

**Stabile Expression von Sulfotransferasen
– allein oder in Kombination mit Cytochrom P450 –
in Zelllinien für Mutagenitätsuntersuchungen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von

Ulrike Pabel
aus Bonn

Berlin, Mai 2003

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| A | EINLEITUNG | 1 |
| 1. | Systeme für Gentoxizitätsuntersuchungen <i>in vitro</i> | 1 |
| 1.1 | Kanzerogenese und Gentoxizität | 1 |
| 1.2 | Komponenten von Gentoxizitätstests | 6 |
| 1.2.1 | Endpunkte in der Gentoxizitätsprüfung | 6 |
| 1.2.2 | Indikatorzellen für die Gentoxizitätsprüfung | 7 |
| 1.2.3 | Metabolisierungssysteme in der Gentoxizitätsprüfung | 8 |
| 1.3 | Korrelation Gentoxizität / Kanzerogenität | 10 |
| 1.4 | Rekombinante Systeme für die Gentoxizitätsprüfung | 10 |
| 2. | Sulfotransferasen | 11 |
| 3. | Aromatische Amine und Amide | 16 |
| 4. | Zielstellung | 23 |
| B | MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 1. | Material | 25 |
| 1.1 | Geräte | 25 |
| 1.2 | Einwegmaterial | 25 |
| 1.3 | Chemikalien, Medien und Fertiglösungen | 26 |
| 1.4 | Antiseren und Proteinstandards | 27 |
| 1.5 | Enzyme | 28 |
| 1.6 | Plasmide | 28 |
| 1.7 | Oligonukleotide | 28 |
| 1.8 | Biologisches Material | 28 |
| 2. | Methoden | 29 |
| 2.1 | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 2.1.1 | Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren | 29 |
| 2.1.2 | Elektrophorese von Nukleinsäuren | 29 |
| 2.1.3 | Polymerasekettenreaktion | 30 |
| 2.1.4 | Restriktionsverdau | 30 |
| 2.1.5 | Ligation | 30 |
| 2.1.6 | Transformation von <i>E. coli</i> | 31 |
| 2.1.7 | Überprüfung der SULT-Sequenz in V79-Zellen | 31 |
| 2.1.8 | DNA-Sequenzierung | 31 |
| 2.1.9 | Konstruktion von pMPSV-hSULT1E1 | 32 |
| 2.1.10 | Konstruktion von pMPSV-hSULT1A1*1 | 32 |
| 2.1.11 | Konstruktion von pMPSV-hSULT1A1*V | 32 |
| 2.2 | Zellbiologische Methoden | 33 |
| 2.2.1 | Kulturbedingungen | 33 |
| 2.2.2 | Subkultivierung | 33 |
| 2.2.3 | Kryokonservierung von Zellen | 34 |
| 2.2.4 | Transfektion der SULT in V79-Zellen | 34 |
| 2.2.5 | Überprüfung der Stabilität der SULT-Expression | 35 |
| 2.2.6 | Untersuchung der Abhängigkeit der SULT-Expression von der Kulturdauer .. | 35 |
| 2.2.7 | Wachstumskurven | 36 |
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden | 36 |
| 2.3.1 | Herstellung subzellulärer Fraktionen aus V79-Zellen | 36 |
| 2.3.2 | Proteinbestimmung | 36 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.3 | Spaltung des Fusionsproteins mbp-hSULT1E1 | 37 |
| 2.3.4 | Messung der SULT-Aktivität | 37 |
| 2.3.4.1 | Radioaktiv markiertes Kosubstrat | 37 |
| 2.3.4.2 | Radioaktiv markierte Substrate | 38 |
| 2.3.5 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 39 |
| 2.3.6 | Western-Blot und Immundetektion | 39 |
| 2.4 | Toxikologische Testmethode | 40 |
| 2.4.1 | Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Genmutationstest | 40 |
| C | ERGEBNISSE | 43 |
| 1. | Konstruktion SULT-profizienter Zelllinien | 43 |
| 1.1 | Konstruktion der pMPSV-SULT-Expressionsvektoren | 43 |
| 1.2 | Transfektion in V79-Zellen und Selektion SULT-positiver Klone | 45 |
| 2. | Charakterisierung der gentechnisch veränderten Zelllinien | 48 |
| 2.1 | Basensequenz der SULT in genomischer DNA der V79-SULT-Zellen | 48 |
| 2.2 | Wachstumseigenschaften | 48 |
| 2.3 | Charakterisierung der SULT- und CYP-Expression | 51 |
| 2.3.1 | Expressionsniveau in V79-SULT-Zellen | 51 |
| 2.3.1.1 | Cytosolische Sulfotransferase-Aktivität gegenüber Standardsubstraten | 51 |
| 2.3.1.2 | Immunblotanalyse der SULT-Expression | 55 |
| 2.3.2 | SULT- und CYP-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer | 60 |
| 2.3.2.1 | SULT-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer | 60 |
| 2.3.2.2 | CYP-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer | 63 |
| 2.3.3 | Stabilität der SULT- und CYP-Expression | 65 |
| 2.3.3.1 | Stabilität der SULT-Expression | 65 |
| 2.3.3.2 | Stabilität der CYP-Expression | 67 |
| 2.3.4 | Einfluss von HAT-Medium | 69 |
| 2.3.4.1 | Wachstumsverhalten unter dem Einfluss von HAT-Medium | 70 |
| 2.3.4.2 | Einfluss von HAT-Supplement auf die SULT- und CYP-Expression | 72 |
| 3. | Mutagenitätsexperimente | 73 |
| 3.1 | Benzyliche Alkohole | 74 |
| 3.1.1 | Mutagenität von 1-Hydroxymethylpyren | 74 |
| 3.1.1.1 | Kontrollzelllinien | 74 |
| 3.1.1.2 | V79-hSULT1A1-Zellen | 74 |
| 3.1.1.3 | V79-hSULT1E1-Zellen | 74 |
| 3.1.2 | Mutagenität von 1-Hydroxyethylpyren | 76 |
| 3.2 | Mutagenität von 2-Nitropropan | 77 |
| 3.3 | Aromatische Amine und Amide | 80 |
| 3.3.1 | Einfluss der aAA auf die SULT-Aktivität | 81 |
| 3.3.2 | Mutagenität von 2-AAF | 83 |
| 3.3.2.1 | Kontrollzelllinien | 83 |
| 3.3.2.2 | V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen | 83 |
| 3.3.2.3 | V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen | 85 |
| 3.3.3 | Mutagenität von 2-Aminoanthracen | 87 |
| 3.3.3.1 | Kontrollzelllinien | 87 |
| 3.3.3.2 | V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen | 88 |
| 3.3.3.3 | V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen | 89 |
| 3.3.4 | Mutagenität von 3'-M-DAB | 90 |
| 3.3.4.1 | Kontrollzelllinien | 90 |
| 3.3.4.2 | V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen | 90 |
| 3.3.4.3 | V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen | 93 |
| 3.3.5 | Mutagenität von 2,4-TDA | 93 |
| 3.3.5.1 | Kontrollzelllinien | 93 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.3.5.2 | V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen | 93 |
| 3.3.5.3 | V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen | 95 |
| D | DISKUSSION | 96 |
| 1. | SULT-exprimierende V79-Zelllinien als Testsystem..... | 96 |
| 2. | Aktivierung benzylischer Alkohole und des 2-Nitropropan in V79-SULT-Zelllinien..... | 97 |
| 3. | Aktivierung aromatischer Amine in V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien im Vergleich zu anderen Testsystemen | 101 |
| 3.1 | 2-AAF | 101 |
| 3.2 | 2-Aminoanthracen | 105 |
| 3.3 | 3'-M-DAB | 106 |
| 3.4 | 2,4-TDA | 107 |
| 4. | Reproduzierbarkeit der Mutagenitätsexperimente | 108 |
| 5. | Aktivierungspotenzial der untersuchten allelischen Varianten von hSULT1A1 und hSULT1A2 | 109 |
| 6. | Einsatzmöglichkeiten der V79-hSULT-Zelllinien | 111 |
| E | ZUSAMMENFASSUNG..... | 113 |
| F | LITERATUR | 116 |
| G | ANHANG | 140 |
| 1. | Abkürzungen | 140 |
| 2. | Veröffentlichungen | 142 |
| 2.1 | Artikel in Fachzeitschriften | 142 |
| 2.2 | Abstracts von Tagungsbeiträgen | 143 |

A Einleitung

1. Systeme für Gentoxizitätsuntersuchungen *in vitro*

1.1 Kanzerogenese und Gentoxizität

Fremdstoffen und ihren reaktiven Metaboliten wird eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von Krebserkrankungen zugeschrieben. Die Aufklärung der individuellen Ursachen von Krebserkrankungen ist bis heute jedoch nur in wenigen Fällen gelungen. Das gilt auch für die Krebsauslösung durch die Substanzgruppe der aromatischen Amide und Amine (aAA). Viele von ihnen haben sich in Tierversuchen als kanzerogen erwiesen. Die Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen ist aber aufgrund von Unterschieden in den Ingestionswegen, der Dauer und der Höhe der Exposition und vor allem der Metabolisierung der potenziell schädlichen Stoffe limitiert. Obwohl aAA in der anthropogenen Umwelt weit verbreitet sind und von einer alltäglichen Exposition auszugehen ist (Grimmer *et al.*, 2000), konnte ihre kanzerogene Wirkung für den Menschen nur bei wenigen Substanzen aufgrund epidemiologischer Studien nachgewiesen werden. In diesen Fällen erfolgte eine berufsbedingte Exposition gegenüber definierten Arylaminen (Tabelle 1). Dadurch konnte die Exposition gegenüber 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl, Benzidin, und *N,N*-Bis(2-chlorethyl)-2-naphthylamin mit einem erhöhten Risiko für Blasenkrebs in Zusammenhang gebracht werden (IARC, 1987a). Als wahrscheinlich humankanzerogen (Einstufung durch die IARC in Gruppe 2A) oder möglicherweise humankanzerogen (Gruppe 2B) wird eine beträchtliche Zahl von aAA klassifiziert (Tabelle 1), bei denen nur begrenzt Hinweise (Gruppe 2A) oder keine Daten (Gruppe 2B) bezüglich des humankanzerogenen Potenzials vorliegen, und die Kanzerogenität im Versuchstier als ausreichend nachgewiesen gilt. Für die überwiegende Zahl der aAA ist keine Beurteilung ihres kanzerogenen Potenzials für den Menschen möglich (Einstufung durch die IARC in Gruppe 3; Datenlage im Bezug auf die Kanzerogenität für den Menschen ist unzureichend / für Versuchstiere unzureichend oder eingeschränkt) (Tabelle 1). Diese lückenhafte Informationslage hängt mit der Vielfalt der Expositionsquellen für den Menschen (Arbeitsplatz, Ernährung, Tabak, Medikamente, Luft- und Wasserverunreinigung) und der Tatsache zusammen, dass die Exposition fast immer gegenüber Stoffgemischen erfolgt. Zudem wird die Krebsentstehung durch viele Faktoren, wie die genetische Disposition, Hormone sowie Ernährungs- und Rauchgewohnheiten, beeinflusst (Doll und Peto, 1981). Nach dem heutigen Verständnis ist die Kanzerogenese

ein mehrstufiger Prozess (Barrett, 1993). Nach dieser Theorie durchlaufen Zellen bis zur Entwicklung eines bösartigen Tumors mehrere Stadien, wobei nicht nur die auslösenden Faktoren für einzelne Stadien unterschiedlich sein können, sondern auch mehrere Ereignisse zur Auslösung eines Fortschrittes der Tumorentwicklung nötig sind. Aus diesen Gründen ist es nur selten möglich, Tumoren aufgrund retrospektiver epidemiologischer Studien auf eine eindeutige Schadensquelle zurückzuführen. Schwache Kanzerogene, die einen ohnehin häufigen Tumor auslösen, sind auch bei weit gestreuter Exposition auf epidemiologischem Weg nicht zu ermitteln.

Darüber hinaus wird die Zurückführung eines Tumors auf seine auslösenden Faktoren durch die lange Latenzzeit der Krebserkrankungen erschwert. Zur Aufklärung der Fähigkeit einer Substanz, Krebs auszulösen, haben sich deswegen Methoden durchgesetzt, bei denen anstelle des Auftretens von Tumoren frühe Ereignisse in der Entstehung von Krebs, die auch *in vitro* nachweisbar sind, untersucht werden. Es sind schädigende Wirkungen auf die DNA, die, wenn sie zu vererbaren DNA-Veränderungen führen, für die fremdstoffinduzierte Tumoringenieurung verantwortlich sind (Burdette, 1955; Shelby, 1988). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, Substanzen auf diese als gentoxisch bezeichneten schädigenden Einflüsse hin zu untersuchen und daraus Rückschlüsse auf ihr kanzerogenes Potenzial zu ziehen. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Kurzeittests für die Erfassung von Gentoxizität entwickelt. Wichtige Komponenten dieser Tests sind die untersuchten Endpunkte der gentoxischen Wirkung sowie die eingesetzten Indikatorzellen und Metabolisierungssysteme.

Tabelle 1: Einstufung von aAA durch die IARC

Die Informationen sind aus den Monographien der IARC entnommen (<http://monographs.iarc.fr/monoeval/allmonos.de>).

| Substanz | Gruppe | Mutagenität | | Kanzerogenität (nur positive Ergebnisse) | | |
|---|--------|----------------|--------------|---|-------------------|--------------|
| | | Bakterien | Säugerzellen | Mensch | Ratte | Maus |
| 4-Aminobiphenyl | 1 | + | + | B | Br, I | HS, L, B, v |
| Benzidin | 1 | + | k. D. | B | Br, Z | L |
| <i>N,N</i> -Bis(2-chlorethyl)-2-naphthylamin (Chlornaphazin) | 1 | + | + | B | lok Sark | Lu |
| 2-Naphthylamin | 1 | + | +/- | B | B | L, Lu |
| 4-Chlor- <i>ortho</i> -toluidin | 2A | +/- | k. D. | (B) | - | Hs |
| IQ | 2A | + | + | (I, V) | I, Z, L, H, K, Br | L, Lu, I |
| MOCA | 2A | + | + | (B) | L, Lu, Br, Z | L |
| <i>ortho</i> -Toluidin | 2A | +/- | +/- | (B) | v, B, Br | L, Hs |
| AαC | 2B | + | + | k. D. | k. D. | L |
| 4-Aminoazobenzol | 2B | + ^a | k. D. | k. D. | L, H | L |
| <i>ortho</i> -Aminoazotoluol | 2B | + ^a | k. D. | k. D. | L, Gb, Lu, B | L, Gb, Lu, B |
| <i>ortho</i> -Anisidin | 2B | - | + | k. D. | B | B |
| Auramin | 2B | + | k. D. | k. D. | lok Sark, L | L |
| <i>para</i> -Chloranilin | 2B | - | + | k. D. | M | HS, L |
| 4-Chlor- <i>ortho</i> -phenylendiamin | 2B | + | k. D. | k. D. | B | L |
| <i>N,N'</i> -Diacetylbenzidin | 2B | k. D. | k. D. | k. D. | Br, O, L | k. D. |
| 2,4-Diaminoanisol | 2B | + | - | k. D. | S, H, K, Z, Pr | S |
| 4,4'-Diaminodiphenylether | 2B | + | k. D. | k. D. | S, L | L, HD |

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 1

| Substanz | Gruppe | Mutagenität | | Kanzerogenität | | |
|--|--------|-------------|--------------|----------------|--------------------|-------------|
| | | Bakterien | Säugerzellen | Mensch | Ratte | Maus |
| 2,6-Diamino-3-(phenylazo)pyridin | 2B | - | k. D. | k. D. | I | L |
| 2,4-Diaminotoluol | 2B | + | k. D. | k. D. | L, lok Sark | k. D. |
| 3,3-Dichlorbenzidin | 2B | + | k. D. | k. D. | Br, Z, Leuk | L, Leuk |
| 3,3'-Dimethylbenzidin (<i>ortho</i> -Tolidin) | 2B | k. D. | k. D. | k. D. | v | k. D. |
| 3,3'-Dimethoxybenzidin (<i>ortho</i> -Dianisid) | 2B | + | k. D. | k. D. | B, Z, H, I, v | k. D. |
| 4-Dimethylaminoazobenzol | 2B | +/- | k. D. | k. D. | L, H | L, Lu |
| 2,6-Dimethylanilin (Xylidin) | 2B | - | + | k. D. | Na | k. D. |
| Glu-P-1 | 2B | + | + | k. D. | L, I, Z, K | L, HS |
| Glu-P-2 | 2B | + | + | k. D. | L, I, Z, K | I, HS |
| MeAcC | 2B | + | k. D. | k. D. | k. D. | HS |
| MeIQ | 2B | +/- | +/- | k. D. | Z, H, Mu, Br, I, v | I, L |
| MeIQx | 2B | +/- | +/- | k. D. | K, Z, H, L | L, Lu, Leuk |
| 4,4'-Methylenbis(2-methylanilin) | 2B | k. D. | k. D. | k. D. | L | k. D. |
| 4,4'-Methyldianilin | 2B | + | k. D. | k. D. | S | S, L |
| PhIP | 2B | + | + | k. D. | Br, I | Ly |
| 4,4'-Thiodianilin | 2B | + | k. D. | k. D. | L, S, O, U | L, S |
| Trp-P-1 | 2B | + | k. D. | k. D. | lok Sark | L |
| Trp-P-2 | 2B | + | + | k. D. | L | L |
| 1-Amino-2-methylantrachinon | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | L, N | k. D. |
| 4-Amino-2-nitrophenol | 3 | +/- | + | k. D. | k. D. | k. D. |
| 2-Amino-4-nitrophenol | 3 | + | + | k. D. | - | - |
| 2-Amino-5-nitrophenol | 3 | + | + | k. D. | P | - |

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 1

| Substanz | Gruppe | Mutagenität | | Kanzerogenität | | |
|---|--------|----------------|-------------------|----------------|-----------------------|-----------------|
| | | Bakterien | Säuger -zellen | Mensch | Ratte | Maus |
| 5-Aminoacenaphthen | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | B, Leuk |
| 2-Aminoanthrachinon | 3 | - | k. D. | k. D. | L | L |
| <i>para</i> -Aminobenzoessäure | 3 | - | k. D. | k. D. | k. D. | - ^c |
| Anilin | 3 | - | k. D. | k. D. | HS, M | - |
| <i>para</i> -Anisidin | 3 | - | k. D. | k. D. | k. D. | - |
| 4-Chlor- <i>meta</i> -phenylendiamin | 3 | k. D. | k.D. | k. D. | - | k. D. |
| 5-Chlor- <i>ortho</i> -toluidin | 3 | - | k. D. | k. D. | - | HS, L |
| Cinnamylanthranilat | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | Lu |
| <i>meta</i> -Cresidin | 3 | - | k. D. | k. D. | B | k. D. |
| <i>para</i> -Cresidin | 3 | + | k. D. | k. D. | B, Na, L | B, Na, L |
| Diacetylaminoazotoluol | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 1,4-Diamino-2-nitrobenzol | 3 | + | + ^b | k. D. | - | L |
| 1,2-Diamino-4-nitrobenzol | 3 | + ^b | + | k. D. | k. D. | k. D. |
| 2,5-Diaminotoluol | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 2,6-Dichlor-phenylendiamin | 3 | + | k. D. | k. D. | - | L |
| 2,4-Dimethylanilin (2,4-Xylidin) | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| <i>N,N</i> -Dimethylanilin | 3 | - | + | k. D. | M | k. D. |
| 2,4'-Diphenyldiamin | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 4,4'-Methylen-bis-(<i>N,N</i> -dimethyl)benzamin | 3 | + | k. D. | k. D. | S | L |
| <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -4-dinitrosoanilin | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 1,5-Naphthalindiamin | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | S, Lu, L |
| 1-Naphthylamin | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 5-Nitro- <i>ortho</i> -anisidin | 3 | + | k. D. | k. D. | H, Z, Br, K, O, Pr | k. D. |
| 5-Nitro- <i>ortho</i> -toluidin | 3 | + | k. D. | k. D. | L | L |
| <i>N</i> -Nitroso-diphenylamin | 3 | - | - | k. D. | +/-, B | - |
| <i>para</i> -Nitroso-diphenylamin | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | +/- | k. D. |
| <i>N</i> -Phenyl-2-naphthylamin | 3 | - | k. D. | k. D. | +/- | L, N, HS, Lu |
| <i>meta</i> -Phenylendiamin | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| <i>para</i> -Phenylendiamin | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 1

| Substanz | Gruppe | Mutagenität | | Kanzerogenität | | |
|------------------------------|--------|-------------|---------------|----------------|-------|-------|
| | | Bakterien | Säuger-zellen | Mensch | Ratte | Maus |
| Pyrimethamin | 3 | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. | Lu |
| 2,2',5,5'-Tetrachlorbenzidin | 3 | + | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |
| 2,4,5-Trimethylanilin | 3 | + | k. D. | k. D. | L, Lu | L |
| 2,4,6-Trimethylanilin | 3 | - | k. D. | k. D. | k. D. | k. D. |

^a unreine Substanz (im bakteriellen Mutagenitätstest geprüft)

^b negativ bei der Zugabe externer Metabolisierungssysteme

^c nach Hautapplikation

Gruppe 1: kanzerogen für den Menschen

Gruppe 2A: wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen

Gruppe 2B: möglicherweise kanzerogen für den Menschen

Gruppe 3: nicht klassifizierbar in Bezug auf die Kanzerogenität für den Menschen

k. D.: keine Daten in den Monographien der IARC oder Daten inadäquat für die Evaluierung

+, positiv; -, negativ, (), geringer oder unklarer Effekt; +/-, sowohl positive als auch negative Ergebnisse (lagen stark überwiegend positive oder negative Ergebnisse vor, wurden nur diese aufgeführt)

B, Harnblase; Br, Brustdrüse; G, Gehirn; Gb, Gallenblase; H, Haut; HD, Hardersche Drüse; HS, Hämangiosarkom; I, Intestinaltrakt; K, Klitoris; L, Leber; Leuk, Leukämie; Lu, Lunge; lok Sark, lokale Sarkome; Ly, Lymphknoten; M, Milz; Mu, Mundhöhle; N, Niere; Na, Nasenhöhle; O, Gehörgang; P, Pankreas; Pr, Präputialdrüse; S, Schilddrüse; sc, subcutane Tumoren; U, Uterus; v, verschiedene Tumoren; Z, Zymbaldrüse

A α C, 2-Amino-9-*H*-pyrido[2,3-*b*]indole; IQ, 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinolin; Glu-P-1, 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol; Glu-P-2, 2-Aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol; MeA α C, 2-Amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indol; MeIQ, 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinolin; MeIQx, 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxalin; MOCA, 4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin); PhIP, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin;

Trp-P-1, 3-Amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol; Trp-P-2, 3-Amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol

1.2 Komponenten von Gentoxizitätstests

1.2.1 Endpunkte in der Gentoxizitätsprüfung

Zu den Endpunkten gentoxischer Wirkungen, die *in vitro* prüfbar sind, gehören Genmutationen (Prüfung auf biochemische oder zellphysiologische vererbare Funktionsänderungen, die nachweislich die Folge von Mutationen in bestimmten Genen sind) (Ames *et al.*, 1973), Chromosomen- (lichtmikroskopisch erkennbare Veränderungen der Chromosomenstruktur) und Genommutationen (Veränderungen der Chromosomenzahl) (Preston *et al.*, 1983), Mikrokerne (Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die nicht in die Tochterkerne aufgenommen wurden) (Kalweit *et al.*, 1999),

Schwesterchromatidaustausche (SCE) (reziproke Austausche zwischen Schwesterchromatiden eines Chromosomes) (Speit, 1993), die Erhöhung der außerplanmäßigen DNA-Reparatursynthese (UDS) (Rossberger und Andrae, 1985), die kovalente Bindung an DNA (Randerath *et al.*, 1981; Lutz, 1986) und die Auslösung von DNA-Strangbrüchen (Singh *et al.*, 1988).

Verschiedene kanzerogene Substanzen sind nicht an allen gentoxischen Endpunkten gleichermaßen wirksam. Deswegen ist es von Vorteil, mit einem Testsystem zu arbeiten, an dem mehrere gentoxische Endpunkte untersuchbar sind. Oft sind aus den Endpunkten, an denen eine Substanz wirksam ist, Rückschlüsse auf die Mechanismen, die der kanzerogenen Wirkung der untersuchten Substanz zugrunde liegen, möglich.

1.2.2 Indikatorzellen für die Gentoxizitätsprüfung

Da gentoxische Vorgänge prinzipiell an Zellen gebunden sind, nicht aber an Organe oder Tiere, sind Kurzzeittests nicht nur im Tierversuch (z.B. Romagna und Staniforth, 1989), sondern auch an Bakterien (z.B. Ames *et al.*, 1973; Oda *et al.*, 1985), Hefen oder Säugerzellen in Kultur durchführbar (z.B. Bradley *et al.*, 1981; Zimmermann *et al.*, 1984). Abgesehen von ethischen Argumenten (Kanzerogenitätsstudien am Versuchstier benötigen sehr hohe Tierzahlen, um statistisch auswertbare Ergebnisse zu erzielen) spricht für die *in vitro*-Testsysteme, dass mit relativ wenig Aufwand ausreichende Zahlen von homogenen Indikatorzellen verfügbar gemacht werden können.

Da sie einfacher zu handhaben sind als Säugerzellkulturen, sind bakterielle Testsysteme gut als Basistestsysteme für gentoxische Wirkungen geeignet. In Säugerzellen entsprechen hingegen die Bedingungen in Bezug auf die Aufnahme der Testsubstanzen, den zellulären Metabolismus, die Verpackung und die Reparatur der DNA eher denen im menschlichen Organismus.

Im bakteriellen Testsystem sind Genommutationen oder Chromosomenmutationen sowie gentoxische Wirkungen von Substanzen, die mit nur in Säugerzellen vorkommenden Enzymen (z.B. Topoisomeraseinhibitoren) reagieren, nicht erfassbar. Außerdem sind an Zellkulturen zahlreichere Endpunkte gentoxischer Wirkungen nachvollziehbar als an bakteriellen Testsystemen.

Die in dieser Arbeit als Indikatorzellen eingesetzten V79-Zellen des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) eignen sich zum Nachweis verschiedener gentoxischer Endpunkte, z.B. zum Nachweis der Mutagenität durch Verlust der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) (Chu *et al.*, 1968; Bradley *et al.*, 1981) oder der Na⁺/K⁺-ATPase (Muriel *et al.*, 1987) sowie zur Prüfung auf Mikrokerne (Kalweit *et al.*, 1999), Chromosomenaberrationen (Preston *et al.*, 1983), SCE (Speit, 1993), UDS (Rossberger und Andrae, 1985; Swierenga *et al.*, 1991) und DNA-Strangbrüche (Singh *et*

al., 1988). Für Genmutationstests sind eine kurze Populationsverdoppelungszeit und eine hohe Kloniereffizienz wichtig, für den Nachweis von Veränderungen auf chromosomaler Ebene eine stabile und nicht zu hohe Anzahl morphologisch gut unterscheidbarer Chromosomen. V79-Zellen besitzen einen stabilen, quasi-diploiden Satz von 22 morphologisch gut unterscheidbaren individuellen Chromosomen (Ford und Yerganian, 1958; Hsu und Zenzes, 1964). Für ihre Eignung als permanente Zelllinie ist zudem wichtig, dass die wiederholte Herstellung von Gefrierkulturen möglich ist, um hohe Viabilität und die Uniformität des Zelltyps zu erhalten. Von Vorteil ist außerdem die Größe der vorhandenen Datenbasis für Mutagenitätstests mit der V79-Zelllinie im Vergleich zu weniger gut etablierten Zelllinien (Bradley *et al.*, 1981; Glatt, 1993b).

1.2.3 Metabolisierungssysteme in der Gentoxizitätsprüfung

Ein gemeinsames Problem der *in vitro*-Systeme ist das eines unvollständigen, fehlenden oder vom humanen Metabolismus abweichenden Fremdstoffmetabolismus. Bei der Adaptation an Kulturbedingungen entdifferenzieren Säugerzellen in Kultur und stellen neben anderen Funktionen auch die Expression vieler fremdstoff-metabolisierender Enzyme ein (Glatt *et al.*, 1987; McGregor *et al.*, 1991). Die überwiegende Zahl kanzerogener Stoffe wirkt aber nicht in der Form gentoxisch, in der sie in der Umwelt oder im Organismus vorkommt, sondern wird erst durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zu reaktiven Metaboliten "gegiftet" (Miller, 1978). Deswegen ist die genaue Kenntnis der metabolischen Kompetenz der Zielzellen und die Einbeziehung fehlender Enzyme des Fremdstoffmetabolismus in das Testsystem notwendig (Glatt *et al.*, 1987; 1990a; Glatt, 1993a, b). Der in dieser Arbeit eingesetzte Subklon der V79-Zelllinie, V79-Mz, exprimiert weder Cytochrom P450 (CYP), noch Chinon-Oxidoreduktase, UDP-Glucuronosyltransferase, Sulfotransferase (SULT) oder *N*-Acetyltransferase (NAT) (Wiebel *et al.*, 1980; Glatt *et al.*, 1990b; McGregor *et al.*, 1991). Die Aktivität anderer Enzyme (CYP-Reduktase, mikrosomale Epoxidhydrolase, Glutathiontransferase, *N*-Deacetylase und Nitroreduktase) wurde von verschiedenen Autoren nachgewiesen (Wiebel *et al.*, 1980; Salmeen *et al.*, 1983; Wiebel *et al.*, 1984; Glatt *et al.*, 1986; 1987; McGregor *et al.*, 1991). Die Expression kann in Sublinien, die in unterschiedlichen Laboratorien gehalten werden, unterschiedlich sein und die einzelnen Enzymaktivitäten können in verschiedenen Wachstumsstadien einer Kultur variieren. Gut bekannt ist die Expression einer endogenen NAT in der Sublinie V79-NH (Wiebel *et al.*, 1984).

Deswegen wird bei *in vitro*-Gentoxizitätsuntersuchungen üblicherweise der postmitochondriale Überstand (S9-Fraktion) aus Gewebehomogenat von Versuchstieren (Ames *et al.*, 1973; Kuroki, 1979) als externes Metabolisierungssystem zugesetzt. Einige Arbeitsgruppen verwenden auch metabolisch kompetente Zellen als aktivierendes System

in Kokulturen mit Indikatorzellen (Kasper *et al.*, 1988; Oglesby *et al.*, 1989). Bei der Arbeit mit S9-Fraktion kann die Metabolisierung durch einzelne Enzymklassen oder Enzymformen verstärkt oder vermindert werden, indem einzelne Enzymklassen im Versuchstier induziert werden, Kofaktoren oder Inhibitoren für fremdstoffmetabolisierende Enzyme zugesetzt werden oder die S9-Fraktion weiter fraktioniert wird. Dies ist aber nur in einem begrenzten Rahmen möglich, so dass eine exakte Aufklärung der an der Metabolisierung beteiligten Enzyme auf diesem Weg nicht möglich ist.

Die Gewebeverteilung und die Substratspezifität der einzelnen Enzymformen sind selbst zwischen Säugetieren stark speziesabhängig. Um verlässliche Aussagen über das gentoxische Potenzial einer Substanz im Menschen zu erhalten, wäre also die Verwendung menschlicher Enzyme im Gentoxizitätstest günstig. Humanes Material für die S9-Herstellung ist jedoch selten verfügbar. Die Gewebeproben stammen zudem meist von kranken Personen, deren Fremdstoffmetabolismus möglicherweise von dem gesunder Individuen abweicht.

Bei allen externen Aktivierungssystemen ist nicht gesichert, ob die aktiven Metabolite für die Indikatorzellen verfügbar sind. Viele gentoxische Metabolite sind kurzlebige, geladene Elektrophile, welche die Membran- oder Zellwandbarriere der Indikatorzellen nicht oder nur in geringem Ausmaß passieren können. Wenn sie extern erzeugt werden, erreichen sie demnach oft nicht den Zellkern der Indikatorzellen, der die Zielstruktur für den Nachweis gentoxischer Wirkungen darstellt. Durch die Zugabe nukleophiler Medienkomponenten wie Chloridanionen konnten in einigen Fällen sekundäre reaktive Spezies erzeugt werden, die in größerem Ausmaß in die Indikatorzellen gelangen (Glatt *et al.*, 1990b).

Einige der dargestellten Probleme können durch den Einsatz von Primärzellen oder metabolisch kompetenten Zelllinien gelöst werden (Glatt *et al.*, 1987). Die humane Leberzelllinie Hep G2, bei der die Expression vieler fremdstoffmetabolisierender Enzyme in Kultur – wenn auch auf reduziertem Niveau – erhalten bleibt (Alexander und Bey, 1976), wurde sowohl als externes Bioaktivierungssystem im *Salmonella*-Mutagenitätstest (Zhuo *et al.*, 1986) als auch in Gentoxizitätstests mit einer Zelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) (Natarajan und Darroudi, 1991) und als Indikatorsystem mit der Fähigkeit zu interner Bioaktivierung eingesetzt (Dearfield *et al.*, 1983). Primärzellen können nach der Präparation noch eine Zeit lang ihr zelltypspezifisches Expressionsmuster fremdstoffmetabolisierender Enzyme beibehalten und sind dadurch ebenfalls zur internen Aktivierung von Testsubstanzen in der Lage (Brambilla und Martelli, 1990). Die aktivierenden Eigenschaften sind jedoch nur für das präparierte Gewebe repräsentativ, wobei im Falle von Hepatocyten auch eine starke Entgiftungskapazität vorhanden ist. Außer der aufwändigen Präparation und der schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die unterschiedliche Qualität der Präparate ist die geringe Zellteilungsrate der

Primärzellen und die lange Populationsverdoppelungszeit einiger metabolisch kompetenter Zelllinien problematisch. Sie führt zu einer starken Begrenzung der durchführbaren Gentoxizitätstests, da diese in vielen Fällen auf kurze Populationsverdoppelungszeiten angewiesen sind.

1.3 Korrelation Gentoxizität / Kanzerogenität

Endpunkte in der *in vitro*-Gentoxizitätsprüfung sind spezifischer als beispielsweise die in der Cytotoxizitätsprüfung. Ein positives Ergebnis in einem Gentoxizitätstest bedeutet jedoch nicht, dass zwingend auch eine kanzerogene Wirkung der geprüften Substanz vorhanden ist. Korrelationsstudien zu Kanzerogenität und Gentoxizität beziehen sich fast ausschließlich auf Genmutationstests in Bakterien und die Kanzerogenitätsprüfung im Versuchstier. Ein Problem bakterieller Testsysteme ist, dass sie auch einige krebsirrelevante Mutationen detektieren (Prival und Dunkel, 1989). Gründe hierfür sind beispielsweise die Aktivierung der Testsubstanz durch bakterienspezifische Enzyme oder Unterschiede zwischen bakteriellen DNA-Reparatursystemen und zu denen von Säugerzellen. Von den im Tierversuch mit Nagern nicht-kanzerogenen Substanzen sind 70-90% auch im bakteriellen Genmutationstest negativ (Prival und Dunkel, 1989). Andererseits werden einige Substanzen wegen fehlender aktivierender fremdstoffmetabolisierender Enzyme nicht detektiert. Verschiedenen Autoren zufolge sind in Abhängigkeit von der untersuchten Substanzklasse 60-90% der kanzerogenen Chemikalien bakterielle Mutagene (Tennant *et al.*, 1987; Shelby, 1988; Ashby und Tennant, 1991). Die Sensitivität in Bezug auf die Entdeckung humaner Kanzerogene kann möglicherweise durch den Einsatz rekombinanter Testsysteme, die humane fremdstoffmetabolisierende Enzyme exprimieren, erhöht werden.

1.4 Rekombinante Systeme für die Gentoxizitätsprüfung

Die Identifikation und Klonierung der cDNA vieler fremdstoffmetabolisierender Enzyme in den letzten Jahren ermöglichte die Etablierung rekombinanter Indikatorzellen, die zur internen Bioaktivierung von Testsubstanzen in der Lage sind. Solche Indikatorzellen sind gentechnisch so verändert, dass sie einzelne fremdstoffmetabolisierende Enzyme des Menschen oder von Versuchstieren heterolog exprimieren. Als Zielzellen sind hier gerade diejenigen geeignet, die eine geringe Hintergrundexpression endogener fremdstoffmetabolisierender Enzyme haben.

In Bakterien für Mutagenitätstests wurden viele fremdstoffmetabolisierende Enzyme des Menschen und von Versuchstieren exprimiert, darunter SULT (Glatt *et al.*, 1995), Glutathion-S-transferasen (Thier *et al.*, 1993), NAT (Grant *et al.*, 1992) und CYP

(Josephy *et al.*, 1995). Die Expression von intrinsischen Membranproteinen wie CYP und UDP-Glucuronosyltransferasen in funktionaler Form ist schwierig. Geeignete Expressionssysteme sind in diesen Fällen eukaryotische Zellen. Eine Reihe von V79-Zelllinien, die Doehmer *et al.* (1999) für die Expression humaner CYP etablierten, wurde vielfach in mechanistischen Studien und Gentoxizitätsuntersuchungen eingesetzt (Glatt *et al.*, 1993; Engst *et al.*, 1999). Auch UDP-Glucuronosyltransferasen (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991), mikrosomale Epoxidhydrolase (Friedberg *et al.*, 1994) und Glutathion-S-transferasen (Jernström *et al.*, 1996) wurden in eukaryotischen Zellen für toxikologische Untersuchungen heterolog exprimiert. Mittlerweile existieren zudem Testsysteme, in denen mehrere humane fremdstoffmetabolisierende Enzyme gemeinsam zur Expression gebracht wurden: CYP2A6 und mikrosomale Epoxidhydrolase (Davies *et al.*, 1989), CYP1A2, CYP3A4, CYP2A6, CYP2E1 und mikrosomale Epoxidhydrolase (Crespi *et al.*, 1991a; 1991b), NAT und CYP (Yanagawa *et al.*, 1994), SULT und CYP in CHO-Zellen (Wu, 2000).

Homogene Kulturen stabil exprimierender rekombinanter Zielzellen sind weniger stark biologischen Schwankungen unterworfen als Versuchstiere bzw. deren Gewebepreparationen. Aufgrund der selektiven Expression einzelner, auch humaner Enzymformen können gentechnisch veränderte *in vitro*-Systeme Erkenntnisse liefern, die *in vivo* nicht abzuklären sind.

2. Sulfotransferasen

Cytosolische Sulfotransferasen (SULT) (E.C.2.8.2) übertragen die Sulfonylgruppe von ihrem Kosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) (Robbins und Lipmann, 1957) auf nukleophile Gruppen kleiner endogener Moleküle wie Steroide und Catecholamine sowie exogener Substrate (Abb. 1). Bekannte Akzeptorgruppen sind -C-OH (phenolisch oder alkoholisch), -N-OH und -NH (Mulder und Jakoby, 1990). Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten werden SULT zu einer Enzymsuperfamilie zusammengefasst (Yamazoe *et al.*, 1994). Die systematische Bezeichnung für humane SULT besteht aus einer Ziffer für die Familie, einem Großbuchstaben für die Subfamilie und einer weiteren Ziffer für das individuelle Enzym. Enzyme, deren Aminosäuresequenzen zu 45% übereinstimmen, werden zu Familien zusammengefasst und erhalten die gleiche erste Ziffer. Die Subfamilien besitzen mindestens 60% Sequenzidentität (3rd International Sulphation Workshop in Drymen, Schottland, 1996). Diese Nomenklatur wurde in der vorliegenden Arbeit auch für die SULT der Ratte angewendet, wobei in Tabelle 2 zusätzlich die Bezeichnungen aufgeführt sind, die in der Literatur am häufigsten verwendet werden. Ein Präfix vor dem systematischen Namen gibt die Spezies an (h für human, r für Ratte). Die Bindungsstelle für das Kosubstrat ist bei allen fremdstoffmetabolisierenden SULT

hochkonserviert und hat die Aminosäuresequenz RKGxxGGDWKxxFT (Komatsu *et al.*, 1994). Die bisher klonierten SULT des Menschen und der Ratte sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Alle gereinigten humanen SULT sind Homodimere, während aus der Ratte auch ein Monomer, rSULT1E1 (Borthwick *et al.*, 1993), und ein Heterodimer aus rSULT1A1 und rSULT1C1 gereinigt wurden (Kiehlbauch *et al.*, 1995). Die Enzymformen besitzen überlappende Substratspezifitäten, unterscheiden sich in ihren K_m -Werten für einzelne Substrate zum Teil aber beträchtlich. Schon sehr wenige Unterschiede in der Aminosäuresequenz können, wie bei hSULT1A1 und hSULT1A3, verschiedene Substratspezifitäten zur Folge haben (Brix *et al.*, 1999; Dajani *et al.*, 1999). Auch als ortholog bezeichnete SULT verschiedener Spezies müssen nicht die gleiche Substratspezifität zeigen. Typische endogene und exogene Substrate für die individuellen SULT sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Mit der Einführung einer negativen Ladung durch die Übertragung der Sulfonylgruppe geht in der Regel eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit und damit eine Verbesserung der Ausscheidbarkeit einher. Außer der Elimination von Fremdstoffen und endogenen Stoffwechselprodukten besitzt die Sulfokonjugation Funktionen bei der Inaktivierung von Hormonen, Neurotransmittern und Pharmaka (Weinshilboum, 1986; Ratge *et al.*, 1991; Roy, 1992). Durch Sulfatasen können die inaktivierten Metabolite wieder desulfoniert werden, so dass Sulfokonjugate Transport- und Speicherfunktionen übernehmen können (Dooley *et al.*, 2000). Andere endogene Substrate und Pharmaka werden durch Sulfonierung in ihre metabolisch aktive Form gebracht (Glatt, 2002).

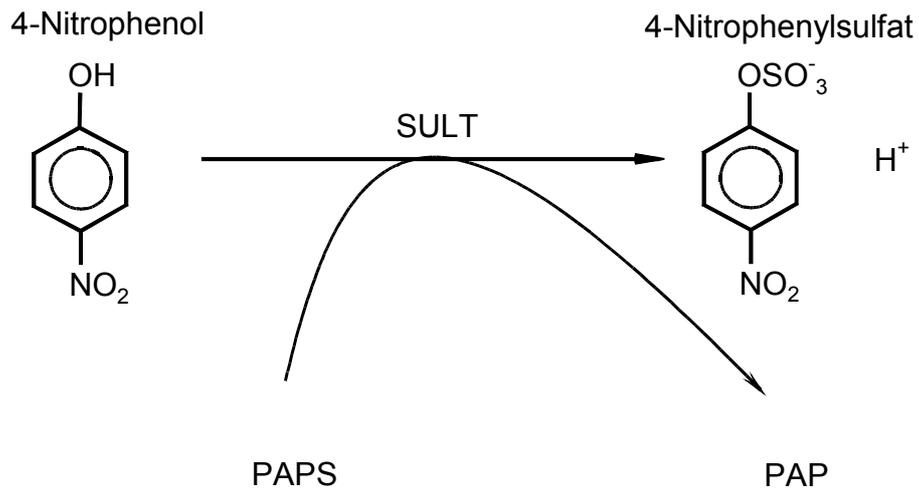


Abb. 1: Sulfonierung von 4-Nitrophenol

SULT übertragen die Sulfonylgruppe von ihrem Kosubstrat 3'-Phosphoadenosyl-5'-phosphosulfat (PAPS).

Tabelle 2: SULT des Menschen und der Ratte

| SULT des Menschen | Referenz Nukleotidsequenzen | Substrate ^a |
|---------------------|--|---|
| 1A1 | (Jones <i>et al.</i> , 1995; Raftogianis <i>et al.</i> , 1997) | 4-Nitrophenol, Minoxidil, 4-OH-Tamoxifen, OH-PhIP ^b , 1-HMP ^b |
| 1A2 | (Zhu <i>et al.</i> , 1996) | 4-Nitrophenol, 2-Naphthol, OH-PhIP ^b |
| 1A3 | (Aksoy <i>et al.</i> , 1994; Jones <i>et al.</i> , 1995) | Dopamin, Vanillin |
| 1B1 | (Fujita <i>et al.</i> , 1997; Wang <i>et al.</i> , 1998) | 4-Nitrophenol, 1-Naphthol, Iodthyronine, OH-CPC ^b , 6-HMBP ^b |
| 1E1 | (Falany <i>et al.</i> , 1995) | β-Östradiol, Östron, Iodthyronine, (-)-1-HEP ^b , 1-HMP ^b |
| 1C1 | (Her <i>et al.</i> , 1997) | 4-Nitrophenol |
| 1C2 | (Sakakibara <i>et al.</i> , 1998) | 4-Nitrophenol, 1-HMP ^b |
| 2A1 | (Comer und Falany, 1992; Otterness <i>et al.</i> , 1995) | Dehydroepiandrosteron, 1-HMP ^b , 6-HMBP ^b |
| 2B1a/b ^c | (Her <i>et al.</i> , 1998) | Dehydroepiandrosteron, Cholesterol, Pregnenolon (Fuda <i>et al.</i> , 2002) |
| 4A1 | (Walther <i>et al.</i> , 1999; Falany <i>et al.</i> , 2000) | unbekannt |

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 2

| SULT der Ratte ^d | Referenz Nukleotidsequenzen | Substrate ^a |
|------------------------------|---|--|
| ST1A1 (rSULT1A1) | (Ozawa <i>et al.</i> , 1992) | Minoxidil (Hirshey und Falany, 1990), 4-Nitrophenol (Sekura und Jakoby, 1981), 1-HMP ^b (Rao und Duffel, 1991; Glatt <i>et al.</i> , 1995) |
| ST1B1 (rSULT1B1) | (Sakakibara <i>et al.</i> , 1995; Fujita <i>et al.</i> , 1997) | Tyrosin, L- und D-Dopa, Thyroidhormone, 4-Nitrophenol (Sakakibara <i>et al.</i> , 1995), OH-CPC ^b , 6-HMBP ^b (Teubner, 2001) |
| ST1C1 (rSULT1C1) | (Nagata <i>et al.</i> , 1993) | 2-Naphthol, <i>N</i> -OH-2-AAF ^b (Nagata <i>et al.</i> , 1993) |
| ratSULT1C2 (rSULT1C2) | (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000) | 4-Nitrophenol |
| ratSULT1C2A (rSULT1C2A) | (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000) | 4-Nitrophenol |
| rat EST (rSULT1E1) | (Demyan <i>et al.</i> , 1992) | β -Östradiol, Östron, Pregnenolon (Borthwick <i>et al.</i> , 1993), |
| rSTa ^e (rSULT2A1) | (Ogura <i>et al.</i> , 1994) | Gallensäuren, Dehydroepiandrosteron |

N-OH-2-AAF, *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren; (-)-1-HEP, (-)-1-(α -Hydroxyethyl)pyren; 1-HMP, 1-Hydroxymethylpyren; 6-HMBP, 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren; OH-CPC, 4-Hydroxycyclopenta[*def*]chrysen; OH-PhIP, *N*-Hydroxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridin

^a Soweit nicht anders vermerkt stammen die Angaben aus den Übersichtsartikeln Glatt *et al.* (2001) und Nagata und Yamazoe (2000).

^b Sulfonierungsprodukt ist instabil

^c Splicevarianten mit unterschiedlichem N-Terminus

^d Bezeichnung von Autoren übernommen, in Klammern die Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit

^e Es wurden zwei Sequenzen aus cDNA-Banken isoliert, deren Genprodukte (ST40, ST41) sich in einer Aminosäure unterscheiden (als rSULT2A1 wird in dieser Arbeit ST40 bezeichnet). Es existieren mehrere weitere, nicht näher charakterisierte SULT der Ratte, die Hydroxysterioide als Substrate haben, z.B. ST60, ST20, ST21 (Watabe *et al.*, 1994).

Für die Diskussion möglicher organotroper Wirkungen von Substanzen, die durch Sulfonierung toxifiziert werden, ist die ausgeprägte Gewebespezifität der Expression der einzelnen SULT-Formen wichtig. In der Ratte ist die Expression vieler SULT auf die Leber konzentriert (Dunn und Klaassen, 1998). Beim Menschen zeigen nur wenige SULT, wie die hSULT1A1, ihr höchstes Expressionsniveau in der Leber. Diese SULT kommt zudem noch in zahlreichen extrahepatischen Geweben vor. Für andere SULT sind extrahepatische Gewebe diejenigen, die das höchste Expressionsniveau aufweisen. Die hSULT2A1 wird stark in der Nebenniere exprimiert und kommt außerdem im Jejunum und im Ileum vor. Die hSULT1B1 ist eine wichtige Form im Intestinaltrakt (Teubner, 2001). Auch hSULT1A3 wird

in sämtlichen untersuchten Abschnitten des Intestinaltraktes exprimiert und kommt in vielen anderen Geweben, jedoch nicht in der adulten Leber vor (Teubner *et al.*, 1998). Die hSULT1E1 wird im Endometrium, im Ileum, Jejunum und Coecum und auch in der Leber exprimiert (Falany *et al.*, 1998; Teubner, 2001). Über die Gewebespezifität der Proteinexpression der hSULT2B1- und hSULT1C-Formen sowie der hSULT1A2 ist bisher praktisch nichts bekannt. RNA der Form hSULT1A2 wurde in Gehirn, Lunge, Niere und Darm gefunden, RNA der 2B-Formen in Haut, Plazenta, Vagina und Prostata (Dooley *et al.*, 2000). RNA beider 1C-Formen wurde in Niere, Gehirn und Ovarien gefunden, RNA der hSULT1C1 auch in Magen und Schilddrüse (Her *et al.*, 1997; Sakakibara *et al.*, 1998). Proteinexpression der hSULT4A1 wurde nur im Gehirn gefunden (Falany *et al.*, 2000).

Polymorphismen in Genen von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen können sowohl die Prädisposition für bestimmte Krankheiten beeinflussen als auch interindividuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Pharmaka erklären. Definitionsgemäß spricht man von einem genetischen Polymorphismus, wenn allelische Variationen (alternative Formen des gleichen Genlocus) in einer Population mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftreten. Für viele SULT wurden Einzelnukleotidaustausche im kodierenden Sequenzbereich beschrieben, von denen einige bei den folgenden SULT zu Variationen in der Aminosäuresequenz (Alloenzyme) führen: hSULT1A1 (Tabelle 3), hSULT1A2 (Tabelle 3), hSULT2A1 (Thomae *et al.*, 2002), hSULT2B1, hSULT1C2 und hSULT1B2 (Iida *et al.*, 2001). Bei der hSULT1A1 führt der Arg213His Austausch (hSULT1A1*2) zu leicht veränderten kinetischen Eigenschaften des exprimierten Proteins gegenüber Standardsubstraten (Raftogianis *et al.*, 1999). Er beruht auf dem Einzelnukleotidaustausch G⁶³⁸→A. Eine Korrelation dieses Genotypes mit geringerer Enzymaktivität wurde für Thrombocyten, nicht aber für die Leber gezeigt (Raftogianis *et al.*, 1997; Raftogianis *et al.*, 1999).

Für die hSULT1A2 wurden 13 unterschiedliche Allele gefunden, die für sechs Alloenzyme kodieren (Raftogianis *et al.*, 1999). Alle allelischen Varianten, deren Sequenz an der Stelle 235 für Thr kodiert, besitzen deutlich erhöhte K_m-Werte gegenüber dem Standardsubstrat 4-Nitrophenol.

Von toxikologischer Relevanz könnten diese Polymorphismen sowohl aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten, Substrataffinitäten oder Affinitäten zum Kosubstrat PAPS oder aufgrund einer unterschiedlichen Enzymexpression oder Stabilität des Enzymes sein.

