

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

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

vorgelegt von  
**Wera Teubner**  
aus Berlin

Potsdam 2001

And experiments with Hex, the university's thinking machine, had found that, indeed, many things are not impossible until they have been tried.

aus „The last continent“ von Terry Pratchett

1. Gutachter: Prof. Dr. H. R. Glatt
  2. Gutachter: Prof. Dr. P. Steinberg
  3. Gutachter: PD Dr. M. Arand
- Tag der Disputation: 18. 5. 2001

## **Inhaltsverzeichnis**

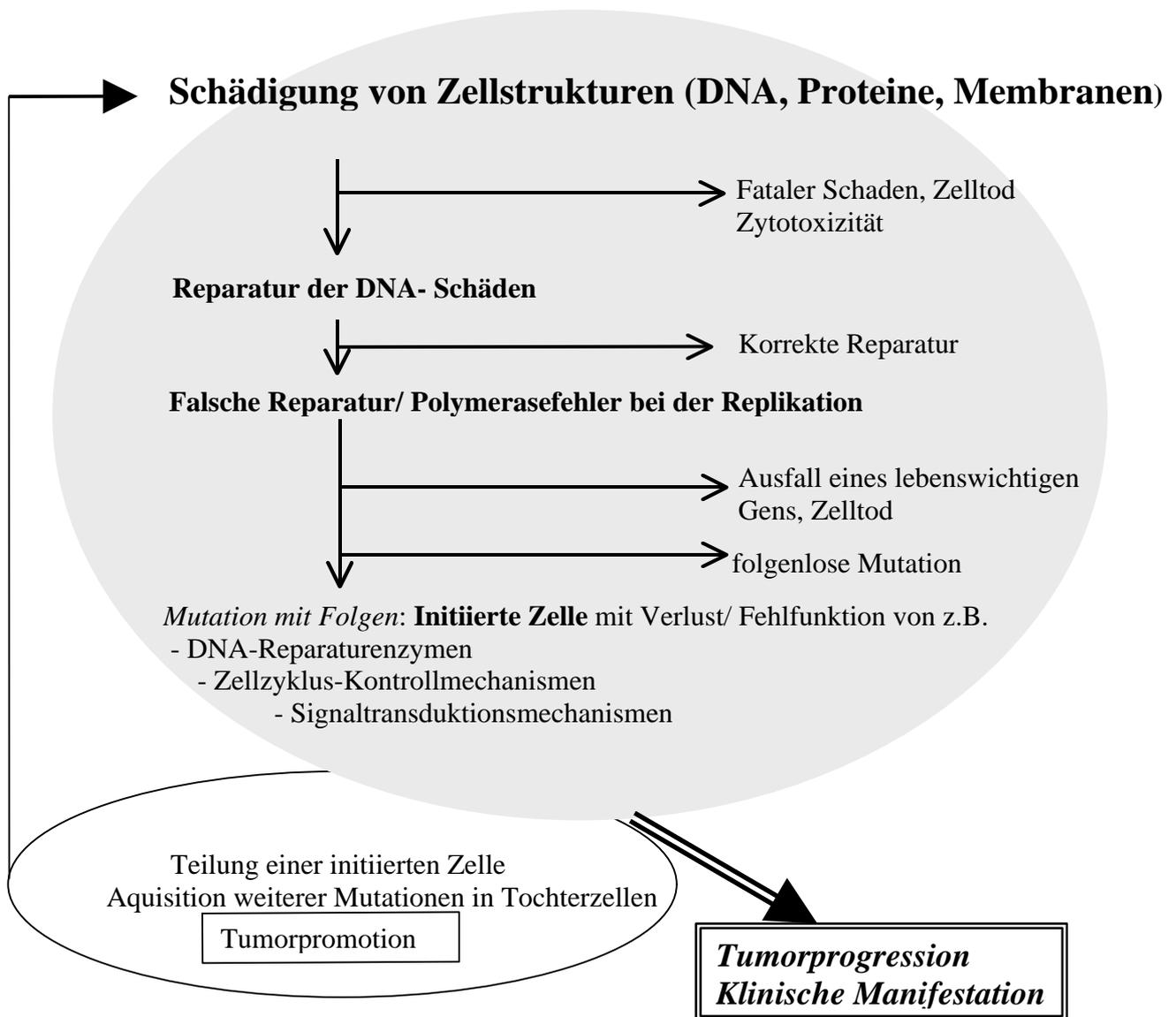
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fremdstoffmetabolismus und Mutagenese</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Enzymatische Sulfonierung</b>	
1.2.1 Sulfotransferasen	3
1.2.2 Mutagenitätstests zur Erfassung der metabolischen Aktivierung durch Sulfotransferasen	8
<b>1.3 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme und Darmkrebs</b>	<b>9</b>
1.3.1 Inzidenz von Darmkrebs	9
1.3.2 Aufnahme und Zufuhr von Fremdstoffen	9
1.3.3 Kolonkanzerogene	10
1.3.4 Ausstattung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen	12
<b>1.4 Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kulturmedien	18
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1 Allgemeine Methoden	24
2.2.2 Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA	25
2.2.4 DNA-Sequenzierung	25
2.2.5 Elektrophorese von Nukleinsäuren	26
2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.7 Nachweis von h1B1- und h1C1-mRNA durch RT-PCR	27
2.2.8 Konstruktion von pMP-h1B1	28
2.2.9 Konstruktion von pET-SULT	29
2.2.10 Bestimmung des h1A1 Polymorphismus	30
<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden</b>	
2.3.1 Präparation von subzellulären Fraktionen	30
2.3.2 Zytosol aus Bakterien	31
2.3.3 Proteinbestimmung	31
2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.5 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen durch Coomassie-Färbung	32
2.3.6 Western Blotting und Immundetektion von Sulfotransferasen	32
2.3.7 Sulfotransferase-Aktivitätsmessungen	33
2.3.8 Überexpression von SULT	35
2.3.9 Depletion von Antiseren mit SULT-Sepharose	36

<b>2.4 Zellbiologische Methoden</b>	<b>38</b>
2.4.1 Allgemeine Methoden	38
2.4.3 Herstellung der Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und -/B	39
2.4.4 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit	40
2.4.5 Bestimmung der SULT-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer	41
2.4.6. Überprüfung der Stabilität der Sulfotransferase-Expression	41
2.4.7 Anzucht und Fixieren von Zellen für die Immunfärbung	41
<b>2.5 Immunhistochemie</b>	<b>42</b>
2.5.1 Vorbereitung der Proben	42
2.5.2 Immunfärbung	43
2.5.3 Mikroskopie und Mikrophotographie	44
<b>2.6. Toxikologische Testmethoden</b>	<b>45</b>
2.6.1. Salmonella Mutagenitätstest	45
2.6.2 HPRT-Genmutationstest mit V79-1B1- und V79p-Zellen	45
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt des Menschen</b>	<b>47</b>
3.1.1 Identifizierung	47
3.1.2 Expression von Sulfotransferasen in verschiedenen Individuen	54
3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von SULT im Colon und Ileum des Mensch	59
<b>3.2. Identifikation von Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt der Ratte</b>	<b>71</b>
<b>3.3 Heterologe Expression von SULT1B1 in Indikatorzellen für Mutagenitätstests</b>	<b>73</b>
3.3.1 TA1538-h1B1	74
3.3.2 V79-h1B1	74
3.3.3 V79-r1B1	77
3.3.4 Vergleich der Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und V79-r1B1/B	81
<b>3.4. Mutagenitäts- und Zytotoxizitätsuntersuchungen</b>	
3.4.1. Mutagenität benzylischer und allylischer Alkohole im Ames Test	83
3.4.3 Mutagenität und Zytotoxizität von 4-OH-CPC in V79-1B1	86
<b>4 Diskussion</b>	<b>88</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7 Abkürzungen</b>	<b>113</b>
<b>Danksagung</b>	<b>115</b>
<b>Anhang</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Fremdstoffmetabolismus und Mutagenese

Durch das fremdstoffmetabolisierende System soll möglichst jeder beliebige Fremdstoff in eine inaktive, wasserlösliche und gut ausscheidbare Form überführt werden. Diese Biotransformation wird in zwei Phasen unterteilt: In der ersten Phase wird eine funktionelle Gruppe neu eingeführt oder eine vorhandene zugänglich gemacht. Diese wird in der zweiten Phase mit einer die Wasserlöslichkeit erhöhenden, polaren Gruppe konjugiert. Gelegentlich wird als dritte Phase der aktive Transport der Konjugate bezeichnet, welche je nach Größe mit dem Harn oder der Galle ausgeschieden werden. Die chemischen Modifikationen des Fremdstoffmetabolismus finden sich im endogenen Stoffwechsel wieder, und die sie katalysierenden Enzyme sind miteinander verwandt. Während Enzyme des endogenen Stoffwechsels auf ein oder wenige Substrate optimiert sind, haben fremdstoffmetabolisierende Enzyme eine sehr breite Substratspezifität, was der enorm großen Anzahl an Fremdstoffen und den vergleichsweise wenigen Varianten an Phase-I und Phase-II Biotransformationen und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen entspricht. Dies bedingt, daß in seltenen Fällen eine bestimmte Biotransformation ungeeignet ist, einen Fremdstoff zu inaktivieren: So ist z.B. das nur noch selten verabreichte Antihypertonikum Minoxidil erst nach Metabolisierung zum Sulfatkonjugat pharmakologisch aktiv. Gefährliche Ausnahmen sind die Fremdstoffe, deren Metabolite instabil und kurzlebig sind, mit Molekülen in ihrem Umfeld reagieren und somit zytotoxisch oder mutagen wirken können. Hat solch ein reaktiver Metabolit ein elektrophiles Zentrum, so ist Wasser der naheliegende Reaktionspartner, jedoch kann auch eine Reaktion mit DNA, Proteinen oder Membranlipiden stattfinden. Der Schaden an zellulären Strukturen kann zum Zelltod führen, was je nach Funktion und Anzahl der betroffenen Zellen Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat: Stirbt aufgrund einer neurotoxischen Substanz eine Nervenzelle, wird diese in der Regel nicht ersetzt, während abgestorbene Leberzellen nachgebildet werden. Manche Proteinaddukte können Immunreaktionen hervorrufen. Wird ein Schaden an der DNA bis zur folgenden Replikation nicht korrekt repariert, ist die Folge eine Mutation, die auf die Tochterzellen vererbt wird. Diese befindet sich im günstigen Fall an einer Position, an der sie keinen weiteren Einfluß auf das Geschehen in der Zelle hat. Im ungünstigen Fall ist sie jedoch in einer für die Tumorentstehung kritischen Sequenz lokalisiert, weshalb man diese Zellen als initiiert bezeichnet. Durch Akkumulation weiterer Mutationen und den Einfluß von Tumorpromotoren kommt es zur Tumorprogression (Abb. 1).



**Abbildung 1:** DNA-schädigende Substanzen verursachen Mutationen und verändern damit die Eigenschaften der betroffenen Zelle. Durch Akkumulation von Mutationen, die zu beschleunigtem Wachstum, Immortalität und fehlender Kontakthemmung führen, wird aus einer initiierten Zelle eine Tumorzelle. Dieser Prozess wird durch Substanzen mit promovierender Wirkung beschleunigt.

Bei der Aktivierung von Promutagenen durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme sind die folgenden drei Aspekte wichtig: Fremdstoffmetabolisierende Enzyme werden organ-, bzw. zelltypspezifisch exprimiert, wobei in vielen Fällen die Enzymmenge durch induzierende Substanzen reguliert wird. Da es meist mehrere Möglichkeiten der Metabolisierung gibt, beeinflusst die Enzyminduktion Menge und Art der Metaboliten. Des weiteren sind für viele fremdstoffmetabolisierende Enzyme genetische Polymorphismen bekannt, die sich auf Substratspezifität, Enzymaktivität, Stabilität oder Induzierbarkeit auswirken und auf diese Weise die Empfindlichkeit eines Individuums beeinflussen können. Die Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen und Krebserkrankungen ist das

Objekt vieler Untersuchungen (Brockmöller *et al.*, 1998; Kiss *et al.*, 2000; McWilliams *et al.*, 1995; Welfare *et al.*, 1999; Wormhoudt *et al.*, 1999). Es ist zu vermuten, daß sich die mutagene Wirkung von reaktiven Metaboliten auf die Zellen konzentriert, in denen die Bioaktivierung stattfindet. Inwieweit diese Mutation eine Gefährdung darstellt, hängt davon ab, wie gut die betroffene Zelle DNA-Schäden reparieren kann, wie stark sie proliferiert und wie lange sie lebt.

## 1.2 Enzymatische Sulfonierung

### 1.2.1 Sulfotransferasen

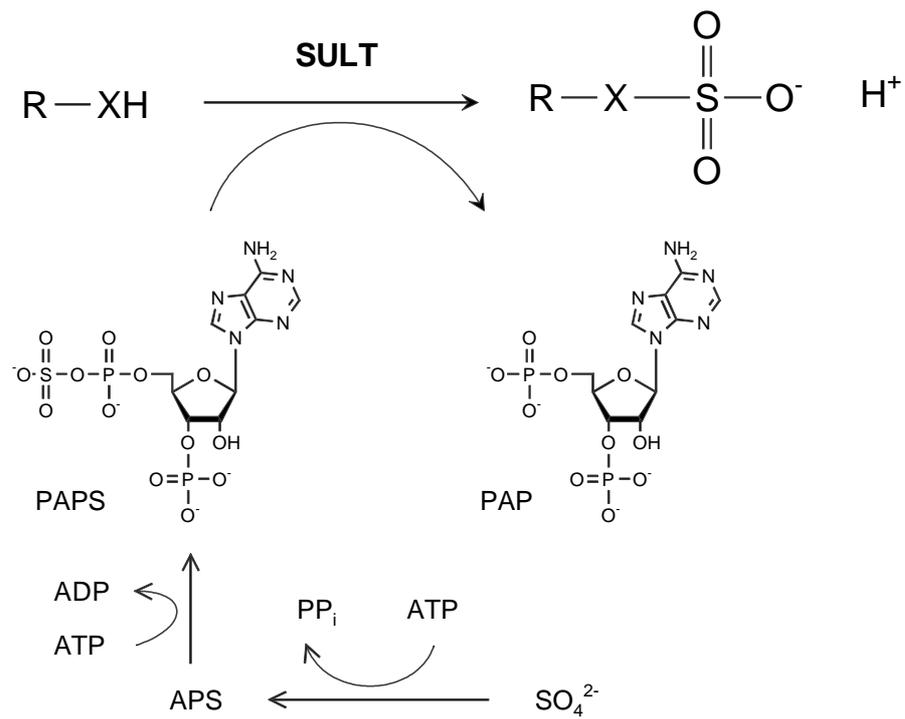
Sulfotransferasen (EC 2.8.2) katalysieren die Sulfonierung von Hydroxyl-, Amino-, Thiol- und N-Oxid-Gruppen von endogenen und exogenen Verbindungen unter Verwendung des Kosubstrats 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), welches dabei zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP) umgesetzt wird (Abb. 2). Substrate der zytosolischen Formen sind Hormone, Neurotransmitter und Fremdstoffe, während die mit dem Golgi-Apparat assoziierten Formen Zuckerreste von Glykoproteinen und Glykosaminglykanen sowie Tyrosinreste in Proteinen sulfonieren (Bowman and Bertozzi, 1999; Falany, 1997; Huttner, 1987). Die Bioaktivierung von benzyllischen Verbindungen durch enzymatische Sulfonierung wurde erstmals 1968 für das N-Hydroxyacetylaminofluoren (DeBaun *et al.*, 1968) beschrieben.

Für den Phase-II Fremdstoffmetabolismus und die Bildung reaktiver Sulfatester (Glatt, 1997) sind die im Zytosol lokalisierten Enzyme von Bedeutung. Diese bilden eine Superfamilie mit der 1996 eingeführten Bezeichnung „SULT“ (3<sup>rd</sup> International Sulphation Workshop in Drymen, Schottland). Es wurde ebenfalls eine systematische Nomenklatur in Anlehnung an die der Cytochrome P450 (Nelson *et al.*, 1996) geplant, bei der eine Einteilung in Familien und Subfamilien entsprechend der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen erfolgt und homologe Formen von Mensch und Ratte den gleichen Namen erhalten. Sie werden bei Bedarf durch das Präfix „h“ oder „r“ unterschieden. Diese Nomenklatur wird bislang hauptsächlich bei den humanen Formen angewendet (Tabelle 1); bei der Ratte ist noch die Nomenklatur nach Yamazoe weit verbreitet, die „ST“ als Bezeichnung für die Superfamilie verwendet und Formen einer Subfamilie unabhängig von der Spezies in Reihenfolge der Entdeckung mit Nummern versieht (Tabelle 2). Dementsprechend erhalten orthologen

Formen im Gegensatz zur SULT-Nomenklatur eine unterschiedliche Nummer. In dieser Arbeit werden, soweit es sie gibt, die Bezeichnungen der SULT-Nomenklatur verwendet.

In Vertebraten sind zur Zeit 5 SULT-Familien mit 44 verschiedenen Genen bekannt (Nagata and Yamazoe, 2000). Die meisten dieser Enzyme wurden als Homodimere aus Monomeren von 290 – 300 Aminosäuren mit je einer Substrat- und Kosubstratbindungsstelle nachgewiesen; aus der Leber der Ratte wurden auch Monomere (r1B1 (Sakakibara *et al.*, 1995) und r1E1 (Borthwick *et al.*, 1993)) und ein Heterodimer (Kiehlbauch *et al.*, 1995) isoliert. Die Expression ist vom Zell- und Gewebetyp sowie vom Entwicklungsstadium abhängig (Dunn *et al.*, 1999; Dunn and Klaassen, 1998; Homma *et al.*, 1992; Runge-Morris, 1997). Für einige Formen und Gewebe wurde eine Regulation durch Hormone beschrieben (Falany *et al.*, 1998; McAllister and Hornsby, 1988; Schauss *et al.*, 1995).

Das Expressionsmuster und die Substratspezifitäten unterscheiden sich z.T. deutlich zwischen verschiedenen Spezies. Bei der Ratte ist die Expression in der Leber geschlechtsabhängig (Tabelle 2), während beim Menschen in nur wenigen Fällen geringfügige Unterschiede gefunden wurden (Britelli *et al.*, 1999; Pacifici *et al.*, 1997a; Pacifici *et al.*, 1997b). Außerdem werden in der Ratte alle bekannten Formen mit Ausnahme der r1C2 (Tabelle 2) und einer spezifisch im Gehirn exprimierten Form, deren Funktion und Substrate man noch nicht kennt (Falany *et al.*, 2000), hauptsächlich in der Leber exprimiert. Im Gegensatz dazu konnten beim Menschen mehrere Formen (h1A3, h1C1, h1C2 und h2B1) in der Leber nicht oder fast nicht nachgewiesen werden (Tabelle 1). Aus der Leber des Kaninchens als bislang einziger Säuger-Spezies wurde die für Alkylamine selektive Form rb3A1 kloniert (Yoshinari *et al.*, 1998).



**Abbildung 2: Reaktion der Sulfotransferasen (SULT) und Neubildung des Kosubstrats 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) aus Sulfat und ATP**

Die Substrate tragen an der Position X Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel; als Grundgerüst R kommen Aryl-, Alkyl- und Aralkylreste vor.

**Tabelle 1: Fremdstoffmetabolisierende SULT des Menschen<sup>a</sup>**

systematische Bezeichnung	ST-Nomenklatur und andere Bezeichnungen	Gewebe	Substrate
SULT1A1 <sup>b</sup>	ST1A3, Phenol-sulfatierende Phenol-SULT (P-PST; P-PST-I), thermostabile Phenol-SULT (TS-PST)	Leber >> Blutplättchen, Darm, Hoden, Endometrium, Lunge, Gehirn	Phenol, p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol, Minoxidil, Paracetamol
SULT1A2 <sup>b</sup>	ST1A2, P-PST-II, Aryl-SULT (HAST4)	mRNA in der Leber (Zhu <i>et al.</i> , 1996)	p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol
SULT 1A3	ST1A5, Monoamin-sulfatierende Phenol-SULT (M-PST) Thermolabile Phenol-SULT (TL-PST), HAST3, STM, HAST5	Jejunum, Gehirn > Thrombozyten >> Leber	Dopamin, Adrenalin, Vanillin, Serotonin, p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol, Paracetamol, Triiodthyronin
SULT1B1	ST1B2 Schilddrüsenhormon-ST <sup>c</sup>	Leber, Darm, Milz, Leukozyten (Wang <i>et al.</i> , 1998)	p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol, Vanillin, Triiodthyronine
SULT1C1	ST1C2 Hydroxyarylamino-ST	mRNA in Niere, Magen, Schilddrüse (Her <i>et al.</i> , 1997)	p-Nitrophenol, N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren
SULT1C2	ST1C3	mRNA in fötaler Niere und Lunge (Sakakibara <i>et al.</i> , 1998)	p-Nitrophenol, N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren
SULT1E1	ST1E4 Östrogen-SULT, hEST	Leber, Jejunum, Endometrium (Falany <i>et al.</i> , 1998)	17 $\beta$ -Östradiol, Östron, Pregnenolon, 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol, $\alpha$ -Naphthol, Phytoöstrogene
SULT2A1 <sup>b</sup>	ST2A3 Hydroxysteroid-SULT, hHST, DHEA-SULT, hST <sub>a</sub>	Nebenniere, Leber (Comer and Falany, 1992), Jejunum (Her <i>et al.</i> , 1996)	Dehydroepiandrosteron, Androsteron, Testosteron, Pregnenolon, Lithocholsäure, Cholesterol
SULT2B1a/b (Splicevarianten, mit unterschiedlichem Transkriptionsanfang)		mRNA in Prostata, Plazenta, Trachea (Her <i>et al.</i> , 1998)	Dehydroepiandrosteron
SULT4A1	ST5A2	Gehirn (Falany <i>et al.</i> , 2000)	unbekannt

<sup>a</sup> Soweit nicht anders vermerkt, stammen die Angaben aus den Übersichtsarbeiten von Falany (1997b) und Nagata und Yamazoe (2000).

<sup>b</sup> polymorph, <sup>c</sup>Unzweckmäßig, da andere Formen auch Schilddrüsenhormone umsetzen (Kester *et al.*, 1999)

**Tabelle 2: Fremdstoffmetabolisierende SULT der Ratte**

systematische Bezeichnung <sup>a</sup>	andere Bezeichnungen	Gewebe	Geschlechtsabhängigkeit der Expression	Substrate
SULT1A1 (ST1A1)	Phenol-SULT (rP-PST), Minoxidil-SULT (rMx-ST), ASTIV, PST-1	mRNA in männl. Leber (auch Protein), Hirn, Lunge, Herz, Darm, Niere, Nebenniere, Hoden, Milz <sup>b</sup> (Ozawa <i>et al.</i> , 1993)	M > W (Matsui and Watanabe, 1982)	p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol, $\beta$ -Östradiol, Minoxidil
SULT1B1 (ST1B1)	Dopa/Tyrosin-SULT (Sakakibara <i>et al.</i> , 1995)	Leber, Niere (Araki <i>et al.</i> , 1997), mRNA auch im Darm <sup>b</sup>	M = W <sup>b</sup>	p-Nitrophenol, $\alpha$ -Naphthol, L- und D-Dopa, Triiodthyronine (Sakakibara <i>et al.</i> , 1995)
SULT1C1 (ST1C1)	HAST-1 (Nagata <i>et al.</i> , 1993)	mRNA in Leber, Niere, Milz <sup>b</sup>	M >> W <sup>b</sup>	$\alpha$ -Naphthol, N-hydroxy-2-acetylaminofluoren
SULT1C2 (ST1C6)	rSULT1C2 (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000)	mRNA und Protein in Niere, Leber und Magen (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000)	unbekannt	p-Nitrophenol
- <sup>c</sup> (ST1C7)	rSULT1C2A (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000)	mRNA und Protein in Niere, Leber und Magen (Xiangrong <i>et al.</i> , 2000)	unbekannt	p-Nitrophenol
SULT1D1 (ST1D2)	Tyrosinester-SULT, (AAC99890; unveröffentlicht)	Niere	unbekannt	unbekannt
SULT1E1 (ST1E2)	Östrogen-SULT, EST-1 und -3	Leber, mRNA auch im männl. Herz <sup>b</sup>	M >> W (Demyan <i>et al.</i> , 1992)	17 $\beta$ -Östradiol, Östron, Pregnenolon, 17 $\alpha$ -Ethinyl-östradiol
SULT2A <sup>d</sup> (ST20, ST21)		Leber (Watabe <i>et al.</i> , 1994), mRNA auch Nebenniere <sup>b</sup>	M < W <sup>3</sup>	Gallensäuren, Hydroxysterioide
SULT2A <sup>d</sup> (ST40, ST41)	rST <sub>a</sub>	Leber (Ogura <i>et al.</i> , 1994)	M << W <sup>3</sup>	Gallensäuren, Hydroxysterioide
SULT2A <sup>d</sup> (ST60)		Leber (Watabe <i>et al.</i> , 1994), mRNA auch Nebenniere <sup>b</sup>	M << W <sup>3</sup>	Gallensäuren, Hydroxysterioide

<sup>a</sup> Da die SULT-Nomenklatur noch nicht in endgültiger Form vorliegt, wird zusätzlich die ST-Nomenklatur von Yamazoe (Nagata and Yamazoe, 2000) angegeben.

<sup>b</sup> (Dunn and Klaassen, 1998)

<sup>c</sup> kein Name bekannt, <sup>d</sup> Noch nicht weiter klassifizierte Formen der Subfamilie SULT2A

<sup>3</sup> (Runge-Morris and Wilusz, 1991)

### 1.2.2 Mutagenitätstests zur Erfassung der metabolischen Aktivierung durch Sulfotransferasen

Die Beteiligung von Sulfotransferasen an der metabolischen Aktivierung verschiedener benzyliischer Verbindungen wurde zunächst in bakteriellen Mutagenitätstests nachgewiesen, die in Gegenwart von mit PAPS angereichertem Leberhomogenat von Mensch und Ratte durchgeführt wurden (Glatt *et al.*, 1994d; Surh *et al.*, 1993). Anstelle des Leberhomogenats wurden daraufhin partiell gereinigte Sulfotransferasen eingesetzt, wodurch sich der Effekt auf einzelne Formen zurückführen ließ (Glatt *et al.*, 1995). Dies war besonders hilfreich, um die bei der Ratte beobachtete geschlechtsabhängige Aktivierung einiger Promutagene (Glatt *et al.*, 1994a) zu erklären. Dieser Ansatz erlaubt außerdem den Vergleich von homologen Formen verschiedener Spezies und hilft hierdurch bei der Interpretation von *in-vivo*-Daten aus Tierversuchen in Hinblick auf den Menschen.

Für die Untersuchung der metabolischen Aktivierung durch humane Enzyme fehlt es an gesundem Gewebe, das man in größerem Maßstab in bakteriellen Mutagenitätstests einsetzen könnte. Inwieweit eine Aktivierung durch Sulfotransferasen des Menschen erfolgt, kann daher besser mit rekombinanten Enzymen untersucht werden. Außerdem zeigen sich sowohl bei Proben von Menschen als auch von Ratten z.T. erhebliche Unterschiede zwischen Homogenaten verschiedener Präparationen.

Testsysteme mit externer metabolischer Aktivierung haben den Nachteil, daß die außerhalb der Zelle gebildeten reaktiven Metabolite aufgrund ihrer Kurzlebigkeit oder ihres ionischen Charakters möglicherweise nicht oder nur schlecht in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren und die DNA zu schädigen. Die reaktiven Metabolite reagieren zudem zunächst mit Komponenten des Kulturmediums. Der Einfluß des Kulturmediums wurde besonders auffällig bei der erhöhten Mutagenität von 1-Hydroxymethylpyren und 4-Hydroxycyclopenta[*def*]chrysen in KCl-haltigem Medium (Glatt *et al.*, 1993). Durch Reaktion mit Chloridionen wurde ein ungeladener und besser membrangängiger Metabolit gebildet (Glatt *et al.*, 1993; Glatt *et al.*, 1990).

In Systemen mit metabolisch kompetenten Indikatorzellen wird die Wechselwirkung zwischen reaktiven Metaboliten und Bestandteilen des Mediums unterbunden. Durch Konstruktion SULT-exprimierender Indikatorstämme für den Ames Test wurde die Möglichkeit geschaffen, einzelne Formen verschiedener Spezies mit erhöhter Sensitivität zu untersuchen (Glatt *et al.*, 1996).

Den physiologischen Bedingungen in humanen Zellen näher sind Säugerzellen als Indikatorzellen. Besonders häufig verwendet werden V79-Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters, CHO-Ovarzellen des Chinesischen Hamsters und L5178Y-

Lymphoblastomzellen der Maus. Diese Zelllinien sind für ihre kurze Populationsverdopplungszeit, den stabilen Karyotyp und die hohe Klonierungseffizienz bekannt, allerdings ist ihre metabolische Kapazität eingeschränkt (Glatt *et al.*, 1987). V79-Zellen exprimieren weder Sulfotransferasen noch mit ihnen um Substrate konkurrierende UDP-Glucuronyltransferasen (Glatt *et al.*, 1987) und eignen sich daher für die heterologe Expression dieser Enzyme. Eine die Hydroxysteroid-SULT der Ratte (rST<sub>a</sub>) exprimierende Zelllinie wurde bereits beschrieben und erfolgreich in Mutagenitätsexperimenten angewendet (Czich *et al.*, 1994; Glatt *et al.*, 1994c)

### 1.3 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme und Darmkrebs

#### 1.3.1 Inzidenz von Darmkrebs

Betrachtet man die Organe, die in Deutschland am häufigsten von Krebs betroffen sind, so sind dies bei Männern Lunge und Prostata und bei Frauen die Brustdrüse, gefolgt vom Dickdarm (Colon und Rektum) bei beiden Geschlechtern (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 1999). Bei der Mortalitätsrate gilt die gleiche Reihenfolge, außer daß sich das Kolorektalkarzinom hier auch bei Männern an zweiter Position befindet. Dickdarmkrebs ist somit die häufigste Krebserkrankung, an der Männer und Frauen gleichermaßen erkranken und auch sterben.

#### 1.3.2 Aufnahme und Zufuhr von Fremdstoffen

Fremdstoffe gelangen über die Speiseröhre in den Gastrointestinaltrakt oder werden durch die Mikroflora im Dickdarm gebildet. Außerdem gelangen in gewissem Umfang eingeatmete Partikel, die durch die Zilien des Epithels der Atemwege soweit herausbewegt werden, daß sie verschluckt werden, in den Darm. Zusätzlich werden Stoffwechselprodukte der Leber, zu denen u.a. Fremdstoffkonjugate zählen, mit der Galle in das Duodenum geleitet. Die Konjugate können im Dickdarm durch bakterielle Enzyme hydrolysiert werden, ebenso wie Pflanzenglykoside, die im allgemeinen als solche weder gut resorbiert noch durch die menschlichen Enzyme metabolisiert werden. Obwohl die Resorption von Nährstoffen im Dünndarm stattfindet und dem Colon hauptsächlich die Funktion der Rückgewinnung von Wasser und Elektrolyten zukommt, gelangen hier die durch die Mikroflora in nicht unerheblichen Mengen gebildeten Vitamine K, B12, Thiamin und Riboflavin in den

Organismus. Für alle im Darmlumen befindlichen Stoffe stellt die Darmmukosa nicht nur eine physische Barriere sondern auch eine „metabolische“ dar. Da die aktiv oder passiv in das Epithel aufgenommenen Substanzen potentiell eine biologische Wirkung haben könnten und weiter transportiert werden müssen, finden in der Mukosa Biotransformationsreaktionen statt.

