenden Stämmen mit dessen Umsatz durch die entsprechenden SULT-Formen korrelieren. Daher eignete sich dieses Testsystem auch, um den relativen Umsatz der zu sehr kurzlebigen Sulfaten konvertierten benzyllischen Alkohole durch die verschiedenen SULT-Formen abzuschätzen, selbst wenn entsprechende Umsatzmessungen über analytische Methoden nicht möglich waren.

#### 5.1.3.1 Mutagenität benzyllischer Alkohole bei Expression humaner SULT-Formen

Innerhalb der Gruppe der benzyllischen Alkohole der alkylierten Pyrenkongenere zeigten die meisten Alkohole deutlich mutagene Effekte in mehreren humane SULT-Formen exprimierenden Stämmen. Eine Ausnahme hiervon bildeten 2- und 4-HMP, die in den Stämmen kein bzw. ein nur äußerst geringes mutagenes Potenzial besaßen (siehe Tabelle 4.2). Dies konnte auf die geringe DNA-Reaktivität der entsprechenden Sulfate 2- und 4-SMP zurückgeführt werden. Über Untersuchungen zur DNA-Adduktbildung in bakterieller DNA der Stämme TA1538a-hST1A1\*1Y und TA1538-hST1C1 wurde ein nur geringes DNA-Adduktniveau nach Inkubation mit 2-HMP beobachtet (siehe Anhang Abb. 8.1), während mittels Umsatzmessungen über HPLC eine Sulfonierung des 2-HMP durch viele humane SULT-Formen wie beispielsweise durch die SULT1A1, 1A2, 1C1 und 1C2 gezeigt werden konnte (Batke 2008).

Der Referenzalkohol 1-HMP sowie 1-HM-6-MP, 1-HM-8-MP und 1- $\alpha$ -HEP zeigten die stärksten mutagenen Effekte in Stämmen mit Expression der humanen SULT-Formen 1A1 und 1E1, der benzyllische Alkohol 2- $\alpha$ -HEP bei Expression der humanen SULT1A1 und 1A2 und 4- $\alpha$ -HEP bei Expression der humanen SULT1E1 (siehe Tabelle 4.2). Dies weist darauf hin, dass die entsprechenden SULT-Formen den höchsten Substratumsatz der jeweiligen benzyllischen Alkohole bewirkten. Im Fall des 2- $\alpha$ -HEP, dessen Schwefelsäureester mit einer Halbwertszeit von 72 min relativ stabil ist, wurden im Rahmen einer anderen Dissertationsschrift parallel Umsatzmessungen mit cytosolischen Präparationen der SULT-exprimierenden *S. typhimurium*-Stämme mittels HPLC durchgeführt (Batke 2008). Die höchsten Umsatzraten ergaben sich mit den humanen SULT-Formen 1A1 und 1A2, bei deren Expression auch die stärksten mutagenen Effekte zu verzeichnen waren.

Im Gegensatz hierzu zeigten die meisten benzyllischen Alkohole der alkylierten PAK mit Benzo[a]pyrengrundgerüst sowie die methylenüberbrückten Alkohole HCPC und HCPBA im Stamm mit Expression der humanen SULT-Form 1B1 und/oder 2A1 die stärksten mutagenen Effekte (siehe Tabelle 4.2). Den stärksten mutagenen Effekt in dieser Gruppe

zeigte 6-HMBP bei Expression der humanen SULT1B1 ( $> 10000$  Revertanten pro nmol Testsubstanz).

Die in dieser Arbeit beobachtete Präferenz der humanen SULT-Formen 1A1 und 1E1 für benzyllische Alkohole mit Pyrengerüst und der humanen SULT-Form 1B1 für benzyllische Alkohole mit größerem bzw. methylenüberbrücktem aromatischem System stimmt mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen überein, bei denen eine hohe Aktivierungskapazität der SULT1A1 für 1-HMP, der SULT1E1 für 1- $\alpha$ -HEP und der SULT1B1 für 6-HMBP und HCPC aufgezeigt wurde (Glatt 2000). Da die entsprechenden SULT-Formen im Menschen Unterschiede in der Gewebeverteilung zeigen (siehe Tabelle 1.1), wobei die SULT1A1 beispielsweise in der Leber und die SULT1B1 im Gastrointestinaltrakt auf hohem Niveau exprimiert werden, sind unterschiedliche Organotropismen der Schädigung der ausgehend von verschiedenen alkylierten PAK gebildeten benzyllischen Metaboliten zu erwarten.

Der benzyllische Alkohol 6-HMAA zeigte neben 1-HMP, 1-HM-6-MP und 1- $\alpha$ -HEP in allen SULT-exprimierenden Stämmen außer bei Expression der humanen SULT2B1a und 2B1b einen mutagenen Effekt. Im Gegensatz zu den anderen genannten Alkoholen zeigte 6-HMAA selbst ein intrinsisches mutagenes Potenzial, was auf die starke Aktivierung des benzyllischen C-Atoms in dieser Verbindung hinweist. Die Untersuchung der Reaktivität des entsprechenden Sulfates über Bestimmung von DNA-Adduktbildung und Mutagenität konnte nicht erfolgen, da die Substanz eine extreme Instabilität zeigte und innerhalb kurzer Zeit zerfiel.

Die sekundären benzyllischen Alkohole 6- $\alpha$ -HEAA sowie 6- $\alpha$ -HEBP zeigten im Gegensatz zu ihren methylierten Kongeneren 6-HMAA bzw. 6-HMBP keine bzw. nur schwach mutagene Effekte in den Stämmen, in denen 6-HMAA bzw. 6-HMBP mutagenes Potenzial und damit einen Umsatz durch die entsprechende exprimierte humane SULT-Form zeigten (siehe Tabelle 4.2). Mangelnde Reaktivität der entsprechenden Sulfate ist auszuschließen, da das benzyllische C-Atom aufgrund des induktiven Effekts der zusätzlichen Methylgruppe theoretisch stärker aktiviert wird als in den methylierten Kongeneren. Reaktivitätsuntersuchungen der Sulfate hatten wie im Fall des Sulfates des 6-HMAA aufgrund der hohen Instabilität der Substanzen nicht erfolgen können. Im Rahmen einer anderen Dissertationsschrift durchgeführte Messungen der Halbwertszeit des Sulfates 6- $\alpha$ -SEBP zeigten jedoch, dass diese im Bereich der Halbwertszeit des 6-SMBP lag (6- $\alpha$ -SEBP: 2 min, 6-SMBP: 1,2 min) (Batke 2008). Die fehlenden bzw. geringen mutagenen Effekte der ethylierten benzyllischen Alkohole 6- $\alpha$ -HEBP und 6- $\alpha$ -HEAA im Vergleich zu den methylierten Kongeneren könnten daher auf einen geringeren Umsatz durch die entsprechenden exprimierten SULT-Formen zurückzuführen sein, der allein durch den strukturellen Unterschied einer zusätzlich am benzyllischen C-Atom gebundenen

Methylgruppe verursacht wäre. Im Fall der benzylichen Alkohole 1-HMP und 1- $\alpha$ -HEP war jedoch ein derartiger Effekt auf den Substratumsatz nicht zu beobachten. 1- $\alpha$ -HEP zeigte in allen SULT-exprimierenden Stämmen vergleichbare oder sogar stärker mutagene Effekte als 1-HMP. Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten schwachen mutagenen Effekte beider Alkohole ist, dass die entsprechenden Sulfate gebildet wurden, jedoch aufgrund ihrer hohen Reaktivität vor Erreichen der bakteriellen DNA mit anderen nukleophilen Reaktionspartnern wie Wasser abreagierten oder weiteren chemischen Reaktionen unterlagen. So wurde für die benzylichen Schwefelssäureester ethylierter PAK beobachtet, dass über Sulfatelimination die entsprechenden Vinylverbindungen gebildet werden (H.R. Glatt, DfE; unveröffentlichte Daten).

### 5.1.3.2 Mutagenität benzylicher Alkohole bei Expression von SULT-Formen der Ratte

Zwischen orthologen SULT-Formen verschiedener Spezies können große Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifität bestehen. So werden 6-HMBP und HCPC, wie in dieser Arbeit gezeigt (Tabelle 4.2), durch die in *S. typhimurium* exprimierte humane SULT1B1 zu potenten Mutagenen aktiviert, wohingegen die murine Sult1b1 weniger als 5% der Aktivität des humanen Orthologs zeigte (Glatt 2000). Ebenso wurden auch 1-Hydroxy-3-methylcholanthren und 2-Hydroxy-3-methylcholanthren durch die in *S. typhimurium* exprimierte humane SULT2A1, jedoch nicht durch die rHSTa, eine der drei SULT2A-Formen der Ratte, zu Mutagenen umgesetzt. Im Gegensatz hierzu wurden 9-Hydroxymethylantracen und 9-Hydroxy-10-methylantracen durch die rHSTa aktiviert, während ein Umsatz durch die humane SULT2A-Form nicht stattfand (Glatt 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchten Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP zeigten den stärksten mutagenen Effekt bei Expression der SULT2A3 der Ratte (rHSTa), einer SULT-Form, die in weiblichen Ratten stark exprimiert wird (Liu & Klaassen 1996a). Eine geringere, aber immer noch hohe spezifische Mutagenität konnte auch bei Expression der rSULT1A1, einer männlich-dominanten SULT-Form (Liu & Klaassen 1996b), beobachtet werden. Die für die Ratten-SULT beobachteten Substratpräferenzen standen daher im Gegensatz zur Situation bei Expression humaner SULT, bei denen die Aktivierung durch die hSULT1A1 die durch die hSULT2A1 bei weitem überwog. Trotz der beobachteten Unterschiede in der Substratspezifität orthologer Enzymformen zeigten die Untersuchungen, dass eine Bioaktivierung des 1-HMP und 1-HM-8-MP auch *in vivo* in der Ratte sowohl im männlichen als auch im weiblichen Geschlecht zu erwarten ist. Im Fall des 1-HMP konnten Glatt *et al.* (2003) die Aktivierung zum mutagenen 1-SMP durch verschiedene PAPS-angereicherte Gewebezysosole der Ratte zeigen. Hierbei zeigte die Leber in Übereinstimmung mit der ausgeprägten Leberfokussierung der SULT-Expression in der Ratte (Dunn & Klaassen 1998) die höchste Aktivierungskapazität, die bei der männlichen Ratte die der Niere um den Faktor

210 überstieg. Die Aktivierungskapazität von Leberzytosol weiblicher Ratten war zudem um den Faktor 4 höher als die von männlichen Ratten, was möglicherweise mit dem höheren Umsatz des 1-HMP durch die weiblich-dominante SULT2A-Form in Zusammenhang steht.

Neben Unterschieden in der Substratspezifität offenbarte der Speziesvergleich jedoch auch Unterschiede zwischen SULT des Menschen und der Ratte hinsichtlich der Kapazität zum Umsatz und zur Bioaktivierung benzyliischer Alkohole. Die bei Expression der humanen SULT-Formen 1A1 und 1E1 für 1-HMP und 1-HM-8-MP ermittelten spezifischen Mutagenitäten lagen um ein Vielfaches höher als die höchsten bei Expression von SULT-Formen der Ratte beobachteten spezifischen Mutagenitäten (siehe Tabelle 5.2). Auch unter Berücksichtigung, dass etwaige Unterschiede in der Proteinexpression sowie in der Funktionsfähigkeit der Enzyme in der bakteriellen Umgebung vorlagen, weist dies auf eine höhere katalytische Effizienz humaner SULT-Formen und damit auf ein höheres Gefährdungspotenzial des Menschen hin.

**Tabelle 5.2 Aktivierung von 1-HMP und 1-HM-8-MP zu einem bakteriellen Mutagen durch verschiedene heterolog exprimierte SULT-Formen des Menschen und der Ratte**

Alkohol	Spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol) <sup>a</sup> in <i>S. typhimurium</i> mit Expression der SULT-Form			
	hSULT1A1	hSULT1E1	rSULT1A1	rSULT2A3
1-HMP	18150 <sup>b</sup>	8120 <sup>c</sup>	650	1190 <sup>c</sup>
1-HM-8-MP	47500	112000	740	1210

<sup>a</sup> Die angegebenen Werte entstammen unabhängigen Einzeluntersuchungen.

<sup>b</sup> Mittelwert aus vier unabhängigen Einzeluntersuchungen

<sup>c</sup> Mittelwert aus zwei unabhängigen Einzeluntersuchungen

## 5.2 *In vivo*-Genotoxizität benzyllischer Metabolite alkylierter PAK

Die durchgeführten *in vitro*-Versuche zeigten das Potenzial der benzyllischen Metabolite alkylierter PAK für genotoxische Wirkungen. Nachfolgend musste geklärt werden, welche Relevanz die beobachteten Effekte für die komplexere *in vivo*-Situation haben, in der neben der intrinsischen DNA-Reaktivität der Metabolite toxikokinetische Faktoren wie Absorption, Verteilung, konkurrierende detoxifizierende Stoffwechselwege sowie Ausscheidungsprozesse deren genotoxische Wirkungen beeinflussen können. Die Bestimmung des DNA-Adduktniveaus zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Verabreichung der Testsubstanzen war hierfür ein geeigneter Endpunkt, da dieses das Integral der Bioverfügbarkeit, Gewebeverteilung, Bioaktivierung und Detoxifizierung sowie Reparatur von primären DNA-Schäden darstellt.

### 5.2.1 Gewebeverteilung und Ausmaß der DNA-Adduktbildung durch benzyllische Alkohole und Schwefelsäureester

Nach Verabreichung verschiedener benzyllischer Alkohole und Schwefelsäureester an männliche Wistar-Ratten wurden DNA-Addukte in den untersuchten Geweben Leber, Niere und Lunge gefunden und konnten anhand der Adduktmuster den Testsubstanzen zugeschrieben werden. *In vivo* wurden in allen Fällen jeweils weniger verschiedene DNA-Adduktflecken detektiert als *in vitro*, was zum einen durch die geringere Konzentration des reaktiven Metaboliten *in vivo* und zum anderen durch die *in vivo* stattfindenden Reparaturprozesse bedingt sein kann. Das Auffinden von weniger Adduktflecken *in vivo* im Vergleich zu *in vitro* wurde für das 1-HMP bzw. 1-SMP auch in einer früheren Arbeit beschrieben (Kuhlow 2001). Sowohl in der früheren als auch in der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo* lediglich die charakteristische Anordnung der vier Hauptadduktflecken gefunden (siehe Abbildung 4.6).

Nach Verabreichung der Schwefelsäureester 1-SMP, 4-SMP, 2- $\alpha$ -SEP, 4- $\alpha$ -SEP und 6-SMBP wurden DNA-Addukte in den untersuchten Organen Leber, Niere und Lunge detektiert (siehe Abb. 4.7). Dies zeigt, dass die Sulfate nach Resorption aus dem Peritoneum systemisch bioverfügbar waren und trotz ihrer zum Teil hohen Reaktivität die Leber und andere Organe erreichten. Ma *et al.* (2003) konnten nach Verabreichung von 1-SMP an männliche Ratten dieses auch noch nach 3 h im Plasma der Ratten nachweisen, was unter Berücksichtigung einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten bei 37°C in Wasser (Landsiedel *et al.* 1996a; Batke 2008) sehr überraschend ist. Die Autoren zeigten auf, dass 1-SMP im Blutplasma durch reversible Albumin-Bindung stabilisiert wird, ein Vorgang, der auch für andere reaktive Sulfate von Bedeutung sein könnte. So konnten Ma *et al.* (2003) für eine exemplarische *in vitro*-Situation zeigen, dass auch die Halbwertszeit des weitaus



kurzlebigeren 6-SMBP bei physiologischer Konzentration an Albumin um den Faktor 120 auf einige Minuten gesteigert wurde.

Die hohen Adduktniveaus in der Leber (siehe Abb. 4.7) sind dadurch erklärbar, dass in das Peritoneum applizierte Substanzen resorbiert und dann zu einem großen Anteil über die Pfortader zur Leber transportiert wurden. Des Weiteren ist denkbar, dass die reaktiveren Sulfate bereits vor Erreichen der Zielorgane zu ihren benzyllischen Alkoholen hydrolysierten, was eine typische *in vitro*-Reaktion dieser Metabolite in wässrigem Medium darstellt (Landsiedel *et al.* 1996a), und dann in der Leber der Ratten zu reaktiven Sulfaten reaktiviert wurden. Eine derartige zyklische Aktivierung reaktiver Sulfate über Hydrolyse zu den benzyllischen Alkoholen und anschließende Reaktivierung über SULT wurde *in vitro* gezeigt (Glatt 2000). Ob dieser Prozess auch *in vivo* stattgefunden hat und welchen Anteil dieser an den gemessenen DNA-Adduktniveaus hatte, kann nicht beantwortet werden.