Tabelle 3: Alloenzyme der hSULT1A-Formen^a

| Bezeichnung | Variation der Aminosäuresequenz ^b | Frequenz ^c |
|-------------------------|--|-----------------------|
| SULT1A1*1 | ----- | 0,674 |
| SULT1A1*2 | Arg213His | 0,313 |
| SULT1A1*3 | Met223Val | 0,01 |
| SULT1A1*4 | Arg37Gly | 0,003 |
| SULT1A1*V ^d | Ala147Thr, Glu181Gly, Arg213His | nicht untersucht |
| SULT1A1*VI ^d | Pro90Leu, Val234Ala | nicht untersucht |
| SULT1A2*1 | ----- | 0,508 |
| SULT1A2*2 | Ile7Thr, Asn235Thr | 0,287 |
| SULT1A2*3 | Pro19Leu | 0,180 |
| SULT1A2*4 | Ile7Thr, Arg184Cys, Asn235Thr | 0,008 |
| SULT1A2*5 | Ile7Thr | 0,008 |
| SULT1A2*6 | Asn235Thr | 0,008 |

^avollständige Darstellung z.B. in Glatt (2002)

^bim Vergleich zur jeweiligen *1-Form

^cDaten für die Allelfrequenzen in Kaukasiern aus Raftogianis *et al.* (1997; 1999)

^dnur als Einzelsequenz berichtet (Hwang *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995); Klonier- oder Sequenzierfehler nicht ausgeschlossen

3. Aromatische Amine und Amide

Aromatische Amine und Amide (aAA) sind seit etlichen Jahrzehnten wegen ihres kanzerogenen Potenzials von großem toxikologischem Interesse. Zu ihnen gehören sowohl industrielle Intermediate als auch Substanzen, die heterozyklischen aromatischen Amine, die beim Zuführen hoher Temperaturen während der Zubereitung von Fleischmahlzeiten durch die Reaktion von Kreatin und Protein entstehen (Skog *et al.*, 1998). Die aAA industriellen Ursprungs werden in bedeutenden Mengen bei der Herstellung von Farben, Harzen, Arzneimitteln, Pestiziden, Kunststoffen und Antioxidantien gebildet. Menschen kommen mit diesen Verbindungen an ihren Arbeitsplätzen in der Industrie, der Landwirtschaft, in Küchen und Bäckereien (Combes und Haveland-Smith, 1982; Haugen *et al.*, 1982; Council on Scientific Affairs, 1988; Carstensen *et al.*, 1988), durch Produkte, die Derivate von Azofarben enthalten, wie Nahrungsmittel, Papier, Leder, Textilien, Kunststoffe, Lacke, Druckfarben, Pharmazeutika und Kosmetika (Combes und Haveland-Smith, 1982; Lin und Solodar, 1988; Dubach *et al.*, 1991), sowie bei der

Tabakrauchexposition und durch Luftverschmutzung (Patrianakos und Hoffman, 1979; Nielsen, 1983) in Berührung. Arylamine können aus Azoverbindungen und nitroaromatischen Kohlenwasserstoffen durch körpereigene Enzyme oder Mikroorganismen des Intestinaltraktes und des Bodens reaktiv freigesetzt werden (Rickert *et al.*, 1984; Levine, 1991; Chung und Stevens, 1993).

Arylamine sind schlecht wasserlöslich, chemisch stabil und werden in der Umwelt langsam abgebaut (Anliker, 1979; Chung und Stevens, 1993). Auch nach oraler oder inhalativer Aufnahme oder nach der Resorption über die Haut sind mehrere Metabolisierungsschritte notwendig, um ihre Ausscheidung zu ermöglichen. Die Tatsache, dass Arylamine in Abhängigkeit von der Spezies Tumore in unterschiedlichen Zielgeweben erzeugen, die weit vom Applikationsort entfernt liegen können (Schulte *et al.*, 1987), legt nahe, dass der Metabolismus bei der Toxifizierung der Arylamine eine wichtige Rolle spielt. Beim Menschen ist das prominenteste Organ für arylamininduzierte Kanzerogenese die Harnblase. Der IARC zufolge gibt es "limitierte Evidenz", dass weitere mögliche Zielstrukturen beim Menschen der Intestinaltrakt [bei IQ (IARC, 1993)] und die Prostata [bei Auramin, (IARC, 1987b)] sind. In Versuchen an Ratten und Mäusen sind auch die Leber, die Schilddrüse, die Zymbaldrüse, die Brustdrüse, die Milz und verschiedene andere Zielorgane für die arylamininduzierte Kanzerogenese, wobei auch hier Speziesunterschiede in der Organotropie einzelner Substanzen bestehen (Tabelle 1) (Miller *et al.*, 1964; Irving *et al.*, 1967).

Der kritische erste Metabolisierungsschritt, der zur Aktivierung von aAA führt, ist in den meisten Fällen eine *N*-Hydroxylierung (Abb. 2) (Kadlubar und Hammons, 1987; Kato und Yamazoe, 1987). Diese wird bei den meisten Vertretern dieser Substanzklasse durch Enzyme der CYP1A-Familie, insbesondere CYP1A2, katalysiert (Butler, *et al.*, 1989; Guengerich and Shimada, 1991). Zu einem geringeren Anteil sind auch andere CYP-Formen, wie CYP1A1 und CYP3A4 (Guengerich und Shimada, 1991; Kadlubar *et al.*, 1992), Flavinmonooxygenasen (Kimura *et al.*, 1984; Windmill *et al.*, 1997) die Prostaglandin-H-synthetase (Kadlubar *et al.*, 1982; Kulkarni und Murthy, 1995) an der initialen Metabolisierung homozyklischer Amine beteiligt. Hydroxylierungen des aromatischen Ringes stellen in der Regel Inaktivierungsreaktionen dar. *N*-Hydroxyarylamine können dahingegen *in vitro* an DNA binden und sind im Tiermodell stärkere Kanzerogene als Arylamine (Miller und Miller, 1981). Bei neutralem pH ist die DNA-Reaktivität von *N*-Hydroxyarylaminen allerdings nur gering, was schon früh auf weitere Metabolisierungsschritte, die zu ultimalen Kanzerogenen führen, schließen ließ (Kriek, 1965).

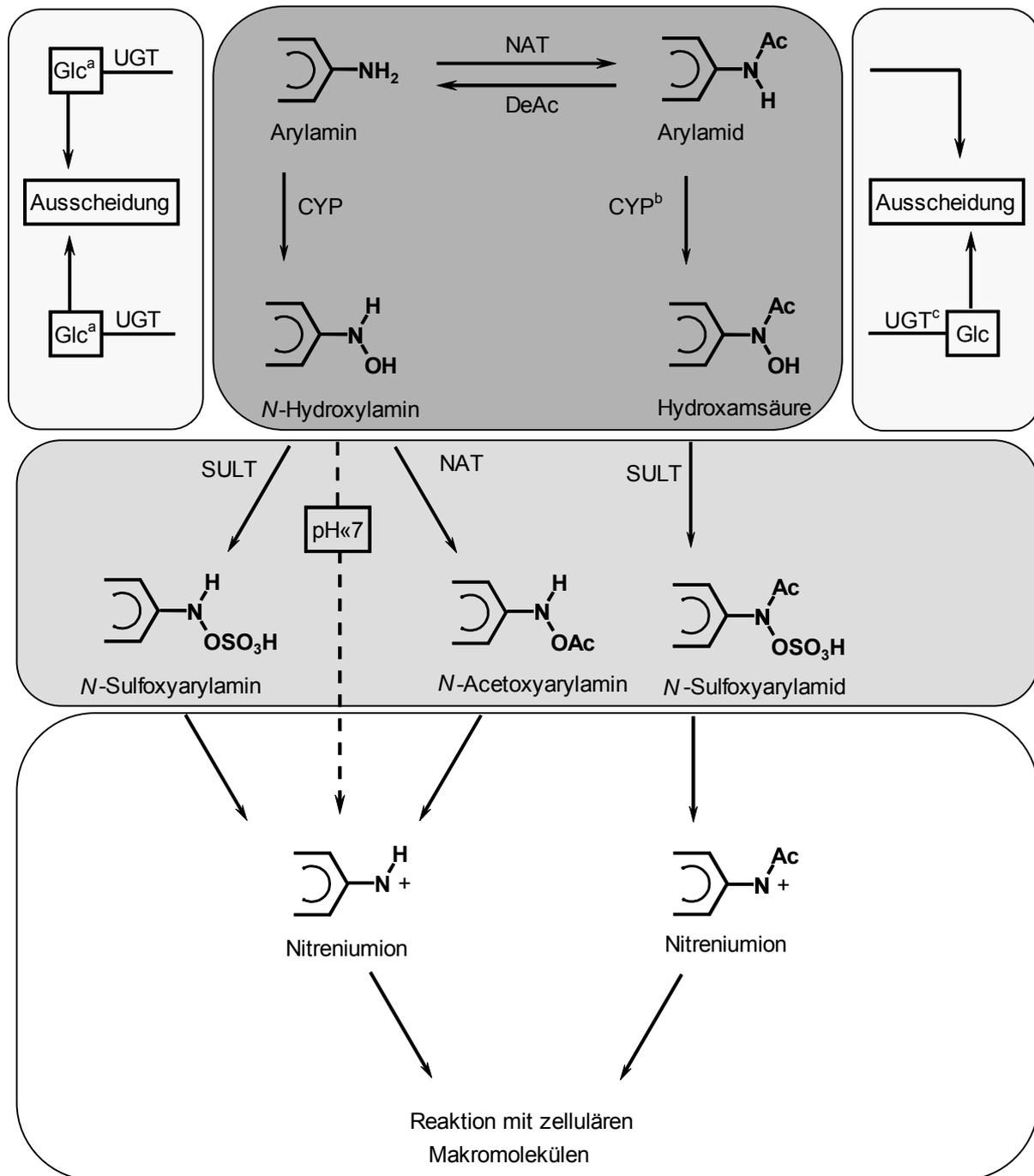


Abb. 2: Wichtige Aktivierungswege aAA zu genotoxischen Metaboliten

Glc: Glucuronid; DeAc: Deacetylase; UGT: UDP-Glucuronosyltransferasen

^aBei $\text{pH} \ll 7$ oder durch Glucuronidasen können aus den *N*-Glucuroniden und den *O*-Glucuroniden Arylamine und Arylhydroxylamine freigesetzt werden, die dann weiteren Aktivierungsschritten unterliegen können.

^bDie Hydroxylierung des Arylamids verläuft in der Regel langsamer als die des Arylamins.

^c(Jin *et al.*, 1993)

Wichtige weitere Reaktionen der *N*-Hydroxylamine und *N*-Hydroxylamide sind *N*-Acetylierungen, *N*-Deacetylierungen und *O*-Konjugationsreaktionen (Abb. 2). Die Veresterung durch SULT oder NAT führt zu Produkten, die aufgrund der stark elektronenziehenden Eigenschaften der Sulfoxy- und der Acetoxygruppe leicht heterolytisch zerfallen (Abb. 2). Dabei bilden sie hochreaktive, elektrophile Nitreniumionen aus, deren positive Ladung durch den aromatischen Ring resonanzstabilisiert ist. Diese stellen ultimale DNA-reaktive Metabolite dar (Miller *et al.*, 1985). Glucuronide sind im Gegensatz dazu wenig reaktive Transportformen der Arylamine, Hydroxylamine und Hydroxamsäuren, aus denen durch mikrobielle Glucuronidasen im Darm (Zenser *et al.*, 1999), bei niedrigen pH-Werten in der Harnblase oder durch Glucuronidasen in extrahepatischen Geweben (Ciotti *et al.*, 1999) Arylhydroxylamine freigesetzt werden können. Welche der beschriebenen enzymatischen Vorgänge bei einem spezifischen Arylamin für seine Aktivierung oder Detoxifizierung verantwortlich sind, ist bisher in den meisten Fällen ungeklärt. *N*-Sulfoxy- und *N*-Acetoxyarylamine sind in der Regel zu instabil für einen Nachweis, und die daraus gebildeten Nitreniumionen und Reaktionsprodukte mit Nucleophilen besitzen identische Strukturen.

Viele der am Metabolismus der Arylamine beteiligten Enzyme sind im Menschen genetisch polymorph. Das führt potenziell zu einer unterschiedlichen Prädisposition von Individuen für die Entwicklung von arylamininduzierten Tumoren, die teilweise an epidemiologischen Studien nachvollziehbar ist (Kadlubar *et al.*, 1992; Hirvonen, 1999). Im Menschen wird CYP1A2 vor allem in der Leber exprimiert. Die Stärke der Expression und die Metabolisierungsrate verschiedener CYP1A2-Substrate zeigen im Menschen große interindividuelle Unterschiede (Ikeya *et al.*, 1989; Lang, 1991; Butler *et al.*, 1992). Die genetische Grundlage dieser Unterschiede ist noch nicht vollständig geklärt (Sachse *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Josephy *et al.*, 2000). Das hCYP1A2 wird durch ein großes Spektrum von Umwelteinflüssen, darunter Kaffee und Zigarettenrauch induziert (Lang, 1991; Schrenk *et al.*, 1998). Der Polymorphismus der Enzyme aus der Familie humaner NAT führt zu Phänotypen mit hoher und niedriger Acetylierungskapazität. Diese polymorphe Expression wird mit einem unterschiedlichen Risiko für Harnblasenkrebs bei arylaminexponierten Personen und für Colonkrebs nach der Exposition gegenüber heterozyklischen aromatischen Aminen in Verbindung gebracht (Evans *et al.*, 1983; Risch *et al.*, 1995; Golka *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998).

Der Einfluss der Polymorphismen humaner SULT auf die Metabolisierung von aAA wurde bisher kaum untersucht und soll Gegenstand der vorliegenden Studie sein. Die folgenden vier aAA wurden in dieser Studie untersucht (Abb. 3).

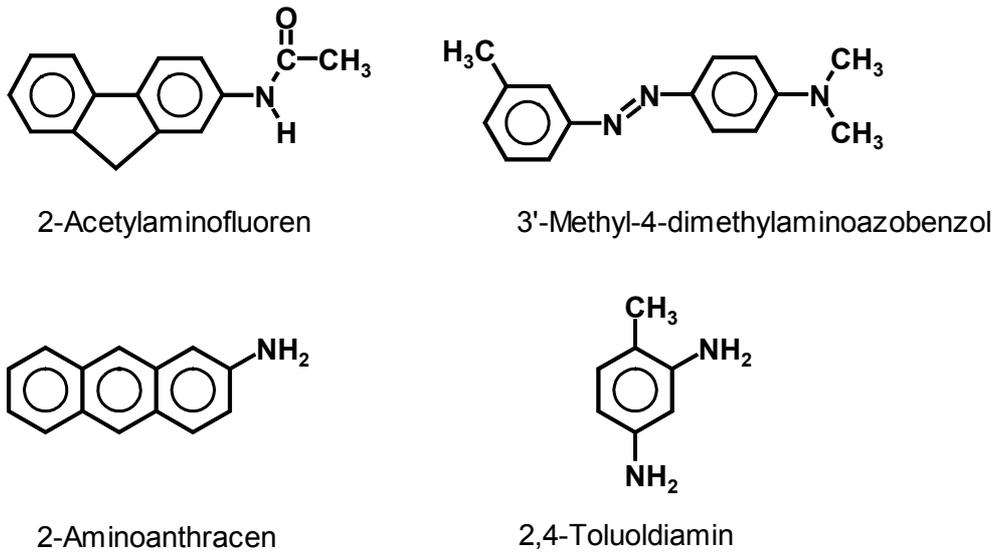


Abb. 3: Strukturformeln der untersuchten aAA

Das aromatische Amid 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) wurde 1941 als sehr potentes Insektizid entdeckt, kam aber als solches nie auf den Markt, da seine starke tumorauslösende Wirkung in Tierversuchen rasch erkannt wurde (Wilson *et al.*, 1941; Weisburger und Weisburger, 1958). Seitdem werden 2-AAF und seine Metabolite in der Krebsforschung intensiv als Modellsubstanzen eingesetzt (Kriek, 1992).

Nach der Inkubation von 2-AAF mit humanen Hepatocyten traten bei geringen 2-AAF Konzentrationen vor allem an der 7- und 9-Position ringhydroxylierte Metabolite auf. Bei höheren Konzentrationen traten vermehrt das Deacetylierungsprodukt 2-AF und *N*-OH-2-AAF auf (Monteith *et al.*, 1988). Die Metabolitenspektren von Ratte und Mensch unterschieden sich qualitativ nicht, aber menschliche Hepatocyten und Nierenzellkulturen metabolisierten 2-AAF in stärkerem Ausmaß zu einem im bakteriellen Mutagenitätstest detektierbaren Mutagen (Monteith *et al.*, 1988; Rudo *et al.*, 1989). Einige Autoren postulierten die DNA-Bindung des *N*-OH-2-AAF nach Deacetylierung (Grantham *et al.*, 1965; Irving, 1966) und anschließender Protonierung (Kriek, 1965). Des Weiteren können SULT (DeBaun *et al.*, 1970; Weisburger *et al.*, 1972), Deacetylasen, (Irving, 1966) und UDP-Glucuronosyltransferasen (Irving *et al.*, 1969) *N*-OH-2-AAF metabolisieren. Miller *et al.* (1985) zeigten, dass in männlichen B6C3F₁-Mäusen nach der Hemmung von SULT durch Pentachlorphenol sowie in brachymorphen Mäusen (limitierte PAPS-Synthese) auch die Ausbildung von Hepatomen gehemmt war. Verschiedene spätere Veröffentlichungen zeigten, dass 4-Nitrophenol sulfonierende Enzyme *N*-OH-2-AAF zu einem DNA-bindenden Metaboliten bioaktivieren können (Abu-Zeid *et al.*, 1992; Gilissen *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995). Außerdem konnte in Primärkulturen von Rattenleberhepatocyten die DNA-Bindung

von 2-AAF durch die Zugabe des SULT-Inhibitors Pentachlorphenol vermindert werden (Loretz und Pariza, 1984).

Für die Generierung eines gentoxischen Metaboliten des aromatischen Amins 2-Aminoanthracen wurden dahingegen bisher keine SULT verantwortlich gemacht. In vielen Kurzzeittestsystemen wurde gezeigt, dass 2-Aminoanthracen durch die Zugabe von S9, Mikrosomen oder gereinigter CYP verschiedener Spezies aus unterschiedlichen Geweben [(*Drosophila* (Hallström und Grafström, 1981), Nasengewebe von Ratten (Bond und Li, 1983), CYP der Ratte (Norman *et al.*, 1979) sowie des Kaninchens (Norman *et al.*, 1982)] zu einem gentoxischen Metaboliten aktiviert wird. Für die Prüfung der Gentoxizität von 2-Aminoanthracen wurden auch gentechnisch veränderte Indikatorzellen eingesetzt, welche CYP der Ratte oder des Menschen exprimieren [*E. coli* (Josephy *et al.*, 1998), *Salmonella typhimurium* (Oda *et al.*, 2001) und V79-Zellen (Ellard *et al.*, 1991; Kiefer *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 1994)]. Bei einigen genetischen Endpunkten war die Metabolisierung durch hCYP1A2 ausreichend (Norman *et al.*, 1979; Ellard *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1994), bei anderen war die zusätzliche Anwesenheit einer NAT notwendig (Rodrigues *et al.*, 1994). Das legt die Vermutung nahe, dass verschiedene Metabolite des 2-Aminoanthracen für die gentoxische Wirkung an unterschiedlichen genetischen Endpunkten verantwortlich sind.

2,4-Diaminotoluol (2,4-TDA) ist ebenfalls ein Arylamin, besitzt aber im Unterschied zu 2-Aminoanthracen nur einen aromatischen Ring. Es ist eine Industriechemikalie, die bei der Produktion von Polyurethanschäumen und Elastomeren in großen Mengen erzeugt wird. Bis 1971 kam 2,4-TDA auch in einigen Haarfärbemitteln vor und ist heute noch ein Intermediat bei der Farbproduktion (Coppinger *et al.*, 1984). Außerdem kann es *in situ* aus Urethankapseln von Silikonimplantaten freigesetzt werden (Pan *et al.*, 1992). In Fütterungsversuchen an Ratten wurde 2,4-TDA als kanzerogen erkannt (Ito *et al.*, 1969). In Salmonellen erzeugte es unter Zusatz der S9-Fraktion der Leber arochlor- oder phenobarbitalinduzierter Ratten Mutationen (Ames, 1975).

3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol (3'-M-DAB) ist eine Azoverbindung. Azoverbindungen werden zur Farbgebung in Nahrungsmitteln, Getränken, Textilien, Lacken und Druckertinte eingesetzt, kommen aber auch in Arzneimitteln, Holzschutzmitteln und Kosmetika vor (Combes und Haveland-Smith, 1982). 4-Dimethylaminoazobenzol (DAB), auch „Buttergelb“ genannt, war der erste Lebensmittelzusatzstoff, der als Hepatokanzerogen erkannt und 1937 verboten wurde. Die Kanzerogenität der ringmethylierten DAB-Derivate ist von der Stellung der Methylgruppe abhängig. Durch die Einführung einer Methylgruppe in 3'-Position von DAB wird die Kanzerogenität deutlich verstärkt (Mori *et al.*, 1980). 2'- und 4'-Methyl-DAB sind in der Ratte weniger kanzerogen als 3'-M-DAB (Levine, 1991, Mori *et al.*, 1984).

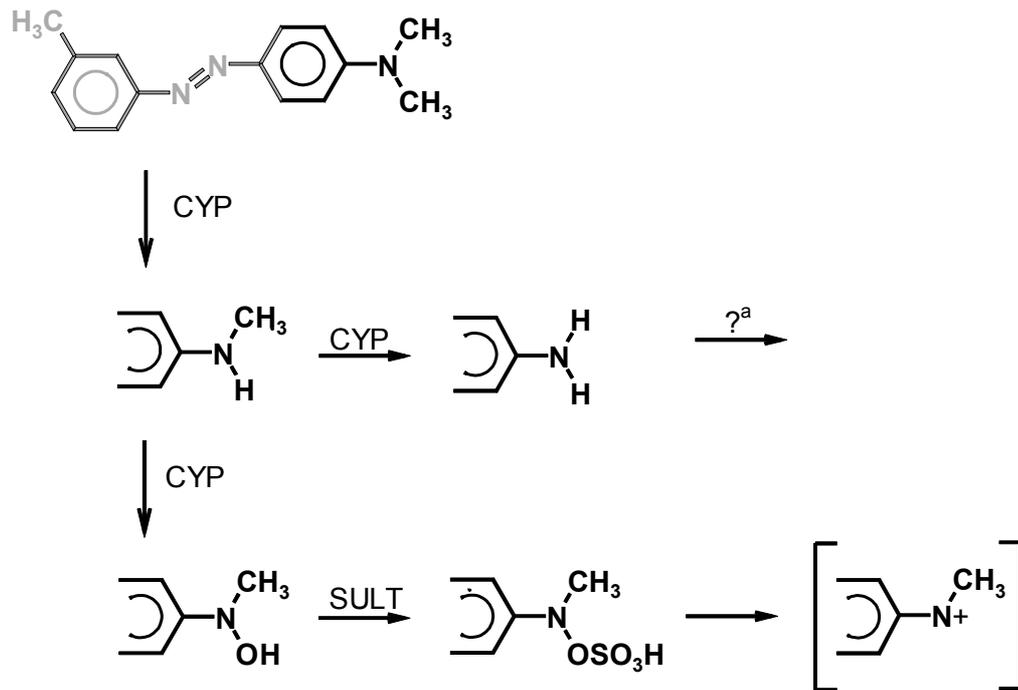


Abb. 4: Mögliche metabolische Aktivierung von 3'-M-DAB

Das Schema wurde in Anlehnung an Miller (1985), Levine (1991) und Delclos (1986) erstellt.

^aIn B6C3F1 Mäusen wurde auch ein *N*-(Deoxyguano-8-yl)-AB Addukt gefunden, das ebenfalls durch die Aktivierung durch CYP und SULT gebildet werden könnte (Delclos *et al.*, 1986).

Azoverbindungen können sowohl reduktiv als auch oxidativ metabolisiert werden. Bei der reduktiven Spaltung der Azobindung werden Arylamine freigesetzt, die durch weiteren Metabolismus zu Kanzerogenen aktiviert werden können. Für die kanzerogene Wirkung von DAB ist allerdings eine intakte Azogruppe erforderlich. Seine Azoreduktion durch Lebermikrosomen und Bakterien ist zwar *in vitro* nachweisbar (Elliott, 1984; Levine, 1985), die dabei entstehenden Arylamine, Anilin und *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin, sind aber in der Ratte weniger tumorigen als die Ausgangsverbindung (Levine, 1991; Case *et al.*, 1993). Für die initialen Schritte der Aktivierung des DAB kommt daher nur der oxidative Metabolismus in Frage. An diesem sind bei Azoverbindungen verschiedene Mitglieder der CYP-Familie beteiligt. DAB kann schrittweise demethyliert (Miller *et al.*, 1945; Levine, 1991) und *N*-hydroxyliert werden (Kadlubar *et al.*, 1976a; Kimura *et al.*, 1984) (Abb. 4). Sowohl die *N*-methylierten als auch die *N*-hydroxylierten Derivate induzieren stärker die UDS in Primärkulturen von Ratten und Mäusen als Aminoazobenzol selbst (Watanabe und Hashimoto, 1981). Sowohl ein Sulfat (Delclos *et al.*, 1986) als auch ein Acetat (Kadlubar *et al.*, 1976b; Degawa *et al.*, 1978) des *N*-hydroxylierten DAB-Metaboliten konnten *in vitro* Nitreniumionen als ultimale genotoxische Metabolite erzeugen und DNA-Addukte ausbilden (Abb. 4).

4. Zielstellung

Die aAA stellen eine Klasse in der Umwelt weit verbreiteter Substanzen anthropogenen Ursprungs dar. Toxikologisch sind sie aufgrund ihrer cytotoxischen und kanzerogenen Eigenschaften von erheblicher Bedeutung. Toxisches Potenzial entfalten die aAA erst nach ihrer metabolischen Aktivierung, an der sowohl CYP als auch konjugierende Enzyme beteiligt sind. Dabei kommen bei den einzelnen Vertretern der strukturell heterogenen Substanzklasse unterschiedliche Enzymformen in Frage. Kleine Strukturänderungen können starke Unterschiede im Wirkungsspektrum nach sich ziehen. Die Wirkung einzelner aAA kann dadurch in Abhängigkeit von der Spezies, der enzymatischen Ausstattung des Zielgewebes und möglicherweise vom untersuchten gentoxischen Endpunkt unterschiedlich sein. Herkömmliche toxikologische *in vitro*-Testsysteme sprechen nicht auf aAA an oder sind nicht in der Lage, die Wirkung differenziert genug nachzuweisen, um Rückschlüsse auf ihre Bedeutung für den Menschen zu ziehen.

Ziel dieser Arbeit war deswegen die Etablierung sensitiver rekombinanter Säugerzelllinien für die Untersuchung der Gentoxizität von aAA. Insbesondere interessierte der Einfluss humaner SULT auf die Mutagenität der aAA. Zu Beginn der Arbeit existierten Informationen über den Nachweis gentoxischer Wirkungen von aAA in gentechnisch veränderten V79-Zellen lediglich für die SULT1C1 der Ratte. Da unklar war, ob im Menschen die gleichen Enzymformen für die Aktivierung verantwortlich sind wie in der Ratte, wurden neben hSULT1C1 auch andere SULT-Formen in V79-Zellen exprimiert. Das Ziel war die Etablierung einer Serie von SULT-exprimierenden V79-Zellen, wobei besonderer Wert auf die Expression der hSULT1A-Formen gelegt wurde, da für diese bereits Hinweise auf die Aktivierung aromatischer Amine vorlagen. Diese Formen sind genetisch polymorph. Die möglichen toxikologischen Auswirkungen dieser Polymorphismen wurden bisher kaum untersucht. Um dies im Säugerzellsystem zu ermöglichen, sollten die cDNAs der häufigsten allelischen Varianten, SULT1A1*1 und SULT1A1*2 sowie SULT1A2*1 und SULT1A2*2, in Expressionsvektoren kloniert und heterolog in V79-Zellen exprimiert werden.

Als Testsysteme eignen sich nur stabile, homogene Indikatorzellen. Deswegen sollten das Expressionsniveau der rekombinanten V79-Zellen, die Stabilität der Expression und die Entwicklung der Expression in verschiedenen Phasen einer Kultur charakterisiert werden.

Um ein breites Spektrum an Grundstrukturen der aAA abzudecken, wurden in Mutagenitätsexperimenten ein monozyklisches aromatisches Amin, 2,4-TDA, ein aromatisches Amin mit mehreren kondensierten aromatischen Ringen, 2-Aminoanthracen, ein tertiäres aromatisches Amin, 3'-M-DAB, und ein aromatisches Amid, 2-AAF, eingesetzt.

Es ist ein CYP1A2-abhängig gebildeter, *N*-hydroxylierter Metabolit, der bei vielen aAA das Substrat für nachfolgende Konjugationsreaktionen darstellt. Um das Problem der geringen Stabilität und der schlechten Penetration der Zielzellmembran auch dieses Metaboliten zu umgehen, und auch, weil seine Struktur oft nicht genau bekannt ist oder er nicht käuflich zu erwerben ist, wurde die Konstruktion von Koexpressionszelllinien angestrebt. Diese sollten sowohl zur oxidativen Metabolisierung als auch zur Sulfonierung aromatischer Amine und somit zur internen Generierung ultimaler reaktiver Metabolite in der Lage sein.

Für die Validierung der V79-SULT-Indikatorzellen wurden auch Substanzen eingesetzt, bei denen die Aktivierung durch SULT bereits eingehend untersucht oder für SULT anderer Spezies nachgewiesen worden war. Dazu gehören die benzylichen Alkohole 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) und 1-Hydroxyethylpyren (1-HEP). In dem Zusammenhang sollte bei den benzylichen Alkoholen ebenfalls untersucht werden, ob SULT-Polymorphismen einen Einfluss auf ihre Aktivierung haben. Da für 1-HEP im bakteriellen System, in dem es interessanterweise enantioselektiv aktiviert wurde, die hSULT1E1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spielte (Hagen *et al.*, 1998), sollte seine Mutagenität auch in rekombinanten hSULT1E1-exprimierenden Säugerzellen untersucht werden.

Bei einigen Verbindungen ist die Mutagenitätsprüfung in Bakterien ungeeignet, weil letztere diese über bakterienspezifische Stoffwechselwege toxisieren oder detoxifizieren. Dazu gehört das Nitroalkan 2-Nitropropan, für das ein SULT-abhängiger Aktivierungsweg postuliert wurde, der bisher nicht für humane Enzyme nachweisbar war. Am rekombinanten Säugerzellsystem sollten humane SULT-Formen, die an der Aktivierung des Nitropropan beteiligt sind, sowie ein möglicher Unterschied in der Aktivierung durch verschiedene allelische Varianten ermittelt werden.

B Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Blot-Apparatur: Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

DNA-Sequenzierer: LKB A.L.F. (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Dunkelkammer: Luminescent analyser LAS 1000 (FujiFilm, Tokio, Japan) mit der Software Advanced image data analyser (AIDA) (Raytest, Straubenhardt)

Flachbettelektrophoresekammer: Agagel Mini (Biometra, Göttingen)

Koloniezählstift: Colony Counter (BIO, Kobe, Japan)

Szintillationszähler: LS6500 (Beckmann, Fullerton, USA)

Thermocycler: TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen)

Ultraschallsonde: Vibra Cell (Bioblock Scientific, Lyon)

UV-Detektion: Eagle Eye II (Stratagene, Heidelberg)

Vertikales Elektrophoresesystem: Hoefer SE 600 Series (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Zellgefriergerät: Cryobad FC60 (Consarctic, Schöllkrippen)

Zellzählgerät: Casy 1 TT (Schärfe, Reutlingen)

1.2 Einwegmaterial

Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von der Firma Eppendorf, Hamburg, bezogen und, wenn nötig, autoklaviert. Weiteres Einwegmaterial wurde bei den folgenden Firmen erworben:

Blotmembran: Hybond ECL Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Elektrodenpapier: Filterpapier Novablot (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Petrischalen: Ø 10 cm (Greiner, Frickenhausen)

Reaktionsgefäße: für die Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA), chloroformbeständige (Sarstedt, Nümbrecht)

Schraubdeckelgefäße für die Kryokonservierung (Nalgene, Rochester, USA)

steriles Einwegmaterial für die Zell- und Bakterienkultur: Zellkulturschalen mit Nocken: Ø 5 cm, Ø 10 cm und Ø 15 cm (Nunc, Wiesbaden), Zellkulturflaschen mit Filterdeckel: T75 und T25 (Biochrom, Berlin)

Sterilfilter: Porengröße 0,2 µm (Millipore, Eschborn)

1.3 Chemikalien, Medien und Fertiglösungen

Anorganische Säuren, Basen und Salze sowie organische Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Für die Herstellung von Puffern für die proteinbiochemischen Experimente wurde destilliertes Wasser verwendet. Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden in bidestilliertem Wasser hergestellt. Lösungen für die molekularbiologischen oder zellbiologischen Arbeiten wurden vor der Verwendung autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert. Für die Reinigung und Isolierung von DNA wurden folgende Systeme der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt: QIAEX II Gelextraktions-System, Qiagen Plasmid Purification System, QIAquick PCR Purification Kit.

Weitere Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

2-Acetylaminofluoren (Sigma-Aldrich, Deisenhofen und A. Seidel, Mainz)

N-OH-2-Acetylaminofluoren (A. Seidel, Mainz)

2-Aminoanthracen (EGA-Chemie, Steinheim)

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bisacrylamid (Gibco, Eggenstein)

Agarose I (Amresco, Solon, Ohio, USA)

Ampicillin Natriumsalz (Biomol, Hamburg)

2,4-Diaminotoluol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)

DNA-Längenstandard: DNA des Phagen λ , *Eco* RI / *Hin* dIII (MBI Fermentas, Vilnius, Lettland)

dNTPs: 100 mM Mix (Eurobio, Le Ulis, Frankreich)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4500 mg / l D-Glukose und L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat (Gibco BRL, Eggenstein)

ECL Western Blotting Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

fötale Kälberserum: 1070-703-c (Cell Concepts, Umkirch), seit Juni 2002 548 B (Biochrom, Berlin)

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

(-)-S- und (+)-R-1-Hydroxyethylpyren (R. Landsiedel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

1-Hydroxymethylpyren (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Luria broth (LB)-Agar in Pulverform (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

LB-Medium in Pulverform (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol (K&K Laboratories, Cleveland, Ohio, USA)
4-Nitrophenol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
2-Nitropropan (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
[6,7-³H(N)]-17 β -Östradiol 1480 GBq / mmol (NEN-DuPont, Bad Homburg)
17 β -Östradiol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
PBS: Ca⁺⁺ / Mg⁺⁺-freie phosphatgepufferte Salzlösung (Biochrom, Berlin)
Penicillin / Streptomycin: 5000 Einheiten / ml Penicillin G (Na-Salz), 5000 μ g / ml Streptomycin-Sulfat (Gibco BRL, Eggenstein)
3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (S. Singer, University of Dayton, USA, oder H.R. Glatt, DfE, Rehbrücke)
[³⁵S]-3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat: Chargen variieren von 0,4 bis 0,45 mM, 37-111 GBq / mmol (NEN-DuPont, Bad Homburg)
Puromycin (Gibco BRL, Eggenstein)
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V (Biomol, Hamburg)
Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint 2200 (Roth, Karlsruhe)
6-Thioguanin: 2-Amino-6-Mercaptopurin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Trypsin: 0,05% Trypsin in 0,53 mM EDTA x 4Na (Invitrogen, Karlsruhe)
Tween[®]20 (Roth, Karlsruhe)

1.4 Antiseren und Proteinstandards

Bakteriell überexprimierte, gereinigte hSULT1A1, die als Standard für quantitative Immunblotanalysen diente, wurde von W. Teubner (Abteilung Ernährungstoxikologie des DfE, jetzt Universität Potsdam) zur Verfügung gestellt (Teubner, 2001). Für den gleichen Zweck stellte C. Falany freundlicherweise ein gereinigtes Fusionsprotein der hSULT1E1 (mbp-hSULT1E1) zur Verfügung (Falany *et al.*, 1995). Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege und anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Esel wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Weitere Antiseren wurden von den folgenden Forschern freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

hSULT1A1-Peptid-Antiserum aus Kaninchen (Sharp *et al.*, 1993)

hSULT1E1-Antiserum aus Kaninchen (Falany *et al.*, 1995)

rSULT1E1-Antiserum aus Kaninchen (Forbes-Bamforth und Coughtrie, 1994)

hCYP1A2-Antiserum aus Kaninchen (E. Muckel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DfE)

1.5 Enzyme

Cloned *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

Faktor Xa Protease (Promega, Mannheim)

Pwo DNA Polymerase (InViTek, Berlin)

Restriktionsenzyme (MBI Fermentas, Vilnius, Lettland)

T4 DNA Ligase (Gibco BRL, Eggenstein)

1.6 Plasmide

pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, USA)

Weitere Plasmide wurden freundlicherweise von folgenden Forschern zur Verfügung gestellt:

pBSpac Δ p (de la Luna, 1988, A. Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma Cantoblanco, Madrid, Spanien)

pKK233-2-hSULT1A1*1 (Falany *et al.*, 1994)

phSULT1A1*V (Jones *et al.*, 1995)

pMPSV E / H und H / E (Artelt *et al.*, 1988)

pMPSV-rSULT1A1 (M. Hagen, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

pMPSV-hSULT1A2*1 (W. Meinel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

pMPSV-hSULT1A2*2 (W. Meinel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

pMPSV-hSULT1C1 (W. Meinel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

pMPSV-rSULT1E1 (W. Meinel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE)

pKK233-2-hSULT1E1 (Falany *et al.*, 1995)

1.7 Oligonukleotide

Die Firmen InViTek, Berlin, und MWG Biotech, Ebersberg, wurden mit der Oligonukleotidsynthese beauftragt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Methodenteil bei der Beschreibung der Konstruktion der pMPSV-SULT Plasmide aufgeführt.

1.8 Biologisches Material

Epicurian Coli[®] XL1-Blue: kompetente Zellen (Stratagene, Heidelberg)

V79-Mz: Sublinie (Glatt *et al.*, 1987) der etablierten V79-Lungenfibroblastenzelllinie aus einem männlichen Chinesischen Hamster (Ford und Yerganian, 1958), zur Verfügung gestellt von C.F. Arlett (MRC Cell Mutation Unit, University of Sussex, England)

V79p: Sublinie der V79-Mz-Zelllinie, die das Plasmid pBSpac Δ p trägt (Czich *et al.*, 1994)

V79-hCYP1A2: Rekombinante V79-Mz-Zelllinie, welche die Plasmide pSV450h1A1 für die Expression von hCYP1A2 und LK444 (Gunning *et al.*, 1987) für die Expression einer Phosphotransferase trägt, die Resistenz gegenüber G418 verleiht (Wölfel *et al.*, 1992).

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA wurde nach Standardmethoden mit den entsprechenden Systemen der Firma Qiagen isoliert und gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA zu Analysezwecken wurde eine Kolonie von einer Luria broth (LB)-Agarplatte mit Selektionsmarker über Nacht bei 37°C und 200 upm in 3 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin angezüchtet. Für die Transfektion in V79-Zellen wurden 100 µl einer solchen Vorkultur oder 100 µl einer Kryokonserven (B 2.1.6) in 100 ml LB-Medium unter den gleichen Bedingungen über Nacht angezüchtet. Die Bakterien wurden bei 4100 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Die weitere Vorgehensweise folgte dem Protokoll der Firma Qiagen. Für die Transfektion in V79-Zellen und für die Sequenzierung wurde die DNA über Qiagen-Anionenaustauschersäulen gereinigt. Für die Sequenzierung oder die Ligation von PCR-Produkten wurden diese über Agarosegele gereinigt. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus den Agarosegelen ausgeschnitten und eingeschmolzen. Die DNA wurde nach dem QIEX-II-Agarose-Gel-Extraktions-Protokoll durch die Bindung an Silikatgelpartikel extrahiert. Die DNA wurde bei -20°C in Tris / EDTA (TE)-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris / HCl pH 8,0) aufbewahrt. Die Ausbeute wurde photometrisch im Gene Quant II bestimmt.

2.1.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren

TAE-Puffer: 40 mM Tris / HCl, 20 mM NaCH₃COO, 1 mM EDTA pH 7,5

Agarosegele: 1% Agarose in TAE-Puffer (w/v) mit 0,004% (v/v) Ethidiumbromidlösung

Probenpuffer: 50% Glycerin in 10 mM Tris / HCl, Spatelspitze Bromphenolblau / 10 ml Probenpuffer

Reinheit und Größe von PCR-Produkten und Proben aus Restriktionsanalysen wurden mittels Flachbettgelelektrophorese überprüft (Sambrook, 1989). Zur Auftrennung der 0,5 bis 1,5 kb langen DNA Fragmente wurden 1% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Proben wurden 5:1 (v/v) mit Probenpuffer versetzt und bei 70 mA in TAE-Puffer aufgetrennt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid konnte im UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Auswertung und Dokumentation erfolgten mit Hilfe des Eagle Eye Systems.

2.1.3 Polymerasekettenreaktion

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden SULT-cDNAs aus zwei Quellen amplifiziert. Die Amplifikation aus genomischer DNA der V79-SULT-Zellen diente der Überprüfung der Sequenz, die aus dem bakteriellen Plasmid pKK233-2-SULT diente der Gewinnung ausreichender cDNA-Mengen zur Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pMPSV. Hierbei wurden an den Enden der PCR-Produkte durch die Wahl der Oligonukleotide Restriktionsstellen zur Klonierung eingefügt. Oligonukleotidsequenzen und Einzelheiten der PCR-Bedingungen sind unter B 2.1.8 bis 2.1.11 dargestellt.

PCR-Ansatz: 100 ng DNA, 10 pmol je Oligonukleotid, 25 nmol dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 U Polymerase, Gesamtvolumen 50 µl

PCR-Bedingungen: 5 min 94°C, {1 min 94°C, 1 min Hybridisierungstemperatur^a, 2 min 72°C} 30 oder 35 Zyklen, 72°C, 2 min

^aDie optimalen Hybridisierungstemperaturen sind unter B 2.1.8 bis B 2.1.11 beschrieben.

2.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden zur Herstellungen ligierbarer Enden an PCR-Produkten und in Plasmiden und zur Analyse von Vektorkonstrukten eingesetzt. Die Enzyme wurden in den vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffern und Konzentrationen eingesetzt und für 2 h mit der zu verdauenden DNA bei 37°C inkubiert.

2.1.5 Ligation

Für Ligationen wurden die einzufügende cDNA und das Plasmid in einem molaren Verhältnis von 3:1 gemischt und für eine Stunde mit Ligase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Inkubationsansätze von 20 µl enthielten 0,5 U Ligase.

2.1.6 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli* wurden mit 1 µl auf 10 ng / µl verdünnter Plasmid-DNA oder 30 µl eines 1:5 (v/v) verdünnten Ligationsansatzes vorsichtig gemischt, für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in ein auf 42°C vorgeheiztes Wasserbad überführt. Nach 45 s wurden sie mit je 1 ml ampicillinfreiem LB-Medium versetzt und für 30 min bei 200 upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Ansätze und 100 µl aus einer 1:10 (v/v) Verdünnung der Ansätze auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von erfolgreich transfizierten Klonen wurden Kryokonserven angelegt. Dazu wurde eine Bakteriensuspension mit 10% (v/v) DMSO versetzt, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.7 Überprüfung der SULT-Sequenz in V79-Zellen

Für die Präparation genomischer DNA aus V79-Zellen wurden 5×10^6 Zellen trypsiniert (B 2.2.2), in PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Danach wurden die Proben mit 20 µl Qiagen Protease K für 10 min bei 56°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 200 µl absolutem Ethanol versetzt, gründlich gemischt und auf eine QIAamp-Säule aus dem QIAamp DNA Blood Mini Kit geladen. Anschließend wurde die Säule entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen zweimal gewaschen und die DNA wurde in 200 µl H₂O_{dest} eluiert. Die SULT-cDNA wurde mit einer Annealingtemperatur von 55°C und 35 Zyklen mittels PCR amplifiziert. Dabei konnten die gleichen Oligonukleotide verwendet werden wie für die Sequenzierung der pMPSV-hSULT-Konstrukte (B 2.1.8). Die PCR-Produkte wurden sequenziert wie unter B 2.1.8 beschrieben.

2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzen der SULT cDNAs wurden sowohl nach der Klonierung in den Expressionsvektor pMPSV als auch nach der Transfektion in V79-Zellen an PCR-Produkten aus genomischer DNA überprüft. Bis Mai 1998 wurden die Sequenzierungen im eigenen Labor nach der Didesoxykettenabbruchmethode nach Sanger (1977) mit dem Sequenziergerät A.L.F durchgeführt. Danach wurde die Firma InViTek mit den Sequenzierungen beauftragt. Für die Sequenzierung im eigenen Labor wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide eingesetzt. Für die Auftragssequenzierungen konnten unmodifizierte Oligonukleotide verwendet werden, da die Firma fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide einsetzt.

Primersequenz vorwärts: 5'-GTT AAC TGG TAA GTT TAG TC-3'

Primersequenz rückwärts: 5'-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC-3'

2.1.9 Konstruktion von pMPSV-hSULT1E1

Für die Insertion der hSULT1E1 zwischen die Restriktionsschnittstellen *Sal*I und *Hin*dIII des Vektors pMPSV (E / H) wurde die cDNA aus dem Plasmid pKK233-2-hSULT1E1 mittels PCR (B 2.1.3) amplifiziert. Durch die Wahl der Oligonukleotide wurde die Erkennungssequenz für *Sal*I vor dem Startkodon und für *Hin*dIII eingeführt. Für die PCR war eine Hybridisierungstemperatur von 55°C optimal.

Primersequenz vorwärts: 5'-GGA AGT CGA CAA TGA ATT CTG AAC TTG AC-3'

Primersequenz rückwärts: 5'-GTA AAG AAA AAG CTT CTT AGA TCT CAG-3'

Das gereinigte PCR-Produkt wurde in den mit *Sal*I und *Hin*dIII restringierten Vektor pMPSV (H / E) ligiert (B 1.6). Anschließend wurden kompetente Epicurian® Coli XL1-blue mit dem Ligationsansatz transformiert (B 2.1.6). Aus den transformierten Bakterien isolierte Plasmide wurden mithilfe des Restriktionsenzym *Eco*RI, für das zwei Schnittstellen innerhalb der cDNA der hSULT1E1 und eine Schnittstelle im Vektor vorhanden waren, auf die Insertion der hSULT1E1 hin überprüft und anschließend sequenziert (B 2.1.8).

2.1.10 Konstruktion von pMPSV-hSULT1A1*1

Die cDNA für die Konstruktion des pMPSV-hSULT1A1*1-Plasmides wurde ebenfalls mittels PCR aus dem Plasmid pKK233-2-hSULT1A1*1 gewonnen. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen für *Eco*RI und *Hin*dIII eingefügt, die für die Klonierung in den Vektor pMPSV (E / H) genutzt wurden.

Primersequenz vorwärts: 5'-CCC CGA ATT CAG GAA CAT GGA GCA GCT GAT-3'

Primersequenz rückwärts: 5'-CCG GGG ATA AGC TTC CTC TCA CAG-3'

Die korrekte Insertion wurde durch Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Eco*RI, *Hin*dIII und *Bam*HI, für das es zwei Schnittstellen innerhalb der hSULT1A1*1-cDNA gibt, durchgeführt. Anschließend wurden mögliche PCR-bedingte Mutationen durch Sequenzierung des pMPSV-hSULT1A1*1-Konstruktes ausgeschlossen.

2.1.11 Konstruktion von pMPSV-hSULT1A1*V

Für die Konstruktion des Plasmides pMPSV-hSULT1A1*V stand ein Konstrukt zur Verfügung, bei dem die hSULT1A1*V-cDNA bereits in Schnittstellen für *Hin*dIII und *Eco*RI eingefügt war (Jones *et al.*, 1995). Aus einer gereinigten Plasmidpräparation dieses Ausgangskonstruktes wurde die hSULT1A1*V-cDNA mit den besagten

Restriktionsenzymen herausgeschnitten. Der Restriktionsansatz wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (B 2.1.2). Anschließend wurde die hSULT1A1-cDNA aus dem Gel isoliert, gereinigt (B 2.1.1) und in den Vektor pMPSV ligiert (B 2.1.5). Das Konstrukt wurde nach dem gleichen Verfahren wie unter B 2.1.10 beschrieben auf die korrekte Insertion und Sequenz hin überprüft.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen

Komplettmedium: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4500 mg D-Glukose und L-Glutamin ohne Natriumpyruvat, 5% FKS, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin

Alle V79-Zelllinien wurden in Komplettmedium bei 37°C, 8% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Zellkulturschalen und Flaschen wurden mit folgenden Mengen Komplettmedium bestückt: 25 cm²-Flasche mit 5 ml, 75 cm²-Flasche mit 20 ml, 21 cm²-Schale mit 5 ml, 58 cm²-Schale mit 10 ml, 145cm²-Schale mit 30 ml.

2.2.2 Subkultivierung

Trypsinlösung: 0,05% Trypsin, 0,5 M EDTA in Ca⁺⁺ / Mg⁺⁺-freiem PBS-Puffer
PBS: Ca⁺⁺ / Mg⁺⁺-freie Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 54 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Vor dem Erreichen eines vollständig geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen verdünnt. Hierfür mussten sie zunächst mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden. Dazu wurde das Medium entfernt und mit dem gleichen Volumen PBS restliches Medium abgewaschen. Anschließend wurden je nach der Größe der Kulturgefäße 1 bis 3 ml Trypsinlösung auf dem Zellrasen verteilt und danach soviel von der Lösung entfernt, bis der Boden des Gefäßes nur eben noch bedeckt war. Die Zellen wurden 5 min in den Brutschrank gestellt und danach durch einen Schlag vom Gefäßboden abgelöst. Um die proteolytische Aktivität zu beenden, wurden die Zellen in PBS mit 5% FKS oder in Komplettmedium resuspendiert. Das Resuspensionsvolumen betrug mindestens die Hälfte des Kulturvolumens. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine 1:100 (v/v) Verdünnung der Zellsuspension im Zellzählgerät gemessen.

Einstellungen: 60 µm Kapillare, Zählvolumen 3 x 200 µl, Auswertungsbereich
Ø 4-30 µm

Die gewünschte Zellzahl wurde in einem neuen Zellkulturgefäß mit frischem Komplettmedium weiterkultiviert. Stammkulturen wurden zweimal wöchentlich (nach 80 bis 90 h) auf $1,5 \times 10^5$ Zellen / T25 Flasche verdünnt.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Kryolösung: FKS, 10% DMSO, sterilfiltriert

Zur Kryokonservierung wurde eine subkonfluente Kultur trypsiniert (B 2.2.2) und nach der Bestimmung der Zellzahl für 5 min bei $188 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Dichte von $5,5 \times 10^5$ bis 10^6 Zellen / ml in Kryolösung resuspendiert. Aliquote von 1 ml wurden im Zellgefriergerät (C) eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert (Programmierung des Zellgefriergerätes: 20°C Starttemperatur, Abkühlung um $2^\circ\text{C} / \text{min}$ bis 0°C , Halten der Temperatur für 10 min, Abkühlung um $2^\circ\text{C} / \text{min}$ bis -8°C , Abkühlung um $6^\circ\text{C} / \text{min}$ bis -33°C , Halten der Temperatur für 2 min, Abkühlung um $2,5^\circ\text{C}$ bis -28°C , Halten der Temperatur für 2 min, Abkühlung um 2°C bis -86°C , freigehende Abkühlung bis -196°C .). Chargen mit geringen Stückzahlen wurden in einer Styroporbox langsam auf -80°C abgekühlt.