### 1.3.3 Kolonkanzerogene

Obwohl Dickdarmkrebs neben dem Lungen- und dem Brustkrebs die häufigste Krebsart in den westlichen Ländern ist, ist die Frage nach den Substanzen, die genetische Veränderungen beim Dickdarmkrebs des Menschen verursachen, ungeklärt. Zur Beantwortung dieser Frage tragen tierexperimentelle Befunde erstaunlich wenig bei, denn es sind nur wenige Substanzen mit kolonkanzerogener Wirkung bekannt. Der Großteil von ihnen kommt zudem entweder nicht in der Natur vor oder ist nicht Bestandteil der menschlichen Nahrung. Es handelt sich hierbei zunächst um Nitrosoharnstoffderivate wie N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff, die als direkte Kanzerogene ohne metabolische Aktivierung alkylierend wirken und instilliert werden müssen. Des Weiteren verursachen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH), Azoxymethan (AOM) und Methylazoxymethanol (MAM) nach Injektion Colontumore. Das gleiche gilt für einige aromatische Amine, wobei zusätzlich Tumore in Leber und Niere auftreten. DMH, AOM und die aromatischen Amine entfalten ihre mutagene Wirkung erst nach metabolischer Aktivierung. Dies ist insofern bedeutsam, als daß es die Beteiligung von Biotransformationsreaktionen bei der Entstehung des Kolonkarzinoms zeigt. AOM und DMH werden durch Monooxygenasen zu MAM metabolisiert, das spontan unter Bildung eines reaktiven Methylkations zerfällt. Im Fall der aromatischen Amine entstehen durch enzymatische Hydroxylierung der primären Aminogruppe N-Hydroxyderivate, die Substrate für N-Acetyltransferasen (NAT) und SULT sein können (Yamazoe *et al.*, 1993). Da 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl in Ratten und Hamstern mit schnellem Acetylierer-Phänotyp eine höhere Anzahl Foci abberanter Krypten in Rektum und Colon verursacht als in Tieren mit dem langsamen Acetylierer-Phänotyp, wird die metabolische Aktivierung dieses aromatischen Amins *in vivo* auf die N-Acetyltransferasen zurückgeführt (Feng *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1996). Für das N-Hydroxyderivat von 4-Aminobiphenyl wurde *in vitro* eine Aktivierung durch mit PAPS angereichertes humanes Gewebehomogenat aus Leber und Colon beobachtet (Chou *et al.*, 1995). Ein Beispiel dafür, daß auch die Mikroflora an der Bioaktivierung beteiligt sein kann, ist das in der Cycadnuß vorkommende Cycasin (Laqueur and Spatz, 1968), bei dem es sich um das  $\beta$ -Glycosid des MAM handelt. Die Spaltung der

glycosidischen Bindung durch die Darmbakterien ist für die kanzerogene Wirkung essentiell, da Cycasin nur in konventionell, nicht jedoch in keimfrei gehaltenen Ratten Kolontumore verursacht (Laqueur, 1965).

Tatsächlich in der Natur vorkommende und mit der Nahrung aufgenommene Substanzen mit kolonkanzerogener Wirkung im Tierversuch sind das 1-Hydroxyanthrachinon (Mori *et al.*, 1992) und die heterozyklischen aromatischen Amine (HAA) (Nagao, 1999). 1-Hydroxyanthrachinon wurde in manchen Heilpflanzen gefunden und ist genotoxisch (Tanaka *et al.*, 2000). Im Hinblick auf den Menschen und die Aktivierung durch SULT ist die Substanzgruppe der HAA interessanter. HAA werden in der Literatur auch als „Cooked Food Mutagens“ bezeichnet, da sie beim Erhitzen von Fleisch gebildet werden. Die meisten dieser Verbindungen verursachen in mehreren Organen Tumore (Sugimura, 1997; Sugimura, 2000), allerdings waren in bisherigen Versuchen die verfütterten Mengen ein Vielfaches von dem, was vom Menschen mit der Nahrung verzehrt wird. Kolontumore traten nach Gabe von 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol (Glu-P-1), 2-Aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol (Glu-P-2), 2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-*f*]quinoxalin (MeIQx), 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ) und 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) auf, wobei letzteres in den männlichen Ratten Kolon-, in den weiblichen jedoch Mammatumore auslöst (Ito *et al.*, 1991). Wie anhand von *in vitro* Studien gezeigt wurde, erfordert die metabolische Aktivierung von HAA zunächst die N-Hydroxylierung der primären Aminogruppe, katalysiert durch CYP1A2 (Turesky *et al.*, 1991), CYP1B1 (Crofts *et al.*, 1997) und eventuell auch CYP1A1 (Crofts *et al.*, 1998). Das N-Hydroxyderivat kann im folgenden durch SULT (r1A1 (Ozawa *et al.*, 1995), h1A1 (Wu *et al.*, 2000), r1E1 (Lewis *et al.*, 1998)) oder NAT (Hein *et al.*, 1994; Turesky *et al.*, 1991) zu reaktiven Estern umgesetzt werden. Der erste Schritt der Aktivierung wurde auch durch die PGHS beschrieben (Flammang *et al.*, 1989; Wild and Degen, 1987).

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß auch von der Mikroflora Substanzen mit genotoxischer Wirkung produziert werden. Hierbei handelt es sich um unter aeroben Bedingungen instabile Lipidether, die als Fecapentaene bezeichnet werden (Gupta *et al.*, 1984; Hirai *et al.*, 1982). Die mutagene Wirkung wird sowohl auf die alkylierenden Eigenschaften (Gupta *et al.*, 1984) als auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Oxidation durch die Prostaglandin H Synthase (de Kok *et al.*, 1994; Plummer *et al.*, 1995) zurückgeführt. Jedoch wurde im Tierexperiment keine kanzerogene Wirkung festgestellt (Weisburger *et al.*, 1990), auch wenn später tumorpromovierende Eigenschaften beschrieben wurden (Zarkovic *et al.*, 1993). Ob und in welcher Beziehung Fecapentaene im

Zusammenhang mit Dickdarmkrebs stehen, ist nicht geklärt. Sie sind ein Beispiel dafür, daß ein *in vitro* beobachteter mutagener Effekt nicht zwingend zu einer kanzerogenen Wirkung *in vivo* führt.

Zusammenfassend ergibt sich, daß Phase-I-Metabolite von Substanzen, die im Tierversuch Kolonkrebs verursachen, in *in-vitro*-Testsystemen durch SULT und NAT zu mutagenen Verbindungen umgesetzt werden. Das Ausmaß der durch aromatische Amine oder HAA verursachten Primärläsionen im Darm, wie z.B. die Bildung von DNA-Addukten oder Foci abberanter Krypten (Feng *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1996; Steffensen *et al.*, 2000), wird durch den NAT-Phänotyp beeinflusst. Daher könnte die *in vitro* gezeigte Mutagenität auch *in vivo* von Bedeutung sein.

Inwieweit der Verzehr von gebratenem Fleisch und anderer HAA-haltiger Nahrung oder der NAT-Phänotyp für den Menschen ein Darmkrebsrisiko darstellen, ist unklar. Aus den ersten epidemiologischen Studien wurde gefolgert, daß reichhaltiger Verzehr von rotem Fleisch und schneller Acetylierer-Phänotyp das Darmkrebsrisiko erhöhen (Giovannucci *et al.*, 1994; Ilett *et al.*, 1987). In jüngeren Arbeiten konnte dies nicht bestätigt werden (Augustsson *et al.*, 1999; Brockton *et al.*, 2000; Kampman *et al.*, 1999), oder es wurde lediglich bei Kombination von NAT-Status und Fleischkonsum bei Männern ab einem Alter von 60 Jahren ein Effekt gefunden (Chen *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie wurde eine Erhöhung des Darmkrebsrisikos für Personen gezeigt, die sowohl für CYP1A2 als auch für NAT den Phänotyp des schnellen Metabolisierers haben und viel HAA verzehren (Lang *et al.*, 1994).

#### 1.3.4 Ausstattung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen

Da die Leber als das zentrale Organ des Fremdstoffmetabolismus gilt, wurde der Ausstattung anderer Organe wie dem Gastrointestinaltrakt weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Häufig findet sich in Publikationen nur die Angabe „Intestinum“ ohne Unterscheidung der einzelnen Darmabschnitte. Von gesundem Gewebe des Menschen gibt es aufgrund des limitierenden Probenmaterials nur wenige Daten. Jedoch wurden Proteine oder mRNA der meisten am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzymfamilien nachgewiesen, (Tabelle 3). Zum Teil handelt es sich um Formen, die nicht oder nur wenig in der Leber exprimiert werden. Hieraus wird ersichtlich, daß der Darm über ein eigenständiges fremdstoffmetabolisierendes System verfügt. Dessen Kapazität wurde für das Colon als „kritisch niedrig“ gegenüber dem Dünndarm bezeichnet (Peters *et al.*, 1991). Der intestinale First-Pass Effekt kann jedoch bei einigen Verbindungen erheblich sein, im Fall von

Ethinylöstradiol und Cyclosporin A wurden mehr als 40 % der Substanzen in metabolisierter Form im Pfortaderblut gefunden (Back *et al.*, 1990; Kolars *et al.*, 1991).

Bei Fütterungsversuchen mit Ratten wurde beobachtet, daß verschiedene Enzyme, u.a. Glutathiontransferasen (Patel *et al.*, 1998; Sattar *et al.*, 1999; van Lieshout *et al.*, 1998; van Lieshout *et al.*, 1996), Prostaglandin-H-Synthetase (Rao *et al.*, 1995), Cytochrom-P450-Reduktase (Baijal *et al.*, 1997; Baijal *et al.*, 1998) sowie Cytochrome P450 (CYP1A1 (Larsen-Su and Williams, 1996; Rosenberg, 1991; Traber *et al.*, 1992; Vang *et al.*, 1990), CYP1A2 (Xu *et al.*, 1997), CYP2E1 und CYP2C7 (Hakkak *et al.*, 1996)) im Dickdarm induziert werden können. Im Fall des Menschen wurden Untersuchungen zur Induktion im Darm an Kulturen humaner Kolonkarzinom-Zelllinien und auch an Patienten, denen aufgrund eines hohen Darmkrebsrisikos Biopsien entnommen werden mußten, durchgeführt: Gezeigt wurde die Induzierbarkeit von CYP1A1 und CYP1A2 (Fontana *et al.*, 1999), UGT1A6, UGT1A9 und UGT2B7 (Munzel *et al.*, 1999) sowie GSTM1-1 (Odwyer *et al.*, 1996). Die Induzierbarkeit der einzelnen Formen in Darm und Leber kann unterschiedlich sein; wie z.B. beobachtet in der Ratte bei den Glutathion-S-Transferasen (Catania *et al.*, 1998) und CYP2C7 (Hakkak *et al.*, 1996).

**Tabelle 3: Fremdstoffmetabolisierende Enzyme im Darm des Menschen<sup>a</sup>**

Superfamilie	Form	toxikologisch oder pharmakologisch relevante Substrate	Lokalisation
CYP	1A1	B[a]P, AA (hauptsächlich Ringoxidation)	Im Dünndarm vorhanden (Zhang <i>et al.</i> , 1999) und induzierbar (Fontana <i>et al.</i> , 1999); mRNA in Colon und Rektum (Mercurio <i>et al.</i> , 1995)
	1A2	Theophyllin, AA (N-Oxidation), $\beta$ -Naphthylamin	Leber, nicht Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992), mRNA in Colon und Rektum (Mercurio <i>et al.</i> , 1995)
	1B1	diverse PAH und HAA (Shimada <i>et al.</i> , 1996) 17 $\beta$ -Östradiol (Shimada <i>et al.</i> , 1999)	Im Tumor, nicht im normalen Colon (Murray <i>et al.</i> , 1997), mRNA, nicht aber Protein im Dünndarm (Zhang <i>et al.</i> , 1999)
	2B6	<b>Benzyloxoresorufin</b>	Leber und Intestinum (Gervot <i>et al.</i> , 1999)
	2C	Tolbutamid, Hexobarbital, NSAID	Dünndarm (Zhang <i>et al.</i> , 1999)
	2D6	Debrisoquin, Spartein und zahlreiche andere Arzneimittel	Duodenum, Jejunum und Ileum, aber viel weniger als in der Leber (Madani <i>et al.</i> , 1999), mRNA im Dünndarm (Zhang <i>et al.</i> , 1999)
	2E1	Ethanol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff	mRNA im Dünndarm (Zhang <i>et al.</i> , 1999)

	3A	Cyclosporin A, Nifedipin und weitere Arzneimittel	Im gesamten GI-Trakt (Kolars <i>et al.</i> , 1994b), im Dünndarm (Zhang <i>et al.</i> , 1999) (Paine <i>et al.</i> , 1997), 3A3 mRNA im Colon und Dünndarm (Mercurio <i>et al.</i> , 1995)
	4B1	2-Acetylamino-fluoren	einige Colonproben, nicht Leber oder Dünndarm (Windmill <i>et al.</i> , 1997)
NAD(P)H Chinon- reduktase 1 (DT-Diaphorase)		Chinone, Bioaktivierung von Mitomycin C und Diaziquon	Leber, Lunge und Colon (in Tumoren mehr Protein als in gesundem Gewebe) (Belinsky and Jaiswal, 1993)
FMO	FMO1	weiche Nukleophile, Oxidation von S, N und anderen Heteroatomen in Xenobiotika	Intestinum (Yeung <i>et al.</i> , 2000)
	FMO3	Tyramin, N-Oxidation von primären Aminen und Hydroxylaminen (Lin <i>et al.</i> , 1996), Amphetamin (Cashman <i>et al.</i> , 1999)	Leber, nicht Intestinum (Lang <i>et al.</i> , 1998)
MAO		oxidative Desaminierung biogener Amine	MAO-A und MAO-B im Duodenum (Saura <i>et al.</i> , 1996)
ALDH		Ethanol, Benzylalkohol	ADH-Aktivität in Leber und Colon (Delker <i>et al.</i> , 1998), mRNA von Klasse I und III Isoformen im Colon (Engeland and Maret, 1993)
ADH		Aldehyde	Colon (Hengstler <i>et al.</i> , 1998)
EH	mEH sEH	Epoxide von PAK	Colon und Ileum (Aktiviät beider Formen) (Pacifici <i>et al.</i> , 1989), Colon (mEH 10 % des Gehalts der Leber) (Massaad <i>et al.</i> , 1992)
GST	A	Elektrophile z.B. B(a)P- dihydrodiolepid (Hayes and Pulford, 1995)	Dick- und Dünndarm (Peters <i>et al.</i> , 1991), Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992) (Hengstler <i>et al.</i> , 1998)
	P1-1	„	Dick- und Dünndarm (Peters <i>et al.</i> , 1991), Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992) (Hengstler <i>et al.</i> , 1998)
	M1-1	„	Leber, nicht Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992)
NAT	NAT1	N-Hydroxy-AA, (Kadlubar, 1994) p-Aminobenzoesäure, p-Aminosalicylsäure	mRNA in Leber, Dünndarm, Colon, Lunge, Niere, Magen, Ösophagus (Windmill <i>et al.</i> , 2000)
	NAT2	N-Hydroxy-AA (Kadlubar, 1994) Isoniazid, Sulfonamide, Aromatasehemmer, Coffein, Hydrylazin	mRNA in Leber, Dünndarm, Colon, Lunge, Niere, Magen, Ösophagus (Windmill <i>et al.</i> , 2000)

UGT	1A	Bilirubin, Paracetamol, Morphin, Gallensäuren, fettlösliche Vitamine, N-Hydroxy-HAA (Orzechowski <i>et al.</i> , 1994)	Mehr 1A im Dünndarm als im Dickdarm (Peters <i>et al.</i> , 1991), 1A im Colon und in der Leber sowie 1A1, 1A3, 1A4, 1A6 mRNA in Colon und Leber (Strassburg <i>et al.</i> , 1999), 1A8 und 1A10 mRNA im Colon, aber nicht in der Leber (Mojarrabi and Mackenzie, 1998), 1A10 mRNA im Colon, Dünndarm und Magen, aber nicht in der Leber (Mojarrabi and Mackenzie, 1998; Strassburg <i>et al.</i> , 1998)
	2B4 2B7	Steroide und Gallensäuren	2B4 in der Leber, nicht im Colon; 2B7 in der Leber und allen Darmabschnitten (Radomska-Pandya <i>et al.</i> , 1998)
β-Glucuronidase		Umbelliferon-4-glucuronid	Enzymaktivität im Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992)
SULT	1A1	N-OH-AAF	mRNA in Leber, Dünndarm, Colon (Bernier <i>et al.</i> , 1996)
	1A3	Katecholamine	mRNA in Leber und Dünndarm (Aksoy and Weinshilboum, 1995)
	1B1	Schilddrüsenhormone	Leber und Darm (Sakakibara <i>et al.</i> , 1995; Wang <i>et al.</i> , 1998)
	1E1	Estrogene	Leber und Jejunum (Her <i>et al.</i> , 1996)
	2A1	Hydroxysterioide	Leber und Jejunum (Her <i>et al.</i> , 1996)
ARS	ARSC, ARSD	Steroidsulfate	mRNA im Colon und Duodenum (Dooley <i>et al.</i> , 2000); Enzymaktivität mit 4-Methylumbelliferonsulfat im Colon (Massaad <i>et al.</i> , 1992)

<sup>a</sup> falls nicht anders spezifiziert, beziehen sich die Angaben auf Protein

## 1.4 Aufgabenstellung

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Expression von SULT-Formen in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte untersucht werden. Hierzu mußten zunächst die einzelnen Formen durch Immunblotting und Bestimmung von Enzymaktivitäten identifiziert werden. Die Expression der detektierten und möglichst auch identifizierten Formen sollte im folgenden zwischen den verschiedenen Darmabschnitten verglichen werden. Bei den humanen Proben sollte auch die interindividuelle Variabilität betrachtet werden, was die Bestimmung der Verteilung der Allele *h1A1\*R* und *h1A1\*H* beinhaltete. Die Befunde sollten einen Vergleich der intestinalen Expression von SULT zwischen Mensch und Ratte erlauben. Zur Charakterisierung gehörte ebenfalls die Untersuchung der Lokalisation im Gewebe mittels Immunhistochemie.

Im zweiten Teil sollten die im Colon identifizierten Formen in Indikatorzellen für Mutagenitätsexperimente exprimiert werden. Da für diese Formen mit Ausnahme der 1B1 schon im Rahmen anderer Arbeiten in der Arbeitsgruppe rekombinante Indikatorzellen hergestellt wurden, beschränkte sich der zweite Teil auf die 1B1. Für die heterologe Expression wurden der im Ames-Test verwendete Stamm *Salmonella typhimurium* TA1538 und die u.a. im HPRT-Test eingesetzten V79-Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters verwendet. Mit den rekombinanten Bakterien sollten im Ames-Test Promutagene gefunden werden, die durch die im humanen Darm exprimierten SULT-Formen aktiviert werden. Die in TA1538-h1B1 mutagen wirkenden Substanzen sollten im HPRT-Test mit V79-1B1-Zellen getestet werden. Die hierfür konstruierten Zelllinien mußten zuvor bezüglich ihrer Stabilität, 1B1-Expression im Vergleich zum Gewebe und Wachstumseigenschaften charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Blotting Apparatur: Pharmacia Nova Blot (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

DNA-Sequenziergerät: Pharmacia LKB A.L.F. DNA-Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg)

Elektrophorese Geräte: Multiphor II mit Stromquelle MultiDrive XL (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg)

Elektrophorese-System: Hoefer SE 600 Series (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Geschlossener Einbettautomat: Hypocenter XP (Shandon, Frankfurt)

Flachbettelektrophorese - Kammer: Agagel Mini (Biometra, Göttingen)

Mikrophotographie: Videokamera Progressive 3CCD (Sony) mit True Colour Analysis System Lucia G (Nikon, Düsseldorf)

Mikroskope: Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena)

Standard KF2 (Carl Zeiss, Jena)

Eclipse E1000 (Nikon, Düsseldorf) mit folgenden Objektiven:

Plan Apo 20x DIC, Plan Apo 40x DIC und Plan Fluor 10x Ph1

Microphot-SA (Nikon, Düsseldorf) mit folgenden Objektiven:

Plan 20x DIC und Plan 40x DIC

Paraffinausgießsystem: Histocentre 2 (Shandon, Frankfurt)

Rotationsmikrotom: HM 350 (Microm, Heidelberg)

Spektralphotometer zur Nukleinsäure-Bestimmung: Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Szintillationszähler: LS6500 (Beckman, Fullerton, USA)

Ultraschallsonde: Vibra Cell (Bioblock Scientific, Frankreich)

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

Zellzählgerät: Casy 1 TT (Schärfe, Reutlingen)

### 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kulturmedien

Für die Herstellung von Puffern für proteinbiochemische Experimente wurde ausschließlich destilliertes Wasser verwendet. Lösungen und Medien für die Molekularbiologie und die Zellkultur wurden ebenfalls mit destilliertem Wasser hergestellt und vor Verwendung autoklaviert oder durch Filtration mit Filtern einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert.

Anorganische Säuren, Basen und Salze sowie organische Lösemittel wurden in einer für die Biochemie geeigneten Qualität von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

#### 2.1.2.1 Feinchemikalien

Agarose I (Amresco, Solon OH, USA)

Ampicillin Na-Salz (Biomol, Hamburg)

Bovines Serum Albumin Fraktion V (Biomol, Hamburg)

CNBr-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig)

3,3'-Diaminobenzidin (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Dehydroepiandrosteron (DHEA) (Sigma, Deisenhofen)

[1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-DHEA 2,2 Tbq/mmol (NEN-DuPont, Bad Homburg)

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

DNA Längenstandard (DNA des λ-Phagen, *EcoRI/HindIII*) (MBI Fermentas, Vilnius, Lettland)

ECL Western Blotting Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig)

Färbeautomat Cadenza (Shandon, Frankfurt)

Folin & Ciocalteu Phenol Reagent (Sigma, Deisenhofen)

Fötale Kälberserum (Eurobio, Ulis, Frankreich)

Histoplast (Shandon, Frankfurt)

4-Hydroxycyclopenta[*def*]chrysen und 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren wurden von A. Seidel (Biochemisches Institut für Umweltkarzinogene, Großhansdorf) zur Verfügung gestellt.

Kanamycin (Sigma, Deisenhofen)

LB- Medium (Sigma, Deisenhofen)

Luria Agar (Sigma, Deisenhofen)

17 $\beta$ -Östradiol [50-28-2] (Sigma, Deisenhofen)

[6,7-<sup>3</sup>H(N)]-17 $\beta$ -Östradiol 1480 Gb/mmol (NEN-DuPont, Bad Homburg)

PAPS [102029-54-9] (S.Singer, University of Dayton, USA)

[<sup>35</sup>S]-PAPS (NEN-DuPont, Bad Homburg)

Penicillin (Gibco BRL, Eggenstein)

Protease-Inhibitor Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Puromycin und Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)

Szintillationsflüssigkeit Rotiszint 2200 (Roth, Karlsruhe)

#### 2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

Steriles Einwegmaterial für zell- und molekularbiologische Arbeiten wie Petrischalen, Gewebekulturschalen, Gewebekulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhäusen) erworben, Einfrierröhrchen und Sterilfiltereinheiten waren von Nalgene (Rochester, USA). Alle weiteren Produkte wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) oder Eppendorf (Hamburg) bezogen.

#### 2.1.2.3 Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG- Peroxidase-Konjugat aus Ziege (Sigma, Deisenhofen)

Anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Esel (Sigma, Deisenhofen)

Vectastain ABC-Kit mit biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus Schwein und Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA)

h1B1-Antiserum (auch IgG-Fraktion): C. N. Falany, University of Alabama, Birmingham, USA

h1A1-Peptid-, h1A3-Peptid-, h2A1- (Sharp *et al.*, 1993), r1E1- (Forbes-Bamforth and Coughtrie, 1994), r1A1- und h1A3-Antiseren: M. H. C. Coughtrie, Dundee, Schottland

h1A1-Antiserum: C. E. Engelke, DIfE, Rehbrücke

#### 2.1.2.4 Plasmidvektoren

pCR-Script Amp SK(+) (Stratagene, Heidelberg)

pET-24a(+) (Novagen, Madison, USA)

pET-28a(+) (Novagen, Madison, USA)

pKK233-2 und pKK233-3 (Clontech, Palo Alto, USA)

pT7Blue(R) (Novagen, Madison, USA)

Folgende Plasmide wurden freundlicherweise von anderen Forschern zur Verfügung gestellt:

pBSpac $\Delta$ p (de la Luna *et al.*, 1988) (A. Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma Cantoblanco, Madrid, Spanien), pMPSV (E/H) und (H/E) (Artelt *et al.*, 1988) (H. Hauser, GBF Braunschweig), pKK233-2-h1B1 (Wang *et al.*, 1998) (C. Falany, University of Alabama, Birmingham, USA) und pMP-r1B1 und pKNeo-r1B1 mit cDNA entsprechend Genebank acc. No. D89375 (W. Meinel, DIfE, Bergholz-Rehbrücke).

#### 2.1.2.5 Oligonukleotide

Die in Berlin ansässigen Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH oder InViTek sowie MWG Biotech (Ebersberg) wurden mit der Oligonukleotidsynthese beauftragt. Die für die Sequenzierung von pT7-Blue(R)-Konstrukten verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

#### 2.1.2.6 Enzyme

Cloned *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

Combi Pol DNA Polymerase (InViTek, Berlin)

Pwo DNA Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein)

T4 DNA Ligase (Gibco BRL, Eggenstein)

Restriktionsenzyme (MBI Fermentas, Vilnius, Lettland)

### 2.1.2.7 Biologisches Material

#### a) Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL1-Blue wurden als kompetente Zellen von Stratagene (Heidelberg) erworben.

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986)

*Salmonella typhimurium* LB5000 (Bullas and Ryu, 1983)

*Salmonella typhimurium* TA1538 wurde von B. Ames (University of California, Berkley, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Stämme *Salmonella typhimurium* TA1538-SULT wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt; sie enthalten die Plasmide pKK-233-2 - SULT:

TA1538-h1A1 (Glatt *et al.*, 1998)

TA1538-h1A2\*1 (HAST4v) und TA1538-h1A2\*2 (HAST4) (W. Meidl)

TA1538-h1A3 (Glatt *et al.*, 1998)

TA1538-h1C1 (W. Meidl)

TA1538-h1E1 (Hagen *et al.*, 1998)

TA1538-h2A1 (Hagen *et al.*, 1998)

TA1538-h2B1 (W. Meidl)

TA1538-r1A1 (Glatt *et al.*, 1998)

TA1538-r1B1 (W. Meidl)

TA1538-r1C1 (W. Meidl)

TA1538-r1E1 (W. Meidl)

TA1538-rSTa (Glatt *et al.*, 1998)

#### b) Zellen

V79: Bei dieser Zelllinie handelt es sich um die in Mainz etablierte Sublinie V79 Mz der aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters gewonnenen Zelllinie V79 (Wölfel *et al.*, 1991).

V79p: Die für Kontrollexperimente verwendete Zelllinie trägt den Puromycin-Resistenzmarker und wurde aus der V79 Mz Sublinie durch stabile Transfektion mit dem Plasmid pBSpacΔp (2.1.2.4) hergestellt (Czich *et al.*, 1994).

Die zytosolische Fraktion aus V79-r1E1-Zellen wurde von U. Pabel (DIfE) zur Verfügung gestellt.

### c) humane Proben

Bei den analysierten Darmproben handelte es sich um Gewebe, das aufgrund einer Krankheit (siehe Tabelle 4) operativ entfernt werden mußte. Die Größe variierte von Stücken mit einer Oberfläche von 8 cm<sup>2</sup> bis zu einer Darmschlinge von 20 cm Länge. Die Gewebe wurden für diese Arbeit von Dr. M. Kretzschmar von der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Gera gesammelt. Nach der Entnahme wurden sie bis zur weiteren Aufarbeitung am DIfE bei -80°C gelagert. Die Probe S-1 wurde von der Abteilung PML des DIfE zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um eine in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Colonbiopsie, die am Benjamin Franklin Krankenhaus entnommen und als "ohne Befund" diagnostiziert worden war.

Tabelle 4: Humane Gewebeproben

Bezeichnung	Gewebe	Geschlecht	Alter bei OP	Diagnose
R1	Rektum	m	42	Rektum-Karzinom
R2	Rektum	w	46	Rektum-Karzinom
R3	Rektum	w	73	Rektum-Karzinom
R4	Rektum	w	74	Rektum-Karzinom
R5	Rektum	w	69	Rektum-Karzinom
R6	Rektum	w	70	Rektum-Karzinom
R7	Rektum	m	69	Rektum-Karzinom
R8	Rektum	w	37	Rektum-Karzinom
R9	Rektum	w	56	Rektum-Karzinom
R10	Rektum	m	?	Rektum-Karzinom
R11	Rektum	w	75	Rektum-Karzinom
C1	Colon	m	58	stenos. Colon-Karzinom mit Ileus
C2	Colon	m	70	stenos. Sigma-Karzinom

---

C3	Colon	w	64	Adenokarzinom des Septum rectovaginale
C4	Colon	w	60	Sigma-Karzinom
C5	Colon	w	36	Colitis Ulcerosa
C6	Colon (Sigma)	m	61	Sigma-Karzinom
C7	Colon (Sigma)	w	61	Sigma-Karzinom
C8	Colon	m	72	Colon-Karzinom
C9	Colon (Sigma)	m	39	Sigma-Divertikulitis
C10	Colon (Sigma)	m	75	Sigma-Neoplasie
C11	Colon (Sigma)	m	74	Sigma-Divertikulitis
C12	Colon (Transversum)	w	66	Transversum-Karzinom
C13	Colon	m	72	Sigma-Neoplasie
C14	Colon	m	71	Sigma-Neoplasie
C15	Colon (Sigma)	w	65	Sigma-Karzinom
C16	Colon	w	74	Sigma-Divertikulitis
C17	Colon	m	65	Sigma-Divertikulitis
C18	Colon	w	67	Colon-Karzinom
C19	Colon	w	50	Colon-Karzinom
C20	Colon	m	57	Colon-Karzinom
C21	Colon	m	68	Colon-Karzinom
C22	Colon	m	57	Colon-Karzinom
C23	Colon	w	59	Colon-Karzinom
C24	Colon (Sigma)	w	66	Sigma-Karzinom
C25	Colon	m	60	Colon-Karzinom
C26	Colon (Sigma)	w	60	Sigma-Neoplasie
C27 (+ I4)	Colon	m	76	Colon-Karzinom
C28	Colon	m	68	Colon-Karzinom
C29	Colon (Sigma)	w	68	Sigma-Karzinom
Coe	Coecum	m	68	Colon-Karzinom

---

I1a + b	Ileum	w	59	Rektum-Karzinom
I2	Ileum	m	71	Rektum-Karzinom
I3	Ileum	m	75	Rektum-Karzinom
I4 (+ C27)	Ileum	w	76	Colon-Karzinom
Jej	Jejunum	m	33	Pankreas-Karzinom
<u>andere Proben:</u>				
M	Magen	?	?	ohne Befund
S-1	Colon desc	m	?	ohne Befund
L(m)	Leber	m	55	?
L(w)	Leber	w	44	?

#### d) Gewebeproben von Ratten

10 Wochen alte männliche und weibliche Ratten vom Stamm Shoe:WIST wurden von der Tierzucht Schönwalde als SPF-Tiere gekauft. Sie wurden vor der Tötung durch Dekapitation für 2 bis 3 Wochen im SPF-Bereich gehalten.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Methoden

Für die Anzucht von Bakterien wurden LB-Medium und Luria Agar verwendet. Das Anlegen von Stockkulturen, die Herstellung kompetenter Bakterien nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode, die Transformation kompetenter Bakterien und andere Standardmethoden wie die DNA-Fällung mit Natriumacetat wurden nach den Vorschriften beschrieben in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### 2.2.2 Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

DNA und RNA wurden mit den entsprechenden Kits von Qiagen aus PCR-Reaktionsansätzen, Agarose-Gelen, Bakterien, Zellkulturen oder Geweben isoliert. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch im "Gene Quant" RNA/DNA calculator.