Die zum Teil hohen Adduktniveaus in der Niere deuten auf einen hohen Import der entsprechenden Sulfate. Dies könnte im Zuge einer renalen Aufnahme der Sulfate über Interaktion mit organischen Anionentransportern wie OAT an der basolateralen Membran der Nierentubulizellen erfolgen. Die Bedeutung der renalen Sekretion für die DNA-Adduktbildung durch reaktive Sulfate alkylierter PAK in der Niere wurde in dieser Arbeit am Beispiel des 1-HMP und 1-HM-8-MP untersucht und wird in Abschnitt 5.2.4 diskutiert. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass in den Nieren aufgrund des ca. fünffach geringeren Gesamtgewichtes eine Aufkonzentrierung der importierten reaktiven Sulfate relativ zur Leber stattfinden könnte.

Im Fall des 6-SMBP waren die hohen Adduktniveaus in der Lunge auffällig (siehe Abb. 4.7). Die Lunge ist das Organ, das nach Resorption der Sulfate und Passage von Leber und Herz über den Blutkreislauf als nächstes erreicht wird. Die hohe Reaktivität des 6-SMBP könnte bedingen, dass die entfernter liegenden Organe nicht erreicht wurden und daher insbesondere die nach Applikation zuerst passierten Organe DNA-Addukte aufzeigten. Darüber hinaus besteht beim 6-SMBP die Möglichkeit, dass aufgrund der Existenz eines terminalen Benzoringes ein alternativer Bioaktivierungsweg ausgehend von dem über Hydrolyse gebildeten benzyllischen Alkohol 6-HMBP besprochen wurde. Dieser Bioaktivierungsweg könnte in der CYP-vermittelten Bildung von Dihydrodiolepidoxiden bestehen. CYP werden in der Ratte sowohl in der Leber als auch in weiteren Organen wie der Lunge exprimiert (Voigt *et al.* 1990). Bayless *et al.* (1986) konnten *in vitro* zeigen, dass 6-MBP und 6-HMBP über CYP weiter oxidativ verstoffwechselt werden und im Ames-Test unter Verwendung eines NADPH-angereicherten metabolisierenden Systems ein mutagenes Potenzial besitzen. Weiterführende Untersuchungen zur Mutagenität und DNA-Adduktbildung des 6-HMBP in gentechnisch veränderten Zelllinien, die CYP oder SULT oder simultan Formen beider Enzymfamilien exprimieren, könnten Aufschluss über den relativen

Beitrag beider Metabolismuswege zur Bioaktivierung des 6-HMBP geben. Ein Vergleich der DNA-Adduktmuster könnte aufzeigen, ob die *in vivo* beobachteten Addukte auch von Dihydrodiolepidoxiden des 6-HMBP verursacht worden sein könnten.

Nach Verabreichung der benzyliischen Alkohole 1-HMP, 1- $\alpha$ -HEP und 2- $\alpha$ -HEP wurden DNA-Addukte in allen untersuchten Organen gefunden. Dies zeigt, dass die Alkohole wie erwartet *in vivo* durch SULT der männlichen Ratte zu den entsprechenden reaktiven benzyliischen Schwefelsäureestern umgesetzt wurden. Ebenso zeigten auch Glatt *et al.* (1994b), dass 1-HMP, 1- $\alpha$ -HEP und 2- $\alpha$ -HEP durch PAPS-angereichertes hepatisches Zytosol weiblicher und männlicher Ratten zu mutagenen Sulfaten aktiviert werden. Da im Gegensatz zum Menschen die SULT-Expression in der Ratte auf die Leber fokussiert ist (Dunn & Klaassen 1998), muss ein Großteil des Umsatzes zu genotoxischen Sulfaten in der Leber stattgefunden haben, was die hohen DNA-Adduktniveaus in diesem Organ in den mit 1-HMP und 1- $\alpha$ -HEP behandelten Tieren erklärt. Hohe Adduktniveaus wurden jedoch auch in Niere und Lunge gefunden, was auf einen hepatischen Export der gebildeten reaktiven Sulfate und ihren Transport über den Blutkreislauf zu extrahepatischen Geweben hinweist. Zwar wurde eine Expression der SULT-Formen 1A1, 1B1 und 1C1 in der männlichen Ratte auch in Niere und/oder Lunge auf RNA-Ebene nachgewiesen (Dunn & Klaassen 1998), die Kapazität entsprechender Gewebszytosome zur Aktivierung von 1-HMP zu einem Mutagen betrug jedoch nur einen Bruchteil der Kapazität von Leberzytosol (0,5% bzw. 0,03%) (Glatt *et al.* 2003). Nach Applikation von 2- $\alpha$ -HEP konnten DNA-Addukte in Leber, Niere und Lunge nachgewiesen werden. Die Adduktniveaus waren jedoch im Vergleich zum 1-HMP bzw. 1- $\alpha$ -HEP sehr gering, was zum einen durch einen schlechteren Umsatz dieses benzyliischen Alkohols durch SULT der männlichen Ratte (Glatt *et al.* 1994b) und zum anderen durch die geringere Reaktivität des gebildeten Sulfates 2- $\alpha$ -SEP (siehe Abbildung 4.4) bedingt sein kann. Nach Applikation von 4- $\alpha$ -HEP konnten keine DNA-Addukte nachgewiesen werden. Da der entsprechende Schwefelsäureester 4- $\alpha$ -SEP *in vivo* DNA-Addukte bildete (siehe Abbildung 4.8), wobei die Adduktniveaus höher lagen als die des 2- $\alpha$ -SEP, ist die wahrscheinlichste Ursache für die Nicht-Nachweisbarkeit von Addukten der schlechte bzw. fehlende Umsatz von 4- $\alpha$ -HEP durch SULT der männlichen Ratte.

### **5.2.2 Gewebeverteilung und Ausmaß der DNA-Adduktbildung durch den benzyliischen Alkohol 1-HM-8-MP im Vergleich zum 1-HMP**

Die Untersuchungen zur Optimierung von Dosis und Zeitregime für die nachfolgenden Inhibitionsstudien offenbarten toxikodynamische Unterschiede zwischen 1-HMP und 1-HM-8-MP trotz großer struktureller Ähnlichkeit. So zeigte 1-HM-8-MP höhere hepatische Adduktniveaus als 1-HMP, wohingegen die Adduktniveaus in anderen Organen insbesondere der Niere deutlich niedriger lagen. Die höheren Adduktniveaus in der Leber

können mit der höheren Reaktivität des in der Rattenleber aus 1-HM-8-MP gebildeten reaktiven Sulfates erklärt werden, die sich *in vitro* durch höhere Adduktniveaus im zell- und enzymfreien System (siehe Abbildung 4.4) und in einer etwas kürzeren Halbwertszeit (Batke 2008) zeigte. Die hohe Reaktivität des aus 1-HM-8-MP gebildeten Sulfates könnte auch die Ursache für die niedrigeren extrahepatischen DNA-Adduktniveaus sein. Des Weiteren ist denkbar, dass auch die durch Albuminbindung bewirkte Stabilisierung im Blut sowie die für den Export aus der Leber sowie für den Import in extrahepatische Organe notwendige Interaktion mit Membrantransportern berücksichtigt werden muss. Beide Prozesse könnten im Fall des aus 1-HM-8-MP gebildeten Sulfates weniger effizient erfolgen als im Fall des 1-SMP.

Für die authentischen Mercaptursäuren der alkylierten PAK 1-Methylpyren (1-MP) und 1,8-Dimethylpyren (1,8-DMP) wurde *in vitro* gezeigt, dass die Mercaptursäure des 1-MP im Gegensatz zu der des 1,8-DMP ein gutes Substrat für die basolateral in den Nierentubuli lokalisierten humanen Anionentransporter OAT1 und 3 darstellt (Bakhiya *et al.* 2007). Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Mercaptursäure des 1-MP vorwiegend renal und die des 1,8-DMP vorwiegend über die Fäzes ausgeschieden wurde. Derartige Unterschiede der Interaktion mit Transmembrantransportern könnten auch für 1-HMP und 1-HM-8-MP sowie deren reaktive Sulfate zutreffen und zu den beobachteten Unterschieden in der Gewebeverteilung der DNA-Adduktbildung beitragen.

An dieser Stelle soll auch darauf verwiesen werden, dass sich im Gegensatz zu allen anderen an Versuchstiere verabreichten benzyllischen Metaboliten alkylierter PAK das *in vivo*-DNA-Adduktmuster des 1-HM-8-MP deutlich von dem *in vitro* durch 1-SM-8-MP erzeugten unterschied (siehe Abbildung 4.13). Über Ko-Chromatographie-Experimente konnten nur zwei der Adduktflecken dem *in vitro*-Adduktmuster zugeordnet werden, die übrigen vier Adduktflecken tauchten *in vitro* nicht auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass verabreichtes 1-HM-8-MP vor der SULT-Umsetzung oder durch SULT gebildetes 1-SM-8-MP weiteren metabolischen Modifikationen unterlag, die in der Bildung eines modifizierten reaktiven Sulfates resultierten, das die dem *in vitro*-Adduktmuster nicht zuordenbaren Adduktflecken hervorrief. Da der einzige Strukturunterschied zwischen 1-HMP und 1-HM-8-MP in der zusätzlichen Methylgruppe im 1-HM-8-MP besteht, ist es denkbar, dass beispielsweise eine Oxidation der Methylgruppe stattfand. Diese Modifikation könnte eine veränderte Nukleotidspezifität des resultierenden Sulfates oder ein verändertes Laufverhalten der gebildeten DNA-Addukte hervorrufen, was in einem veränderten DNA-Adduktmuster resultieren könnte.

Da für oxidative Modifikationen vor allem Cytochrome P450 (CYP) in Frage kommen, wurde der Einfluss von simultaner CYP- und SULT-Aktivität auf das DNA-Adduktmuster von 1-HM-8-MP *in vitro* untersucht (siehe Anhang Abb. 8.2). Mit NADPH und PAPS

angereichertes S9-Homogenat männlicher Ratten wurde mit Heringsperma-DNA und 1-HM-8-MP inkubiert, die DNA isoliert und das Adduktmuster mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling qualitativ und quantitativ untersucht. Die DNA aus dem Inkubationsansatz, dem nur PAPS aber kein NADPH zugesetzt worden war (nur SULT-Aktivität), zeigte das typische *in vitro*-DNA-Adduktmuster des authentischen Sulfates 1-SM-8-MP. Im Vergleich hierzu war im DNA-Adduktmuster des Inkubationsansatzes, der mit NADPH und PAPS angereichert worden war (CYP- und SULT-Aktivität), die Intensität typischer *in vitro*-Adduktflecken vermindert und gleichzeitig tauchten typische Adduktflecken des *in vivo*-Adduktmarkers auf. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass durch CYP bewirkte oxidative Modifikationen des 1-HM-8-MP (oder 1-SM-8-MP) das veränderte *in vivo*-Adduktmarker hervorriefen. Über parallel durchgeführte Metabolitenanalytik im Rahmen einer anderen Dissertationsschrift konnte der urinaire Hauptmetabolit nach Verabreichung von 1-HM-8-MP an Ratten als hydroxylierte Carbonsäure des 1,8-DMP identifiziert werden, wobei die Position der Hydroxylgruppe (phenolisch oder benzylich) nicht bestimmt werden konnte (Batke 2008). Im Fall des 1-HMP wurden im Urin zwei Hauptmetabolite gefunden, die als 1-Pyrenylcarbonsäure und als Sulfat einer ringhydroxylierten 1-Pyrenylcarbonsäure identifiziert wurden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass 1-HM-8-MP *in vivo* in stärkerem Maße oxidativen Modifikationen unterliegt als 1-HMP.

### 5.2.3 Modulation der DNA-Adduktbildung durch Enzyminhibitoren

Zum Nachweis der Beteiligung eines Enzyms am Metabolismus bzw. der Bioaktivierung eines Fremdstoffes eignet sich die Anwendung spezifischer Enzyminhibitoren. Zur Untersuchung der Bedeutung oxidativer Stoffwechselprozesse für die Detoxifizierung benzylicher Metabolite alkylierter PAK wurden analog zu früheren Untersuchungen zum 1-HMP Inhibitionsstudien auch mit dem benzylichen Alkohol 1-HM-8-MP durchgeführt. Parallel wurde die Bedeutung und Beeinflussbarkeit des SULT-abhängigen Toxifizierungsweges für die benzylichen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP über Verabreichung von SULT-Inhibitoren untersucht.

#### 5.2.3.1 Modulation der DNA-Adduktbildung durch SULT-Inhibitoren

Pentachlorphenol (PCP) ist ein potenter kompetitiver Inhibitor von SULT *in vitro* und *in vivo* (Mulder & Scholtens 1977; Meerman *et al.* 1983), wobei in der Ratte selektiv Sulfotransferasen der Familie SULT1 (insbesondere 1A1 und 1C1) gehemmt werden (Duffel & Jakoby 1981; Nagata *et al.* 1993). Die Vorbehandlung mit PCP vor Verabreichung von 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP führte zu einer Reduktion der DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere männlicher Ratten, wobei der Maximaleffekt in einer Reduktion des Adduktniveaus auf 20% relativ zu Kontrolltieren in der Leber 1-HMP-behandelter Tiere bestand.

Meerman *et al.* (1983) konnten über die Gabe einer einzelnen entsprechenden Dosis von PCP (40 µmol/kg KM) an Wistar-Ratten eine maximale Inhibierung der Sulfatierung von Harmol von 71% erreichen. Die Autoren berechneten anhand pharmakokinetischer Daten, dass eine komplette Inhibierung der Sulfatierung von Harmol (und anderer phenolischer Verbindungen) nur durch eine für die Tiere letale Plasmakonzentration von PCP hätte erreicht werden können. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es plausibel, dass trotz Verabreichung von PCP noch DNA-Addukte detektiert wurden und keine komplette Inhibierung der Sulfatierung beobachtet wurde.

Im Fall des 1-HM-8-MP war die durch PCP bedingte Reduktion des DNA-Adduktniveaus geringer ausgeprägt als beim 1-HMP. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer anderen Arbeit (Batke 2008), in der eine Abnahme der renalen Exkretion der Mercaptursäure des 1-HMP um 80% relativ zum Kontrollwert im Vergleich zu einer Abnahme der renalen Exkretion der Mercaptursäure des 1-HM-8-MP um lediglich 20% beobachtet wurde. Mercaptursäuren werden aus Glutathion-Konjugaten gebildet, die durch Reaktion elektrophiler Verbindungen wie reaktiver benzyllischer Schwefelsäureester mit Glutathion entstehen (Seutter-Berlage *et al.* 1981; Watabe *et al.* 1982). Das Ausmaß der detoxifizierenden Reaktion benzyllischer Sulfate mit Glutathion ist nicht bekannt und vermutlich im Fall des 1-SMP gering, da die entsprechende Mercaptursäure auch nach Verabreichung von 1-SMP an Ratten nur in geringen Konzentrationen ausgeschieden wurde (Ma *et al.* 2000). Dennoch stellen Mercaptursäuren mögliche Biomarker für die Bildung reaktiver Schwefelsäureester dar. Die durch PCP bedingte Abnahme der DNA-Adduktniveaus als auch die Abnahme der renalen Mercaptursäureauscheidung zeigen eine Inhibierung der SULT-vermittelten Umsetzung von 1-HMP und 1-HM-8-MP zu DNA-reaktiven Sulfaten.