Um eine Zelllinie neu in Kultur zu nehmen, wurde eine Kryokonserven bei 37°C getaut. Die Zellen wurden in 10 ml Komplettmedium überführt und 5 min bei $188 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit einer Pipette in 5 ml Komplettmedium vereinzelt und in eine Kulturflasche T25 gefüllt. Nach 4 h Kultivierung erfolgte ein Medienwechsel zur Entfernung nicht angewachsener Zellen.

2.2.4 Transfektion der SULT in V79-Zellen

Transfektionspuffer: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 0,1% Glukose, 130 mM HEPES pH 7,0 bis 7,1 (eingestellt mit NaOH)

CaCl_2 -Lösung: 2,5 mM CaCl_2

Selektionsmedium: Komplettmedium, 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Puromycin

Am Vortag der Transfektion wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen der Ausgangszelllinie (V79-Mz oder V79-hCYP1A2) in möglichst niedriger Passage in 9 cm^2 Zellkulturschalen subkultiviert und 24 h inkubiert. Zusammen mit den pMPSV-SULT Plasmiden wurde nach der Methode von Doehmer *et. al* (1988) das Plasmid pBSpac Δ p kotransfiziert, welches das für die Selektion notwendige Gen für eine Puromycin-NAT trägt. Der Quotient A_{260} / A_{280} der zu transfizierenden DNA-Präparation lag mindestens bei 1,7. Weniger reine DNA

wurde durch Fällung mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M NaCH₃COO gereinigt. Für einen Transfektionsansatz wurden 1 µg pBSpacΔp und 20 µg pMPSV-SULT mit 1 ml Transfektionspuffer und 54 µl CaCl₂-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildeten sich feine kristallartige Präzipitate, die mit einer Pipette auf den Zellrasen aufgetropft wurden. Die Zellen wurden anschließend weiterkultiviert, wobei nach 4 h ein Medienwechsel erfolgte. Nach 24 h wurden die Transfektanten in 15 Zellkulturschalen (145 cm²) subkultiviert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Innerhalb von 10 bis 14 Tagen wuchsen puromycinresistente Zellen zu Kolonien heran, die im Folgenden als Klone bezeichnet werden. Mindestens 30 Klone wurden mit Klonierungsringsen umschlossen, trypsiniert und in 6-Lochplatten mit 2 ml Kompletmedium pro Loch weiterkultiviert. Sobald sich ein Zellrasen ausgebildet hatte, wurde von jedem Klon mindestens eine Kryokonserven angelegt und aus den restlichen Zellen eine Kultur zur Charakterisierung der SULT-Expression angelegt.

2.2.5 Überprüfung der Stabilität der SULT-Expression

Zur Überprüfung der Stabilität der SULT-Expression wurden die Zellen über mindestens 20 Passagen kultiviert (B.2.2.2). Parallel zu jeder zweiten Stammhaltungspassage wurden zwei Kulturen für die Präparation subzellulärer Fraktionen angelegt und aufgearbeitet (B 2.3.1). Die Proteinkonzentration und die SULT-Aktivität wurden nach den Vorschriften B 2.3.2 und B 2.3.4 bestimmt. Die Stabilität der CYP-Expression wurde im Immunblot (B 2.3.6) nachgewiesen.

2.2.6 Untersuchung der Abhängigkeit der SULT-Expression von der Kulturdauer

Von Zellen aus einer Vorkultur, die entsprechend den Vorkulturen aus dem HPRT-Test (B 4.1) angelegt und inkubiert worden waren, wurden am Tag 1 der Versuchsreihe entsprechend der Vorschrift zur Herstellung subzellulärer Fraktionen (B 2.3.1) 10 Kulturen angelegt. Nach 24, 48, 72, 96 und 120 h wurden je zwei Kulturen geerntet und aufgearbeitet (B 2.3.1). Proteinkonzentration und SULT-Aktivität wurden nach den Vorschriften B 2.3.2 und B 2.3.4 bestimmt, die CYP-Expression wurde im Immunblot (B 2.3.6) charakterisiert.

2.2.7 Wachstumskurven

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der V79-SULT-Zellen wurden Kulturen wie unter B 2.2.6 beschrieben angelegt. Nach 24, 48, 72, 96 und 120 h wurden die Zellen von einer Kultur geerntet und gezählt. Aus der Steigung m der Wachstumskurven, in denen die Zellzahlen in natürlichen Logarithmen dargestellt wurden, wurde die Verdoppelungszeit t_v mit der folgenden Formel bestimmt:

$$(1) \quad t_v = \ln 2 / m$$

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung subzellulärer Fraktionen aus V79-Zellen

KCP-Puffer: 150 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 (wenn nicht anders spezifiziert)

SULT- und CYP-Expression wurden, solange es die Versuchsfrage nicht anders verlangte, in 44 h Kulturen von $1,5 \times 10^6$ Zellen in 145 cm^2 Schalen charakterisiert. Die Zellen wurden wie für die Subkultivierung trypsinisiert, gezählt und bei $319 \times g$ und $4^\circ\text{C} / \text{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml PBS / Schale resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 100 μl KCP-Puffer / Schale aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension $3 \times 10 \text{ s}$ mit Unterbrechungen von je mindestens 30 s auf Eis sonifiziert und danach 60 min bei $100000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Hierbei wurde eine lösliche Fraktion erhalten, die cytosolische Proteine enthielt und im Folgenden Cytosol genannt wird. Die unlösliche Fraktion wurde in 100 μl KCP-Puffer / Schale resuspendiert und zur Analyse von hCYP1A2 im Immunblot verwendet. Die subzellulären Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Proteinbestimmung

Kupfersulfatlösung: 98 ml 0,1 M NaOH mit 2% (w/v) Na_2CO_3 , 1 ml 2% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 1 ml 2% (w/v) K / Na-Tartrat

Folin-Lösung: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1:2 (v/v) mit H_2O verdünnt

Proteinkonzentrationen in subzellulären Fraktionen wurden photometrisch nach Lowry *et al.* (1951) oder nach dem Protokoll der Firma Pierce mit Bicinchonsäure (BCA)

durchgeführt (Smith *et al.*, 1985). Die Proben wurden je nach der zu erwartenden Proteinkonzentration 1:100, 1:200 oder 1:500 (v/v) verdünnt. Je 500 µl Probe wurden mit 2,5 ml Kupfersulfatlösung versetzt und sofort gevortext. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,25 ml Folin-Lösung zugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 660 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Kalibrierreihe mit BSA in Konzentrationen von 0,02 bis 0,2 mg BSA / ml ermittelt, die bei jeder Proteinbestimmung mitgeführt wurde.

2.3.3 Spaltung des Fusionsproteins mbp-hSULT1E1

Faktor Xa-Puffer (10x): 1 M NaCl, 200 mM Tris / HCl, pH 8

Für quantitative Immunblotanalysen wurde das Fusionsprotein mit Protease Faktor Xa gespalten. Die Proteinbestimmung der Ausgangslösung des Fusionsproteins ergab 3,13 mg / ml. Bei einem Molekulargewicht von 35,123 kDa für hSULT1E1 (Falany *et al.*, 1995) und 41,6 kDa für das maltosebindende Protein (Firma NEB) entspricht 1 µg des Fusionsproteins 0,458 µg reiner hSULT1E1. Es wurden 25 µg des Fusionsproteins mit 10 µl Faktor Xa-Puffer (10fach) und unterschiedlichen Mengen der Faktor Xa Proteaselösung [2,5 µl (2%), 6 µl (4,8%), 12 µl (9,6%), 0 µl (0%)] in einem Reaktionsansatz von 100 µl Gesamtvolumen 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 40 µl Aceton gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz im Vakuum getrocknet, und das Spaltprodukt wurde in 20 µl Probenpuffer für die Polyacrylamidgelelektrophorese (B 2.3.5) aufgenommen.

2.3.4 Messung der SULT-Aktivität

2.3.4.1 Radioaktiv markiertes Kosubstrat

| | |
|-----------------|--|
| Kofaktorlösung: | 4 µM PAPS, 1 µM PAP ³⁵ S |
| Stopplösung 1: | 0,1 M Ba(CH ₃ COO) ₂ |
| Stopplösung 2: | 0,1 M Ba(OH) ₂ |
| Stopplösung 3: | 0,1 M ZnSO ₄ |

Die SULT-Aktivität im Cytosol der V79-Zellen wurde bei den Substraten, die nicht radiomarkiert erhältlich waren, mit ³⁵S-markiertem PAPS bestimmt (Foldes und Meek, 1973). Die Methode beruht auf der Trennung der durch die enzymatische Sulfonierung radioaktiv markierten Produkte von nicht verbrauchtem Kofaktor und anorganischem

$^{35}\text{SO}_4^{2-}$, indem letztere als schwerlösliche Bariumsalze präzipitiert werden. Hierfür wurden folgende Lösungen angesetzt:

Für eine Inkubation wurden 0,1 bis 50 μg cytosolisches Protein in KCP-Puffer (B 2.3.1) mit 20 μl der Kofaktorstofflösung (50 pmol PAP^{35}S / PAPS)

gemischt und nach dem Starten der Reaktion durch Substratzugabe für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Gesamtvolumen: 150 μl). Zur Bestimmung des Leerwerts wurde statt Substrat das gleiche Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ zu einem Ansatz zugegeben. Die Reaktion wurde durch Fällung mit je 200 μl $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$, und ZnSO_4 -Lösung in dieser Reihenfolge gestoppt und die Bariumsalze durch Zentrifugation bei 15800 x g für 3 min abgetrennt. Die in jedem Ansatz eingesetzte Gesamtaktivität wurde in einer Probe gemessen, bei der anstelle der Fällungslösungen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ zugesetzt wurde (100%-Wert). Ein Aliquot (200 μl) des Überstandes oder des 100%-Wertes wurden in 400 μl Szintillationsflüssigkeit im Szintillationsmessgerät gemessen. Die Produktbildung [pmol / mg / min] wurde nach der Formel (2) aus den Zählwerten pro Minute (cpm) berechnet:

$$(2) \text{ Produktbildung [pmol / mg / min]} = \frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blindwert}}) \times \text{pmol}_{\text{PAPS}}}{\text{cpm}_{100\% - \text{Wert}} \times \text{min}_{\text{Inkubationszeit}} \times \text{mg}_{\text{Protein}}}$$

2.3.4.2 Radioaktiv markierte Substrate

| | |
|--------------------------------------|---|
| Reaktionspuffer: | 100 mM Tris / HCl, pH 7,5 |
| MgCl ₂ -Lösung: | 175 mM MgCl ₂ |
| PAPS-Lösung: | 250 μM PAPS |
| Stopplösung: | 0,25 M Tris / HCl pH 8,7 |
| β -Östradiol-Lösung: | 5000 μM in DMSO, Verdünnung im Reaktionsansatz auf 0,6% DMSO |
| [³ H] β -Östradiol | 25 μM in Ethanol, 1480 GBq / mmol |

Für die Messung des Umsatzes von β -Östradiol wurde ³H-markiertes Substrat eingesetzt (Falany *et al.*, 1995). Bei dieser Methode wird die Erhöhung der Wasserlöslichkeit durch Sulfonierung ausgenutzt. Beim Ausschütteln mit Chloroform bleibt das Produkt in der wässrigen Phase, während das Edukt mit der organischen Phase aus dem Reaktionsansatz entfernt wird. Es wurden 0,1 bis 2 μg cytosolisches Protein in einem Puffervolumen von 75 μl mit 1,5 pmol β -Östradiol / [³H] β -Östradiol (0,1 μCi) und 5 nmol PAPS für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 250 μl . Der Reaktionsstart

erfolgte durch die Zugabe von PAPS. In den Leerwert wurde statt PAPS-Lösung $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ pipettiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden 250 μl Tris / HCl-Puffer und 3 ml Chloroform zugegeben. Die Phasen wurden 2 min kräftig ausgeschüttelt und anschließend durch Zentrifugation bei 1500 $\times g$ für 3 min getrennt. Ein Aliquot (200 μl) der wässrigen oberen Phase wurde in 4 ml Szintillationslösung im Szintillationszähler gemessen. Die eingesetzte Gesamtradioaktivität wurde in einer Probe ohne Protein und Chloroform bestimmt (100%-Wert). Die Berechnung des Umsatzes erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Substratmenge anstelle der Kofaktormenge in die Rechnung einging.

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

| | |
|-------------------------|--|
| Trenngelpuffer: | 1,5 M Tris / HCl, 0,4% SDS, pH 8,8 |
| Sammelgelpuffer: | 50 mM Tris / HCl, 0,4% SDS, pH 6,8 |
| Solubilisierungspuffer: | 62,5 mM Tris / HCl pH 6,8, 2% SDS (w/v), 20% Glycerin (v/v), 5% (v/v) Mercaptoethanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau |
| Laufpuffer: | 25 mM Tris / HCl, 120 mM Glycin, 0,1% SDS |
| Ammoniumpersulfat: | 20 mg / ml |

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine der subzellulären Fraktionen von V79-Zellen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Es wurden Trenngele mit 11% und Sammelgele mit 3% Acrylamidlösung in einer Lösung mit 25% Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer verwendet. Beide Gele wurden mit 20 μl *N,N,N,N'*-Tetramethylethyldiamin und 0,3 mg / ml Ammoniumpersulfat in einer Fläche von 20 cm^2 und 1,5 mm Dicke polymerisiert. Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine mit Solubilisierungspuffer 5 min gekocht.

Die Elektrophorese wurde bei 25 mA gestartet. Sobald die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde die Stromstärke auf 70 mA erhöht. Die Trennung wurde nach etwa 3 h, wenn die Lauffront 0,5 bis 1 cm vom unteren Gelrand entfernt war, beendet.

2.3.6 Western-Blot und Immundetektion

| | |
|---------------------|---|
| Kathodenpuffer: | 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 0,01% SDS, 20% Methanol |
| Anodenpuffer I: | 0,3 M Tris / HCl, pH 10,5, 20% Methanol |
| Anodenpuffer II: | 25 mM Tris / HCl, pH 8,5, 20% Methanol |
| TBST (10x): | 200 mM Tris / HCl, pH 9,0, 140 mM NaCl, 0,1% (w/v) Tween [®] 20 |
| TBS (10x): | 200 mM Tris / HCl, pH 7,5, 140 mM NaCl |
| Blockierungslösung: | 2% BSA in 1xTBST (für das hCYP1A2-Antiserum 1% BSA und 1% Milchpulver in 1xTBS) |

Antiseren: Verdünnung in 1xTBST mit 1% BSA (hCYP1A2-Antiserum in 1% Milchpulver in 1xTBS)

rSULT1E1-Antiserum 1:2500 (v/v)

hSULT1E1-Antiserum 1:2000 (v/v)

hSULT1A1-Peptid-Antiserum 1:2000 (v/v)

hCYP1A2-Antiserum 1:2000 (v/v)

anti-Kaninchen-IgG-Peroxidasekonjugat (1:2000) (v/v)

anti-Schaf-IgG-Peroxidasekonjugat (1:2000) (v/v)

Zur weiteren Analyse wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit dem halbtrockenen Elektrobloß-System (Kyhse-Andersen, 1984) auf Nitrocellulosemembran überführt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 0,8 mA / cm² über 2 h. Die Membran wurde zunächst 30 min in Blockierungslösung geschwenkt, um alle Proteinbindungsplätze auf der Membran abzusättigen und so unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Für die immunologische Detektion wurde die Membran 1 h mit dem ersten Antiserum (anti-SULT oder anti-CYP) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen in 1 x TBST (5 x 6 min) entfernt. Um die Proteinbanden sichtbar machen zu können, wurde die Membran danach 1 h mit dem zweiten Antikörper (anti-Kaninchen- oder anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen für 5 x 6 min in 1 x TBST wurde die Membran leicht getrocknet und dem ECL-Protokoll der Firma Amersham folgend 1 min in ECL-Detektionslösung geschwenkt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Dieses wird dabei in einen chemolumineszierenden Zustand versetzt, der durch Schwärzung von Filmen nachweisbar ist. Die Expositionszeiten betragen zwischen 15 s und 5 min. Die Filme wurden bis Mai 1999 von Hand entwickelt. Ab September 2000 wurde die Chemolumineszenz mithilfe des Luminiszenz Analyse Gerätes (FujiFilm) sichtbar gemacht und computergestützt ausgewertet.

2.4 Toxikologische Testmethode

2.4.1 Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Genmutationstest

HAT-Medium: 0,4 µM Aminopterin, 0,1 mM Hypoxanthin, 0,016 mM Thymidin, 0,1 mM Glycin in Kompletmedium

6-Thioguanin-Medium: 42 µM 6-Thioguanin in Kompletmedium

Der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Genmutationstest (HPRT-Test) wurde entsprechend den für V79-Zellen entwickelten Richtlinien (OECD, 1997)

durchgeführt (Glatt, 1993b; Glatt *et al.*, 1998a). Genmutationen am *hprt*-Locus werden bei diesem Test durch vererbare Funktionsänderungen der HPRT nachgewiesen. Zellen mit intakter HPRT verstoffwechseln das Selektionsagenz 6-Thioguanin zu einem cytotoxischen Metaboliten und sterben ab. HPRT-defiziente Zellen bleiben hingegen unter dem Einfluss von 6-Thioguanin teilungsfähig. Die Nukleotidsynthese erfolgt in diesen Zellen nicht über das Recycling von Basen, sondern über den alternativen Weg der *de novo* Synthese.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen während zwei Stammkulturpassagen (B 2.2.2) in HAT-Medium kultiviert, um spontane *hprt*⁻-Mutanten zu eliminieren. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden Vorkulturen von 10⁶ Zellen in T75 Flaschen angelegt, um ausreichende Zellzahlen für den Mutagenitätstest zu erhalten. An Tag 1 des Versuchs wurden die Zellen auf 1,5 x 10⁶ Zellen / 145 cm² Schale verdünnt. Dabei wurden zwei Kulturen für jede Konzentration einer Substanz (in der Regel pro Test zwei Substanzen in fünf Konzentrationen), drei Kulturen für die Lösungsmittelkontrollen und zwei Kulturen für die Positivkontrollen angelegt. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die Testsubstanzen zugegeben. Als Positivkontrolle wurde *anti*-Chrysen-1,2-dihydrodiol-3,4-oxid, das ohne metabolische Aktivierung mutagen wirkt, in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Alle Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst. Als Positivkontrolle für CYP1A2-Aktivität wurde Benzo[a]pyren-*trans*-7,8-dihydrodiol in einer Konzentration von 3 µM in Aceton eingesetzt. Der Volumenanteil des Lösungsmittels im Medium betrug 0,2%. Die Zellen wurden mit der Testsubstanz für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Testsubstanz entfernt. Zu jeder Kultur wurde nach zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS 10 ml frisches Komplettmedium zugegeben. Vor der nächsten Subkultivierung wurden die Zellen 48 h weiterkultiviert, in denen sich mögliche Mutationen manifestieren konnten. Anschließend wurden die Zellen von den Kulturschalen abgelöst und die Zellzahlen bestimmt. Die Zellzahlen bei dieser ersten Subkultivierung dienten der Erfassung der Cytotoxizität der Testsubstanz. Für jede Kultur wurde eine neue Kultur mit 3 x 10⁶ Zellen / 145 cm² Schale angelegt. Da für die Toxifizierung des 6-Thioguanin sehr geringe Mengen an HPRT ausreichen, wurden die Zellen anschließend für 72 h weiterkultiviert, um den Abbau der noch vorhandenen HPRT abzuwarten. Bei der anschließenden zweiten Subkultivierung wurden ebenfalls die Zellzahlen pro Kulturschale bestimmt und protokolliert, und es wurden für jede Kultur sechs neue Kulturen von je 10⁶ Zellen in 6-Thioguanin-Medium in 145 cm² Schalen angelegt. Parallel dazu wurde die Kloniereffizienz der Kulturen geprüft. Dazu wurden von jeder Kultur drei Subkulturen von 100 Zellen in 21 cm² Schalen mit Komplettmedium angelegt. Nach 10tägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien auf Selektions- und Kloniereffizienzschalen mit Methanol oder vergälltem Alkohol fixiert, mit Giemsa-Lösung gefärbt und ausgezählt.

Die Mutantenhäufigkeit (MF) pro 10^6 Zellen einer Kultur wurde nach folgender Formel (3) aus den mittleren Kolonienzahlen berechnet:

$$(3) \quad MF = \frac{\text{Kolonien}_{\text{Selektionsplatten}}}{\text{Kolonien}_{\text{Kloniereffizienzplatten}}} \times 10^{-4}$$

Als MF_0 wird im Folgenden die Frequenz spontan 6-Thioguanin-resistenter Zellen in den Lösungsmittelkontrollen bezeichnet, als ΔMF der absolute Anstieg der MF ($MF - MF_0$). Kriterien für die Akzeptanz eines HPRT-Tests waren eine durchschnittliche Zellzahl bei der ersten Subkultivierung von mindestens 15×10^6 pro Kultur in den Lösungsmittelkontrollen und das Erreichen von mindestens 10% der Zellzahl der Lösungsmittelkontrollen in den mit Substanz behandelten Kulturen. Ferner wurden Experimente von der Auswertung ausgeschlossen, bei denen die Kloniereffizienz geringer als 30% oder MF_0 größer als 15×10^{-6} war. In Experimenten mit den rekombinanten Zelllinien wurden die SULT-Aktivität im Cytosol parallel angesetzter Kulturen [radiometrische Aktivitätsmessung (B 2.3.4)] in SULT-exprimierenden Zelllinien und die Aktivierung von $3 \mu\text{M}$ BP-7,8-diol zum Mutagen ($MF_{\text{BP-7,8-diol}} - MF_0 \geq 100 \times 10^{-6}$) in den CYP-exprimierenden Zelllinien als weitere Kriterien für gültige Experimente herangezogen. Wurden diese Parameter nicht bestimmt, so wurden nur Tests mit deutlicher SULT- oder CYP-abhängiger Aktivierung der Testsubstanz gewertet. Eine Substanz wurde als mutagen bezeichnet, wenn ΔMF -Werte von mindestens 20×10^{-6} annahm und der Effekt dosisabhängig und reproduzierbar war. Erreichte ΔMF lediglich bei einem Punkt der Dosis-Wirkungskurve reproduzierbar diese Werte, so wurde auf diesen Effekt ausdrücklich hingewiesen. Die Auswertung der Mutagenitätsuntersuchungen erfolgte rein deskriptiv nach den genannten Kriterien. Die Daten ließen klare qualitative Aussagen bezüglich der Mutagenität der geprüften Substanzen zu. Auf eine weitere statistische Analyse der Ergebnisse wurde verzichtet, da für den HPRT-Genmutationstest keine befriedigenden statistischen Analyseverfahren existieren (Glatt, 1993b).

C Ergebnisse

1. Konstruktion SULT-profizienter Zelllinien

In dieser Arbeit wurden vier Phenol-SULT des Menschen (hSULT1A1, hSULT1A2, hSULT1E1, hSULT1C1) und die wichtigsten allelischen Varianten der hSULT1A1 und der hSULT1A2 stabil in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters exprimiert. Die hSULT1E1 wurde nur allein in V79-Zellen exprimiert, während für die beiden allelischen Varianten der hSULT1A1 außerdem hCYP1A2-hSULT-Koexpressionszelllinien konstruiert wurden. Die beiden allelischen Varianten der hSULT1A2 und die hSULT1C1 wurden lediglich in der Kombination mit hCYP1A2 exprimiert. Außerdem wurden zwei Zelllinien für die Expression der rSULT1E1 und rSULT1A1 etabliert, die aber weniger genau charakterisiert wurden als die Zelllinien, die hSULT exprimieren.

1.1 Konstruktion der pMPSV-SULT-Expressionsvektoren

Für die heterologe Expression in V79-Zellen mussten Konstrukte der cDNA der einzelnen SULT-Formen in einem eukaryotischen Expressionsvektor hergestellt werden. Um eine vollständige Reihe untereinander vergleichbarer Zelllinien für hSULT und rSULT zu erhalten, wurde der Vektor pMPSV (Artelt *et al.*, 1988) gewählt, mit dem bereits die hSULT2A1 sowie die rSULT2A1 und die rSULT1C1 erfolgreich in V79-Zellen zur Expression gebracht worden waren (Czich *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995; Glatt *et al.*, 1998b). Die SULT-cDNA-Quellen und Insertionsschnittstellen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Mit den in B 2.1.9 bis B 2.1.11 aufgeführten Oligonukleotiden wurden mittels ortsgerechter Mutagenese in einer PCR (B 2.1.3) geeignete Restriktionsschnittstellen an die SULT-cDNA angefügt. Nach Ligation der SULT-cDNA in pMPSV (B 2.1.5) wurden die pMPSV-SULT-Konstrukte unter Ampicillinselektion in *E. coli* vermehrt. Ein Schema der pMPSV-SULT-Konstrukte zeigt Abb. 5. Für die Transfektion in V79-Zellen wurde Plasmid-DNA aus einem isolierten bakteriellen Klon präpariert und gereinigt (B 2.1.1).

Tabelle 4: Konstruktion von pMPSV-SULT

| SULT | Genbank Nr. | cDNA-Quelle | Insertions- schnittstelle in pMPSV | Insertion in pMPSV |
|-------------------|---------------------|--------------------------------|--|-----------------------|
| h1A1*1 | X78283 | Falany <i>et al.</i> , 1994 | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | vorliegende Arbeit |
| h1A1*2 | U09031 ^a | Coughtrie, unveröffentlicht | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | W. Meinl |
| h1A1*V | X84654 | Jones <i>et al.</i> , 1995 | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | vorliegende Arbeit |
| h1A2*1 | U28169 | Meinl <i>et al.</i> , 2002 | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | W. Meinl |
| h1A2*2 | U28170 | Meinl <i>et al.</i> , 2002 | <i>Eco</i> RI / <i>Sal</i> I | W. Meinl |
| h1C1 | U66036 | Meinl, unveröffentlicht | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | W. Meinl |
| h1E1 | S77383 | Falany <i>et al.</i> , 1995 | <i>Sal</i> I / <i>Hin</i> dIII | vorliegende Arbeit |
| r1A1 ^b | L19998 | Hirshey <i>et al.</i> , 1992 | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | M. Hagen |
| r1E1 ^c | U50204 | Meinl, unveröffentlicht | <i>Eco</i> RI / <i>Hin</i> dIII | W. Meinl |

^a Sequenz zeigt zudem zwei synonyme Nukleotidaustausche gegenüber der Referenzsequenz *1 (C153 zu T, G 162 zu A), die im pMPSV-Konstrukt nicht vorhanden sind.

^b Sequenz im pMPSV-Vektor zeigt zwei synonyme Nukleotidaustausche gegenüber der Referenzsequenz (G 531 zu A und A 712 zu C).

^c Sequenz im pMPSV-Vektor weicht von der Referenzsequenz durch einen Einzelnukleotidaustausch (T 52 zu G) ab, der zu einem Aminosäureaustausch von Phe zu Val führt.

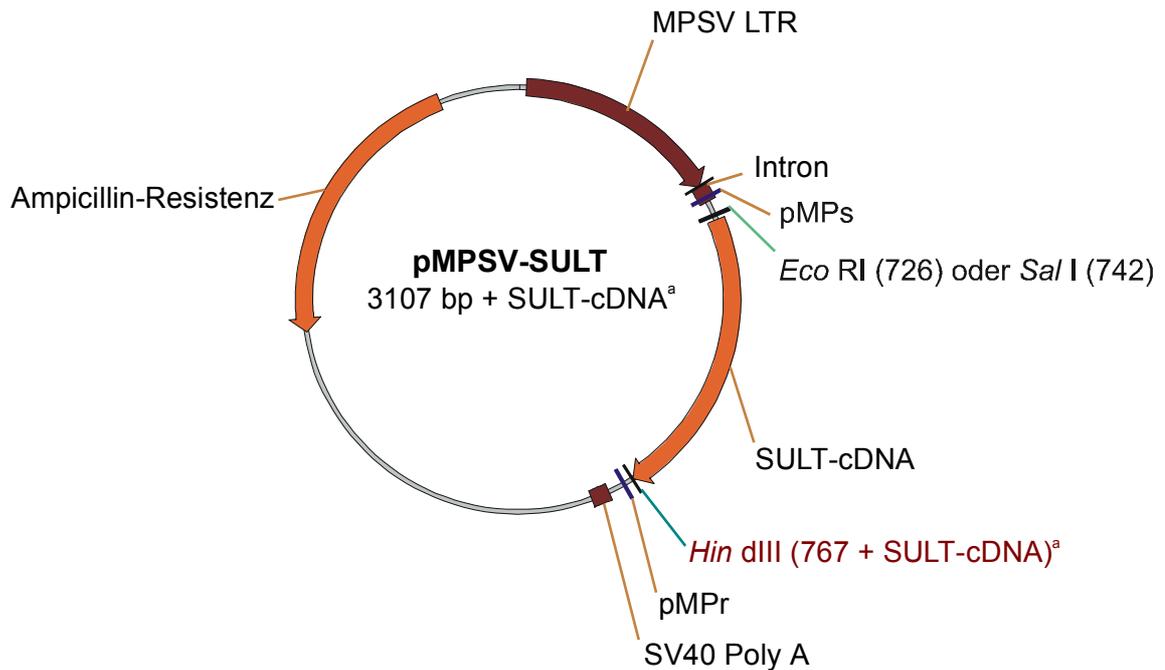


Abb. 5: Schema des Vektors pMPSV-SULT

^a bei Verwendung der *Sal* I-Schnittstelle für die Insertion 16 bp mehr

MPSV LTR: Long terminal repeat des *Myeloproliferativen Sarcomavirus*

SV 40 Poly A: Polyadenylierungs-Signal des *Simian Virus 40*

pMPr / pMPs: Sequenzen der Primer für die Reamplifizierung der SULT-cDNA für die Sequenzierung (B 2.1.7)

1.2 Transfektion in V79-Zellen und Selektion SULT-positiver Klone

Die pMPSV-SULT Konstrukte für hSULT1A1*1, hSULT1A1*V, hSULT1E1, rSULT1A1 und rSULT1E1 wurden in V79-Mz-Zellen transfiziert. Für die Etablierung der hCYP1A2-hSULT-Koexpressionszelllinien wurden pMPSV-hSULT1A1*1, -hSULT1A1*2, -hSULT1A2*1, -hSULT1A2*2 und -hSULT1C1 in V79-hCYP1A2-Zellen (Wölfel *et al.*, 1992) transfiziert. Die Zelllinie V79-hCYP1A2 ist eine Transfektante von V79-Mz, die hCYP1A2 sowie eine Phosphotransferase für die Resistenz gegenüber G418 exprimiert. Die hierfür verwendeten Expressionsvektoren sind in Abb. 6 dargestellt. Der Expressionsvektor für hCYP1A2 war pSV2-gpt (Mulligan und Berg, 1981). Die Originalbezeichnung des veröffentlichten Klons lautet XEMhIA2-Mz. Die Bezeichnungen der in der vorliegenden Arbeit etablierten Zelllinien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

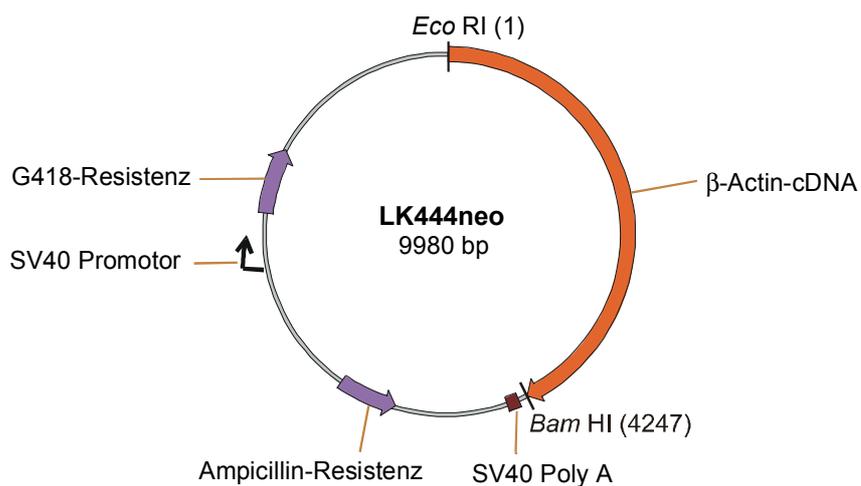
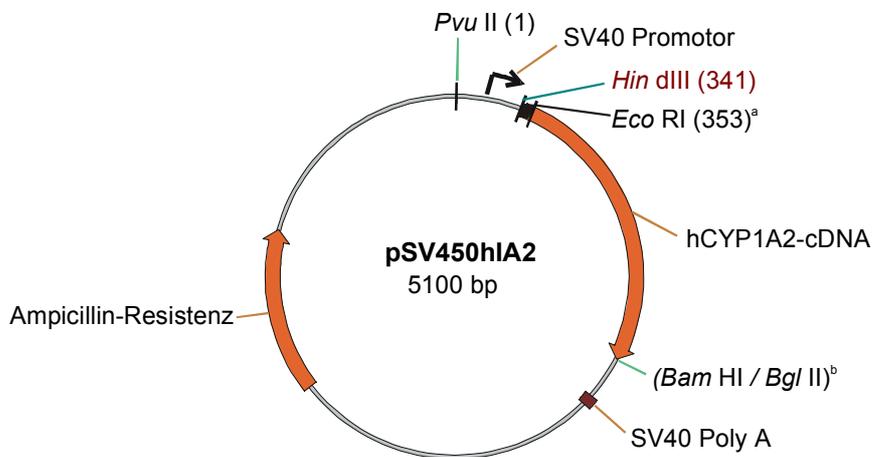
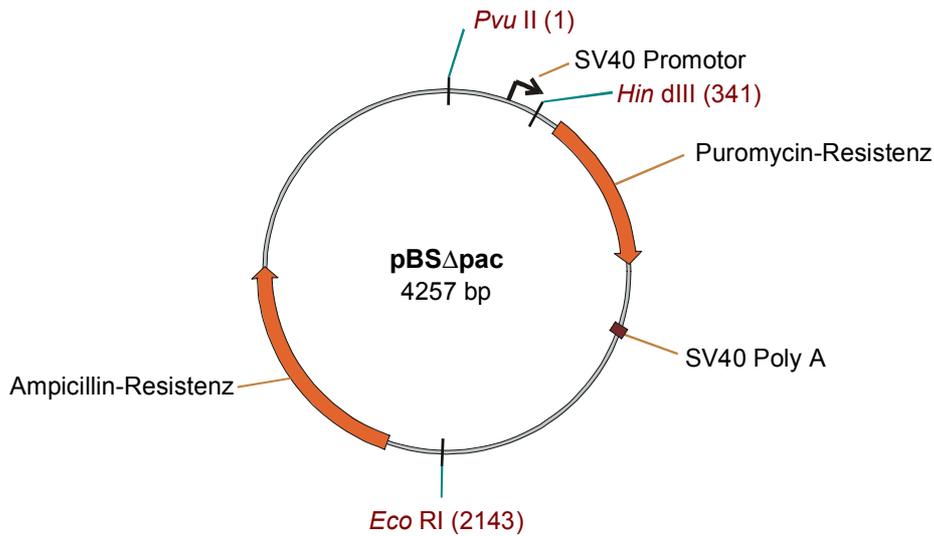


Abb. 6: Schema der Vektoren für die Expression der Puromycin-Resistenz (Δ pBSpac), der G418-Resistenz (LK444neo) und des hCYP1A2 (pSV450h1A2)

^aSchnittstelle stammt aus der Subklonierung in SK⁺Blueskript (Wölfel *et al.*, 1992)

^bSchnittstelle ist nicht mehr verwendbar

Da der Vektor pMPSV kein Resistenzgen gegen ein in eukaryotischen Zellen wirksames Antibiotikum trug, wurde bei der Transfektion von pMPSV-SULT der Vektor Δ pBSpac kotransfiziert (Abb. 6). Dieser kodiert für eine NAT, die Resistenz gegenüber Puromycin verleiht. Alle vorhandenen oder mindestens 20 der puromycinresistenten Transfektanten wurden isoliert und expandiert (B 2.2.4). Anschließend wurde die cytosolische Fraktion der einzelnen Klone mittels Immunblot und radiometrischen Aktivitätsmessungen auf die Expression von SULT hin untersucht. Einen Aufschluss über das Verhältnis zwischen puromycinresistenten und SULT-exprimierenden Klonen gibt Tabelle 5. Bei einigen Transfektionen waren mehr als 50% der puromycinresistenten Klone SULT-positiv, bei anderen wurden in mehreren aufeinander folgenden Transfektionen nur sehr wenige SULT-exprimierende Klone gefunden (z.B. V79-hCYP1A2-hSULT1C1).

Tabelle 5: Transfektionen von pMPSV-SULT in V79- und V79-hCYP1A2-Zellen

| Zelllinie ^a V79- | Anzahl untersuchter Klone | Anzahl SULT-positiver Klone | Bezeichnung des ausgewählten Klons |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| hSULT1A1*1 | 15 | 5 | 5 |
| hSULT1A1*V | 5 | 1 | 4 |
| hSULT1E1 | 25 | 3 | 16 |
| hCYP1A2-hSULT1A1*1 | 33 | 18 | 36 |
| hCYP1A2-hSULT1A1*2 | 33 | 16 | 7 |
| hCYP1A2-hSULT1A2*1 | 35 | 24 | 32 |
| hCYP1A2-hSULT1A2*2 | 24 | 9 | 12 |
| hCYP1A2-SULT1C1 | 38 | 2 | 10 |
| rSULT1A1 | 16 | 2 | 15 |

^aunter V79 ist immer V79-Mz zu verstehen.

Da bei der eingesetzten Methode der Insertionsort der cDNA in die genomische DNA zufällig ist, war eine starke Variabilität des Expressionsniveaus zwischen verschiedenen Klonen einer Transfektion zu erwarten. Zunächst wurden diejenigen Zellklone ermittelt, welche die stärkste Expression der jeweiligen SULT-Form aufwiesen. In den Klonen der Koexpressionszelllinien wurde außerdem überprüft, ob das Expressionsniveau von hCYP1A2 mit der Ausgangszelllinie vergleichbar war (C 2.3.3.2). Da eine Beeinträchtigung endogener Gene der V79-Zellen durch den Einbau der Fremd-DNA möglich ist, können verschiedene Funktionen nach der Transfektion verändert und von Zellklon zu Zellklon unterschiedlich sein. Dies kann sich unter anderem in der Veränderung der Wachstumseigenschaften oder in der Stabilität der Expression niederschlagen. Auf diese beiden Parameter hin wurden die selektierten Klone weiter

charakterisiert (C 2.3). Erwies sich ein Klon in weiteren Untersuchungen als ungeeignet, wurde ein neuer Klon für die Charakterisierung ausgewählt. Für rSULT1A1, hSULT1A1*1 und hSULT1C1 waren mehrere Transfektionen erforderlich, um geeignete Klone ausfindig zu machen. In den folgenden Abschnitten ist unter dem Namen der jeweiligen Zelllinie der Klon zu verstehen, der in Tabelle 5 aufgeführt ist. Nur für V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 wurde in einigen Mutagenitätsuntersuchungen auch ein anderer Klon eingesetzt (V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 Klon 4).

2. Charakterisierung der gentechnisch veränderten Zelllinien

Die SULT-positiven Klone aus den Transfektionen in V79-Mz- und V79-hCYP1A2-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften und der SULT- und CYP-Expression eingehend charakterisiert. Als Kontrollzelllinien hierfür dienten V79p-Zellen (B 1.8), die lediglich das für Puromycinresistenz kodierende Plasmid Δ pBSpac besitzen, das auch bei der Etablierung der SULT-exprimierenden Zelllinien kotransfiziert wurde. Die Kontrollzelllinie für die V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien war die hCYP1A2-exprimierende Sublinie von V79-Mz, die als Ausgangszelllinie für die SULT-Koexpressionszelllinien verwendet worden war.

2.1 Basensequenz der SULT in genomischer DNA der V79-SULT-Zellen

Zur Prüfung der Basensequenz der in das Genom der V79-Zellen eingefügten SULT-cDNA wurden PCR-Amplifikate von genomischer DNA der Transfektanten hergestellt und sequenziert (B 2.1.8). Mit dieser Methode wurde die korrekte SULT-Sequenz in V79-hSULT1E1, V79-rSULT1E1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 und V79-hCYP1A2-hSULT1C1 nachgewiesen (Genbank Nr. in Tabelle 4).

2.2 Wachstumseigenschaften

Bei einem HPRT-Test sind mehrere Subkultivierungsschritte und Phasen der Zellvermehrung notwendig. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass für die Ausprägung des Phänotyps der HPRT-Defizienz eine starke Ausdünnung der HPRT notwendig ist, da schon sehr geringe Mengen des Enzyms zur Giftung von 6-Thioguanin genügen. Während der Vermehrungsphasen können sich auch die HPRT-defizienten Zellen vermehren, weswegen die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellpopulation das Ergebnis des Tests beeinflussen kann. Bei einem starken Abweichen des Wachstumsverhaltens der

gentechnisch veränderten Zellen von den Wildtypzellen wäre eine Anpassung des Testprotokolls in Bezug auf die Dauer der Wachstumsphasen zwischen den Subkultivierungen sowie die Einsaatdichte notwendig. Nach dem Standardprotokoll des Labors für den HPRT-Genmutationstest werden die Zellen nach der Einsaat 18 h inkubiert, bevor die Testsubstanz zugegeben wird. In dieser Zeit heften sich die Zellen an die Kulturgefäße und beginnen sich zu teilen.

Tabelle 6: Wachstumseigenschaften der rekombinanten Zelllinien

Aus zwei bis vier Ausgangskulturen wurden jeweils Subkulturen für die Zellzählungen zu den einzelnen Zeitpunkten angelegt. Die Steigungen der Wachstumskurven wurden aus den zu einer Ausgangskultur gehörigen Subkulturen getrennt ermittelt und die Verdoppelungszeiten daraus wie unter B 2.2.7 beschrieben berechnet. Die Werte sind Mittelwerte \pm SE der Verdoppelungszeiten für das 0-48 h Intervall aus der angegebenen Anzahl an Ausgangskulturen (n).

| Zelllinie | n | Verdoppelungszeit, h |
|------------------------|---|----------------------|
| V79-hSULT1A1*1 | 3 | 16,5 \pm 0,3 |
| V79-hSULT1A1*V | 2 | 18,4 \pm 0,9 |
| V79-hSULT1E1 | 2 | 14,7 \pm 0,3 |
| V79-rSULT1A1 | 2 | 13,7 \pm 0,1 |
| V79p | 2 | 21,7 \pm 2,0 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 | 4 | 16,2 \pm 0,7 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 | 2 | 20,7 \pm 0,5 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 | 2 | 18,6 \pm 0,1 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 | 2 | 17,3 \pm 0,1 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1C1 | 2 | 20,3 \pm 1,3 |
| V79-hCYP1A2 | 4 | 23,5 \pm 1,3 |

Um eine ausreichende Zahl von Mutationen im *hprt*-Gen auch im nicht toxischen Konzentrationsbereich der Testsubstanz statistisch zu ermöglichen und um eine zu starke Dezimierung der Zellpopulation bei Toxizität zu vermeiden, darf die Zellzahl während der Exposition nicht zu gering sein. Andererseits muss in den Kulturschalen genügend Platz für weitere Zellteilungen zur Expression des neuen Genotyps sein. Um den gesamten Zeitraum von der Einsaat bis zur ersten Subkultivierung abzudecken, wurden Wachstumskurven der Zelllinien über 120 h mit Messpunkten im Abstand von 24 h unter den Kulturbedingungen, die im HPRT-Test herrschen, aufgenommen (Abb. 7). Die Verdoppelungszeiten im 0-48 h-Intervall (Tabelle 6) lagen etwas über dem Literaturwert für V79-Zellen von 12 h (Glatt, 1993b). Beide Kontrollzelllinien, V79p und V79-hCYP1A2,

vermehrten sich im 0-24 h-Intervall langsamer als die SULT-profizienten Zelllinien (Abb. 7). Da die Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien sich bereits nach 48 h angeglichen, wurde für die gentechnisch veränderten Zelllinien keine Veränderung des Protokolls für den HPRT-Test vorgenommen. Zwischen 96 und 120 h Kulturdauer wurde bei allen Zelllinien Konfluenz erreicht (Abb. 7).

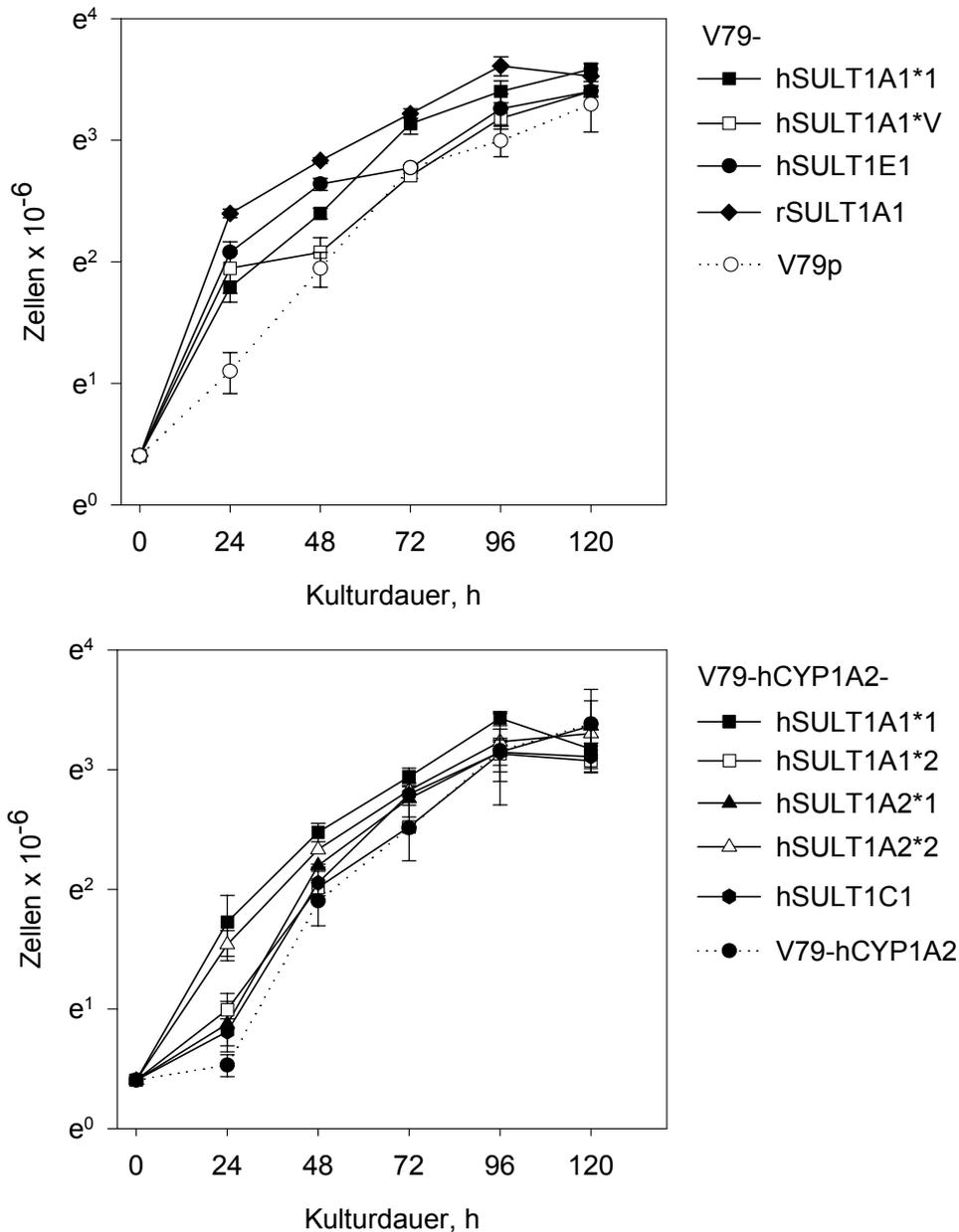


Abb. 7: Wachstumskurven der V79-Zelllinien

Aus der in Tabelle 6 angegebenen Anzahl von Ausgangskulturen wurden jeweils Subkulturen mit $1,5 \times 10^6$ Zellen für die Zellzählungen zu den einzelnen Zeitpunkten angelegt. Für die ersten beiden Zeitpunkte wurden aus jeder Ausgangskultur drei Subkulturen pro Messpunkt angelegt, für alle weiteren Messpunkte je zwei Subkulturen. Dargestellt sind die mittleren Zellzahlen / Kulturschale (145 cm^2) und der SE von zwei bis vier unabhängigen Ausgangskulturen.

2.3 Charakterisierung der SULT- und CYP-Expression

2.3.1 Expressionsniveau in V79-SULT-Zellen

2.3.1.1 Cytosolische Sulfotransferase-Aktivität gegenüber Standardsubstraten

SULT besitzen unterschiedliche, für das jeweilige Enzym charakteristische optimale Substratkonzentrationen für verschiedene Verbindungen. Ein typisches Substrat, das von vielen Phenol-SULT umgesetzt wird, ist 4-Nitrophenol. Der cytosolische Umsatz von 4-Nitrophenol der V79-hSULT- und V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien wurde mithilfe radioaktiv markierten Kosubstrats bestimmt (B 2.3.4). Für die Aktivitätsbestimmung von V79-hCYP1A2-hSULT1C1 wurden 10 µg, von V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 und V79-hSULT1E1 5 µg und von allen übrigen Zelllinien 2 µg cytosolisches Protein in Inkubationen über 10 min eingesetzt. Die SULT-Formen zeigten charakteristische Unterschiede in den optimalen Substratkonzentrationen (Tabelle 7). Diese Unterschiede entsprachen den aufgrund der unterschiedlichen K_m -Werte für 4-Nitrophenol bei bakteriell oder in COS-Zellen exprimierten SULT erwarteten (Veronese *et al.*, 1994; Falany *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1996). Im Rahmen einer anderen Studie wurde der 4-Nitrophenolumsatz in lebenden Zellen untersucht (Engst *et al.*, 2002). Auch hier war die optimale Substratkonzentration bei den hSULT1A2-Alloenzymen im Vergleich zu den hSULT1A1-Alloenzymen in den höheren Konzentrationsbereich verschoben (hSULT1A1*1, hSULT1A1*2 und hSULT1A1*V < hSULT1A2*1 < hSULT1A2*2). Für die Messungen bei optimalen

4-Nitrophenol-Konzentrationen wurde unter den beschriebenen Bedingungen Linearität gezeigt. Als Standardbedingung für alle folgenden Aktivitätsmessungen wurden folgende 4-Nitrophenol-Konzentrationen gewählt: 4 µM für hSULT1A1*1 und hSULT1A1*2, 10 µM für hSULT1A2*1, 1000 µM für hSULT1A2*2 und 10 mM für hSULT1C1. In Abb. 8 sind die Werte der für diese Arbeit unter Standardbedingungen bei verschiedenen Gelegenheiten durchgeführten Aktivitätsmessungen dargestellt.