### 2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsenzyme, Polymerasen sowie die T4 Ligase wurden inklusive ihrer Reaktionspuffer von den Herstellern geliefert (2.1.2.6). Die Enzyme wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller eingesetzt.

### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxykettenabbruchmethode nach Sanger (1977). Sie wurde bis Mai 1998 mit dem Pharmacia LKB A.L.F. im Labor selbst durchgeführt, danach wurde die Firma InViTek (Berlin) mit der DNA-Sequenzierung beauftragt. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren bei beiden Varianten identisch, jedoch wurden für die Sequenzierung mit dem Pharmacia-Gerät fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet. Da die Firma InViTek fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide einsetzt, konnten in diesem Fall unmodifizierte Oligonukleotide verwendet werden.

Oligonukleotide für die Sequenzierung der h1B1 cDNA aus pMP-h1B1:

Vorwärtsprimer 5'-FITC-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC-3'

Rückwärtsprimer 5'-FITC-GTT AAC TGG TAA GTT TAG TC-3'

interner Primer 5'-FITC-AAA GTT CCA ATG TTG GAA-3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung der h1B1 cDNA aus pCR-h1B1:

Vorwärtsprimer 5'-FITC-GCT TGA TAT CGA ATT CTT GC-3'

Rückwärtsprimer 5'-FITC-AAC AAA AGC TGG AGG AGC TCC AC-3'

interner Primer 5'-FITC-AAA GTT CCA ATG TTG GAA-3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung der h1B1 cDNA aus pT7-h1B1:

Vorwärtsprimer 5'- FITC-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'

Rückwärtsprimer 5'- FITC-CAG GAA ACA GCT ATC AC -3'

interner Primer 5'-FITC-AAA GTT CCA ATG TTG GAA-3'

### 2.2.5 Elektrophorese von Nukleinsäuren

TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl , 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO, 1 mM EDTA pH 7,5)

Agarose (1 % (w/v) in TAE mit 0,04 % (w/v) Ethidiumbromid)

Proben-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 % Glycerin mit 0,5 % Bromphenolblau)

Für die Elektrophorese im Flachbettssystem wurden Gele aus 1 % (w/v) Agarose mit Ethidiumbromid (0,04 %) in TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 60 mA in TAE-Puffer. Zur Abschätzung von Länge und Menge der untersuchten Nukleinsäuren wurden 500 ng mit *EcoRI* und *HindIII* restringierte DNA (2.1.2.1) des Phagen  $\lambda$  als Standard eingesetzt.

Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelstränge konnten die DNA-Fragmente bei Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der digitalen Kamera des "Eagle Eye".

### 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente zum einen der Amplifikation von cDNAs aus gentechnisch veränderten V79 Zellen (2.4.3) sowie aus Geweben und zum andern der gezielten Mutagenese, um Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme zu Klonierungszwecken einzufügen.

Bei allen PCRs wurde anfangs der DNA-Doppelstrang durch fünfminütiges Erhitzen auf 94 °C aufgeschmolzen, dann folgten 25 - 30 Vermehrungszyklen bestehend aus Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge für 1 min bei 94 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide an die Einzelstränge für 1 min bei der geeigneten Temperatur und Polymerasereaktion für 0,5 - 3 min je nach Länge des PCR-Produkts bei 72 °C. Abschließend wurde 10 min bei 72 °C inkubiert, um angefangene DNA-Stränge zu komplettieren. Ein Ansatz von 50  $\mu$ l enthielt 1 U Polymerase (2.1.2.6), 100 ng DNA, 10 pmol jedes Oligonukleotids, 25 nmol dNTPs und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Die bei den einzelnen Amplifikationen verwendeten Polymerasen, Oligonukleotide und Hybridisierungstemperaturen sind bei den jeweiligen Anwendungen aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.5) nachgewiesen.

### 2.2.7 Nachweis von h1B1- und h1C1-mRNA durch RT-PCR

Als Ausgangsmaterial diente humane Mucosa aus dem Rektum (Probe R3, Tabelle 4). Die gesamte RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits von Qiagen gewonnen. Die Gewinnung der cDNA erfolgte unter Verwendung der Reversen Transkriptase Superscript<sup>TM</sup> II (Gibco BRL, Eggenstein) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt: Zum einen wurde zunächst die gesamte mRNA (2.2.2) unter Verwendung des Oligonukleotids 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' in cDNA umgeschrieben, und zum anderen wurde nur die h1B1 cDNA mit einem spezifischen Oligonukleotid (5'-ACC TTT TAA GCT TAT TTA CAT CTT GCT CAG-3') hergestellt. Die Konstrukte dienten als Ausgangsmaterial für Amplifikationen (2.2.6) mit für h1B1 und h1C1 spezifischen Oligonukleotiden. Letzere sind im folgenden gemeinsam mit den verwendeten Polymerasen aufgeführt:

#### a) h1B1

Vorwärtsprimer 5'-AAT CGA ATT CAA AAT GCT TTC CCC AAA AGA TAT TC-3'

Rückwärtsprimer 5'-GAA TTC AAG CTT TAA ATC TCT GTG CGG-3'

Hybridisierungstemperatur: 55 °C, Taq Polymerase, Combi-Pol Polymerase

#### b) h1C1

Vorwärtsprimer 5'-GAC CAC GAA TTC TGA GAC ACT ATG GCC CTG AC-3'

Rückwärtsprimer 5'-ACC TTT TAA GCT TAT TTA CAT CTT GCT CAG-3'

Hybridisierungstemperatur: 50 °C und 55 °C, Pwo Polymerase und Combi-Pol Polymerase

Die Identität der h1B1 - PCR-Produkte wurde zunächst durch Restrictieren (2.2.3) mit den Enzymen *Xba*I, *Xmn*I und *Nco*I und elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente (2.2.5) überprüft. Um die PCR-Produkte in ausreichender Menge für die Sequenzierung zu gewinnen, wurde der mit der Combi-Pol hergestellte Ansatz in das Plasmid pCRScript (2.1.2.4) und der andere in das Plasmid pT7Blue (2.1.2.4) insertiert. Da es sich in beiden Fällen um "Blunt-End" Klonierungen an der *Srf*I-, bzw. *Eco*RV-Restriktionsschnittstelle handelte und die verwendeten Polymerasen keine glatten Enden produzieren, mußten diese durch Behandlung mit *Pfu* DNA Polymerase poliert werden. Das entsprechende Protokoll ebenso wie das zur weiteren Ligation und Transformation von kompetenten Epicurian Coli® XL1-Blue wurde aus dem Handbuch zum pCRScript-Plasmid der Firma Stratagene

entnommen. Ob die transformierten Bakterien tatsächlich das Plasmid mit insertierter h1B1 cDNA aufgenommen hatten, wurde durch Restringieren (2.2.3) des aus diesen Bakterien isolierten Plasmids (2.2.2) mit *PvuII* und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (2.2.5) überprüft. Die Orientierung der insertierten cDNA wurde durch Analyse der Fragmentgröße nach Restringieren (2.2.3) mit *XbaI* (pT7Blue), bzw. *XmnI* (pCRScript) bestimmt. Für die Sequenzierung (2.2.4) wurden ein Klon pT7Blue-h1B1 und zwei Klone pCRScript-h1B1 mit korrekter Orientierung ausgewählt.

Des Weiteren wurde die durch Restringieren mit *EcoRI* und *HindIII* (2.2.3) erhaltene h1B1 cDNA aus pT7-Blue-h1B1 in den ebenso restringierten Expressionsvektor pKK233-3 (2.1.2.4) ligiert (2.2.3). Mit pKK233-3-h1B1 wurden kompetente Epicurian Coli® XL1 transformiert; der resultierende Stamm wurde *E. coli* XL1- h1B1 (RT-PCR) genannt.

### 2.2.8 Konstruktion von pMP-h1B1

Um die h1B1 cDNA zwischen die *EcoRI* und die *HindIII* Restriktionschnittstellen des Vektors pMPSV (E/H) ligieren zu können, wurde die cDNA Sequenz aus dem Plasmid pKK233-2-h1B1 (2.1.2.4) mit Combi-Pol Polymerase amplifiziert (2.2.6). Durch die gewählten Oligonukleotide wurden an der Sequenz zwei Modifikationen vorgenommen: Erstens wurde die Wildtypsequenz im Bereich des Translationsstartkodons, die im Ausgangsplasmid verändert worden war (Wang *et al.*, 1998), wieder hergestellt und zweitens wurde die Erkennungssequenz für *EcoRI* vor dem Startcodon eingefügt. Hierfür wurden folgende Oligonukleotide mit einer Hybridisierungstemperatur von 57 °C verwendet:

Vorwärtsprimer 5'-AAT CGA ATT CAA AAT GCT TTC CCC AAA AGA TAT TC-3'

Rückwärtsprimer 5'-CTT CTC TCA TCC GCC AAA ACA GCC-3'

Kompetente Epicurian Coli® XL1-Blue wurden mit pMP-h1B1 entsprechend dem Herstellerprotokoll transformiert, und die aus den transformierten Bakterien isolierten Plasmide (2.2.2) wurden durch Restringieren (2.2.3) mit *XbaI* und Auftrennung der Spaltprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.5) auf Vorhandensein der h1B1 cDNA überprüft.

Um eventuell bei der PCR entstandene Mutationen auszuschließen, wurde die Sequenz der h1B1 cDNA im pMP-h1B1 Plasmid bestimmt (2.2.4).

### 2.2.9 Konstruktion von pET-SULT

Für die Überexpression im pET-System der Firma Novagen wurden die gewünschten cDNAs in ein Plasmid aus der pET-Serie inseriert. In diesen Konstrukten unterliegt die Expression der Kontrolle des T7 Promoters. *E. coli* BL21 (DE3) (2.1.2.7) wurden mit den Plasmiden pET-SULT transformiert (2.2.1), um die entsprechenden Stämme *E. coli* BL21-SULT zu erhalten. Diese exprimieren nach Induktion mit IPTG die T7 RNA Polymerase, so daß induzierte Bakterien fast ausschließlich das entsprechende Protein produzieren.

#### a) pET24a(+)-h1B1

Die h1B1 cDNA wurde zwischen die *NdeI* und die *HindIII* Restriktionsschnittstellen des Plasmids pET24a(+) inseriert (2.2.3). Die hierfür erforderlichen Restriktionsschnittstellen wurden durch PCR (2.2.6) mit folgenden Oligonukleotiden eingeführt:

Vorwärtsprimer 5'-GAA TTC CAT ATG CTT TCC CCA AAA G-3'

Rückwärtsprimer 5'-GAA TTC AAG CTT TAA ATC TCT GTG CGG-3'

Als Ausgangsmaterial diente das Plasmid pKK233-2-h1B1 (2.1.2.4). Die Amplifikation wurde durch die Pfu turbo Polymerase katalysiert, die Hybridisierungstemperatur betrug 60 °C.

#### b) pET28a(+)-r1B1

Zur Insertion in pET28 wurde eine cDNA mit Schnittstellen für *NcoI* am 5'-Ende und *HindIII* am 3'-Ende benötigt. Diese wurde aus dem von W. Meinel zur Verfügung gestellten Konstrukt pKNeo-r1B1 durch Restringieren (2.2.3) mit *NcoI* und *HindIII* erhalten. Wie bei pKK233-h1B1 ist die Restriktionsschnittstelle für *NcoI* in der r1B1 cDNA durch einen konservativen Basenaustausch entfernt worden.

#### c) pET28b(+)-h1A1 und -1A3

Die cDNAs wurden entsprechend der h1B1-cDNA aus den Plasmiden pKK-233-h1A1 und -h1A3, die aus den Stämmen *S. typhimurium* TA1538-h1A1 und -h1A3 (2.1.2.4) isoliert worden waren (2.2.2), durch Restringieren (2.2.3) mit *NcoI* und *HindIII* gewonnen. Sie wurden in das ebenfalls mit *NcoI* und *HindIII* restringierte Plasmid pET28b(+) (2.1.2.4) ligiert (2.2.3).

### 2.2.10 Bestimmung des h1A1 Polymorphismus

Die Untersuchung der Darmproben bezüglich des Polymorphismus der h1A1 (Allele *h1A1*\*R und *h1A1*\*H) (Raftogianis *et al.*, 1997) wurde nach der von C. Engelke etablierten Methode durchgeführt (Engelke *et al.*, 2000).

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

Bei der Durchführung von Prozessen, bei denen der Erhalt des nativen Proteins wichtig war, wurden die Proben im Eisbad gekühlt, oder es wurde im Kühlraum bei 4 °C gearbeitet. Von solchen Proben wurden Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.1 Präparation von subzellulären Fraktionen

#### 2.3.1.1 Präparation der subzellulären Fraktionen aus Colonmucosa von Mensch und Ratte

PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4)

Homogenisationspuffer (150 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 und Complete™ Protease Inhibitor Cocktail entsprechend der Herstellervorschrift)

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden langsam aufgetaut, indem sie erst für sechs Stunden bei -20 °C gehalten und anschließend über Nacht in Eis gelegt wurden. Die aufgetauten Gewebestücke wurden mit eisgekühltem PBS gespült, um grobe Reste an Darminhalt und Blut zu entfernen. Bei den humanen Proben mußten die Wucherungen des Tumors mit der Schere entfernt werden, danach wurde das aufgeschnittene Darmstück mit der Muskelschicht auf einer eisgekühlten Glasplatte ausgebreitet. Es folgte eine Reinigung der Mucosa durch kräftiges Spülen mit PBS und Abtupfen mit Papiertüchern. Die Mucosa wurde mit einem Plastikspatel abgeschabt und in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit 3 ml Puffer pro g Mucosa homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Das Sediment wurde mit 2 ml Homogenisationspuffer pro g Gewebe resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und 1 h bei 100 000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytosolische Fraktion, das Sediment die

mikrosomale Fraktion. Letztere wurde zum Waschen mit 5 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut sedimentiert. Anschließend wurde sie mit 0,5 ml/g Gewebe in Homogenisationspuffer resuspendiert, 10 s sonifiziert und eingefroren.

#### 2.3.1.2 Präparation der subzellulären Fraktion aus Leber

Das Gewebe (Tabelle 4) wurde mit einem Skalpell zerkleinert und mit 5 ml/g Gewebe Homogenisationspuffer analog zum Protokoll für die Darmproben homogenisiert und in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt (2.3.1.1).

#### 2.3.2 Zytosol aus Bakterien

LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/l); falls erforderlich ohne Antibiotikum

KCP-Puffer (150 mM KCl , 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4)

Pro Ansatz wurden 100 ml Medium mit 100 µl einer tiefgefrorenen Stockkultur (2.2.1) inokuliert und für 8 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden für 5 min bei 3000 x g und 4 °C sedimentiert, mit 25 ml KCP-Puffer resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Zu den gewaschenen Bakterien wurden 800 µl KCP-Puffer pipettiert. Die zytosolische Fraktion wurde durch Sonifizieren und Ultrazentrifugation gewonnen: Hierfür wurde die Suspension drei Zyklen aus je 10 s Behandlung mit Ultraschall und 30 s Kühlung im Eisbad unterzogen. Anschließend wurde die zytosolische Fraktion durch einstündige Ultrazentrifugation bei 100 000 x g und 4 °C erhalten.

#### 2.3.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (1951). Zur Herstellung der Eichreihe wurde BSA verwendet.

#### 2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Solubilisierungspuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) Mercaptoethanol und 0,1 % (w/v) Bromphenolblau)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Methode nach Lämmli (1970) mit einem 3%igen Sammelgel und einem 11%igen Trenngel verwendet. Die Proben wurden zur Denaturierung für 5 min mit Solubilisierungspuffer gekocht.

### 2.3.5 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen durch Coomassie-Färbung

Färbelösung (0,1 % (w/v) Servablau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure und 40 % (v/v) Methanol)  
Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol)

Die Gele wurden zunächst für 20 min mit der Färbelösung und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrundes mit der Entfärbelösung inkubiert. Gefärbte Gele wurden mit der digitalen Kamera des Eagle Eye (2.1.1) fotografiert.

### 2.3.6 Western Blotting und Immundetektion von Sulfotransferasen

TBS-T (50 mM Tris/HCl pH 9, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween 20)

Blockierungslösung (1 % BSA (w/v) in TBS-T, bzw. 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T im Fall des h1A1-Antiserums)

Primärantikörper: h1B1-Antiserum (1: 10 000) aus Kaninchen (Serum)  
r1E1-Antiserum (1: 2500) aus Kaninchen  
h1A1- und h1A3-Peptid-Antiserum (1: 2000) aus Kaninchen  
h1A1-Antiserum (1: 20 000) aus Kaninchen  
h2A1-Antiserum (1: 2500) aus Kaninchen  
h1A3-Antiserum (1: 10 000) aus Schaf  
r1A1-Antiserum (1: 2000) aus Kaninchen

Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidasekonjugat aus Ziege (1: 2000)  
Anti-Schaf-IgG-Peroxidasekonjugat aus Esel (1:2000)

Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel (2.3.4) wurden sie durch das halbtrockene Elektroblobverfahren von Kyhse-Andersen (1984) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden zunächst alle freien Bindungsstellen auf der Membran durch einstündige Inkubation mit der Blockierungslösung abgesättigt. Anschließend wurde die Blockierungslösung gegen den in

der Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper ausgetauscht und die Membran eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert. Danach wurde sie fünfmal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Kaninchen-, bzw. Anti-Schaf-IgG-Peroxidasekonjugat verwendet. Die Peroxidase katalysiert die Luminol-Wasserstoffperoxid-Reaktion, wodurch Chemolumineszenz erzeugt wird, die mit einem Film detektiert werden kann. Inkubation und Detektion erfolgten nach der Vorschrift des ECL Western Blotting Kits (2.1.2).

### 2.3.7 Sulfotransferase-Aktivitätsmessungen

#### 2.3.7.1 Messung der Umsatzraten von [<sup>3</sup>H]-markierten Substraten

[<sup>3</sup>H]β-Östradiol: 20 nM und 20 μM in 15 % (v/v) Ethanol; je 2000 cpm/μl

[<sup>3</sup>H]DHEA: 3 μM und 15 μM in 15 % (v/v) Ethanol; je 2000 cpm/μl

Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4)

MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung (175 mM)

PAPS-Stammlösung (250 μM)

Stopplösung (100 mM Tris/HCl pH 8,7)

Chloroform

Szintillationscocktail

β-Östradiol und DHEA sind Substrate der h1E1 und h2A1. Da sich Ausgangsverbindung und Sulfatester in ihrer Verteilung zwischen einer organischen und wässrigen Phase stark unterscheiden, können sie durch Ausschütteln der wässrigen Phase mit Chloroform voneinander getrennt werden.

Ein Inkubationsansatz von 250 μl enthielt neben der Enzymquelle 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 μM PAPS sowie 3 μM [<sup>3</sup>H]DHEA oder 20 μM [<sup>3</sup>H]β-Östradiol für h2A1 und 30 μM [<sup>3</sup>H] DHEA oder 20 nM [<sup>3</sup>H]β-Östradiol für h1E1.

Die Enzymreaktion wurde für 10 min bei 37 °C durchgeführt, durch die Zugabe von PAPS gestartet und durch Zugabe von 250 μl Stopplösung und 3 ml Chloroform beendet. Die Bestimmung des Blindwerts erfolgte in einem Ansatz ohne PAPS. Die Phasen wurden 2 min lang ausgeschüttelt und durch Zentrifugation für 2 min bei 3000 rpm getrennt. 200 μl der wässrigen Phase wurden zu 4 ml Szintillationscocktail pipettiert und im Szintillationszähler gezählt.

Der 100%-Wert wurde aus einem Ansatz ohne Protein und ohne Chloroform ermittelt und der Umsatz (U) entsprechend Formel (1) berechnet.

$$U_{\text{Substrat}} \left[ \frac{\text{pmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blindwert}}) \cdot n_{\text{Substrat}} [\text{pmol}]}{\text{cpm}_{100\% - \text{Wert}} \cdot t [\text{min}] \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \quad (1)$$

### 2.3.7.2 Messung der [<sup>35</sup>S]PAPS -Umsatzrate mit $\alpha$ -Naphthol

KP-Puffer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4)

Kosubstrat-Stammlösungen: 4  $\mu$ M PAPS und 1  $\mu$ M [<sup>35</sup>S]PAPS in Wasser

Substrat-Stammlösung: 7,5  $\mu$ M  $\alpha$ -Naphthol in Wasser

Fällungsreagenzien: 0,1 M Ba(OH)<sub>2</sub>, 0,1 M Ba(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> und 0,1 M Zn(OH)<sub>2</sub>

Szintillationscocktail

Der Umsatz von Substanzen, die nicht in radioaktiv markierter Form zur Verfügung standen, wurde radiometrisch mit [<sup>35</sup>S]PAPS nach der Methode von Foldes und Meek (1973) bestimmt. Hierbei wird im Verlauf der enzymatischen Sulfonierung <sup>35</sup>S in das Substrat eingebaut. Anschließend werden nicht umgesetztes [<sup>35</sup>S]PAPS und freies [<sup>35</sup>S]Sulfat durch Ba<sup>2+</sup> gefällt. Die im Überstand verbleibende Aktivität ist ein Maß für die Menge an gebildetem Sulfatester.

Ein Inkubationsansatz von 150  $\mu$ l enthielt 50 pmol PAPS/[<sup>35</sup>S]PAPS (ca. 20 000 cpm), KP-Puffer, 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Naphthol sowie die Probe mit zu bestimmender SULT-Aktivität. Die eingesetzte Proteinmenge der Probe wurde so gewählt, daß während der Inkubation nicht mehr als 15 % des Kosubstrats verbraucht wurden. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von je 200  $\mu$ l der Fällungsreagenzien beendet. Die Sulfatsalze wurden für 2 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und 500  $\mu$ l des Überstandes zu 4 ml Szintillationscocktail gegeben. Aus dem Vergleich mit der Radioaktivität in einer Probe, die Wasser anstelle von Protein und Fällungsreagenzien enthielt ("100 %-Wert"), wurde der Umsatz (U) des Kosubstrats entsprechend Formel (2) berechnet.

$$U_{\text{PAPS}} \left[ \frac{\text{pmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blindwert}}) \cdot n_{\text{PAPS}} [\text{pmol}]}{\text{cpm}_{100\% - \text{Wert}} \cdot t [\text{min}] \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \quad (2)$$

### 2.3.8 Überexpression von SULT

Kanamycin-Medium (LB-Medium mit 30 mg/l Kanamycin)

Isopropylthiogalactosid-Stammlösung (100 mM IPTG)

KCP-Puffer (150 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4)

Da die *E. coli* BL21-SULT (2.2.9) das pET-Plasmid beim Lagern verlieren, wurden die Kulturen aus Einzelkolonien der Selektionsplatte eines frischen Transformationsansatzes angeimpft. Die weiteren Schritte wurden entsprechend der Vorschrift für das pET-System durchgeführt: Zunächst wurde die Einzelkolonie für 2 bis 3 h in 3 ml Medium bei 37 °C und 200 Upm in einem Schüttelinkubator vermehrt, anschließend wurde die gesamte Vorkultur in 100 ml Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>691</sub> von 0,6 - 0,8 (ca. 3 h) weiter inkubiert. Dann wurde die Induktion durch Zugabe von 100 µl IPTG-Lösung gestartet. Nach weiteren 4 h konnten die Bakterien aufgearbeitet werden.

Die starke Überexpression eines Proteins kann für die Bakterien ungünstig sein und führt dazu, daß die Proteine in Form von sogenannten "Inclusion Bodies" abgelagert werden. Auf diese Weise erhält man unlösliches, aber weitestgehend reines Protein. Vor der Aufarbeitung eines Ansatzes wurde daher untersucht, inwieweit das überexprimierte Protein in löslicher oder unlöslicher Form vorlag. Hierfür wurde ein Aliquot von 10 ml der induzierten Kultur wie unter (2.3.1.3) beschrieben zentrifugiert, gewaschen und sonifiziert. Anschließend wurde für 20 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die lösliche und die unlösliche Fraktion zu trennen. Beide Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese (2.3.4) und Coomassie-Färbung (2.3.5) auf das Vorhandensein von überexprimiertem Protein untersucht.

#### 2.3.8.1 Aufarbeitung der löslichen Fraktion

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem für Bakterien beschriebenen Protokoll (2.3.1.3).

### 2.3.8.2 Aufarbeitung der "Inclusion Bodies" aus *E. coli* BL21-SULT

Lysepuffer: 5 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA

Lysozym-Lösung (10 mg/ml)

MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M)

MnCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM)

DNase I-Lösung (10 mg/ml)

Detergenz-Puffer (1 % (w/v) Deoxycholsäure, 1 % Nonidet P40, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5)

Triton-Puffer (0,5 % (w/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5)

Tris-Puffer (1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8)

Die aus 50 ml Kultur sedimentierten Bakterien wurden in 1 ml Lysepuffer und 250 µl Lysozym-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Dann wurden je 26 µl MgCl<sub>2</sub>- und MnCl<sub>2</sub>- sowie 11 µl DNase I-Lösung hinzugegeben und wieder 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 3 ml Detergenzpuffer versetzt und kräftig mit dem Vortexer durchmischt. Durch Zentrifugation bei 10 000 x g für 10 min bei 4 °C wurde die unlösliche Fraktion sedimentiert und danach in 3 ml Triton-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Die Waschschrte mit Detergenz- und Triton-Puffer wurden wiederholt und dann zweimal mit Tris-Puffer durchgeführt. Die "Inclusion Bodies" wurden schließlich in 1 ml 0,1 % (w/v) SDS gelöst und für weitere Verwendungen bei - 80 °C eingefroren.

### 2.3.9 Depletion von Antisera mit SULT-Sepharose

Kopplungspuffer: 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3

Blockierungspuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,0

Waschpuffer 1: 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 mit 0,5 M NaCl

Waschpuffer 2: 0,1 M NaAc pH 4,0 mit 0,5 M NaCl

PBS-T: PBS pH 7,4 mit 0,1 % (v/v) Triton X-100

Da von den verwendeten Antisera keine Präimmunsere zur Verfügung standen, wurden zur Erstellung von Kontrollfraktionen für die Immunhistochemie die spezifischen Antikörper mit immobilisierten Antigenen aus den Antisera bzw. der IgG-Fraktion entfernt. Hierfür wurden die im pET-System überexprimierten löslichen Proteine h1B1, h1A1 und

h1A3 an CNBr-Sepharosereste auf Agarosekügelchen ( $d = 4 \mu\text{m}$ ) gekoppelt. Bei der Präparation der zu diesem Zweck verwendeten löslichen Fraktion von *E. coli* BL21-SULT (2.3.8.1) wurden die Bakterien in Kopplungspuffer anstelle von KCP-Puffer aufgenommen und sonifiziert. Die Reinheit dieser Fraktion wurde durch SDS-Gelelektrophorese (2.3.4) und Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant Blue (2.3.5) überprüft. Die Kopplung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt: 0,6 g CNBr-Sepharose-Pulver wurden mit 500 ml 1 mM HCl gewaschen und dann mit 15 mg Protein in 1,78 ml Kopplungspuffer versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose fünfmal mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend wurden 10 ml Blockierungspuffer hinzugefügt und 72 h im Kühlraum inkubiert. Danach wurde die SULT-Sepharose dreimal abwechselnd mit 10 ml Waschpuffer 1 und 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen und vor der Inkubation mit Antiserum einmal mit 10 ml PBS-T gespült.

Zur Entfernung der spezifischen Antikörper aus den Antiseren, bzw. der IgG-Fraktion wurden 20  $\mu\text{l}$  Serum oder IgG-Fraktion zu 400  $\mu\text{l}$  SULT-Sepharose in PBS-T gegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose viermal mit 40  $\mu\text{l}$  PBS-T eluiert, wobei sie für jeweils 10 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Vereinigung der Eluate wurde die Proteinkonzentration bestimmt, um die Verdünnung gegenüber der Ausgangslösung berechnen zu können. Anschließend wurde das Eluat mit 180  $\mu\text{l}$  2 % BSA in PBS-T pH 7,4 versetzt, um das verdünnte Protein beim Einfrieren zu stabilisieren.

Das h1B1-Antiserum und die IgG-Fraktion sowie das h1A1-Antiserum wurden jeweils mit h1A3-Sepharose und h1B1-Sepharose vorbehandelt. Das gegen h1A3-Sepharose depletierte h1B1-Antiserum sollte reagieren wie die Ausgangsfraktion, während das gegen h1B1-Sepharose depletierte h1B1-Antiserum keine spezifischen Signale mehr ergeben sollte. Das umgekehrte gilt für das h1A1-Antiserum. Die Antiseren und IgG-Fractionen, die gegen Peptide von h1A1, bzw. h1A3 gerichtet sind, wurden mit h1A1-, bzw. h1A3-Sepharose vorbehandelt.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Allgemeine Methoden

#### 2.4.1.1 Kultur von V79-Zellen

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gehalten. Der CO<sub>2</sub> -Anteil betrug 5 %. Für die Stammhaltung wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen von 25 cm<sup>2</sup> mit 5 ml Medium kultiviert.

#### 2.4.1.2 Ablösen von Zellen

Nach dem Abpipettieren des Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einer Lösung aus 0,05 % Trypsin und 0,5 M EDTA in Ca/Mg-freier Dulbeccos Phosphat-gepufferter Salzlösung benetzt und 5 min in den Brutschrank gestellt. Die hiernach abgelösten Zellen wurden zur Beendigung der proteolytischen Aktivität in 5 ml Kulturmedium für die erneute Einsaat oder im Fall der Zellernte in 10 % FKS in PBS resuspendiert.

#### 2.4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

100 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml Casyton verdünnt und im Zellzählgerät "Casy 1 TT" gemessen.

#### 2.4.1.4 Passagieren von Zellen

Das Passagieren erfolgte bei Erreichen der Konfluenz nach 2 - 3 Tagen. Die Zellen wurden abgelöst (2.4.1.2) und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Von der Suspension wurden für die Kultivierung in 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen 0,5 ml (ca. 10<sup>5</sup> Zellen) in eine neue Gewebekulturflasche mit 4,5 ml frischem Medium gegeben und weiter kultiviert (2.4.1.1). Bei Verwendung von 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen wurden die dreifache Mengen an Zellen und Medium eingesetzt.

#### 2.4.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Hierfür wurde zunächst die Zellzahl der unter Standardbedingungen kultivierten Zellen bestimmt (2.4.1.3), so daß sie nach fünfminütiger Zentrifugation bei 800 rpm mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in der Kryolösung aus 90 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen werden konnten. Aliquots von je 1 ml wurden im Kryostat auf  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen wurde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad durchgeführt, wonach die Zellsuspension möglichst schnell in Medium verdünnt und für 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert wurde, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml - Gewebekulturflaschen mit Medium überführt. Zur Entfernung nicht angewachsener Zellen wurde nach 4 h das alte Kulturmedium gegen frisches ausgetauscht.

#### 2.4.2 Präparation der zytosolischen Fraktion aus Zellen

Die abgelösten und resuspendierten Zellen (2.4.1.2) wurden für 5 min bei  $800 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml PBS pro Kulturschale resuspendiert. Anschließend wurden sie erneut zentrifugiert und ein zweites Mal mit PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in  $200 \mu\text{l}$  KCP-Puffer je Kulturschale (ca.  $10^7$  Zellen) resuspendiert, um durch Sonifizieren und Ultrazentrifugation wie für die Bakterien beschrieben (2.3.1.3) die zytosolische Fraktion zu erhalten.