Wodurch könnte die geringere Wirksamkeit des PCP im Fall des 1-HM-8-MP bedingt sein? Die Untersuchungen zur Mutagenität benzyllischer Alkohole in SULT-profizienten *S. typhimurium* zeigten, dass 1-HM-8-MP durch die humane SULT1E1 stärker aktiviert wird als durch die humane SULT1A1 (2,5fach höhere spezifische Mutagenität). Im Gegensatz hierzu unterlag 1-HMP einer stärkeren Aktivierung durch die SULT1A1 (siehe Tabelle 4.2). PCP ist jedoch ein stärkerer Inhibitor der SULT1A1-Form (H.R. Glatt, DfE; unveröffentlichte Daten). In Bezug auf die Situation in der Ratte wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass 1-HMP und 1-HM-8-MP gleichermaßen durch die Ratten-SULT1A1 aktiviert werden. Die Aktivierung durch die SULT1E1-Form der Ratte konnte aufgrund der Inaktivität des Enzyms in *S. typhimurium* nicht untersucht werden. Falls jedoch die mit humanen Enzymen beobachteten Bedingungen hinsichtlich Aktivierung benzyllischer Alkohole und Hemmbarkeit durch PCP auch auf die Ratte zutreffen, könnte dies die geringere Wirksamkeit des PCP im Fall von 1-HM-8-MP erklären.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass PCP auch Effekte auf weitere Enzyme neben SULT gehabt haben könnte. So wurde während der parallel durchgeführten Metabolitenuntersuchungen festgestellt, dass PCP bei Verabreichung von 1-HMP eine verringerte Ausscheidung der 1-Pyrenylcarbonsäure bewirkte, was auf eine Hemmung von Alkoholdehydrogenasen (ADH) hindeutete (Batke 2008). Eine derartige Hemmung von ADH durch PCP konnte *in vitro* an cDNA-exprimierten Enzymen bestätigt werden (Kollock 2007). Ebenso wurde gezeigt, dass PCP *in vitro* GST-Aktivitäten hemmt (Moorthy & Randerath 1996). Somit könnte PCP gleichzeitig die Bioaktivierung und Detoxifizierung benzyliischer Alkohole beeinflusst haben und das beobachtete DNA-Adduktniveau stellte den Nettoeffekt dieses Einflusses auf Toxifizierungs- und Detoxifizierungsreaktionen dar. Im Fall des 1-HMP und in geringerem Ausmaß auch im Fall des 1-HM-8-MP bewirkte PCP eine protektive Verschiebung hin zu einer stärkeren Detoxifizierung und damit einer Abnahme der Adduktniveaus.

Als weiterer SULT-Inhibitor wurde das Flavonoid Quercetin verwendet. Es ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet (hohe Gehalte z.B. in Äpfeln, Zwiebeln, Rotwein) und wird vom Menschen täglich im zweistelligen Milligramm-Bereich aufgenommen (Scalbert & Williamson 2000). Quercetin wurde daher als nahrungsrelevanter SULT-Inhibitor eingesetzt und in einer zum PCP äquimolaren Menge von 40  $\mu\text{mol/kg}$  KM an die Tiere verabreicht.

Die Vorbehandlung mit Quercetin vor Applikation von 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP führte zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der Adduktniveaus in Leber und Niere. Eine Hemmung verschiedener humaner SULT-Formen wie der SULT1A1, 1A3 und 1E1 durch Quercetin *in vitro* wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Eaton *et al.* 1996; Ghazali & Waring 1999; Marchetti *et al.* 2001; De Santi *et al.* 2002). Auch eine Inhibierung der männlich-dominanten Ratten-SULT-Form 1A1 sowie der weiblich-dominanten SULT2A1 wurde *in vitro* nachgewiesen (Mesia-Vela & Kauffman 2003).

*In vivo* wird oral verabreichtes Quercetin jedoch bereits im Gastrointestinaltrakt massiv metabolisiert. Graf *et al.* (2006) konnten nach chronischer Verabreichung von Quercetin an Ratten zeigen, dass in Magen-, Caecum- und Colongewebe etwa ein Drittel und im Dünndarmgewebe 88% des Quercetins in Form von Metaboliten vorlagen. Im Blutplasma der Ratten wurden nur Quercetinmetabolite gefunden. Auch Chen *et al.* (2005) stellten fest, dass nach einmaliger oraler Applikation von Quercetin nur 5,3% in unveränderter Form bioverfügbar waren, wohingegen etwa 93,3% im Darm metabolisiert wurden. Die Quercetinmetabolite könnten eine geringere Fähigkeit zur SULT-Hemmung aufweisen als unverändertes Quercetin. So zeigten Eaton *et al.* (1996), dass verschiedene mögliche humane Quercetinmetaboliten schwächere Inhibitoren der humanen P-PST (SULT1A1) sind als Quercetin selbst.

Des Weiteren könnten Quercetin und dessen Metabolite auch Effekte auf andere Enzyme gehabt haben. So wurde eine Hemmung der humanen GSTP1-1 und von Rattenleber-GST-Formen durch Quercetin *in vitro* gezeigt (van Zanden *et al.* 2003; Zhang & Das 1994). Da reaktive Sulfate alkylierter PAK wie 1-SMP über GST-katalysierte Glutathion-Konjugation abgefangen werden können (Ma *et al.* 2000), würde eine Inhibierung dieses Detoxifizierungsweges zu erhöhten Sulfatkonzentrationen und damit auch DNA-Adduktniveaus führen. Des Weiteren wurden auch inhibitorische Effekte sowohl des Quercetins als auch von Quercetinmetaboliten auf den organischen Anionentransporter MRP1 und in geringerem Ausmaß auch auf den Transporter MRP2 beobachtet (van Zanden *et al.* 2004; van Zanden *et al.* 2007). Diese werden in der sinusoidalen bzw. der biliären Hepatozytenmembran exprimiert (van Montfoort *et al.* 2003) und könnten Bedeutung für den Export reaktiver Sulfate aus der Leber haben. Über parallel durchgeführte Metabolitenanalytik konnte beim 1-HMP, jedoch nicht beim 1-HM-8-MP, eine Abnahme der Ausscheidung der entsprechenden Mercapursäure über den Urin beobachtet werden (Batke 2008), was auf eine durch Quercetin und/oder Metabolite bedingte Hemmung der Glutathion-Konjugation oder von Transmembrantransportern hindeuten könnte. Eine über Quercetin bzw. Quercetinmetabolite bedingte Hemmung der Prozesse, die zu einer Abnahme der Konzentration reaktiver Sulfate führen (Glutathion-Konjugation, Export), hätte eine eventuell erfolgte Hemmung der toxisierenden Sulfokonjugation maskieren können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der in dieser Arbeit eingesetzten Dosierung von 40  $\mu\text{mol/kg}$  KM, bei der PCP eine SULT-Hemmung zeigte, eine protektive Wirkung des Quercetins gegenüber der genotoxischen Wirkung benzyllischer Alkohole nicht aufgezeigt werden konnte. Die Hemmung der DNA-Adduktbildung bei Verabreichung des SULT-Inhibitors PCP verdeutlicht, dass benzyllische Alkohole alkylierter PAK *in vivo* über Sulfonierung bioaktiviert werden.

### 5.2.3.2 Modulation der DNA-Adduktbildung durch ADH/ALDH-Inhibitoren

Zur ADH-Inhibition wurden in dieser Arbeit der kompetitive ADH-Inhibitor 4-Methylpyrazol (Blomstrand *et al.* 1979; Cornell *et al.* 1983; Plapp *et al.* 1984), der klinisch bei Vergiftungen mit Methanol und Ethylenglykol eingesetzt wird (Megarbane *et al.* 2005), und das kompetitive ADH-Substrat Ethanol verwendet, wobei sich das Behandlungsregime an früheren Studien orientierte (Ma 2001; Ma *et al.* 2002). Sowohl die Verabreichung von 4-Methylpyrazol als auch Ethanol führte zu einer Erhöhung der DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere 1-HM-8-MP-behandelter Tiere. Maximale Effekte wurden in der Leber mit einem Anstieg des Adduktniveaus um den Faktor drei sowohl mit 4-Methylpyrazol als auch mit Ethanol beobachtet. Diese Effekte können dadurch erklärt werden, dass durch 4-Methylpyrazol und Ethanol eine kompetitive Inhibierung von ADH und im Fall des Ethanols im späteren Verlauf auch von ALDH über gebildeten Acetaldehyd erfolgte. Die damit

verbundene Hemmung der über diese Enzyme katalysierten entgiftenden Oxidation der benzyllischen Hydroxylgruppe des 1-HM-8-MP resultierte in einer verstärkten SULT-vermittelten Bildung reaktiver Sulfate. Ein Umsatz von 1-HMP und 1-HM-8-MP durch ADH als auch eine entsprechende Inhibierung der ADH-katalysierten Oxidation von 1-HMP und 1-HM-8-MP durch 4-Methylpyrazol und Ethanol ist an cDNA-exprimierten humanen ADH-Formen gezeigt worden (Kollock 2007; Kollock *et al.* 2008a; Kollock *et al.* 2008b). Die Bedeutung oxidativer Modifikationen der Seitenkette für den Metabolismus des 1-HM-8-MP *in vivo* wurde auch im Rahmen einer anderen Arbeit gezeigt, in welcher der Hauptmetabolit des 1-HM-8-MP im Urin behandelter Ratten als hydroxylierte Carbonsäure des 1,8-DMP identifiziert wurde (Batke 2008). Bei Vorbehandlung von Ratten mit 4-Methylpyrazol bzw. Ethanol vor Gabe von 1-HM-8-MP wurde eine Abnahme der renalen Exkretion der Carbonsäure des 1,8-DMP auf 38% bzw. 44% des Kontrollwertes und gleichzeitig eine deutlich erhöhte Ausscheidung der entsprechenden Mercaptursäure im Fäzes um den Faktor 3 bzw. 9 festgestellt (Batke 2008). Dies deutet in Übereinstimmung mit den beobachteten erhöhten DNA-Addukt-niveaus auf eine verstärkte Bildung reaktiver Sulfate hin.

Das Ausmaß der Verschiebung des Metabolismus des 1-HM-8-MP hin zur Bildung reaktiver Sulfate bei simultaner Hemmung von ADH war jedoch viel schwächer ausgeprägt als im Fall des 1-HMP. Bei Verabreichung von 1-HMP führte eine Vorbehandlung weiblicher Ratten mit der gleichen Dosis von 4-Methylpyrazol zu einem Anstieg der hepatischen Addukt-niveaus um den Faktor 28 und die Verabreichung von Ethanol in einer nur halb so hohen Dosierung (0,8 g/kg KM) zu einem Anstieg um den Faktor 15 (Ma *et al.* 2002). Eine mögliche Erklärung hierfür liefern *in vitro*-Untersuchungen zum Umsatz des 1-HM-8-MP durch verschiedene cDNA-exprimierte humane ADH-Formen (Kollock *et al.* 2008a). Hierbei zeigte sich, dass die Affinität des 1-HM-8-MP für die ADH2, die die Hauptform für den Umsatz benzyllischer Alkohole alkylierter PAK in der humanen Leber darstellen könnte, deutlich höher war als die des 1-HMP ( $K_m$  1-HMP: 76  $\mu$ M,  $K_m$  1-HM-8-MP: 6,4  $\mu$ M). Des Weiteren könnte 1-HM-8-MP, wie unter Punkt 5.2.2 erläutert, initial in stärkerem Maß als 1-HMP CYP-katalysierten oxidativen Modifikationen unterliegen. Neben Unterschieden in der Enzymaffinität könnte dies dazu beitragen, dass eine Hemmung von ADH geringere Auswirkung auf die SULT-vermittelte Toxifizierung von 1-HM-8-MP hatte als im Fall des 1-HMP.

Der ALDH-Inhibitor Disulfiram wurde viele Jahre klinisch gegen Alkoholabusus eingesetzt, da aus der irreversiblen Hemmung von ALDH eine langanhaltende Alkoholunverträglichkeit resultiert (Hald & Jacobsen 1948; Johansson 1992; Petersen 1992). Eine Vorbehandlung mit Disulfiram führte zu leicht erhöhten DNA-Addukt-niveaus in Leber (Faktor 1,5) und Niere (Faktor 1,3) der mit 1-HM-8-MP behandelten Tiere. In



Übereinstimmung hierzu steht eine leichte, nicht statistisch signifikante Reduktion der Ausscheidung der entsprechenden Carbonsäure über parallel durchgeführte Metabolitenanalytik (Batke 2008). Ein schwächer ausgeprägter Effekt des ALDH-Inhibitors Disulfiram im Vergleich zu den ADH-Inhibitoren Ethanol und 4-Methylpyrazol wurde auch beim 1-HMP beobachtet. Bei diesem Alkohol führte die Verabreichung von Disulfiram lediglich zu einer Erhöhung hepatischer Addukt-niveaus um den Faktor 3,8 im Vergleich zu einer Erhöhung um den Faktor 28 bzw. 15 mit 4-Methylpyrazol bzw. Ethanol (Ma *et al.* 2002). Die Inhibition von ALDH durch Disulfiram beinhaltet die kovalente Modifikation des aktiven Zentrums des Enzyms und wird durch Metabolite des Disulfirams hervorgerufen (Lipsky *et al.* 2001a,b). Das in dieser Arbeit angewandte Behandlungsregime orientierte sich an einer Studie von Yourick & Faiman (1989), in der über Verabreichung von Disulfiram (0,25 mmol/kg KM) eine Reduktion der hepatischen ALDH-Aktivität um ca. 50% beobachtet wurde. Eventuell ist eine derartige Reduktion nicht ausreichend, um die Oxidation der ausgehend von 1-HMP und 1-HM-8-MP gebildeten Aldehyde in stärkerem Maße zu beeinträchtigen. Eine weitere Erklärung für den schwach ausgeprägten Effekt einer Vorbehandlung mit Disulfiram auf die 1-HM-8-MP-Toxifizierung könnte die Beteiligung weiterer Enzyme neben ALDH an der Oxidation des gebildeten Aldehyds sein. Als möglicher Kandidat wurden im Rahmen einer früheren Arbeit die Aldehyd-Oxidase diskutiert (Ma 2001).

Die Vorbehandlung mit Disulfiram hatte bei 1-HM-8-MP-behandelten Ratten einen geringeren Effekt im Vergleich zum 1-HMP, analog zur Situation bei Vorbehandlung mit ADH-Inhibitoren. Ursache hierfür könnten Unterschiede in der Enzymaffinität der ausgehend von beiden benzyllischen Alkoholen gebildeten Aldehyde für ALDH der Ratte sein. So zeigten Untersuchungen mit cDNA-exprimierter humaner ALDH2, dass die Affinität des ausgehend von 1-HM-8-MP gebildeten Aldehyds 1-Formyl-8-methylpyren für dieses Enzym viel höher ist als die des ausgehend von 1-HMP gebildeten Aldehyds 1-Formylpyren (Glatt *et al.* 2008).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Hemmung von ADH und ALDH in einer Steigerung der DNA-Adduktbildung und damit der Toxifizierung des benzyllischen Alkohols 1-HM-8-MP resultierte, was darauf hindeutet, dass die Oxidation der benzyllischen Hydroxylgruppe des 1-HM-8-MP durch ADH/ALDH einen Detoxifizierungsmechanismus darstellt.

#### **5.2.4 Modulation der DNA-Adduktbildung durch Hemmung der renalen Sekretion**

Metabolite von Fremdstoffen werden renal oder biliär ausgeschieden. Welche dieser Ausscheidungsrouten beschränkt wird, hängt vom Molekulargewicht und bestimmter struktureller Eigenschaften des entsprechenden Metaboliten ab. Sulfokonjugate von Fremdstoffen werden aufgrund des geringeren Molekulargewichtes häufig zu einem größeren Prozentsatz als die entsprechenden Glucuronide renal ausgeschieden. Da Sulfate

unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind, was deren passive Membranpenetration verhindert, ist ein Transmembrantransport von Sulfaten von Transportproteinen abhängig. In Hepatozyten erfolgt die Exkretion von organischen Anionen an der biliären als auch der sinusoidalen Membran vor allem über ATP-abhängige Transportproteine wie MDR (multidrug resistance proteins) und MRP (multidrug resistance-associated proteins) (van Montfoort *et al.* 2003). Anionische Fremdstoffe bzw. Fremdstoffmetabolite wie Sulfokonjugate werden im Blut in Form einer reversiblen Bindung an Albumin transportiert und vor allem über renale Sekretion über proximale Nierentubulizellen ausgeschieden. Die Aufnahme organischer Anionen in die Niere erfolgt an der basolateralen Membran proximaler Nierentubulizellen über eine Subgruppe polyspezifischer Transporter der SLC22A-Familie, die als OAT (organic anion transporter) bezeichnet werden (van Montfoort *et al.* 2003; Burckhardt & Burckhardt 2003).