Für hSULT1E1 ist 4-Nitrophenol kein gutes Substrat (Tabelle 7). Für die Aktivitätsmessung von V79-hSULT1E1 wurden 0,5 µg cytosolisches Protein über 10 min mit 20 nM β-Östradiol inkubiert (B 2.3.4). Die Schwankungen in der cytosolischen SULT-Aktivität verschiedener Kulturen waren in dieser Zelllinie verhältnismäßig gering. Die durchschnittliche Aktivität ± SE betrug 194 ± 33 pmol / mg / min (n = 8). Im Cytosol einer Zelllinie, die für die Expression der SULT1E1 der Ratte konstruiert wurde, konnte rSULT1E1 lediglich immunologisch detektiert werden. Es wurde jedoch kein Umsatz der untersuchten Substrate (β-Östradiol, Östron, α-Naphthol, 4-Nitrophenol) in diesen Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Für einen Vergleich des Toxifizierungspotenzials von allelischen Varianten in rekombinanten Zelllinien ist die genaue Kenntnis ihres Expressionsniveaus auf Proteinebene erforderlich. Die durchschnittlichen Aktivitäten gegenüber 4-Nitrophenol unterschieden sich in den Zelllinien, welche die allelischen Varianten der hSULT1A1 mit hCYP1A2 koexprimierten, um einen Faktor < 2 [454 pmol / mg / min für hSULT1A1*1 (n = 12) und 239 pmol / mg / min für hSULT1A1*2 (n = 10)] und in den Zelllinien, welche die allelischen Varianten der hSULT1A2 koexprimierten, um einen Faktor < 3 [690 pmol / mg / min für hSULT1A2*1 (n = 9) und 321 pmol / mg / min in hSULT1A2*2 (n = 6)]. Auch bei den Zelllinien, die nur hSULT1A1*1 und hSULT1A1*V exprimierten, waren die durchschnittlichen Aktivitäten ähnlich [191 pmol / mg / min in V79-hSULT1A1*1 (n = 6) und 126 pmol / mg / min in V79-hSULT1A1*V (n = 5)]. Gerade in diesen V79-hSULT1A- und V79-hCYP1A2-hSULT1A-Zelllinien streuten die Einzelwerte der Aktivitätsmessungen jedoch über einen großen Bereich (50 bis 1000 pmol / mg / min) (Abb. 8). Um die Ergebnisse aus Mutagenitätsexperimenten mit den allelischen Varianten dennoch miteinander vergleichen zu können, wurden parallel zu den Kulturen, die gegenüber den Testsubstanzen exponiert wurden, auch Zellen für Aktivitätsmessungen kultiviert.

Die Konzentrationsabhängigkeit des Umsatzes von 4-Nitrophenol war in beiden Zelllinien, welche die allelischen Varianten der SULT1A1 exprimierten (Tabelle 7), vergleichbar. Die Koexpression von hCYP1A2 hatte keinen Einfluss auf die Konzentrationsabhängigkeit der cytosolischen Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol.

Im Cytosol von V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen fand bei einer 100fach niedrigeren optimalen Konzentration von 4-Nitrophenol ein höherer Umsatz von 4-Nitrophenol statt als in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2.

Die Aktivität im Cytosol der V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen war bis zu einer Konzentration von 1000 μM nur sehr gering (Tabelle 7). Das spricht dafür, dass die Nachweisbedingungen für diese SULT-Form nicht optimal waren und keine genauen Angaben zur Stärke der Proteinexpression in Geweben und artifiziellen Expressionssystemen möglich sind. In weiteren Untersuchungen wurde die hSULT1C1-Aktivität bei einer 4-Nitrophenolkonzentration von 10 mM gemessen und betrug dann durchschnittlich 16 ± 3 pmol / mg / min (n = 6) (Abb. 8).

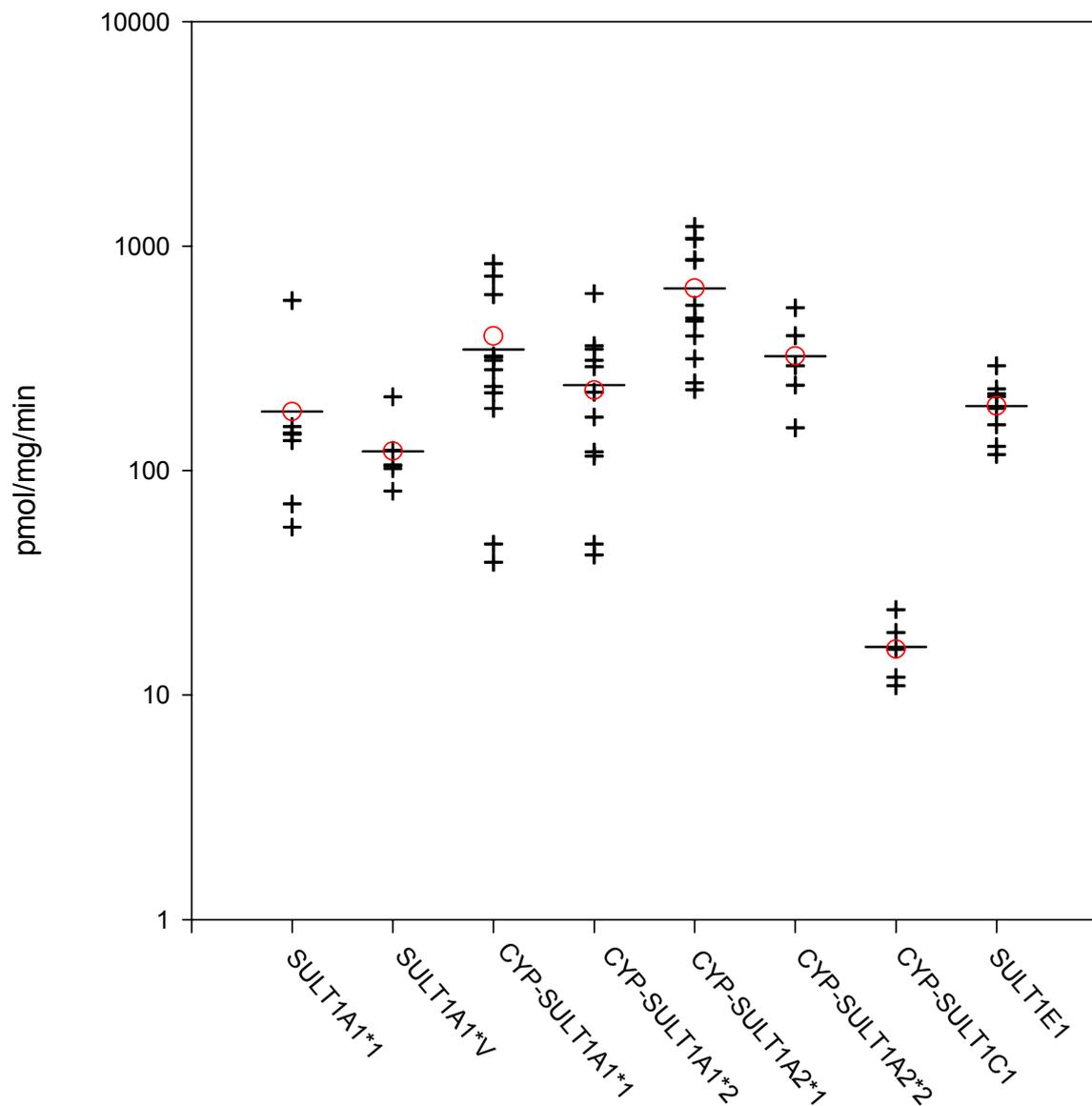


Abb. 8: SULT-Aktivität von V79-hSULT- und V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien

Dargestellt sind Einzelwerte (+), Mittelwerte (o) und Mediane (–) des Umsatzes von 4-Nitrophenol in SULT1A-Zellen und SULT1C-Zellen und des Umsatzes von β -Östradiol in SULT1E-Zellen. Es wurde für jedes Enzym die für Standardmessungen gewählte Substratkonzentration eingesetzt. Die Einzelwerte stellen Messungen zu verschiedenen Gelegenheiten dar [Konzentrationsabhängigkeit des 4-Nitrophenolumsatzes (Tabelle 7), Stabilität der Expression (C 2.3.3.1), 48 h-Wert der Bestimmung der Abhängigkeit der Expression von der Kulturdauer (C 2.3.2.1), Parallelmessungen zu HPRT-Tests (C 3)]. Die Mittelwerte der Aktivitätsmessungen für die Stabilitätsuntersuchungen wurden dabei als ein Wert behandelt, da es sich um aufeinander folgende Subkulturen handelte.

Tabelle 7: Konzentrationsabhängigkeit des Umsatzes von 4-Nitrophenol in Cytosol rekombinanter Zelllinien

a) V79-hSULT-Zelllinien

| exprimierte SULT | Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol | | | | | |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| | 1 µM | 4 µM | 10 µM | 100 µM | 1000 µM | |
| | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | % ^b |
| 1A1*1 | 700 ± 13 | 697 ± 8 | 548 ± 6 | 354 ± 11 | 46 ± 11 | 7 |
| 1A1*V | 104 ± 21 | 129 ± 1 | 139 ± 1 | 71 ± 7 | 18 ± 1 | 15 |
| 1E1 | 1 ± 1 | 8 ± 2 | 4 ± 2 | 21 ± 11 | 49 ± 29 | 100 |

b) V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien

| exprimierte SULT | Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol | | | | | |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| | 1 µM | 4 µM | 10 µM | 100 µM | 1000 µM | |
| | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | pmol/mg/min ^a | % ^b |
| 1A1*1 | 280 ± 8 | 289 ± 116 | 262 ± 25 | 139 ± 4 | 16 ± 1 | 5 |
| 1A1*2 | 563 ± 10 | 614 ± 26 | 573 ± 30 | 249 ± 30 | 19 ± 8 | 3 |
| 1A2*1 | 193 ± 34 | 296 ± 6 | 640 ± 14 | 848 ± 53 | 452 ± 18 | 53 |
| 1A2*2 | <1 | 17 ± 1 | 47 ± 16 | 188 ± 25 | 531 ± 64 | 100 |
| 1C1 | 3 ± 1 | <1 | <1 | <1 | 11 ± 6 | 100 ^d |

^aMittelwerte ± SE von Doppelbestimmungen einer Cytosolcharge der Zelllinien, pmol / mg Protein / min

^bprozentuales Verhältnis zu der für Standardmessungen gewählten Substratkonzentration der SULT-Form

^cSubstratkonzentration für Standardmessungen der hSULT1A2*1 war 10 µM (Abb. 8)

^dSubstratkonzentration für Standardmessungen der hSULT1C1 war 10 mM. Bei dieser Konzentration war der Umsatz geringfügig höherer (Abb. 8).

2.3.1.2 Immunblotanalyse der SULT-Expression

Sowohl die Mobilität im elektrischen Feld als auch die Kreuzreaktivität mit Antisera gegen SULT der Ratte oder des Menschen waren bei der hSULT1A1*1, der hSULT1A1*2 und der hSULT1A1*V nicht unterscheidbar (Abb. 10, 11A). Ebenso waren im Immunblot keine Unterschiede zwischen der hSULT1A2*1 und hSULT1A2*2 zu erkennen (Abb. 11B). Die hSULT1A1, hSULT1A2, hSULT1E1 zeigten dahingegen unterscheidbare elektrophoretische Laufeigenschaften (Abb. 9B, 11B). Die hSULT1C1 ließ sich gut von hSULT1A1 und hSULT1A2 unterscheiden, besaß aber sehr ähnliche elektrophoretische Laufeigenschaften wie hSULT1E1 (nicht gezeigt). In Immunblotanalysen konnte das Expressionsniveau der hSULT1E1 mithilfe eines gereinigten maltosebindenden Fusionsproteins mbp-hSULT1E1 (Falany *et al.*, 1995) quantifiziert werden (Abb. 9). Durch Behandlung mit Faktor Xa Protease wurde das maltosebindende Protein abgespalten (B 2.3.3). Das rSULT1E1-Antiserum detektierte sowohl das Fusionsprotein als auch ein Spaltprodukt. Beim Einsatz von 2 µg Protease zur Behandlung von 25 µg des Fusionsproteins war im Immunblot nur noch das Spaltprodukt nachweisbar (Abb. 9A). Im Cytosol von V79-hSULT1E1 wurde ein Protein detektiert, das die gleichen elektrophoretischen Laufeigenschaften besaß wie das immunreaktive Spaltprodukt des mbp-hSULT1E1 Fusionsproteins (Abb. 9B). Die Signalstärke von 50 µg cytosolischem Protein von V79-hSULT1E1 entsprach der von 0,25 µg mbp-hSULT1E1 nach Behandlung mit Faktor Xa (entsprechend 0,114 µg reiner hSULT1E1 (B 2.3.3)). Die cytosolische Fraktion der V79-hSULT1E1-Zellen enthielt demnach 2,3 µg hSULT1E1 / mg Protein. Aus dem Vergleich der Signalstärken des Signals in humanem Lebercytosol, das aufgrund seiner elektrophoretischen Laufeigenschaften und seiner Immunreaktivität der hSULT1E1 zuzuordnen war, mit dem Signal in den V79-hSULT1E1-Zellen ließ sich abschätzen, dass die Expression in den V79-Zellen etwa um den Faktor 10 stärker war als in der untersuchten Leberprobe.

Ein quantitativer Vergleich der Expression der hSULT1A1 in der Leber mit V79-hSULT-Zelllinien im Immunblot ist in Abb. 10 gezeigt. Es lässt sich abschätzen, dass die Signalstärke in der Cytosolpräparation von V79-hSULT1A1*1 um den Faktor 2 und in hSULT1A1*V um den Faktor 1,5 stärker war als in humaner Leber.

Die Bestimmung des Gehaltes an hSULT1A1 in V79-Zellen mithilfe der Signale von bakteriell überexprimierter gereinigter hSULT1A1 ergab 1 bis 2 µg hSULT1A1 / mg cytosolisches Protein.

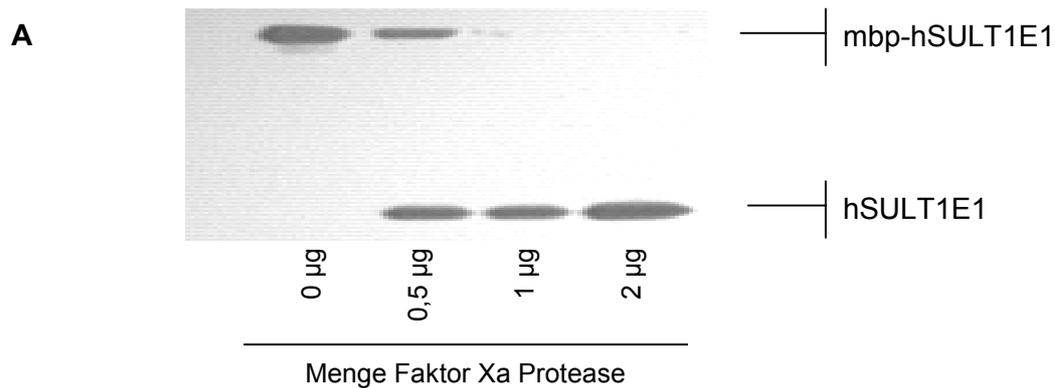
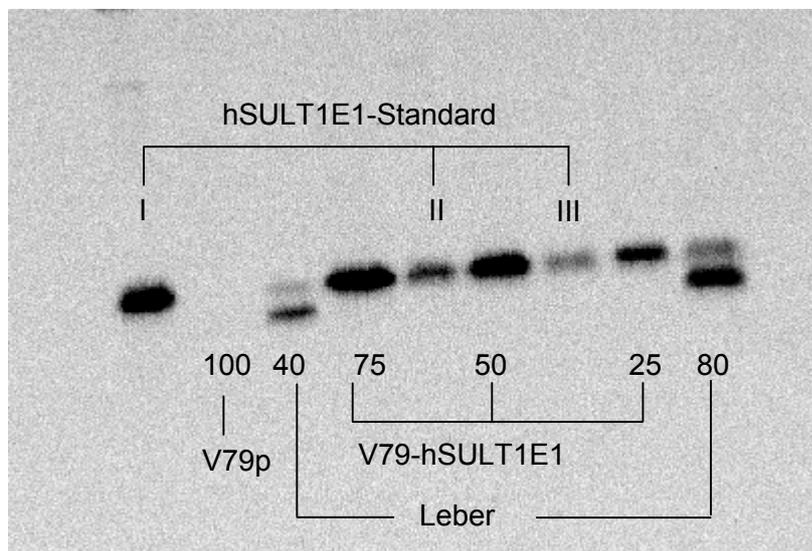
**B**

Abb. 9: Quantifizierung des Expressionsniveaus der hSULT1E1 in V79-hSULT1E1

Die Immunblotanalysen wurden mit einem 1. Antiserum gegen rSULT1E1 aus Kaninchen und einem 2. Antiserum gegen anti-Kaninchen-IgG durchgeführt.

A Quantitativer Verdau des Fusionsproteins mbp-hSULT1E1

Aufgetragen wurden 2 µg des Fusionsproteins (entsprechend 0,916 µg hSULT1E1) nach Behandlung mit den angegebenen Mengen Faktor Xa Protease (die Proteasemengen beziehen sich auf die Behandlung von 25 µg des Fusionsproteins)

B Kalibrierung mit freigesetzter reiner hSULT1E1

Aufgetragen wurden I, 0,114 µg; II, 0,057 µg; III, 0,028 µg des hSULT1E1-Standards (mit Faktor Xa-Protease (2 µg) behandeltes Fusionsprotein) sowie die angegebenen Mengen (µg) der cytosolischen Fraktion von V79-hSULTE1-Zellen, V79p-Zellen und einer humanen Leberprobe.

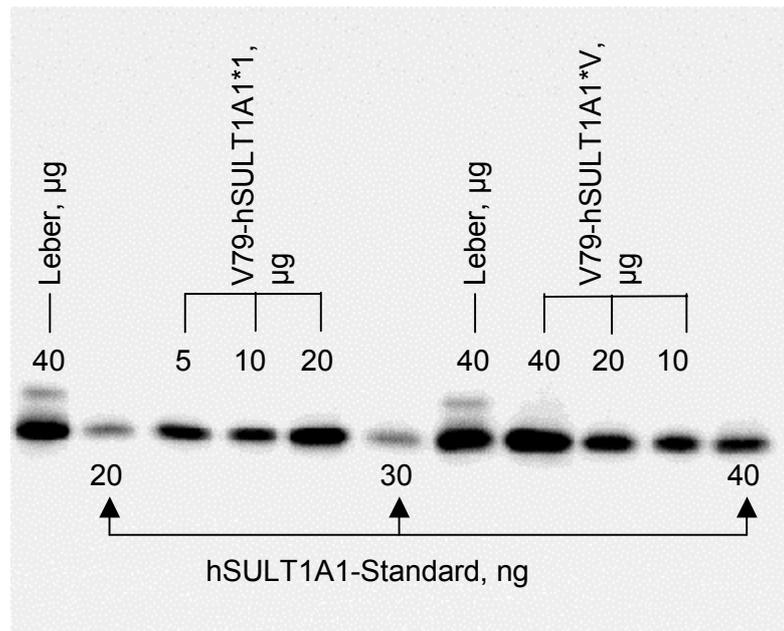


Abb. 10: Vergleich des Expressionsniveaus von SULT1A1 in V79-hSULT1A1-Zellen und humaner Leber

Die Immunblotanalyse der cytosolischen Fraktion von V79-hSULT1A1 im Vergleich zu Cytosol aus humaner Leber wurde mit einem 1. Antikörper gegen hSULT1A3 aus dem Schaf (MPST II) und einem 2. Antikörper gegen anti-Schaf-IgG durchgeführt. Aufgetragen wurden die angegebenen Proteinmengen der cytosolischen Fraktionen von V79p-Zellen, von V79-hSULT1A1-Zellen und von humaner Leber. Als Standard wurde bakteriell überexprimierte, gereinigte hSULT1A1*1 eingesetzt.

Das SULT-Expressionsniveau der allelischen Varianten der SULT1A1 und SULT1A2 in V79-hCYP1A2-hSULT1A1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A2 wurde ebenfalls im Immunblot im Vergleich zu humaner Leber analysiert (Abb. 11). Um auch SULT1A2 sichtbar zu machen, wurden Antiseren verwendet, die beide SULT-Formen erkennen (rSULT1E1-Antiserum und hSULT1A3-Antiserum). Die dominierende SULT-Form in der Leber zeigte die gleichen elektrophoretischen Laufeigenschaften wie das in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 detektierte Protein.

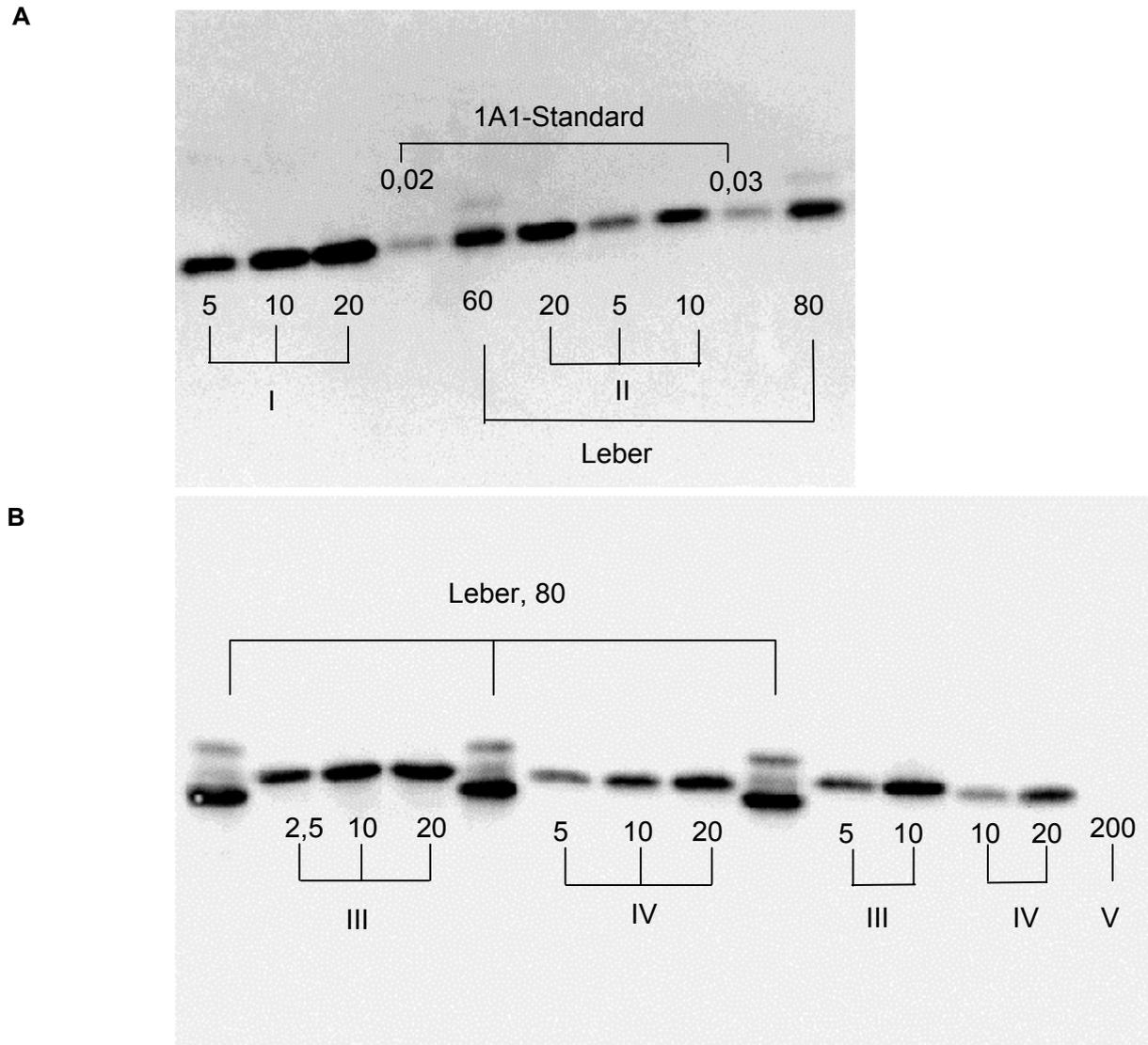


Abb. 11: Vergleich des Expressionsniveaus von SULT1A1 und hSULT1A2 in V79-hCYP1A2-hSULT-Zellen und humaner Leber

Die Immunblotanalyse wurde entweder mit einem 1. Antiserum gegen rSULT1E1 aus dem Kaninchen und einem 2. Antiserum gegen anti-Kaninchen-IgG (A) oder mit einem 1. Antiserum gegen hSULT1A3 aus dem Schaf und einem 2. Antiserum gegen anti-Schaf-IgG (B) durchgeführt. Aufgetragen wurden die angegebenen Proteinmengen (μg) von Cytosolpräparationen aus I, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1, II, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2, III, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1, IV, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2, V, V79-hCYP1A2 und humaner Leber. Im unteren Immunblot (B) wurden zwei verschiedene Cytosolchargen in der linken und der rechten Abbildungshälfte verglichen. Als Standard wurde bakteriell überexprimierte, gereinigte hSULT1A1 eingesetzt.

Die Expression in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 war um den Faktor 10, in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 um den Faktor 5 stärker als in humaner Leber (Abb. 11). Die Gehaltsbestimmung der hSULT1A1 in den Koexpressionszellen ergab für hSULT1A1*1 20 µg SULT / mg cytosolischen Proteins, für hSULT1A1*2 10 µg SULT / mg cytosolischen Proteins. Ein sehr schwaches Signal in humanem Lebercytosol, das etwas über dem Signal für hSULT1A1 und deutlich unter dem Signal für hSULT1E1 liegt, zeigt die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die hSULT1A2 (Teubner, 2001) (Abb. 11B). Allerdings besitzt eine andere SULT-Form, die hSULT1B1, die ebenfalls durch das hSULT1A3-Antiserum erkannt wird, elektrophoretische Laufeigenschaften, die nicht von denen der hSULT1A2 zu unterscheiden sind. Bei der Cytosolpräparation, die in Abb. 11B gezeigt ist, ergaben 5 µg cytosolisches Protein von V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 ein ähnlich starkes hSULT1A1-Signal wie 80 µg Lebercytosol. Die Aktivitäten der in der linken Abbildungshälfte verglichenen V79-Cytosolpräparationen betragen 802 pmol / mg / min für hSULT1A2*1 und 652 pmol / mg / min für hSULT1A2*2, die auf der rechten Abbildungshälfte verglichenen Chargen 463 pmol / mg / min für hSULT1A2*1 und 399 pmol / mg / min für hSULT1A2*2. Der Unterschied zwischen diesen Zelllinien bezüglich der Signalstärke im Immunblot betrug mit allen getesteten Antiseren (anti-hSULT1A3, anti-rSULT1E1 und anti-hSULT1A1-Peptid) etwa den Faktor 4 und war somit deutlich größer als es aufgrund der Aktivitätsmessungen zu erwarten gewesen wäre. Dieses Phänomen bestätigte sich in weiteren Analysen.

Abb. 12 zeigt das SULT-Expressionsniveau in verschiedenen Klonen der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1C1. Um ein Signal im Immunblot zu erhalten, mussten mindestens 100 µg cytosolisches Protein der gentechnisch veränderten V79-Zellen aufgetragen werden. Nur mit dem Antiserum gegen rSULT1E1, das mit vielen rSULT und hSULT kreuzreagiert, ließ sich die hSULT1C1 im Immunblot nachweisen. In Bezug auf die Kreuzreaktivität mit einem Antiserum gegen hSULT1B1 unterschieden sich die SULT1C1-Form des Menschen und der Ratte. Die hSULT1C1 war mit diesem Antiserum nicht detektierbar (nicht gezeigt). Dies lässt sich mit einer relativ geringen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 62% erklären (Yoshinari *et al.*, 1998). Die Signalstärken verschiedener Klone im Immunblot korrelierten mit den Werten aus Aktivitätsmessungen mit 10 mM 4-Nitrophenol. Für weitere Untersuchungen wurde Klon 10 eingesetzt.

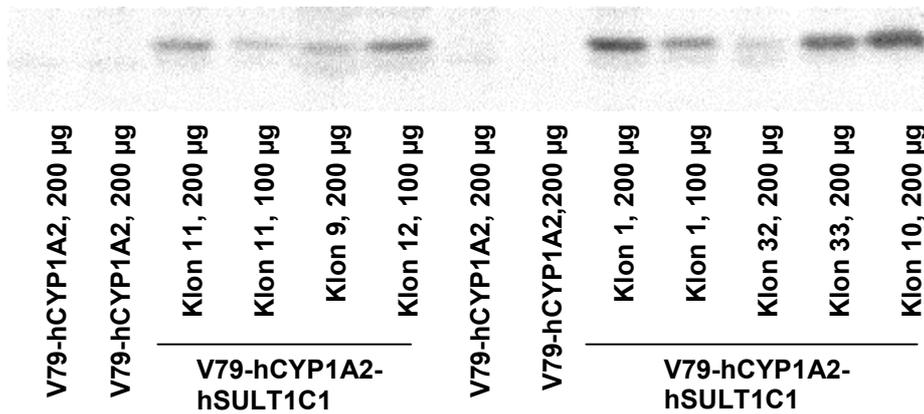


Abb. 12: Detektion von SULT1C1 in V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen

Die Immunblotanalyse wurde mit einem 1. Antiserum gegen rSULT1E1 aus Kaninchen und einem 2. Antiserum gegen anti-Kaninchen-IgG durchgeführt. Aufgetragen wurden die angegebenen Proteinmengen von Cytosolpräparationen verschiedener Klone von V79-hCYP1A2-hSULT1C1 und V79-hCYP1A2.

2.3.2 SULT- und CYP-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die Expression in eukaryoten Zellen muss nicht in allen Wachstumsphasen einer Kultur gleich stark sein. Da der Insertionsort eines cDNA-Konstruktes in das Genom der Wirtszelle zufällig ist, kann auch die Abhängigkeit der heterologen Expression von der Kulturdauer bei jedem gentechnisch veränderten Klon unterschiedlich sein und muss daher für jede Zelllinie eigens ermittelt werden. Für die Einsetzbarkeit der Zelllinien in Genmutationstests ist dieser Parameter von besonderer Bedeutung, da die Exposition gegenüber der Substanz innerhalb einer Phase mit hohem Expressionsniveau liegen sollte. Um die SULT- und CYP-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer zu prüfen, wurden, entsprechend dem Protokoll für den HPRT-Test, $1,5 \times 10^6$ Zellen subkultiviert und unter Standardbedingungen inkubiert. In Abständen von 24 h wurden Zellen geerntet, die Zellzahlen bestimmt und subzelluläre Fraktionen hergestellt (B 2.3.1).

2.3.2.1 SULT-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die SULT-Aktivität im Cytosol der Zellen wurde sowohl von den in Tabelle 5 beschriebenen Klonen von V79-hSULT1A1*1, V79-hSULT1A1*V und V79-hSULT1E1 als auch im Cytosol der Koexpressionszelllinien V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 und V79-hCYP1A2-hSULT1C1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer bestimmt (Abb. 13). Die Schwankungen der Aktivitäten der nach 24 bis 72 h gewonnenen Cytosolpräparationen

einer Zelllinie lagen innerhalb der Schwankungsbereite der nach 48 h gewonnenen Cytosole während der Stabilitätsprüfung der Zelllinien (C 2.3.3.1). Bei allen V79-SULT- und V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien außer V79-hCYP1A2-hSULT1C1 war eine etwas höhere cytosolische Aktivität nach 48 h oder 72 h im Vergleich zum ersten Messpunkt nach 24 h zu verzeichnen. Dieser Anstieg war jedoch so gering, dass keine Anpassung des HPRT-Protokolls nötig war. Bei allen V79-SULT-Zellen war die Aktivität in den nach 96 h gewonnenen Proben niedriger als zu früheren Messpunkten. Obwohl die Kulturen nach 120 h konfluent waren, war die cytosolische SULT-Aktivität in den V79-hCYP1A2-hSULT-Zellen hier gegenüber den vorherigen Messpunkten leicht erhöht. Weder zur Kulturdauer noch zu den parallel durchgeführten Zellzahlbestimmungen war demnach eine Korrelation der SULT-Aktivität im Sinne einer stetigen Zu- oder Abnahme vorhanden.

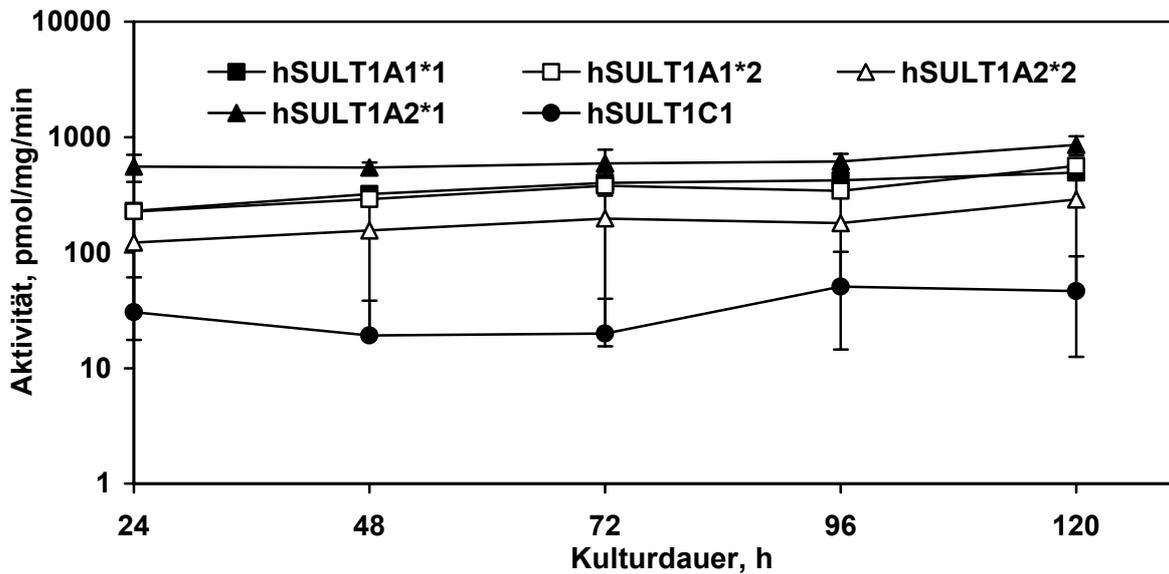
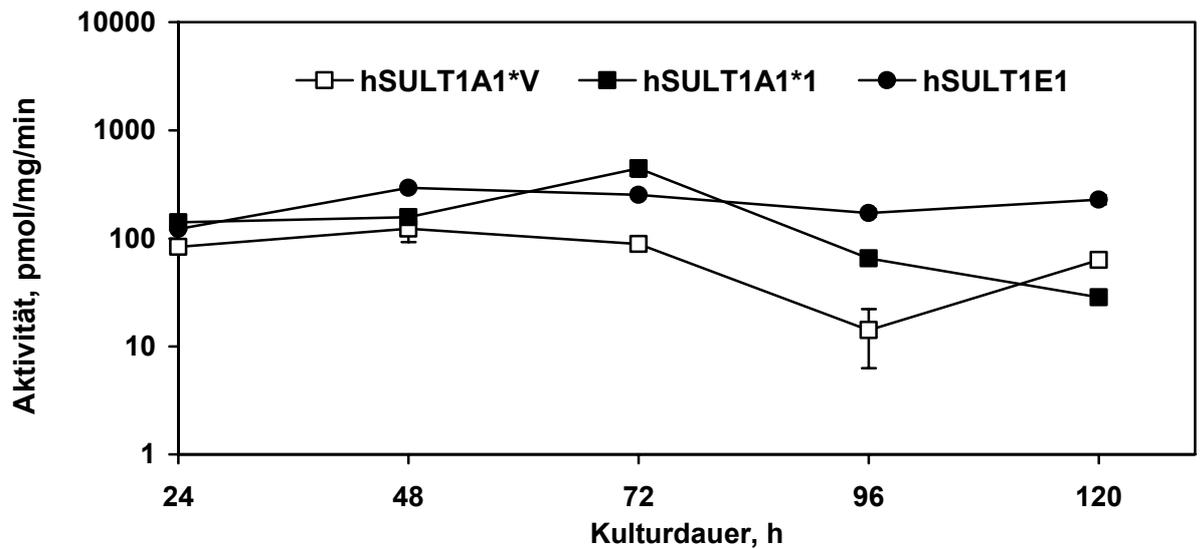


Abb. 13: Cytosolische SULT-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer in V79-hSULT-Zelllinien (oberes Bild) und V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien (unteres Bild)

Für jede SULT-Form wurde die für Standardmessungen gewählte Konzentration an 4-Nitrophenol eingesetzt (C 2.3.1.1). Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von zwei Kulturen.

2.3.2.2 CYP-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die CYP-Expression in den mikrosomalen Fraktionen der im vorigen Abschnitt beschriebenen Kulturen wurde im Immunblot quantifiziert. In Abb. 14 sind beispielhaft die Ergebnisse mit zwei Zelllinien dargestellt. Die Menge an immunreaktivem Protein entsprach in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1-Zellen nach 72 h Kulturdauer nur noch maximal der Hälfte der Menge in den Präparationen nach 24 und 48 h Kulturdauer und nahm in den 96 und 120 h kultivierten Zellen weiter ab. In V79-hCYP1A2-Zellen war bereits nach 72 h in 100 µg mikrosomalem Protein kaum noch immunreaktives Protein nachweisbar. In V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2- und V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen verringerte sich die Expression mit fortschreitender Kulturdauer wie in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 (Daten nicht gezeigt). Sowohl in den V79-hCYP1A2-hSULT Koexpressionszelllinien als auch in der Ausgangszelllinie für die Transfektionen, V79-hCYP1A2, hing die Expression von hCYP1A2 also, im Gegensatz zu der SULT-Expression, stark von der Kulturdauer ab. Unter den hier vorgestellten Kulturbedingungen sollte die Exposition der CYP exprimierenden Zellen gegenüber einer Testsubstanz im HPRT-Test demnach innerhalb 48 h nach der Einsaat der Zellen erfolgen. Sollten geringere initiale Zellzahlen eingesetzt werden, um die Dauer der Inkubation mit einer Testsubstanz verlängern zu können, müsste die Auswirkung auf die Expression in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Das Gleiche gilt für den Fall, dass bei einer stark toxischen Substanz die Einsaat größerer Zellzahlen notwendig werden würde.

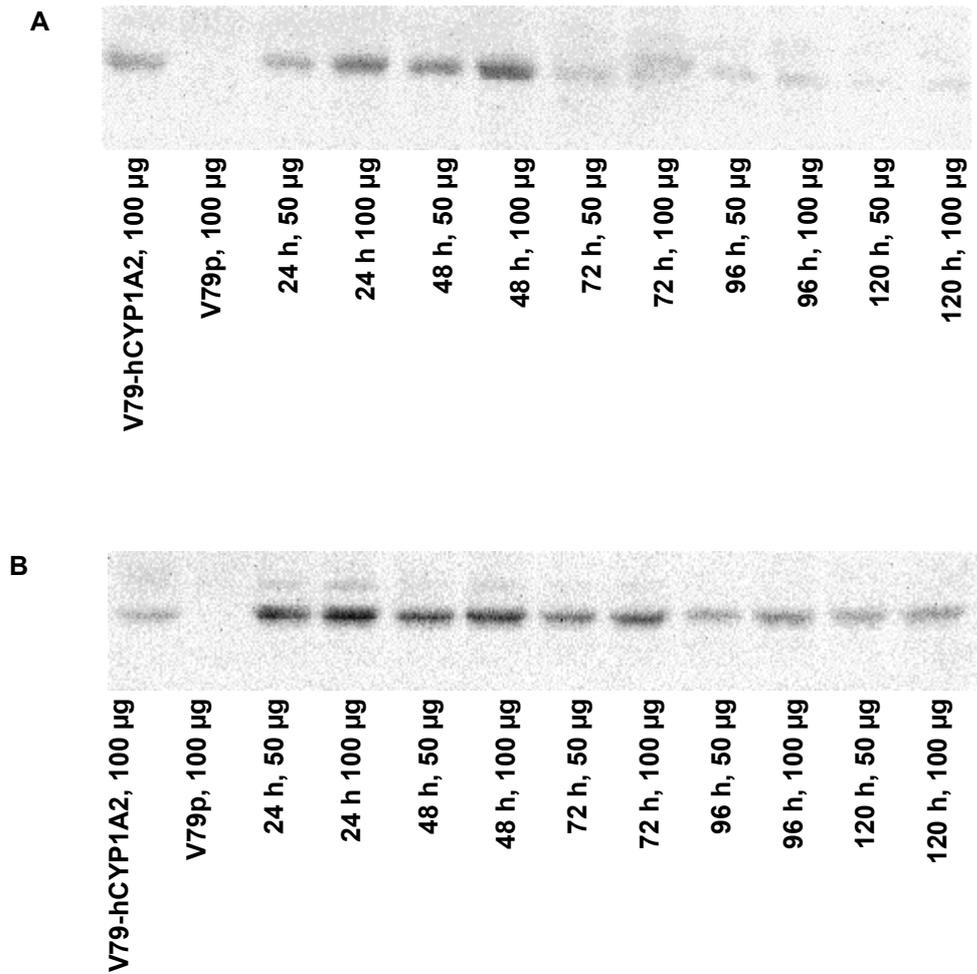


Abb. 14: Expression von hCYP1A2 in Abhängigkeit von der Kulturdauer in V79-hCYP1A2 (A) und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 (B)

Die Immunblotanalyse der mikrosomalen Fraktionen der Zellen wurde mit einem 1. Antiserum gegen hCYP1A2 aus Kaninchen und einem 2. Antiserum gegen anti-Kaninchen-IgG durchgeführt. Auf die erste Spur wurde als Standard jeweils ein Aliquot der gleichen Mikrosomenpräparation von V79-hCYP1A2 aufgetragen. Die Kulturdauer der Zellen vor der Herstellung der subzellulären Fraktionen ist in der Abbildung angegeben.

2.3.3 Stabilität der SULT- und CYP-Expression

Ziel der Transfektionen war es, Zelllinien zu erhalten, die langfristig für die Mutagenitätsprüfung eingesetzt werden können. Hierfür muss gewährleistet sein, dass die Zellen konservierbar sind und das Expressionsniveau über mehrere Passagen stabil bleibt. Um die Stabilität der Expression zu untersuchen, wurden Kryokonserven der in Tabelle 5 genannten Klone der gentechnisch veränderten Zellen in Kultur genommen und über mindestens 20 Passagen unter Standardbedingungen in Medium ohne Selektionsmarker inkubiert (B 2.2.5). Bei jeder zweiten Passage wurden Zellen zur Gewinnung der subzellulären Fraktionen eingesät und nach 44 h geerntet (B 2.3.1).

2.3.3.1 Stabilität der SULT-Expression

Die SULT-Aktivität wurde im Cytosol der Zellen mit den unter D 2.4.1 beschriebenen Substraten und Konzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in den Cytosolen von V79-hSULT1A1*1-, V79-hSULT1A1*2- und V79-hSULT1E1-Zellen zeigt das obere Diagramm in Abb. 15. Die Aktivitäten gegenüber 4-Nitrophenol in den Cytosolen der Koexpressionszelllinien V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 und V79-hCYP1A2-hSULT1C1 sind im unteren Diagramm der Abb. 15 dargestellt. Zwischen den cytosolischen Aktivitäten verschiedener Passagen einer Zelllinie traten zum Teil beträchtliche Unterschiede auf. Diese Schwankungen korrelierten jedoch bei keinem der in Mutagenitätstest eingesetzten Klone mit dem Alter der Kulturen. Da das durchschnittliche Expressionsniveau über den untersuchten Zeitraum erhalten blieb, ist sichergestellt, dass die SULT-cDNA bei diesen Klonen stabil in das Genom der Zellen insertiert wurde. Unter den Transfektanten von V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 wurden auch Klone mit sehr hohem cytosolischem Umsatz von 4-Nitrophenol gefunden, der aber nur über wenige Passagen stabil blieb. Diese Klone wurden nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

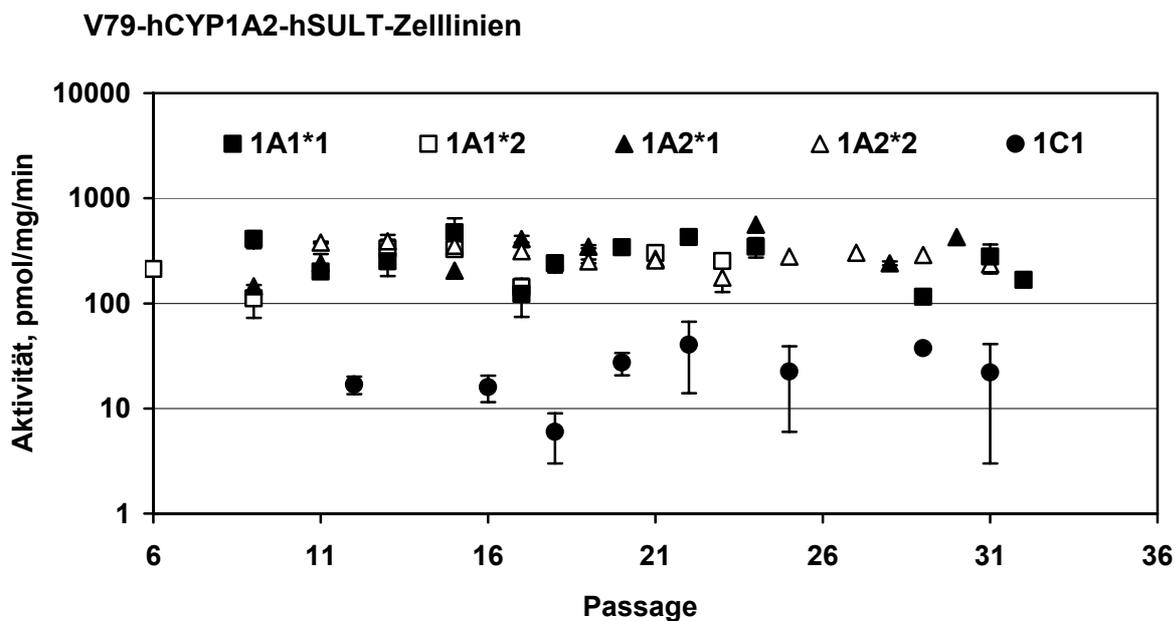
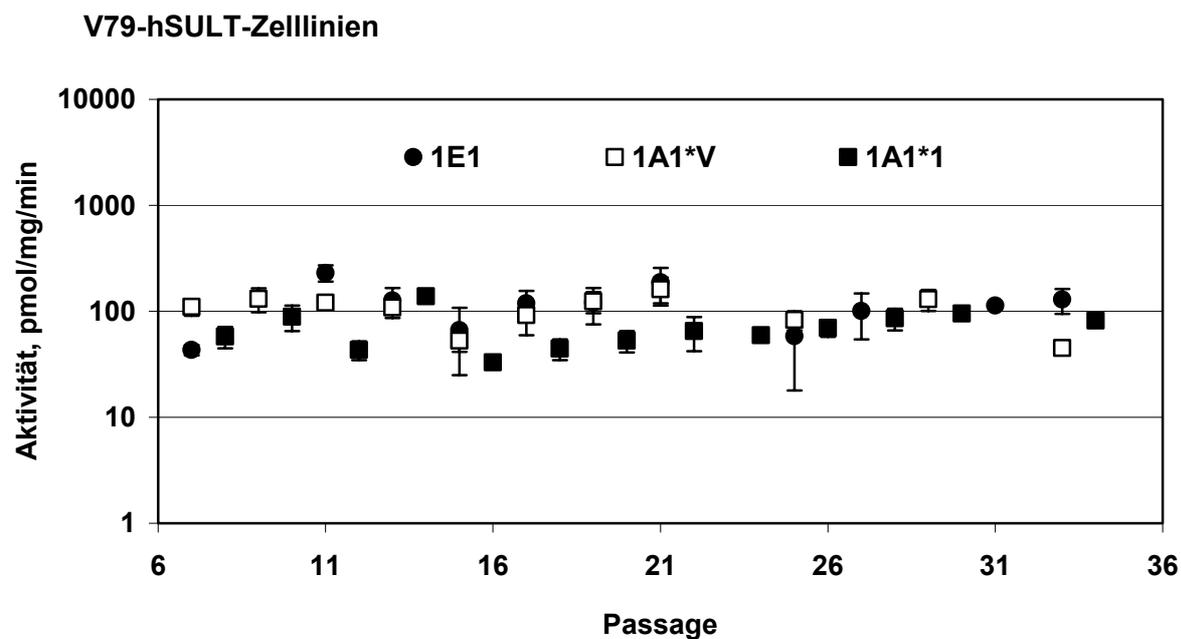


Abb. 15: Stabilität der SULT-Expression in V79-SULT- und V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien

Es wurde jeweils die für Standardmessungen gewählte 4-Nitrophenolkonzentration eingesetzt (C 2.3.1.1). Für die Aktivitätsmessungen im Cytosol der V79-hSULT1E1-Zellen wurde β -Östradiol als Substrat verwendet (B 2.3.4.2). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SE aus zwei Kulturen.

2.3.3.2 Stabilität der CYP-Expression

Die Stabilität der CYP-Expression in den V79-hCYP1A2-Zellen und den V79-hCYP1A2-hSULT-Koexpressionszelllinien wurde in den im vorigen Abschnitt beschriebenen Kulturen mittels Immunblotanalyse überprüft. In Abb. 16 sind beispielhaft die Ergebnisse mit den Zelllinien V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 dargestellt. Die Untersuchungen der übrigen V79-hCYP1A2-hSULT Koexpressionszelllinien zeigten ebenfalls immunreaktives hCYP1A2-Protein in allen mikrosomalen Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Um die Signale verschiedener Blots miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils eine Probe der gleichen Charge von Mikrosomen von V79-hCYP1A2 in zwei Konzentrationen mit untersucht. Relativ zu diesem Signal war die Menge an immunreaktivem Protein in allen Koexpressionszelllinien gleich hoch. Schwankungen in der Signalstärke zwischen den einzelnen Passagen einer Zelllinie betrug maximal 50%. Diese Schwankungen korrelierten jedoch nicht mit dem Alter der Kulturen. Die Expression an immunreaktivem hCYP1A2 war demnach in allen etablierten Zelllinien stabil. Wie auch in Bezug auf die SULT-Expression dargestellt wurde, waren unter den Transfektanten von V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 ebenfalls Klone, bei denen zwar die jeweilige SULT-Form gut exprimiert wurde, aber keine Expression von hCYP1A2 mehr nachweisbar war. Einige dieser Zellen waren auch in Medium mit dem Zusatz von G418, dem Selektionsmarker bei der Transfektion von hCYP1A2, nicht mehr lebensfähig. Eine zusätzlich zur Selektion auf Puromycinresistenz durchgeführte Selektion auf G418-Resistenz hätte aber nicht ausschließen können, dass hCYP1A2-negative Zellen sich vermehren, da bei der Etablierung der V79-hCYP1A2 Zelllinie das Gen für die Resistenz gegenüber G418 auf einem separaten Plasmid lag, das kotransfiziert wurde.