#### 2.4.3 Herstellung der Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und -/B

##### 2.4.3.1 Transfektion

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0

Transfektionspuffer: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 % Glucose und  
130 mM HEPES pH 7,07 – 7,10 (eingestellt mit NaOH)

$\text{CaCl}_2$  – Lösung: 2,5 M  $\text{CaCl}_2$

V79-Zellen wurden nach der von Doehmer (1988) beschriebenen Methode mit den Plasmiden pMP-h1B1 (2.2.8) bzw. pMP-r1B1 (2.1.2.4) und pBSpac $\Delta$ p (de la Luna *et al.*, 1988) kotransfiziert, wobei letzteres das Gen für die Puromycin-Acetyltransferase als

Selektionsmarker trägt.  $7,5 \times 10^5$  V79-Zellen einer möglichst frühen Passage wurden in einer 9 cm<sup>2</sup>-Petrischale ausgesät und vor der Behandlung mit der DNA für 24 h kultiviert. Die Plasmide pMP-SULT und pBSpacΔp wurden im Verhältnis 20 : 1 gemischt, durch Ethanolfällung konzentriert und sterilisiert und in TE-Puffer in einer Konzentration von 1 µg/µl aufgenommen. 20 µl der DNA-Lösung wurden zunächst mit 1 ml Transfektionspuffer und dann mit 54 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Aus diesem Gemisch bildete sich innerhalb von 25 min ein Kopräzipitat mit feinen Kristallen aus DNA, Calcium- und Phosphat-Ionen, das auf die Zellen aufgetropft wurde. Dieses wurde nach 4 h durch einen Medienwechsel entfernt. Einen Tag später wurden die Zellen auf 15 Gewebekulturschalen verteilt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch Selektionsmedium mit 5 µg/ml Puromycin ersetzt. Nach 10 bis 14 Tagen waren Kolonien auf dem Boden der Kulturschalen zu erkennen, die mit Hilfe von Klonierungsringen abgelöst und in Sechsllochplatten überführt wurden.

#### 2.4.3.2 Selektion von Sulfotransferase-exprimierenden Zellklonen

Die Zellklone (2.4.3.1) wurden vermehrt, bis 6 – 7 x 10<sup>6</sup> Zellen vorhanden waren. Hieraus wurden drei Aliquots für die Kryokonservierung (2.4.1.5) angefertigt und zwei bis drei 150 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturschalen mit je 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesät. Nach 44 - 48 h wurden diese Zellen abgelöst und die zytosolische Fraktion hergestellt (2.4.2). Die Expression der h1B1, bzw. r1B1 wurde durch Immunoblotting (2.3.6) unter Verwendung des h1B1-Antiserums und durch Bestimmung der Enzymaktivität mit 1 µM α-Naphthol (2.3.7.1) nachgewiesen. Von exprimierenden Klonen wurden weitere Kryokonserven angefertigt (2.4.1.5), die restlichen wurden verworfen.

#### 2.4.4 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit

Um genügend Zellen zur Verfügung zu haben, wurden konfluent wachsende Zellen aus drei 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen abgelöst (2.4.1.2) und in je 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt, wobei entweder 1,5 x 10<sup>6</sup> oder 3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 150 cm<sup>2</sup>-Petrischale eingesät wurden. Nach 24, 48 und 72 h Kultivierung (2.4.1.1) wurden die Zellen aus zwei Schalen pro Ansatz abgelöst (2.4.1.2) und die Zellzahl bestimmt (2.4.1.3); im Fall des Ansatzes mit 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden für die Ermittlung des 24 h-Werts vier Schalen verwendet.

Die Verdopplungszeit  $t_v$  wurde durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der Zellzahl gegen die Inkubationszeit ermittelt, indem die Steigung  $m$  des linearen Bereichs (22 - 49 h) bestimmt wurde. Die Berechnung erfolgte entsprechend Formel (3).

$$t_v = \ln 2/m \quad (3)$$

#### 2.4.5 Bestimmung der SULT-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Hierfür wurden die aus dem Experiment zur Bestimmung der Verdopplungszeit abgelösten Zellen verwendet (2.4.4), d.h. die Expression wurde 24, 48 und 72 h nach Einsaat bestimmt, wobei der Einfluß der Zelldichte durch Verwendung zweier Ansätze mit unterschiedlicher Zellzahl berücksichtigt wurde. Die zytosolischen Fraktionen (2.4.2) dieser Zellen wurden nach der Proteinbestimmung (2.3.3) für die radiometrische Bestimmung der SULT-Aktivität (2.3.7) verwendet.

#### 2.4.6 Überprüfung der Stabilität der Sulfotransferase-Expression

Im Abstand von zwei bis drei Passagen wurden je  $1,5 \times 10^6$  Zellen in drei 150 cm<sup>2</sup>-Petrischalen eingesät und für 68 - 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst (2.4.1.2) und die zytosolische Fraktion präpariert (2.4.2). In ihr wurde durch Enzymaktivitätsmessung mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Naphthol als Substrat (2.3.7.1) und Immunoblotting mit dem h1B1-Antiserum (2.3.6) die SULT-Expression charakterisiert. Die Enzymaktivität wurde bis mindestens zur 20. Passage bestimmt.

#### 2.4.7 Anzucht und Fixieren von Zellen für die Immunfärbung

Für die Immunfärbung wurden die Zellen auf sterilen Objektträgern in Quadripermschalen kultiviert. Um Kolonien aus 8 - 16 Zellen zu erhalten, wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro Objektträger (20 cm<sup>2</sup>) eingesät und für 72 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und der Objektträger zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch siebenminütiges Eintauchen des Objektträgers in -20 °C kaltes Methanol fixiert. Der Objektträger wurde anschließend an der Luft getrocknet. Die Immunfärbung mit dem h1B1-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1500 in BSA erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

## 2.5 Immunhistochemie

### 2.5.1 Vorbereitung der Proben

Formalin 4 % nach Lillie (1954) (4 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und 6,5 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0)

PBS-T: PBS pH 7,4 mit 0,1 % (v/v) Triton X-100

Ethanol

Bei den Proben C27, C28 und I4 handelte es sich um Teile von größeren Gewebestücken, die aufgrund von Krankheit operativ entfernt werden mußten (Tabelle 4). Sie wurden nach Entnahme für die Immunhistochemie fixiert, während das restliche Gewebe zur Herstellung subzellulärer Fraktionen verwendet wurde. Bei der Colonprobe mit der Bezeichnung S-1, die bereits in Wachs eingebettet von der Abteilung Präventivmedizinische Lebensmittelforschung (PML) des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, handelte es sich um eine Biopsie, die am Benjamin Franklin Krankenhaus in Berlin entnommen und als "ohne Befund" diagnostiziert worden war.

Die Gewebe wurden nach der Entnahme für mindestens 24 h in 4 % Formalin gelegt und anschließend 24 h mit Leitungswasser gewässert. Das Wasser wurde im Entwässerungsautomaten gegen Toluol ausgetauscht und die Proben in Paraffin eingeschmolzen. Aus den Wachsblöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms Schnitte von 2 - 4  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Diese wurden durch Trocknen bei 37 °C auf den Objektträgern fixiert. Die Gewebeschnitte wurden durch Eintauchen des Objektträgers in Toluol vom Paraffin befreit. Letzteres wurde anschließend gegen Ethanol ausgetauscht, indem der Objektträger zweimal unter sanftem Schütteln für 10 min in Ethanol getaucht wurde. Danach wurde er für jeweils 5 min in Gefäßen mit absteigenden Konzentrationen an Ethanol (90 %, 80 %, 75 %, 50 %) und für 10 min in Wasser bewegt, um das Gewebe zu rehydrieren. Abschließend wurde der Objektträger in PBS-T überführt. Im Falle der Proben S-1 und S-2 wurden die Objektträger mit dem rehydrierten Gewebe für 5 min in 10 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0 gekocht, und nach 15 minütiger Abkühldauer in PBS-T gestellt.

### 2.5.2 Immunfärbung

Waschpuffer (PBS-T): PBS pH 7,4 mit 0,1 % (v/v) Triton X-100

Blockierungslösung: 1 % (w/v) BSA in PBS-T oder 1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T im Fall des h1A1-Antiserums

Zunächst wurde mit einem Wachsstift ein Kreis um die Gewebeschnitte gezogen, so daß von den zur Immunfärbung verwendeten Lösungen nur jeweils 40 - 80 µl eingesetzt werden mußten. Bei der Färbung von auf Objektträgern fixierten Zellen wurde die im folgenden beschriebene Prozedur im Automaten durchgeführt. Da der Nachweis letztlich über die Peroxidase-Aktivität des Sekundärantikörpers, bzw. des Avidinkonjugats erfolgte, wurden zunächst die endogenen Peroxidasen durch 5 - 10 minütige Inkubation mit 3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert. Der Schnitt, bzw. die Zellen wurden anschließend dreimal für 5 min mit PBS-T inkubiert, bevor die Blockierungslösung für 20 min aufgetropft wurde. Danach wurde die Lösung mit dem Primärantikörper (Tabelle 5) aufgetragen und über Nacht im Kühlschrank einwirken gelassen. Die Primärantikörper wurden hierzu mit der Blockierungslösung verdünnt und die optimalen Verdünnungen aus Immunfärbungen mit verschiedenen Konzentrationen ermittelt.

**Tabelle 5: Verdünnungen der Primärantikörper für die Immunhistochemie**

Antikörper gerichtet gegen	Fraktion	Vorbehandlung (2.3.9)	Verdünnung	behandelte Proben
h1B1	Serum	-	1:1000 in BSA	S-1, C27, C28, I4
h1B1	Serum	-	1:1500 in BSA	V79-SULT1B1, V79p
h1B1	IgG	h1A3-Sepharose	1:1500 in BSA	C27, C28, I4
h1B1	IgG	h1B1-Sepharose	1:1500 in BSA	C27, C28, I4
h1A1	Serum	-	1:1500 in Milchpulver	S-1, C27, C28, I4
h1A1	Serum	h1A3-Sepharose	1:1500 in Milchpulver	C27, C28, I4
h1A1	Serum	h1B1-Sepharose	1:1500 in Milchpulver	C27, C28, I4
h2A1	Serum	-	1:800 in BSA	C27, C28, I4

Am folgenden Tag wurde das Antiserum abgenommen und der Schnitt dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Für die Detektion des spezifischen Antikörpers wurde das ABC-Kit der Firma Vectastain (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Bei diesem System ist der gegen IgG aus Kaninchen gerichtete Sekundärantikörper biotinyliert und wird in einem weiteren Schritt von einem Avidin-Meerrettich-Peroxidasekonjugat gebunden. Dies erlaubt den Nachweis durch die von der Peroxidase katalysierte Farbreaktion des 3,3'-Diaminobenzidins. Die Substanz wurde entsprechend der Herstellervorschrift verdünnt, für 1 – 2 min auf das Gewebe aufgetragen und anschließend mit Wasser abgespült. Diese Methode wurde für die Untersuchungen an den Schnitten aus den Proben C27, C28 und I4 sowie für die Immunfärbung der Zellen verwendet. Bei der Probe S-1 wurde der spezifische Antikörper durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden, indem dieses für 30 min bei 37 °C in einer Verdünnung von 1:400 in Blockierungslösung auf das Gewebe aufgetropft wurde.

Anschließend wurden überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimalige Inkubation für 5 min mit PBS-T bei Raumtemperatur entfernt. Die Detektion der Peroxidase-Aktivität erfolgte ebenfalls mit 3,3'-Diaminobenzidin.

Abschließend wurde als Gegenfärbung eine Chromatinfärbung mit Methylgrün nach Pappenheim (1908) durchgeführt. Die Färbelösung (0,8 % (w/v) Methylgrün in 20 % Ethanol) wurde auf 65 °C erwärmt und für 1 bis 2 min auf das Gewebe gegeben. Die Differenzierung erfolgte mit 0,05 % Essigsäure in Aceton. Anschließend wurden die Objektträger erst in Ethanol und dann in Toluol überführt. Schließlich wurde das Gewebe mit Entellan versetzt und mit einem Deckgläschen versehen.

### 2.5.3 Mikroskopie und Mikrophotographie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden im Fall der Probe S-1 mit dem Mikroskop Microphot-SA, bei allen anderen Proben mit dem Mikroskop Eclipse E1000 (2.1.1) durchgeführt. Die Proben wurden bei Verwendung der Objektive mit 20- und 40facher Vergrößerung mit dem Differentialinterferenzkontrast, bei geringerer Vergrößerung mit dem Phasenkontrast dargestellt. Die Dokumentation erfolgte mit der Videokamera Progressive 3CCD und der Software Lucia G (2.1.1).

## 2.6. Toxikologische Testmethoden

### 2.6.1. Salmonella Mutagenitätstest

Der in diesem Testsystem verwendete Indikatorstamm *Salmonella typhimurium* TA1538 ist aufgrund einer Leseraster-Mutation im Histidin-Operon (*hisD3052*) Histidin-auxotroph und kann nur auf Histidin-supplementiertem Agar wachsen. Wird unter Einwirkung eines Mutagens der korrekte Leserahmen wiederhergestellt, ist auch ein von Histidin unabhängiges Wachstum möglich. Diese Eigenschaft ermöglicht die Selektion von Mutanten durch Ausplattieren der Bakterien auf Minimalnährböden. Substanzen wurden in TA1538 und in den die verschiedenen Sulfotransferasen exprimierenden Stämmen TA1538-SULT nach der 20 min-Präinkubationsmethode von Maron und Ames (1983) getestet, wobei die Sensitivität durch die Verwendung der fünffachen Bakteriendichte gesteigert wurde. Die Testsubstanzen wurden frisch eingewogen und so in DMSO gelöst, daß pro Inkubation 10 µl zugesetzt wurden.

Die Spontanmutationsrate wurde in Inkubationen mit 10 µl Lösungsmittel bestimmt. Die Inkubationen erfolgten in dreifacher Bestimmung, die spezifische Mutagenität wurde aus dem linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet.

### 2.6.2 HPRT-Genmutationstest mit V79-1B1- und V79p-Zellen

Der HPRT-Test wurde entsprechend dem für V79-Zellen publizierten Protokoll (Glatt, 1993) durchgeführt. Die gentoxische Wirkung einer Testsubstanz wird durch den Funktionsverlust der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) angezeigt. Dieser schützt Zellen mit Mutationen im HPRT-Gen vor dem Einbau des Guaninanalogs 6-Thioguanin, während normale Zellen sterben. Für diesen Test wurden die Zelllinien V79p sowie die Sulfotransferase-exprimierenden Zelllinien V79-h1B1 und V79-r1B1/A und -/B eingesetzt.

Am ersten Tag wurden pro getestete Konzentration in zwei Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm je  $1,5 \times 10^6$  Zellen eingesät. 18 h später wurden die Testsubstanzen in 60 µl DMSO gelöst und dem Medium der Testkulturen für 24 h zugesetzt. Der Volumenanteil des Lösemittels im Kulturmedium betrug 0,2 %. Als Positivkontrolle wurde *anti*-Chrysen-1,2-dihydrodiol-3,4-oxid in einer Konzentration von 5 µM verwendet. Die mutagene Wirkung dieser Substanz bedarf keiner metabolischen Aktivierung.

Nach der Exposition wurden die Zellen 48 h in frischem Medium kultiviert, um für die Selektion den Abbau der noch vorhandenen HPRT abzuwarten. Anschließend wurden die Zellen zur Erfassung der zytotoxischen Wirkung abgelöst (2.4.1.2) und die Zellzahlen in den Kulturen von Testsubstanz und Lösemittelkontrolle gemessen (2.4.1.3).  $3 \times 10^6$  dieser Zellen wurden zu 30 ml Medium in eine Petrischale (d = 14 cm) gegeben und für 72 Stunden kultiviert. Anschließend wurden aus jeder Petrischale zum einen je  $10^6$  Zellen in sechs Petrischalen (d = 14 cm) mit Selektionsmedium und zum anderen je  $10^2$  Zellen in drei Petrischalen (d = 5 cm) mit DMEM Medium eingesät. Letzteres diente der Bestimmung der Klonierungseffizienz. Die Kolonien konnten zwischen dem 17. und 20. Tag gezählt werden. Die Mutantenfrequenz (Mf) einer Kultur i berechnet sich wie folgt aus den mittleren Kolonienzahlen:

$$MF(i) = \frac{\text{Kolonien}_{\text{Selektionsplatten}(i)}}{\text{Kolonien}_{\text{Klonierungseffizienzplatten}(i)} \cdot 10000} \quad (4)$$

Die Mutantenfrequenz wird pro  $10^6$  Zellen angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt des Menschen

##### 3.1.1 Identifizierung

###### 3.1.1.1 Identifizierung der SULT-Formen im Gastrointestinaltrakt durch Immunblot-Analyse

Alle bekannten Sulfotransferasen des Menschen, die zur Zeit der Durchführung dieser Studie bekannt waren, standen in rekombinanter Form, exprimiert in *Salmonella typhimurium* TA1538, zur Verfügung. Außerdem wurden die Formen h1B1, h1A1 und h1A3 durch Überexpression (2.3.8) als lösliche Proteine und in Form von „Inclusion Bodies“ gewonnen, wobei es sich insbesondere bei den letzteren um nahezu reine Sulfotransferasen handelt (Anhang A1). Die zytosolischen Fraktionen aus Kulturen der verschiedenen Bakterienstämme sowie humaner Leber dienten als Referenzen für die immunologische Detektion. Zudem wurden die Fraktionen der „Inclusion Bodies“ als Mengenstandard eingesetzt.

Für die Identifizierung der SULT-Formen durch Immunblot-Analyse wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt, auf eine Blotmembran transferiert und mit den spezifischen Antiseren inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers. Die hierfür verwendeten Mengen an zytosolischem Protein wurden so ausgewählt, daß sie Signale vergleichbarer Intensität ergaben.

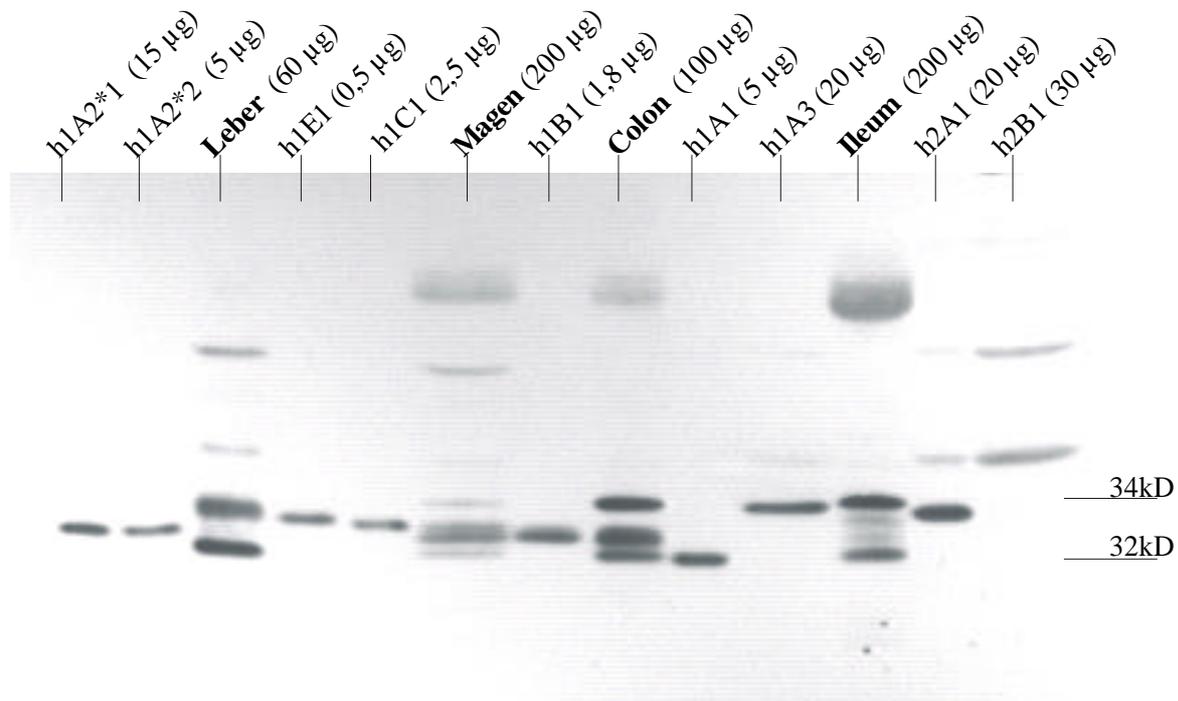
Durch die Verwendung von Antiseren, die für eine oder wenige Formen selektiv waren, konnte untersucht werden, ob Migrationsverhalten und Immunreaktivität der heterolog und im humanen Gewebe exprimierten Sulfotransferasen übereinstimmen (Anhang A3). Im Rahmen dieser Experimente wurde gleichzeitig die Selektivität der Antiseren überprüft. Bei den Formen h1A1, h1A3, h1B1 und h2A1, die unter Verwendung von für diese Formen selektiven Antiseren (2.1.2.3, Anhang A3) nachgewiesen wurden, war das Migrationsverhalten unabhängig davon, ob die einzelne Form in TA1538-SULT oder im Gewebe exprimiert wurde. Im Fall von h1E1, die nur durch das r1E1-Antiserum detektiert werden konnte, fanden sich Banden mit vergleichbarem  $M_{app}$  von 33,5kD in den Spuren von TA1538-h1E1, Leber und Ileum (Abb. 3 und 4). Da von anderen Autoren die Expression von h1E1 in der Leber und im Jejunum schon beschrieben wurde (Falany *et al.*, 1995) (Her *et al.*, 1996), ist davon auszugehen, daß die detektierten Proteine tatsächlich h1E1 darstellen und rekombinante h1E1 das gleiche  $M_{app}$  hat wie die im humanen Gewebe exprimierte. Schwache

Signale, die auf die h1E1 zurückzuführen sein könnten, wurden in den Spuren von Coecum und Jejunum detektiert (Abb. 4 und 7).

Die Detektion von h1C1 war ebenfalls ausschließlich mit diesem Antiserum möglich: Eine mit der h1C1-Referenz komigrierende Bande ist in der Fraktion aus der Mucosa des Magens zu sehen (Abb. 3). Die mRNA der h1C1 wurde in diesem Organ nachgewiesen (Her *et al.*, 1997).

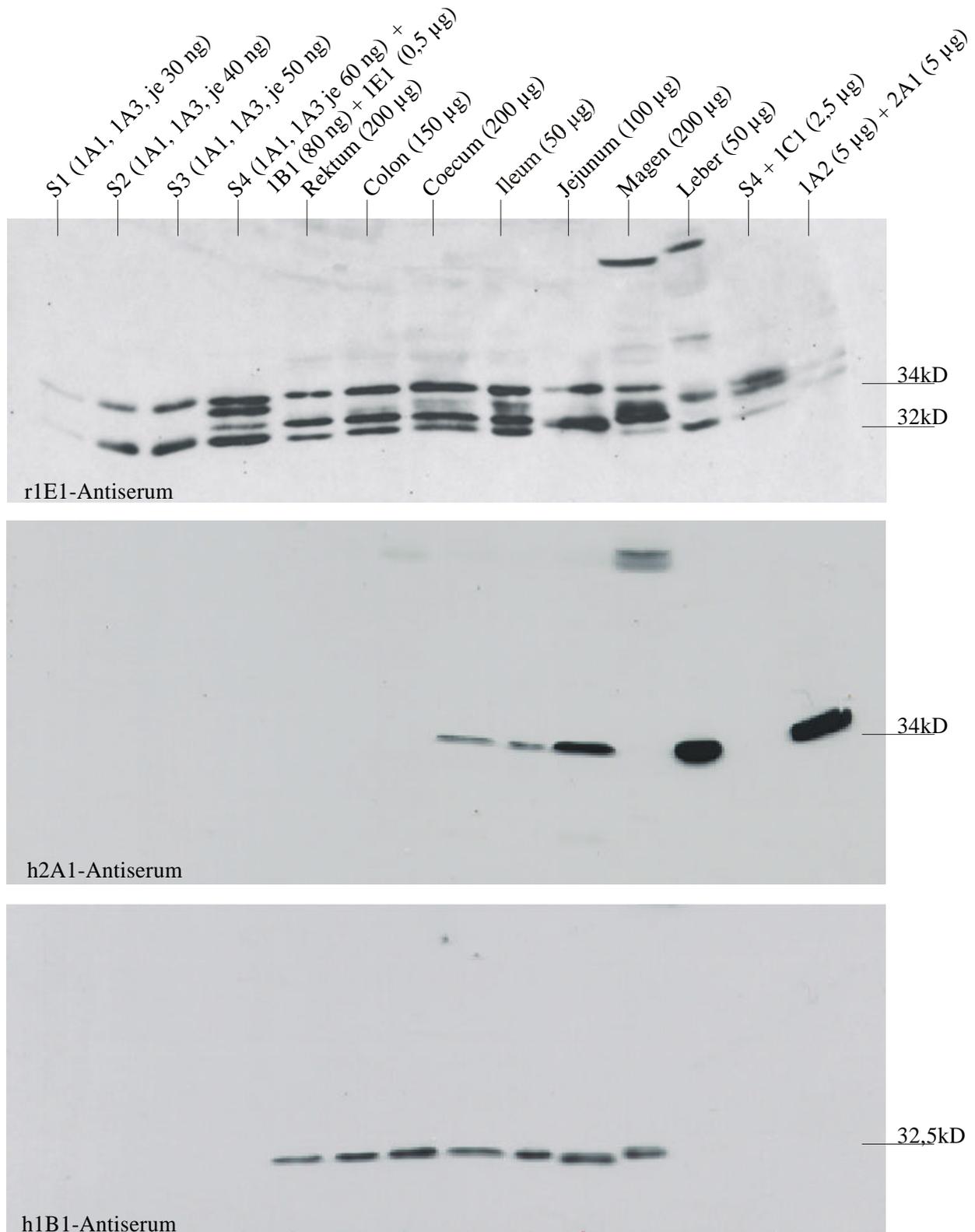
Das r1E1-Antiserum erkannte, wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, alle zu diesem Zeitpunkt bekannten humanen Sulfotransferasen der Familie 1 sowie die Form h2A1. Das apparente Molekulargewicht ( $M_{app}$ ) der einzelnen Formen lag in einem Bereich von 32 - 34kDa. Manche von ihnen, wie z.B. h1A1 und h1A3 wurden sehr viel besser voneinander getrennt, als es aufgrund des aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichts zu erwarten gewesen wäre und konnten daher gut unterschieden werden. Im Gegensatz hierzu könnte eine Bande mit einem  $M_{app}$  von 32,5kDa sowohl der h1B1 als auch der h1A2 zugeordnet werden. Bei Verwendung weiterer Antiseren, die für h1B1, bzw. h1A-Formen selektiv sind (Anhang A3, Abb. 4), konnte gezeigt werden, daß das Protein von 32,5kD lediglich durch das h1B1- Antiserum detektiert wurde.

Die weiteren Untersuchungen mit den für einzelne Formen selektiven Antiseren sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Formen h1A1, h1A3 und h1B1 wurden in den zytosolischen Fraktionen aller Darmabschnitte sowie des Magens nachgewiesen.



**Abbildung 3: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus TA1538-hSULT und humanem Gewebe unter Verwendung des gegen r1E1 gerichteten Antiserums**

Die Proben wurden in den angegebenen Proteinmengen durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Immunkonjugate wurden durch einen mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in Kombination mit der Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



**Abbildung 4: Detektion von SULT in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts und in TA1538-h1A2, -1E1 und -2A1 (1A2, 1E1 und 2A1) unter Verwendung der angegebenen Antiseren**

Die Proben wurden in den angegebenen Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Als Standards (S1 - S4) wurden die „Inclusion Bodies“ von h1A1, h1A3 und h1B1 eingesetzt. Die für Colon und Ileum eingesetzten Proben C27 und I4 stammen von demselben Patienten; für Rektum wurde die Probe R10 verwendet.

### 3.1.1.2 Nachweis von SULT im GI-Trakt durch Enzymaktivitätsmessungen

Aufgrund der überlappenden Substratspezifität war der spezifische Nachweis einer bestimmten Form durch Enzymaktivitätsmessungen lediglich in zwei Fällen möglich:  $\beta$ -Östradiol ist bei einer Konzentration von 20 nM nur für die h1E1 ein gutes Substrat, während Dehydroepiandrosteron (DHEA) bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M bevorzugt durch die h2A1 umgesetzt wird. Um das Ausmaß der nicht auf diese beiden Formen zurückzuführenden Produktbildung im Colon zu erfassen, wurden die Messungen mit einem Gemisch (SULT-Referenz) aus den Formen h1A1, h1A3 und h1B1 durchgeführt. Hierfür wurden zu 100  $\mu$ g zytosolischem Protein aus V79-Zellen die Mengen an überexprimierter h1A1\*R, h1A3 und h1B1 gegeben, wie sie in 100  $\mu$ g zytosolischem Protein aus einem Gemisch aus für h1A1\*R homozygoten Colonproben (Colon-Pool) durch Immunodetektion zu finden sind (Anhang A2).

#### **Tabelle 6: Nachweis der Enzymaktivitäten von h1E1 und h2A1 in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts**

Als SULT-Referenz diente ein Gemisch aus überexprimierter h1A1\*R, h1A3 und h1B1 (2.3.8) sowie der zytosolischen Fraktion aus V79-Zellen. Es zeigte bei der Immunblot-Analyse sehr ähnliche Signale wie ein Gemisch zytosolischer Fraktionen aus humanen Colonproben, die homozygot für *h1A1\*R* sind (Colon-Pool, Anhang A2). Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus zwei Enzymaktivitätsmessungen (2.3.7.2).

	Enzymaktivität in der zytosolischen Fraktion [pmol/mg/min]	
	$\beta$ -Östradiol (20 nM) (h1E1-Aktivität)	DHEA (3 $\mu$ M) (h2A1-Aktivität)
SULT-Referenz (h1A1, -1A3 und -1B1)	0,11 $\pm$ 0,04	1,4 $\pm$ 0,3
Rektum (R8)	0,07 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,1
Colon (Colon-Pool)	0,04 $\pm$ 0,01	1,8 $\pm$ 0,1
Coecum <sup>1</sup>	0,6 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 4
Ileum (I4)	8,6 $\pm$ 0,7	35 $\pm$ 2
Jejunum <sup>1</sup>	2,0 $\pm$ 0,2	81 $\pm$ 13
Magen <sup>1</sup>	0,13 $\pm$ 0,03	2,7 $\pm$ 1,1
Leber (L(w))	8,7 $\pm$ 0,1	372 $\pm$ 9

<sup>1</sup>Von diesem Gewebe stand nur eine Probe zur Verfügung.

Vergleicht man die gemessenen Enzymaktivitäten (Tabelle 6) mit den Signalstärken der Banden von h1E1 (33kD), beziehungsweise h2A1 (34kD) in Abbildung 4, findet man insbesondere für die h2A1 eine gute Korrelation. In 50 µg der zytosolischen Fraktion der Leber ist die zwei- bis dreifache Menge an Immunreaktivität enthalten wie in 100 µg des Jejunums, woraus sich ein Unterschied um den Faktor von 4 - 6 ergibt. In der mit DHEA bestimmten Enzymaktivität unterscheiden sich die beiden Proben um den Faktor 4,6. Eine ähnlich gute Übereinstimmung findet man beim weiteren Vergleich: Jejunum und Ileum unterscheiden sich in der Immunreaktivität um den Faktor 2 - 4, bei der Enzymaktivität beträgt er 2,3. Die Probe aus dem Ileum enthält die 2 - 4fache Menge an Immunreaktivität und die 3,5fache Menge an Enzymaktivität im Vergleich zur Probe aus dem Coecum.

Bei der h1E1 ist diese Art von Vergleich aufgrund der schwachen Immunreaktivität und der zusätzlichen Banden nur bedingt durchführbar. Die Intensität der h1E1-Bande ist in den Spuren von Leber und Ileum bei gleicher Proteinmenge ähnlich. Dies stimmt damit überein, daß die mit  $\beta$ -Östradiol bestimmte Enzymaktivität (Tabelle 6) keinen Unterschied zwischen Leber und Ileum zeigt. Im Gegensatz dazu ist die Immunreaktivität im Coecum um den Faktor 8 - 16 schwächer, die Enzymaktivität beträgt ein Vierzehntel.