Die nach Verabreichung von 1-HMP an Ratten gefundenen hohen DNA-Adduktniveaus in der Niere (Kuhlow 2001; diese Arbeit: Abbildung 4.7, 4.8, 4.9, 4.12) könnten darauf zurückzuführen sein, dass in der Leber gebildetes 1-SMP in Form einer stabilisierenden reversiblen Albumin-Bindung zur Niere transportiert wird und dort über eine Interaktion mit Transportproteinen in die Zellen aufgenommen wird. Für die stabilen isomeren Sulfate 2- und 4-SMP konnte *in vitro* in OAT-exprimierenden Zelllinien gezeigt werden, dass diese Substrate der humanen OAT-Formen 1 und 3 darstellen (Bakhiya *et al.* 2006).

Zur Überprüfung der Bedeutung renaler Sekretionsprozesse für das Ausmaß und die Gewebeverteilung durch benzyllische Metaboliten alkylierter PAK hervorgerufene DNA-Schäden wurden Ratten vor Verabreichung der benzyllischen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP mit Probenecid vorbehandelt. Probenecid ist ein Inhibitor organischer Anionentransporter (Takeda *et al.* 2001; Burckhardt & Burckhardt 2003) und wird klinisch zur Behandlung der Hyperurikämie eingesetzt (Bardin 2004; Pea 2005). Das Behandlungsregime orientierte sich an Literaturdaten (Trumper *et al.* 1998).

Überraschenderweise hatte Probenecid nur einen geringen Effekt auf die DNA-Adduktniveaus der Niere, die im Fall des 1-HMP um den Faktor zwei erniedrigt und im Fall des 1-HM-8-MP unverändert waren. Die Adduktniveaus der Leber waren jedoch deutlich um den Faktor 7 bzw. 5 bei 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP gegenüber den Kontrolltieren erhöht (Abbildung 4.12). Dies deutete darauf hin, dass Probenecid vor allem den Export reaktiver Sulfate aus der Leber hemmte. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass Probenecid kein spezifischer Inhibitor von OAT ist, die hauptsächlich in der Niere exprimiert werden (Burckhardt & Burckhardt 2003). Horikawa *et al.* (2002) zeigten, dass Probenecid den multispezifischen organischen Anionentransporter MRP2 (ABCC2) *in vitro* und *in vivo* inhibiert, der in der biliären Membran von Hepatozyten des Menschen und der Ratte exprimiert wird (van Montfoort *et al.* 2003). Ebenso wurde auch eine Hemmung des in der

basolateralen Hepatozytenmembran exprimierten Transporters MRP1 (ABCC1) durch Probenecid in verschiedenen *in vitro*-Studien gezeigt (Gollapudi *et al.* 1997; Leite *et al.* 2007). Daher könnten die erhöhten Adduktniveaus in der Leber aus der Hemmung des biliären als auch des sinusoidalen Exportes der gebildeten reaktiven Sulfate resultieren. Dennoch konnten bei beiden Alkoholen nach Verabreichung von Probenecid um den Faktor zwei erhöhte Adduktniveaus in der Lunge und im Fall des 1-HMP ein um den Faktor zwei verringertes Adduktniveau in der Niere gemessen werden, was auf eine simultan stattgefundene Hemmung der renalen Sekretion und eine daraus resultierende erhöhte Blutkonzentration hindeutet. Über parallel durchgeführte Messungen der Exkretion der ausgehend vom 1-HMP gebildeten Mercaptursäure wurde nach Verabreichung von Probenecid eine Abnahme der Exkretion im Urin auf 50% und der Exkretion im Fäzes auf 18% des Kontrollwertes beobachtet (Batke 2008), was ebenso auf eine Hemmung sowohl der renalen als auch der biliären Sekretion hindeutet.

Wie unter Punkt 5.2.2 erläutert, wurde nach Verabreichung von 1-HM-8-MP an Ratten in deren Geweben nicht das typische *in vitro*-DNA-Adduktmuster des authentischen 1-SM-8-MP gefunden. Überraschenderweise zeigte das DNA-Adduktmuster Probenecid-behandelter Ratten wieder typische Adduktstellen des *in vitro*-Musters als auch *in vivo*-typische Adduktstellen und erschien so als Überlagerung des *in vitro*- und des *in vivo*-Adduktmusters (siehe Abb. 4.13). Die Ursache für das veränderte Adduktmuster *in vivo* könnte wie erläutert in oxidativen Modifikationen des 1-HM-8-MP bzw. des 1-SM-8-MP beispielsweise über CYP-Aktivität begründet liegen, die in der Bildung eines modifizierten Sulfates resultierten. Da im *in vivo*-Adduktmuster sowohl Adduktstellen auftauchten, die für das authentische 1-SM-8-MP typisch sind, aber auch Adduktstellen sichtbar waren, die man diesem nicht zuordnen konnte, legt dies nahe, dass sowohl authentisches 1-SM-8-MP als auch das modifizierte Sulfat in der Leber gebildet wurden. Der Anteil 1-SM-8-MP-typischer Adduktstellen am Gesamtadduktniveau in der Leber lag jedoch nur bei ca. 10%, was zeigt, dass hauptsächlich das modifizierte Sulfat für die DNA-Adduktbildung verantwortlich war. Gleiches gilt auch für die extrahepatischen Gewebe, die dasselbe DNA-Adduktmuster und einen ähnlichen Anteil 1-SM-8-MP-typischer Adduktstellen am Gesamtadduktniveau zeigten (siehe Anhang Tabelle 8.9). Eine Vorbehandlung mit Probenecid bewirkte einerseits erhöhte Adduktniveaus in der Leber und andererseits eine qualitative Veränderung im DNA-Adduktmuster, die vor allem eine starke Aktivitäts- und Adduktniveaunahme des 1-SM-8-MP-typischen Hauptadduktstellen (Fleck 1) beinhaltete (siehe Anhang Tabelle 8.9). Das Adduktniveau des Hauptadduktstellen des typischen *in vivo*-Adduktmusters (Fleck I), der vermutlich dem modifizierten Sulfat zuzuordnen ist, war im Gegensatz dazu nach Vorbehandlung mit Probenecid unverändert, was zeigt, dass das erhöhte Adduktniveau in der Leber auf eine erhöhte Adduktbildung durch authentisches 1-SM-8-MP zurückzuführen ist. Eine mögliche

Erklärung hierfür ist, dass authentisches 1-SM-8-MP *in vivo* in stärkerem Maße als das modifizierte Sulfat aus der Leber exportiert wurde, wobei vermutlich wie auch im Fall der entsprechenden Mercaptursäure vor allem die biliäre Route beschränkt wurde (Bakhiya *et al.* 2007). Über Probenecid könnte über eine Hemmung biliärer Transporter wie des MRP2 der Export des authentischen 1-SM-8-MP verhindert worden sein, was in einer verstärkten DNA-Adduktbildung resultierte. Über parallel erfolgte Metabolitenanalytik konnte exemplarisch für ein Tier gezeigt werden, dass nach Vorbehandlung mit Probenecid eine stark erhöhte Ausscheidung der ausgehend vom 1-HM-8-MP gebildeten Mercaptursäure über den Urin und damit eine Redirektion der Exkretion von der biliären hin zur renalen Route stattfand (Batke 2008). Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass über Probenecid vor allem eine Hemmung biliärer Transporter in der Leber erfolgte. Das Adduktmuster der Niere zeigte nach Vorbehandlung mit Probenecid die gleichen qualitativen Veränderungen wie das der Leber (siehe Abb. 4.13), wobei das Adduktniveau jedoch unverändert war. Das Adduktniveau des *in vivo*-typischen Hauptadduktflöcken (Fleck I) war nach Vorbehandlung mit Probenecid deutlich vermindert, während das Adduktniveau des 1-SM-8-MP-typischen Hauptadduktflöcken (Fleck 1) in gleichem Maße zunahm (siehe Anhang Tabelle 8.9). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der Leber das in stark erhöhter Konzentration vorliegende 1-SM-8-MP mit dem modifizierten Sulfat um die sinusoidalen Transporter konkurrierte und zu einem höheren Anteil aus der Leber in den systemischen Kreislauf exportiert wurde und extrahepatische Gewebe erreichte.

Neben dem Effekt der Transporthemmung ist auch ein direkter Einfluss des Probenecid auf Enzyme wie CYP denkbar. In verschiedenen *in vitro*-Studien wurde jedoch gezeigt, dass Probenecid keinen Einfluss auf die Aktivität verschiedener CYP-Formen hat (Luo *et al.* 2002; Faucette *et al.* 2004).

Über die Verabreichung von Probenecid konnte die Bedeutung der renalen Sekretion für die hohen Adduktniveaus in der Niere von Ratten, die mit benzyllischen Alkoholen alkylierter PAK behandelt wurden, nicht eindeutig geklärt werden. Da bislang keine spezifischen Inhibitoren für renal exprimierte OAT bekannt sind, könnte die Verwendung gentechnisch veränderter Tiere, die bestimmte renale Transportproteine nicht exprimieren, hier größeren Aufschluss geben.

Die beobachteten Effekte zeigten jedoch, dass eine allgemeine Hemmung der Exkretion alkylierter PAK bzw. ihrer benzyllischen Metaboliten zu einer gesteigerten Genotoxizität in Leber und extrahepatischen Organen führt.

### 5.3 Relevanz einer SULT-vermittelten Bioaktivierung alkylierter PAK für den Menschen

Alkylierte PAK wurden in vielen Matrices nachgewiesen, die für die menschliche Exposition von Bedeutung sind wie Zigarettenrauch und verschiedene Nahrungsmittel wie Grillfleisch, Räucherkäse und Olivenöl. In diesen Matrices wurden insbesondere hohe Konzentrationen an Methylpyrenen gefunden (Seidel & Glatt, unveröffentlichte Daten). Gerade Vertreter der Methylpyrene wurden *in vitro* über mikrosomale Präparationen aus Rattenleber und humaner Leber zu einem hohem Prozentsatz zu benzylichen Alkoholen umgesetzt (Batke 2008). Ebenso wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass benzyliche Alkohole von Methylpyrenen sowohl *in vitro* durch humane SULT und Ratten-SULT als auch *in vivo* in der Ratte zu reaktiven genotoxischen Sulfaten bioaktiviert werden.

Eine einfache Übertragung dieser *in vitro* und im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist jedoch aus vielerlei Hinsicht nicht möglich. So zeigen Mensch und Ratte im Hinblick auf die Gewebeverteilung von SULT große Unterschiede. Im Gegensatz zur Leber-fokussierten SULT-Expression der Ratte zeigt der Mensch eine hohe Expression sowohl in der Leber als auch in extrahepatischen Organen wie dem Gastrointestinaltrakt (Glatt 2002). Zudem offenbarten die Untersuchungen auch Unterschiede in den Substratspezifitäten orthologer SULT-Formen des Menschen und der Ratte sowie Unterschiede im Umsatz benzylicher Alkohole durch humane und Ratten-SULT. Diese Faktoren könnten die Konzentration und Gewebeverteilung reaktiver Metaboliten alkylierter PAK sowie das Ausmaß der durch diese ausgelösten DNA-Schäden im Menschen stark beeinflussen. Erste Untersuchungen mit 1-HMP-behandelten transgenen Mäusen, die die humanen SULT-Formen 1A1/1A2 in humantypischer Gewebeverteilung exprimieren, zeigten im Vergleich zu Wildtyptieren erhöhte Adduktniveaus in Leber und auch extrahepatischen Geweben, in denen die humanen SULT-Formen jedoch nicht die murine SULT-Form 1A1 exprimiert werden (Dobbernack 2008).

Des Weiteren überstiegen die in dieser Arbeit im Tierversuch verwendeten Dosierungen an alkylierten PAK bzw. ihren Metaboliten die PAK-Exposition des Menschen, die auf wenige Mikrogramm/Tag geschätzt wird (Dennis 1983; Lodovici *et al.* 1995; de Vos *et al.* 1990), um ein Vielfaches. Bei sehr viel niedrigeren Expositionen gegenüber alkylierten PAK könnte sich das Verhältnis zwischen Toxifizierungs- und Detoxifizierungsreaktionen der gebildeten benzylichen Metabolite ganz anders verhalten als im untersuchten Tiermodell.

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Bioaktivierung alkylierter PAK durch Koexposition mit Substanzen, die Einfluss auf die Detoxifizierung über Hemmung detoxifizierender Enzyme oder Hemmung der Exkretion nehmen, gesteigert werden kann. Diese Substanzen umfassten in der Humantherapie verwendete Pharmaka wie Probenecid (Bardin 2004; Pea 2005) und 4-Methylpyrazol (Fomepizol) (Mégarbane *et al.* 2005) als auch

das Genussmittel Ethanol. Ethanol, dessen Einfluss exemplarisch für 1-HMP in einer früherer Arbeit (Ma 2001; Ma *et al.* 2002) und für 1-HM-8-MP in dieser Arbeit untersucht wurde, führte in hohen aber immer noch humanrelevanten Dosen über Hemmung von ADH (und im späteren Verlauf auch von ALDH über Acetaldehyd) zu einem deutlichen bis dramatischen Anstieg in der Bioaktivierung dieser benzyllischen Alkohole zu reaktiven Sulfaten und der damit verbundenen DNA-Schädigung. Ethanol (Alkohol)-haltige Getränke sind als humankanzerogen eingestuft (IARC Monographie Vol. 44 1988), wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist. Tierexperimentelle Studien stützen jedoch das Konzept der Wirkung als Kokanzerogen bzw. Tumorpromotor (Pöschl & Seitz 2004). Epidemiologische Studien zeigen auch eine synergistische Wirkung des Ethanol bei der durch Tabakrauch verursachten Krebsentstehung beispielsweise im oberen Gastrointestinaltrakt (Castellsagué *et al.* 1999) und im oberen respiratorischen Trakt (Maier *et al.* 1999). Eine durch Ethanol bedingte Verstärkung der Bioaktivierung im Tabakrauch enthaltener Genotoxine wie alkylierter PAK könnte hierzu einen Beitrag leisten.

## 6 Zusammenfassung

Alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) werden in vielen Matrices wie Fahrzeugabgasen und Tabakrauch und auch als Kontaminanten in Nahrungsmitteln neben rein aromatischen Kongeneren gefunden. Während rein aromatische PAK über Bildung vizinaler Dihydrodiolepoxide bioaktiviert werden, können alkylierte PAK überdies über die Alkylseitenkette über benzyliche Hydroxylierung und nachfolgende Sulfonierung katalysiert über Sulfotransferasen (SULT) zu reaktiven Schwefelsäureestern umgesetzt werden. Die SULT-vermittelte Bioaktivierung zu einem genotoxischen Schwefelsäureester wurde für den benzylichen Alkohol 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) des Hepatokarzinogens 1-Methylpyren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Ratte gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die benzylichen Alkohole weiterer alkylierter PAK über Sulfonierung zu genotoxischen Schwefelsäureestern (Sulfaten) umgesetzt werden. Hierzu wurde eine Gruppe von 17 Modellsubstanzen ausgewählt, innerhalb der typische Strukturen systematisch variiert wurden, um die Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu ermöglichen. Die Modellsubstanzen umfassten alkylierte Kongenere des Pyren, Chrysen, Benz[a]anthracen, Benzo[a]pyren und Anthanthren.

Das genotoxische Potenzial authentischer benzylicher Schwefelsäureester der Modellsubstanzen wurde zunächst *in vitro* über DNA-Adduktbildung im zellfreien System und Mutagenität im *Salmonella*-Rückmutationstest untersucht. Die Sulfate zeigten große Reaktivitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Struktur des aromatischen Systems und der Position der Alkylseitenkette, wobei die Endpunkte DNA-Adduktbildung und Mutagenität gut korrelierten. Das höchste genotoxische Potenzial zeigten Sulfate alkylierter PAK mit Pyrenstruktur und der Alkylgruppe in Position 1 (1-Sulfoxymethylpyren, 1-Sulfoxymethyl-6-methylpyren, 1-Sulfoxymethyl-8-methylpyren) sowie das Sulfat des Cyclopenta-benzo[a]pyren. Bei Durchführung des *Salmonella*-Mutagenitätstests in chloridhaltigem Expositionsmedium zeigte sich bei den meisten Schwefelsäureestern eine starke Steigerung der Mutagenität im Vergleich zur Durchführung in rein wässrigem Medium. Dieser Effekt kann auf die Bildung sekundär reaktiver Chlorderivate der Schwefelsäureester zurückgeführt werden, die aufgrund fehlender Ladung die bakterielle Zellmembran leichter durchdringen können. Er verdeutlicht zudem den großen Einfluss von Membranen als Barrieren für den Durchtritt unter physiologischen Bedingungen geladener reaktiver Metabolite auf Ergebnisse von Mutagenitätsuntersuchungen.