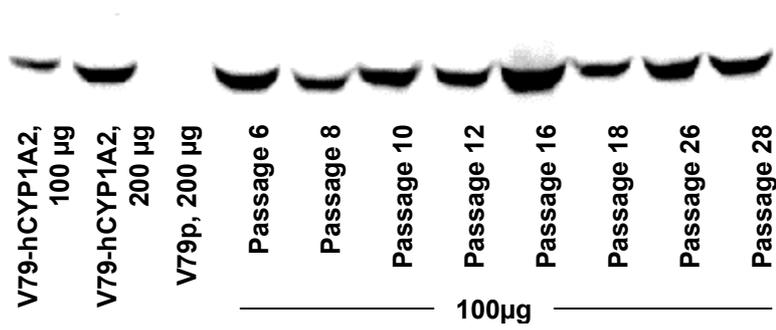
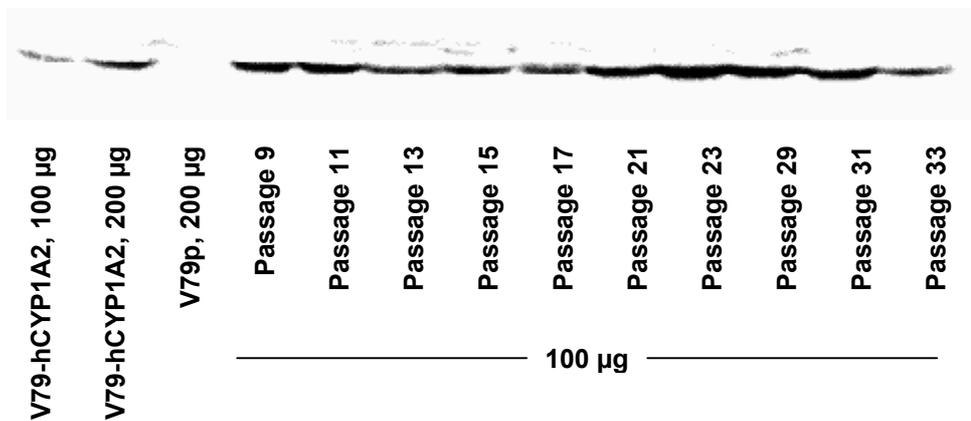
V79-hCYP1A-hSULT1A1*1**V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2**

Abb. 16: Stabilität der hCYP1A2-Expression in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1- und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen

Die Immunblotanalyse wurde mit einem 1. Antiserum gegen hCYP1A2 aus Kaninchen und einem 2. Antiserum gegen anti-Kaninchen-IgG durchgeführt. Auf die ersten beiden Spuren wurde als Standard jeweils ein Aliquot der gleichen Mikrosomenpräparation von V79-hCYP1A2-Zellen aufgetragen.

2.3.4 Einfluss von HAT-Medium

Die übliche Häufigkeit, mit der spontane Funktionsänderungen des *hprt*-Gens in V79-Zellkulturen auftreten, liegt bei 5×10^{-6} (Glatt, 1993b). Nach einigen Passagen können sich jedoch HPRT-defiziente Zellen in den Kulturen anreichern und die Spontanmutationsrate im Genmutationstest deutlich erhöhen. Um das zu verhindern, können vor Testbeginn Passagen in einem Medium durchgeführt werden, das Aminopterin enthält (Bradley *et al.*, 1981). Diese Substanz hemmt die Dihydrofolsäurereductase. Damit ist die *de novo* Synthese von Purinnukleotiden gestört, und die Zellen sind auf die Wiederverwertung von Purinbasen mithilfe der HPRT angewiesen (*salvage pathway*). Zellen mit einem Defekt im *hprt*-Gen, der zu einem Aktivitätsverlust der HPRT führt, vermehren sich in diesem Medium nicht. Um eine Limitierung des Wachstums der HPRT-positiven Zellen durch fehlende Ausgangsbausteine für den *salvage pathway* zu verhindern, werden dem Medium Hypoxanthin und Thymidin zugesetzt (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium = HAT-Medium).

Aufgrund der Struktur des Aminoptेरins sind jedoch auch negative Einflüsse auf HPRT-positive Zellen denkbar. Speziell in den Zellen, die CYP und SULT koexprimieren, könnte es zu einer Toxifizierung des Aminoptेरins durch eine ähnliche Reaktionsabfolge wie bei den aromatischen Aminen kommen (A 3, Abb. 2).

Nach einigen Problemen mit der Reproduzierbarkeit von HPRT-Tests (D 4) wurde der Einfluss des HAT-Mediums auf das Wachstum (Abb. 17), die SULT-Aktivität im Cytosol (C 2.3.4.2) und die Menge an immunreaktivem hCYP1A2 in den Mikrosomen (C 2.3.4.2) einiger Zelllinien eingehend untersucht. Kontrollzellen, die weder CYP noch SULT exprimierten, hCYP1A2 exprimierende Zellen, hSULT1A1*1 exprimierende Zellen und hCYP1A2 mit hSULT1A1*2 und hSULT1A1*1 koexprimierende Zellen wurden nach dem in Tabelle 8 dargestellten Schema kultiviert. Zellen wurden drei aufeinander folgende Passagen entweder immer ohne HAT-Zusatz im Kulturmedium (Variante OOO), immer mit HAT-supplementiertem Medium (Variante HHH) oder zunächst mit HAT-Medium, dann aber ohne HAT-Medium kultiviert (HHO und HOO). Die Kulturdauer und Einsaatdichte entsprachen den Bedingungen für die Vorkulturen (Kultur 1 und 2) und Testgruppen (Kultur 3) im HPRT-Test (B 2.4.1). Die Abfolge von Subkultivierungen in HAT-supplementiertem und HAT-freiem Medium der Variante HHO entsprach dem bisherigen Vorgehen bei Kulturen für den HPRT-Test (Tabelle 8, B 2.4.1). Die Zellen wurden nach 72 oder 44 h gezählt und aus Kultur 3 wurden subzelluläre Fraktionen hergestellt.

Tabelle 8: Versuchsaufbau zur Prüfung des Einflusses des HAT-Mediums auf Wachstum sowie CYP- und SULT- Expression in V79-Zellen

Die Zellen wurden entweder in HAT-supplementiertem Medium (H) oder in Medium ohne HAT-Supplement (O) kultiviert. Einsaatdichte und Kulturdauer betragen 10^6 Zellen für Kultur 1 und Kultur 2 (beide 72 h), und $1,5 \times 10^6$ Zellen für Kultur 3 (44 h).

| Bezeichnung der Variante | Medium für | | |
|--------------------------|------------------|----------|----------|
| | Kultur 1 | Kultur 2 | Kultur 3 |
| OOO | HAT-frei | HAT-frei | HAT-frei |
| HHH | HAT | HAT | HAT |
| HHO | HAT | HAT | HAT-frei |
| HOO | HAT ^a | HAT-frei | HAT-frei |

^a Die Zellen wurden auch vor Kultur 1 mindestens eine Passage in HAT-Medium kultiviert, um vergleichbare Bedingungen wie in Variante HHO zu erhalten.

2.3.4.1 Wachstumsverhalten unter dem Einfluss von HAT-Medium

Nach der 72 h Kulturdauer (Ende der Kultur 1) war anhand der Zellzahlen bei allen untersuchten Zelllinien kein Unterschied im Wachstum der Kulturen mit und ohne HAT-Supplement festzustellen (Daten nicht aufgeführt). Die Ergebnisse der Zellzählungen der Kulturen 3 sind in Abb. 17 dargestellt. In allen Kulturen, die wie im HPRT-Test in HAT-Medium vorkultiviert und in HAT-freiem Medium weiterkultiviert wurden (Variante HHO), war die Zellzahl um mindestens 50% gegenüber den in HAT-freiem Medium gehaltenen Kulturen vermindert. Dies traf auf die SULT-exprimierenden, die CYP-exprimierenden und die SULT- und CYP-koexprimierenden Zelllinien sowie die Kontrollzelllinie V79p zu. Der Effekt wurde durch mehrere aufeinander folgende Kulturen in HAT-Medium, die wie Kultur 1 angesetzt wurden, weder verstärkt noch vermindert. Wurden die Zellen nach Kultur 2 in HAT-Medium auch mit HAT-supplementiertem Medium weiterkultiviert (Variante HHH), nahmen die Zellzahlen hingegen in der Regel (Ausnahme: V79-hCYP1A2; nicht bestätigte Einzelmessung) nicht oder kaum ab. Das HAT-Supplement hatte also keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur, die mit HAT kultiviert wurde, sondern es bewirkte ein verlangsamtes Wachstum in der darauffolgenden Kultur ohne HAT-Supplement.

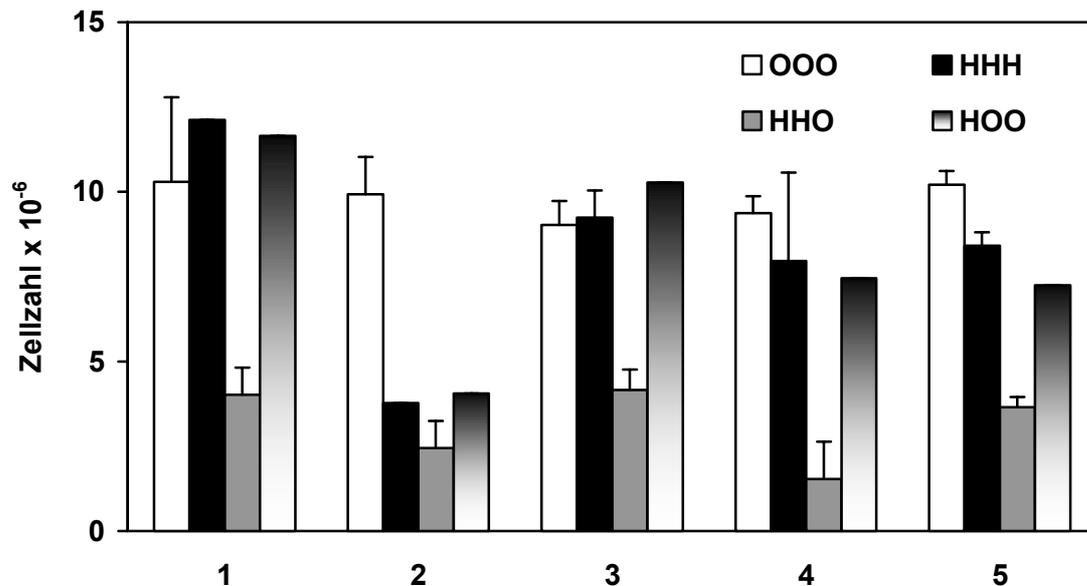


Abb. 17: Einfluss von HAT-Medium auf das Wachstumsverhalten von V79-Zellen

Die Zellzahlen / 30 cm² Kulturschale wurden nach 44 h Kultivierung in HAT-Medium (Variante HHH) oder HAT-freiem Medium (Variante OOO, HHO und HOO) ermittelt. Die Kulturbedingungen der Varianten sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die geprüften Zelllinien waren 1, V79p; 2, V79-hCYP1A2; 3, V79-hSULT1A1*1; 4, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1; 5, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2. Die Werte der Varianten HOO und der Varianten HHH der Zelllinien V79p und V79-hCYP1A2 sind Einzelbestimmungen. Alle übrigen Werte sind Mittelwerte \pm SE aus drei Versuchen, die zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wurden.

Möglicherweise werden in Gegenwart von HAT-Supplement die Enzyme der *de novo* Nukleotidsynthese herunterreguliert und gleichzeitig der *salvage pathway* durch die Gegenwart von Hypoxanthin und Thymidin unterstützt. Fällt dieser Zusatz weg, so brauchen die Zellen einige Zeit, um sich an die neuen Bedingungen anzupassen, wobei die DNA-Synthese und somit die Zellvermehrung verlangsamt ablaufen. Um diese These zu überprüfen, wurde von jeder untersuchten Zelllinie eine Kultur, die über mindestens zwei Passagen in HAT-Medium kultiviert worden war, eine Passage in HAT-freiem Medium gehalten und anschließend noch einmal in HAT-freiem Medium subkultiviert (Variante HOO). Dabei wurden in Kultur 3 ähnliche Zellzahlen erreicht wie in den ausschließlich in HAT-Medium (Variante HHH) oder ausschließlich in HAT-freiem Medium vermehrten (Variante OOO) Kulturen (Ausnahme wiederum V79-hCYP1A2) (Abb. 17). Zusammenfassend ergibt sich, dass die Umstellung von HAT-Medium auf HAT-freies Medium zu einer transienten Verlangsamung des Wachstums führte.

2.3.4.2 Einfluss von HAT-Supplement auf die SULT- und CYP-Expression

Zur Untersuchung des Einflusses von HAT-Supplement auf die SULT-Expression wurden Aktivitätsmessungen in den cytosolischen Fraktionen von Kultur 3 der nach dem Schema in Tabelle 8 angelegten Zellkulturen durchgeführt. Der 4-Nitrophenolumsatz in den Varianten HHH, HHO und HOO ist in Abb. 18 als prozentualer Anteil des Umsatzes in den Varianten OOO dargestellt. In der Zelllinie V79-hSULT1A1*1 war die SULT-Aktivität bei allen Varianten HHH ebenso hoch wie bei den Varianten OOO. Bei beiden untersuchten Koexpressionszelllinien war der cytosolische Umsatz von 4-Nitrophenol in den Varianten HHH geringer als in den Varianten OOO. Bei V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 war der 4-Nitrophenol Umsatz in den Varianten HHO nochmals reduziert. Dieser Effekt wurde bei der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 nicht beobachtet. Bei den Varianten HOO wurde in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 die Aktivität der Variante HHH, in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 sogar die Aktivität der Variante OOO wieder erreicht. Demnach wurde zwar kein deutlicher Einfluss des HAT-Mediums auf die SULT-Expression beobachtet, die Ergebnisse widersprachen aber auch nicht der Veränderung des Protokolls in der Weise, dass nach einer HAT-Passage vor Testbeginn eine Passage in HAT-freiem Medium durchgeführt wurde.

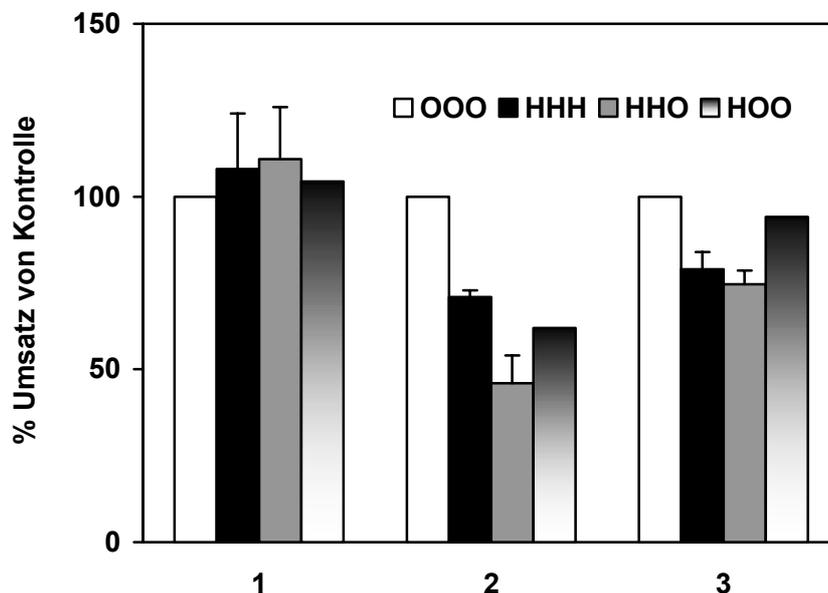


Abb. 18: SULT-Aktivität in V79-SULT- und V79-hCYP1A2-hSULT-Zellen in Abhängigkeit von der HAT-Supplementierung des Kulturmediums

Der cytosolische 4-Nitrophenolumsatz (Substratkonzentration 4 μ M) wurde in Zellen, die in HAT-Medium (Variante HHH) oder HAT-freiem Medium (Variante OOO, HHO und HOO) kultiviert wurden, ermittelt (Kulturbedingungen der Varianten in Tabelle 8). Die geprüften Zelllinien waren 1, V79-hSULT1A1*1; 2, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1; 3, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2. Die dargestellten Werte für die Varianten OOO und HOO sind Einzelwerte, für die Varianten HHH und HHO Mittelwerte \pm SE aus drei Versuchen, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden.

Die mikrosomalen Fraktionen von Kultur 3 der in Tabelle 8 beschriebenen Kulturen wurden auf den Einfluss der Kultivierung in HAT-supplementiertem Medium auf die Expression von hCYP1A2 hin untersucht. Immunblotanalysen zeigten äquivalente Mengen an immunreaktivem hCYP1A2 in Variante OOO, Variante HHH, Variante HHO und Variante HOO (Tabelle 8) der Zelllinien V79-hCYP1A2, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 (Daten nicht gezeigt). Somit war kein Einfluss der HAT-Supplementierung auf die Expression von hCYP1A2 festzustellen.

3. Mutagenitätsexperimente

Stabil exprimierende Klone der gentechnisch veränderten Zelllinien wurden im HPRT-Genmutationstest eingesetzt (B 2.4.1). Um eine direkte Mutagenität der geprüften Substanzen von SULT-vermittelter Mutagenität abgrenzen zu können, wurden Kontrollexperimente mit der SULT-freien puromycinresistenten Zelllinie V79p durchgeführt. Als Kontrollzelllinie für Substanzen, die in den V79-hCYP1A2-hSULT Koexpressionszelllinien getestet wurden, diente V79-hCYP1A2.

Als Positivkontrolle für die Expression von funktionalem hCYP1A2 wurde in den Experimenten mit V79-hCYP1A2 und den von dieser Zelllinie abgeleiteten V79-hCYP1A2-hSULT Koexpressionszelllinien Benzo[*a*]pyren-*trans*-7,8-dihydrodiol (BP-7,8-diol) eingesetzt.

Für die neu etablierten V79-SULT-Zellen waren zunächst keine entsprechenden Positivkontrollen zur Überprüfung der funktionalen SULT-Expression im Genmutationstest bekannt. Da während der Charakterisierung der Zelllinien Schwankungen im SULT-Expressionsniveau aufgefallen waren, wurden parallel zu jedem Genmutationstest Kulturen zur Präparation subzellulärer Fraktionen für SULT-Aktivitätsmessungen angesetzt. Die Vorkultur, Einsaatdichte und Inkubationsbedingungen dieser Kulturen waren identisch mit denen des jeweiligen Mutagenitätstests. Die Ernte der Zellen erfolgte zum Zeitpunkt der Beendigung der Exposition gegenüber der Testsubstanz. Die cytosolische SULT-Aktivität wurde mit den für Standardmessungen gewählten Substratkonzentrationen bestimmt (B 2.3.4; C 2.3.1.1).

3.1 Benzylische Alkohole

3.1.1 Mutagenität von 1-Hydroxymethylpyren

3.1.1.1 Kontrollzelllinien

Der benzylische Alkohol 1-HMP war negativ im Test mit der SULT-defizienten Kontrollzelllinie (Abb. 19). Erst die heterologe Expression von SULT führte zu einer Zunahme der *hprt*⁻-Mutanten mit steigender Konzentration von 1-HMP.

3.1.1.2 V79-hSULT1A1-Zellen

Bei den Zelllinien, die zwei allelische Varianten der hSULT1A1 exprimierten, zeigte sich ein Unterschied im Toxifizierungspotenzial. Die Expression von hSULT1A1*1 führte sowohl zu einer stärkeren Cytotoxizität des 1-HMP (Abb. 19) als auch zu einer stärkeren Zunahme der Mutagenität bei steigender 1-HMP-Konzentration als die Expression von hSULT1A1*V (Abb. 19). In der Zelllinie V79-hSULT1A1*V stieg die MF nur marginal über diejenige in der Kontrollzelllinie V79p an. Die cytosolische Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol der beiden Zelllinien war ähnlich (240 ± 40 pmol / mg / min in V79-hSULT1A1*1 und 154 ± 54 pmol / mg / min in V79-hSULT1A1*V). Erste Ergebnisse mit einer noch nicht näher charakterisierten Zelllinie, die hSULT1A1*2 exprimiert, zeigten, dass 1-HMP in dieser Zelllinie ebenso gut aktiviert wird, wie in V79-hSULT1A1*1-Zellen (Abb. 19).

3.1.1.3 V79-hSULT1E1-Zellen

Die hSULT1E1-exprimierende Zelllinie reagierte noch empfindlicher auf 1-HMP als V79-hSULT1A1*1 (Abb. 19). Hier stieg die MF bereits bei $0,03 \mu\text{M}$ deutlich an. Ab $0,3 \mu\text{M}$ waren die Zellzahlen bei der ersten Subkultivierung bei V79-hSULT1E1 stark verringert, worauf die relativ große Streuung der MF-Werte zurückzuführen sein dürfte.

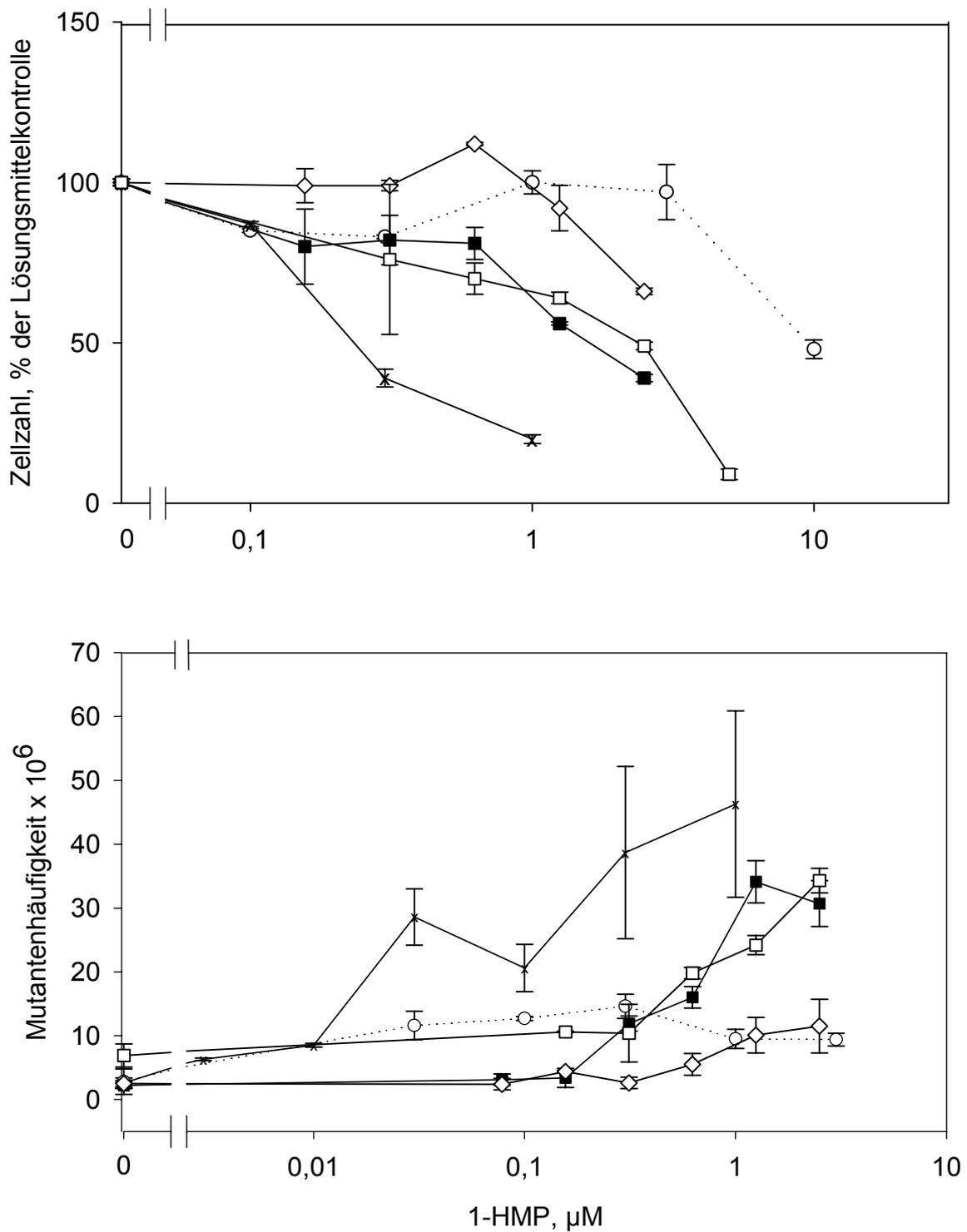


Abb. 19: SULT-abhängige (Geno-)toxizität von 1-HMP in V79-SULT-Zellen

Dargestellt ist die Cytotoxizität zum Zeitpunkt der ersten Subkultivierung im HPRT-Test (oberes Bild) sowie die Mutagenität am *hprt*-Locus (unteres Bild) in den Zelllinien V79-hSULT1A1*1 (■), hSULT1A1*V (◇), V79-hSULT1A1*2 (□) und in V79-hSULT1E1 (x). Als Kontrollzelllinie wurden V79p-Zellen (○) eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von zwei Kulturen.

3.1.2 Mutagenität von 1-Hydroxyethylpyren

Auch der sekundäre benzyliche Alkohol 1-HEP war in V79p nicht mutagen (Abb. 20). Durch V79-hSULT1E1 wurde er bereits in extrem geringen Konzentrationen bioaktiviert. Für 1-HEP konnte eine klare Enantioselektivität der Aktivierung durch die hSULT1E1 gezeigt werden (Abb. 20). Die MF nach Inkubation mit (+)-1-HEP stieg erst ab einer etwa um den Faktor 100 höheren Konzentration an als mit (-)-1-HEP (Abb. 20).

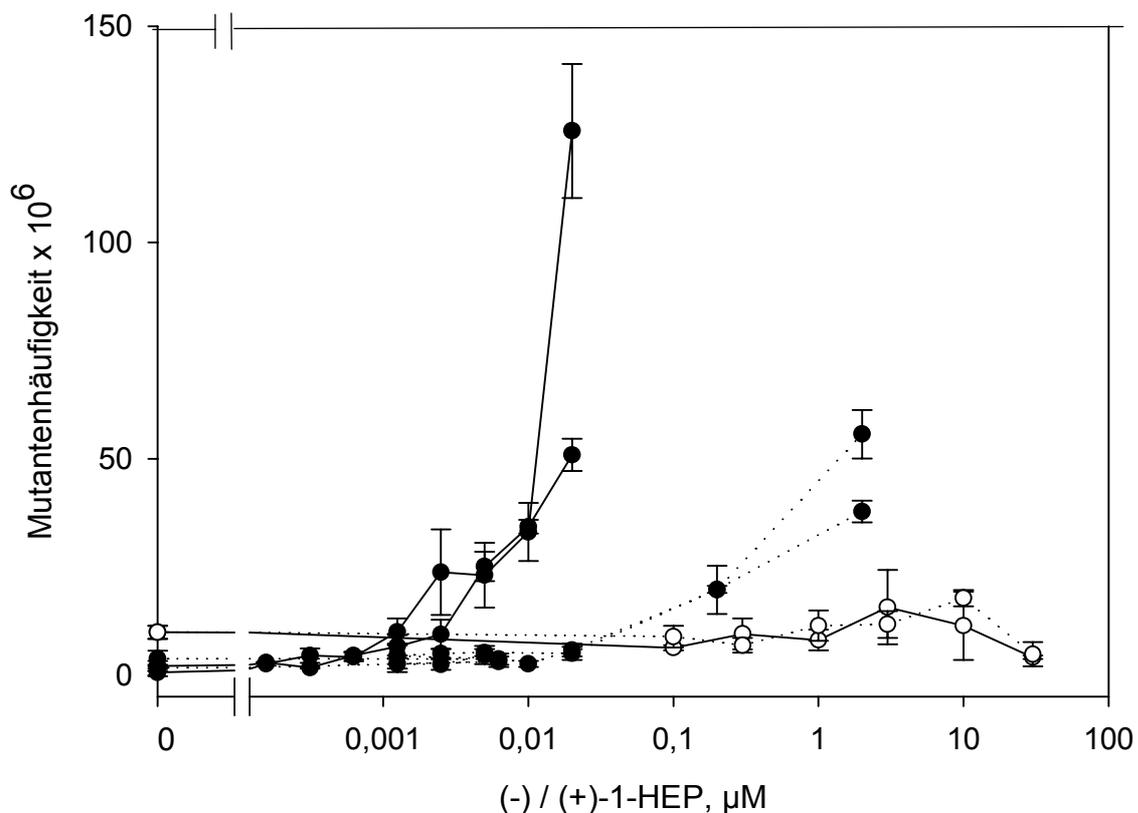


Abb. 20: SULT-abhängige Bioaktivierung in V79-hSULT1E1-Zellen

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus aus je zwei Versuchen mit (+)-1-HEP (gepunktete Linie) und (-)-1-HEP (durchgezogene Linie) in V79-hSULT1E1-Zellen (●) und je einem Versuch mit der Kontrollzelllinie V79p (○). Die Werte sind Mittelwerte ± SE von zwei Kulturen.

3.2 Mutagenität von 2-Nitropropan

2-Nitropropan war negativ in Mutagenitätsuntersuchungen mit SULT-defizienten Kontrollzellen (Abb. 21, Tabelle 9). In sämtlichen Zelllinien, die eine der allelischen Varianten der hSULT1A1 exprimierten, wurde 2-Nitropropan zum Mutagen aktiviert (Abb. 21). Das Toxifizierungspotenzial der hSULT1A1*V-Variante war um den Faktor 7 bis 10 schwächer als das der hSULT1A1*1-Variante (Tabelle 9). Die MF in der Zelllinie, welche die SULT1A1 der Ratte exprimiert, lagen leicht über denen in V79-hSULT1A1*V-Zellen und deutlich unter denen in V79-hSULT1A1*1-Zellen (Abb. 21). Als Parameter für die Expression der hSULT wurde die cytosolische Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol verglichen. Diese unterschied sich in den in Abb. 21 dargestellten Experimenten mit V79-hSULT1A1*1- und V79-hSULT1A1*V-Zellen um einen Faktor von 2,1 (Tabelle 8). Der Unterschied im Toxifizierungspotenzial dieser allelischen Varianten der hSULT1A1 war bei dieser Testsubstanz demnach noch ausgeprägter als bei 1-HMP (C 3.1.1). Wie bei 1-HMP zeigten erste Ergebnisse mit der Zelllinie V79-hSULT1A1*2, dass auch diese Variante zur Aktivierung von 2-Nitropropan in der Lage ist.

Die Aktivierung von 2-Nitropropan durch hSULT1A-Formen wurde in den Koexpressionszelllinien bestätigt (Tabelle 9). Die zusätzliche Expression von hCYP1A2 sollte für die Bioaktivierung in diesem Fall unerheblich sein. In keinem der drei Experimente mit V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen wurde eine Aktivierung des 2-Nitropropan erreicht, die der in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1-Zellen entsprach. Die SULT-Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol war in diesen Experimenten unterschiedlich hoch und erreichte zum Teil höhere Werte als in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1-Zellen.

Die höchsten MF erzeugte 2-Nitropropan in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 in einem Experiment mit sehr hoher cytosolischer Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol (1075 pmol / mg / min, Tabelle 9).

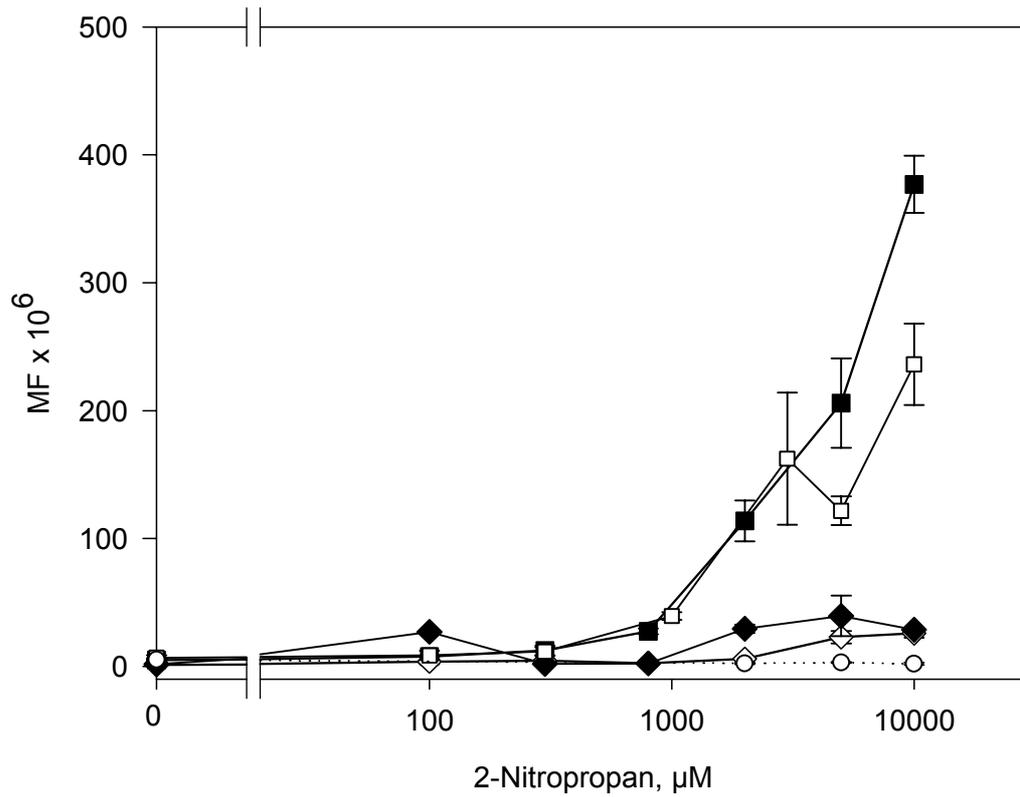


Abb. 21: SULT-abhängige Aktivierung von 2-Nitropropan in V79-SULT-Zellen

Die Zelllinien exprimierten hSULT1A1*1 (■), hSULT1A1*2 (□), hSULT1A1*V (◇) oder rSULT1A1 (◆). Als Kontrollzelllinie (○) wurde V79p eingesetzt. Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus als Mittelwert \pm SE von zwei Kulturen.

Tabelle 9: Vergleich des Toxifizierungspotenzials in V79-Zellen, die verschiedene hSULT1A-Formen exprimieren

Dargestellt sind der cytosolische 4-Nitrophenolumsatz bei Standard-Substratkonzentration (C 2.3.1.1) (Mittelwerte \pm SE aus Mehrfachmessungen (n = 2-4) einer Kultur, die parallel zum jeweiligen HPRT-Tests angesetzt wurde) sowie Mittelwerte \pm SE der Δ MF für 2-Nitropropan in zwei Kulturen (angegeben ist der SE der MF). Daten aus Abb. 21 wurden zum Vergleich z.T. wiederholt.

| Zelllinie | Experiment | Aktivität \pm SE ^b pmol / mg / min | Δ MF ^a x 10 ⁶ \pm SE |
|------------------------|----------------|--|---|
| V79-hSULT1A1*1 | 1 ^c | 165 \pm 18 | 201 \pm 35 |
| | 2 | 54 \pm 3 | 158 \pm 9 |
| | 3 | 47 \pm 10 | 164 \pm 16 |
| V79-hSULT1A1*2 | 1 | 196 \pm 25 | 115 \pm 11 |
| V79-hSULT1A1*V | 1 | 79 \pm 2 | 22 \pm 5 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 | 1 | 735 \pm 34 | 86 \pm 6 |
| | 2 | 607 \pm 18 | 49 \pm 1 |
| | 3 | 834 \pm 25 | 101 \pm 30 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 | 1 | 1016 \pm 35 | 28 \pm 2 |
| | 2 | 362 \pm 43 | 35 \pm 2 |
| | 3 | 47 \pm 9 | 21 \pm 3 |
| V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 | 1 | 1057 \pm 20 | 467 \pm 57 |
| | 2 | 1223 \pm 183 | 81 \pm 4 |
| V79p | | keine SULT- Expression | -3 \pm 1 |
| V79-hCYP1A2 | | keine SULT- Expression | 6 \pm 4 |

^abei 5000 μ M

^bgegenüber 4-Nitrophenol

^centspricht dem in Abb. 21 dargestellten Experiment

3.3 Aromatische Amine und Amide

Die Fähigkeit der hCYP1A2 und hSULT koexprimierenden Zelllinien, homozyklische aAA zu aktivieren, wurde anhand der vier Testsubstanzen 2,4-TDA, 2-AAF, 2-Aminoanthracen und 3'-M-DAB charakterisiert. Diese Verbindungen wurden in den Zelllinien V79-hCYP1A2-hSULT1C1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1, und V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 auf ihre mutagene Wirkung hin untersucht.

Mit der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1C1 konnte für keine der Verbindungen eine SULT-abhängige Bioaktivierung nachgewiesen werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mutagenität von aAA am *hprt*-Locus von V79-hCYP1A2- und V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen

Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von einer bis vier Kulturen (angegeben ist der SE der MF).

| μM | $\Delta\text{MF} \times 10^6 \pm \text{SE}^a$ | | | |
|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | 2-Aminoanthracen | | 2-AAF | |
| | I | II | I | II |
| 0,1 | 4,6 \pm 2,2 | -0,1 \pm 1,8 | – ^b | – ^b |
| 0,3 | 24,7 \pm 17,4 | 4,4 \pm 1,2 | – ^b | – ^b |
| 1 | 22,1 \pm 4,7 | 4,8 \pm 0,2 | -0,4 \pm 0,3 | -3,0 \pm 3,0 |
| 3 | 24,6 \pm 6,0 | 3,6 \pm 7,6 | 1,2 \pm 1,2 | -0,6 \pm 2,5 |
| 10 | 23,3 \pm 1,7 | 14,8 \pm 3,0 | 2,0 \pm 1,7 | 1,2 \pm 1,9 |
| 30 | 28,2 \pm 1,6 | 24,0 \pm 2,7 | 4,4 \pm 1,6 | 1,9 \pm 0,8 |
| 100 | – ^b | – ^b | 4,2 \pm 2,8 | 12,5 \pm 1,5 |

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 10

| µM | $\Delta\text{MF} \times 10^6 \pm \text{SE}^a$ | | | |
|-----|---|------------|----------------|----------------|
| | 2,4-TDA | | 3'-M-DAB | |
| | I | II | I | II |
| 1 | – ^b | 2,8 ± 1,9 | -0,7 ± 0,3 | 3,0 ± 2,1 |
| 3 | – ^b | 2,1 ± 0,2 | 1,7 ± 1,4 | 10,5 ± 9,3 |
| 10 | 0,8 ± 0,3 | 1,3 ± 0,1 | -2,5 ± 1,4 | 7,5 ± 7,0 |
| 30 | 4,5 ± 0,2 | 10,8 ± 3,3 | 11,9 ± 1,0 | -0,1 ± 0,5 |
| 100 | 8,0 ± 1,9 | 13,7 ± 7,8 | – ^b | – ^b |
| 300 | 19,6 ± 3,0 | 15,3 ± 0,3 | – ^b | – ^b |

I: V79-hCYP1A2-Zellen

II: V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen

^aangegeben ist der SE der MF^bkeine Daten vorhanden**3.3.1 Einfluss der aAA auf die SULT-Aktivität**

Bei der Bioaktivierung von aAA folgt der *N*-Hydroxylierung durch hCYP1A2 eine Konjugation zu einem reaktiven Ester (A 3, Abb. 2). Statt einer toxisierenden *N*-*O*-Sulfonierung wäre aber auch eine detoxifizierende *N*-Sulfonierung des Amins möglich. Auch ist denkbar, dass die Ausgangssubstanz die SULT hemmt, ohne selbst konjugiert zu werden. Beide Möglichkeiten wurden mit enzymatischen Untersuchungen geprüft. In einer ersten Versuchsreihe wurden 2-Aminoanthracen, 2-AAF und 3'-M-DAB anstelle des Standardsubstrats 4-Nitrophenol in Aktivitätsmessungen mit PAP³⁵S (B 2.3.4) eingesetzt. In cytosolischen Fraktionen von V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1-, V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-, V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1- und V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen wurde kein Umsatz im Konzentrationsbereich von 0,03 bis 300 µM bei Inkubationszeiten von 5, 10, 20, 40 und 240 min gefunden (Daten nicht gezeigt). Bei gleichzeitiger Inkubation der V79-Cytosole mit 4-Nitrophenol und den aromatischen Aminen wurde der 4-Nitrophenolumsatz der geprüften SULT, hSULT1A1*1 und hSULT1A1*2, bei aAA-Konzentrationen ≥ 30 µM deutlich gehemmt (Abb. 22).

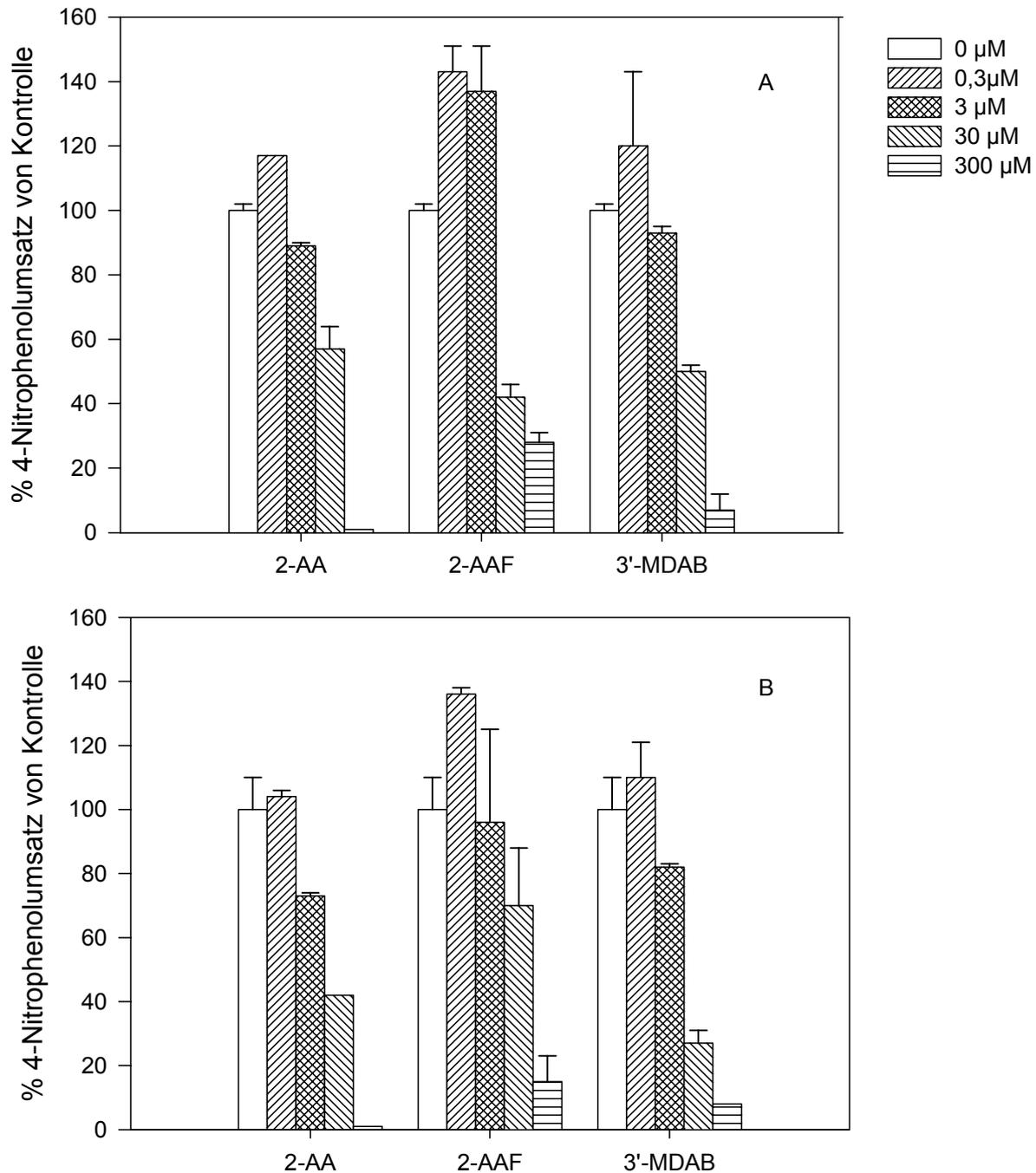


Abb. 22: Hemmung des 4-Nitrophenolumsatzes durch aAA

Die Aktivitäten wurden mit den für Standardmessungen gewählten 4-Nitrophenol-konzentrationen (C 2.3.1.1) unter Zusatz von 0,3 bis 300 µM der aAA in Cytosol von V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1-Zellen (A) und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen (B) bestimmt.

3.3.2 Mutagenität von 2-AAF

3.3.2.1 Kontrollzelllinien

2-AAF war in den Zelllinien, die weder hCYP1A2 noch SULT oder nur hCYP1A2 exprimieren, nicht mutagen (Tabelle 10, Abb. 23).

3.3.2.2 V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen

Die Zelllinien, die hCYP1A2 und hSULT1A1*1 oder hSULT1A1*2 koexprimierten, waren zu einer geringen Aktivierung von 2-AAF in der Lage (Abb. 23). Die Kriterien für ein positives Testergebnis (B 2.4.1) wurden aber nur in zwei Experimenten mit der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 erfüllt. In zwei weiteren Experimenten mit diesen Zelllinien stieg die MF nicht über die in der Zelllinie V79-hCYP1A2 gemessene an, was wahrscheinlich auf eine geringe SULT-Expression in diesen Experimenten zurückzuführen ist (Tabelle 11). Bei geringer SULT-Aktivität stieg die MF auch beim Einsatz des *N*-hydroxylierten Metaboliten *N*-OH-2-AAF direkt in den Test nicht über die Werte in der Kontrollzelllinie an (Abb. 23). In den übrigen Experimenten mit *N*-OH-2-AAF in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1- und V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen war *N*-OH-2-AAF schwach mutagen (Abb. 23).

Tabelle 11: SULT-Aktivität in Cytosol von V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen

Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von Mehrfachmessungen ($n = 2-4$) einer parallel zum HPRT-Test angesetzten Kultur. Als Substrat wurde 2-Nitrophenol in Standardkonzentrationen eingesetzt (C 2.3.1).

| Zelllinie | Experiment | SULT-Aktivität \pm SE, pmol / mg / min |
|-------------------|------------|--|
| V79-hCYP1A2-hSULT | | |
| 1A1*1 | 1 | 834 \pm 25 |
| 1A1*1 | 2 | 679 \pm 55 |
| 1A1*1 | 3 | 39 \pm 3 |
| 1A1*1 | 4 | n.u. ^a |
| 1A1*2 | 1 | 86 \pm 8 |
| 1A1*2 | 2 | 362 \pm 43 |

^anicht untersucht; in Exp. 4 wurde mit Klon 4 gearbeitet, der generell geringere SULT-Expression besitzt als der in den übrigen Experimenten eingesetzte Klon 36 (C 1.2, Tabelle 5).

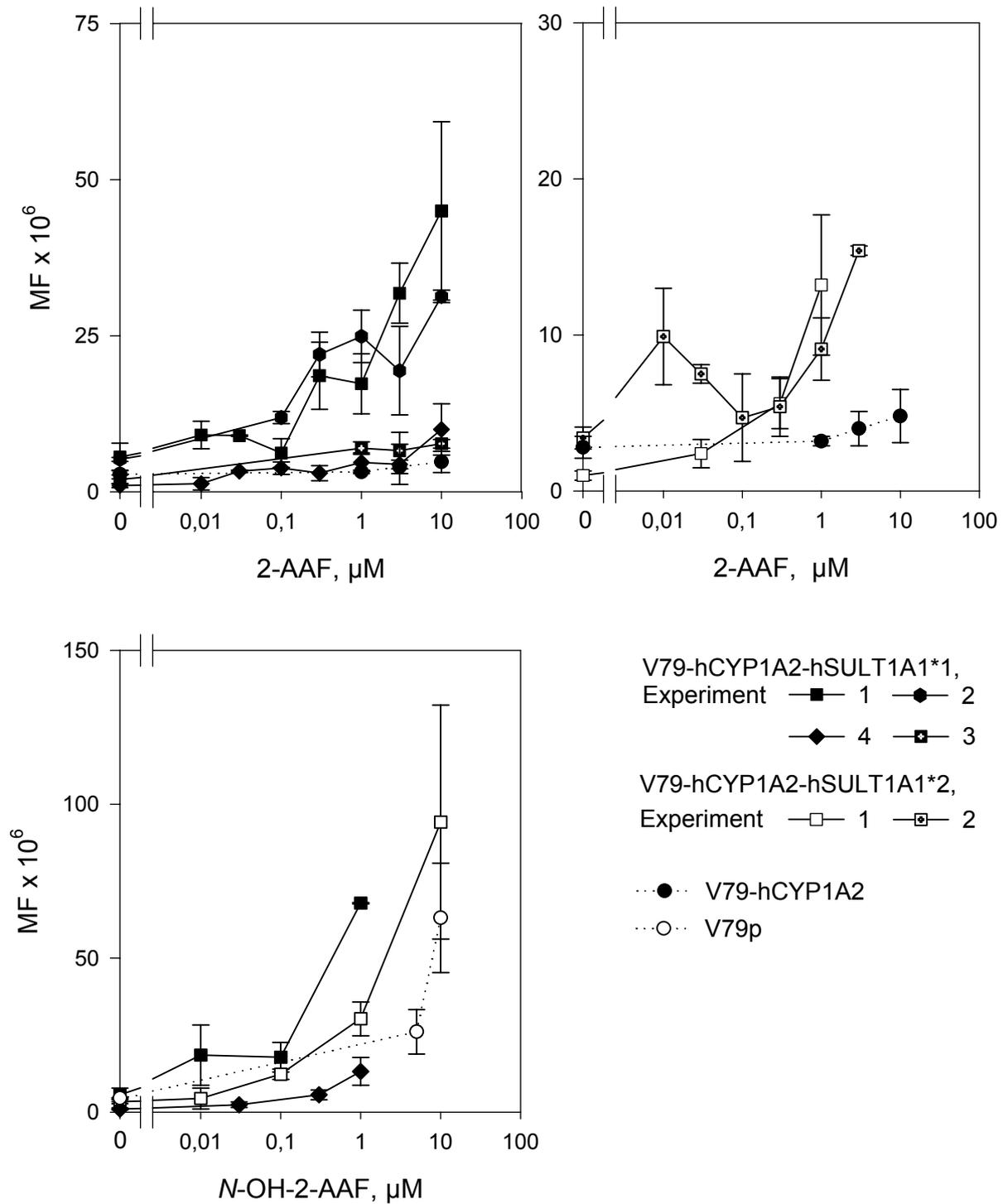


Abb. 23: SULT-abhängige Aktivierung von 2-AAF und N-OH-2-AAF in V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zelllinien

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus. Die Werte sind Mittelwerte und SE von zwei Kulturen.

3.3.2.3 V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen

Der Einsatz der Koexpressionszelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 führte zur Aktivierung des 2-AAF (Abb. 24). In allen Experimenten, in denen Konzentrationen über 0,3 μM getestet wurden, wurde bei diesen Konzentrationen ΔMF -Werte über 20 erreicht. In Experiment 3 war 2-AAF schon in deutlich niedrigeren Konzentrationen stark mutagen. Die Stärke der Mutagenität von 2-AAF korrelierte weder mit der cytosolischen Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol (Abb. 24), noch mit der Stärke der Aktivierung von BP-7,8-diol zum Mutagen (Abb. 24). Obwohl anhand der Zellzahlen bei der ersten Subkultivierung oder anhand der Kloniereffizienz bis 10 μM 2-AAF keine toxischen Effekte zu erkennen waren, wurden maximale ΔMF -Werte schon in Konzentrationen unter 1 μM erreicht. In Experiment 2 und 4 wurden höhere Konzentrationen zwar nicht getestet, die Zahl der Mutanten stagnierte mit steigenden 2-AAF-Konzentrationen aber bereits im Konzentrationsbereich unter 1 μM . Um zu untersuchen, ob eine zu geringe Metabolisierung des 2-AAF zu *N*-OH-2-AAF limitierend wirkte, wurde auch der *N*-hydroxylierte Metabolit in den Mutagenitätstest eingesetzt. *N*-OH-2-AAF war ebenfalls mutagen in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen (Abb. 24). Im Konzentrationsbereich von 0,03 bis 0,3 μM stieg die MF auf den dreifachen Wert im Vergleich zu 2-AAF an. Bei unterschiedlicher cytosolischer Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol (870 pmol / mg / min in Exp. 4 und 463 pmol / mg / min in Exp. 3) wurde *N*-OH-2-AAF in beiden Experimenten vergleichbar gut aktiviert. In Konzentrationen über 0,3 μM war *N*-OH-2-AAF in beiden Experimenten cytotoxisch (B 2.4.1; Zellzahlen bei der ersten Subkultivierung unter 10% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle).