### 3.1.1.3 Nachweis von SULT durch RT-PCR

Aus der aus Probe R5 isolierten RNA wurde durch RT-PCR mit für h1B1 spezifischen Oligonukleotiden (2.2.7) ein Produkt erhalten, dessen Sequenz mit der von Wang et al. publizierten (1998) (GenBank-Nr. U95726) übereinstimmt. Im Gegensatz zu der von Fujita et al. publizierten (1997) (GenBank-Nr. D89479) kodiert Codon 186 für Glu anstelle von Gly.

Mit für h1C1 spezifischen Oligonukleotiden konnte aus der gleichen Probe kein Produkt amplifiziert werden.

**Tabelle 8: Expression von SULT in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts**

(Abkürzungen für die Antiseren: r1E1 = AS-I, h1A1 = AS-II, h1A1- Peptid = AS-III, h1A3-Peptid = AS-IV, h1B1 = AS-V und h2A1 = AS-VI)

Die Immunblotanalyse mit AS-I, -II, -V und -VI wurde mit allen zur Verfügung stehenden Proben (n) mit qualitativ gleichem Ergebnis durchgeführt. Für die Bestimmung der Enzymaktivität und die Immunblot-Analyse mit AS-III und -IV wurden einzelne Proben verwendet (vgl. Tabelle 6).

	<b>h1A1</b>	<b>h1A2</b>	<b>h1A3</b>	<b>h1B1</b>	<b>h1C1</b>	<b>h1E1</b>	<b>h2A1</b>
<b>M<sub>app</sub></b>	32kD	32,5kD	34kD	32,5kD	33kD	33,5kD	34kD
<b>Nachweis</b>	AS-I, -II und -III	AS-I, -II und -III	AS-I, -II und -IV	AS-I und -V	AS-I	AS-I	AS-I und -VI
						Enzymaktivität	
<b>Gewebe</b>							
Rektum n = 8	+	-	+	+	- <sup>a</sup>	-	-
Colon n = 23 <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	-	-
Coecum n = 1	+	-	+	+	-	+	+
Ileum n = 5	+	-	+	+	(-) <sup>c</sup>	+	+
Jejunum n = 1	(-) <sup>d</sup>	-	+	+	-	+	+
Magen n = 1	+	-	+	+	+	-	-

<sup>a</sup>Durch RT-PCR mit für h1C1 spezifischen Oligonukleotiden konnte keine h1C1 mRNA nachgewiesen werden.

<sup>b</sup>In einer weiteren, als einzige von einem Patienten mit Colitis Ulcerosa stammenden Probe konnten keine SULT detektiert werden.

<sup>c</sup>Aus der Immunblot-Analyse ist keine eindeutige Aussage abzuleiten (Abb. 4)

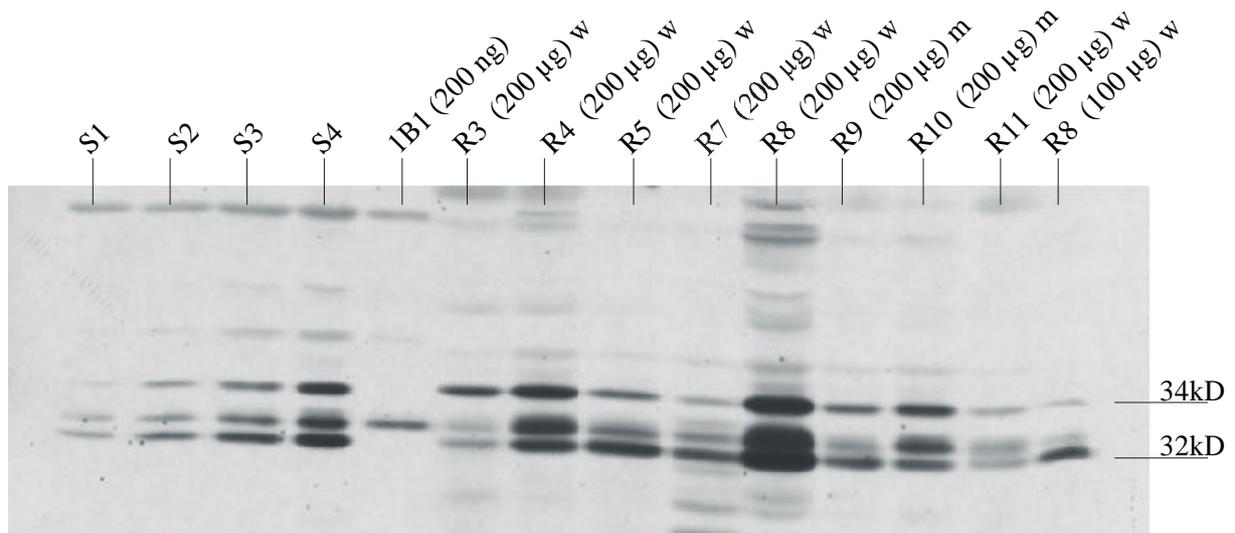
<sup>d</sup>Enzymaktivität der h1A1 wurde im Jejunum beschrieben (Sundaram *et al.*, 1989).

### 3.1.2 Expression von Sulfotransferasen in verschiedenen Individuen

#### 3.1.2.1 Vergleich des Expressionsniveaus in verschiedenen Dickdarmproben

Die zytosolischen Fraktionen aller Darmproben wurden durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blotting und Immunodetektion auf die Expression von Sulfotransferasen untersucht. Hierfür wurden die Proben gemeinsam mit einem Standard aus den „Inclusion Bodies“-Fraktionen von h1A1 und h1A3 (30, 40, 50 und 60 ng) sowie h1B1 (100, 120, 140 und 160 ng) aufgetragen. Die von den Gewebeproben eingesetzten Proteinmengen wurden so gewählt, daß die Intensitäten der Chemolumineszenz-Signale mit denen der Standards vergleichbar waren (Abb. 5 und 6 sowie Anhang A4 - A7). In allen Proben mit Ausnahme von Probe C5, die als einzige von einem Patienten mit Colitis Ulcerosa stammt, wurden die bereits identifizierten Formen (Abb. 3) gefunden. Anhand der Standards läßt sich abschätzen, in welcher Menge die SULT-Formen im zytosolischen Protein vorliegen. Um mit den Standardproben vergleichbare Signale zu erhalten, mußten von den Colonproben zwischen 100 µg und 400 µg und von den Rektumproben 200 µg an zytosolischem Protein aufgetragen werden. Bei zwei Drittel der Dickdarmproben wurden 200 µg Protein verwendet, deren SULT-Menge wurde auf 0,15 - 0,3 Promille für die h1A1 und h1A3 sowie 0,6 - 0,8 Promille für die h1B1 berechnet. Die restlichen Proben hatten etwa die doppelte Menge an immunoreaktivem Protein (C8, C9, C11, C13 und R8) oder ein Viertel bis ein Drittel (C16, C17, C21, C25 und C15). Während der Gehalt zwischen den verschiedenen zytosolischen Fraktionen bis zu einem Faktor von 8 - 10 schwankte, war das Verhältnis der einzelnen Formen innerhalb einer Fraktion viel ähnlicher. Ausnahmen sind die Proben R3 und R9, in denen die h1B1 im Vergleich zu den anderen Proben nur halb so stark exprimiert war. Außerdem war die h1A1 im Verhältnis zu den anderen Formen in mehreren Proben (R3, C11, C14, C17, C18, C20, C24, C26) um die Hälfte erniedrigt.

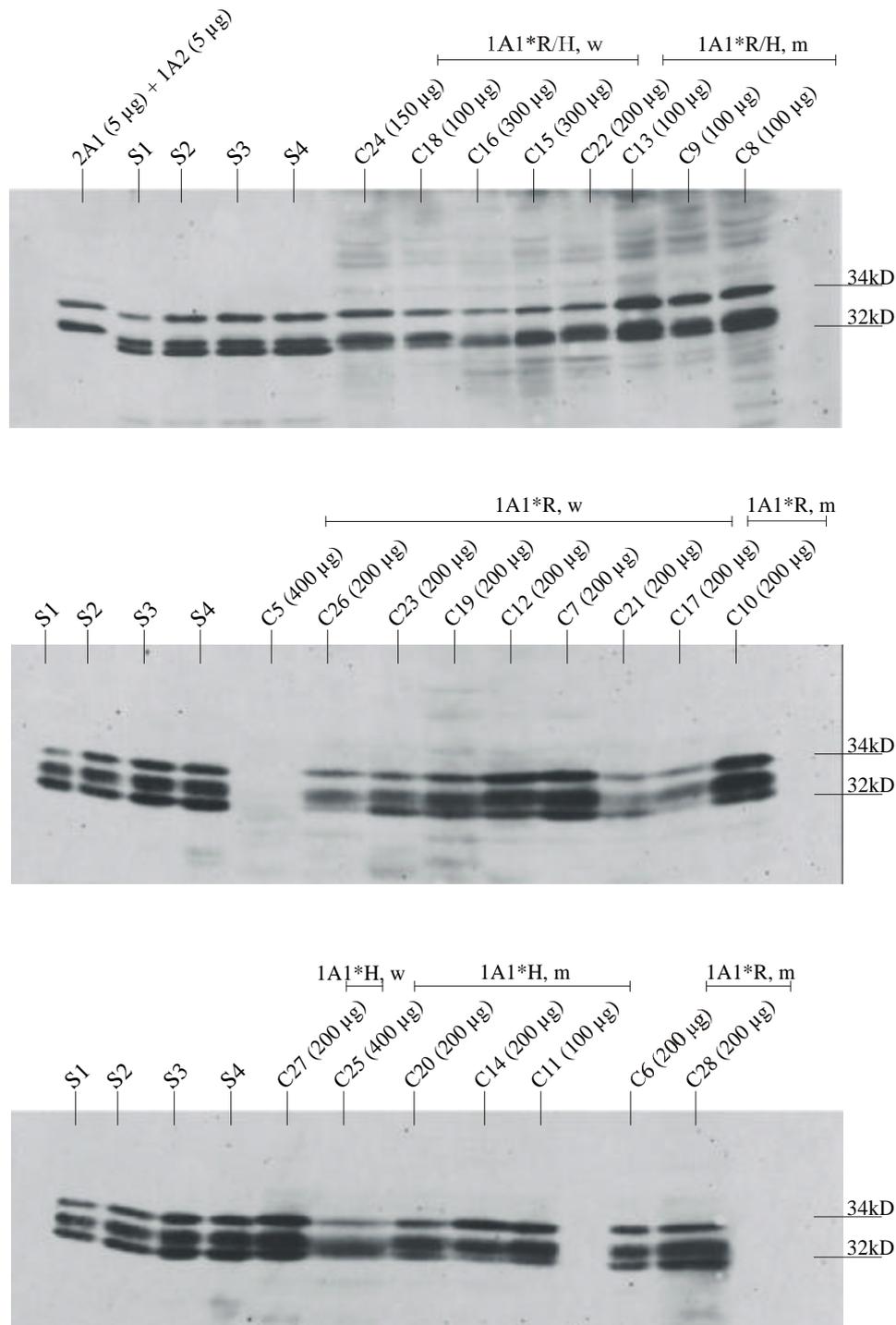
Der größte Anteil an Darmproben stammt von Patienten, die aufgrund einer Neoplasien operiert werden mußten. Bei den restlichen Proben waren chronisch entzündliche Prozesse der Grund für die Entnahme: Sigma-Divertikulitis (C9, C11, C16 und C17) und Colitis Ulcerosa (C5). Der Gehalt an SULT in den Dickdarmproben von Divertikulitispatienten, Krebspatienten, von im Alter von 33 - 50 oder 56 - 76 Jahren operierten Patienten, Männern oder Frauen variierte gleichermaßen innerhalb dieser Gruppen (Abb. 5 und 6, Anhang A4 - A7).



**Abbildung 5: Immundetektion von h1A1, h1A3 und h1B1 in Rektumproben von verschiedenen Patienten (w = weiblich, m = männlich, Tabelle 4) mit dem r1E1-Antiserum**

Die Proben wurden in den angegebenen Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

Als Standards (S1 - S4) wurden die Inclusion Bodies von h1A1 und h1A3 (je 30 ng, 40 ng, 50 ng und 60 ng) sowie von h1B1 (100 ng, 120 ng, 140 ng und 160 ng) eingesetzt.



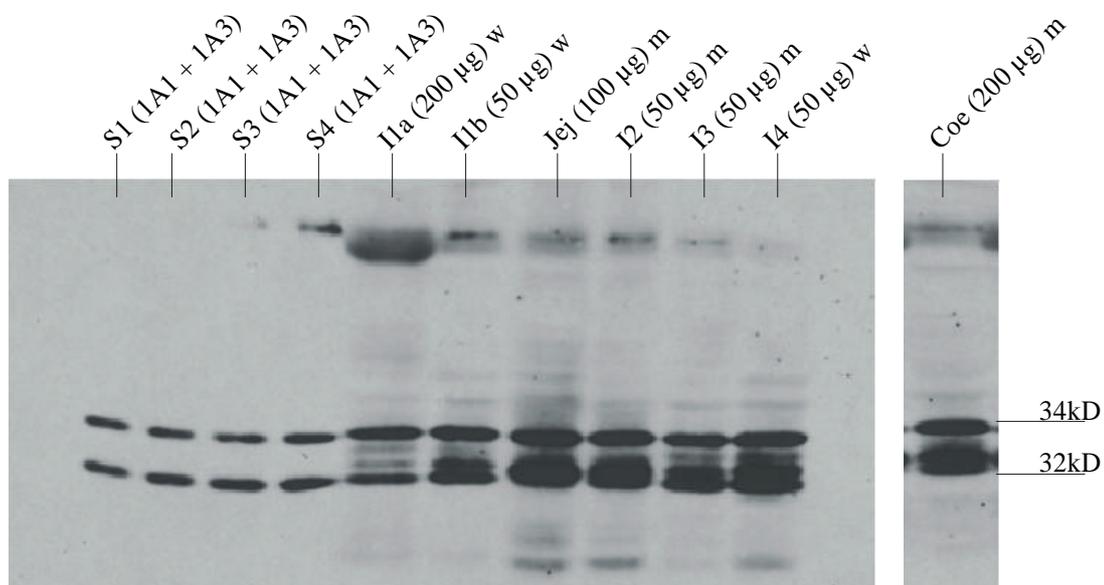
**Abbildung 6: Immundetektion von h1A1, h1A3 und h1B1 in Colonproben von verschiedenen Patienten (Tabelle 4) mit dem r1E1-Antiserum**

Die Proben wurden in den angegebenen Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Anordnung der Proben erfolgte nach Geschlecht (w, m) und h1A1-Genotyp (1A1\*H, 1A1\*R sowie 1A1\*R/H). Als Standards (S1 - S4) wurden die Inclusion Bodies von h1A1 und h1A3 (je 30 ng, 40 ng, 50 ng und 60 ng) sowie von h1B1 (100 ng, 120 ng, 140 ng und 160 ng) eingesetzt. Im obersten Teil sind zusätzlich die zytosolischen Fraktionen von TA1538-h2A1 und -h1A2 aufgetragen, da dieser Blot mit weiteren Antiseren untersucht wurde (Anhang A5 - A7).

### 3.1.2.2 Vergleich des Expressionsniveaus in verschiedenen Dünndarmproben

In vier von fünf Proben aus dem Ileum wurden durch Immunodetektion mit 50 µg zytosolischem Protein mit den Standardproben vergleichbare Mengen an Sulfotransferasen detektiert (Abb. 7). Die relativen Intensitäten der einzelnen Signale war ähnlich wie bei den Dickdarmproben, wobei mit dem verwendeten Antiserum ein zusätzliches Protein von 33,5 kD, bei dem es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die h1E1 handelt, detektiert wurde. Bei den Dickdarmproben wurden beim Großteil der Proben 200 µg für die Immundetektion in Kombination mit den Standardproben verwendet, woraus geschlossen wird, daß in den Proben aus dem Ileum in etwa die vierfache Menge der Formen h1A1, h1A3 (0,6 – 1,2 Promille) und h1B1 (2,4 – 3,2 Promille) enthalten ist. Die fünfte Probe aus Ileum (I1a), die nur ein Viertel der Immunreaktivität aufwies, stammt zwar von demselben Patienten wie Probe I1b, jedoch fiel sie bei der Aufarbeitung durch eine sehr „verwässerte“ und dünne Mucosa auf. Sie wird daher nicht als repräsentativ betrachtet.

Die h2A1 konnte in allen Proben aus dem Ileum durch Immunblotanalyse nachgewiesen werden (Anhang A8).



**Abbildung 7: Immunodetektion von h1A1, h1A3, h1B1 und h1E1 in Dünndarmproben von verschiedenen Patienten (w = weiblich, m = männlich, Tabelle 4) mit dem r1E1-Antiserum**

Die Proben wurden in den angegebenen Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Als Standards (S1 - S4) wurden die Inclusion Bodies von h1A1 und h1A3 (je 30 ng, 40 ng, 50 ng und 60 ng) eingesetzt. Die verschiedenen Abschnitte des Dünndarms sind mit I (Ileum), Jej (Jejunum) und Coe (Coecum) abgekürzt.

### 3.1.2.3 Expression und Verteilung der Allele *h1A1*\*R und *h1A1*\*H

Der *h1A1*-Genotyp wurde bestimmt, um eine möglicherweise unterschiedliche *h1A1*-Expression in den einzelnen Darmproben erklären zu können und um zu sehen, ob die Verteilung in einem Kollektiv aus Darmkrebspatienten verändert ist. Hinweise für einen möglichen Einfluß liefert eine Studie von Raftogianis et al. (1997), in der Thermostabilität und Enzymaktivität von *h1A1* in Kombination mit dem *h1A1*-Genotyp in Blutplättchen untersucht wurden. Proben mit niedriger Thermostabilität waren homozygot für *h1A1*\*H. Proben mit hoher Thermostabilität waren homozygot für *h1A1*\*R und zeigten eine im Mittel 7,7fach erhöhte Enzymaktivität (Raftogianis *et al.*, 1997).

Aus den Gewebeproben wurde DNA isoliert (2.2.2), dann wurde die Verteilung der Allele *h1A1*\*R und *h1A1*\*H untersucht (2.2.10). Von den 39 Proben von Darmkrebspatienten waren 17 (43,6%) heterozygot, 16 (41,0%) homozygot für *h1A1*\*R und 6 (15,4%) homozygot für *h1A1*\*H (Tabelle 9 und 10). Daraus berechnet sich eine Allelhäufigkeit von 0,64 für *h1A1*\*R und 0,36 für *h1A1*\*H. Ähnliche Daten wurden in einer größer angelegten Studie mit gesunden Personen (0,63 und 0,3 (Engelke *et al.*, 2000)) gefunden. Bei der geringen Anzahl der Darmproben ist die Aussagekraft der berechneten Allelhäufigkeit vergleichsweise gering.

Wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, ist die relative Intensität des *h1A1*-Signals im Vergleich zu den anderen SULT-Formen in einigen Colonproben um die Hälfte erniedrigt. Zu ihnen gehören auch, aber nicht ausschließlich die für *h1A1*\*H homozygoten Proben (C11, C14, C17, C18, C20, C24, C25 und C26).

**Tabelle 9: *h1A1*-Genotyp in Proben von Patienten mit Rektum-Karzinom**

<i>h1A1</i> -Genotyp	Proben	Anzahl
homozygot *R	R2, R4, R7, R10, R11	5
homozygot *H	R6	1
heterozygot	R1, R5, R8, R9, I1, I2, I3	7

**Tabelle 10: h1A1-Genotyp in Proben von Patienten mit Colon-Karzinom**

h1A1-Genotyp	Proben	Anzahl
homozygot *R	C1, C4, C6, C7, C10, C12, C19, C21, C23, C26, C28	11
homozygot *H	C11, C14, C20, C25, C27	5
heterozygot	C2, C8, C9, C13, C15, C19, C22, C24, C29, Coe	10

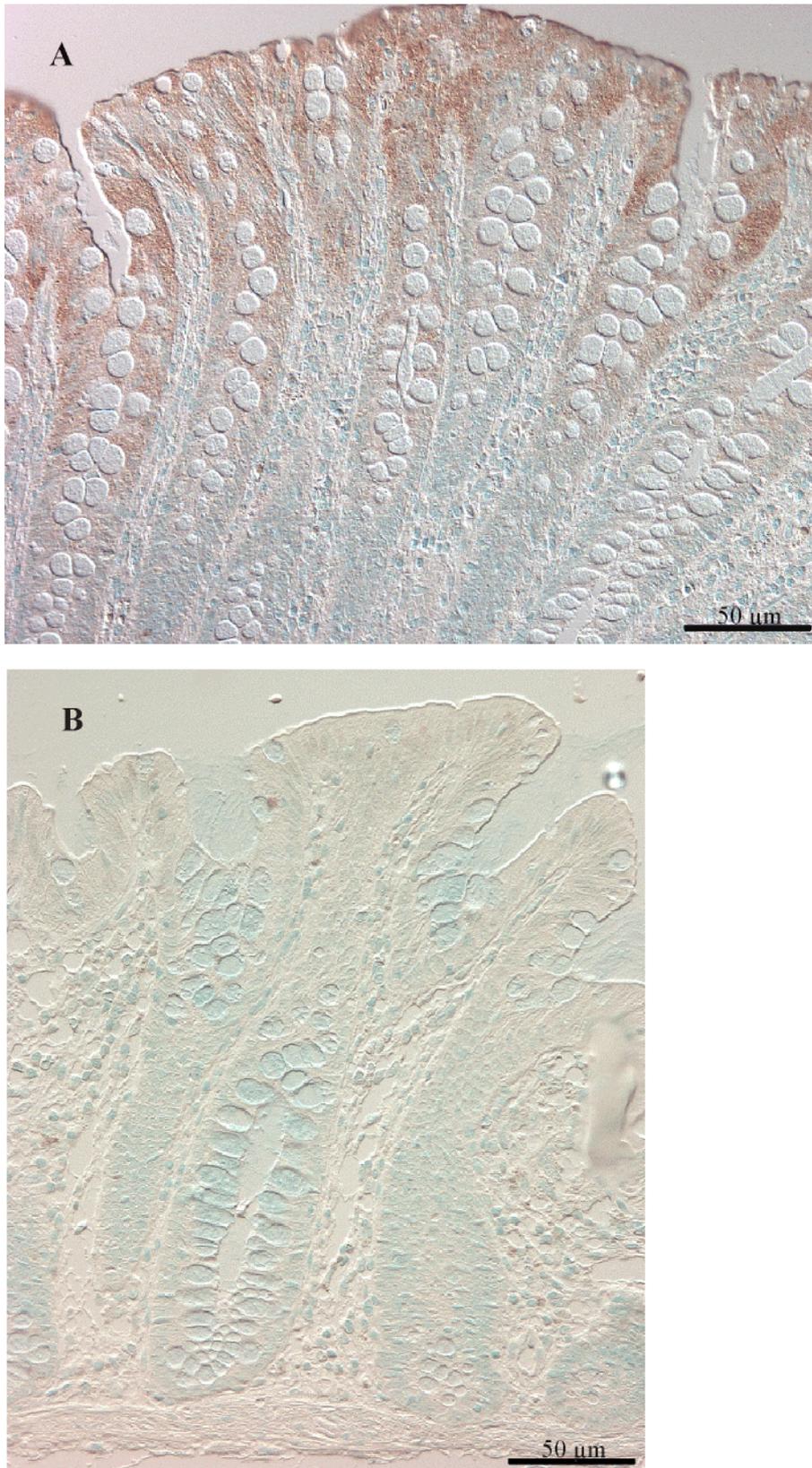
### 3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von SULT im Colon und Ileum des Mensch

#### 3. 1.3.1 Nachweis der h1B1 im Colon und Ileum

Der immunhistochemische Nachweis der h1B1 erfolgte unter Verwendung des bereits für die Untersuchung der Western Blots eingesetzten Antiserums sowie der mit h1B1- und h1A3-Sepharose vorbehandelten IgG-Fraktionen (2.3.9). Das h1B1-Antiserum detektierte in den zytosolischen Fraktionen der Proben C27, I4 und C28, von denen die immunhistochemisch untersuchten Gewebe stammten, jeweils ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 32,5kD, was dem der h1B1 entspricht (Abb. 4). Das h1B1-Antiserum zeigt eine geringe Kreuzreaktivität mit der h1E1 (Anhang A3), die jedoch nicht für die Detektion der h1E1 in den zytosolischen Fraktionen der Dünndarmproben ausreicht (Abb. 4). Um die Spezifität des h1B1-Antiserums auch für die Bedingungen bei der Immunhistochemie zeigen zu können, wurden in parallelen Ansätzen Immunfärbungen mit den vorbehandelten IgG-Fraktionen durchgeführt. Eine positive Reaktion zeigte sich mit der unbehandelten (Probe S-1, Abb. 9) und der mit h1A3-Sepharose vorinkubierten IgG-Fraktion (Abb. 8,10 - 11), nicht aber mit der, aus der die spezifischen Antikörper durch Bindung an h1B1-Sepharose entfernt worden waren (Abb. 8).

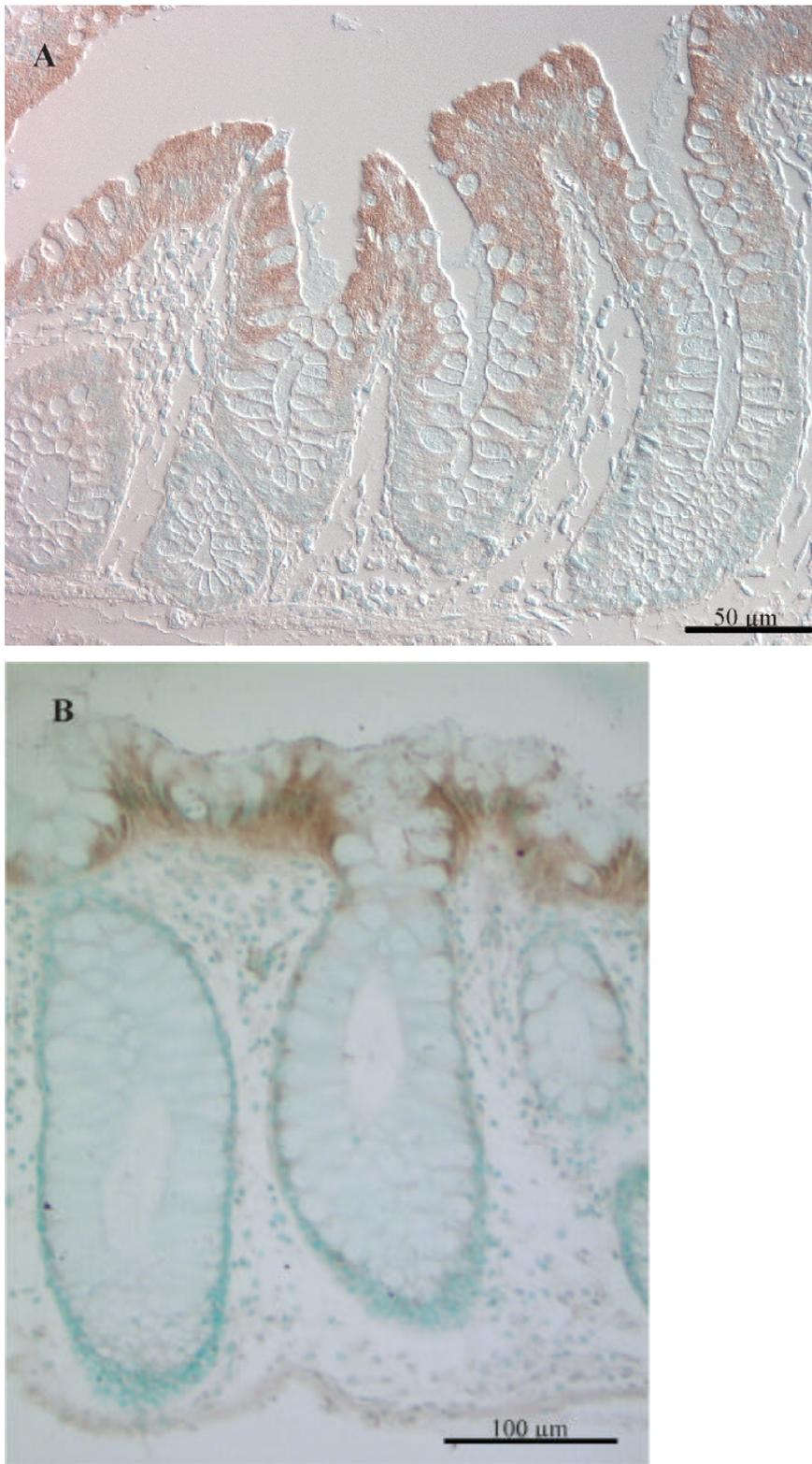
Im Ileum (Probe I4, Abb. 10) ist die Expression der h1B1, die durch die braune Farbe angezeigt wird, auf die Epithelzellen der Zotten (Villi) beschränkt. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der Chromatinfärbung mit Methylgrün türkisgrün. Unter diesen Bedingungen binden auch Mucine den Farbstoff, so daß die Taschen der Becherzellen ebenfalls schwach grün gefärbt sind.

Im Colon, das keine Zotten besitzt, ist die Expression in den Epithelzellen am stärksten und nimmt in Richtung Kryptengrund ab. An den tiefsten Stellen der Krypten tritt keine Färbung auf (Abb. 8 - 10). Im Ileum ist die Expression von h1B1 auf die Enterozyten der Villi beschränkt, in den Zellen der Krypten ist keine Färbung zu erkennen (Abb. 11).



**Abbildung 8: Nachweis von h1B1 im humanen Colon (Probe C28) mit h1B1-Antiserum, das mit h1A3-Sepharose (A) oder h1B1-Sepharose (B) vorbehandelt wurde.**

Die Detektion der Immunkonjugate wurde unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.

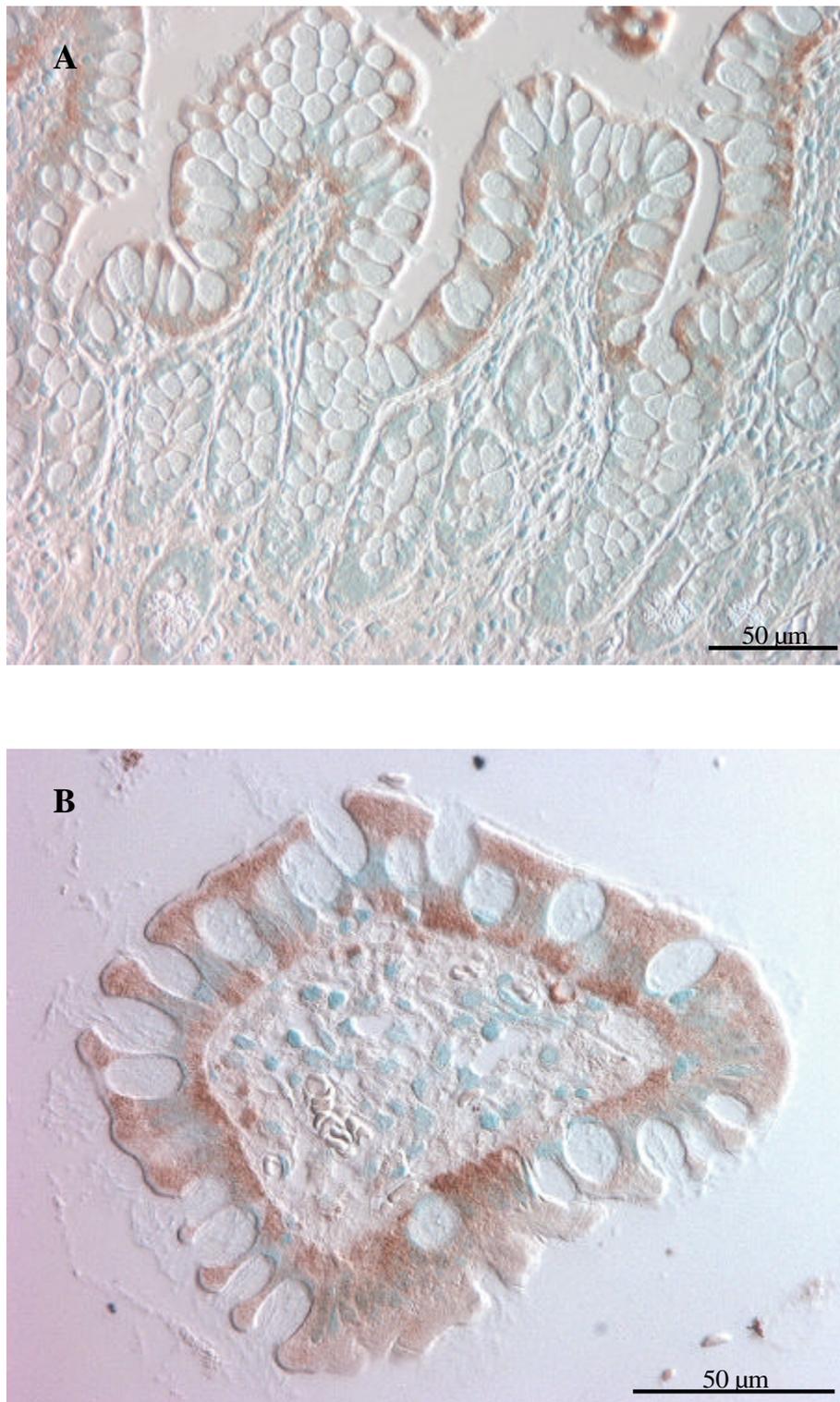


**Abbildung 9: Nachweis von h1B1 im Colon eines Darmkrebspatienten (Probe C28, A) und eines gesunden Patienten (Probe S-1, B) mit h1B1-Antiserum**

Im Fall von (A) erfolgte der Nachweis mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und einem Avidin-Peroxidase-Konjugat.