Ein Ansatz zur Vermeidung von Membranbarrieren bestand darin, den *Salmonella*-Mutagenitätstest mit den benzylichen Alkoholen der untersuchten alkylierten PAK und gentechnisch veränderten *S. typhimurium*-Stämmen, die SULT-Formen des Menschen und der Ratte heterolog exprimieren, durchzuführen. Die mit diesem Testsystem beobachteten mutagenen Effekte stellten das Produkt der Substratspezifität der jeweils exprimierten SULT-

Form und der intrinsischen Reaktivität der gebildeten benzyllischen Schwefelsäureester dar. Bis auf die Alkohole 2- und 4-Hydroxymethylpyren zeigten alle untersuchten benzyllischen Alkohole deutliche mutagene Effekte in einem oder mehreren humane SULT exprimierenden Stämmen. Während die benzyllischen Alkohole der alkylierten Pyrenkongenere durch die humanen Formen SULT1A1, 1A2 und 1E1 zu mutagenen Sulfaten umgesetzt wurden, erfolgte der Umsatz der benzyllischen Alkohole mit Benzo[a]pyren-, Chrysen- und Benz[a]anthracenstruktur vor allem durch die humane SULT1B1 und 2A1. Die benzyllischen Alkohole 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) und 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren (1-HM-8-MP) wurden auch in Mutagenitätsprüfungen mit *S. typhimurium* mit Expression verschiedener SULT-Formen der Ratte eingesetzt. Beide Alkohole zeigten mutagene Effekte sowohl bei Expression männlich-dominanter als auch weiblich-dominanter Ratten-SULT-Formen.

Die durchgeführten *in vitro*-Versuche zeigten das Potenzial der benzyllischen Metabolite alkylierter PAK für genotoxische Wirkungen. Nachfolgend musste geklärt werden, welche Relevanz die beobachteten Effekte für die komplexere *in vivo*-Situation haben, in der Faktoren wie Absorption, Verteilung, konkurrierende detoxifizierende Stoffwechselwege sowie Ausscheidungs- und Reparaturprozesse genotoxische Wirkungen beeinflussen können. Die Bestimmung des DNA-Adduktniveaus zu einem definierten Zeitpunkt nach Verabreichung der Testsubstanzen war hierfür ein geeigneter Endpunkt.

Nach Verabreichung verschiedener benzyllischer Schwefelsäureester und Alkohole an männliche Wistar-Ratten konnten DNA-Addukte in den untersuchten Organen Leber, Niere und Lunge detektiert werden, was im Fall der Schwefelsäureester deren systemische Bioverfügbarkeit und im Fall der benzyllischen Alkohole deren Umsatz durch SULT der männlichen Ratte zu den entsprechenden reaktiven benzyllischen Schwefelsäureestern zeigte. Da im Gegensatz zum Menschen die SULT-Expression in der Ratte auf die Leber fokussiert ist, musste ein Großteil des Umsatzes zu genotoxischen Sulfaten in der Leber stattgefunden haben, was die hohen DNA-Adduktniveaus in diesem Organ erklärte. DNA-Addukte wurden auch in extrahepatischen Organen gefunden, was über einen hepatischen Export der gebildeten reaktiven Sulfate und deren Transport über den Blutkreislauf zu diesen Geweben erklärt werden kann.

Für die weiterführenden *in vivo*-Studien wurden die benzyllischen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP ausgewählt, die trotz großer struktureller Ähnlichkeit toxikodynamische Unterschiede zeigten. So bewirkte 1-HM-8-MP höhere hepatische Adduktniveaus als 1-HMP, wohingegen die Adduktniveaus in extrahepatischen Organen insbesondere in der Niere deutlich niedriger lagen. Mögliche Erklärungen für diese Unterschiede in der Gewebeverteilung sind die höhere Reaktivität des aus 1-HM-8-MP gebildeten reaktiven Sulfates sowie Unterschiede in der Interaktion der gebildeten Sulfate mit Transmembrantransportern.



Untersuchungen zum Metabolismus des 1-HMP *in vivo* hatten gezeigt, dass oxidative Stoffwechselprozesse an der Alkylseitenkette unter Bildung stabiler Metaboliten dominieren. Ergebnisse von *in vitro*-Experimenten und *in vivo*-Inhibitionsstudien zeigten eine Beteiligung von Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen (ADH, ALDH). Zur Untersuchung der Bedeutung des SULT-vermittelten Toxifizierungsweges als auch konkurrierender detoxifizierender oxidativer Stoffwechselprozesse, wurden für 1-HMP und 1-HM-8-MP *in vivo*-Inhibitionsstudien mit SULT-Inhibitoren und für 1-HM-8-MP auch mit ADH/ALDH-Inhibitoren durchgeführt.

Eine Vorbehandlung mit dem gut etablierten SULT-Hemmstoff Pentachlorphenol führte zu einer Reduktion der DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere 1-HMP-behandelter Tiere und in geringerem Ausmaß auch bei 1-HM-8-MP-behandelten Tieren. Die Verabreichung von Quercetin, das *in vitro* verschiedene SULT-Formen hemmt, hatte keine Auswirkung auf die DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere. Die Hemmung der DNA-Adduktbildung bei Verabreichung des SULT-Inhibitors Pentachlorphenol verdeutlichte jedoch, dass benzyliche Alkohole alkylierter PAK *in vivo* über Sulfonierung bioaktiviert werden.

Eine Vorbehandlung mit dem ADH-Inhibitor 4-Methylpyrazol und dem ADH-Substrat Ethanol führte zu erhöhten DNA-Adduktniveaus in Leber und Niere 1-HM-8-MP-behandelter Tiere. Den gleichen Effekt, jedoch in geringerem Ausmaß, hatte auch die Vorbehandlung mit dem ALDH-Inhibitor Disulfiram. Dies deutet darauf hin, dass oxidative Modifikationen an der Seitenkette des 1-HM-8-MP einen Detoxifizierungsmechanismus darstellen. Die Wirkung der ADH- und ALDH-Inhibitoren war wie die Wirkung der SULT-Inhibitoren im Fall des 1-HM-8-MP jedoch geringer ausgeprägt als beim 1-HMP, was auf Unterschieden in der Enzymaffinität beider Alkohole bzw. ihrer Metaboliten beruhen könnte.

Nach Verabreichung benzylicher Metabolite alkylierter PAK wurden oftmals hohe Adduktniveaus in der Niere detektiert. Als mögliche Ursache hierfür wurde eine Transporter-vermittelte renale Sekretion reaktiver Sulfate postuliert, die in der vorliegenden Arbeit über Vorbehandlung mit Probenecid, einem Inhibitor organischer Anionentransporter, vor Verabreichung von 1-HMP und 1-HM-8-MP überprüft wurde. Der Haupteffekt der Probenecid-Behandlung wurde jedoch nicht in der Niere, sondern in der Leber beobachtet, die stark erhöhte Adduktniveaus zeigte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Hemmung des Exportes in der Leber gebildeter reaktiver Sulfate über Inhibition hepatischer organischer Anionentransporter. Probenecid erwies sich somit für die zu untersuchende Problematik als zu unspezifisch.

Die *in vivo*-Inhibitionsstudien zeigten, dass die Bioaktivierung alkylierter PAK und damit deren genotoxische Wirkung durch Koexposition mit humanrelevanten Substanzen, die Einfluss auf die Detoxifizierung über Hemmung detoxifizierender Enzyme oder Hemmung der Exkretion nehmen, gesteigert werden kann.

## Summary

Alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are found besides purely aromatic congeners in numerous matrices like car engine exhausts and tobacco smoke and as contaminants in foods. While purely aromatic PAH are bioactivated via formation of vicinal dihydrodiolepoxydes, alkylated PAH can moreover be converted at the alkyl side chain to reactive sulfuric acid esters via benzylic hydroxylation and subsequent sulfonation catalysed by sulfotransferases (SULT). The SULT-mediated bioactivation to a genotoxic sulfuric acid ester was shown for the benzylic alcohol 1-hydroxymethylpyrene (1-HMP) of the hepatocarcinogen 1-methylpyrene both *in vitro* and *in vivo* in the rat.

In the thesis at hand it was studied if the benzylic alcohols of further alkylated PAH are converted to genotoxic sulfuric acid esters (sulfates) via sulfonation. For this purpose a group of 17 model substances was chosen within which typical structures were varied systematically to allow for deduction of structure activity relationships. The model substances comprised alkylated congeners of pyrene, chrysene, benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene and anthanthrene.

The genotoxic potential of authentic benzylic sulfuric acid esters of the model substances was initially investigated *in vitro* via DNA adduct formation in a cell free system and mutagenicity in the *Salmonella* reverse mutation test. The sulfates showed large differences in reactivity depending on the structure of the aromatic system and the position of the alkyl side chain whereupon the endpoints DNA adduct formation and mutagenicity correlated well. Sulfates of alkylated PAH with pyrene structure and the alkyl group in position 1 (1-sulfooxymethylpyrene, 1-sulfooxymethyl-6-methylpyrene, 1-sulfooxy-8-methylpyrene) as well as the sulfate of cyclopentabenz[a]pyrene showed the strongest genotoxic potential. When the *Salmonella* mutagenicity test was performed in exposure medium containing chloride most sulfuric acid esters showed a strong increase in mutagenicity compared with the performance in purely aqueous medium. This effect can be attributed to the formation of secondary reactive chloro derivatives of the sulfuric acid esters that are able to penetrate the bacterial cell membrane more easily due to the missing charge. Moreover, it demonstrates the strong influence of membranes as barriers for the penetration of under physiological conditions charged reactive metabolites on the outcome of mutagenicity studies.

An approach to avoid membrane barriers was to carry out the *Salmonella* mutagenicity test with the benzylic alcohols of the alkylated PAH studied and *S. typhimurium* strains genetically engineered for the heterologous expression of human and rat SULT forms. The mutagenic effects observed with this test system represented the product of the substrate specificity of the expressed SULT form and the intrinsic reactivity of the benzylic sulfuric acid esters formed. Except for the alcohols 2- and 4-hydroxymethylpyrene all benzylic alcohols

studied showed clear mutagenic effects in one or more SULT-expressing strains. While the benzylic alcohols of the alkylated pyrene congeners were converted to mutagenic sulfates by the human forms SULT1A1, 1A2 and 1E1, conversion of the benzylic alcohols with benzo[a]pyrene, chrysene and benz[a]anthracene structure was mainly carried out by the human SULT1B1 and 2A1. The benzylic alcohols 1-hydroxymethylpyrene (1-HMP) and 1-hydroxy-8-methylpyrene (1-HM-8-MP) were also included in mutagenicity studies with *S. typhimurium* expressing different forms of rat SULT. Both alcohols showed mutagenic effects at expression of both male-dominant and female-dominant rat SULT forms.

The studies performed *in vitro* demonstrated the potential of benzylic metabolites of alkylated PAH for genotoxic effects. Consecutively, the relevance of the observed effects for the more complex *in vivo* situation, in which factors like absorption, distribution, competing detoxifying metabolic pathways as well as excretion and repair processes can influence genotoxic effects, had to be clarified. The determination of the DNA adduct level at a defined time after administration of the test substances was an appropriate endpoint for this purpose.

After administration of different benzylic sulfuric acid esters and alcohols to male Wistar rats DNA adducts were detected in the studied organs liver, kidney and lung, in case of the sulfuric acid esters showing their systemic bioavailability and in case of the benzylic alcohols demonstrating their conversion to the corresponding reactive benzylic sulfuric acid esters by SULT of the male rat. Since in contrast to man SULT expression in the rat is focused on the liver, a large part of the conversion to genotoxic sulfates must have been taken place in the liver explaining the high DNA adduct levels in this organ. DNA adducts were also found in extrahepatic tissues which can be attributed to a hepatic export of the reactive sulfates formed and their transport to these tissues via circulation.

For the continuative *in vivo* studies the benzylic alcohols 1-HMP and 1-HM-8-MP were chosen that demonstrated toxicodynamic differences in spite of their great structural resemblance. Thus, 1-HM-8-MP caused higher hepatic DNA adduct levels than 1-HMP whereas the adduct levels in extrahepatic tissues particularly in the kidney were clearly lower. Possible explanations for these differences in tissue distribution are the higher reactivity of the reactive sulfate formed from 1-HM-8-MP as well as differences in the interaction of the sulfates formed with transmembrane transporters.

Studies investigating the metabolism of 1-HMP *in vivo* had shown that oxidative metabolic pathways at the alkyl side chain with formation of stable metabolites dominate. Results of *in vitro* experiments and *in vivo* inhibition studies demonstrated an involvement of alcohol and aldehyde dehydrogenases (ADH, ALDH). To investigate the importance of the SULT-mediated toxification pathway as well as competing detoxifying oxidative metabolic pathways, *in vivo* inhibition studies with SULT inhibitors were performed for 1-HMP and 1-HM-8-MP and with ADH/ALDH inhibitors also for 1-HM-8-MP.

A pretreatment with the well-established SULT inhibitor pentachlorophenol led to a reduction of DNA adduct levels in liver and kidney of animals treated with 1-HMP and to a lesser extent also in animals treated with 1-HM-8-MP. Administration of quercetin that inhibits different SULT forms *in vitro* had no impact on the DNA adduct levels in liver and kidney. However, inhibition of DNA adduct formation at administration of pentachlorophenol demonstrated that benzylic alcohols of alkylated PAH are bioactivated via sulfonation *in vivo*.

A pretreatment with the ADH inhibitor 4-methylpyrazole and the ADH substrate ethanol led to increased DNA adduct levels in liver and kidney of animals treated with 1-HM-8-MP. The same effect but to a lesser extent was caused by a pretreatment with the ALDH inhibitor disulfiram. This indicates that oxidative modifications at the side chain of 1-HM-8-MP represent a detoxification mechanism. The effect of the ADH and ALDH inhibitors just as the effect of the SULT inhibitors was less pronounced in case of 1-HM-8-MP compared to 1-HMP which might be based on differences in enzyme affinity of both alcohols and their metabolites, respectively.

After administration of benzylic metabolites of alkylated PAH often high DNA adduct levels were detected in kidney. A transporter-mediated renal secretion was postulated as possible cause which was investigated in the thesis at hand using a pretreatment with probenecid, an inhibitor of organic anion transporters, before administration of 1-HMP and 1-HM-8-MP. However, the main effect of the treatment with probenecid was not observed in kidney but in liver that showed strongly increased adduct levels. A possible explanation for this effect is the inhibition of the export of reactive sulfates formed in liver via inhibition of hepatic organic anion transporters. Thus, probenecid proved to be too unspecific for the question to be investigated.

The *in vivo* inhibition studies demonstrated that the bioactivation of alkylated PAH and their genotoxic effects can be enhanced by coexposition with substances relevant for human beings that influence detoxification by inhibition of detoxifying enzymes or inhibition of excretion.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ames, B. N. and Whitfield, H. J., Jr. (1966). Frameshift mutagenesis in Salmonella. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31, 221-225.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D. (1973a). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2281-2285.
- Ames, B. N., Lee, F. D., and Durston, W. E. (1973b). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 782-786.
- Bakhiya, N., Stephani, M., Bahn, A., Ugele, B., Seidel, A., Burckhardt, G., and Glatt, H. (2006). Uptake of chemically reactive, DNA-damaging sulfuric acid esters into renal cells by human organic anion transporters. *J Am Soc Nephrol* 17, 1414-1421.
- Bakhiya, N., Batke, M., Laake, J., Monien, B. H., Frank, H., Seidel, A., Engst, W., and Glatt, H. (2007). Directing role of organic anion transporters in the excretion of mercapturic acids of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Dispos* 35, 1824-1831.
- Bardin, T. (2004). Current management of gout in patients unresponsive or allergic to allopurinol. *Joint Bone Spine*. 71, 481-485.
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 100, 9-20.
- Batke, M. (2008). Metabolismus von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen - Einfluss der Struktur auf benzyliche Hydroxylierung und Sulfonierung in vitro und Modulation des Metabolismus in vivo. Dissertation Universität Potsdam.
- Bayless, J. H., Jablonski, J. E., Roach, S. M., and Sullivan, P. D. (1986). Inhibition of the mutagenicity and metabolism of 6-methyl-benzo[a]pyrene and 6-hydroxymethyl-benzo[a]pyrene. *Biochem Pharmacol*. 35, 2313-2322.
- Bigger, C. A., Ponten, I., Page, J. E., and Dipple, A. (2000). Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the supF target gene. *Mutat Res* 450, 75-93.
- Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J., Weinshilboum, R. M., and Coughtrie, M. W. (2004). A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 14, 199-211.
- Blomstrand, R., Ostling-Wintzell, H., Lof, A., McMartin, K., Tolf, B. R., and Hedstrom, K. G. (1979). Pyrazoles as inhibitors of alcohol oxidation and as important tools in alcohol research: an approach to therapy against methanol poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3499-3503.

- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Tornqvist, M., Victorin, K., and Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 451-488.
- Burckhardt, B. C. and Burckhardt, G. (2003). Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146, 95-158.
- Castellsagué, X., Muñoz, N., De Stefani, E., Victora, C. G., Castelletto, R., Rolón, P. A., and Quintana, M. J. (1999). Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer*. 82, 657-664.
- Chen, X., Yin, O. Q., Zuo, Z., and Chow, M. S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm Res* 22, 892-901.
- Cook, J. W., Hewett, C. L., and Hieger, I. (1933). The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. *J. Chem. Soc.*, 395-405.
- Coombs, M. M., Dixon, C., and Kissonerghis, A. M. (1976). Evaluation of the mutagenicity of compounds of known carcinogenicity, belonging to the benz[a]anthracene, chrysene, and cyclopenta[a]phenanthrene series, using Ames's test. *Cancer Res* 36, 4525-4529.
- Cornell, N. W., Hansch, C., Kim, K. H., and Henegar, K. (1983). The inhibition of alcohol dehydrogenase in vitro and in isolated hepatocytes by 4-substituted pyrazoles. *Arch Biochem Biophys* 227, 81-90.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., and Pacifici, G. M. (2002). Inhibition of phenol sulfotransferase (SULT1A1) by quercetin in human adult and foetal livers. *Xenobiotica* 32, 363-368.
- de Vos, R. H., van Dokkum, W., Schouten, A., and de Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem Toxicol* 28, 263-268.
- DeBaun, J. R., Rowley, J. Y., Miller, E. C., and Miller, J. A. (1968). Sulfotransferase activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rodent livers susceptible and resistant to this carcinogen. *Proc Soc Exp Biol Med*. 129, 268-273.
- Dewar MJS, Dougherty RC (1975). The PMO theory of organic chemistry, New York: Plenum Press.
- Dipple, A. (1995). DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16, 437-441.
- Dobbernack, G. (2008). Konstruktion und Charakterisierung transgener Mauslinien für humane Sulfotransferasen zur Untersuchung der gewebspezifischen Genotoxizität durch Sulfotransferasen aktivierter Xenobiotika. Dissertation Universität Potsdam.

- Duffel, M. W., and Jakoby, W. B. (1981). On the mechanism of aryl sulfotransferase. *J Biol Chem* 256, 11123-11127.
- Dunn, R. T., 2nd, and Klaassen, C. D. (1998). Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab Dispos* 26, 598-604.
- Eaton, E. A., Walle, U. K., Lewis, A. J., Hudson, T., Wilson, A. A., and Walle, T. (1996). Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab Dispos.* 24, 232-237.
- Enders, N., Seidel, A., Monnerjahn, S., and Glatt, H. R. (1993). Synthesis of 11 benzylic sulfate esters, their bacterial mutagenicity and its modulation by chloride, bromide and acetate anions. *Polycyclic aromatic compounds* 3, 887s-894s.
- Engst, W., Landsiedel, R., Hermersdorfer, H., Doehmer, J., and Glatt, H. (1999). Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 20, 1777-1785.
- Faucette, S. R., Wang, H., Hamilton, G. A., Jolley, S. L., Gilbert, D., Lindley, C., Yan, B., Negishi, M., and LeCluyse, E. L. (2004). Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. *Drug Metab Dispos* 32, 348-358.
- Flesher, J. W., and Sydnor, K. L. (1971). Carcinogenicity of derivatives of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res* 31, 1951-1954.
- Flesher, J. W., and Sydnor, K. L. (1973). Possible role of 6-hydroxymethylbenzo(a)pyrene as a proximate carcinogen of benzo(a)pyrene and 6-methylbenzo(a)pyrene. *Int J Cancer* 11, 433-437.
- Flowers-Geary, L., Bleczinski, W., Harvey, R. G., and Penning, T. M. (1996). Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 99, 55-72.
- Freimuth, R. R., Wiepert, M., Chute, C. G., Wieben, E. D., and Weinshilboum, R. M. (2004). Human cytosolic sulfotransferase database mining: identification of seven novel genes and pseudogenes. *Pharmacogenomics J* 4, 54-65.
- Fuda, H., Lee, Y. C., Shimizu, C., Javitt, N. B., and Strott, C. A. (2002). Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase. *J Biol Chem* 277, 36161-36166.
- Fujita, K., and Kamataki, T. (2002). Genetically engineered bacterial cells co-expressing human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase: prediction of metabolism and toxicity of drugs in humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 17, 1-22.

- Ghazali, R. A., and Waring, R. H. (1999). The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention. *Life Sci.* 65, 1625-1632.
- Glatt, H. (1999). Polyzyklische Aromaten. In: *Umweltmedizin. Grundlagen der Umweltmedizin - klinische Umweltmedizin - ökologische Medizin* (V. Mersch-Sundermann, Ed.), pp. 186-199. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129, 141-170.
- Glatt, H. (2002). Sulphotransferases. In *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics* (C. Ioannides, Ed.), pp. 353-439.
- Glatt, H. and Bartsch, I. (1996). External versus internal metabolic activation of polycyclic aromatic compounds in mutagenicity tests: a comparison using heterologous expression systems. *Polycyclic Aromatic Compounds* 10, 43-50.
- Glatt, H. and Meinel, W. (2004a). Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 55-68.
- Glatt, H. and Meinel, W. (2004b). Use of genetically manipulated *Salmonella typhimurium* strains to evaluate the role of sulfotransferases and acetyltransferases in nitrofen mutagenicity. *Carcinogenesis* 25, 779-786.
- Glatt, H. and Meinel, W. (2005). Sulfotransferases and acetyltransferases in mutagenicity testing: technical aspects. *Methods Enzymol* 400, 230-249.
- Glatt, H., Henschler, R., Phillips, D. H., Blake, J. W., Steinberg, P., Seidel, A., and Oesch, F. (1990). Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells. *Environ Health Perspect* 88, 43-48.
- Glatt, H., Martine, U., Baidossi, W., and Blum, J. (1991). Strong influence of the exposure medium on mutagenicity in the Ames test: 7-methylbenz[a]anthracene-5,6-oxide. *Mutagenesis* 6, 537-540.
- Glatt, H., Henschler, R., Frank, H., Seidel, A., Yang, C., Abu-Shqara, E., and Harvey, R. G. (1993). Sulfotransferase-mediated mutagenicity of 1-hydroxymethylpyrene and 4H-cyclopenta[def]chrysen-4-ol and its enhancement by chloride anions. *Carcinogenesis* 14, 599-602.
- Glatt, H., Abu-Shqara, E., Martiné, U., Baidossi, W., Harvey, R. G., and Blum, J. (1994a). K-region oxides and imines derived from alkylated benz[a]anthracene congeners: synthesis, stability in aqueous media and mutagenicity. *Mutagenesis* 9, 83-92.
- Glatt, H., Pauly, K., Frank, H., Seidel, A., Oesch, F., Harvey, R. G., and Werle-Schneider, G. (1994b). Substance-dependent sex differences in the activation of benzylic alcohols to mutagens by hepatic sulfotransferases of the rat. *Carcinogenesis* 15, 2605-2611.



- Glatt, H., Seidel, A., Harvey, R. G., and Coughtrie, M. W. (1994c). Activation of benzylic alcohols to mutagens by human hepatic sulphotransferases. *Mutagenesis* 9, 553-557.
- Glatt, H., Werle-Schneider, G., Enders, N., Monnerjahn, S., Pudil, J., Czich, A., Seidel, A., and Schwarz, M. (1994d). 1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects in vitro and in vivo, and metabolic aspects. *Chem Biol Interact* 92, 305-319.
- Glatt, H., Bartsch, I., Christoph, S., Coughtrie, M. W., Falany, C. N., Hagen, M., Landsiedel, R., Pabel, U., Phillips, D. H., Seidel, A., and Yamazoe, Y. (1998). Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem Biol Interact* 109, 195-219.
- Glatt, H., Meinel, W., Kuhlow, A., and Ma, L. (2003). Metabolic formation, distribution and toxicological effects of reactive sulphuric acid esters. *Nova Acta Leopoldina NF87* 329, 151-161.
- Glatt, H., Schneider, H., Seidel, A. (2006). Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. In *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie* (G. u. H. Dunkelberg, Ed.).
- Glatt, H., Rost, K., Frank, H., Seidel, A. and Kollock, R. (2008). Detoxification of promutagenic aldehydes derived from methylpyrenes by human aldehyde dehydrogenases ALDH2 and ALDH3A1. *Arch Biochem Biophys* 477, 196-205.
- Gollapudi, S., Kim, C. H., Tran, B. N., Sangha, S., and Gupta, S. (1997). Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 40, 150-158.
- Gomaa, E. A., Gray, J. I., Rabie, S., Lopez-Bote, C., and Booren, A. M. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Addit Contam* 10, 503-521.
- Graf, B. A., Ameho, C., Dolnikowski, G. G., Milbury, P. E., Chen, C. Y., and Blumberg, J. B. (2006). Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr* 136, 39-44.
- Guillen, M. D., and Sopelana, P. (2004a). Load of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils: importance of alkylated derivatives. *J Food Prot* 67, 1904-1913.
- Guillen, M. D., and Sopelana, P. (2004b). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *J Dairy Sci* 87, 556-564.
- Gupta, R. C. (1984). Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6943-6947.

- Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C. N., and Glatt, H. (1998). Expression of human estrogen sulfotransferase in *Salmonella typhimurium*: differences between hHST and hEST in the enantioselective activation of 1-hydroxyethylpyrene to a mutagen. *Chem Biol Interact* 109, 249-253.
- Hald, J. and Jacobsen, E. (1948). The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of Antabuse (tetraethylthiuramdisulphide) and alcohol. *Acta Pharmacol.* 4, 305-310.
- Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H., and Zhao, C. (2000). DNA adducts, mutations, and cancer 2000. *Regul Toxicol Pharmacol* 32, 264-275.
- Hildebrandt, M. A., Salavaggione, O. E., Martin, Y. N., Flynn, H. C., Jalal, S., Wieben, E. D., and Weinshilboum, R. M. (2004). Human SULT1A3 pharmacogenetics: gene duplication and functional genomic studies. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 870-878.
- Hildebrandt, M.A., Carrington, D.P., Thomae, B.A., Eckloff, B.W., Schaid, D.J., Yee, V.C., Weinshilboum, R.M. and Wieben, E.D. (2007) Genetic diversity and function in the human cytosolic sulfotransferases. *Pharmacogenomics J*, 7, 133-43.
- Hilpert, L. R. (1987). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylated-polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate extracts using negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 14, 383-394.
- Hoffmann, D. and Wynder, E. L. (1971). A study of tobacco carcinogenesis: XI. Tumor initiators, tumor accelerators, and tumor promoting activity of condensate fractions. *Cancer* 27, 848-864.
- Horikawa, M., Kato, Y., Tyson, C. A., and Sugiyama, Y. (2002). The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* 17, 23-33.
- IARC (1984). Polynuclear aromatic hydrocarbons, part 2, carbon blacks, mineral oils (lubricant base oils and derived products) and some nitroarenes. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 33.
- IARC (1984). Polynuclear aromatic hydrocarbons, part 3, industrial exposures in aluminium production, coal gasification, coke production and, and iron and steel founding. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 34.
- IARC (1985). Polynuclear aromatic hydrocarbons, part 4, bitumens, coal-tars and derived products, shale-oils and soots. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 35.
- IARC (1986). Tobacco smoking. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 38.

- IARC (1988). Alcohol drinking. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 44.
- IARC (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, WHO, Lyon, 92 (in Bearbeitung).
- Johansson, B. (1992). A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 369, 15-26.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., and Keppler, D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56, 988-994.
- Jernström, B. and Graslund, A. (1994). Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys Chem* 49, 185-199.
- Kennaway, E. and Hieger, I. (1930). Carcinogenic substances and their fluorescence spectra. *Br J Med* 1, 1044-1046.
- Kollock, R. (2007). Humane Alkoholdehydrogenasen und Aldehyddehydrogenasen: Bedeutung für den Metabolismus von Methylpyrenderivaten und von 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural. Dissertation Universität Potsdam.
- Kollock, R., Frank, H., Seidel, A., Meinel, W., and Glatt, H. (2008a). Oxidation of alcohols and reduction of aldehydes derived from methyl- and dimethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenases. *Toxicology* 245, 65-75.
- Kollock, R., Meinel, W., Schneider, H., Batke, M., Frank, H., Seidel, A., and Glatt, H. (2008b). Efficient oxidation of promutagenic hydroxymethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenase ADH2 and its inhibition by various agents. *Biochem Pharmacol* 75, 527-537.
- König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I., and Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 377-394.
- Kuhlow, A. (2001). Bildung, Verteilung und DNA-Bindung des reaktiven Sulfatesters 1-Sulfooxymethylpyren in der Ratte. Dissertation Universität Potsdam.
- La Voie, E. J., Coleman, D. T., Rice, J. E., Geddie, N. G., and Hoffmann, D. (1985). Tumor-initiating activity, mutagenicity, and metabolism of methylated anthracenes. *Carcinogenesis* 6, 1483-1488.
- Landsiedel, R., Engst, W., Scholtyssek, M., Seidel, A., and Glatt, H. R. (1996a). Benzylic sulfuric acid esters react with diverse functional groups and often form secondary reactive species. *Polycyclic Aromatic Compounds* 11, 341-348.
- Landsiedel, R., Engst, W., Seidel, A., and Glatt, H. R. (1996b). Physico-chemical properties and mutagenicity of benzylic compounds. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, Suppl. 2, 215-222.

- Larsson, B. K., Sahlberg, G. P., Eriksson, A. T., and Busk, L. A. (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food. *J Agric Food Chem* 31, 867-873.
- Lee, M. L., Novotny, M., and Bartle, K. D. (1976). Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco and marijuana smoke condensates. *Anal Chem* 48, 405-416.
- Leite, D. F., Echevarria-Lima, J., Calixto, J. B., and Rumjanek, V. M. (2007). Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 73, 665-674.
- Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A., and Ames, B. N. (1982a). A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7445-7449.
- Levin, D. E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. (1982b). A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat Res* 94, 315-330.
- Lipsky, J. J., Shen, M. L., and Naylor, S. (2001a). In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem Biol Interact* 130-132, 93-102.
- Lipsky, J. J., Shen, M. L., and Naylor, S. (2001b). Overview--in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem Biol Interact* 130-132, 81-91.
- Liu, L. and Klaassen, C. D. (1996a). Ontogeny and hormonal basis of female-dominant rat hepatic sulfotransferases. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 386-391.
- Liu, L. and Klaassen, C. D. (1996b). Ontogeny and hormonal basis of male-dominant rat hepatic sulfotransferases. *Mol Pharmacol* 50, 565-572.
- Lodovici, M., Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S., and Testolin, G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit Contam* 12, 703-713.
- Lodovici, M., Akpan, V., Evangelisti, C., and Dolara, P. (2004). Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol* 24, 277-281.
- Luo, G., Cunningham, M., Kim, S., Burn, T., Lin, J., Sinz, M., Hamilton, G., Rizzo, C., Jolley, S., Gilbert, D., Downey, A., Mudra, D., Graham, R., Carroll, K., Xie, J., Madan, A., Parkinson, A., Christ, D., Selling, B., LeCluyse, E., and Gan, L. S. (2002). CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30, 795-804.
- Ma, L. (2001). Mercaptursäure und Nukleosidaddukt im Harn als Biomarker in 1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten. Dissertation Universität Potsdam.