In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 war 2-AAF nicht mutagen (Abb. 24). Die cytosolische Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol betrug in diesem Test 240 pmol / mg / min. Im gleichen Test wurde eine weitere Substanz, 3'-M-DAB, geprüft, die hSULT1A2*2-abhängig ebenso gut aktiviert wurde wie in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 (C 3.3.3). Das Ergebnis für 2-AAF in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 ist also als klar negativ zu bewerten.

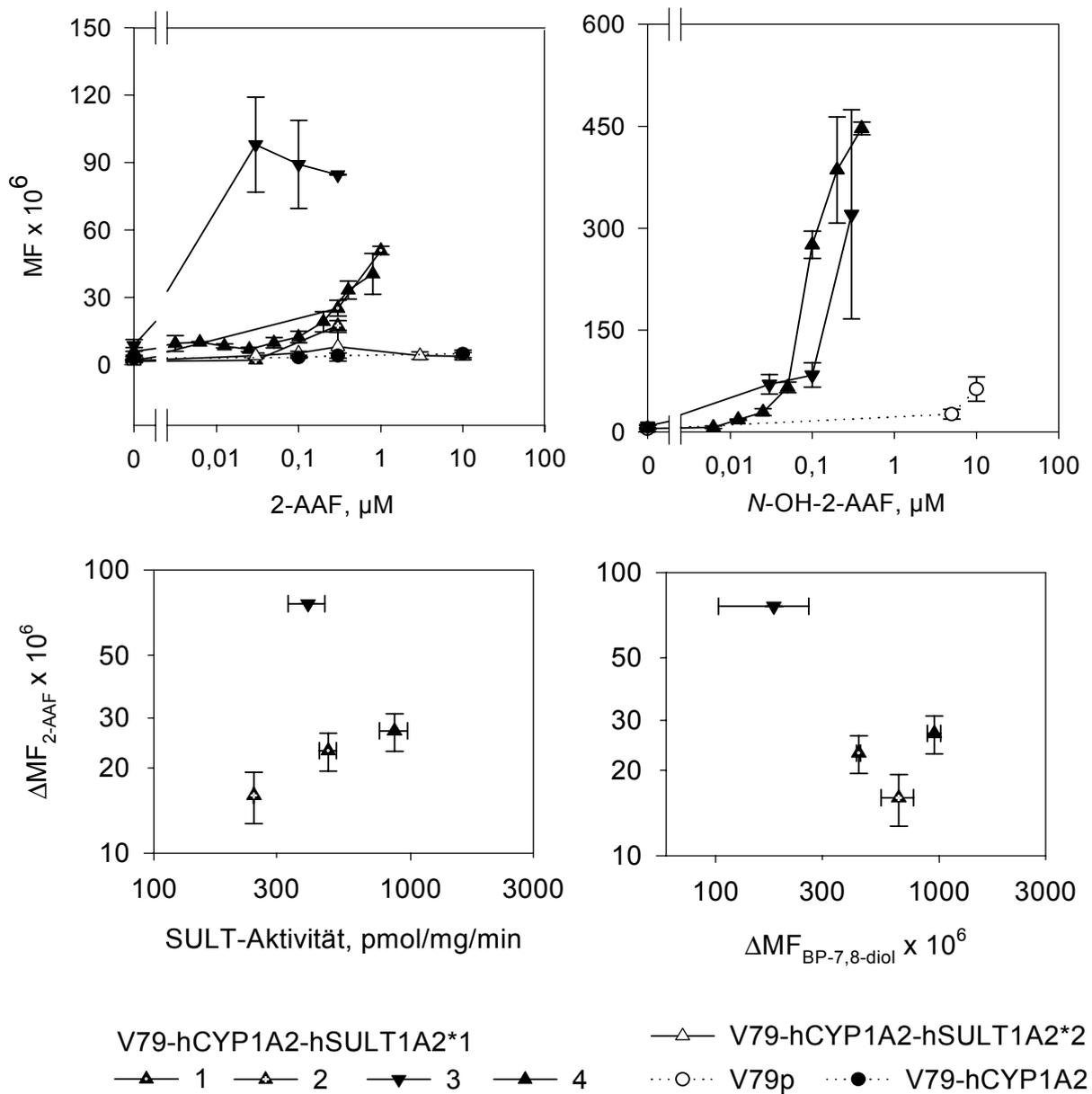


Abb. 24: SULT-abhängige Aktivierung von 2-AAF und N-OH-2-AAF in V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zelllinien

Dargestellt ist in den beiden oberen Abbildungen die Mutagenität am *hprt*-Locus und in den beiden unteren Abbildungen die Korrelation der durch 2-AAF induzierten ΔMF_{\max} zu der cytosolischen Aktivität gegenüber 4-Nitrophenol (linkes Bild) oder zu der induzierten MF von BP-7,8-diol, die einen Parameter für die funktionale Expression von hCYP1A2 darstellt (rechtes Bild). Die Werte sind Mittelwerte und SE von zwei Kulturen (obere Abbildungen), für die SULT-Aktivität von Mehrfachmessungen ($n = 2-4$) einer parallel zum HPRT-Test angesetzten Kultur und für ΔMF_{\max} und $\Delta MF_{BP-7,8-diol}$ von zwei Kulturen (untere Abbildungen).

3.3.3 Mutagenität von 2-Aminoanthracen

3.3.3.1 Kontrollzelllinien

2-Aminoanthracen zeigte in der Zelllinie, die hCYP1A2 exprimiert, eine geringe mutagene Wirkung in Konzentrationen über 0,1 μM (Tabelle 10, Abb. 25).

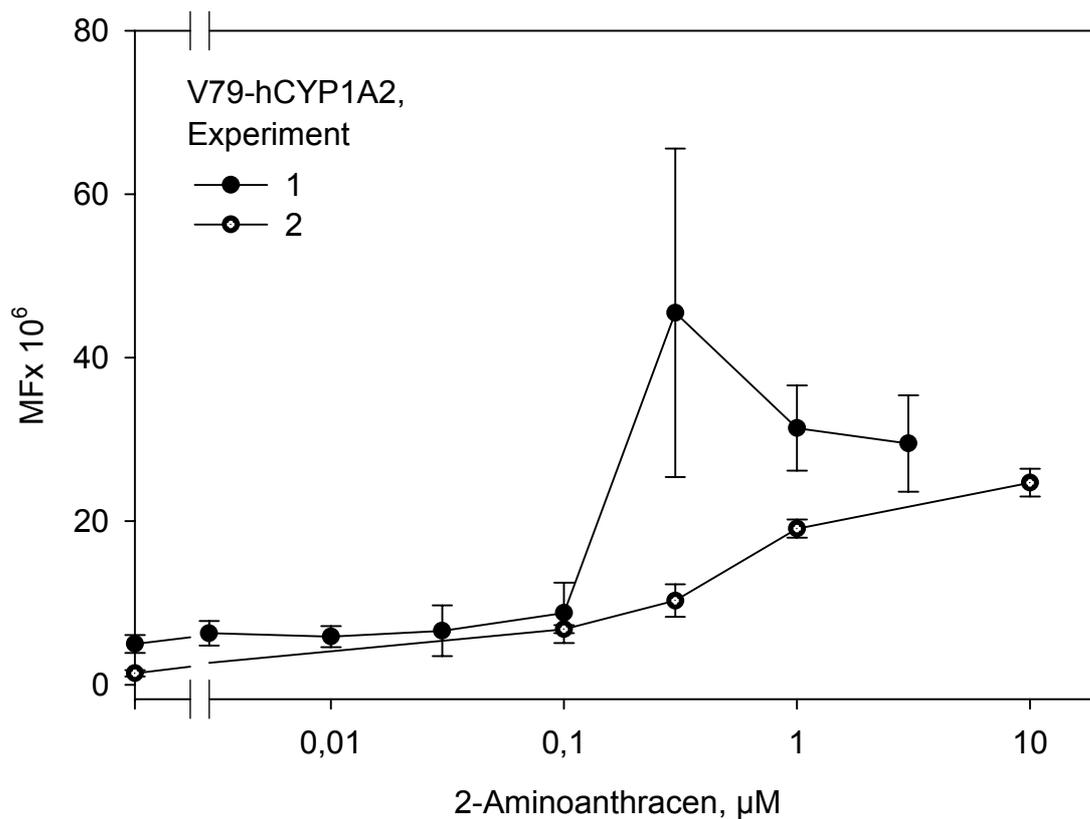


Abb. 25: Mutagene Wirkung von 2-Aminoanthracen in Kontrollzelllinien

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus. Die Werte sind Mittelwerte und SE von zwei Kulturen.

3.3.3.2 V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen

In V79-hSULT1A1*1 und V79-hSULT1A1*2-Zellen wurde 2-Aminoanthracen bereits im Konzentrationsbereich unter 0,1 μM aktiviert (Abb. 26). In diesen niedrigen Konzentrationen war die MF nur in einem gültigen Experiment mit der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 nicht höher als in V79-hCYP1A2-Zellen (Experiment 3). Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. In zwei Experimenten, die aufgrund einer hohen Zahl von spontanen *hprt*⁻-Mutanten oder aufgrund einer zu niedrigen Klonierungseffizienz als ungültig gewertet wurden, war die MF im Konzentrationsbereich unter 0,1 μM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle klar erhöht (Daten nicht gezeigt).

In höheren Konzentrationen war die MF in V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen nicht oder nur geringfügig höher als in den Kontrollzellen. In diesem Konzentrationsbereich zeigten die Werte einen unregelmäßigen Kurvenverlauf und große Streuungen (Daten nicht gezeigt).

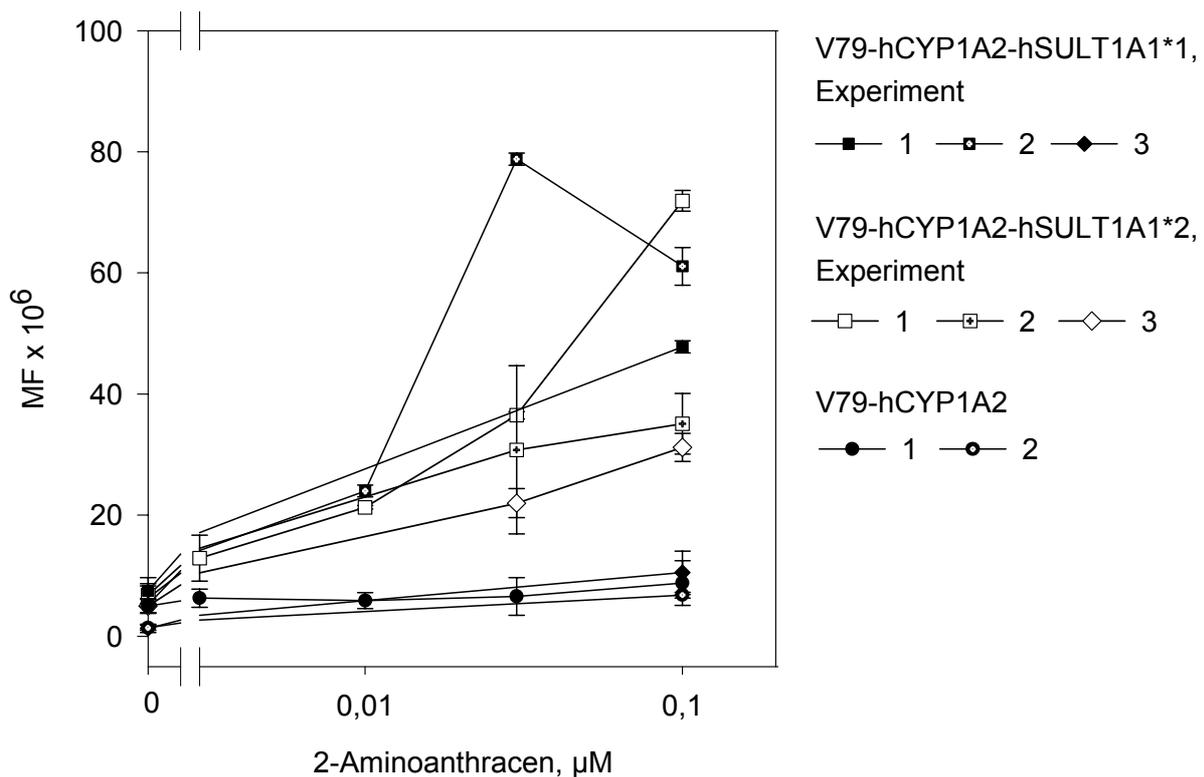


Abb. 26: SULT-abhängige Aktivierung von 2-Aminoanthracen in V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zelllinien

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus. Die Werte sind Mittelwerte und SE von zwei Kulturen.

3.3.3.3 V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen

In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 erhöhte 2-Aminoanthracen bei einer Konzentration von 1 μM in allen Experimenten ΔMF über 20×10^{-6} (Tabelle 12). In Experiment 1 hatte 2-Aminoanthracen im Konzentrationsbereich von 0,003 bis 3 μM eine klare mutagene Wirkung (Daten nicht vollständig gezeigt). Dies war in den übrigen Experimenten, möglicherweise aufgrund einer geringeren Expression entweder der hSULT1A2*1 oder des hCYP1A2, nicht der Fall (Tabelle 13).

In V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 war die MF in keinem Test deutlich über die in V79-hCYP1A2 gemessene hinaus erhöht (Tabelle 12). Gleichzeitig mit 2-Aminoanthracen wurde 3'-M-DAB geprüft, das durch V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 SULT-abhängig aktiviert wurde und somit als Positivkontrolle gelten kann. Wie bei 2-AAF ist das negative Ergebnis für 2-Aminoanthracen in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 demnach gut abgesichert.

Tabelle 12: Mutagene Wirkung von 2-Aminoanthracen in V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zelllinien am *hprt*-Locus

| Zelllinie V79- | Experiment | $\Delta\text{MF} \times 10^6$ | \pm | SE ^a |
|--------------------|------------|-------------------------------|-------|-----------------|
| hCYP1A2 | 1 | 26 | \pm | 5 |
| | 2 | 18 | \pm | 1 |
| hCYP1A2-hSULT1A2*1 | 1 | 73 | \pm | 10 |
| | 2 | 56 | \pm | 7 |
| | 3 | 61 | \pm | 12 |
| hCYP1A2-hSULT1A2*2 | 1 | 20 | \pm | 2 |
| | 2 | 20 | \pm | 1 |

^aMittelwerte von zwei unabhängigen Kulturen bei 1 μM 2-Aminoanthracen; angegeben ist der SE der MF

Tabelle 13: Werte der Parameter für die funktionelle SULT- und CYP-Expression in HPRT-Tests mit 2-Aminoanthracen in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1

| V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 | cytosolische SULT-Aktivität ± SE, pmol / mg / min ^b | $\Delta MF_{BP7,8\text{-diol}} \times 10^6 \pm SE^a$ |
|------------------------|--|--|
| Experiment 1 | 1075 ± 19 | 596 ± 60 |
| Experiment 2 | 1223 ± 183 | 387 ± 32 |
| Experiment 3 | 245 ± 1 | 660 ± 109 |

^aMittelwerte von zwei unabhängigen Kulturen bei 3 µM BP-7,8-diol; angegeben ist der SE der MF

^bMittelwerte ± SE aus 2-4 unabhängigen Messungen einer Cytosolpräparation

3.3.4 Mutagenität von 3'-M-DAB

3.3.4.1 Kontrollzelllinien

3'-M-DAB war negativ in Kontrollzelllinien, die weder SULT noch CYP oder nur hCYP1A2 exprimierten (Tabelle 10, Abb. 27).

3.3.4.2 V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen

Koexpressionszellen für hCYP1A2 und hSULT1A1 waren in der Lage, 3'-M-DAB zu bioaktivieren (Abb. 27). In sämtlichen Experimenten mit V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Koexpressionszelllinien waren die Zellzahlen bei der ersten Subkultivierung bei einer Konzentration von 30 µM, in den meisten Experimenten bereits bei 10 µM, um mindestens 50% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle vermindert (Tabelle 14). In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 stieg die MF ab einer Konzentration von 0,1 µM über die in den Kontrollzelllinien an, in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 ab 0,3 µM. In dieser Zelllinie wurden keine ΔMF -Werte über 20 erreicht. In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 hatte 3'-M-DAB bei einer Konzentration von 1 µM in allen Experimenten eine mutagene Wirkung. In Experiment 3 wurde 3'-M-DAB extrem stark aktiviert. Dieses Experiment fiel im Vergleich zu anderen Experimenten mit der gleichen Zelllinie durch eine besonders gute Aktivierung von BP-7,8-diol auf (Abb. 28).

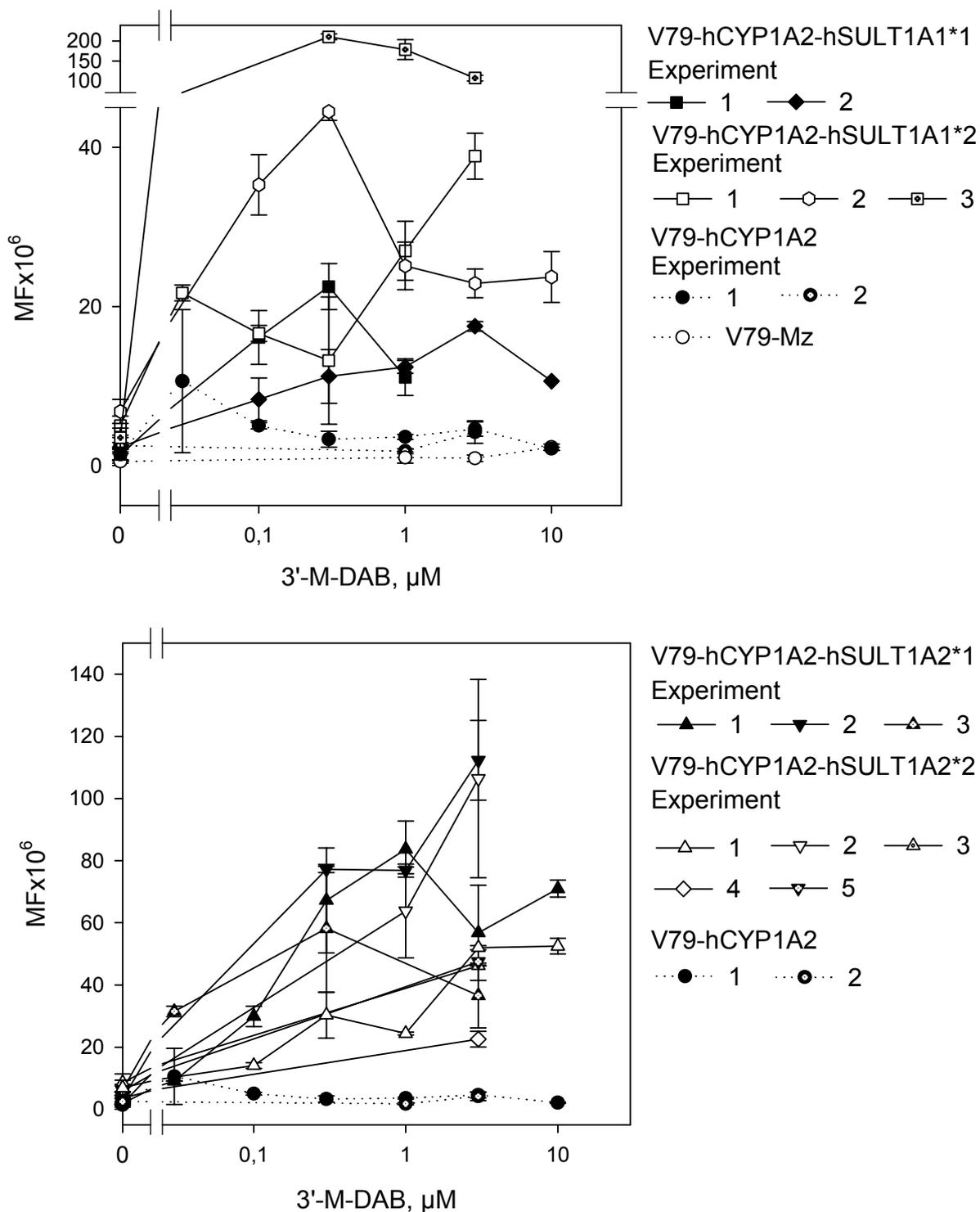


Abb: 27: SULT-abhängige Aktivierung von 3'-M-DAB in V79-hCYP1A2-hSULT1A-Zelllinien

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus in Zelllinien, die hCYP1A2 und hSULT1A1 (oberes Bild) oder hCYP1A2 und hSULT1A2 (unteres Bild) exprimieren. Die Werte sind Mittelwerte und SE von zwei Kulturen.

Tabelle 14: Cytotoxische Wirkung von 3'-M-DAB

Dargestellt sind die prozentualen Zellzahlen bei der 1. Subkultivierung im HPRT-Test als Mittelwerte \pm SE von zwei Kulturen. Es sind nur die Experimente aus Abb. 27 aufgeführt, bei denen 3'-M-DAB in Konzentrationen über 3 μ M getestet wurde.

| Zelllinie V79- | Experiment | Zellzahl, % von Lösungsmittelkontrolle | |
|--------------------|------------|--|----------------------|
| | | 3'-M-DAB, 10 μ M | 3'-M-DAB, 30 μ M |
| hCYP1A2-hSULT1A1*1 | 1 | 23 \pm 2 | n.u. |
| | 2 | 62 \pm 1 | n.u. |
| hCYP1A2-hSULT1A1*2 | 2 | 40 \pm 1 | 42 \pm 2 |
| | 3 | 26 \pm 5 | 16 \pm 1 |
| hCYP1A2 | 1 | 28 \pm 2 | 31 \pm 2 |
| | 2 | 34 \pm 4 | 20 \pm 1 |
| hCYP1A2-hSULT1A2*1 | 1 | 40 \pm 1 | n.u. |
| hCYP1A2-hSULT1A2*2 | 1 | 64 \pm 6 | n.u. |
| | 2 | 40 \pm 1 | 28 \pm 5 |
| Mz | | 67 \pm 2 | 33 \pm 1 |

n.u.: nicht untersucht

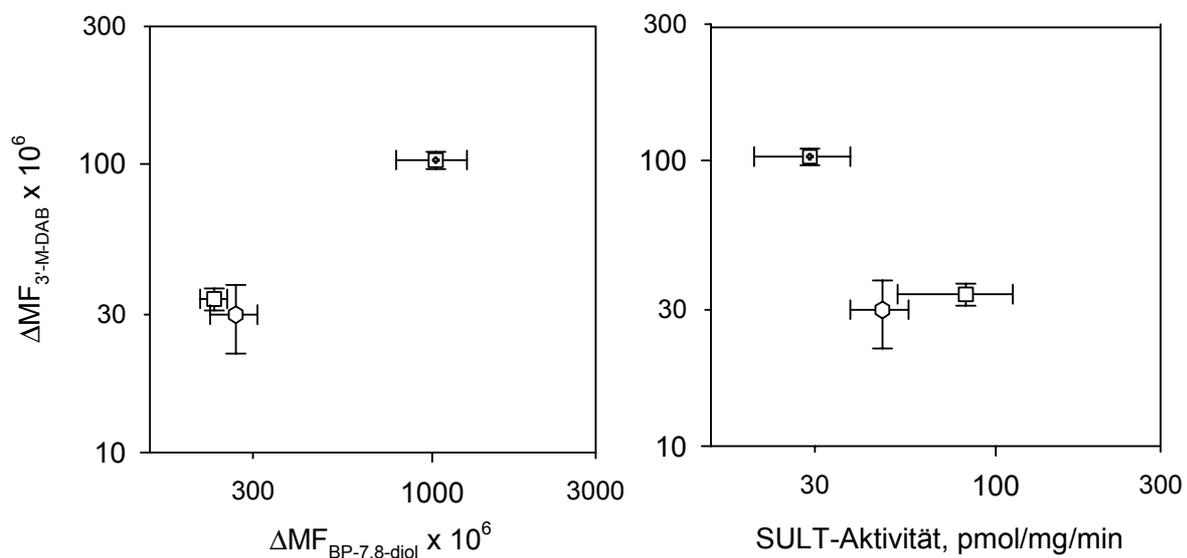


Abb. 28: Korrelation der mutagenen Wirkung von 3'-M-DAB zu der Expressionsstärke von SULT und CYP in rekombinanten V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen

Dargestellt sind drei unabhängige Experimente. Daten aus Abb. 27 wurden zu Vergleichszwecken wiederholt. Die Werte sind Mittelwerte und SE von Mehrfachmessungen ($n = 2-4$) einer parallel zum HPRT-Test angesetzten Kultur für die SULT-Aktivität und von zwei Kulturen eines HPRT-Tests bei 3 μ M der jeweiligen Testsubstanz für $\Delta MF_{3'-M-DAB}$ und $\Delta MF_{BP-7,8-diol}$.

3.3.4.3 V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen

3'-M-DAB wurde sowohl in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen als auch in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen (Pabel *et al.*, 1999) konzentrationsabhängig zum Mutagen aktiviert. In allen Experimenten wirkte 3'-M-DAB ab einer Konzentration von 0,3 µM mutagen. Die MF-Werte lagen ab 0,1 µM über den Werten in den Kontrollzelllinien. Die mutagenen Effekte nahmen nur in wenigen Experimenten in Konzentrationen über 1 µM zu. Da 3'-M-DAB in einigen Experimenten selbst als Positivkontrolle für die funktionelle SULT- und CYP-Expression eingesetzt wurde, wurden die cytosolische SULT-Aktivität oder die Aktivierung von BP-7,8-diol in den Experimenten in Abb. 27 nicht immer mitbestimmt. In V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen war jedoch in Experiment 2 (Abb. 27 unten), in dem die MF-Werte bei 3 µM anstiegen, die Aktivierung von BP-7,8-diol deutlich höher ($\Delta MF \times 10^6 \pm SE = 684 \pm 13,2$) als in den Experimenten 1 und 3 (Abb. 27 unten, $\Delta MF \times 10^6 = 437 \pm 9, 378 \pm 32$), während eine extrem hohe SULT-Aktivität in Experiment 3 (1223 ± 183) nicht zu einer stärkeren mutagenen Wirkung des 3'-M-DAB als in den übrigen Experimenten führte.

3.3.5 Mutagenität von 2,4-TDA

3.3.5.1 Kontrollzelllinien

2,4-TDA zeigte keine direkte Mutagenität in den CYP- und SULT-freien Kontrollzellen (Abb. 29). Ein marginaler Anstieg der MF erfolgte beim Einsatz der Zelllinie, die hCYP1A2 exprimierte (Tabelle 10, Abb. 29).

3.3.5.2 V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen

In Experimenten mit V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen zeigte 2,4-TDA in Konzentrationen über 30 µM eine mutagene Wirkung. Die MF stieg in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1- im Vergleich zu V79-hCYP1A2-Zellen bereits in zehnfach niedrigeren Konzentrationen leicht an. Der Anstieg der MF war in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2- im Vergleich zu V79-CYP1A2-hSULT1A1*1-Zellen im niedrigen Konzentrationsbereich etwas zu höheren Konzentrationen hin verschoben (Abb. 29). In höheren Konzentrationen erreichte die Mutagenität von 2,4-TDA in V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2-Zellen aber höhere Werte.

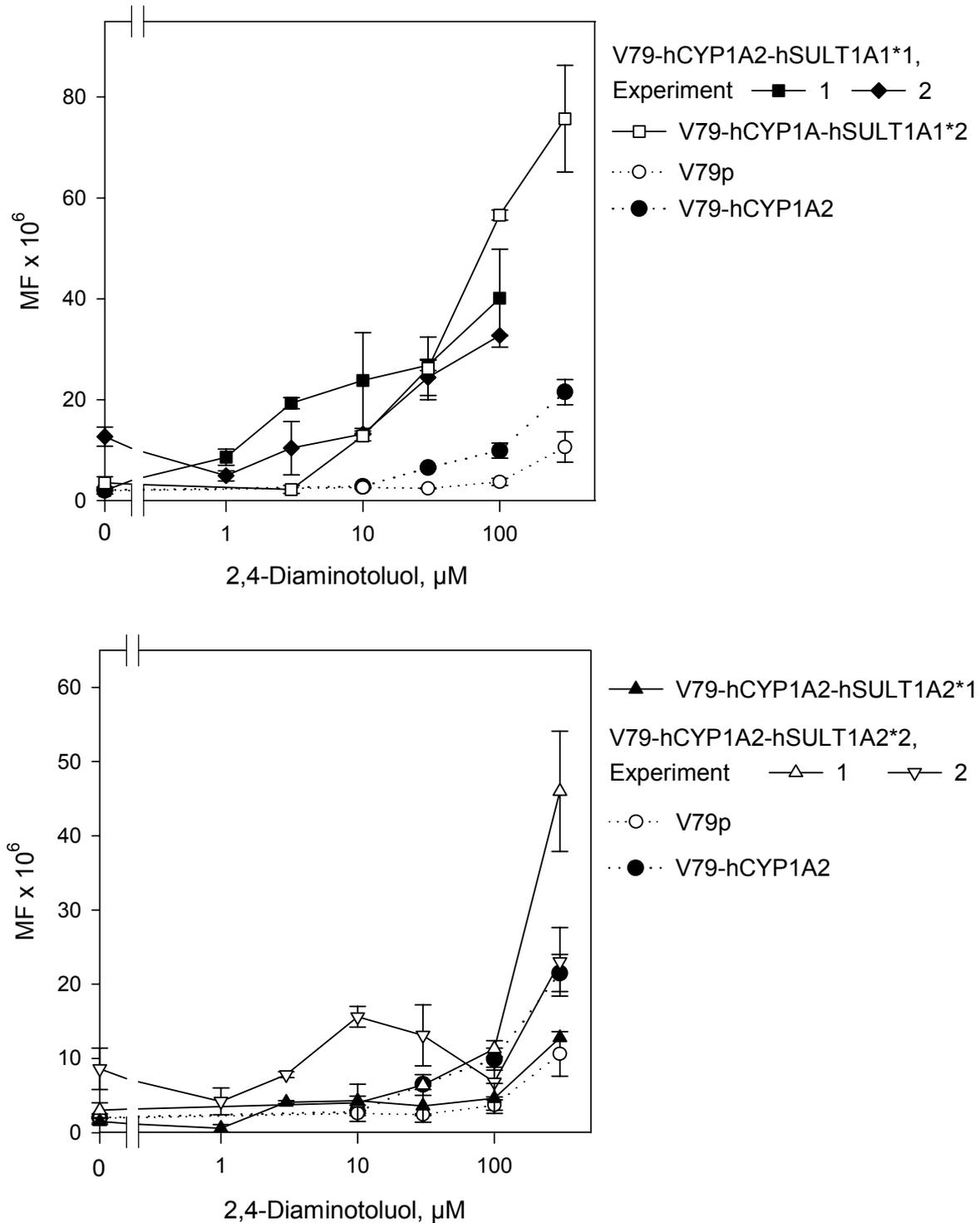


Abb. 29: SULT-abhängige Aktivierung von 2,4-TDA in V79-hCYP1A2-hSULT1A-Zelllinien

Dargestellt ist die Mutagenität am *hprt*-Locus als Mittelwert und SE von zwei unabhängigen Kulturen in Kontrollzelllinien und V79-hCYP1A2-hSULT1A1-Zellen (oberes Bild) oder V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen (unteres Bild). In Experiment 1 und 2 (obere Abbildung) wurden unterschiedliche Klone der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 eingesetzt (Klon 4 in Experiment 1 und Klon 36, der in dieser Arbeit üblicherweise verwendet wurde, in Experiment 2).

3.3.5.3 V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zellen

In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2 stieg die durch 2,4-TDA induzierte MF im Konzentrationsbereich von 3 bis 30 μM in Experiment 2 etwas an. Eine Zunahme der MF, die die Kriterien für ein positives Testergebnis erfüllte, wurde aber nur in Experiment 1 in Konzentrationen ab 30 μM nachgewiesen. In V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen stieg die MF nicht stärker an als in V79-hCYP1A2-Zellen. Im gleichen Experiment war eine andere Testsubstanz, 2-Aminoanthracen, mutagen, die hCYP1A2- und hSULT-abhängig bioaktiviert wurde.

D Diskussion

1. SULT-exprimierende V79-Zelllinien als Testsystem

Die bisher durchgeführten Studien zur SULT-abhängigen Aktivierung von aAA beziehen sich größtenteils auf die SULT der Ratte. Zunächst hielt man rSULT1A1 für das Enzym der Ratte, das die höchste Aktivität gegenüber aAA hat (Gilissen *et al.*, 1992; Yamazoe *et al.*, 1994). Später erkannte man, dass in Untersuchungen an gereinigten SULT aus Rattenleber wahrscheinlich oft mit einem Heterodimer aus rSULT1C1 und rSULT1A1 gearbeitet worden war (Kiehlbauch *et al.*, 1995). Durch die Klonierung und die Expression der rSULT1C1 konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym eine höhere Aktivität gegenüber *N*-OH-2-AAF hat als rSULT1A1 (Nagata *et al.*, 1993). Die Fähigkeit der rSULT1C1, aAA zum Mutagen zu aktivieren, wurde auch in V79-Zelllinien, die sowohl rCYP1A2 als auch rSULT1C1 exprimieren, gezeigt (Glatt *et al.*, 1996; 1998b). In bisherigen Studien an rekombinanten humanen SULT zur Aktivierung von aAA wurde meistens nur der Einfluss von einer oder zwei unterschiedlichen SULT-Formen untersucht (Ozawa *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 1998; Wu, 2000; Lewis *et al.*, 2000). Untereinander sind die Studien aufgrund unterschiedlicher experimenteller Ansätze kaum vergleichbar. Untersuchungen an Enzympräparationen aus humanem Gewebe zeigten, dass hSULT1A-Enzyme die Enzyme des Menschen sind, die aAA aktivieren können (Abu-Zeid *et al.*, 1992; Gilissen *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995). In diesen Studien wurde allerdings ausschließlich mit Präparaten aus der Leber gearbeitet. Viele humane SULT werden aber überwiegend in extrahepatischen Geweben exprimiert. Auch die hSULT1C1 wurde bei Erwachsenen weder auf der Ebene der mRNA noch auf Proteinebene in der Leber nachgewiesen (Her *et al.*, 1997). Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit hSULT1A1*1, hSULT1A1*2, hSULT1A2*1, hSULT1A2*2 und hSULT1C1 für die Koexpression mit hCYP1A2 in V79-Zellen ausgewählt.

Für die Mutagenitätsuntersuchungen wurden zunächst diejenigen Zellklone mit der höchsten stabilen Expression ausgewählt. Bei den V79-hSULT1A1- und -hSULT1E1-Zelllinien lag diese im Bereich der Expression in humanem Referenzgewebe oder etwas darüber. Wie die hSULT1C1 konnte auch die hSULT1A2 auf der Proteinebene in den bisher untersuchten Geweben nur sehr schlecht nachgewiesen werden (Teubner, 2001). Nach bisherigen Erkenntnissen aus der Arbeitsgruppe wird hSULT1A2 in Colon exprimiert, wobei das Expressionsniveau geringer ist als das der hSULT1A1. Möglicherweise werden sowohl hSULT1C1 als auch hSULT1A2 in Geweben generell nur schwach exprimiert. Eine

stärkere Expression in rekombinanten Zellen kann also zwar die Sensitivität des Testsystems erhöhen, spiegelt aber nicht unbedingt die Situation *in vivo* wider. Da in den Zellklonen mit hoher SULT-Aktivität messbare Effekte eher zu erwarten sind, sind diese dennoch am besten geeignet, um die Testsysteme zu etablieren und Positivkontrollen ausfindig zu machen. In späteren Untersuchungen sollten auch Zellklone mit geringerer SULT-Expression eingesetzt werden, die Aufschluss darüber geben können, in welchen Fällen die Stärke der SULT-Expression die Nachweisgrenze für die Mutagenität einer Substanz *in vitro* bestimmt. *In vivo* übernehmen SULT als Enzyme mit hoher Substrataffinität und geringer Kapazität typischerweise die Metabolisierung im niedrigen Konzentrationsbereich, während bei höheren Konzentrationen eher Glucuronide gebildet werden (Temellini *et al.*, 1991). Daten aus *in vitro*-Untersuchungen, in denen keine Konkurrenz zu anderen Phase II Enzymen bestand, sind demnach in dem Fall möglicherweise nur begrenzt relevant in Bezug auf die Verhältnisse *in vivo*, wenn erst in sehr hohen Substratkonzentrationen eine Toxifizierung stattfindet. Mit den neuen V79-SULT-Zellen konnten einige Testsubstanzen schon in sehr niedrigen Dosierungen aktiviert werden.

2. Aktivierung benzyliischer Alkohole und des 2-Nitropropan in V79-SULT-Zelllinien

In bakteriellen SULT-profizienten Systemen wurde die Aktivierung benzyliischer Alkohole durch SULT bereits eingehend untersucht (Glatt *et al.*, 1990b; 1995; 1998b; Hagen *et al.*, 1998). 1-HMP wurde in diesem Testsystem durch viele der untersuchten SULT stark bioaktiviert. Deswegen konnte es bei den neu konstruierten Zelllinien als Kontrollsubstanz für die Fähigkeit zur intrazellulären Metabolisierung durch SULT und die Erfassung der mutagenen Effekte der ultimalen Metabolite eingesetzt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Zelllinien V79-hSULT1A1*1, V79-hSULT1A1*V und V79-hSULT1E1 erwiesen sich als geeignet zum Nachweis der Mutagenität benzyliischer Alkohole. Die mutagenen Effekte waren in dem eukaryotischen Testsystem allerdings sowohl mit 1-HMP als auch mit dem sekundären benzyliischen Alkohol 1-HEP schwächer als im bakteriellen System. Das mag daran liegen, dass in den V79-Zellen eine schnelle Reparatur der DNA-Schäden stattfand, was sich in einer starken, 1-HMP-induzierten UDS manifestierte (Kreis *et al.*, 2000). Eine unterschiedliche Substratspezifität der einzelnen SULT-Formen und eine ausgeprägte Enantioselektivität waren jedoch auch im V79-Zellsystem vorhanden und spiegelten die Verhältnisse im bakteriellen System (Glatt *et al.*, 1997; Hagen *et al.*, 1998) wider. Die Mutagenität und die Toxizität von 1-HMP war in V79-hSULT1E1 am höchsten, in V79-hSULT1A1*1 etwas geringer und in V79-hSULT1A1*V deutlich niedriger. (-)-(S)-1-HEP war in V79-hSULT1E1

bereits in 100fach niedrigeren Konzentrationen als (+)-(R)-1-HEP deutlich mutagen. Die Enantioselektivität der hSULT2A1 war im bakteriellen System genau umgekehrt (Glatt *et al.*, 1997; Hagen *et al.*, 1998; Landsiedel *et al.*, 1998). Da die beiden Enzyme in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, kommen verschiedene Organe als Zielorgane für die mutagene Wirkung der Enantiomere in Frage.

Die vorrangig in Männchen exprimierte SULT1E1 der Ratte war im eukaryotischen Expressionsmodell gegenüber den untersuchten Substraten nicht aktiv (C 2.3.1). Auch im bakteriellen Expressionsmodell führte die rSULT1E1 nicht zur Aktivierung von 1-HEP (Glatt *et al.*, 2000). In der Ratte wird 1-HEP wahrscheinlich vorrangig durch rSULT2A1 aktiviert, die aber, ebenso wie hSULT2A1, eine genau umgekehrte Enantioselektivität im Vergleich zur hSULT1E1 besitzt, wie mit SULT-exprimierenden Salmonellenstämmen gezeigt werden konnte (Glatt *et al.*, 1997; Hagen *et al.*, 1998; Landsiedel *et al.*, 1998). Dies zeigt, wie hilfreich *in vitro*-Untersuchungen an rekombinanten Testorganismen sein können, um falsche Rückschlüsse vom Tiermodell auf den Menschen zu vermeiden.

Mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit etablierten hSULT1A1-exprimierenden V79-Zelllinien konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Aktivierung eines Nitroalkanes, des 2-Nitropropan, durch humane SULT in Säugerzellen ausreicht, um einen gentoxischen Metaboliten zu generieren (Kreis *et al.*, 2000; Glatt *et al.*, 2000).

2-Nitropropan ist eine Industriechemikalie, die als Lösungsmittel eingesetzt wird (IARC, 1982). Es wurde außerdem in Zigarettenrauch gefunden (Hoffman und Rathkamp, 1968). Seit 1979 ist 2-Nitropropan als Hepatokanzerogen für die Ratte (Lewis *et al.*, 1979; Andrae, 1988) und als Mutagen im bakteriellen Mutagenitätstest (Hite und Skeggs, 1979) bekannt. Unter den untersuchten Organen der Ratte induzierte 2-Nitropropan ausschließlich in der Leber UDS (Andrae, 1988), Einzelstrangbrüche (Robbiano *et al.*, 1991), Mikrokernbildung (George *et al.*, 1989) und Basenveränderungen auf DNA- und RNA-Ebene (Fiala *et al.*, 1989). Auch *in vitro* erhöhte 2-Nitropropan in Leberzelllinien die DNA-Reparatur (Andrae, 1988; Roscher *et al.*, 1990). Bei physiologischem pH-Wert kann es tautomerisieren und liegt dann vorwiegend als Propan-2-Nitronat vor (Linhart *et al.*, 1991). Einige Untersuchungen gaben Anlass für die Vermutung, dass SULT eine wichtige Rolle beim weiteren Metabolismus von 2-Nitropropan spielen. In der Ratte sowie in SULT-profizienten Primärzellkulturen verminderten SULT-Inhibitoren die durch 2-Nitropropan induzierte UDS und die Modifizierung von Guaninnukleotiden (Sodum *et al.*, 1994; Kreis *et al.*, 1998). In verschiedenen humanen Zelllinien, die geringe oder keine SULT exprimierten, war keine Gentoxizität von 2-Nitropropan nachzuweisen (Andrae, 1988).

Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich 2-Nitropropan in V79-Zellen als nicht mutagen. Durch die Expression von hSULT1A1 wurden die Säugerzellen jedoch fähig, 2-Nitropropan zu einem Mutagen zu metabolisieren. Mit denselben V79-hSULT1A1*1-Zellen führten Kreis *et al.* (2000) Untersuchungen zur Induktion von UDS durch. Auch an

diesem gentoxischen Endpunkt war nur in den hSULT-exprimierenden V79-Zelllinien ein Effekt durch 2-Nitropropan messbar, nicht jedoch in den Wildtypzellen (Kreis *et al.*, 1998). Das unterschiedliche Aktivierungspotenzial der beiden Zelllinien, welche die hSULT1A1*1 oder hSULT1A1*V exprimierten, zeigte sich in der Induktion von UDS ebenso wie in der Häufigkeit der Mutationen am *hprt*-Locus (Andrae, unveröffentlichtes Ergebnis). Zuvor konnte schon mit der in dieser Arbeit konstruierten Zelllinie, welche die SULT1A1 der Ratte stabil exprimiert, und einer früher etablierten Zelllinie für die Expression der SULT1C1 der Ratte gezeigt werden, dass beide Enzyme zur Bioaktivierung von 2-Nitropropan in der Lage sind. Die Induktion von UDS war in der Zelllinie V79-rSULT1A1 stärker als in V79-rSULT1C1 (Andrae *et al.*, 1999). In der rSULT1A1-Zelllinie erzeugte 2-Nitropropan ebenfalls Mutationen am *hprt*-Locus (Glatt *et al.*, 2000). Auch frühere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die rSULT1A1 das am stärksten an der Toxifizierung von 2-Nitropropan beteiligte Enzym in der Ratte ist (Sodum *et al.*, 1994).

Man geht davon aus, dass Propan-2-nitronat vor oder nach einer enzymatischen oder nicht-enzymatischen Deoxygenierung zur Acetoxim-O-sulfonsäure konjugiert werden kann (Abb. 30). Dieser Metabolit kann hydrolytisch in Aceton und Hydroxylamin-O-sulfonsäure gespalten werden. Letztere zerfällt spontan in Schwefelsäure und das hochreaktive Nitreniumion (Sodum *et al.*, 1993; Andrae *et al.*, 1999).

Genetische Schäden, die durch die Entstehung von NH_2^+ bei der Metabolisierung des 2-Nitropropan induziert wurden, sind DNA-Aminierungen, die zur Bildung von 8-Aminoguanin (Sodum *et al.*, 1993), 8-Oxoguanin (Fiala *et al.*, 1995) und einem weiteren, *in vitro* instabilen, modifizierten Nukleotid führen, das mittlerweile als 2-Hydrazinohypoxanthin bekannt ist (Sodum und Fiala, 1998).

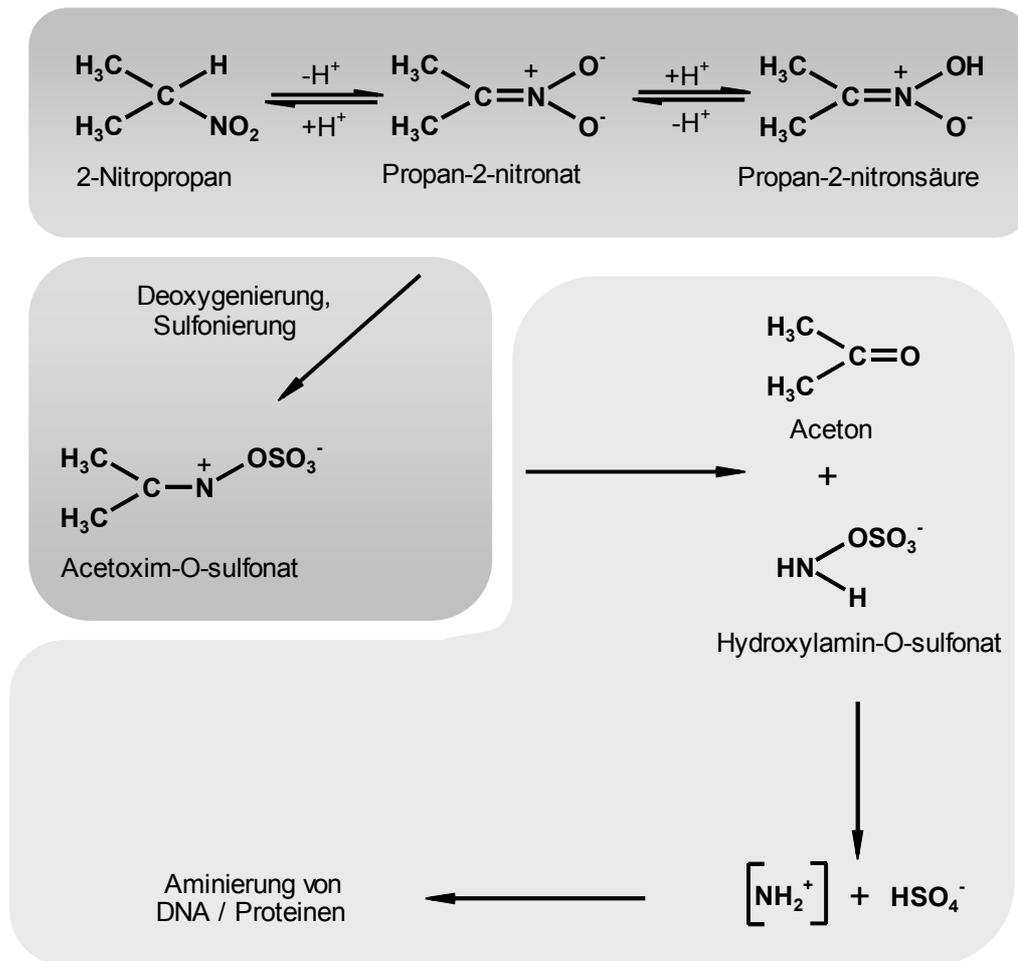


Abb. 30: Schema der Aktivierung von 2-Nitropropan (Sodum und Fiala, 1998; Kreis *et al.*, 1998; Andrae *et al.*, 1999)

In früheren Arbeiten wurde eine Bioaktivierung des 2-Nitropropan durch CYP postuliert, da gentoxische Schäden in Hepatomzellen der Ratte nach Enzyminduktion durch Dexamethason verstärkt auftraten (Roscher *et al.*, 1990). Letzteres könnte jedoch auch Phenol-SULT der Ratte induziert haben (Kreis *et al.*, 1998). Außerdem wurde an SULT-profizienten Primärzellen gezeigt, dass weder CYP noch Prostaglandin-H-synthetasen, welche die Bildung DNA-reaktiver Spezies durch oxidative Denitrifizierung katalysieren könnten, essenziell für die Ausprägung der gentoxischen Wirkung von 2-Nitropropan sind (Kreis *et al.*, 1998). In den V79-hCYP1A2-Zellen war die MF nach Inkubation mit 2-Nitropropan im Vergleich zu den Wildtypzellen marginal erhöht (C 3.3). Erst durch die Expression von hSULT1A1 allein oder in Kombination mit hCYP1A2 stieg die MF deutlich an. Das geringere Toxifizierungspotenzial des Allels mit dem Austausch Arg213His in V79-hSULT1A1*V im Vergleich zu V79-hSULT1A1*1 wurde mit der Koexpressionszelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 im Vergleich zu V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 bestätigt. Mit der Koexpressionszelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 konnte

erstmalig gezeigt werden, dass auch die hSULT1A2 zur Toxifizierung von 2-Nitropropan in der Lage ist.

In Untersuchungen mit bakteriellen Teststämmen war 2-Nitropropan in vielen Fällen auch ohne den Zusatz externer Metabolisierungssysteme oder das Vorhandensein von CYP oder SULT mutagen (Speck *et al.*, 1982; Göggelmann *et al.*, 1988). Dies ist möglicherweise auf bakterienspezifische Aktivierungswege, die Säugern wahrscheinlich keine Bedeutung haben, zurückzuführen. Verschiedene Autoren postulierten die Bildung eines Hydroxylamins durch bakterielle Nitroreduktasen (Göggelmann *et al.*, 1988), die Bildung von NO-Radikalen (Kohl *et al.*, 1995) oder eine direkte, nicht-enzymatische Bindung von Propan-2-nitronat an die DNA (Speck *et al.*, 1982). Obwohl die Mutagenitätsprüfung an Säugerzellen aufwändiger ist als an Bakterien, ist sie für die Prüfung von Nitroalkanen deswegen möglicherweise besser geeignet. Durch die Expression von SULT ließ sich die Mutagenität aber auch in gentechnisch veränderten Salmonellen-Stämmen steigern, so dass auch an diesem Testsystem die Rolle der SULT für die Aktivierung von 2-Nitropropan nachzuvollziehen war (Glatt *et al.*, 2000).

3. Aktivierung aromatischer Amine in V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien im Vergleich zu anderen Testsystemen

3.1 2-AAF

Die gentoxische Wirkung von 2-AAF wurde bereits in früheren Studien in verschiedenen Testsystemen gezeigt. Aus der Zusammenstellung der Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen in Tabelle 14 wird ersichtlich, dass 2-AAF in Abhängigkeit vom Metabolisierungssystem unterschiedliche gentoxische Metabolite bildet, deren Gentoxizität jeweils an verschiedenen Endpunkten nachweisbar ist. Deswegen ist der Einsatz definierter metabolisierender Enzyme und die Verwendung von Testsystemen, an denen mehrere gentoxische Endpunkte untersucht werden können, für die Prüfung dieser Substanz von besonderer Wichtigkeit. Nur der Metabolit, der durch das Zusammenspiel von CYP und konjugierenden Enzymen gebildet wird, scheint zur Auslösung von Mutationen in Säugerzellen in der Lage zu sein (Tabelle 14). In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal die Mutagenität von 2-AAF in Säugerzelllinien nachgewiesen werden, die humane SULT exprimieren.