Für die Herstellung von (B) wurde der Gewebeschnitt durch Aufkochen vorbehandelt und ein mit Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.

Die Immunkonjugate werden durch die braune Farbe angezeigt. Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.



**Abbildung 10: Nachweis von h1B1 im humanen Ileum (Probe I4) mit h1B1-Antiserum**

Die Detektion der Immunkonjugate wurde unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe).

Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.

### 3.1.3.2 Nachweis der h1A1 und h1A3 im Colon und Ileum

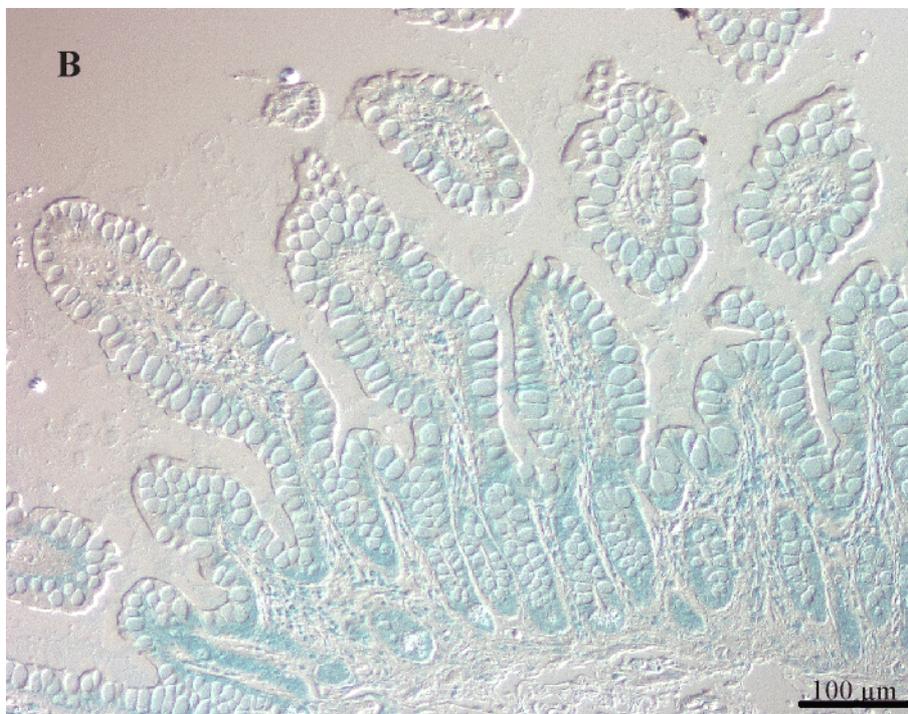
Beide Formen wurden unter Verwendung des h1A1-Antiserums nachgewiesen, das auf Western Blots die Formen h1A1, h1A2 und h1A3 erkennt, während mit anderen Formen keine Kreuzreaktivität beobachtet wurde (Anhang A3, A4, A6). Ebenso wie beim h1B1-Antiserum wurden durch Inkubation mit h1B1-Sepharose und h1A1-Sepharose Fraktionen gewonnen, die für die Formen h1A1, h1A2 und h1A3 selektive Antikörper enthielten oder nicht enthielten. Positive Reaktionen wurden sowohl mit dem nicht vorbehandelten als auch mit dem gegen h1B1-Sepharose depletierten Antiserum erhalten (Abb 12 - 15). Keine Immunfärbung wurde mit dem mit h1A1-Sepharose vorbehandelten Antiserum erzielt (Abb. 14). Die gleiche Prozedur wurde auch mit den gegen Peptide aus h1A1 und h1A3 gerichteten Antiseren und IgG-Fraktionen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß diese für die Immunhistochemie ungeeignet sind, da trotz Vorinkubation mit den entsprechenden SULT-Sepharosen Färbungen auftraten.

Die Verteilung von h1A1 und h1A3 war ähnlich der bereits für die h1B1 beobachteten: Im Ileum wurde das Zytoplasma der Epithelzellen der Zotten gefärbt, während die Krypten frei erschienen. Im Colon nahm die Expression von luminal in Richtung Kryptengrund ab. Zusätzlich wurden im Ileum deutlich die Endothelzellen der Gefäße in der Submucosa gefärbt. Im Colon war dies in vergleichbarer Intensität nur in den Gefäßen in Lymphfollikeln zu sehen.



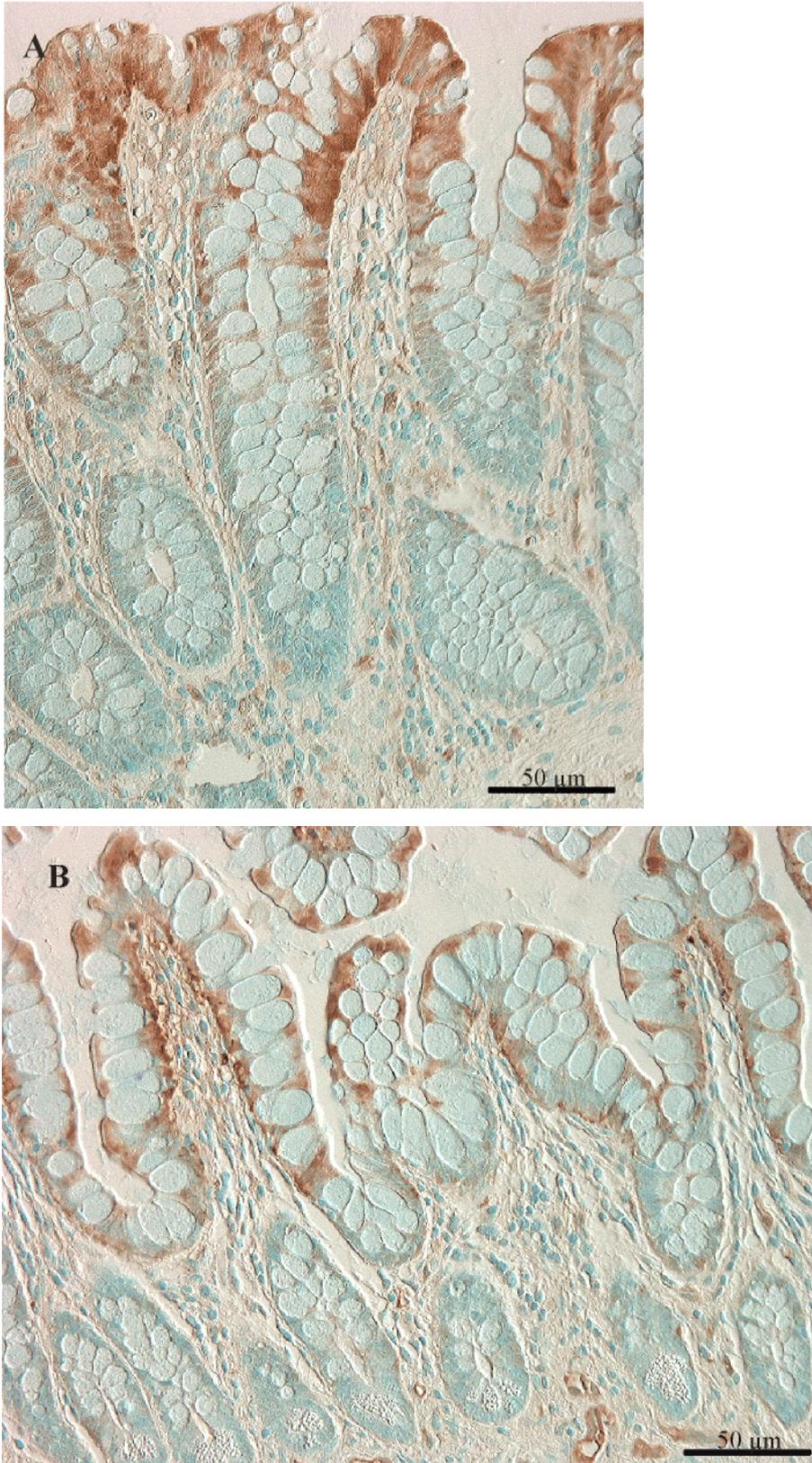
**Abbildung 11: Nachweis von h1A1 und h1A3 im humanen Ileum (Probe I4) mit h1A1-Antiserum, das mit h1B1-Sepharose vorbehandelt wurde**

Die Immunkonjugate wurden unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats detektiert (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün durchgeführt.



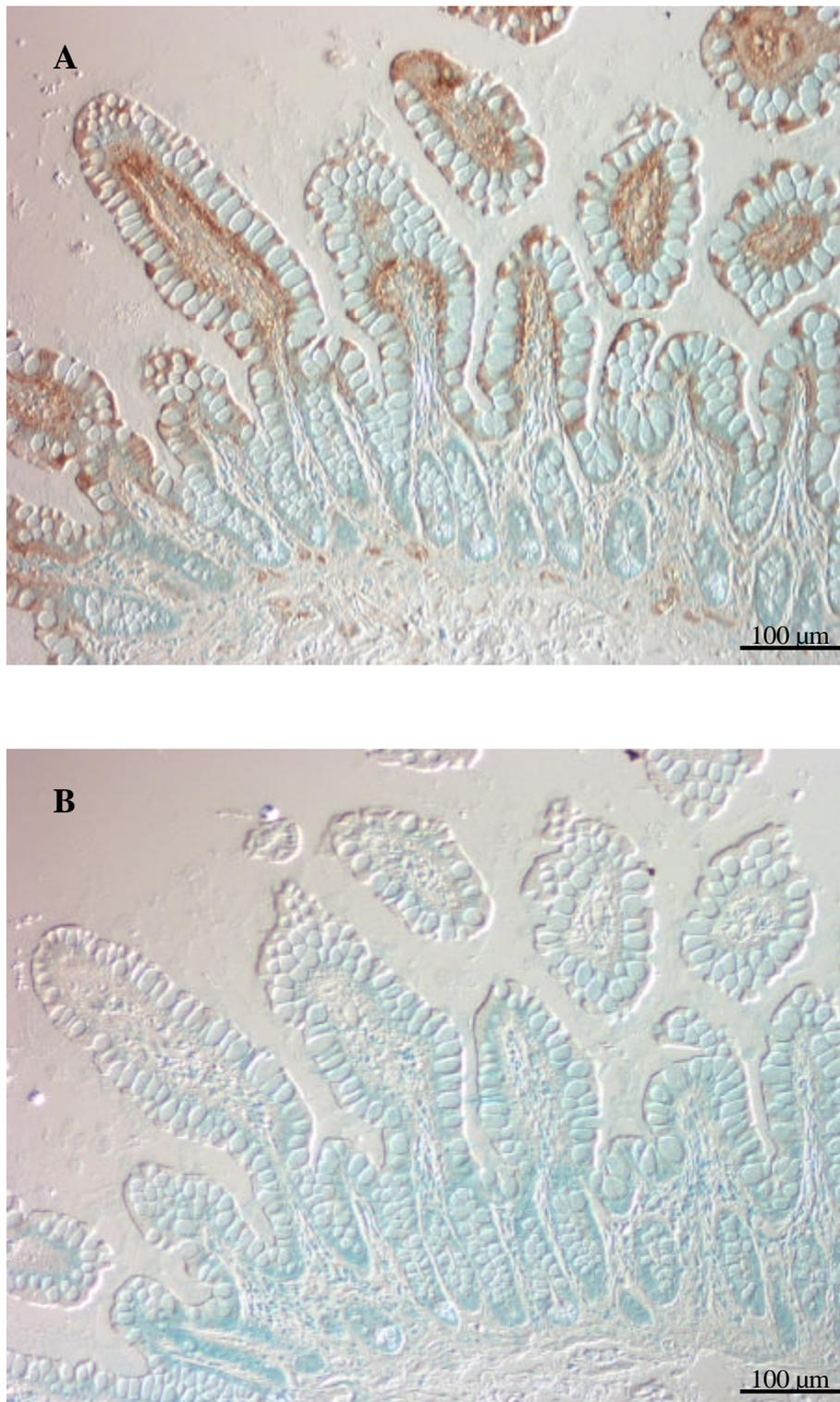
**Abbildung 12: Nachweis von h1A1 und h1A3 im humanen Ileum (Probe I4) mit h1A1-Antiserum, das mit h1A3-Sepharose vorbehandelt wurde**

Die Immunkonjugate wurden unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats detektiert (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün durchgeführt.



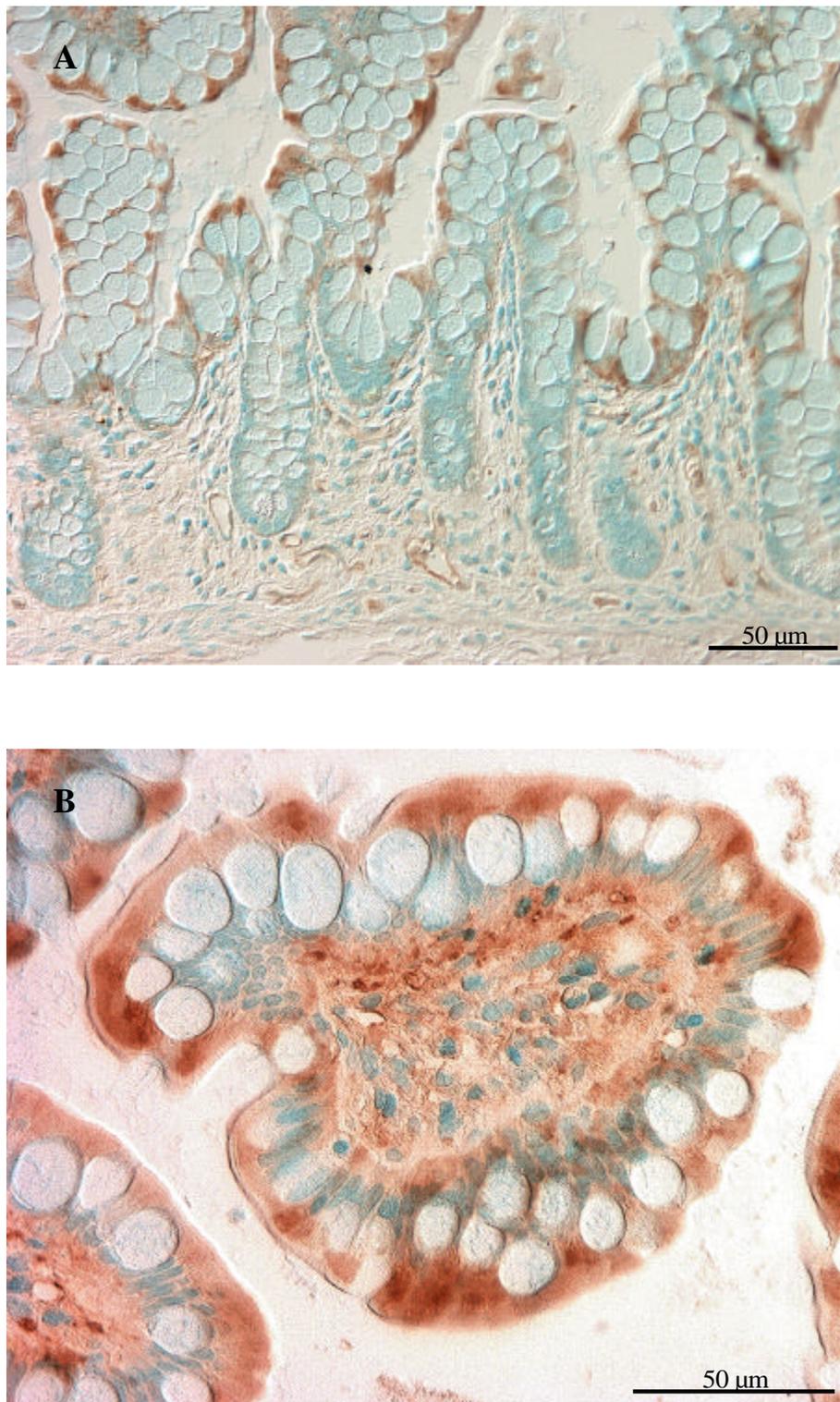
**Abbildung 13: Nachweis von h1A1 und h1A3 im humanen Colon (Probe C27, A) und Ileum (Probe I4, B) mit h1A1-Antiserum**

Die Detektion der Immunkonguate wurden unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.



**Abbildung 14: Nachweis von h1A1 und h1A3 im humanen Ileum (Probe I4) mit h1A1-Antiserum, das mit h1B1-Sepharose (A) oder h1A3-Sepharose (B) vorbehandelt wurde**

Die Detektion der Immunkonjugate wurde unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.

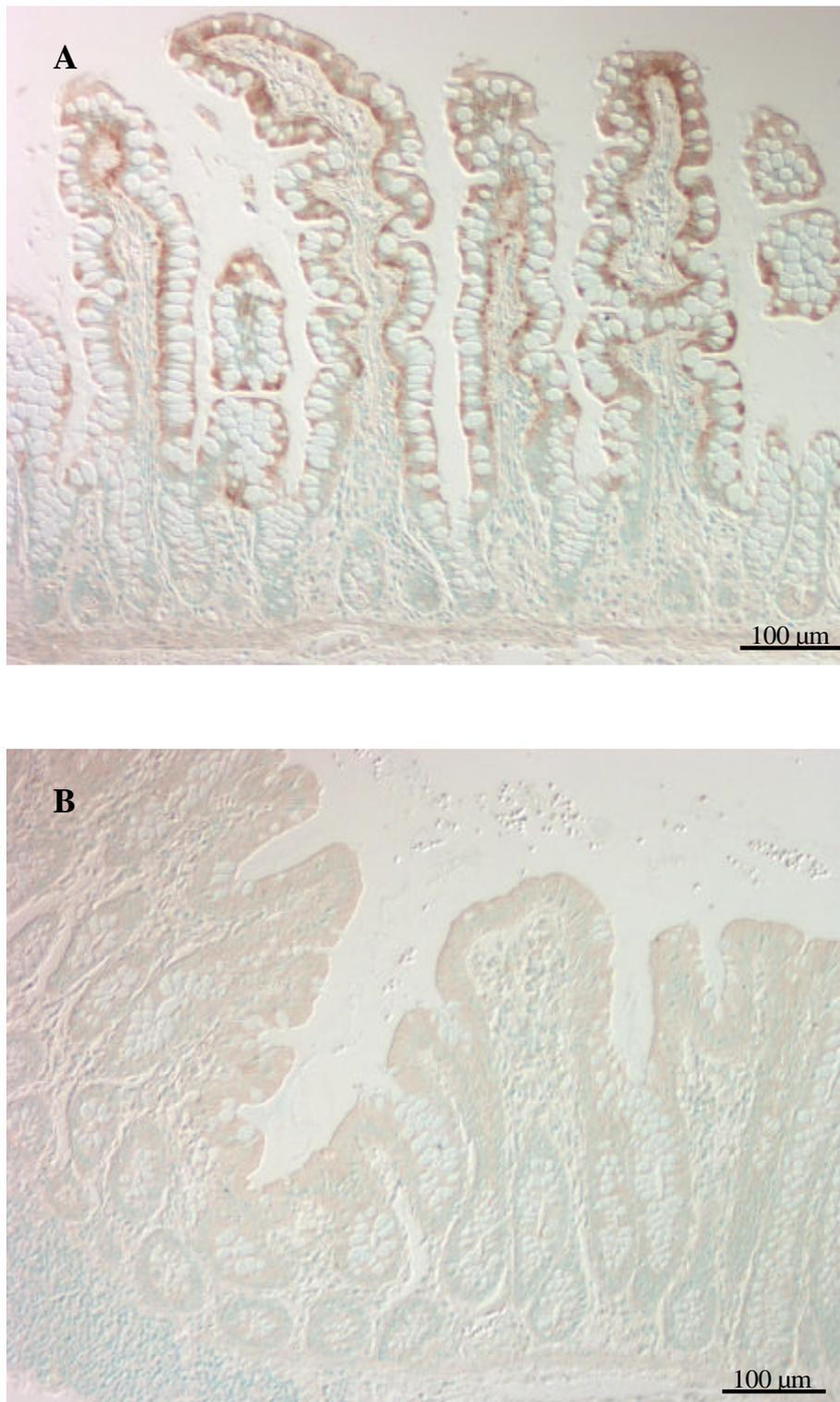


**Abbildung 15: Nachweis von h1A1 und h1A3 im humanen Ileum (Probe I4) mit h1A1-Antiserum**

Die Detektion der Immunkonjugate wurde unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.

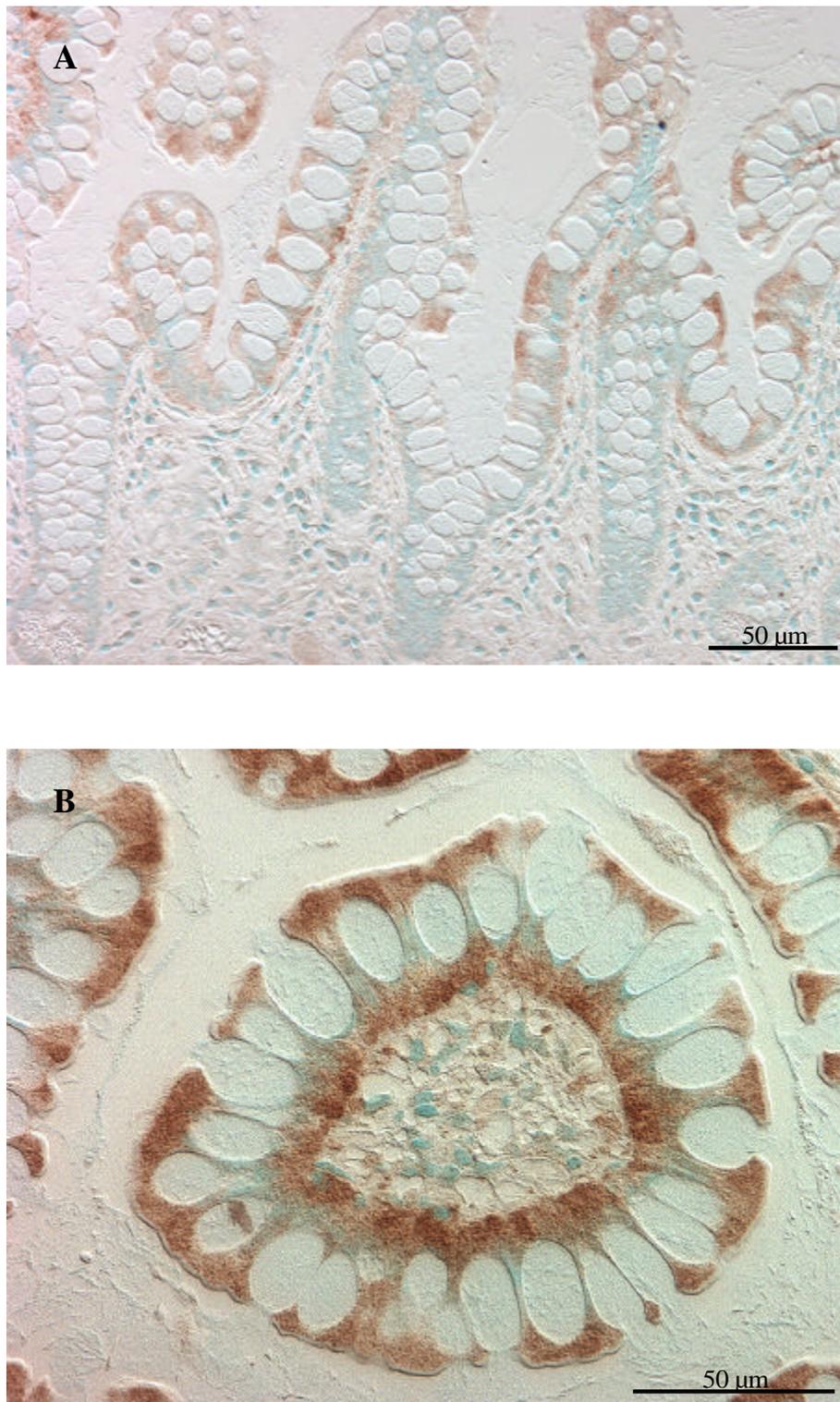
### 3.1.3.3 Nachweis der h2A1 im Colon und Ileum

Dieses Enzym wurde durch das h2A1-Antiserum nachgewiesen, das bei der Immunblot-Analyse neben der h2A1 keine weitere humane SULT erkennt (Anhang A3, A4, A7). Dieses Serum wurde keiner Vorbehandlung unterzogen, da im Colon weder Immunreaktivität noch Enzymaktivität der h2A1 nachgewiesen wurden (Abb. 4, Tabelle 6) und daher Immunfärbungen mit einer Probe aus dem Colon als Negativkontrolle dienten (Abb. 16). Tatsächlich wurde in parallel und mit dem gleichen Protokoll durchgeführten Immunfärbungen nur in Gewebeschnitten aus dem Ileum eine Farbreaktionen erhalten (Abb. 16 und 17). Es zeigte sich die gleiche Verteilung wie bei der h1B1.



**Abbildung 16: Nachweis von h2A1 im Ileum (A) im Vergleich zum Colon (B)**

Die Proben I4 (Ileum) und C27 (Colon) stammen von demselben Patienten. Verwendet wurde das h2A1-Antiserum. Die Detektion der Immunkonjugate erfolgte unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.



**Abbildung 17: Nachweis der h2A1 im humanen Ileum (Probe I4) mit h2A1-Antiserum**

Die Detektion der Immunkonjugate wurde unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Avidin-Peroxidase-Konjugats durchgeführt (braune Farbe). Als Gegenfärbung wurde die Chromatinfärbung mit Methylgrün verwendet.

### 3.2. Identifikation von Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt der Ratte

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß die Expression von SULT in der Ratte weitgehend auf die Leber beschränkt ist, und dementsprechend gut ist dieses Organ bezüglich seiner Ausstattung an SULT untersucht. Die zytosolischen Fraktionen aus Leber von weiblichen und männlichen Ratten wurden zusätzlich zu denen aus TA1538-rSULT als Referenzen für die Immunodetektion verwendet. Im Fall von r1E1 wurde von den Bakterien zusätzlich ein verkürztes r1E1-Protein gebildet. In Abbildung 18 sind daher in der entsprechenden Spur zwei Banden zu sehen. Als Referenz für die r1B1 wurde die zytosolische Fraktion aus V79-r1B1/A verwendet.

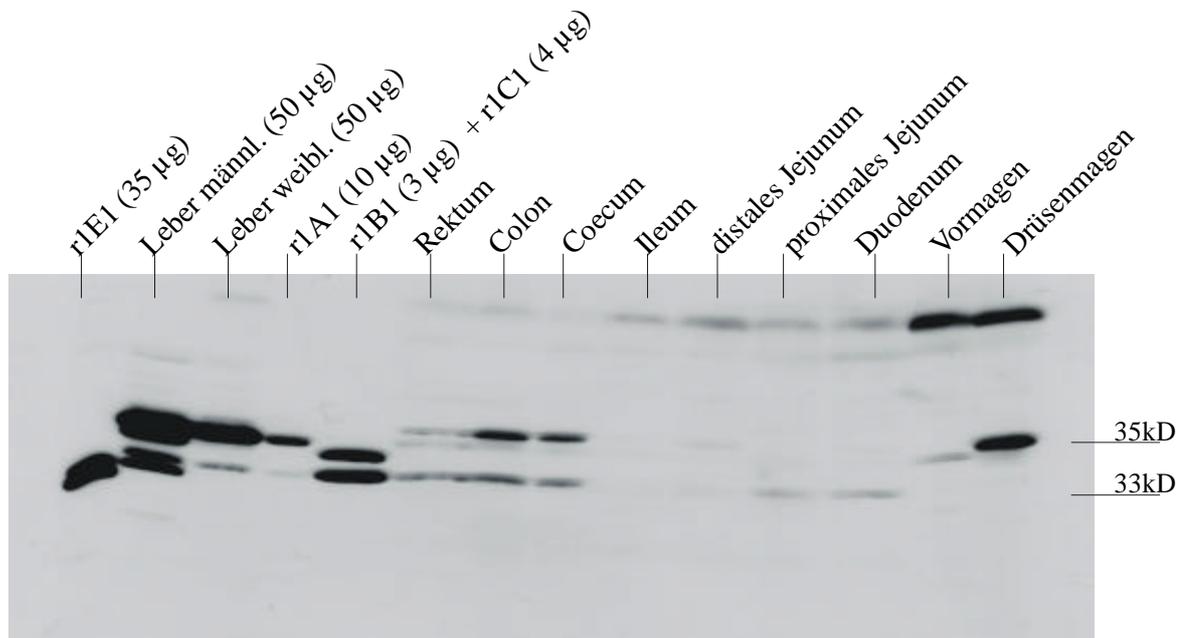
Für den immunologischen Nachweis standen die fünf gegen h1A3, h1B1, h2A1 und r1A1 gerichteten Antiseren zur Verfügung. Die einzelnen mit ihnen hergestellten Abbildungen sind im Anhang (A9 - A11) aufgeführt. Unter Verwendung des h1A3-Antiserums konnten drei Proteine von 33kD, 34,7kD und 35kD im Darm der Ratte detektiert werden (Abb. 18), wobei das Protein von 33kD mit der r1B1 und das von 34,7kD mit der r1A1 komigrierte. Beide Proteine inklusive der Referenzen wurden auch durch das h1B1-, bzw. r1A1-Antiserum erkannt. Lediglich Signale in den Referenzen, nicht jedoch in den Darmproben, wurden mit dem r1E1- (ohne Abbildung) und dem h2A1-Antiserum (Anhang A11) erhalten. Die Identität des Proteins von 35kD, bei dem es sich aufgrund der Größe des apparenten Molekulargewichts und einer mit der r1B1 vergleichbaren Signalintensität durchaus um eine Sulfotransferase handeln könnte, ist ungeklärt. Ein Protein von ca. 40kD wurde mit ähnlicher Intensität im Magen detektiert, eine SULT-Form dieser Größe ist jedoch nicht bekannt, so daß die Bedeutung dieser Bande fraglich ist. Die mit den verschiedenen Antiseren erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß die Expression von Sulfotransferasen weitestgehend auf den Dickdarm (Rektum, Colon und Coecum) und auf den Drüsenmagen beschränkt ist. Der Gehalt an Sulfotransferasen im Vergleich zur Leber war sehr gering: 3% bei der r1A1 und 20 - 30% bei der r1B1. Die nicht identifizierte Bande von ca. 35kD fand sich auch in der Leber, wo sie von der starken Bande der r1A1 überlagert wurde.