- Ma, L., Landsiedel, R., and Kuhlow, A. (2000). Detection of mercapturic acids and nucleoside adducts in blood, urine and feces of rats treated with metabolites of methylpyrene. *Polycyclic Aromatic Compounds* 21, 135-149.
- Ma, L., Kuhlow, A., and 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., Kuhlow, A., and Glatt, H. (2003). Albumin strongly prolongs the lifespan of chemically reactive sulphuric acid esters and affects their biological activities in the rat. *Nova Acta Leopoldina* 87, 265-272.
- Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Seitz, H. K., and Heller, W. D. (1990). Tobacco- and alcohol-associated cancer risk of the upper respiratory and digestive tract. *Laryngorhinootologie*. 69, 505-511.
- Marchetti, F., De Santi, C., Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., and Pacifici, G. M. (2001). Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine. *Xenobiotica* 31, 841-847.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173-215.
- McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J., and Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 979-983.
- Meerman, J. H., Sterenborg, H. M., and Mulder, G. J. (1983). Use of pentachlorophenol as long-term inhibitor of sulfation of phenols and hydroxamic acids in the rat in vivo. *Biochem Pharmacol* 32, 1587-1593.
- Megarbane, B., Borron, S. W., and Baud, F. J. (2005). Current recommendations for treatment of severe toxic alcohol poisonings. *Intensive Care Med* 31, 189-195.
- Meinl, W., Meerman, J. H., and Glatt, H. (2002). Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in Salmonella typhimurium. *Pharmacogenetics* 12, 677-689.
- Meinl, W., Pabel, U., Osterloh-Quiroz, M., Hengstler, J. G., and Glatt, H. (2006). Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *Int J Cancer* 118, 1090-1097.
- Meinl, W., Donath, C., Schneider, H., Sommer, Y. and Glatt, H. (2008). SULT1C3, an orphan sequence of the human genome, encodes an enzyme activating various promutagens. *Food Chem Toxicol.* 46, 1249-56.
- Menzie, C., Potocki, B., and Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol* 26, 1279-1284.

- Mesía-Vela, S., and Kauffman, F. C. (2003). Inhibition of rat liver sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1 and glucuronosyltransferase by dietary flavonoids. *Xenobiotica* 33, 1211-1220.
- Miller, J. A. (1994). Sulfonation in chemical carcinogenesis--history and present status. *Chem Biol Interact* 92, 329-341.
- Miyata, M., Kudo, G., Lee, Y. H., Yang, T. J., Gelboin, H. V., Fernandez-Salguero, P., Kimura, S., and Gonzalez, F. J. (1999). Targeted disruption of the microsomal epoxide hydrolase gene. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Biol Chem* 274, 23963-23968.
- Monnerjahn, S., Seidel, A., Steinberg, P., Oesch, F., Hinz, M., Stezowsky, J. J., Hewer, A., Phillips, D. H., and Glatt, H. R. (1993). Formation of DNA adducts from 1-hydroxymethylpyrene in liver cells in vivo and in vitro. *IARC Sci Publ*, 189-193.
- Moorthy, B. and Randerath, K. (1996). Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo[a]pyrene-induced hepatic DNA adduct formation in vivo and inhibits microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in vitro: likely inhibition of epoxide detoxication by pentachlorophenol. *Arch Toxicol* 70, 696-703.
- Muckel, E., Frandsen, H., and Glatt, H. R. (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, 1063-1068.
- Mulder, G. J., and Scholtens, E. (1977). Phenol Sulphotransferase and Uridine Diphosphate Glucuronyltransferase from Rat Liver in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 165, 553-559.
- Nagao, M., Ochiai, M., Okochi, E., Ushijima, T., and Sugimura, T. (2001). LacI transgenic animal study: relationships among DNA-adduct levels, mutant frequencies and cancer incidences. *Mutat Res* 477, 119-124.
- Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Gong, D. W., Yamazoe, Y., and Kato, R. (1993). Isolation and expression of a cDNA encoding a male-specific rat sulfotransferase that catalyzes activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J Biol Chem* 268, 24720-24725.
- Ogawa, K., Tsuda, H., Shirai, T., Ogiso, T., Wakabayashi, K., Dalgard, D. W., Thorgeirsson, U. P., Thorgeirsson, S. S., Adamson, R. H., and Sugimura, T. (1999). Lack of carcinogenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in cynomolgus monkeys. *Jpn J Cancer Res.* 90, 622-628.
- Otteneeder, M. and Lutz, W. K. (1999). Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat Res* 424, 237-247.

- Panalaks, T. (1976). Determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked and charcoal-broiled food products by high pressure liquid chromatography and gas chromatography. *J Environ Sci Health B* 11, 299-315.
- Pea, F. (2005). Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol.* 147, 35-46.
- Petersen, E. N. (1992). The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 369, 7-13.
- Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443, 139-147.
- Phillips, D. H. and Castegnaro, M. (1999). Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14, 301-315.
- Plapp, B. V., Leidal, K. G., Smith, R. K., and Murch, B. P. (1984). Kinetics of inhibition of ethanol metabolism in rats and the rate-limiting role of alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 230, 30-38.
- Pöschl, G. and Seitz, H. K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 39, 155-165.
- Pott, P. (1775). Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kind of ruptures, and the modification of the toes and feet. *Hawes, Clarke & Collins, London.*
- Prival, M. J., King, V. D., and Sheldon, A. T., Jr. (1979). The mutagenicity of dialkyl nitrosamines in the Salmonella plate assay. *Environ Mutagen* 1, 95-104.
- Reddy, M. V., and Randerath, K. (1986). Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1543-1551.
- Rice, J. E., Rivenson, A., Braley, J., and LaVoie, E. J. (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, 525-532.
- Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Walker, B. A., Balasubramanian, R., Wislocki, P. G., Roth, R. W., and Saugier, R. K. (1986). Mutagenicity of benzylic acetates, sulfates and bromides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Biol Interact* 58, 253-275.
- Rogge, W. F., Hildemann, L. M., Mazurek, M. A., Cass, G. R. C. I. o. T., Pasadena (United States)), and Simoneit, B. R. T. O. S. U., Corvallis (United States)) (1993). Sources of fine organic aerosol. 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-duty diesel trucks. *Environmental Science and Technology ; Vol/Issue: 27:4; DOE Project*, Pages: 636-651.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.

- Seutter-Berlage, F., Rietveld, E. C., Plate, R., and Klippert, P. J. (1981). Mercapturic acids as metabolites of aromatic aldehydes and alcohols. *Adv Exp Med Biol.* 136, 359-367.
- Sills, R. C., French, J. E., and Cunningham, M. L. (2001). New models for assessing carcinogenesis: an ongoing process. *Toxicol Lett* 120, 187-198.
- Snook, M. E., Severson, R. F., Arrendale, R. F., Higman, H. C., and Chortyk, O. T. (1978). Multi-alkylated polynuclear aromatic hydrocarbons of tobacco smoke: separation and identification. *Beiträge zur Tabakforschung International* 9, 222-247.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2007). Todesursachen in Deutschland: Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2005. Fachserie 12 Reihe 4
- Surh, Y. J. (1998). Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chem Biol Interact* 109, 221-235.
- Surh, Y. J., Liem, A., Miller, E. C., and Miller, J. A. (1989). Metabolic activation of the carcinogen 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene: formation of an electrophilic sulfuric acid ester and benzylic DNA adducts in rat liver in vivo and in reactions in vitro. *Carcinogenesis* 10, 1519-1528.
- Surh, Y. J., Blomquist, J. C., Liem, A., and Miller, J. A. (1990a). 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, 1451-1460.
- Surh, Y. J., Liem, A., Miller, E. C., and Miller, J. A. (1990b). The strong hepatocarcinogenicity of the electrophilic and mutagenic metabolite 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyrene and its formation of benzylic DNA adducts in the livers of infant male B6C3F1 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 85-91.
- Surh, Y. J., Kwon, H., and Tannenbaum, S. R. (1993). Sulfotransferase-mediated activation of 4-hydroxy- and 3,4-dihydroxy-3,4-dihydrocyclopenta[c,d]pyrene, major metabolites of cyclopenta[c,d]pyrene. *Cancer Res.* 53, 1017-1022.
- Takeda, M., Narikawa, S., Hosoyamada, M., Cha, S. H., Sekine, T., Endou, H. (2001). Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur J Pharmacol.* 419, 113-20.
- Thakker, D. R., Yagi, H., Levin, W., Wood, A. W., Conney, A. H., and Jerina, D. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolic activation to ultimate carcinogens. In: *Bioactivation of Foreign Compounds* (M. W. Anders, Ed.), pp. 177-242. Academic Press, Inc.
- Trumper, L., Monasterolo, L. A., Elias, M. M. (1998). Probenecid protects against In vivo Acetaminophen-induced nephrotoxicity in male Wistar rats. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 606-10.



- Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E., and Chambers, H. (2006). An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Ann Occup Hyg* 50, 395-403.
- van Montfoort, J. E., Hagenbuch, B., Groothuis, G. M., Koepsell, H., Meier, P. J., and Meijer, D. K. (2003). Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug Metab* 4, 185-211.
- van Zanden, J. J., Ben Hamman, O., van Iersel, M. L., Boeren, S., Cnubben, N. H., Lo Bello, M., Vervoort, J., van Bladeren, P. J., and Rietjens, I. M. (2003). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chem Biol Interact* 145, 139-148.
- van Zanden, J. J., Geraets, L., Wortelboer, H. M., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M., and Cnubben, N. H. (2004). Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 67, 1607-1617.
- van Zanden, J. J., van der Woude, H., Vaessen, J., Usta, M., Wortelboer, H. M., Cnubben, N. H., and Rietjens, I. M. (2007). The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol* 74, 345-351.
- Voigt, J. M., Kawabata, T. T., Burke, J. P., Martin, M. V., Guengerich, F. P., and Baron, J. (1990). In situ localization and distribution of xenobiotic-activating enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lungs of untreated rats. *Mol Pharmacol* 37, 182-191.
- Volkman, R. (1874). Ueber Theer- und Rußkrebs. *Berl. Klin. Wochenschr.* 11, 218.
- Watabe, T., Ishizuka, T., Ozawa, N., and Isobe, M. (1982). Conjugation of 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene (7-HMBA) with glutathione via a sulphate ester in hepatic cytosol. *Biochem Pharmacol* 31, 2542-2544.
- Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S., and Kato, R. (1994). Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem Biol Interact* 92, 107-117.
- Yourick, J. J. and Faiman, M. D. (1989). Comparative aspects of disulfiram and its metabolites in the disulfiram-ethanol reaction in the rat. *Biochem Pharmacol* 38, 413-421.
- Zhang, K. and Das, N. P. (1994). Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem Pharmacol* 47, 2063-2068.

## 8 Anhang

**Tabelle 8.1 DNA-Adduktniveaus in Geweben männlicher Wistar-Ratten nach Applikation verschiedener Metaboliten alkylierter PAK.** Jeweils drei Tiere wurden einmalig i.p. mit 250 µmol/kg KM (1-SMP: 27,8 µmol/kg KM) Testsubstanz gelöst in 500 µl DMSO behandelt und nach 3 h getötet. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

< 1 Es konnten keine DNA-Addukte nachgewiesen werden (Detektionslimit: ca. 1 Addukt/10<sup>8</sup> Nukleotide).

alk PAK-Metabolit	DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide					
	Leber	MW ± SD	Niere	MW ± SD	Lunge	MW ± SD
1-HMP	157		145		63	
	466	650 ± 607	340	591 ± 612	244	180 ± 101
	1328		1289		232	
1-SMP	304		258		29	
	553	429 ± 176	498	378 ± 170	164	97 ± 96
	*		*		*	
4-SMP	60		200		84	
	80	70 ± 14	105	153 ± 67	60	72 ± 17
	*		*		*	
1-α-HEP	2643		469		766	
	2695	2669 ± 37	633	551 ± 116	548	657 ± 154
	*		*		*	
2-α-HEP	67		11		11	
	2,6	24 ± 37	2,6	4,5 ± 5,7	< 1	3,7 ± 6,4
	3,7		< 1		< 1	
4-α-HEP	< 1		< 1		< 1	
	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	< 1		< 1		< 1	
2-α-SEP	70		83		33	
	114	95 ± 23	75	84 ± 10	53	46 ± 11
	102		95		51	
4-α-SEP	290		182		57	
	365	343 ± 47	339	332 ± 147	112	141 ± 102
	375		475		255	
6-SMBP	173		25		432	
	404	289 ± 163	33	29 ± 6	239	336 ± 137
	*		*		*	

**Tabelle 8.2 DNA-Adduktniveaus in Geweben männlicher Wistar-Ratten nach Applikation von 1,8-Dimethylpyren.** Die Substanz wurde einmalig i.p. in einer Dosierung von 250 µmol/kg KM gelöst in 500 µl DMSO appliziert und die Tiere 24 h nach Applikation getötet. < 1 Es wurden keine DNA-Addukte detektiert (Nachweisgrenze: ca. 1 Addukt / 10<sup>8</sup> Nukleotide).

	DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide		
	Leber	Niere	Lunge
Tier 1	20	5	4
Tier 2	3	11	7
Tier 3	1	< 1	5
Tier 4	2	< 1	< 1
Tier 5	3	2	< 1

**Tabelle 8.3 Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der DNA-Adduktbildung in Geweben männlicher Wistar-Ratten nach Applikation von 1-HMP oder 1-HM-8-MP.** Die Tiere wurden einmalig i.p. mit 83,3 bzw. 250 µmol/kg KM Testsubstanz gelöst in 500 µl DMSO behandelt und nach 1,5 bzw. 3 h getötet. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

Benzylischer Alkohol	DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide					
	Leber	MW ± SD	Niere	MW ± SD	Lunge	MW ± SD
1-HMP						
83,3 µmol/kg KM	229		332		56	
1,5 h	221	225 ± 6	681	507 ± 247	151	104 ± 67
1-HMP						
83,3 µmol/kg KM	17		53		19	
3 h	131	74 ± 81	310	182 ± 182	78	49 ± 42
1-HM-8-MP						
83,3 µmol/kg KM	429		212		32	
1,5 h	498	464 ± 49	43	128 ± 120	45	39 ± 9
1-HM-8-MP						
83,3 µmol/kg KM	158		100		70	
3 h	*		*		*	
1-HM-8-MP						
250 µmol/kg KM	453		113		83	
1,5 h	511	482 ± 41	137	125 ± 17	57	70 ± 18
1-HM-8-MP						
250 µmol/kg KM	132		90		77	
3 h	*		*		*	

**Tabelle 8.4 Einfluss einer Vorbehandlung mit Pentachlorphenol (PCP) bzw. Quercetin auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere 1-HMP- bzw. 1-HM-8-MP-behandelter männlicher Wistar-Ratten.** Jeweils zehn Tieren wurde 40 µmol/kg KM PCP bzw. Quercetin gelöst in Wasser (10 ml/kg KM) einmalig oral verabreicht. Nach 40 min (PCP) bzw. 1,5 h (Quercetin) wurde jeweils fünf Tieren einmalig i.p. 83,3 µmol/kg KM 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) appliziert und die Tiere nach 1,5 h getötet. Kontrolltiere erhielten nur Wasser vor Applikation der benzyllischen Alkohole. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

Benzylischer Alkohol		DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide			
		Kontrolle	PCP	Quercetin	
1-HMP	Leber	687	267	823	
		547	111	578	
		991	130	2002	
		1086	173	1141	
		755	*	*	
		Mittelwert ± SD	813 ± 221	170 ± 70	1136 ± 622
	Niere	851	341	1288	
		1245	417	619	
		719	208	1394	
		568	338	621	
		1629	*	*	
		Mittelwert ± SD	1002 ± 431	326 ± 87	981 ± 419
	1-HM-8-MP	Leber	184	321	222
			484	737	893
2134			475	785	
1251			388	1190	
969			*	104	
Mittelwert ± SD			1004 ± 755	480 ± 182	639 ± 461
Niere		98	64	75	
		94	80	193	
		406	44	88	
		97	48	83	
		73	*	12	
		Mittelwert ± SD	154 ± 142	59 ± 17	90 ± 65

**Tabelle 8.5 Einfluss einer Vorbehandlung mit 4-Methylpyrazol bzw. Ethanol auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere 1-HM-8-MP-behandelter männlicher Wistar-Ratten.** Jeweils fünf Tieren wurde 1 mmol/kg KM 4-Methylpyrazol bzw. 35 mmol/kg KM Ethanol gelöst in Wasser (10 ml/kg KM) einmalig oral verabreicht. Nach 10 min wurde den Tieren einmalig i.p. 83,3 µmol/kg KM 1-HM-8-MP gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) appliziert und die Tiere nach 1,5 h getötet. Kontrolltiere erhielten nur Wasser vor Applikation des benzyllischen Alkohols. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