2-AAF war in der Zelllinie, die keine rekombinanten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme oder nur hCYP1A2 exprimierte, in der vorliegenden Arbeit bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht mutagen am *hprt*-Locus (C 3.4.2). Erst durch die Koexpression von SULT mit hCYP1A2 war eine Aktivierung von 2-AAF zum Mutagen

nachweisbar. Vergleichbare Beobachtungen machten auch Chou *et al.* (1995) in ihren Untersuchungen zur SULT-vermittelten DNA-Bindung. Da die Aktivierung nicht durch Hitzeeinwirkung zu unterbinden war, wurde hSULT1A3 hier als aktivierende SULT ausgeschlossen und die thermostabile Form hSULT1A1 für die Bioaktivierung in Betracht gezogen. In der vorliegenden Arbeit zeigten V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen die stärkste Aktivierung von 2-AAF.

In V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen und in V79-hCYP1A2-hSULT1C1-Zellen war 2-AAF nicht mutagen. In V79-Zellen, die rCYP1A2 zusammen mit der SULT1C1 der Ratte koexprimieren, war 2-AAF dahingegen stark mutagen (Glatt *et al.*, 1998b). Die menschliche SULT und die der Ratte scheinen sich in diesem Punkt in ihrer Substratspezifität zu unterscheiden. Im Expressionssystem *Salmonella typhimurium* war die hSULT1C1 ebenfalls nicht zur Bioaktivierung von *N*-OH-2-AAF in der Lage. Auch diesem Testsystem verlieh hSULT1A2*1 von allen geprüften SULT der 1A Familie die größte Sensitivität gegenüber der Mutagenität von *N*-OH-2-AAF (Glatt *et al.*, 2001). Möglicherweise ist eine andere SULT1C-Form des Menschen, hSULT1C2, in der Lage, *N*-OH-2-AAF zu aktivieren. Diese wurde bereits im V79-System exprimiert und wird in Kürze in Mutagenitätstests mit *N*-OH-2-AAF eingesetzt werden.

Tabelle 14: Gentoxische Wirkung von 2-AAF

| Endpunkt, | Metabolisierungssystem (MS) | Ergebnis | Referenz |
|---|---|-----------------|---|
| Mutationen in <i>Salmonella typhimurium</i> | extern | positiv | Staiano <i>et al.</i> , 1983; McCann <i>et al.</i> , 1975 |
| Mikrokerne in verschiedenen Säugerzelllinien ^a | ohne Zusatz eines externen MS | positiv | Glatt <i>et al.</i> , 1990a |
| Mutagenität am <i>hprt</i> -Locus von V79-Zellen | mit / ohne Zusatz eines externen MS | negativ | Glatt <i>et al.</i> , 1998b |
| | intern, rekombinantes rCYP1A2 und rSULT1C1 und eine NAT des chinesischen Hamsters | positiv | Glatt <i>et al.</i> , 1998b |
| | rekombinantes rCYP1A2 und eine NAT des Chinesischen Hamsters | schwach positiv | Glatt <i>et al.</i> , 1998b |
| DNA-Bindung | extern | positiv | Chou <i>et al.</i> , 1995 |
| SCE, wenige Chromosomenaberrationen | intern, rekombinantes rCYP1A2 | positiv | Rodrigues <i>et al.</i> , 1994 |
| Mutationen am <i>hprt</i> -Locus in V79-Zellen | intern, rekombinantes rCYP1A2 | negativ | Rodrigues <i>et al.</i> , 1994 |
| SCE, Chromosomenaberrationen und Mutationen am <i>hprt</i> -Locus in V79-Zellen | intern, rekombinantes rCYP1A2 und eine NAT des chinesischen Hamsters | positiv | Rodrigues <i>et al.</i> , 1994 |

^anicht in V79-Zellen

Beide geprüften allelischen Varianten der hSULT1A1 aktivierten sowohl *N*-OH-2-AAF als auch 2-AAF in Zelllinien, in denen hCYP1A2 koexprimiert war, nicht oder nur sehr schwach. Auch Lewis *et al.* (2000) fanden keine Sulfonierung von *N*-OH-2-AAF durch rekombinante hSULT1A1. Die Sulfonierung des *N*-OH-2-AAF in humaner Leber führte er auf eine Hydroxysteroid-SULT, die hSULT2A1 zurück. Allerdings waren für die Konjugation des *N*-OH-2-AAF durch rekombinante hSULT2A1 sehr hohe *N*-OH-2-AAF-Konzentrationen erforderlich. Die MF in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 stieg dahingegen schon ab Konzentrationen von 0,03 µM an. In hSULT2A1 exprimierenden V79-Zellen (Glatt, unveröffentlichtes Ergebnis) und *Salmonella typhimurium*-Stämmen (Meinl *et al.*,

2002) war die Mutagenität von *N*-OH-2-AAF zudem im Vergleich zu SULT-defizienten Zellen oder Bakterien nicht oder nur marginal erhöht.

Verschiedenen Autoren zufolge hatten SULT im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Befunden einen hemmenden Effekt auf die DNA-Reaktivität von 2-AAF. In Humanhepatocytenkulturen wurde die DNA-Bindung durch die Hemmung von SULT erhöht, was als Unterbindung eines SULT-katalysierten Detoxifizierungsweges interpretiert wurde (Monteith, 1992). Auch in Bakterien wurde die durch *N*-OH-2-AAF induzierte Mutagenität durch die Zugabe von Kofaktoren für SULT gehemmt (Stout *et al.* 1976; Mulder *et al.* 1977). Extern zugesetztes *N*-Sulfoxy-AAF ist nur sehr schwach mutagen in Bakterien (Smith *et al.*, 1986). Bakterien besitzen NAT, die zur Aktivierung von *N*-OH-2-AAF oder des deacetylierten Derivates, *N*-OH-Aminofluoren, führen können. Solche Enzyme fehlen in V79-Mz-Zellen. Wahrscheinlich ist, dass der hochreaktive, mutagene Sulfatester vor allem bei der Verwendung externer aktivierender Systeme mit Proteinen oder anderen Makromolekülen reagierte oder zerfiel, bevor er die bakterielle DNA erreichte (Stout *et al.*, 1976). Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass *N*-Sulfoxy-AAF im wässrigen System eine extrem kurze Halbwertszeit (4 s) hat (Panda *et al.*, 1989).

Als Gründe für den fehlenden Anstieg der Mutagenität in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen mit steigender Konzentration an 2-AAF kommen eine Limitierung durch das Expressionsniveau des hCYP1A2 oder der hSULT1A2*1, oder aber die Sulfamatbildung durch direkte Sufonierung des aromatischen Amids ohne vorherige *N*-Hydroxylierung in Frage, die eine Detoxifizierungsreaktion darstellen würde. Eine Sulfamatbildung konnte nicht nachgewiesen werden (C 3.4.1). Eine Limitierung durch das Expressionsniveau des hCYP1A2 in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen wäre möglich, da die Mutagenität von *N*-OH-2-AAF in diesen Zellen deutlich stärker war als die von 2-AAF. Die MF nahm bei Exposition gegenüber *N*-OH-2-AAF mit steigender Konzentration bis in den cytotoxischen Konzentrationsbereich zu, was gegen eine Limitierung durch das Expressionsniveau der SULT spricht. Als weiterer Grund wäre denkbar, dass eine Hemmung der SULT durch eine Interaktion mit 2-AAF erfolgt, ohne dass ein Sulfamat gebildet wird. In Ratten wurde der 4-Nitrophenolumsatz in der cytosolischen Leberfraktion durch die Verabreichung von 2-AAF gehemmt (Ringer *et al.*, 1985; Mangold *et al.*, 1990). Hinweise auf eine Interaktion des 2-AAF mit humanen SULT gab die Hemmung des cytosolischen Umsatzes von 4-Nitrophenol bei Zugabe von 2-AAF (C 3.3). Bioaktivierungsweg und Wirkung des 2-AAF können demnach außer von der Wahl des Testsystems, des metabolisierenden Systems und des untersuchten gentoxischen Endpunktes zusätzlich von der Konzentration an 2-AAF abhängen.

3.2 2-Aminoanthracen

In V79-rCYP1A2-Zellen erzeugte 2-Aminoanthracen in früheren Untersuchungen sowohl SCE als auch Mikrokerne sowie in geringem Maße chromosomale Aberrationen (Ellard *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1994). Durch das Vorhandensein einer endogenen NAT zusätzlich zu rCYP1A2 in den V79-Zellen wurde die gentoxische Wirkung von 2-Aminoanthracen auf diese Endpunkte verstärkt. Für eine SULT-abhängige Aktivierung gab es bisher keine Hinweise.

In der vorliegenden Arbeit stieg die MF bereits in der Zelllinie, die nur hCYP1A2 exprimierte, leicht an (C 3.3.2, Abb. 25). Zumindest im niedrigen Konzentrationsbereich war die Mutagenität in einigen Experimenten mit hSULT-koexprimierenden V79-Zellen deutlich erhöht. Sowohl hSULT1A1*1 als auch hSULT1A2*1 waren in der Lage, 2-Aminoanthracen in der Anwesenheit von hCYP1A2 zu aktivieren. Diese Aktivierung ist vermutlich auf die Sulfonierung und die daran anschließende spontane Nitreniumionbildung des hCYP1A2-Metaboliten *N*-OH-Aminoanthracen zurückzuführen (A 3, Abb. 2). Dieser Effekt könnte besonders relevant sein, weil SULT *in vivo* oft für die Verstoffwechslung von Substanzen in niedrigen Konzentrationen verantwortlich sind, während bei höheren Konzentrationen andere enzymatische Reaktionen überwiegen.

Einerseits war für einen deutlichen Anstieg der MF die hSULT-Koexpression in V79-hCYP1A2 notwendig, andererseits wurde 2-Aminoanthracen in einem Experiment trotz nachgewiesener cytosolischer SULT-Aktivität in Parallelkulturen nicht bioaktiviert. Außerdem stieg die Mutagenität von 2-Aminoanthracen ab einer Konzentration von 0,3 µM nicht mehr weiter an, obwohl höhere Konzentrationen nicht toxisch auf V79-hCYP1A2-hSULT-Zellen wirkten. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Arylamine und die davon abgeleiteten Hydroxylarylamine um die gleiche NAT konkurrieren können. In V79-NH-rCYP1A2-Zellen, die in der Lage sind, 2-Aminoanthracen und 2-Aminofluoren zu *N*-Hydroxiden zu metabolisieren, konnte die Gentoxizität und die Cytotoxizität von 2-Aminoanthracen durch 2-Aminofluoren unterdrückt werden (Kiefer *et al.*, 1994). Da in dieser Veröffentlichung auch ohne die Zugabe von 2-Aminofluoren die toxischen Effekte in Konzentrationen oberhalb von 0,3 µM geringer waren als in niedrigeren Konzentrationen, besteht die Möglichkeit, dass 2-Aminoanthracen selbst mit *N*-OH-Aminoanthracen um die Metabolisierung durch die NAT konkurrierte. Eine ähnliche Situation könnte auch in den V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien gegeben sein, da 2-Aminoanthracen den cytosolischen Umsatz von 4-Nitrophenol deutlich hemmte. Folglich wäre die Metabolisierung von 2-Aminoanthracen in diesem Testsystem, entsprechend der oben beschriebenen Metabolisierung von 2-AAF, nicht nur von der Spezifität und Expressionsstärke der metabolisierenden Enzyme abhängig, sondern auch von dem Verhältnis der Hydroxylierungs- zur Sulfonierungskapazität in kritischen Phasen des Mutagenitätstests.

3.3 3'-M-DAB

Bei DAB und davon abgeleiteten Derivaten ist die Auswertung von Kanzerogenitätsstudien schwierig, da sie widersprüchliche Ergebnisse bei Verwendung verschiedener Spezies und Applikationsformen lieferten (Fare, 1966; Mori *et al.*, 1984; Delclos *et al.*, 1984). 4-Methylaminoazobenzol (MAB) und 4-Aminoazobenzol (AB) sind in Mäusen nach intraperitonealer Applikation ebenso stark kanzerogen wie DAB (Delclos *et al.*, 1984). In Fütterungsversuchen mit Ratten wurde AB jedoch als nicht oder weniger kanzerogen im Vergleich zu MAB und DAB beurteilt (Miller *et al.*, 1985, Levine, 1991). Hinweise auf einen SULT-abhängigen Aktivierungsweg von DAB lieferten Versuche mit PAPS-defizienten Mäusen, bei denen deutlich weniger Addukte und Hepatome gefunden wurden als in Kontrolltieren (Levine, 1991, Delclos *et al.*, 1986). Eine Supplementation des Futters mit Natriumsulfat führte zu einer Verkürzung der Tumorlatenzzeit (Blunck und Crowther, 1975). Ergebnisse zur Mutagenität des DAB und seiner Derivate in Bakterien sind fragwürdig, weil hier unter Zusatz von S9 nicht nur 3'-M-DAB mutagen waren, sondern auch die in der Ratte nur schwach kanzerogenen 2'- und 4'-Methyl-Derivate des DAB (Mori *et al.*, 1983b). Möglicherweise kann durch bakterielle Nitroreduktasen im Mutagenitätstest die Ausbildung DNA-reaktiver Nitroxidradikale stattfinden, die *in vivo* in der Ratte nicht relevant ist.

Die erste Demethylierung (A 3, Abb. 3) ist in der Ratte 3-methylcholanthren-induzierbar, während die zweite durch Phenobarbital induziert wird (Levine, 1985). Letzteres induziert außerdem die 4'-Ringhydroxylierung, die eine Detoxifizierungsreaktion darstellt (Degawa *et al.*, 1990). Die *N*-Hydroxylierung des MAB geschieht entweder CYP-abhängig nach Induktion durch 3-Methylcholanthren oder durch flavinabhängige Monooxygenasen (Kimura *et al.*, 1984; Mori *et al.*, 1983a). Da die Induzierbarkeit durch 3-Methylcholanthren auf eine Metabolisierung durch CYP1A2 hinweist, sollten also sowohl die Demethylierung als auch die *N*-Hydroxylierung in V79-hCYP1A2-Zellen ablaufen können. In diesen Zellen war 3'-M-DAB jedoch nicht mutagen (C 3.4.4).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass im V79-Testsystem die zusätzliche Anwesenheit konjugierender Enzyme für die Aktivierung von DAB notwendig ist. In V79-hCYP1A2-hSULT1C1 fand keine Aktivierung statt, während die rSULT1C1 in Kombination mit rCYP1A2 3'-M-DAB zum Mutagen aktivierte (Glatt, unveröffentlichtes Ergebnis). In dieser Arbeit wurden SULT1A-Enzyme als SULT des Menschen erkannt, die hCYP1A2-Metabolite des 3'-M-DAB zu ultimalen Mutagenen aktivieren können. Die Mutagenität am *hprt*-Locus lag in den Zellen, welche die unterschiedlichen 1A Formen, hSULT1A1 und hSULT1A2, exprimierten, bei einer Konzentration von 3 µM im gleichen Bereich. Auch die allelischen Varianten der hSULT1A1 und hSULT1A2 unterschieden sich nur in niedrigeren Konzentrationen in ihrem Aktivierungspotenzial. Es wurde kein Einfluss des SULT-Expressionsniveaus auf die Mutagenität von 3'-M-DAB in den V79-hCYP1A2-

hSULT1A-Zelllinien beobachtet. Die Sensitivität des Testsystems schien hingegen stärker durch die Expressionsstärke von hCYP1A2 im jeweiligen Test beeinflusst zu sein (C 3.4.4).

Im Tierversuch war die Kanzerogenität des DAB nach der Einführung einer Methylgruppe in der 3'-Position erhöht (Mori *et al.*, 1980). Eine weitere Verstärkung der Kanzerogenität erfolgte nach der Hydroxylierung der Methylgruppe in der 3'-Position (Mori *et al.*, 1980). Möglicherweise ist das hCYP1A2 nicht nur zur *N*-Demethylierung und *N*-Hydroxylierung des 3'-M-DAB, sondern auch zur 3'-Hydroxylierung in der Lage.

Wie der ultimal krebsauslösende Metabolit, der *in vivo* und in den in dieser Arbeit konstruierten V79-Zellen aus 3'-M-DAB gebildet wird, aussieht, ist demnach unklar. Die oxidative und sulfokonjugatbildende metabolische Aktivierung an der exozyklischen *N*-Position und möglicherweise auch die Hydroxylierung der 3'-Methylgruppe spielen aber eine wichtige Rolle.

3.4 2,4-TDA

In früheren Untersuchungen hatte 2,4-TDA schwache mutagene Effekte im Säugerzellsystem gezeigt (Coppinger *et al.*, 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass humane SULT 2,4-TDA aktivieren können. Eine Steigerung der MF wurde durch die Koexpression von hSULT1A1*1 oder hSULT1A1*2 mit hCYP1A2 bei Konzentrationen über 1 mM erreicht. Eine Aktivierung des 2,4-TDA durch SULT wurde unter anderem deswegen postuliert, weil die SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol und 2,6-Dichlor-4-nitrophenol die kovalente Bindung von 2,4-TDA an Hepatocyten-DNA hemmten (Furlong *et al.*, 1987). Diese Substanzen können jedoch auch einen Einfluss auf andere Enzyme haben. In diesem Zusammenhang interessiert besonders die Hemmung von NAT, da Cunningham und Matthews (1990) einen durch NAT katalysierten Aktivierungsweg eines *N*-Hydroxids von 2,4-TDA postulierten (Cunningham und Matthews, 1990). Sie zeigten eine Verminderung der Mutagenität von 2,4-TDA in *Salmonella typhimurium* durch spezifische Inhibitoren für NAT und durch den Einsatz NAT-defizienter Bakterienstämme. Ob dieser Aktivierungsweg *in vivo* eine Rolle spielt und im Menschen stattfindet, wurde bisher nicht geklärt. Säugerzelllinien, die NAT der Ratte oder des Menschen zusammen mit CYP exprimieren, könnten für die Aufklärung hilfreich sein.

Sowohl 2,4-TDA als auch das stellungsisomere 2,6-TDA induzierten UDS in Hepatocyten der Ratte, aber nur 2,4-TDA induzierte auch in humanen Hepatocyten UDS (Butterworth *et al.*, 1989). In Abhängigkeit von der Spezies könnten demnach zumindest bei 2,6-TDA unterschiedliche Bioaktivierungsprozesse ablaufen. Metabolisch kompetente Indikatorzellen, die humane Enzymformen exprimieren, sind bei dieser Substanz auch deswegen von besonderem Interesse, weil 2,6-TDA *in vivo* in der Ratte nicht kanzerogen war (National Technical Information Service, 1980), in *Salmonella typhimurium* aber ebenso mutagen wirkte wie 2,4-TDA (Zeiger *et al.*, 1988; Cunningham *et al.*, 1989).

4. Reproduzierbarkeit der Mutagenitätsexperimente

Die Variabilität der Ergebnisse mehrerer gleichbehandelter Kulturen innerhalb eines HPRT-Genmutationstests war gering, sodass klare qualitative Aussagen zum Aktivierungspotenzial der untersuchten Zelllinien möglich waren. Dem standen in einigen Fällen große Abweichungen zwischen separaten Experimenten entgegen, wodurch ein quantitativer Vergleich des Aktivierungspotenzials bei einigen Testsubstanzen schwierig war. Große Streuungen traten vor allem in Experimenten mit niedrigen maximalen Effekten auf, während starke Effekte gut reproduzierbar waren. Zum Teil können die unterschiedlichen Ergebnisse auf Schwankungen im Expressionsniveau von SULT, hCYP1A2 oder ein daraus resultierendes unterschiedliches Verhältnis der bioaktivierenden Enzyme in den Koexpressionszelllinien zurückzuführen sein. Für alle Klone, mit denen im HPRT-Test gearbeitet wurde, war eine stabile SULT- und CYP-Expression über mindestens 20 Passagen nachgewiesen worden (C 2.3.3). Dennoch traten Schwankungen im Expressionsniveau zwischen den einzelnen Passagen auf (C 2.3.1). In den Experimenten mit 2-AAF und *N*-OH-2-AAF in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1 schien die cytosolische SULT-Aktivität mit der Stärke der Bioaktivierung zu korrelieren (C 3.4.2). In der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 war jedoch kein klarer Zusammenhang vorhanden (C 3.4.2). In Experimenten mit 3'-M-DAB in V79-hCYP1A2-hSULT1A2-Zelllinien war eher ein Einfluss des Expressionsniveaus von hCYP1A2 zu erkennen (C 3.4.4). Aufgrund direkter Interaktionen der Testsubstanzen mit den SULT hing die Bioaktivierung der aAA in diesem Testsystem möglicherweise nicht nur von der Sulfonierungs- oder *N*-Hydroxylierungskapazität ab, sondern auch vom Verhältnis der exprimierten Enzyme zueinander. Bei hoher Expression von hCYP1A2 wird viel der aAA sofort *N*-hydroxyliert und steht für die nachfolgende Sulfonierung zur Verfügung, wohingegen bei geringerer Hydroxylierungskapazität trotz hoher SULT-Expression wegen der Inhibition durch relativ hohe verbleibende Konzentrationen des aAA das *N*-hydroxylierte aAA nicht effizient sulfoniert werden kann.

Ein weiterer Grund für Schwankungen in den Ergebnissen der Mutagenitätsexperimente mit den Koexpressionszelllinien könnte in einer uneinheitlichen Vorgehensweise bei der Durchführung der HAT-Passagen vor Testbeginn liegen. Der Einfluss des HAT-Supplementes auf die SULT-Expression in Koexpressionszellen war uneindeutig (C 2.4.2), aber es ließ sich eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums in den ersten HAT-freien Kulturen nach der Selektion auf *hprt*⁻-Mutanten nachweisen (C 2.4.2). Da Mutationen erst durch Zellteilungen manifestiert werden, kann dies auch einen Einfluss auf das Ergebnis des Mutagenitätstests haben. Bei unklaren Ergebnissen wurden deshalb Wiederholungsexperimente durchgeführt, bei denen mindestens eine

Passage zwischen der HAT-Selektion und der Einsaat für den Mutagenitätstest in HAT-freiem Medium durchgeführt wurde. Dieses Vorgehen ist für weitere Mutagenitätstests empfehlenswert.

Die Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Mutagenitätsexperimente machen deutlich, wie wichtig gute Positivkontrollen für die Etablierung neuer Zelllinien sind. Eine durch die Enzymausstattung der jeweiligen Zelllinie aktivierbare Substanz ist als Positivkontrolle der Expressionskontrolle in subzellulären Fraktionen vorzuziehen.

Als Positivkontrolle für die Mutagenitätstests erwies sich 3'-M-DAB als gut geeignet, da es in einer Konzentration von 3 μ M von allen V79-hCYP1A2-hSULT1A-Zelllinien zu einem Mutagen aktiviert wurde, in Kontrollzelllinien jedoch nicht mutagen war. Allerdings war kein klarer Zusammenhang zwischen dem SULT-Expressionsniveau und der Stärke der Aktivierung von 3'-M-DAB vorhanden. Da der Einfluss des Expressionsniveaus auf die Aktivierung anderer Substanzen möglicherweise stärker ist, sollte es extern weiterhin mitbestimmt werden. Neben dieser Kontrolle, die nur durch das Zusammenspiel der beiden rekombinanten Enzyme aktiviert werden kann, ist in der Etablierungsphase auch das Mitführen von Substanzen, die bereits durch eines der Enzyme zum ultimalen Mutagen metabolisiert werden, empfehlenswert, da für diese Substanzen eine breitere Datenbasis zum Vergleich vorhanden ist. Beeinträchtigungen des Testergebnisses durch unerwünschte Interaktionen der Testsubstanz mit den exprimierten Enzymen lassen sich jedoch nicht durch Positivkontrollen ausschließen, sondern müssen für neue Substanzen jeweils geprüft werden.

5. Aktivierungspotenzial der untersuchten allelischen Varianten von hSULT1A1 und hSULT1A2

Über die toxikologische Bedeutung der Polymorphismen der hSULT1A1 und hSULT1A2 im Menschen gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse. Coughtrie *et al.* (1999) berichteten, dass die Frequenz des hSULT1A1*1-Allels in der Bevölkerung mit steigendem Alter zunimmt. Andere epidemiologische Studien zeigten, dass der hSULT1A1*2-Phenotyp mit einem höheren Risiko für Brustkrebs einhergeht (Zheng *et al.*, 2001). Bei Individuen, die ein hSULT1A1*1-Allel tragen, wurde eine deutlichere Korrelation zwischen dem Brustkrebsrisiko und Ernährungsgewohnheiten, die zu einer stärkeren Aufnahme heterozyklischer aromatischer Amine führen, gefunden (Zheng *et al.*, 2001). Der hSULT1A1*1-Genotyp korrelierte außerdem mit einem früheren Auftreten von Brustkrebs und wurde auch in einen Zusammenhang mit dem zusätzlichen Auftreten anderer Tumore gebracht (Seth *et al.*, 2000). Diese komplexe Situation hängt möglicherweise mit einer unterschiedlichen Auswirkung der Stärke der SULT-Aktivität auf verschiedene

Risikofaktoren für Brustkrebs zusammen. So sind SULT nicht nur an der Aktivierung von krebserregenden Fremdstoffen, sondern auch an der Inaktivierung endogener Risikofaktoren, der Östrogene, beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden die meisten Substanzen durch Zelllinien, die hSULT1A1*1 oder hSULT1A1*2 exprimierten oder mit hCYP1A2 koexprimierten, ähnlich gut aktiviert. 2-Nitropropan wurde in den Koexpressionszellen durch das hSULT1A1*1-Allel stärker aktiviert, 3'-M-DAB durch das hSULT1A1*2-Allel. Da die Unterschiede nicht gravierend waren und in dem komplexen Testsystem viele Faktoren die Ergebnisse beeinflussen können, ist anzunehmen, dass kein unterschiedliches Aktivierungspotenzial der allelischen Varianten der hSULT1A1 für die untersuchten Substrate besteht. Hierfür spricht auch, dass 2-Nitropropan in den Zelllinien, die kein hCYP1A2 exprimieren, in hSULT1A1*2 exprimierenden Zellen ebensogut aktiviert wurde wie in hSULT1A1*1-exprimierenden. Die allelischen Varianten der hSULT1A2 zeigten hingegen klare Unterschiede in ihrem Aktivierungspotenzial bei einigen der untersuchten aAA.

2-AAF wurde durch die hSULT1A2*1 stärker als durch alle anderen untersuchten hSULT aktiviert, war aber in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen nicht mutagen. 2-Aminoanthracen war ebenfalls negativ in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen, wurde aber durch sämtliche übrigen hSULT1A-Alloenzyme aktiviert. Anhand der Aktivierung von 3'-M-DAB, die in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*2-Zellen ähnlich gut war wie in V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1-Zellen, konnte abgesichert werden, dass hSULT1A2*2 in dem Expressionssystem im Mutagenitätstest in funktioneller Form exprimiert wird und zur Aktivierung eines aromatischen Amins in der Lage ist.

In den genannten epidemiologischen Studien wurde der Polymorphismus für die hSULT1A2 zwar nicht untersucht, das Auftreten des katalytisch weniger aktiven Alloenzym, hSULT1A2*2, ist aber an das Auftreten der hSULT1A1*2-Form gekoppelt (Engelke *et al.*, 2000). Die Aktivierung von aAA durch hSULT1A2*1 lässt vermuten, dass dieses Enzym auch für die Bioaktivierung heterozyklischer aAA wichtig sein könnte. Die Tatsache, dass Individuen mit dem hSULT1A1*1-Genotyp bei stärkerer Aufnahme heterozyklischer aAA ein höheres Risiko für Brustkrebs haben, könnte nach den Ergebnissen dieser Studie demnach entweder mit dem gekoppelten Auftreten desjenigen hSULT1A2-Allels mit dem stärkeren Aktivierungspotenzial für aAA oder mit der stärkeren Expression des hSULT1A1*1-Alloenzymes in einigen Geweben erklärt werden.

Da die Enzyme sowohl toxisierende als auch detoxifizierende Eigenschaften gegenüber verschiedenen Substraten haben können, lässt sich ein allgemein vorteilhafter Genotyp möglicherweise nie ausmachen. In Verbindung mit bestimmten Risikofaktoren können allerdings toxisierende oder detoxifizierende Eigenschaften der Alloenzyme dominieren und das Entstehen oder die Vermeidung bestimmter Krankheiten mitbestimmen. Möglicherweise übernehmen fremdstoffmetabolisierende Enzyme mit

anderen gewebespezifischen Expressionsmustern die Metabolisierung, wenn die für einen Giftstoff weniger affinen SULT-Formen exprimiert werden, so dass bei diesen Individuen andere Zielorgane für eine Schädigung durch die Substanz in Frage kommen.

Für die Tumorinduktion durch aAA werden nämlich in verschiedenen Geweben teilweise unterschiedliche Metabolisierungswege angenommen. Im Harnblasenlumen können aufgrund des sauren Milieus Arylhydroxylamine aus Glucuroniden freigesetzt werden und nach Protonierung Nitreniumionen ausbilden (Lang, 1991). Eine andere Möglichkeit in der Harnblase ist die peroxidative Aktivierung durch Prostaglandin-H-synthetasen (Flammang *et al.*, 1989). Lungengewebe ist wahrscheinlich nicht zur N-Oxidierung von aAA in der Lage (McManus *et al.*, 1980; Kadlubar *et al.*, 1988). Dennoch wurden Addukte von Arylaminen in der Lunge entdeckt (Kadlubar *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1989). Hydroxylamine könnten entweder durch Resorption aus dem Blutstrom in die Lunge gelangen oder mittels Nitroreduktion aus Nitroaromaten gebildet werden (Lang, 1991). Außerdem wurde Peroxidaseaktivität in Lungengewebe gefunden (Lang, 1991). In der Lunge besteht eine hohe Expression von NAT (Windmill *et al.*, 2000). Es wurde aber kein Zusammenhang zwischen dem Acetylierertyp und Lungenkrebsrisiko gefunden (Burgess und Trafford, 1985; Philip *et al.*, 1988).

Dass der Polymorphismus der hSULT1A1 für Zigarettenraucher relevant sein könnte, postulierte erst kürzlich eine Fall-Kontrollstudie, die eine erhöhte Inzidenz für Lungenkrebs bei Rauchern, die Träger des hSULT1A1*1 Allels sind, feststellte (Wang *et al.*, 2002). Bisher ist jedoch unklar, auf welche Bestandteile des Zigarettenrauches dieses unterschiedliche Risiko zurückzuführen ist. Auch zur Klärung dieser Fragestellung stellen die V79-Zellen, die unterschiedliche allelische Varianten der hSULT1A1 und hSULT1A2 exprimieren oder mit hCYP1A2 koexprimieren, ein sinnvolles Testmodell dar.

6. Einsatzmöglichkeiten der V79-hSULT-Zelllinien

Der Fremdstoffmetabolismus rekombinanter Testorganismen ist in der Regel auf wenige Enzyme begrenzt. Das gentoxische Potenzial einer Testsubstanz wird daher nicht vollständig abgeklärt. Auch deswegen können *in vitro*-Systeme mit gentechnisch veränderten Indikatorzellen Tierversuche nicht vollständig ersetzen, liefern aber wichtige ergänzende Informationen für die Aufklärung der zur Aktivierung beitragenden Reaktionen und für die Voraussage von organspezifischen Wirkungen. Dadurch können Indikatorzellen, die humane Enzyme exprimieren, zur Klärung beitragen, ob Daten aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind oder welche Spezies für diese Untersuchungen geeignet wäre (Glatt *et al.*, 1998a). So wurden in dieser Arbeit abgesehen von proteinbiochemischen Unterschieden auch starke Unterschiede in der Fähigkeit der

SULT1C1-Formen des Menschen und der Ratte gefunden, aAA zu Mutagenen zu aktivieren. Da die einzelnen SULT-Formen unterschiedliche Muster in der Gewebespezifität ihrer Expression zeigen, die wiederum bei den Säugerspezies verschieden sind, dürfte die SULT-vermittelte Mutagenität bei Mensch und Versuchstier unterschiedlich ausgeprägte Organotropismen haben.

Da Studien an etablierten *in vitro*-Testsystemen schneller Ergebnisse liefern und kostengünstiger sind, werden sie in der pharmazeutischen und chemischen Industrie routinemäßig als Vorstudien auf mögliche kanzerogene Wirkungen eingesetzt. In der Basisprüfung wird üblicherweise ein Genmutationstest an Bakterien und ein Chromosomenmutationstest an Säugerzellkulturen durchgeführt. Anschließend werden die Befunde an einem Genmutationstest an Säugerzellkulturen und einem *in vivo*-Mikrokerntest am Knochenmark von Säugern abgeklärt, für den eine alternative Richtlinie für einen *in vitro*-Mikrokerntest an Säugerzellkulturen erarbeitet wird (Marzin, 1997; Garriott *et al.*, 2002). Bei einem positiven Ergebnis wird ein anschließender Tierversuch in vielen Fällen unnötig. Deswegen sind auch in diesem Bereich möglichst spezifische *in vitro*-Indikatorsysteme für gentoxische Untersuchungen von großem Interesse.

Außer für die Untersuchung der homozyklischen aAA und benzyllischen Alkohole sind SULT-exprimierende Zellen für einige andere Substanzgruppen relevant. Naheliegend ist die Untersuchung der gentoxischen Wirkung heterozyklischer aromatischer Amine. Diese entstehen beim Erhitzen von Fleisch und Fisch (Commoner *et al.*, 1978; Jägerstad M., 1991) und werden mit der erhöhten Inzidenz für Colonkrebs bei bestimmten Ernährungsgewohnheiten in Zusammenhang gebracht (Schiffman *et al.*, 1990; Wohlleb *et al.*, 1990). Sie werden an der Aminogruppe wahrscheinlich analog zu den homozyklischen aAA metabolisiert und bilden wie sie DNA-reaktive Metabolite (Patrianakos und Hoffman, 1979; Haugen *et al.*, 1982; Kato und Yamazoe, 1987; Boobis *et al.*, 1994). Auch für die Beteiligung von SULT am Metabolismus der heterozyklischen aromatischen Amine gibt es Hinweise (Ozawa *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1998; Wu, 2000). Deswegen sind gerade die Koexpressionszelllinien für hCYP1A2 und hSULT für Studien ihres Metabolismus und ihrer Gentoxizität geeignet.

Des Weiteren haben sich die V79-SULT-Zellen als sensitive Systeme für die Prüfung von Nitroverbindungen erwiesen. Außer dem Nitroalkan 2-Nitropropan wurde der nitropolyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff 3-Nitrobenzanthron in den in den hier konstruierten Zelllinien V79-hSULT1A1*1, V79-hCYP1A2-hSULT1A1 und V79-hCYP1A2-hSULT1A2*1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide SULT 3-Nitrobenzanthron zu einem cytotoxischen Metaboliten aktivieren können, der DNA-Addukte bildet (Arlt *et al.*, 2002).

E Zusammenfassung

Viele Arylamide und Arylamine (aAA) wirken im Tierversuch kanzerogen, sind aber in Bezug auf ihre Kanzerogenität im Menschen nicht zu klassifizieren oder werden als möglicherweise kanzerogen eingestuft. Dazu gehören auch einige heterozyklische aromatische Amine, die beim Erhitzen von Fleisch und Fisch entstehen. Da aAA ihre Kanzerogenität erst nach einer oft mehrschrittigen metabolischen Aktivierung entfalten, besteht grundsätzlich das Problem, dass Säugerspezies sich in ihrer Disposition für Tumoren, die durch diese Substanzgruppe ausgelöst werden, unterscheiden können. Erkenntnisse aus Tierversuchen oder *in vitro*-Studien, bei denen tierisches Material als Quelle für metabolisierende Enzyme verwendet wurde, sind deswegen nicht ohne Vorbehalte auf den Menschen zu übertragen. In der vorliegenden Arbeit gelang die Etablierung einer Serie sensitiver rekombinanter Indikatorzellen für die Prüfung der gentoxischen Wirkung aromatischer Amine und Amide. Durch die Fähigkeit zur internen Durchführung der mehrstufigen metabolischen Aktivierung von aAA konnte auf den Zusatz externer Metabolisierungssysteme gänzlich verzichtet werden. Dadurch erübrigte sich bei den neu etablierten Testsystemen das Problem der schlechten Membrangängigkeit extrazellulär generierter reaktiver Metabolite und der Reaktion mit Makromolekülen im Extrazellularraum.

Es wurden Zelllinien für die Expression von humaner Sulfotransferase (hSULT) 1A1 (*1, *2 und *V), hSULT1A2 (*1 und *2), hSULT1A3, hSULT1E1 und hSULT1C1 konstruiert. Auch die Reihe der V79-Zelllinien, die SULT der Ratte exprimieren, wurde durch zwei neue Zelllinien, V79-rSULT1A1 und V79-rSULT1E1, ergänzt. Verschiedene hSULT1A- Formen (1A1*1, 1A1*2, 1A2*1, 1A2*2) sowie hSULT1C1 wurden unter vergleichbaren Bedingungen mit humanem Cytochrom P450 1A2 (hCYP1A2) koexprimiert. Dadurch sind die Zelllinien für vergleichende toxikologische und enzymatische Untersuchungen der einzelnen SULT-Formen und der SULT von Ratte und Mensch gut geeignet.

Die Expression von SULT erwies sich als nicht besonders problematisch, während die Selektion von Klonen, die für die hohe Expression beider Enzyme (CYP und SULT) stabil waren, sich als sehr aufwändig herausstellte. Auch die Interpretation und die Reproduzierbarkeit von Mutagenitätsexperimenten war bei den Koexpressionszelllinien schwieriger als bei Zelllinien, die nur ein rekombinantes Enzym exprimierten.

Die neu etablierten Zelllinien wurden bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften, des SULT-Expressionsniveaus und der protein-biochemischen Eigenschaften der exprimierten SULT charakterisiert. Die Korrektheit der Sequenz wurde für alle neu

konstruierten V79-SULT-Zelllinien bestätigt. Weder die SULT-Expression noch die Koexpression von SULT und CYP veränderten die untersuchten zellbiologischen Parameter maßgeblich. Die exprimierten Enzyme unterschieden sich in ihren Spezifitäten, Konzentrations- und pH-Optima gegenüber Standardsubstraten nicht von gereinigten oder bakteriell exprimierten Enzymen.

Im HPRT-Genmutationstest mit benzylischen Alkoholen konnte gezeigt werden, dass die SULT-profizienten V79-Zellen ein sensitives Testsystem zum Nachweis SULT-vermittelter Mutagenität durch hSULT1E1 und hSULT1A1 darstellen. Mit den V79-hSULT1A-Zellen konnte zum ersten Mal die durch hSULT-vermittelte Mutagenität eines Nitroalkanes, 2-Nitropropan, in einem Säugerzellsystem gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die hSULT1A2, eine SULT-Form, die in Bezug auf ihr toxifizierendes Potenzial bisher nur wenig untersucht worden war, von den untersuchten SULT das stärkste Aktivierungspotenzial für 2-Nitropropan besaß.

Die Prüfung von aAA in den V79-hCYP1A2-hSULT-Zelllinien brachte neue Erkenntnisse zur Bioaktivierung dieser Substanzgruppe im Menschen. 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol (3'-M-DAB), 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) und 2-Aminoanthracen wurden in V79-hCYP1A2-hSULT1A-Zelllinien bereits in sehr niedrigen Konzentrationen aktiviert. Das spricht dafür, dass diese SULT-Formen diejenigen sind, die für die Aktivierung von aAA im Menschen wichtig sind und dass dieser Aktivierungsweg von biologischer Bedeutung ist. Für jedes der geprüften aAA wurde mindestens eine SULT-Form gefunden, die es bei gemeinsamer Expression mit hCYP1A2 zum Mutagen aktivieren konnte. Von den bisher untersuchten SULT-Formen der Ratte besaß rSULT1C1 das stärkste Aktivierungspotenzial für diese Substanzgruppe. Im Menschen scheinen hingegen SULT1A-Formen die wichtigste Rolle bei der Aktivierung von aAA zu spielen. In Abhängigkeit von der Struktur wurden die aAA durch die einzelnen SULT-Formen unterschiedlich stark aktiviert. 2-AAF wurde deutlich stärker durch hSULT1A2 als durch hSULT1A1 aktiviert. Dahingegen wurde 2,4-TDA praktisch nur durch hSULT1A1 aktiviert. Zum ersten Mal wurde in dieser Arbeit die Aktivierung von 2-Aminoanthracen durch SULT nachgewiesen. Sowohl hSULT1A1*1 als auch hSULT1A2*1 waren dazu in der Lage. Ein hCYP1A2-hSULT-abhängiger Aktivierungsweg wurde auch für 3'-M-DAB bestätigt. Da sämtliche untersuchten hSULT1A-Formen zur Aktivierung dieser Substanz in der Lage waren, eignet sie sich gut als Positivkontrolle für funktionelle Expression von hSULT1A2 und hSULT1A1 bei weiteren Tests, in denen andere aAA geprüft werden sollen. Durch die Validierung des SULT-Expressionsniveaus der Zelllinien war es in einigen Fällen möglich, das Aktivierungspotenzial verschiedener allelischer Varianten der hSULT1A-Formen zu vergleichen. So wurden 2-Aminoanthracen und 2-AAF gut durch hSULT1A2*1 aktiviert, waren bei Expression des hSULT1A2*2-Alloenzymes aber nicht mutagen. Zur Aktivierung des 3'-M-DAB waren hingegen beide hSULT1A2-Alloenzyme in der Lage. Die untersuchten

Alloenzyme der hSULT1A1 besaßen ein ähnlich starkes Aktivierungspotenzial für die meisten aAA. 3'-M-DAB war in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*2 etwas stärker mutagen als in der Zelllinie V79-hCYP1A2-hSULT1A1*1. In dieser Arbeit wurden demnach gut charakterisierte Indikatorsysteme für die gentoxische Wirkung von aAA etabliert, die bereits auch in anderen Arbeitsgruppen eingesetzt wurden und dort reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

F Literatur

- Abu-Zeid, M., Yamazoe, Y., Kato, R. (1992) Sulfotransferase-mediated DNA binding of *N*-hydroxyarylamines(amides) in liver cytosols from human and experimental animals. *Carcinogenesis* 13:1307-1314
- Aksoy, I. A., Wood, T. C., Weinshilboun, R. (1994) Human liver estrogen sulfotransferase: identification by cDNA cloning and expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:1621-1629
- Alexander, J. J., Bey, E. P. (1976) Establishment of a continuously growing cell line from a primary carcinoma of the liver. *S. Afr. med. J.* 50:2124-2128
- Ames, B. N. (1975) Hair dyes are mutagenic; Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:2423-2427
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D. (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:2281-2285
- Andrae, U., Homfeldt, L., Vogl, L., Lichmannegger, J., Summer, K.-H. (1988) 2-Nitropropane induces DNA repair synthesis in rat hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 9:811-815
- Andrae, U., Kreis, P., Coughtrie, M. W., Pabel, U., Meinl, W., Bartsch, I., Glatt, H. (1999) Activation of propane 2-nitronate to a genotoxicant in V79-derived cell lines engineered for the expression of rat hepatic sulfotransferases. *Mutation Res.* 439:191-197
- Anliker, R. (1979) Ecotoxicology of dyestuffs - a joint effort by industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 3:59-74
- Arlt, V. M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H. (2002) Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* 23:1937-1945
- Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., Hauser, H. (1988) Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68:213-219
- Ashby, J., Tennant, R. W. (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation Res.* 257:229-306
- Barrett, J. C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 100:9-20

- Blunck, J. M., Crowther, C. E. (1975) Enhancement of azo dye carcinogenesis by dietary sodium sulfate. *Eur. J. Cancer* 11:23-32
- Bond, J. A., Li, A. P. (1983) Rat nasal tissue activation of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene to mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.* 5:311-318
- Boobis, A. R., Lynch, A. M., Murray, S., de la Torre, R., Solans, A., Farre, M., Segura, J., Gooderham, N. J., Davies, D. S. (1994) CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res.* 54:89-94
- Borthwick, E. B., Burchell, A., Coughtrie, M. W. H. (1993) Purification and immunochemical characterization of a male-specific rat liver oestrogen sulphotransferase. *Biochem. J.* 289:719-725
- Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A., Huberman, E. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature – a report of the Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 87:81-142
- Brambilla, G., Martelli, A. (1990) Human hepatocytes in genotoxicity assays. *Pharmacol. Res.* 22:381-392
- Brix, L. A., Duggleby, R. G., Gaedigk, A., McManus, M. E. (1999) Structural characterization of human aryl sulphotransferases. *Biochem. J.* 337:337-343
- Burdette, W. J. (1955) The significance of mutation in relation to the origin of tumors: a review. *Cancer Res.* 15:201-205
- Burgess, E. J., Trafford, J. A. (1985) Acetylator phenotype in patients with lung carcinoma - a negative report. *Eur. J. Respir. Dis.* 67:17-19
- Butler, M. A., Lang, N. P., Young, J. F., Caporaso, N. E., Vineis, P., Hayes, R. B., Teitel, C. H., Massaengill, J. P., Lawsen, M. F., Kadlubar, F. F. (1992) Determination of human CYP1A2 and NAT 2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 2:116-127
- Butterworth, B. E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Loury, D. J., White, R. D., Doolittle, D. J., Working, P. K., Cattley, R. C., Jirtle, R., Michalopoulos, G., Strom, S. (1989) Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Res.* 49:1075-1084
- Carstensen, J. M., Wicksell, L., Eklund, G., Gustafsson, J. A. (1988) Lung cancer incidence among Swedish bakers and pastrycooks: temporal variation. *Scand. J. Soc. Med.* 16:81-85
- Case, R. A. M., Hosker, M. E., McDonald, D. B., Pearson, J. T. (1993) Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff

- intermediates in the british chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, α -naphthylamine and β -naphthylamine. *Br. J. Ind. Med.* 50:389-411
- Chen, J., Stampfer, M. J., Hough, H. L., Garcia-Closas, M., Willett, W. C., Hennekens, C. H., Kelsey, K. T., Hunter, D. J. (1998) A prospective study of *N*-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 58:3307-3311
- Chou, H.-C., Lang, N. P., Kadlubar, F. F. (1995) Metabolic activation of *N*-hydroxy arylamines and *N*-hydroxy heterocyclic amines by human sulfotransferase(s). *Cancer Res.* 55:525-529
- Chu, E. H. Y., Bailife, E. G., Malling, H. V. (1968) Mammalian cell genetics II: chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61:1306-1312
- Chung, K. T., Stevens, S. E. J. (1993) Degradation of azo-dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:2121-2132
- Ciotti, M., Lakshmi, V. M., Basu, N., Davis, B. B., Owens, I. S., Zenser, T. V. (1999) Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides. *Carcinogenesis* 20:1963-1969
- Combes, R. D., Haveland-Smith, R. B. (1982) A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Res.* 98:101-248
- Comer, K. A., Falany, C. N. (1992) Immunological characterization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase from human liver and adrenal. *Mol. Pharmacol.* 41:645-651
- Commoner, B., Vithayathil, A. J., Dolara, P., Nair, S., Madyastha, P., Cuca, G. C. (1978) Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science* 201:913-916.
- Coppinger, W. J., Brennan, S. A., Carver, J. H., Thompson, E. D. (1984) Locus specificity of mutagenicity of 2,4-diaminotoluene in both L5178Y mouse lymphoma and AT3-2 Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 135:115-123
- Coughtrie, M. W. H., Gilissen, R. A. H. J., Shek, B., Strange, R. C., Fryer, A. A., Jones, P. W., Bamber, D. E. (1999) Phenol sulphotransferase *SULT1A1* polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations. *Biochem. J.* 337:45-49
- Council on Scientific Affairs (1988) Cancer risk of pesticides in agricultural workers. *JAMA* 260:959-966
- Crespi, C. L., Gonzalez, F. J., Steimel, D. T., Turner, T. R., Gelboin, H. V., Penman, B. W., Langenbach, R. (1991a) A metabolically competent human cell line expressing five

- cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. *Chem. Res. Toxicol.* 4:566-572
- Crespi, C. L., Penman, B. W., Steimel, D. T., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. (1991b) The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B₁ and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis* 12:355-359
- Cunningham, M. L., Matthews, H. B. (1990) Evidence for an acetoxarylamine as the ultimate mutagenic reactive intermediate of the carcinogenic aromatic amine 2,4-diaminotoluene. *Mutation Res.* 242:101-110
- Cunningham, M. L., Burka, L. T., Matthews, H. B. (1989) Metabolism, disposition, and mutagenicity of 2,6-diaminotoluene, a mutagenic noncarcinogen. *Drug Metab. Dispos.* 17:612-617
- Czich, A., Bartsch, I., Dogra, S., Hornhardt, S., Glatt, H. R. (1994) Stable heterologous expression of hydroxysteroid sulphotransferase in Chinese hamster V79 cells and their use for toxicological investigations. *Chem.-Biol. Interact.* 92:119-128
- Dajani, R., Cleasby, A., Neu, M., Wonacott, A. J., Jhoti, H., Hood, A. M., Modi, S., Hersey, A., Taskinen, J., Cooke, R. M., Manchee, G. R., Coughtrie, M. W. H. (1999) X-Ray crystal structure of human dopamine sulfotransferase, SULT1A3: molecular modeling and quantitative structure-activity relationship analysis demonstrate a molecular basis for sulfotransferase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 274:37862-37868
- Davies, R. L., Crespi, C. L., Rudo, K., Turner, T. R., Langenbach, R. (1989) Development of a human cell line by selection and drug-metabolizing gene transfection with increased capacity to activate promutagens. *Carcinogenesis* 10:885-891
- Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Brown, N. A., Williams, J. R. (1983) Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutation Res.* 108:437-449
- DeBaun, J. R., Miller, E. C., Miller, J. A. (1970) *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase: its probable role in carcinogenesis and in protein-(methion-S-yl) binding in rat liver. *Cancer Res.* 30:577-595
- Degawa, M., Miyairi, S., Hashimoto, Y. (1978) Electrophilic reactivity and mutagenicity of ring methyl derivatives of *N*-acyloxy-*N*-methyl-4-aminoazobenzene and related azo dyes. *Gann* 69:367-374
- Degawa, M., Miura, S., Hashimoto, Y. (1990) Androgen-dependent renal microsomal P-450 responsible for *N*-hydroxylation and mutagenic activation of 3-methoxy-4-aminoazobenzene. *Cancer Res.* 50:2729-2733
- Delclos, K. B., Tarpley, W. G., Miller, E. C., Miller, J. A. (1984) 4-Aminoazobenzene and *N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene as equipotent hepatic carcinogens in male