Die Untersuchungen wurden mit Gewebe von je zwei weiblichen und männlichen jungen Tieren durchgeführt. Im Gegensatz zur Leber war ein Unterschied in der Expression zwischen den Geschlechtern nicht auffällig (Anhang A9 - 11).

Versuche, die zur Immunblot-Analyse verwendeten Antiseren auch für immunhistochemische Untersuchungen von Rattengewebe anzuwenden, zeigten je nach Konzentration der Antikörper eine sehr schwache oder starke gleichmäßige Färbung des gesamten Präparats.

Da außerdem bei der Immunblot-Analyse sehr viel mehr Kreuzreaktivität auftrat als bei den humanen Proben (Anhang A9, A10, Abb. 18), waren diese Antiseren im Fall der Ratte für die Immunhistochemie nicht geeignet.



**Abbildung 18: Detektion von Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt einer männlichen Ratte mit dem h1A3-Antiserum**

Zytosolische Fraktionen von TA1538-SULT und Leber (in den angegebenen Mengen) sowie von Mukosa aus verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts (je 300 µg) wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Immunkonjugate wurden durch Katalyse der Luminol-Peroxidase-Reaktion durch den Sekundärantikörper nachgewiesen.

**Tabelle 11: Nachweis von SULT im Gastrointestinaltrakt der Ratte**

Verwendet wurden die gegen r1A1, h1A3, h1B1 und h2A1 gerichteten Antiseren. Sie erkennen die Formen r1A1 (r1A1- und h1A3-Antiserum), r1B1, r1C1 und r1E1 (h1A3- und h1B1-Antiserum) sowie r2A (h2A1-Antiserum). Das 35kD-Protein wurde durch die r1A1- und h1A3-Antiseren erkannt. Untersucht wurden Proben von zwei männlichen und zwei weiblichen Tieren.

Gewebe	SULT-Expression					35kD-Protein
	r1A1	r1B1	r1C1	r1E1	r2A	
Rektum	+	+	-	-	-	+
Colon	+	+	-	-	-	+
Coecum	+	+	-	-	-	+
Ileum	-	-	-	-	-	(+) <sup>1</sup>
dist. Jejunum	-	-	-	-	-	(+) <sup>1</sup>
prox. Jejunum	-	+	-	-	-	-
Duodenum	-	(+) <sup>1</sup>	-	-	-	-
Drüsenmagen	-	+	+	-	-	+
Vormagen	+	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Signal nur in Proben von ein oder zwei Tieren

**3.3 Heterologe Expression von SULT1B1 in Indikatorzellen für Mutagenitätstests**

Die Form h1B1 war zu Beginn der Studie die einzige im humanen Darm identifizierte Form, für die in der Arbeitsgruppe kein von *Salmonella typhimurium* TA1538 abgeleiteter Stamm zur Verfügung stand. Der Stamm *Salmonella typhimurium* TA1538-h1B1, im folgenden abgekürzt durch „TA1538-h1B1“, wurde daher im Rahmen dieser Studie hergestellt. Durch seine Verwendung als Indikatorstamm im Ames-Test konnten Promutagene auf ihre Bioaktivierbarkeit durch h1B1 überprüft werden (Tabelle 14). In diesen Vorversuchen positiv getestete Substanzen wurden im Folgenden im viel aufwendigeren HPRT-Genmutationstest mit den V79-SULT1B1-Zellen eingesetzt.

### 3.3.1 TA1538-h1B1

#### 3.3.1.1. Konstruktion von TA1538-h1B1

Das Plasmid pKK233-2-h1B1 (Wang *et al.*, 1998) wurde in *Salmonella typhimurium* LB5000 transfiziert und vermehrt, um das Methylierungsmuster des Plasmids an das von *Salmonella typhimurium* anzupassen. *Salmonella typhimurium* LB5000 ist ein restriktionsdefizienter, aber methylierungsprofizienter Abkömmling von *Salmonella typhimurium* LT2 (Bullas and Ryu, 1983). Das aus *Salmonella typhimurium* LB5000-h1B1 isolierte Plasmid wurde zur Transformation von *S. typhimurium* TA1538 verwendet, um den Stamm TA1538-h1B1 zu erhalten.

#### 3.3.1.2 Expression von h1B1 in TA1538-h1B1

Die Sulfotransferase konnte in der zytosolischen Fraktion von TA1538-h1B1 im Gegensatz zu der vom Ausgangsstamm TA1538 durch radiometrische Bestimmung der Enzymaktivität mit  $\alpha$ -Naphthol detektiert werden. Aus zwei Präparationen wurde eine Aktivität ( $\pm$  SE) von  $1886 \pm 166$  pmol/mg/min ermittelt. Die Nachweisgrenze für den Ausgangsstamm lag bei 3 pmol/mg/min.

Bei der Immunblot-Analyse zytosolischer Fraktionen von TA1538 und TA1538-SULT unter Verwendung des h1B1-Antiserums wurde nur im Stamm TA1538-h1B1 ein Protein mit einem  $M_{app}$  von 32,5kD detektiert (Anhang A3).

### 3.3.2 V79-h1B1

#### 3.3.2.1 Konstruktion der Zelllinie

Für die Expression der h1B1-cDNA in V79-Hamsterlungenfibroblasten wurde diese in den für die Expression in Säugerzellen hergestellten Vektor pMPSV (E/H) (Artelt *et al.*, 1988) eingefügt. Als Quelle für die cDNA diente das Plasmid pKK233-2-h1B1. Die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* wurden mit Hilfe der PCR (2.2.8) eingeführt. Hierdurch wurde auch der von Wang *et al.* (1998) eingefügte Basenaustausch an Position 4 rückgängig gemacht, so daß die cDNA-Sequenz im Plasmid pMP-h1B1 vollständig mit der publizierten Wildtypsequenz (Wang *et al.*, 1998) übereinstimmt. Es besteht jedoch folgender Unterschied zu der von Fujita *et al.* (Genebank

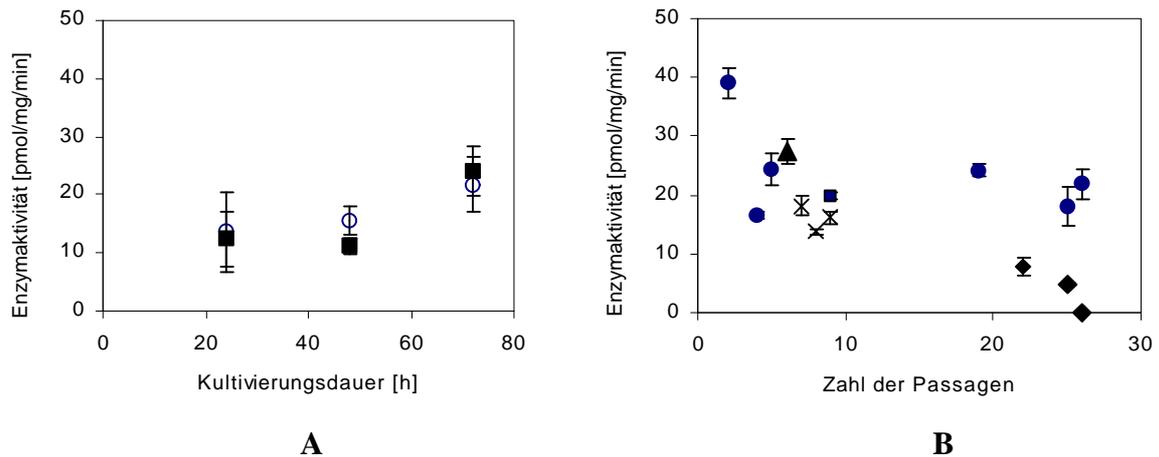
acc. No. D89479, 1997) publizierten Sequenz: Bei Fujita *et al.* (1997) ist Codon 186 GAA (Glu) und bei Wang *et al.* (1998) GGA (Gly).

V79-Zellen wurden mit pMP-h1B1 und dem das Gen für den Selektionsmarker Puromycin-Acetyltransferase tragenden Plasmid pBSpac $\Delta$ p kotransfiziert. 82 Puromycin-resistente Klone wurden aus fünf Transfektionsexperimenten gewonnen. Die Zellklone wurden vermehrt, bis genügend Material für die Präparation von zytosolischen Fraktionen zur Verfügung stand. Der Nachweis der Expression von h1B1 erfolgte durch Immunblot-Analyse und Enzymaktivitätsmessungen. In den zytosolischen Fraktionen aus 72 Klonen war keine Enzymaktivität zu detektieren (Nachweisgrenze 0,8 pmol/mg/min), sieben wiesen eine Enzymaktivität von 1 - 5 pmol/mg/min auf und je eine enthielt 7, 20, 39 und 46 pmol/mg/min. Die vier zuletzt genannten Klone wurden weiter kultiviert und bezüglich ihrer Expression von h1B1 untersucht. Der Klon mit der höchsten Enzymaktivität verlor diese innerhalb der nächsten vier Passagen vollständig. Die Klone mit ursprünglich 39 und 20 pmol/mg/min verloren innerhalb der nächsten Passage die Hälfte ihrer Enzymaktivität und blieben auf diesem Niveau. Aus Kulturen mit unterschiedlichen Passagenzahlen zwischen 4 und 20 wurden folgende mittlere Aktivitäten ( $\pm$  SE) berechnet:  $10,2 \pm 4,5$  (n = 5) und  $19,3 \pm 4,7$  (n = 9) pmol/mg/min. Der Klon mit einer Enzymaktivität von 7 pmol/mg/min erwies sich bis zur 6. Passage als stabil, wurde dann aber aufgrund eines bei der Sequenzierung identifizierten Aminosäureaustausches ( $^{206}\text{K}$  nach  $^{206}\text{R}$ ) verworfen. Der Klon mit der höchsten Enzymaktivität wurde für die Etablierung der V79-h1B1 Zelllinie verwendet.

### 3.3.2.2. Charakterisierung der Zelllinie

Sulfotransferase-Aktivität wurde konstitutiv exprimiert; sie war 24 h, 48 h und 72 h nach der Einsaat nachzuweisen (Abb. 19). Sie war unabhängig davon, ob die Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  oder  $3 \times 10^6$  Zellen/150 cm<sup>2</sup> eingesät worden waren.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in zytosolischen Fraktionen aus Kulturen unterschiedlicher Passagenzahl zeigte, daß die Expression weitgehend stabil war (Abb. 19). In einzelnen Kulturen nahm sie mit der Passagenzahl ab.

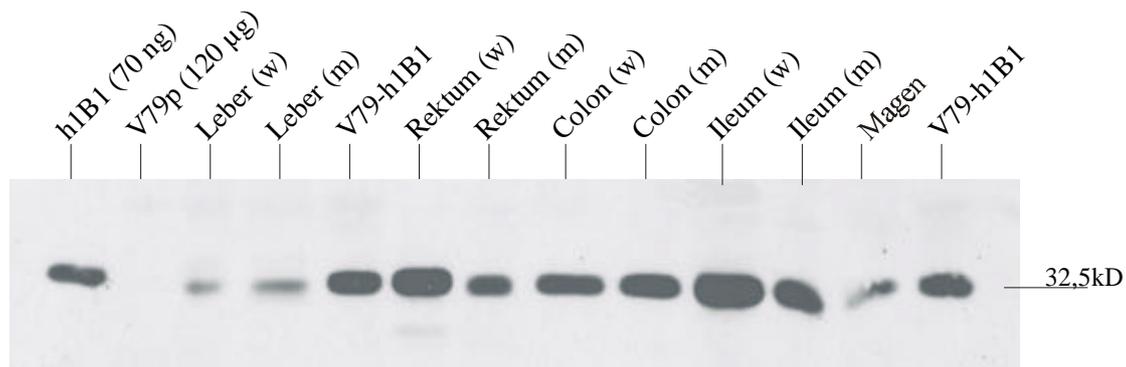


**Abbildung 19: Abhängigkeit der h1B1-Aktivität in zytosolischen Fraktionen aus V79-h1B1 in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung (A) und der Anzahl der Passagen (B).**

A: Um den Einfluß der Zelldichte bei unterschiedlichen Kultivierungszeiten zu erfassen, wurden Kulturen mit einer initialen Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  (Kreise) oder  $3 \times 10^6$  (Quadrate) Zellen/150 cm<sup>2</sup> verwendet. Dargestellt sind Doppelwerte  $\pm$  SE von zwei unabhängigen Experimenten.

B: Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen/150 cm<sup>2</sup> eingesät und für 68 – 75 h kultiviert. Meßpunkte mit gleichen Symbolen wurden aus Kulturen der gleichen Rücklage gewonnen. Angegeben ist der Standardfehler der Doppelbestimmung der Enzymaktivitätsmessung.

Die Anzahl an V79-h1B1 Zellen verdoppelte sich während der exponentiellen Wachstumsphase alle  $13,1 \pm 0,6$  h ( $n = 4$ ), womit sie sich etwas langsamer teilten als die V79-Zellen, die eine Verdopplungszeit von  $12,3 \pm 3,7$  h ( $n = 3$ ) aufwiesen. Neben der Enzymaktivität konnte auch das gegenüber dem h1B1-Antiserum immunreaktive Protein in V79-h1B1, nicht aber in V79p nachgewiesen werden (Abb. 20). Aus der Abbildung geht hervor, daß in 60  $\mu$ g zytosolischem Protein der Zelllinie, das  $1,16 \pm 0,28$  pmol/min  $\alpha$ -Naphthol umsetzen kann, in etwa 70 ng h1B1 mit einer rechnerischen Aktivität von  $0,94 \pm 0,02$  pmol/min enthalten sind.



**Abbildung 20 : Nachweis von h1B1 unter Verwendung des gegen h1B1 gerichteten Antiserums in V79p-Zellen, V79-h1B1-Zellen und humanem Gewebe**

Jeweils 60 µg an zytosolischem Protein von V79p, V79-h1B1 und Geweben von männlichen (m) und weiblichen (w) Personen sowie 70 ng h1B1 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Die Immunkonjugate wurden nach Behandlung mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.

### 3.3.2.3 Vergleich der Expression von h1B1 in V79-h1B1 und in humanem Gewebe

Der Vergleich der Expression von h1B1 in der neuen Zelllinie und im menschlichen Gewebe erfolgte mittels Immunblot-Analyse (Abb. 20). Die Menge an immunoreaktivem Protein in V79-h1B1 ist mit der im Dickdarm vergleichbar, höher als in der Leber und im Magen und niedriger als im Dünndarm.

### 3.3.3 V79-r1B1

#### 3.3.3.1. Konstruktion und Charakterisierung der Zelllinien V79-r1B1/A und -/B

Für die Transfektion von V79-Zellen wurden die Plasmide pMP-r1B1 und pBSpacΔp (2.1.2.4) im Verhältnis 10:1 gemischt und mit Hilfe der Calcium-Präzipitationsmethode in die Zellen eingeführt. Die Integration von pBSpacΔp führt zur Expression der Puromycin-Acetyltransferase und erlaubt die Selektion von Puromycin-resistenten Klonen.

Aus zwei Transfektionen wurden 20 Zellklone erhalten, von denen zunächst zehn durch Bestimmung der SULT-Aktivität auf r1B1-Expression hin untersucht wurden.

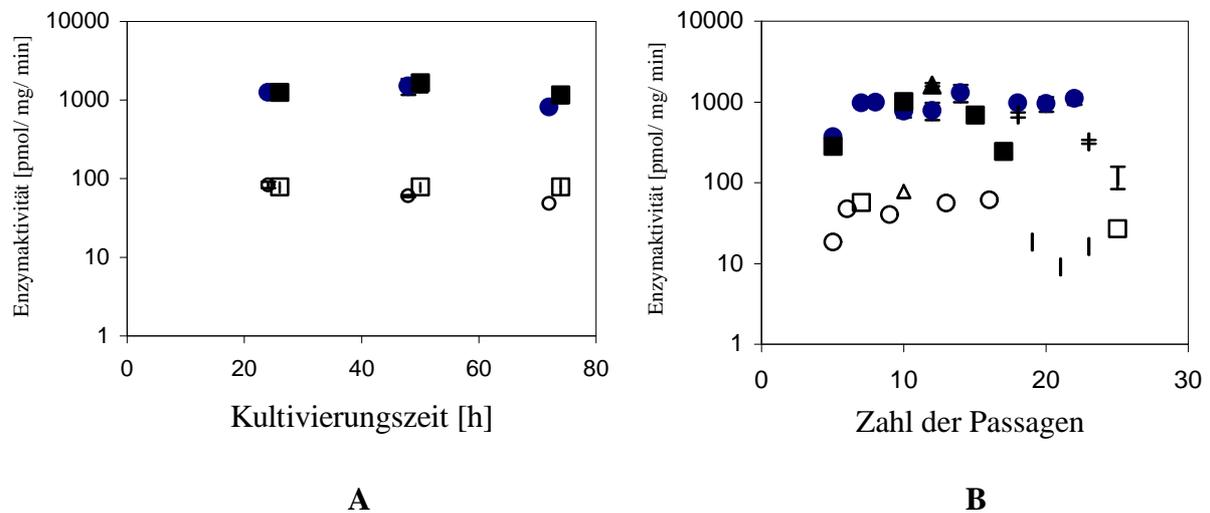
In zwei Klonen war keine Sulfonierung von α-Naphthol zu detektieren, in drei Klonen betrug die Aktivität zwischen 0,1 und 2 pmol/mg/min und in zwei weiteren 5 und 6 pmol/mg/min; die letzten beiden Klone zeigten mehr als 10 pmol/mg/min und wurden unter

den Bezeichnungen V79-r1B1/A und -/B weiter charakterisiert. Um die Sequenz der integrierten DNA zu überprüfen, wurde die genomische DNA präpariert und die r1B1 cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert (II.7.3). Die Sequenz des PCR-Produkts wurde bestimmt und erwies sich als identisch mit derjenigen in pMP-r1B1, bzw. der von Fujita et al (1997) beschriebenen.

Die Expression von r1B1 wurde über 20 Passagen verfolgt, wobei in Abständen von zwei bis drei Passagen die Enzymaktivität in der zytosolischen Fraktion bestimmt wurde (Abb. 21). Aus den Daten von Kulturen, deren Alter zwischen 6 und 16 Passagen betrug, wurde eine durchschnittliche Aktivität von  $1019 \pm 224$  pmol/mg/min ( $n = 8$ ) für V79-r1B1/A und  $57 \pm 9$  pmol/mg/min ( $n = 6$ ) für V79-r1B1/B berechnet. Die Expression war unabhängig davon, ob die Zellen für 24, 48 oder 72 h kultiviert wurden (Abb. 21).

Beide Zelllinien unterschieden sich in der SULT-Aktivität im Mittel um den Faktor 18. Betrachtet man die Menge an immunreaktivem Protein (Abb. 22), so finden sich vergleichbare Signale in 3 µg zytosolischem Protein von Klon A und in 100 µg von Klon B, wobei sich die für die Herstellung des Western Blots verwendeten zytosolischen Fraktionen in ihrer Aktivität um den Faktor 24 unterschieden. In der zytosolischen Fraktion von V79p-Zellen konnte keine spezifische Immunreaktivität nachgewiesen werden.

Die Verdopplungszeiten der neu etablierten Zelllinien und der Ausgangszelllinie sind in Tabelle 12 dargestellt.



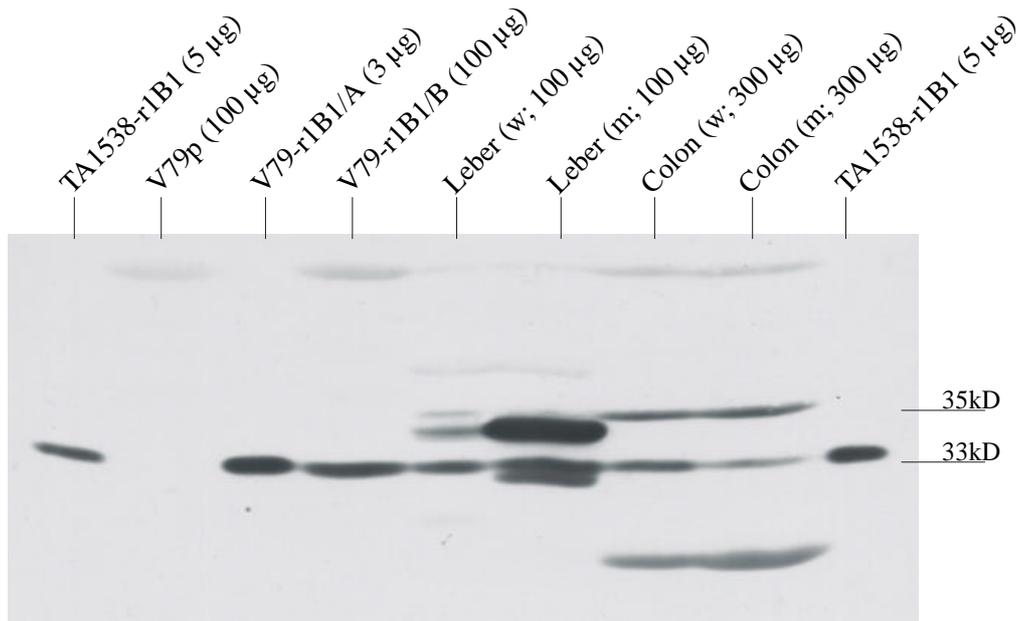
**Abbildung 21: Abhängigkeit der r1B1-Aktivität in zytosolischen Fraktionen aus V79-r1B1/A (geschlossene Symbole) und -/B (offene Symbole) in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung (A) und der Anzahl der Passagen (B).**

A: Um den Einfluß der Zelldichte bei unterschiedlichen Kultivierungszeiten zu erfassen, wurden Kulturen mit einer initialen Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  (Kreise) oder  $3 \times 10^6$  (Quadrate) Zellen/150 cm<sup>2</sup> verwendet. Dargestellt sind Doppelwerte  $\pm$  SE von zwei unabhängigen Experimenten.

B: Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen/150 cm<sup>2</sup> eingesetzt und für 68 - 75 h kultiviert. Meßpunkte mit gleichen Symbolen wurden aus Kulturen der gleichen Rücklage gewonnen. Angegeben ist der Standardfehler der Doppelbestimmung der Enzymaktivitätsmessung.

**Tabelle 12: Verdopplungszeiten der Zelllinien**

	Verdopplungszeit [h]	$\pm$ SE [h]	Zahl der Experimente
V79	12,3	3,7	3
V79-r1B1/A	14,1	1,3	6
V79-r1B1/B	14,1	1,7	3

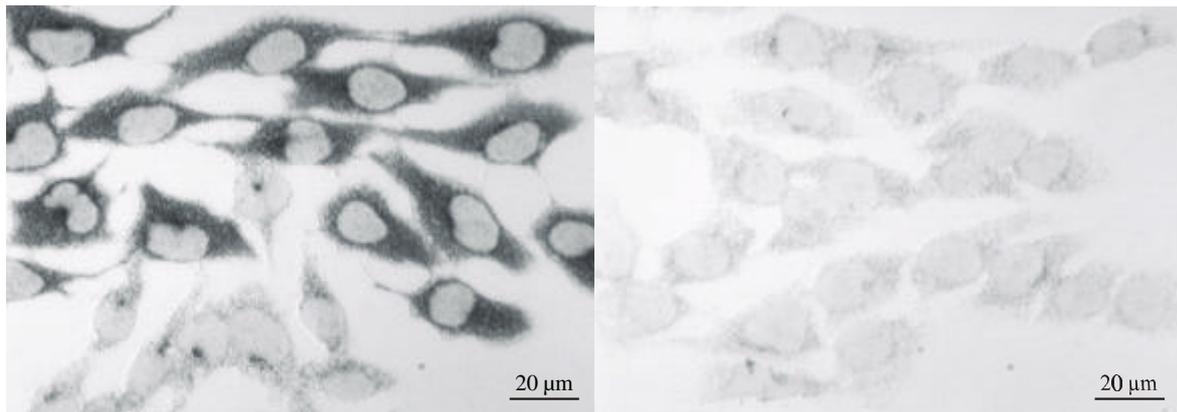


**Abbildung 22: Nachweis von r1B1 Protein in V79-r1B1, Leber und Colon der Ratte sowie *Salmonella typhimurium* TA1538-r1B1 mit dem h1B1-Antiserum**

Die zytosolischen Fraktionen von V79p-, V79-r1B1/A- und V79-r1B1/B-Zellen und Geweben einer weiblichen (w) und männlichen (m) Ratte sowie von TA1538-r1B1 wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Die Immunkonjugate wurden nach Behandlung mit dem mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.

### 3.3.3.2 Immunfärbung von V79-SULT1B1

Kulturen der drei SULT1B1 exprimierenden Zelllinien sowie von V79p wurden auf Objektträgern angelegt und nach drei Tagen mit auf -20 °C vorgekühltem Methanol fixiert. Für den Nachweis von r1B1 und h1B1 wurden verschiedene Konzentrationen an h1B1-Antiserum getestet, wobei die V79p-Zellen als Negativkontrolle dienten. Lediglich in den hoch exprimierenden V79-r1B1/A-Zellen war eine deutliche Färbung von Zellen zu erkennen, während sich V79-r1B1/B- und V79-h1B1-Zellen kaum von den V79p-Zellen unterschieden. Es wurden nicht alle V79-r1B1/A-Zellen gefärbt; allerdings war die Färbung in jedem positivem Fall gleichmäßig auf das Zytosol verteilt (Abb. 23).



**Abbildung 23: Detektion von r1B1 in fixierten V79-r1B1/A- und -/B-Zellen mit dem h1B1-Antiserum**

Die Zellen wurden für 72 h auf Objektträgern kultiviert und mit Methanol fixiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der Immunhistochemie der humanen Darmproben.

### 3.3.3.3 Vergleich der Expression von r1B1 in V79-r1B1 und in Colon und Leber der Ratte

Die Untersuchung der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts zeigte, daß r1B1 hauptsächlich im Dickdarm und in der Leber exprimiert wird (Abb. 18). Daher wurden diese Organe für den Vergleich mit den Zelllinien ausgewählt. In Abbildung 22 ist zu erkennen daß die in V79-r1B1/B vorhandene Menge an Sulfotransferase in etwa dem Gehalt in der Leber entspricht. Im Colon wird dagegen die dreifache Menge an Protein benötigt, um ein schwächeres Signal zu erzeugen. Während der V79-r1B1-Klon mit der niedrigeren SULT-Aktivität sich ähnlich den Geweben verhält, ist der Unterschied zu V79-r1B1/A mit der im Mittel 18fach höheren Enzymaktivität dementsprechend größer.

### 3.3.4 Vergleich der Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und V79-r1B1/B

Da die Überexpression von r1B1 in *E. coli* BL21-r1B1 nicht gelang, bzw. die Expression nicht stärker war als in TA1538-r1B1, gab es keinen Mengenstandard wie im Fall der h1B1. Der Umsatz von  $\alpha$ -Naphthol und die Immunreaktivität mit dem h1B1-Antiserum erlauben nur einen groben Vergleich, da die kinetischen Eigenschaften bezüglich  $\alpha$ -Naphthol unterschiedlich sein können und zu erwarten ist, daß ein gegen die humane Form gerichteter Antikörper weniger gut mit der Form der Ratte reagiert. Aus den zur Verfügung stehenden

Eigenschaften (Tabelle 13) geht hervor, daß V79-h1B1 am ehesten mit V79-r1B1/B zu vergleichen ist.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der wichtigsten Charakteristika der V79-SULT-Zelllinien**

Eigenschaft	V79-h1B1	V79-r1B1/A	V79-r1B1/B
Enzymaktivität mit 1 $\mu$ M $\alpha$ -Naphthol [pmol/mg/min]	19,3 $\pm$ 4,7	1019 $\pm$ 224	57 $\pm$ 9
$\mu$ g SULT/mg zytosolisches Protein	1,17	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Populationsverdopplungszeit [h]	13,1 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 1,7
Proteinmenge für vergleichbare Immunreaktivität mit h1B1-Antiserum [ $\mu$ g]	20	4	70
Expression im Vergleich zur Leber	2 – 3 mal höher	ca. 20 x höher	vergleichbar
Expression im Vergleich zum Colon	vergleichbar	ca. 60 x höher	ca. 3 x höher
Immunfärbung von Zellen	negativ	positiv	negativ

### 3.4. Mutagenitäts- und Zytotoxizitätsuntersuchungen

#### 3.4.1. Mutagenität benzyllischer und allyllischer Alkohole im Ames Test

Die aus dem Ames Teststamm TA1538 abgeleiteten Stämme TA1538-h1A1, -h1A3 und -h1B1, die die im humanen Colon identifizierten Sulfotransferasen exprimieren, wurden als Indikatorstämme im Ames Mutagenitätstest eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 15 aufgeführt. Es zeigte sich, daß sich die einzelnen SULT-Formen deutlich in ihrer Fähigkeit zur Bioaktivierung der Testsubstanzen unterscheiden. Der neu etablierte Stamm TA1538-h1B1 aktivierte die benzyllischen Alkohole 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren (6-HMBP) und 4*H*-Cyclopenta[*def*]chrysen-4-ol (4-OH-CPC) besonders effizient. Während 4-OH-CPC in keinem der anderen Stämmen mutagen war, wurde im Fall von 6-HMBP ein schwacher, SULT-unabhängiger Effekt beobachtet. Beide Substanzen wurden daraufhin im HPRT-Genmutationstest mit SULT1B1-exprimierenden V79-Zellen eingesetzt.