Benzyllischer Alkohol		DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide		
		Kontrolle	4-Methylpyrazol	Ethanol
1-HM-8-MP	Leber	184	4334	1290
		484	5198	5561
		2134	1481	2442
		1251	3086	2899
		969	1841	*
	Mittelwert ± SD	1004 ± 755	3188 ± 1588	3048 ± 1807
	Niere	98	655	161
		94	208	143
		406	422	251
		97	194	330
73		94	*	
Mittelwert ± SD	154 ± 142	315 ± 225	221 ± 87	

**Tabelle 8.6 Einfluss einer Vorbehandlung mit Disulfiram auf das DNA-Adduktniveau in Leber und Niere 1-HM-8-MP-behandelter männlicher Wistar-Ratten.** Fünf Tieren wurde 0,25 mmol/kg KM Disulfiram gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) einmalig i.p. verabreicht. Nach 16 h wurde den Tieren einmalig i.p. 83,3 µmol/kg KM 1-HM-8-MP gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) appliziert und die Tiere nach 1,5 h getötet. Kontrolltiere erhielten nur DMSO vor Applikation des benzyliischen Alkohols. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

Benzyliischer Alkohol		DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide	
		Kontrolle	Disulfiram
1-HM-8-MP	Leber	2756	1889
		919	2748
		520	1796
		*	*
		*	*
	Mittelwert ± SD	1398 ± 1193	2144 ± 525
	Niere	398	236
		282	348
		82	375
		*	*
*		*	
Mittelwert ± SD	254 ± 160	320 ± 74	

**Tabelle 8.7 Einfluss einer Vorbehandlung mit Probenecid auf das DNA-Adduktniveau in Leber, Niere und Lunge 1-HMP-behandelter männlicher Wistar-Ratten.** Fünf Tieren wurde 0,7 mmol/kg KM Probenecid gelöst in 0,9% NaCl (10 ml/kg KM) einmalig i.p. verabreicht. Nach 30 min wurde den Tieren einmalig i.p. 83,3 µmol/kg KM 1-HMP gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) appliziert und die Tiere nach 1,5 h getötet. Kontrolltiere erhielten nur 0,9% NaCl vor Applikation des benzyliischen Alkohols. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

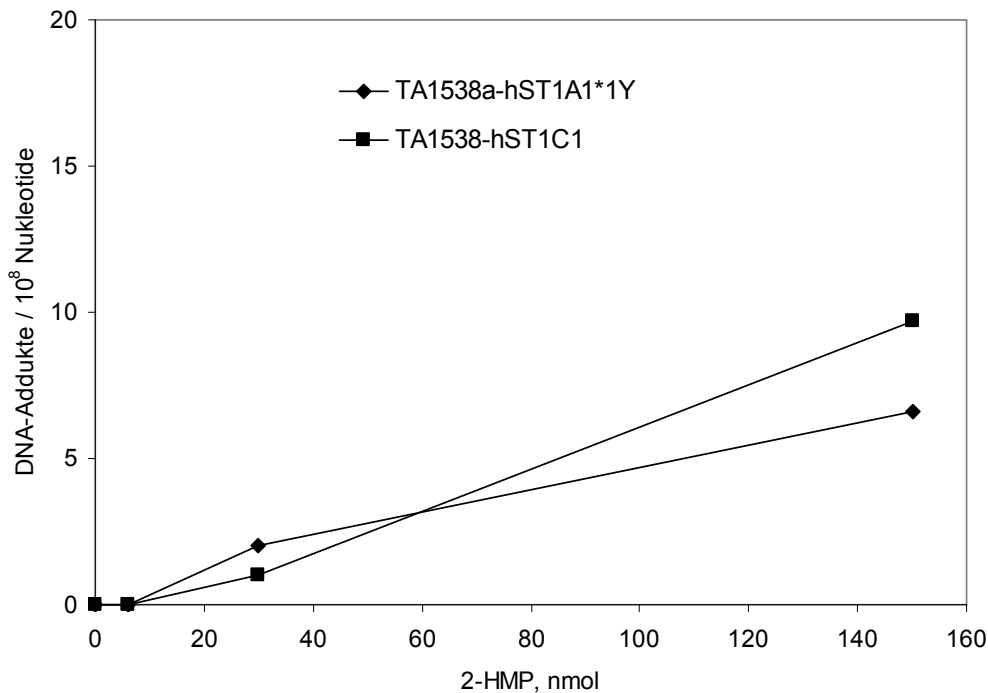
Benzyliischer Alkohol		DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide	
		Kontrolle	Probenecid
1-HMP	Leber	211	3291
		591	3928
		357	1310
		515	*
		*	*
	Mittelwert ± SD	419 ± 169	2843 ± 1365
	Niere	233	220
		388	293
		205	61
		503	*
		*	*
	Mittelwert ± SD	332 ± 139	191 ± 119
Lunge	76	319	
	157	360	
	71	48	
	168	*	
	*	*	
Mittelwert ± SD	118 ± 52	242 ± 170	

**Tabelle 8.8 Einfluss einer Vorbehandlung mit Probenecid auf das DNA-Adduktniveau in Leber, Niere und Lunge 1-HM-8-MP-behandelter männlicher Wistar-Ratten.** Fünf Tieren wurde 0,7 mmol/kg KM Probenecid gelöst in 0,9% NaCl (10 ml/kg KM) einmalig i.p. verabreicht. Nach 30 min wurde den Tieren einmalig i.p. 83,3 µmol/kg KM 1-HM-8-MP gelöst in DMSO (2,5 ml/kg KM) appliziert und die Tiere nach 1,5 h getötet. Kontrolltiere erhielten nur 0,9% NaCl vor Applikation des benzyllischen Alkohols. Jeder Wert repräsentiert ein Tier.

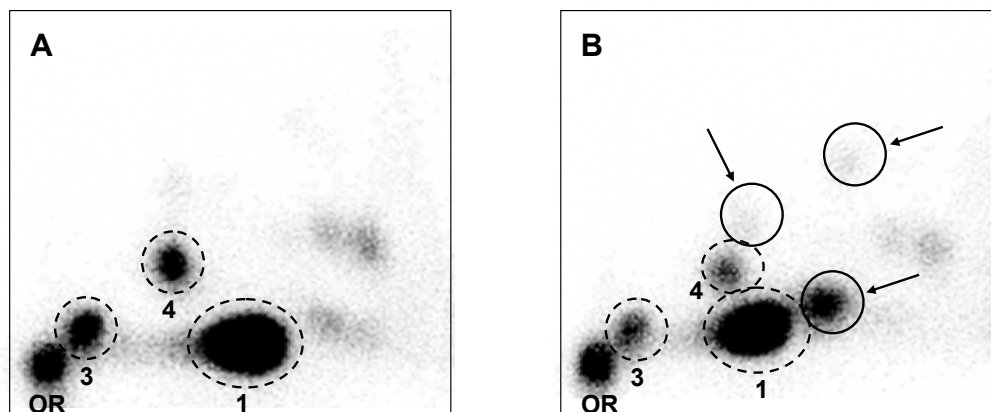
\* Tier wurde aufgrund Fehlapplikation von der Untersuchung ausgeschlossen.

Benzyllischer Alkohol		DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide	
		Kontrolle	Probenecid
1-HM-8-MP	Leber	820	4596
		890	6478
		867	917
		*	*
		*	*
	Mittelwert ± SD	859 ± 36	3997 ± 2829
	Niere	185	142
		167	287
		181	123
		*	*
*		*	
Mittelwert ± SD	178 ± 10	184 ± 90	
Lunge	61	196	
	121	295	
	77	70	
	*	*	
	*	*	
Mittelwert ± SD	86 ± 31	187 ± 113	



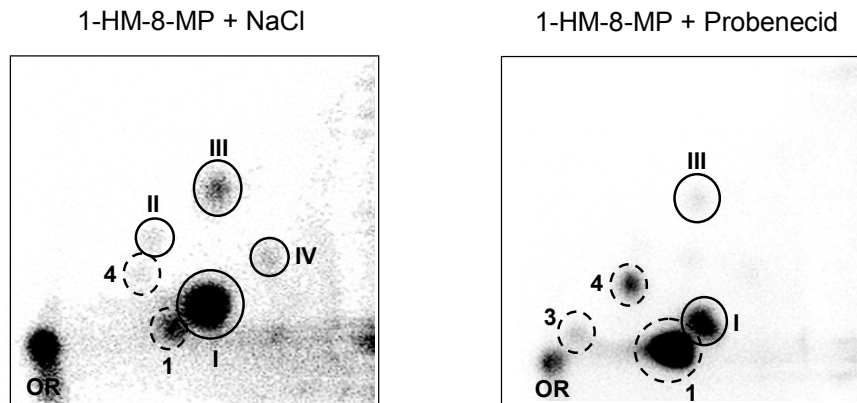


**Abbildung 8.1 DNA-Adduktniveau in humane SULT exprimierenden *S. typhimurium* nach Inkubation mit 2-HMP.** Bakteriensuspension und 2-HMP (gelöst in DMSO) wurden in 100 mM MgSO<sub>4</sub> wie unter 3.2.2 beschrieben für 60 min bei 37°C inkubiert. Die bakterielle DNA wurde isoliert und jeweils 5 µg zur DNA-Adduktanalyse mittels <sup>32</sup>P-Postlabelling eingesetzt (siehe 3.2.5).



**Abbildung 8.2 DNA-Adduktmuster nach Inkubation von 1-HM-8-MP mit Heringsperma-DNA und Rattenleber-S9 (+ PAPS) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) eines für CYP-Aktivität notwendigen NADPH-generierenden Systems.** 20 µM 1-HM-8-MP wurden mit 500 µg Heringsperma-DNA, gelöst in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer, sowie MgCl<sub>2</sub>, PAPS, S9-Fraktion aus unbehandelten männlichen Wistar-Ratten ohne (A) bzw. mit (B) einem NADPH-generierenden System (Glucose-6-Phosphat + NADP) für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach DNA-Isolierung wurden jeweils 5 µg DNA zum <sup>32</sup>P-Postlabelling eingesetzt und mit <sup>32</sup>P markierte DNA-Addukte mittels multidirektionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe 3.2.5). OR kennzeichnet den Auftragspunkt auf der DC-Karte. Unterbrochene Kreise kennzeichnen typische Adduktstellen des *in vitro*-Adduktmodus des authentischen Sulfates 1-SM-8-MP. Durchgezogene Kreise und Pfeile kennzeichnen Adduktstellen des *in vivo*-Adduktmodus des 1-HM-8-MP, die keinem Fleck des *in vitro*-Adduktmodus zugeordnet werden konnten.

**Tabelle 8.9 Anteil einzelner Adduktstellen der DNA-Adduktmuster in Geweben von männlichen Wistar-Ratten, die mit 1-HM-8-MP und NaCl (Kontrolle) bzw. 1-HM-8-MP und Probenecid behandelt wurden, an der Gesamtaktivität auf dem Chromatogramm.** Die Behandlung der Tiere erfolgte wie in Tabelle 8.8 beschrieben. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der drei auswertbaren Tiere (jeweils zwei Tiere in Kontroll- und Behandlungsgruppe mussten aufgrund Fehlapplikation von der Auswertung ausgeschlossen werden).



	Adduktstelle	Anteil Adduktstelle an der Gesamtaktivität % [DNA-Addukte / 10 <sup>8</sup> Nukleotide]	
		Leber	Niere
1-HM-8-MP + NaCl	1	8 [70]	15 [25]
	3	-	-
	4	0,5	0,5
	I	82 [790]	77 [130]
	II	1	1
	III	6	4
	IV	2,5	2,5
1-HM-8-MP + Probenecid	1	75 [3100]	85 [160]
	3	1	2
	4	3	4
	I	20 [760]	8,5 [15]
	II	-	-
	III	1	0,5
	IV	-	-

## Publikationen

### Artikel in Fachzeitschriften

Meinl, W., Donath, C., Schneider, H., Sommer, Y. and Glatt, H. (2008). SULT1C3, an orphan sequence of the human genome, encodes an enzyme activating various promutagens. *Food Chem Toxicol.* 46, 1249-56.

### Tagungsbeiträge

L. Ma, H. Hollnagel, C. Langheinrich, M. Stephani, R. Kollock, A. Seidel, H. R. Glatt (2005). Co-administration of ethanol or an alcohol dehydrogenase inhibitor dramatically enhances the DNA adduct formation by 1-hydroxymethylpyrene in the rat *in vivo*. 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco (USA).

C. Donath, H. R. Glatt (2006). Organ-spezifische DNA-Addukte. 22. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM), Darmstadt.

C. Donath, M. Stephani, A. Seidel and H. R. Glatt (2006). Influence of metabolic modifiers on the DNA adduct formation by 1-hydroxymethylpyrene and 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene in the rat. 6. GUM-<sup>32</sup>P-Postlabelling Workshop, Heidelberg. In: *European Journal of Genetic and Molecular Toxicology*, November 2006.

C. Donath, A. Seidel and H. R. Glatt (2007). Influence of probenecid on DNA adduct formation by 1-hydroxymethylpyrene and 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene in the rat. 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 375 (Suppl 1), 410.

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Claudia Donath, geb. Langheinrich  
Geburtsdatum: 15.06.1979  
Geburtsort: Bernburg/Saale

### **Schulische Ausbildung**

09/1986 – 07/1990      Grundschule Könnern  
09/1990 – 07/1991      Polytechnische Oberschule Hans-Beimler Könnern  
09/1991 – 07/1998      Gymnasium Carolinum Bernburg  
Abschluss: Abitur

### **Universitäre Ausbildung**

10/1998 – 10/2003      Studium der Ernährungswissenschaft  
Universität Potsdam  
  
09/2002 – 10/2003      Anfertigung Diplomarbeit in der Abteilung  
Ernährungstoxikologie des Institutes für  
Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam  
Thema: Untersuchungen zur Inhibierung von p53 in intestinalen  
Rattenepithelzellen (IEC-18)  
Abschluss: Diplom  
  
01/2004 – 06/2007      Anfertigung Dissertation in der Abteilung Ernährungstoxikologie  
des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung Potsdam-  
Rehbrücke

### **Berufliche Tätigkeit**

seit 07/2007              Prüfleiterin für den Bereich *in vitro* Genotoxizität in der  
Abteilung „*in vitro* Pharmakologie/Toxikologie“ bei BSL  
Bioservice Scientific Laboratories GmbH Planegg/München

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt dafür bedanken, dass er mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichte und diese wissenschaftlich betreute, mir Gelegenheit gab, die Ergebnisse vielerorts zu präsentieren und meine Weiterbildung auf toxikologischem Gebiet unterstützte.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Nadiya Bakhiya und Dr. Yasmin Sommer für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die vielen hilfreichen Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank geht ebenso an meine Projektpartnerin Dr. Monika Batke für die jahrelange gute Zusammenarbeit und die vielen produktiven, anregenden Diskussionen. Ebenso möchte ich mich auch bei Korinna Wend und Gila Dobbernack für die schöne Bürogemeinschaft und die immerwährende Unterstützung inner- und außerhalb des Labors und bei meinen weiteren Mitstreitern Dr. Mandy Osterloh-Quiroz, Dr. Ronny Kollock, Chimgee Baasanjav-Gerber und Dr. Yasmin Sommer für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Christine Gumz für die vielen Besuche im Isotopenlabor, Andrea Katschak und Elisabeth Meyer für die Durchführung zahlreicher Ames-Tests, Sabine Braune für die Unterstützung bei den Tierversuchen und Martina Scholtyssek für die viele Arbeit mit DNA-Isolierung übermitteln sowie allen Mitarbeitern der Abteilung Ernährungstoxikologie dafür danken, dass sie eine so angenehme Arbeitsatmosphäre schufen.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an die Mitarbeiter des Max-Rubner-Laboratoriums des DIfE insbesondere an Elke Thom für die kompetente Betreuung der Tiere und Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Ehemann Enrico Donath und meinen Eltern Petra und Wolfgang Langheinrich dafür, dass sie mich stets unterstützten und aufmunterten und immer fest an mich glaubten und glauben.