- C57BL/6 X C3H/He F₁ mice and characterization of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoazobenzene as the major persistent hepatic DNA-bound dye in these mice. *Cancer Res.* 44:2540-2450
- Delclos, K. B., Miller, E. C., Miller, J. A., Liem, A. (1986) Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic and hepatocarcinogenic metabolites of 4-aminoazobenzene and its *N*-methyl derivatives in infant male C57BL/6J x C3H/HeJ F₁ (B6C3F₁) mice. *Carcinogenesis* 7:277-287
- Demyan, W. F., Song, C. S., Kim, D. S., Her, S., Gallwitz, W., Rao, T. R., Slomczynska, M., Chatterjee, B., Roy, A. K. (1992) Estrogen sulfotransferase of the rat liver: complementary DNA cloning and age- and sex-specific regulation of messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* 6:589-597
- Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H. R., Oesch, F. (1988) Stable expression of rat cytochrome P450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and mutagenicity of aflatoxin B₁. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5769-5773
- Doehmer, J., Buters, J. T. M., Luch, A., Soballa, V., Baird, W. M., Morisson, H., Stegeman, J. J., Townsend, A. J., Greenlee, W. F., Glatt, H. R., Seidel, A., Jacob, J., Greim, H. (1999) Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metab. Rev.* 31:423-435
- Doll, R., Peto, R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1191-1308
- Dooley, T. P., Haldeman-Cahill, R., Joiner, J., Wilborn, T. W. (2000) Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277:236-245
- Dubach, U. C., Rosner, B., Sturmer, T. (1991) An epidemiologic study of abuse of analgesic drugs. Effects of phenacetin and salicylate on mortality and cardiovascular morbidity. *N. Engl. J. Med.* 324:155-160
- Dunn, R. T., Klaassen, C. D. (1998) Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab. Dispos.* 26:598-604
- Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wölfel, C., Doehmer, J., Parry, J. M. (1991) The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis* 6:461-470
- Elliott, B. M. (1984) Azoreductase activity of Sprague Dawley and Wistar-derived rats towards both carcinogenic and noncarcinogenic analogues of 4-dimethylaminophenylazobenzene. *Carcinogenesis* 5:1051-1055
- Engelke, C. E., Meinl, W., Boeing, H., Glatt, H. R. (2000) Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Pharmacogenetics* 10:163-169

- Engst, W., Landsiedel, R., Hermersdörfer, H., Doehmer, J., Glatt, H. R. (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
- Engst, W., Pabel, U., Glatt, H. R. (2002) Conjugation of 4-nitrophenol and 4-hydroxylonazolac in V79-derived cells expressing individual forms of human sulphotransferases. *Environ. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 11:243-250
- Evans, D. A., Eze, L. C., Whibley, E. J. (1983) The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer. *J. Med. Genet.* 20:330-333
- Falany, C. N., Wheeler, J., Oh, T. S., Falany, J. L. (1994) Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 48:369-375
- Falany, C. N., Krasnykh, V., Falany, J. L. (1995) Bacterial expression and characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52:529-539
- Falany, J. L., Azziz, R., Falany, C. N. (1998) Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium. *Chem.-Biol. Interact.* 109:329-339
- Falany, C. N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J., Falany, J. L. (2000) Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem. J.* 346:857-864
- Fare, G. (1966) Rat skin carcinogenesis by topical applications of some azo dyes. *Cancer Res.* 26:2406-2408
- Fiala, E. S., Conaway, C. C., Mathis, J. E. (1989) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49:5518-5522
- Fiala, E. S., Sodum, R. S., Hussain, N. S., Rivenson, A., Dolan, L. (1995) Secondary nitroalkanes: induction of DNA repair in rat hepatocytes, activation by aryl sulfotransferase and hepatocarcinogenicity of 2-nitrobutane and 3-nitropentane in male F344 rats. *Toxicology* 99:89-97
- Flammang, T. J., Yamazoe, Y., Benson, R. W., Roberts, D. W., Potter, D. W., Chu, D. Z., Lang, N. P., Kadlubar, F. F. (1989) Arachidonic acid-dependent peroxidative activation of carcinogenic arylamines by extrahepatic human tissue microsomes. *Cancer Res.* 49:1977-1982.
- Foldes, A., Meek, J. L. (1973) Rat brain phenolsulfotransferase: partial purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 327:365-374
- Forbes-Bamforth, K. J., Coughtrie, M. W. (1994) Identification of a new adult human liver sulfotransferase with specificity for endogenous and xenobiotic estrogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:707-711

- Forbes, K. J., Hagen, M., Glatt, H. R., Hume, R., Coughtrie, M. W. H. (1995) Human fetal adrenal hydroxysteroid sulphotransferase: cDNA cloning, stable expression in V79 cells and functional characterisation of the expressed enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 112:53-60
- Ford, D. K., Yerganian, G. (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 21:393-425
- Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B., Siest, G. (1991) Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures. *Mol. Pharmacol.* 39:177-183
- Friedberg, T., Becker, R., Oesch, F., Glatt, H. R. (1994) Studies on the importance of microsomal epoxide hydrolase in the detoxification of arene oxides using the heterologous expression of the enzyme in mammalian cells. *Carcinogenesis* 15:171-175
- Fuda, H., Lee, Y. C., Shimizu, C., Javitt, N. B., 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., Nagata, K., Ozawa, S., Sasano, H., Yamazoe, Y. (1997) Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases. *J. Biochem.* 122:1052-1061
- Furlong, B. B., Weaver, R. P., Goldstein, J. A. (1987) Covalent binding to DNA and mutagenicity of 2,4-diaminotoluene metabolites produced by isolated hepatocytes and 9000 g supernatant from Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* 8:247-251
- Garriott, M. L., Phelps, J. B., Hoffman, W. P. (2002) A protocol for the *in vitro* micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.* 517:123-134
- George, E., Burlinson, B., Gatehouse, D. (1989) Genotoxicity of 1- and 2-nitropropane in the rat. *Carcinogenesis* 10:2329-2334.
- Gilissen, R. A. H. J., Ringer, D. P., Stavenuiter, H. J. F. C., Mulder, G. J., Meerman, J. H. N. (1992) Sulfation of hydroxylamines and hydroxamic acids in liver cytosol from male and female rats and purified aryl sulfotransferase IV. *Carcinogenesis* 13:1699-1703
- Gilissen, R. A. H. J., Bamforth, K. J., Stavenuiter, J. F. C., Coughtrie, M. W. H., Meerman, J. H. N. (1994) Sulfation of aromatic hydroxamic acids and hydroxylamines by multiple forms of human liver sulfotransferases. *Carcinogenesis* 15:39-45

- Glatt, H. R. (1993a) Fremdstoffmetabolismus und Mutagenitätsprüfung. In: Fahrig, R. (ed.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 169-185
- Glatt, H. R. (1993b) HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters. In: Fahrig, R. (ed.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 243-262
- Glatt, H. R. (2002) Sulphotransferases. In: Ioannides, C. (ed.) *Handbook of Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, John Wiley & Sons, Sussex, 353-439
- Glatt, H. R., Oesch, F., Neumann, H.-G. (1986) V79 Chinese hamster cells deacetylate *trans-N*-acetoxy-4-acetylaminostilbene and *trans-N*-hydroxy-4-acetylaminostilbene to mutagenic and cytotoxic metabolites. *Cell Biol. Toxicol.* 2:213-221
- Glatt, H. R., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., Oesch, F. (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolising activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* 1:313-333
- Glatt, H. R., Gemperlein, I., Setiabudi, F., Platt, K.-L., Oesch, F. (1990a) Expression of xenobiotic-metabolising enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5:241-249
- Glatt, H. R., Henschler, R., Phillips, D. H., Blake, J. W., Steinberg, P., Seidel, A., Oesch, F. (1990b) Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells. *Environ. Health Perspect.* 88:43-48
- Glatt, H. R., Pauly, K., Wölfel, C., Dogra, S., Seidel, A., Lee, H., Harvey, R. G., Oesch, F., Doehmer, J. (1993) Stable expression of heterologous cytochromes P450 in V79 cells: mutagenicity studies with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromat. Compds.* 3 (Suppl.):1167-1174
- Glatt, H. R., Bartsch, I., Czich, A., Seidel, A., Falany, C. N. (1995) *Salmonella* strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases. *Toxicol. Lett.* 82:829-834
- Glatt, H. R., Christoph, S., Czich, A., Pauly, K., Schwierzok, A., Seidel, A., Coughtrie, M. W. H., Doehmer, J., Falany, C. N., Phillips, D. H., Yamazoe, Y., Bartsch, I. (1996) Rat and human sulfotransferases expressed in Ames's *Salmonella typhimurium* strains and Chinese hamster V79 cells for the activation of mutagens. In: Hengstler, J. G. (ed.) *Control Mechanisms of Carcinogenesis*, 98-115
- Glatt, H. R., Engst, W., Hagen, M., Hermersdörfer, H., Landsiedel, R., Pabel, U. (1997) The use of cell lines genetically engineered for human xenobiotic-metabolizing enzymes. In: van Zutphen, B. (ed.) *Developments in Animal and Veterinary Sciences*, Elsevier, Amsterdam, 81-94

- Glatt, H. R., Davis, W., Meinl, W., Hermersdorfer, H., Venitt, S., Phillips, D. H. (1998a) Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis* 19:1709-1713
- Glatt, H. R., Bartsch, I., Christoph, S., Coughtrie, M. W. H., Falany, C. N., Hagen, M., Landsiedel, R., Pabel, U., Phillips, D. H., Seidel, A., Yamazoe, Y. (1998b) Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem.-Biol. Interact.* 109:195-219
- Glatt, H. R., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W., Andrae, U., Falany, C. N., Meinl, W. (2000) Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112-113:341-348
- Glatt, H. R., Boeing, H., Engelke, C. E. H., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., Meinl, M. (2001) Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Res.* 482:27-40
- Göggelmann, W., Bauchinger, M., Kulka, U., Schmid, E. (1988) Genotoxicity of 2-nitropropane and 1-nitropropane in *Salmonella typhimurium* and human lymphocytes. *Mutagenesis* 3:137-140.
- Golka, K., Prior, V., Blaszkewicz, M., Cascorbi, I., Schops, W., Kierfeld, G., Roots, I., Bolt, H. M. (1996) Occupational history and genetic *N*-acetyltransferase polymorphism in urothelial cancer patients of Leverkusen, Germany. *Scand J. Work Environ. Health* 22:332-338
- Grant, D. M., Josephy, P. D., Lord, H. L., Morrison, L. D. (1992) *Salmonella typhimurium* strains expressing human arylamine *N*-acetyltransferases: metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res.* 52:3961-3964
- Grantham, P. H., Weisburger, E. K., Weisburger, J. H. (1965) Dehydroxylation and deacetylation of *N*-hydroxy-*N*-2-fluorenylacetamide by rat liver and brain homogenates. *Biochim. Biophys. Acta* 107:414-424
- Grimmer, G., Dettbarn, G., Seidel, A., Jacob, J. (2000) Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci. Total. Environ.* 247:81-90
- Guengerich, F. P., Shimada, T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4:391-407
- Gunning, P., Leavitt, J., G., M., Ng, S. Y., Kedes, I. (1987) A human β -actin expression vector system directs high level accumulation of antisense transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:4831-4835
- Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C. N., Glatt, H. R. (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

- Hallström, I., Grafström, R. (1981) The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. II. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chem.-Biol. Interact.* 34:145-159
- Haugen, D. A., Peak, M. J., Suhrbler, K. M., Stamoudis, V. C. (1982) Isolation of mutagenic aromatic amines from a coal conversion oil by cation exchange chromatography. *Anal. Chem.* 54:32-37
- Her, C., Kaur, G. P., Athwal, R. S., Weinshilboum, R. M. (1997) Human sulfotransferase SULT1C1: cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization. *Genomics* 41:467-470
- Her, C., Wood, T. C., Eichler, E. E., Mohrenweiser, H. W., Ramagli, L. S., Siciliano, M. J., Weinshilboum, R. M. (1998) Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics* 53:284-295
- Hirshey, S. J., Falany, C. N. (1990) Purification and characterization of rat liver minoxidil sulphotransferase. *Biochem. J.* 270:721-728
- Hirshey, S. J., Dooley, T. P., Reardon, I. M., Heinrikson, R. L., Falany, C. N. (1992) Sequence analysis, *in vitro* translation, and expression of the cDNA for rat liver minoxidil sulfotransferase. *Mol. Pharmacol.* 42:257-264
- Hirvonen, A. (1999) Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ. Health Perspect.* 107:37-47
- Hite, M., Skeggs, H. (1979) Mutagenic evaluation of nitroparaffins in the *Salmonella typhimurium*/mammalian-microsome test and the micronucleus test. *Environ. Mutagen.* 1:383-389
- Hoffman, D. H., Rathkamp, G. (1968) Chemical studies on tobacco smoke. III. Primary and secondary nitroalkanes in cigarette smoke. *Beitr. Tabakforsch.* 4:124-134
- Hsu, T. C., Zenzes, M. T. (1964) Mammalian chromosomes *in vitro* XVII. Idiogram of the Chinese hamster. *J. Natl. Cancer Inst.* 32:857-869
- Huang, J., Guo, W.-C., Lai, M.-D., Guo, Y. L., Lambert, G. H. (1999) Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (FL21L) in Chinese. *Drug Metab. Dispos.* 27:98-101
- Hwang, S. R., Kohn, A. B., Hook, V. Y. H. (1995) Molecular cloning of an isoform of phenol sulfotransferase from human brain hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:701-707
- IARC (1982) Some industrial chemicals and dyestuffs. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, WHO, Lyon, 29:1-416
- IARC (1987a) Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs Volumes 1 to 42. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, WHO, Lyon, Suppl. 7:S. 261 (2-Naphthylamin), S. 123 (Benzidin), S. 130 (*N,N*-Bis(2-chlorethyl)-2-naphthylamin), S. 291 (4-Aminobiphenyl)

- IARC (1987b) Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs Volumes 1 to 42. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, WHO, Lyon, Suppl. 7:118
- IARC (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, WHO, Lyon, 56:156
- Iida, A., Sekine, A., Saito, S., Kitamura, Y., Kitamoto, T., Osawa, S., Mishima, C., Nakamura, Y. (2001) Catalog of 320 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 20 quinone oxidoreductase and sulfotransferase genes. *J. Hum. Genet.* 46:225-240
- Ikeya, K., Jaiswal, A. K., Owens, R. A., Jones, J. E., Nebert, D. W., Kimura, S. (1989) Human CYP1A2 sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene and genetic differences in liver 1A2 mRNA concentrations. *Mol. Endocrinol.* 3:1399-1408
- Irving, C. C. (1966) Enzymatic deacetylation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene by liver microsomes. *Cancer Res.* 26:1390-1396
- Irving, C. C., Wiseman, R., Young, J. M. (1967) Carcinogenicity of 2-Acetylaminofluorene and *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the rabbit. *Cancer Res.* 27:838-848
- Irving, C. C., Veazey, R. A., Hill, J. T. (1969) Reaction of the glucuronide of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene with nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 179:189-198
- Ito, D., Hiasa, Y., Konishi, Y., Marugami, M. (1969) The development of carcinoma in liver of rats treated with *m*-toluenediamine and the synergistic and antagonistic effects of other chemicals. *Cancer Res.* 29:1137-1145
- Jägerstad M., S. K., Grivas S., Olsson K. (1991) Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Res.* 259:219-233
- Jernström, B., Funk, M., Frank, H., Mannervik, B., Seidel, A. (1996) Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis* 17:1491-1498
- Jin, C. J., Miners, J. O., Burchell, B., Mackenzie, P. I. (1993) The glucuronidation of hydroxylated metabolites of benzo[*a*]pyrene and 2-acetylaminofluorene by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 14:2637-2639
- Jones, A. L., Hagen, M., Coughtrie, M. W. H., Roberts, R. C., Glatt, H. R. (1995) Human platelet phenolsulfotransferases: cDNA cloning, stable expression in V79 cells and identification of a novel allelic variant of the phenol-sulfating form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:855-862
- Josephy, P. D., DeBruin, L. S., Lord, H. L., Oak, J. N., Evans, D. H., Guo, Z. Y., Dong, M. S., Guengerich, F. P. (1995) Bioactivation of aromatic amines by recombinant

- human cytochrome P4501A2 expressed in Ames tester strain bacteria: a substitute for activation by mammalian tissue preparations. *Cancer Res.* 55:799-802
- Josephy, P. D., Evans, D. H., Parikh, A., Guengerich, F. P. (1998) Metabolic activation of aromatic amine mutagens by simultaneous expression of human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and *N*-acetyltransferase in *Escherichia coli*. *Chem. Res. Toxicol.* 11:70-74
- Josephy, P. D., Bibeau, K. L., Evans, D. H. (2000) Activation of MeIQ (2-Amino-3,4-dimethylimidazo-[4,5-*f*]quinoline) by sequence variants of recombinant human cytochrome P450 1A2. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:328-335
- Kadlubar, F. F., Hammons, G. J. (1987) The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens. In: Guengerich, F. (ed.), *Mammalian Cytochromes P-450*, CRC Press Inc., Boca-Raton, 81-130
- Kadlubar, F. F., Miller, J. A., Miller, E. C. (1976a) Microsomal *N*-oxidation of the hepatocarcinogen *N*-methyl-4-aminoazobenzene and the reactivity of *N*-hydroxy-*N*-methyl-4-aminoazobenzene. *Cancer Res.* 36:1196-1206
- Kadlubar, F. F., Miller, J. A., Miller, E. C. (1976b) Hepatic metabolism of *N*-hydroxy-*N*-methyl-4-aminoazobenzene and other *N*-hydroxy arylamines to reactive sulfuric acid esters. *Cancer Res.* 36:2350-23349.
- Kadlubar, F., Frederick, C., Weiss, C., Zenser, T. (1982) Prostaglandin endoperoxide synthetase-mediated reaction of carcinogenic aromatic amines and their binding to DNA and protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:253-258
- Kadlubar, F. F., Talaska, G., Lang, N. P., Benson, R. W., Roberts, D. W. (1988) Assessment of exposure and susceptibility to aromatic amine carcinogens. *IARC Sci. Publ.* 89:166-174
- Kadlubar, F. F., Butler, M. A., Kaderlik, K. R., Chou, H. C., Lang, N. P. (1992) Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 98:69-74
- Kalweit, S., Utesch, D., von der Hude, W., Madle, S. (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells: comparison of three different test approaches. *Mutation Res.* 439:183-190
- Kasper, P., Madle, S., George, E. (1988) Induction of SCE by indirect mutagens in cultured rat hepatoma cells and in Chinese hamster V79 cells co-cultivated with hepatocyte primary cultures. *Mutagenesis* 3:521-525
- Kato, R., Yamazoe, Y. (1987) Metabolic activation and covalent binding to nucleic acid of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jpn. J. Cancer Res.* 78:297-311

- Kiefer, F., Cumpelik, O., Reen, R., Doehmer, J., Wiebel, F. J. (1994) Arylamines suppress their own activation and that of nitroarenes in V79 Chinese hamster cells by competing for acetyltransferases. *Environ. Health Perspect.* 102:95-97
- Kiehlbauch, C. C., Lam, Y. F., Ringer, D. P. (1995) Homodimeric and heterodimeric aryl sulfotransferases catalyze the sulfuric acid esterification of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.* 270:18941-18947
- Kimura, T., Kodoma, M., Nagata, C. (1984) The role of cytochrome P450 and flavin containing monooxygenase in the *N*-hydroxylation of *N*-methyl-4-aminoazobenzene in rat liver: Analysis with purified enzymes and antibodies. *Gann* 75:895-904
- Kohl, C., Morgan, P., Gescher, A. (1995) Metabolism of the genotoxicant 2-nitropropane to a nitric oxide species. *Chem.-Biol. Interact.* 97:175-184
- Komatsu, K., Driscoll, W. J., Koh, Y. C., Strott, C. A. (1994) A P-loop related motif (GxxGxxK) highly conserved in sulfotransferases is required for binding the activated sulfate donor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:1178-1185
- Kreis, P., Degen, G. H., Andrae, U. (1998) Sulfotransferase-mediated genotoxicity of propane 2-nitronate in cultured ovine seminal vesicle cells. *Mutation Res.* 413:69-81
- Kreis, P., Brandner, S., Coughtrie, M. W., Pabel, U., Meinel, W., Glatt, H., Andrae, U. (2000) Human phenol sulfotransferases hP-PST and hM-PST activate propane 2-nitronate to a genotoxicant. *Carcinogenesis* 21:295-299
- Kriek, E. (1965) On the interaction of *N*-2-fluorenylhydroxylamine with nucleic acids *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20:793-799
- Kriek, E. (1992) 50 years of research on *N*-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118:481-489
- Kulkarni, A. P., Murthy, K. R. (1995) Xenobiotic metabolism in humans during early pregnancy: peroxidase-mediated oxidation and bioactivation of 2-aminofluorene. *Xenobiotica* 25:799-810
- Kuroki, T. (1979) Critical importance of microsome concentration in mutagenesis assay with V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 63:259-272
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10:203-209
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Landsiedel, R., Pabel, U., Engst, W., Ploschke, J., Seidel, A., Glatt, H. R. (1998) Chiral inversion of 1-hydroxyethylpyrene enantiomers mediated by enantioselective sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:181-185

- Lang, N. P. (1991) Aromatic and heterocyclic amine metabolism and phenotyping in humans. *New Horizon in Biological Dosimetry* 375:33-47
- Levine, W. G. (1985) Studies on microsomal azoreduction. *N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene (DAB) and its derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 34:3259-3264
- Levine, W. G. (1991) Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug Metab. Rev.* 23:253-309
- Lewis, A. J., Walle, U. K., King, R. S., Kadlubar, F. F., Falany, C. N., Walle, T. (1998) Bioactivation of the cooked food mutagen *N*-hydroxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by estrogen sulfotransferase in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 19:2049-2053
- Lewis, A. J., Otake, Y., Walle, U. K., Walle, T. (2000) Sulphonation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene by human dehydroepiandrosterone sulphotransferase. *Xenobiotica* 30:253-261
- Lewis, T. R., Ulrich, C. E., Busey, W. M. (1979) Subchronic inhalation toxicity of nitromethane and 2-nitropropane. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2:233-249
- Lin, G. H. Y., Solodar, W. E. (1988) Structure-activity relationship studies on the mutagenicity of some azo-dyes in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutagenesis* 3:311-315
- Linhart, I., Gescher, A., Goodwin, B. (1991) Investigation of the chemical basis of nitroalkane toxicity: tautomerism and decomposition of propane-1- and 2-nitronate under physiological conditions. *Chem.-Biol. Interact.* 80:187-201
- Loretz, L. J., Pariza, M. W. (1984) Effect of glutathione levels, sulfate levels, and metabolic inhibitors on covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline and 2-acetylaminofluorene to cell macromolecules in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 5:895-899
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193:165-275
- Lutz, W. K. (1986) Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 112:85-91
- Mangold, B. L., Erickson, J., Lohr, C., McCann, D. J., Mangold, J. B. (1990) Self-catalyzed irreversible inactivation of rat hepatic aryl sulfotransferase IV by *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 11:1563-1567
- Marzin, D. (1997) The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutation Res.* 392:175-181

- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:5135-5139
- McGregor, D. B., Edwards, I., Wolf, C. R., Forrester, L. M., Caspary, W. J. (1991) Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutation Res.* 261:29-39
- McManus, M. E., Boobis, A. R., Pacifici, G. M., Frempong, R. Y., Brodie, M. J., Kahn, G. C., Whyte, C., Davies, D. S. (1980) Xenobiotic metabolism in the human lung. *Life Sci.* 26:481-487
- Meinl, W., Meerman, J. H., Glatt, H. R. (2002) Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics* 12:677-689
- Miller, E. C. (1978) Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. *Cancer Res.* 38:1479-1496
- Miller, E. C., Miller, J. A. (1981) Searching for the ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 47:2327-2345
- Miller, J. A., Miller, E. C., Baumann, C. A. (1945) On the methylation and demethylation of certain carcinogenic azo dyes in the rat. *Cancer Res.* 5:162-168
- Miller, E. C., Miller, J. A., Enomoto, M. (1964) The comparative carcinogenicity of 2-acetylaminofluorene and its *N*-hydroxy metabolite in mice, hamsters, and guinea pigs. *Cancer Res.* 24:2018-2032
- Miller, E. C., Miller, J. A., Boberg, E. W., Delclos, K. B., Lai, C.-C., Fennell, T. R., Wiseman, R. W., Liem, A. (1985) Sulfuric acid esters as ultimate electrophilic and carcinogenic metabolites of some alkenylbenzenes and aromatic amines in mouse liver. In: Huberman, E. (ed.) *Carcinogenesis*, Raven Press, New York, 10:93-107
- Monteith, D. K. (1992) Inhibition of sulfotransferase affecting unscheduled DNA synthesis induced by 2-acetylaminofluorene: an *in vivo* and *in vitro* comparison. *Mutation Res.* 282:253-258
- Monteith, D. K., Michalopoulos, G., Strom, S. C. (1988) Metabolism of acetylaminofluorene in primary cultures of human hepatocytes: dose-response over a four-log range. *Carcinogenesis* 9:1835-1841
- Mori, Y., Niwa, T., Toyoshi, K., Hirano, K., Sigiura, M. (1980) Carcinogenicity of 3'-hydroxymethyl-*N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene in rat liver. *Carcinogenesis* 1:533-535
- Mori, Y., Niwa, T., Toyoshi, K. (1983a) Participation of cytochrome P450 in mutagenic activation of the carcinogen 3'-hydroxymethyl-*N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene and its *N*-demethylated compounds by rat liver. *Mutation Res.* 122:13-22

- Mori, Y., Niwa, T., Toyoshi, K., Hirano, K., Sugiura, M. (1983b) Mutagenesis in *Salmonella* after metabolic activation of carcinogenic azo dyes and their isomers by liver S9 from rats, mice and hamsters. *Mutation Res.* 121:95-102
- Mori, Y., Niwa, T., Toyoshi, K. (1984) Carcinogenic activities of hydroxymethyl derivatives of 4-(dimethylamino)-azobenzene in the liver of rats, mice and hamsters. *Exp. Pathol.* 26:15-19
- Mueller, G. C., Miller, J. A. (1953) The metabolism of methylated aminoazo dyes II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 202:579-587
- Mulder, G. J., Hinson, J. A., Nelson, W. L., Thorgeirsson, S. N. (1977) Role of sulfotransferase from rat liver in the mutagenicity of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Pharmacol.* 26:1356-1358
- Mulder, G. J., Jakoby, W. B. (1990) Sulfation. In: Mulder, G. J. (ed.) *Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach*, Taylor and Francis, London, Chapter 5, 107-161
- Mulligan, R. C., Berg, P. (1981) Selection for animal cells that express the *Escherichia Coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:2072-2076
- Muriel, W., Cole, J., Lehmann, A. R. (1987) Molecular analysis of ouabain-resistant mutants of the mouse lymphoma cell line L5178Y. *Mutagenesis* 2:383-389
- Nagata, K., Yamazoe, Y. (2000) Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:159-176
- Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Gong, D. W., Yamazoe, Y., 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
- Nagata, K., Yoshinari, K., Ozawa, S., Yamazoe, Y. (1997) Arylamine activating sulfotransferase in liver. *Mutation Res.* 376:267-272
- Natarajan, A. T., Darroudi, F. (1991) Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* 6:399-403
- National Technical Information Services (1980) Bioassay of 2,6-toluenediamine dihydrochloride for possible carcinogenicity. CAS No. 15481-70-6
- Nielsen, T. (1983) Isolation of polycyclic hydrocarbons and nitro derivatives in complex mixtures by liquid chromatography. *Anal. Chem.* 55:286-290
- Norman, R. L., Muller-Eberhard, U., Johnson, E. F. (1979) The role of cytochrome P-450 forms in 2-aminoanthracene and benz[a]pyrene mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:195-201

- Norman, R. L., Muller-Eberhard, U., Johnson, E. F. (1982) Effect of microsomal cytochrome P-450 isozyme induction on the mutagenic activation of 2-aminoanthracene. *Cancer Res.* 42:1722-1726
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H. (1985) Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 147:219-229
- Oda, Y., Aryal, P., Terashita, T., Gillam, E. M., Guengerich, F. P., Shimada, T. (2001) Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella typhimurium* umu tester strains expressing human cytochrome P4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial O-acetyltransferase. *Mutation Res.* 492:81-90.
- OECD (1997) *In vivo* mammalian cell gene mutation test (updated guideline 21st July 1997). 476
- Oglesby, L. A., Brock, K. H., Moore, M. M. (1989) Induced hepatocytes as a metabolic activation system for the mouse-lymphoma assay. *Mutation Res.* 223:295-302
- Ogura, K., Satsukawa, M., Okuda, H., Hiratsuka, A., Watabe, T. (1994) Major hydroxysteroid sulfotransferase STa in rat liver cytosol may consist of two microheterogeneous subunits. *Chem.-Biol. Interact.* 92:129-144
- Otterness, D. M., Her, C., Aksoy, S., Kimura, S., Wieben, E. D., Weinshilboum, R. M. (1995) Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene: molecular cloning and structural characterization. *DNA Cell Biol.* 14:331-341
- Ozawa, S., Nagata, K., Gong, D. W., Yamazoe, Y., Kato, R. (1992) Cloning, expression, and functional characterization of rat and human phenol sulfotransferases. *J. Pharmacobio-Dyn.* 15:21-26
- Ozawa, S., Chou, H.-C., Kadlubar, F. F., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R. (1994) Activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by cDNA-expressed human and rat arylsulfotransferases. *Jpn. J. Cancer Res.* 85:1220-1228
- Pabel, U., Muckel, E., Meinel, W., Doehmer, J., Glatt, H. R. (1999) Co-expression of human cytochrome P450 1A2 with human conjugating enzymes in Chinese hamster V79 cells for mutagenicity testing of aromatic amines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359:R173
- Pan, Y. H., Reddy, G. R., Reed, G. A. (1992) Prostaglandin H synthase-dependent genotoxicity of 2,4-diaminotoluene. *Environ. Mol. Mutagen.* 19:201-208
- Panda, M., Novak, M., Magonski, J. (1989) Hydrolysis kinetics of the ultimate hepatacarcinogen *N*-(sulfonatoxy)-2-(acetylamino)fluorene: detection of long-lived hydrolysis intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 111:4524-4525
- Patrianakos, C., Hoffman, D. (1979) Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J. Anal. Toxicol.* 3:150-154

- Philip, P. A., Fitzgerald, D. L., Cartwright, R. A., Peake, M. D., Rogers, H. J. (1988) Polymorphic *N*-acetylation capacity in lung cancer. *Carcinogenesis* 9:491-493.
- Preston, B. D., Miller, J. A., Miller, E. C. (1983) Non-arene oxide aromatic ring hydroxylation of 2,2',5,5'- tetrachlorobiphenyl as the major metabolic pathway catalyzed by phenobarbital-induced rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 258:8304-8311
- Prival, M. J., Dunkel, V. C. (1989) Reevaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of chemicals previously identified as "false positives" in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 13:1-24
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Weinshilboum, R. M. (1999) Human phenol sulfotransferases *SULT1A2* and *SULT1A1*: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations. *Biochem. Pharmacol.* 58:605-616
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Otterness, D. M., van Loon, J. A., Weinshilboum, R. M. (1997) Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common *SULT1A1* alleles with TS PST phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:298-304
- Randerath, K., Reddy, M. V., Gupta, R. C. (1981) ³²P-Labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:6126-6129
- Rao, S. I., Duffel, M. W. (1991) Benzylic alcohols as stereospecific substrates and inhibitors for aryl sulfotransferase. *Chirality* 3:104-111
- Ratge, D., Kohse, K. P., Steegmuller, U., Wisser, H. (1991) Distribution of free and conjugated catecholamines between plasma, platelets and erythrocytes: different effects of intravenous and oral catecholamine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257:232-238
- Rickert, D. E., Butterworth, B. E., Popp, J. A. (1984) Dinitrotoluene: acute toxicity, oncogenicity, genotoxicity, and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 13:217-234
- Ringer, D. P., Norton, T. R., Kizer, D. E. (1985) Effect of sulfotransferase inhibitors on the 2-acetylaminofluorene-mediated lowering of rat liver *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase activity. *Biochem. Pharmacol.* 34:3380-3383
- Risch, A., Wallace, D. M., Bathers, S., Sim, E. (1995) Slow *N*-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 4:231-236.
- Robbiano, L., Mattioli, F., Brambilla, G. (1991) DNA fragmentation by 2-nitropropane in rat tissues, and effects of the modulation of biotransformation processes. *Cancer Lett.* 57:61-66
- Robbins, P. W., Lipmann, F. (1957) Isolation and identification of active sulfate. *J. Biol. Chem.* 229:837-851

- Rodrigues, A. S., Silva, I. D., Caria, M. H., Laires, A., Chaveca, T., Glatt, H. R., Rueff, J. (1994) Genotoxicity assessment of aromatic amines and amides in genetically engineered V79 cells. *Mutation Res.* 341:93-100
- Romagna, F., Staniforth, C. D. (1989) The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.* 213:91-104
- Roscher, E., Ziegler-Skylakakis, K., Andrae, U. (1990) Involvement of different pathways in the genotoxicity of nitropropanes in cultured mammalian cells. *Mutagenesis* 5:375-380
- Rossberger, S., Andrae, U. (1985) DNA repair synthesis induced by *N*-hydroxyurea, acetohydroxamic acid, and *N*-hydroxyurethane in primary rat hepatocyte cultures: comparative evaluation using the autoradiographic and bromodesoxyuridine density-shift method. *Mutation Res.* 145:201-207
- Roy, A. K. (1992) Regulation of steroid hormone action in target cells by specific hormone-inactivating enzymes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199:265-272
- Rudo, K. M., Dauterman, W. C., Langenbach, R. (1989) Human and rat kidney cell metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo[*a*]pyrene. *Cancer Res.* 49:1187-1192
- Sachse, C., Brockmüller, J., Bauer, S., Roots, I. (1999) Functional significance of a C-A polymorphism in intron I of the cytochrome P450 *CYP1A2* gene tested with caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47:445-449
- Sakakibara, Y., Takami, Y., Zwieb, C., Nakayama, T., Suiko, M., Nakajima, H., Liu, M. C. (1995) Purification, characterization, and molecular cloning of a novel rat liver dopa/tyrosine sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 270:30470-30478
- Sakakibara, Y., Yanagisawa, K., Katafuchi, J., Ringer, D. P., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M., Liu, M. C. (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of novel human SULT1C sulfotransferases that catalyze the sulfonation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.* 273:33929-33935
- Salmeen, I., Zacmanidis, P., Ball, J. (1983) 1-Nitropyrene reduction by *Salmonella typhimurium*, V79 Chinese hamster and primary rat liver cells. *Mutation Res.* 122:23-28
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467
- Schiffman, M. H., van Tassell, R., Andrews, A. W. (1990) Epidemiologic studies of fecal mutagenicity, cooked meat ingestion, and risk of colorectal cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* 205-214

- Schrenk, D., Brockmeier, D., Morike, K., Bock, K. W., Eichelbaum, M. (1998) A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort study of healthy Caucasian volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 53:361-367
- Schulte, P. A., Ringen, K., Hemstreet, G. P., Ward, E. (1987) Occupational cancer of the urinary tract. *Occup. Med.* 2:85-107
- Sekura, R. D., Jakoby, W. B. (1981) Aryl sulfotransferase IV from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 211:352-359
- Seth, P., Lunetta, K. L., Bell, D. W., Gray, H., Nasser, S. M., Rhei, E., Kaelin, C. M., Iglehart, D. J., Marks, J. R., Garber, J. E., Haber, D. A., Polyak, K. (2000) Phenol sulfotransferases: hormonal regulation, polymorphism, and age of onset of breast cancer. *Cancer Res.* 60:6859-6863
- Sharp, S., Barker, E. V., Coughtrie, M. W. H., Lowenstein, P. R., Hume, R. (1993) Immunochemical characterization of a dehydroepiandrosterone sulfotransferase in rats and humans. *Eur. J. Biochem.* 211:539-548
- Shelby, M. D. (1988) The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutation Res.* 204:3-15
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Ticc, R. R., Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191
- Skog, K. I., Johansson, M. A. E., Jägerstad, M. I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* 36:879-896
- Smith, B. A., Springfield, J. R., Gutmann, H. R. (1986) Interaction of the synthetic ultimate carcinogens, *N*-sulfonyl- and *N*-acetoxy-2-acetylaminofluorene, and of enzymatically activated *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene with nucleophiles. *Carcinogenesis* 7:405-411
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85
- Sodum, R. S., Fiala, E. S. (1998) *N*²-Amination of guanine to 2-hydrazinohypoxanthine, a novel *in vivo* nucleic acid modification produced by the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Chem. Res. Toxicol.* 11:1453-1459
- Sodum, R. S., Sohn, O. S., Nie, G., Fiala, E. S. (1993) Aryl sulfotransferase activation of 2-nitropropane and related secondary nitroalkanes. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 34:157-160
- Sodum, R. S., Sohn, O. S., Nie, G., Fiala, E. S. (1994) Activation of the liver carcinogen 2-nitropropane by aryl sulfotransferase. *Chem. Res. Toxicol.* 7:344-351

- Speck, W. T., Meyer, L. W., Zeiger, E., Rosenkranz, H. S. (1982) Mutagenicity and DNA-modifying activity of 2-nitropropane. *Mutation Res.* 104:49-54
- Speit, G. (1993) Der Schwesterchromatidaustausch als Indikator für gentoxische Effekte. In: Fahrig, R. (ed.), *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 263-273
- Staiano, N., Erickson, L. C., Smith, C. L., Marsden, E., Thorgeirsson, S. S. (1983) Mutagenicity and DNA damage induced by arylamines in the *Salmonella*/hepatocyte system. *Carcinogenesis* 4:161-167
- Stout, D. L., Baptist, J. N., Matney, T. S., Shaw, C. R. (1976) *N*-Hydroxy-2-aminofluorene: the principal mutagen produced from *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene by a mammalian supernatant enzyme preparation. *Cancer Lett.* 1:269-274
- Swierenga, S. H., Bradlaw, J. A., Brillinger, R. L., Gilman, J. P., Nestmann, E. R., San, R. C. (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: I. Unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocyte cultures. *Mutation Res.* 246:235-253.
- Temellini, A., Franchi, M., Giuliani, L., Pacifici, G. M. (1991) Human liver sulphotransferase and UDP-glucuronosyltransferase: structure-activity relationship for phenolic substrates. *Xenobiotica* 21:171-177
- Tennant, R. W., Margolin, B. H., Shelby, M. D., Zeiger, E., Haseman, J. K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B. (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. *Science* 236:933-941
- Teubner, W. (2001) Charakterisierung von Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte und Aktivierung von Promutagenen in V79-Zellen, die eine intestinale Form (1B1) des Menschen und der Ratte exprimieren. *Dissertationsschrift*, Universität Potsdam (<http://www.pub.ub.uni-potsdam.de/2001/0010/teubner.pdf>) 47-59
- Teubner, W., Pabel, U., Meinel, W., Coughtrie, M. W. H., Falany, C. N., Kretzschmar, M., Seidel, A., Glatt, H. R. (1998) Characterisation of sulfotransferases in human colon mucosa and their expression in *Salmonella typhimurium* for the study of the activation of promutagens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357:R135
- Thier, R., Taylor, J. B., Pemble, S. E., Humphreys, W. G., Persmark, M., Ketterer, B., Guengerich, F. P. (1993) Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in *Salmonella typhimurium* TA1535 leads to base-pair mutations upon exposure to dihalomethanes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:8576-8580
- Thomae, B. A., Eckloff, B. W., Freimuth, R. R., Wieben, E. D., Weinshilboum, R. M. (2002) Human sulfotransferase SULT2A1 pharmacogenetics: genotype-to-phenotype studies. *Pharmacogenomics J.* 2:48-56

- Veronese, M. E., Burgess, W., Zhu, X. Y., McManus, M. E. (1994) Functional characterization of two human sulphotransferase cDNAs that encode monoamine- and phenol-sulphating forms of phenol sulphotransferase: substrate kinetics, thermal-stability and inhibitor-sensitivity studies. *Biochem. J.* 302:497-502
- Walther, S. E., Dunbrack, R. L., Raftogianis, R. B. (1999) Cloning, expression and characterization of a human sulfotransferase, SULT4A1, that represents a novel SULT family. *ISSX Proc.* 15:388
- Wang, J., Falany, J. L., Falany, C. N. (1998) Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver. *Mol. Pharmacol.* 53:274-282
- Wang, Y., Spitz, M. R., Meng-Hsuan Tsou, A., Zhang, K., Makan, N., Wu, X. (2002) Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphism as a predisposition factor for lung cancer: a case-control analysis. *Lung Cancer* 35:137-142
- Watabe, T., Ogura, K., Satsukawa, M., Okuda, H., Hiratsuka, A. (1994) Molecular cloning and functions of rat liver hydroxysteroid sulfotransferases catalysing covalent binding of carcinogenic polycyclic arylmethanols to DNA. *Chem.-Biol. Interact.* 92:87-105
- Watanabe, H. K., Hashimoto, Y. (1981) Unscheduled DNA synthesis induced by 4-aminoazobenzene, *N*-hydroxy-4-aminoazobenzene, and their derivatives in primary cultures of rat and mouse hepatocytes. *Gann* 72:930-936
- Weinshilboum, R. M. (1986) Sulfate conjugation of neurotransmitters and drugs: an introduction. *Fed. Proc.* 45:2223-2228
- Weisburger, E. K., Weisburger, J. H. (1958) Chemistry, carcinogenicity and metabolism of 2-fluorenamine and related compounds. *Adv. Cancer Res.* 5:331-431
- Weisburger, J. H., Yamamoto, R. S., Williams, G. M., Grantham, P. H., Matsushima, T., Weisburger, E. K. (1972) On the sulfate ester of *N*-hydroxy-*N*-2-fluorenylacetamide as a key ultimate hepatocarcinogen in the rat. *Cancer Res.* 32:491-500
- Wibel, F. J., Singh, J., Schindler, E., Summer, K.-H. (1980) UDP-glucuronosyl-, phenol sulfo-, and glutathione-S-transferase activities of mammalian cells in permanent culture. *Toxicology* 17:123-126
- Wibel, F. J., Lambiotte, M., Singh, J., Summer, K.-H., Wolff, T. (1984) Expression of carcinogen-metabolizing enzymes in continuous cultures of mammalian cells. In: Greim, H. (ed.) *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis*, Raven Press, New York, 77-88
- Wilson, R. H., DeEds, F., Cox, A. J. (1941) The toxicity and carcinogenicity of 2-acetaminofluorene. *Cancer Res.* 1:595-608
- Wilson, V. L., Weston, A., Manchester, D. K., Trivers, G. E., Roberts, D. W., Kadlubar, F. F., Wild, C. P., Montesano, R., Willey, J. C., Mann, D. L. (1989) Alkyl and aryl

- carcinogen adducts detected in human peripheral lung. *Carcinogenesis* 10:2149-2153
- Windmill, K. F., McKinnon, R. A., Zhu, X. Y., Gaedigk, A., Grant, D. M., McManus, M. E. (1997) The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutation Res.* 376:153-160
- Windmill, K. F., Gaedigk, A., Hall, P. D. M., Samaratunga, H., Grant, D. M., Mc Manus, M. E. (2000) Localization of *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol. Sci.* 54:19-29
- Wohlleb, J. C., Hunter, C. F., Blass, B., Kadlubar, F. F., Chu, D. Z., Lang, N. P. (1990) Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer: environmental and demographic associations. *Int. J. Cancer* 46:22-30
- Wölfel, C., Heinrich-Hirsch, B., Schulz-Schalge, T., Seidel, A., Frank, H., Ramp, U., Wächter, F., Wiebel, F. J., Gonzalez, F., Greim, H., Doehmer, J. (1992) Genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of human cytochrome P450IA2. *Eur. J. Pharmacol.* 228:95-102
- Wu, R. W. (2000) Genetically modified Chinese hamster ovary cells for investigating sulfotransferase-mediated cytotoxicity and mutation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:57-65
- Xiangrong, L., Jöhnk, C., Hartmann, D., Schestag, F., Krömer, W., Gieselmann, V. (2000) Enzymatic properties, tissue-specific expression, and lysosomal location of two highly homologous rat SULT1C2 sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:242-250
- Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S., Kato, R. (1994) Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem.-Biol. Interact.* 92:107-117
- Yanagawa, Y., Sawada, M., Deguchi, T., Gonzalez, F. J., Kamataki, T. (1994) Stable expression of human CYP1A2 and *N*-acetyltransferases in Chinese hamster CHL cells: mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Cancer Res.* 54:3422-3427
- Yoshinari, K., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y. (1998) Molecular characterization of ST1C1-related human sulfotransferase. *Carcinogenesis* 19:951-953
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. (1988) *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 11:1-157
- Zenser, T. V., Lakshmi, V. M., Davis, B. B. (1999) Human and *Escherichia coli* β -glucuronidase hydrolysis of glucuronide conjugates of benzidine and 4-aminobiphenyl, and their hydroxy metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 27:1064-1067

- Zheng, W., Xie, D., Cerhan, J. R., Sellers, T. A., Wen, W., Folsom, A. R. (2001) Sulfotransferase *1A1* polymorphism, endogenous estrogen exposure, well-done meat intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10:89-94
- Zhu, X., Veronese, M. E., Iocco, P., McManus, M. E. (1996) cDNA cloning and expression of a new form of human aryl sulfotransferase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:565-571.
- Zhuo, Z., Casciano, D. A., Heglich, R. H. (1986) Use of the human liver cell line Hep G2 in a modified *Salmonella* reversion assay. *Cancer Lett.* 32:327-334
- Zimmermann, F. K., Borstel, R. C., von Halle, E. S., Perry, J. M., Zetterberg, G., Siebert, D., Barale, R., Loprieno, N. (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevesiae*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 133:199-244

G Anhang

1. Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| aAA | aromatische Amine und Amide |
| 2-AAF | 2-Acetylaminofluoren |
| AB | 4-Aminoazobenzol |
| bp | Basenpaare |
| BP-7,8-diol | Benzo[a]pyren- <i>trans</i> -7,8-dihydrodiol |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CA | Chromosomenaberrationen |
| CHO-Zellen | Zelllinie aus dem Ovar eines Chinesischen Hamsters |
| cpm | Zählwerte pro Minute |
| CYP | Cytochrom P450 |
| Da | Dalton |
| DAB | 4-Dimethylaminoazobenzol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| FKS | fötales Kälberserum |
| HAA | heterozyklische aromatische Amine |
| HAT-Medium | Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium |
| 1-HEP | 1-Hydroxyethylpyren |
| 1-HMP | 1-Hydroxymethylpyren |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase |
| HPRT-Test | Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Genmutationstest |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| kb | Kilobasen |
| K_m | Michaelis-Menten-Konstante |
| LB | Luria Broth |
| MAB | 4-Methylaminoazobenzol |
| 3'-M-DAB | 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol |
| MF | Mutantenfrequenz |
| NAT | N-Acetyltransferase |

| | |
|----------|--|
| N-OH-AAF | N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren |
| OECD | Organisation for Economic Co-Operation and Development |
| PAPS | 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| S9 | Überstand der 9000 x g-Zentrifugation von Organhomogenat |
| SCE | Schwesterchromatidaustausch |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SE | Standardfehler |
| SULT | Sulfotransferase(n) |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®20 |
| 2,4-TDA | 2,4-Diaminotoluol |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UDS | außerplanmäßige DNA-Synthese |
| v/v | Volumenanteile |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

2. Veröffentlichungen

2.1 Artikel in Fachzeitschriften

- Andrae, U., Kreis, P., Coughtrie, M. W. H., Pabel, U., Meinl, W., Bartsch, I., Glatt, H. R. (1999) Activation of propane 2-nitronate to a genotoxicant in V79-derived cell lines engineered for the expression of rat hepatic sulfotransferases. *Mutation Res.* 439:191-197
- Arlt, V. M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H. (2002) Metabolic activation of the environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* 23:1937-1945
- Arlt, V. M., Glatt, H. R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Seidel, A., Frank, H., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H. (2003) Activation of 3-Nitrobenzanthrone and its metabolites by human acetyltransferases, sulfotransferases and cytochrome P450 expressed in Chinese Hamster V79 cells. *Int. J. Cancer.* 105:583-592
- Engst, W., Pabel, U., Glatt, H. R. (2002) Conjugation of 4-nitrophenol and 4-hydroxylonazolac in V79-derived cells expressing individual forms of human sulphotransferases. *Environ. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 11:243-250
- Glatt, H. R., Bartsch, I., Christoph, S., Coughtrie, M. W. H., Falany, C. N., Hagen, M., Landsiedel, R., Pabel, U., Phillips, D. H., Seidel, A., Yamazoe, Y. (1998) Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem.-Biol. Interact.* 109:195-219
- Glatt, H. R., Boeing, H., Engelke, C. E. H., Kuhlow, L. M. A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., Meinl, W. (2001) Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Res.* 482:27-40
- Glatt, H. R., Engelke, C. E. H., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W. H., Andrae, U., Falany, C. N., Meinl, W. (2000) Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112-113:341-348
- Glatt, H. R., Pabel, U., Muckel, E., Meinl, W. (2002) Activation of polycyclic aromatic compounds by cDNA-expressed phase I and phase II enzymes. *Polycyclic Aromat. Compds.*, 22:955-967
- Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C. N., Glatt, H. R. (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
- Kester, M. H. A., van Dijk, C. H., Tibboel, D., Hood, A. M., Rose, N. J. M., Meinl, W., Pabel, U., Glatt, H. R., Falany, C. N., Coughtrie, M. W. H., Visser, T. J. (1999) Sulfation of

thyroid hormone by estrogen sulfotransferase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2577-2580

Kreis, P., Brandner, S., Coughtrie, M. W. H., Pabel, U., Meinl, W., Glatt, H. R., Andrae, U. (2000) Human phenol sulfotransferases hP-PST and hM-PST activate propane 2-nitronate to a genotoxicant. *Carcinogenesis* 21:295-299

Landsiedel, R., Pabel, U., Engst, W., Ploschke, J., Seidel, A., Glatt, H. R. (1998) Chiral inversion of 1-hydroxyethylpyrene enantiomers mediated by enantioselective sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:181-185.

2.2 Abstracts von Tagungsbeiträgen

Glatt, H. R., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Meinl, W. Sulfotransferases: genetics and toxicology. *37th European Congress of Toxicology-Eurotox '99*, Oslo (1999). In: *Toxicol. Lett.* 109 (Suppl. 1), 12

Glatt, H.R., Pabel, U., Meinl, W., Coughtrie, M. W. H., Sabbioni, G., Falany, C.N. Human phenolsulfotransferase forms potent mutagens from metabolites of 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT) and 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) (1999). In: *Toxicologist* 48:125

Glatt, H. R., Pabel, U., Teubner, W., Muckel, E., Coughtrie, M. W., Falany, C. N., Meinl, W. Toxication of xenobiotics by sulfotransferases. *European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics*, Budapest (1999). In: *ISSX Proceedings* 14, 1

Glatt, H. R., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Teubner, W., Meinl, W., Muckel, E. Involvement of phase-II enzymes in the activation of dietary carcinogens. *International Congress on Dietary Factors, Cancer Causes and Prevention*, Wien (2001)

Meinl, W., Teubner, W., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Seidel, A., Falany, C. N., Glatt, H. R. Expression of 16 human and rat sulfotransferases in *Salmonella typhimurium* TA1538. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz (1999). In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, R173

Pabel, U., Muckel, E., Meinl, W., Doehmer, J., Glatt, H. R. Co-expression of human cytochrome P450 1A2 with human conjugating enzymes in Chinese hamster V79 cells for mutagenicity testing of aromatic amines. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie* (1999). In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, R174

Pabel, U., Muckel, E., Glatt, H. R. Mutagenicity of heterocyclic aromatic amines in V79-cells engineered for co-expression of human cytochrome P450 and individual

phase-II enzymes. *Second International Workshop on Analytical, Chemical, and Biological Relevance of Heterocyclic Aromatic Amines*, Graz (2003)

Teubner, W., Pabel, U., Meinel, W., Coughtrie, M. W. H., Falany, C. N., Kretzschmar, M., Seidel, A., Glatt, H. R. Characterisation of sulfotransferases in human colon mucosa and their expression in *Salmonella typhimurium* for the study of the activation of promutagens. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz (1998). In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, R135

3. Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke, in der Abteilung Ernährungstoxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. R. Glatt.

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