**Tabelle 14: Mutagenität benzyllischer und allyllischer Alkohole im Ames Test**

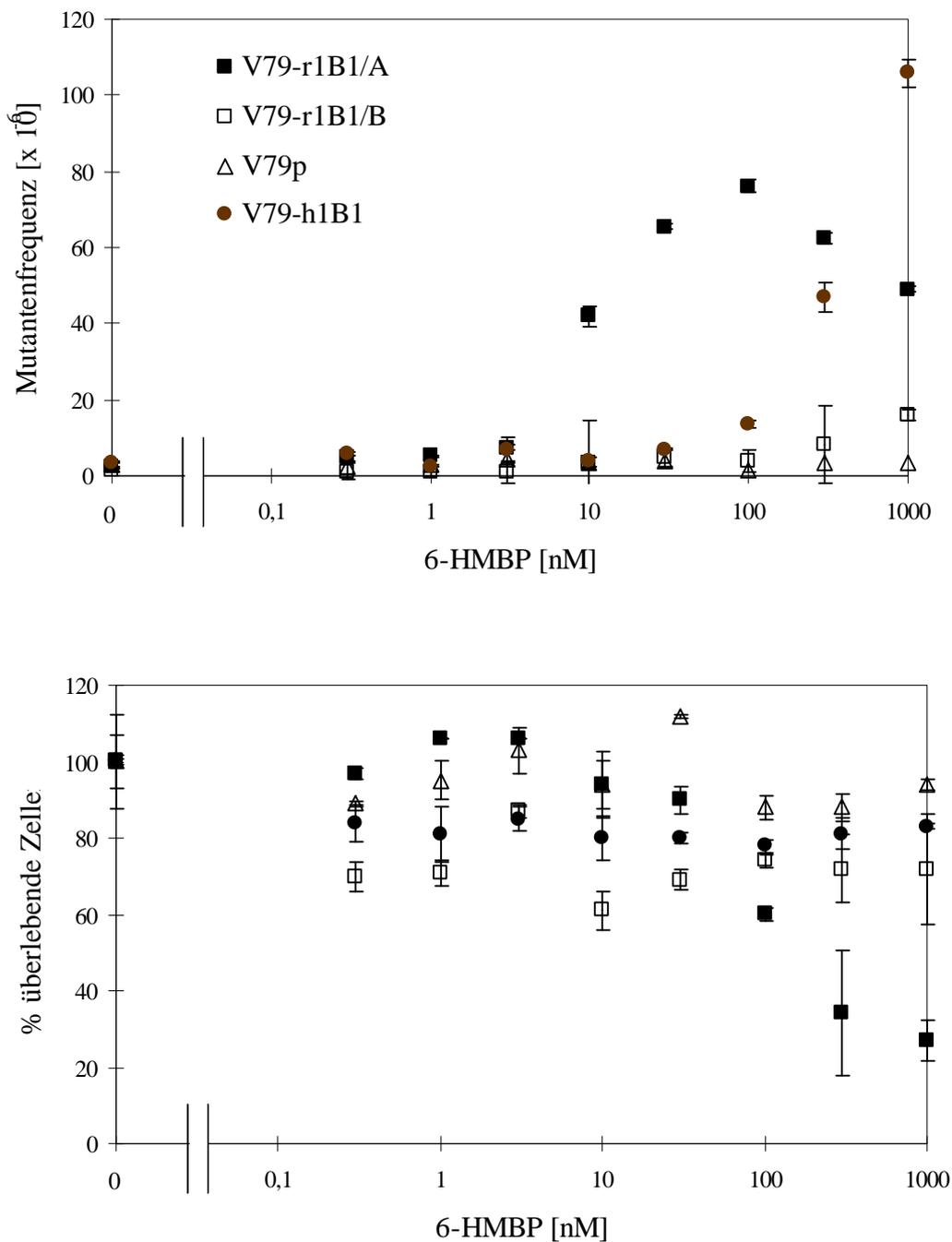
Substanz	Revertanten pro nmol			
	TA1538 <sup>a</sup>	TA1538-h1A1 <sup>a</sup>	TA1538-h1A3 <sup>a</sup>	TA1538-h1B1
1-Hydroxymethylpyren	< 0.5	4200	30	70
(-)-(S)-1-Hydroxyethylpyren	< 0.5	600	6	70
(+)-(R)-1-Hydroxyethylpyren	< 0.5	50	40	40
7-Hydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[ <i>a</i> ]pyren	~0.7	150	~0.3	~0.9
6-Hydroxymethylbenzo[ <i>a</i> ]pyren	15	18	12	2700
1-Hydroxy-3-methylcholanthren	< 0.2	7	< 0.2	< 0.2
4 <i>H</i> -Cyclopenta[ <i>def</i> ]chrysen-4-ol	<1	<1	<1	2100
N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren	15	120	19	12
2-Acetylamino-4-hydroxylaminotoluol	~ 0.1	6	~ 0.1	~ 0.1
1'-Hydroxysafrol <sup>b</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
α-Hydroxytamoxifen <sup>b</sup>	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2

<sup>a</sup>Unveröffentlichte Daten aus der Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE

<sup>b</sup>Aktivierung zu Mutagenen durch andere Sulfotransferasen der Ratte oder des Menschen

### 3.4.2 Mutagenität und Zytotoxizität von 6-HMBP in V79-1B1-Zellen

Die Mutagenität von 6-HMBP in den aus V79-Zellen abgeleiteten Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und -/B sowie V79p wurde im HPRT-Genmutationstest bestimmt. Im gleichen Ansatz wurde auch die Zytotoxizität erfaßt. Die Ergebnisse der einzelnen HPRT-Tests sind in Abb. 24 zusammengefaßt. 6-HMBP war im Konzentrationsbereich von 0,3 - 1 µM weder mutagen noch zytotoxisch in den lediglich mit dem Selektionsmarker transfizierten V79p-Zellen. Die 1B1-exprimierenden Zelllinien hingegen reagierten mit einer Erhöhung der Mutantenfrequenz und z.T. auch der Zytotoxizität, wobei das Ausmaß und die Konzentrationsabhängigkeit davon abhingen, wie hoch die SULT-Expression war und ob die Form des Menschen oder Ratte exprimiert wurde. Hieraus folgt, daß in diesem System die Menge an reaktiven Metaboliten nicht allein durch die Verfügbarkeit von Substrat (6-HMBP) oder Kosubstrat (PAPS) limitiert wurde, sondern durch die Menge und die kinetischen Eigenschaften der exprimierten Sulfotransferase. Während mit 6-HMBP in den hoch exprimierenden V79-r1B1/A-Zellen bereits bei einer Konzentration von 10 nM die Zahl der Mutanten gegenüber der Kontrollzelllinie erhöht war, trat dies bei den ca. 25fach niedriger exprimierenden V79-r1B1/B Zellen erst bei der höchsten getesteten Konzentration (1 µM) auf. Die die humane Form exprimierenden V79-h1B1 Zellen zeigten einen vergleichbaren Anstieg der Mutantenfrequenz bei einer Konzentration von 100 nM, obwohl ihr Gehalt an 1B1 niedriger ist als in V79-r1B1/B. Im Gegensatz zu V79-r1B1/A stieg die Mutantenfrequenz in V79-h1B1 oberhalb von 100 nM weiter an und wurde höher als die in der Zelllinie mit der Form der Ratte. Starke zytotoxische Effekte wurden lediglich in V79-r1B1/A beobachtet.

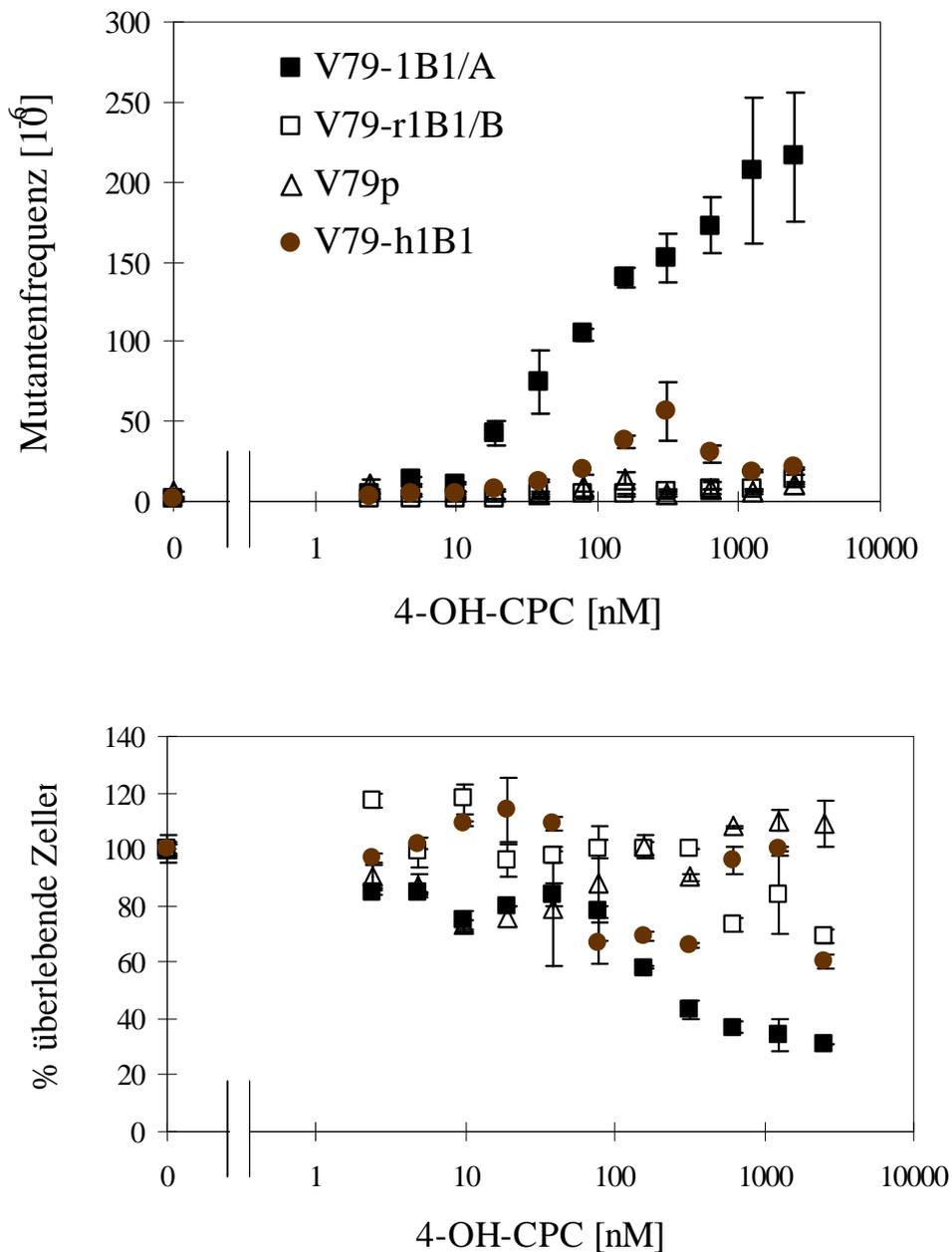


**Abbildung 24: Mutagenität am *hprt*-Lokus (oben) und Zytotoxizität (unten) von 6-HMBP in V79-1B1-Zellen im Vergleich zu den SULT defizienten V79p-Zellen**

6-HMBP wurde in DMSO gelöst und für 24 h dem Kulturmedium zugefügt. Aus der Zahl der hiernach geernteten Zellen wurde die Zytotoxizität berechnet. Für die Selektion der Mutanten wurden die Zellen in 6-Thioguanin-haltigem Medium kultiviert, wobei für jede Kultur zusätzlich die Klonierungseffizienz bestimmt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SE aus zwei Kulturen. Wo kein Fehlerbalken zu erkennen ist, wird dieser vom Symbol überdeckt.

### 3.4.3 Mutagenität und Zytotoxizität von 4-OH-CPC in V79-1B1

Analog zu den HPRT-Genmutationstests mit 6-HMBP wurde die Fähigkeit der aus V79 abgeleiteten Zellen zur Bioaktivierung von 4-OH-CPC untersucht (Abb. 25). 4-OH-CPC wurde in einem Konzentrationsbereich von 3 nM bis 6,25 µM eingesetzt. Wie im Fall von 6-HMBP war die hoch exprimierende Zelllinie V79-r1B1/A am sensitivsten bezüglich Mutagenität und Zytotoxizität, wobei höhere Mutantenfrequenzen auftraten als bei 6-HMBP und die Mutantenfrequenz ab 10 nM kontinuierlich zunahm. Weder in V79-r1B1/B- noch in V79p-Zellen wurden mutagene Effekte beobachtet. Ein moderater Effekt war in der Zelllinie mit der humanen Form zu erkennen: 4-OH-CPC erhöhte im Bereich von 0,1 – 1 µM die Mutantenfrequenz mit einem Maximum bei 0,3 µM.



**Abbildung 25: Mutagenität am *hprt*-Lokus (oben) und Zytotoxizität (unten) von 4-OH-CPC in V79-1B1-Zellen im Vergleich zu den SULT defizienten V79p-Zellen**

4-OH-CPC wurde in DMSO gelöst und für 24 h dem Kulturmedium zugefügt. Aus der Zahl der hiernach geernteten Zellen wurde die Zytotoxizität berechnet. Für die Selektion der Mutanten wurden die Zellen in 6-Thioguanin-haltigem Medium kultiviert, wobei für jede Kultur zusätzlich die Klonierungseffizienz bestimmt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SE aus zwei Kulturen. Wo kein Fehlerbalken zu erkennen ist, wird dieser vom Symbol überdeckt.

## 4 Diskussion

In dieser Studie wurde zum ersten Mal umfassend die Expression von Sulfotransferasen in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts von Mensch und Ratte untersucht. Mit Ausnahme der Formen, bei denen es sich vermutlich um h1C1, r1C2 und h2B1 handelt, konnten alle gefundenen Formen eindeutig identifiziert werden. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Ausstattung von Dickdarm und Dünndarm, der beim Menschen und der Ratte anders ausgeprägt war. Während beim Menschen die Expression im Dünndarm in etwa viermal stärker war und mehr Formen gefunden wurden als im Colon, wurden in der Ratte nur wenige Formen im Dickdarm schlecht exprimiert; im Dünndarm waren sie kaum nachweisbar.

Die Fähigkeit von humanem intestinalen Gewebe zur enzymatischen Sulfonierung ist von diversen Autoren beschrieben worden, z.B. wurden (+) und (-) Terbutalin durch humane Proben aus dem Duodenum, Ileum und Colon umgesetzt (Pacifci *et al.*, 1993). Diese Aktivität wurde einer als „Katechol-Sulfotransferase“ bezeichneten Form zugeordnet, bei der es sich vermutlich um die h1A3 handelt, da sie auch als thermolabile Phenol-Sulfotransferase bezeichnet wurde. Die Sulfonierung der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten (S)-Isoproterenol und (S)-Albuterol durch humane Darmproben wurde ebenfalls auf die h1A3 zurückgeführt (Hartman *et al.*, 1998). Im Colon und Dünndarm einzelner Proben wurden Arylsulfotransferasen ohne Differenzierung einzelner Formen (Windmill *et al.*, 1997), die mRNA der h1A1 (Bernier *et al.*, 1996) und das Protein der h1B1 (Wang *et al.*, 1998) gefunden. Die im humanen Ileum, Jejunum und Coecum identifizierten Formen h2A1 und h1E1 (Tabelle 8) wurden von Her *et al.* (1996) im Jejunum von 62 Patienten immunchemisch detektiert. Diese Befunde stimmen gut mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen zur Expression von SULT im Darm des Menschen überein.

Bei bisherigen Untersuchungen zur Expression von SULT im Darm der Ratte wurde die mRNA von r1A1 und r1B1 (Dunn and Klaassen, 1998) gefunden, wobei das Protein der r1B1 in einer früheren Arbeit nur in Leber und Niere, nicht jedoch im Darm detektiert werden konnte (Araki *et al.*, 1997). Da in keiner der beiden Arbeiten der Darmabschnitt spezifiziert wurde, besteht die Möglichkeit, daß in der zuerst erwähnten der Dickdarm, in der anderen aber der Dünndarm untersucht wurde, in dessen Mukosa auch hier keine Expression der r1B1 gefunden wurde (Abb. 18). In dieser Arbeit wurden r1A1 und r1B1 im Rektum, Colon und Coecum in Mengen detektiert, die deutlich niedriger waren als in der Leber (3% und 20-30%, Anhang A9 und A10). Das beobachtete Verhältnis zur Leber war vergleichbar mit dem, was

für die mRNA beschrieben wurde: 15 - 25% für die r1B1 und 0,4% für die r1A1 (Dunn and Klaassen, 1998). Im Gegensatz zum Dünndarm ist der Magen der Ratte reichhaltiger mit Sulfotransferasen ausgestattet (Tabelle 11). Bei den Untersuchungen zur Gewebeverteilung der SULT wurde der Magen selten erfaßt: Zu r1B1 und r1A1 gibt es keine Angaben, lediglich die r1C2 wurde als Protein von 34kD in den Lysosomen der Mukosa des Magens beschrieben (Xiangrong *et al.*, 2000). Gerade für diese Form stand als einziger der Ratte keine Referenz zur Verfügung. Gleichzeitig wurde ein Protein von 35kD mit dem h1B1-Antiserum detektiert, das nicht mit einer der anderen Referenzen komigrierte und am stärksten im Drüsenmagen der Ratte, schwächer in der Leber sowie deutlich schwächer im Dickdarm exprimiert wurde (Abb. 18). Dies paßt insofern mit der für die mRNA der r1C2 beschriebenen Gewebeverteilung überein, als daß diese in großer Menge in der Niere und in geringeren Mengen im Magen und der Leber gefunden wurde (Xiangrong *et al.*, 2000). Zwar wurde im Gegensatz zur Immunblotanalyse keine mRNA im Darm nachgewiesen, jedoch wurde auch in dieser Arbeit nicht zwischen Dün- und Dickdarm unterschieden. Es könnte sich daher durchaus bei dem 35kD-Protein um die r1C2 handeln.

Die immunhistochemische Lokalisation der Sulfotransferasen gelang nur bei den humanen Proben, da die Sensitivität der Antiseren für die Gewebe der Ratte nicht ausreichend war. Die Formen h1A1 und/oder h1A3, h1B1 und h2A1 wurden in den differenzierten Epithelzellen der Mukosa exprimiert. Im Ileum waren die Darmzotten gefärbt, im Colon, das keine Zotten besitzt, die Zellen am luminalen Ende der Krypten. Diese Verteilung wurde auch für die mRNA anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie z.B. CYP3A (McKinnon *et al.*, 1995) oder NAT (Debiec-Rychter *et al.*, 1996) beschrieben. Die Zellen, in denen die Sulfotransferasen detektiert wurden, teilen sich nicht mehr, weshalb DNA-Addukte nicht mehr zu Mutationen führen können. Zudem werden Zellen mit den in ihnen gefangenen Mutagenen innerhalb von wenigen Tagen in das Darmlumen abgeschilfert und ausgeschieden. Dort allerdings unterliegen sie wieder dem Stoffwechsel der Mikroflora. In diesem Sinne wäre der humane Dünndarm aufgrund seiner größeren Vielfalt an SULT und der stärkeren Expression von h1A1 und h1A3 besser geschützt als der Dickdarm. Bei der Ratte ist das Umgekehrte der Fall, weshalb die Ratte zur Untersuchung der intestinalen SULT-abhängigen Aktivierung von Promutagenen ein wenig geeignetes Modell ist.

In räumlicher Nähe zum Epithel, am Grund der ca. 0,5 mm tiefen Einfaltungen (Krypten), befinden sich die Stammzellen, aus denen die Enterozyten nachgebildet werden. Um aus der proliferativen Zone am unteren Ende einer Krypte des Rattencolons zur Oberfläche zu wandern, braucht eine Zelle 60 – 72 h (Rijke *et al.*, 1979). Untersuchungen am

absteigenden Colon der Ratte zeigten, daß eine Krypte aus circa 625 Zellen besteht und der Umfang von ungefähr 19 Zellen gebildet wird (Rijke *et al.*, 1979). In den Stammzellen bleibt eine Mutation ein Leben lang erhalten, und für sie stellen reaktive Metabolite ein extrem hohes Risiko dar. Ob es Möglichkeiten gibt, daß in differenzierten Epithelzellen gebildete ultimale Mutagene in die Stammzellen gelangen und dort Mutationen verursachen, ist entscheidend für die Frage, ob die Generierung reaktiver Metabolite im Epithel der Mukosa ein Risiko oder einen Schutz darstellt. DNA-Addukte von Aflatoxin B1 wurden ausschließlich in den differenzierten Enterozyten und nicht in den Zellen der Krypten gefunden (Kolars *et al.*, 1994a). Dies spricht für den protektiven Effekt der Bioaktivierung in den Epithelzellen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß Addukt mengen unterhalb des Detektionslimits in den Stammzellen auftreten. Trotzdem ist das Zielorgan für Aflatoxin B1 die Leber und nicht der Darm, was wiederum für einen ausreichenden Schutz spricht. Theoretisch ist es auch möglich, daß die für die genetischen Veränderungen verantwortlichen Substanzen durch die Blutbahn zu den Stammzellen gelangen. Hinweise dafür liefert eine Arbeit von Kaderlik *et al.* (1994), in der gezeigt wurde, daß intravenös verabreichtes N-OH-PhIP und N-Acetoxy-PhIP DNA-Addukte in allen Organen verursachten, in denen auch nach Fütterung von PhIP Addukte gefunden wurden. Zusätzlich zeigten Ratten, denen der Gallengang abgebunden und damit der enterohepatische Kreislauf unterbrochen wurde, das gleiche DNA-Adduktmuster wie die normalen Ratten.

Mit dem h1A1-Antiserum wurden neben den Enterozyten auch die Endothelzellen der Kapillaren in der Mukosa des Ileums und in den Lymphfollikeln des Colons gefärbt (Abb. 11). Endothelzellen wurden bisher sowohl mit positiven als auch mit negativen Resultaten auf die Expression von „Arylsulfotransferasen“ hin untersucht, womit in der Literatur sehr häufig h1A1 und h1A3, bzw. Formen mit Aktivität gegenüber  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Naphthol gemeint sind. Positiv waren Endothelzellen der Aorta des Affen (Yang *et al.*, 1986) und der Blut-Hirnschranke des Rindes (Baranczyk-Kuzma *et al.*, 1989); in Endothelzellen von Bronchiolen des Menschen und des Rindes konnten keine Sulfotransferasen detektiert werden (Beckmann *et al.*, 1993). Es scheint, als ob die Expression von Sulfotransferasen in Endothelzellen vom Organ abhängig ist. Ein Grund für die unterschiedliche Expression im Endothel von Dünndarm und Dickdarm könnte sein, daß im Dünndarm sehr viel mehr Stoffe resorbiert werden.

Nach Konstruktion des Stammes *S. typhimurium* TA1538-h1B1 gab es in der Arbeitsgruppe für jede im humanen Colon identifizierte Sulfotransferase einen entsprechenden Stamm TA1538-SULT. Durch Verwendung dieser Stämme im Ames-Test mit verschiedenen

benzyllischen und allyllischen Verbindungen wurde ersichtlich, daß sich die einzelnen SULT-Formen in ihrer Fähigkeit zur Bioaktivierung von Promutagenen deutlich unterscheiden. Während (+)-(R)-1-Hydroxyethylpyren in allen drei Stämmen gleichermaßen schwach mutagen war, wurde (-)-(S)-1-Hydroxyethylpyren sehr viel stärker durch die h1A1 als durch die h1A3 oder h1B1 aktiviert. 4-OH-CPC und 6-HMBP waren starke Mutagene in TA1538-h1B1. 4-OH-CPC konnte weder im Ausgangsstamm TA1538 noch in den anderen SULT-profizienten Stämmen einen detektierbaren Effekt erzeugen. 6-HMBP hingegen besaß auch ohne SULT-abhängige Aktivierung einen schwachen Effekt, der in den anderen Teststämmen ebenfalls auftrat. Insgesamt wurden fast alle der getesteten benzyllischen Alkohole durch eine der im humanen Colon exprimierten Sulfotransferasen aktiviert.

Benzyllische Alkohole sind potentielle Metabolite von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), alkylierten PAK und polyzyklischen aromatischen Ketonen. PAK entstehen bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material und wurden nachgewiesen in Autoabgasen (insbesondere von Dieselmotoren (Rogge *et al.*, 1993)), Abgasen von mit Braunkohle gefeuerten Öfen (Knobloch and Engewald, 1993), städtischen Aerosolen (Durant *et al.*, 1996; Ramdahl, 1985) und Zigarettenrauch (Grimmer, 1979). Methylierte PAK werden außerdem geochemisch aus Terpenoiden gebildet und kommen dementsprechend in Kohle und Mineralöl vor (Radke, 1987). Eine enzymatische Methylierung von PAK wurde ebenfalls beschrieben (Flesher *et al.*, 1986). Methylierte PAK können bei Temperaturen oberhalb von 700°C Methylenbrücken ausbilden (Adams *et al.*, 1982). PAK, als deren Leitsubstanz Benzo[a]pyren (B[a]P) verwendet wird, lagern sich durch die Luft in der Kutikularschicht von Grünpflanzen (Grünkohl, Salat und anderem Blattgemüse) ab, oder sie gelangen über die Luft- und Rauchtrocknung von Lebensmitteln in die Nahrung. Eine Zusammenstellung verschiedener Bestimmungen des Gehalts von B[a]P in Lebensmitteln (bis 100 µg B[a]P/kg) findet sich bei Grimmer *et al.* (Grimmer, 1988). Der Gehalt von Cyclopenta[def]chrysen (CPC) und B[a]P in 1 g Luftpartikel aus St. Louis, MO (USA) wurde mit 1,2 µg und 3,1 µg bestimmt (Wise *et al.*, 1986).

Das effizient durch die h1B1 aktivierte 6-HMBP wurde als Metabolit von B[a]P in Rattenleberhomogenat identifiziert (Flesher *et al.*, 1982; Flesher and Sydnor, 1973), während die Bildung von 4-OH-CPC aus Cyclopenta[def]chrysen (CPC) nicht untersucht ist. B[a]P, 6-Methylbenzo[a]pyren (6-MBP) (Flesher and Sydnor, 1973; Rogan *et al.*, 1983), 6-HMBP (Flesher and Sydnor, 1973), CPC und 4H-Cyclopenta[def]chrysen-4-on (Rice *et al.*, 1985) zeigten beim Aufpinseln auf Mäusehaut tumorinitiierende Wirkung. 6-MBP verursachte Lebertumore (Surh *et al.*, 1989). Die hydroxylierten Derivate 4-OH-CPC und 6-HMBP waren

im Ames Test ohne metabolische Aktivierung nur schwach mutagen (Glatt *et al.*, 1993; Glatt *et al.*, 1995; Glatt *et al.*, 1994a). Wurde dem Testansatz jedoch die mit PAPS versetzte zytosolische Fraktion aus Rattenleber als metabolisches System hinzugefügt, zeigten beide benzyliche Alkohole eine mutagene Wirkung (Glatt *et al.*, 1993; Surh *et al.*, 1989), wobei das Ausmaß vom Geschlecht der Ratte abhing: Während 6-HMBP bei Verwendung der Leber eines weiblichen Tieres sehr viel stärkere Effekte zeigte, wurde 4-OH-CPC durch Leberhomogenat eines männlichen Tieres effizienter aktiviert (Glatt *et al.*, 1994a). Dies läßt sich dadurch erklären, daß unterschiedliche, geschlechtsspezifisch exprimierte SULT-Formen für die Bioaktivierung verantwortlich sind. 6-HMBP wurde als Substrat für die in der weiblichen Ratte dominante Hydroxysteroid-SULT (rST<sub>a</sub>) beschrieben (Glatt *et al.*, 1994b), während 4-OH-CPC durch die im Männchen dominante Form r1A1 (rAST-IV) und in geringerem Ausmaß auch durch die Hydroxysteroid-SULT umgesetzt wurde (Glatt *et al.*, 1995). Obwohl Mutagenitätsexperimente mit Bakterien kostengünstiger und weniger zeitaufwendig sind, stellen Säugetierzellen in Hinblick auf den Menschen das bessere Modell dar. Die Form 1B1, die sowohl im Colon des Menschen als auch der Ratte vorkommt (Tabellen 8 und 11), wurde ausgewählt, um die Bioaktivierung von Promutagenen durch die beiden Formen zu vergleichen. Hierfür wurden die aus V79 Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters abgeleiteten Zelllinien V79-h1B1, V79-r1B1/A und V79-r1B1/B hergestellt. Da die Mutagenität der benzylichen Alkohole 4-OH-CPC und 6-HMBP in TA1538-h1B1 bekannt war (3.4.1), standen zwei Substanzen für die Validierung der Zelllinien im HPRT-Test zur Verfügung. Für die Mutagenitäts-untersuchungen war es wünschenswert, eine Zelllinie mit einer SULT-Expression ähnlich dem Gewebe und eine viel stärker exprimierende Zelllinie zu erhalten. Letztere diente der Erhöhung der Sensitivität und der Beantwortung der Frage, ob anstelle der Enzymmenge nicht auch die Verfügbarkeit des Kosubstrats limitierend wirken könnte. Das dies nicht der Fall war, zeigte sich anhand der Zelllinien V79-r1B1/A und -/B: Die in etwa die zwanzigfache Menge an Sulfotransferase exprimierende Zelllinie V79-r1B1/A zeigte einen sehr viel stärkeren und von der Konzentration des Promutagens abhängigen Effekt als die Zelllinie mit der niedrigen Expression, V79-r1B1/B. Die Mutagenität wurde daher in diesem System durch die Menge an Sulfotransferase limitiert. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, wie gleichmäßig die Sulfotransferase-Expression innerhalb einer Kultur war und ob alle Zellen gleichermaßen sensitiv gegenüber den benzylichen Alkoholen waren. Hierfür wurden die Zellen in Kolonien auf Objektträgern gezüchtet und mit dem h1B1-Antiserum immunchemisch untersucht. Nur in der stark exprimierenden Zelllinie V79-r1B1/A reichte die

Enzymmenge für den Nachweis aus. Wie im humanen Darmepithel wurde die r1B1 im Zytoplasma der V79-r1B1/A-Zellen gefunden (Abb. 23). Allerdings wurde ein Teil der Zellen nicht gefärbt, wofür eine plausible Erklärung noch aussteht. Da die Zellen nicht synchronisiert wurden, wäre ein Einfluß vom Zellzyklus denkbar. Ob dieser sich jedoch in diesem Ausmaß bemerkbar machen würde, ist fraglich. Da die Enzymaktivität in den zytosolischen Fraktionen aus den rekombinanten Zelllinien unabhängig von der Dauer der Kultivierung war (Abb. 21), sollte das Verhältnis von stark und schwach exprimierenden Zellen innerhalb einer Kultur konstant sein.

Der Vergleich der Immunoreaktivität in den zytosolischen Fraktionen der Zelllinien und der Mukosaproben zeigte, daß die Menge an Sulfotransferase in V79-r1B1/B und V79-h1B1 ähnlich der in der zytosolischen Fraktionen aus den Geweben war. Jedoch ist dieser Vergleich so nicht korrekt, denn die zytosolischen Fraktionen wurden aus der gesamten Mukosa und nicht nur dem einschichtigen Epithel, in dem die 1B1 nachgewiesen wurde (Abb. 9 und 10), hergestellt. Dies erklärt, warum immunchemisch die h1B1 zwar in histologischen Präparaten, nicht aber in fixierten V79-h1B1-Zellen nachzuweisen war. Der in den Zelllinien beobachtete genotoxische Effekt sollte daher im Epithel der Mukosa stärker sein. Die beiden dem Colon der Ratte und des Menschen ähnlichen Zelllinien V79-r1B1/B und V79-h1B1 zeigten große Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber den benzyllischen Alkoholen. Während in der die humane Form exprimierenden Zelllinie die Zahl der Mutanten stark erhöht war, zeigte sich in der anderen Zelllinie nur bei den höchsten Konzentrationen ein schwacher Effekt (Abb. 24 und 25). Es ist folglich zu erwarten, daß bei Exposition mit den getesteten Promutagenen die Mukosa des Menschen stärker mit reaktiven Metaboliten belastet werden würde. Ob dies letztendlich bedeutet, daß der Mensch besser oder schlechter geschützt ist, hängt von dem bereits erwähnten Punkt ab, ob die reaktiven Metabolite zu den Stammzellen gelangen und dort Mutationen verursachen können.

Obwohl für die Etablierung der die humane Form exprimierenden Zelllinie die achtfache Anzahl an Zellklonen untersucht wurde, konnte kein Klon gefunden werden, der mehr als die in der zytosolischen Fraktion aus humanem Colon detektierte Menge an h1B1 enthielt. Das Expressionsniveau in den einzelnen stabilen Zellklonen wird u. a. durch den Integrationsort der cDNA im Genom der Zelle und die Anzahl der integrierten Kopien bestimmt. Allerdings ist es auch denkbar, daß durch das fremde Protein toxische Prozesse, wie z.B. die Sulfatierung und die damit verbundene Inaktivierung von essentiellen Komponenten des Kulturmediums, verursacht werden und Transfektanten mit hoher Expression absterben. Ob dies der Grund dafür ist, daß keine stärker exprimierenden V79-

h1B1-Klone gefunden werden konnten oder ob die Anzahl der untersuchten Klone zu gering war, bleibt eine Vermutung. Da die Plasmide pMP-r1B1 und pMP-h1B1 bis auf 6 zusätzliche Basen zwischen LTR-Promoter und Startkodon in pMP-h1B1 identisch sind, ist es unwahrscheinlich, daß der Grund für die schlechte Ausbeute an stark exprimierenden Klonen beim Plasmid zu suchen ist.

Durch die Verwendung der rekombinanten Zelllinien V79-r1B1/A und -/B wurde die Bioaktivierung von 6-HMBP und 4-OH-CPC durch die in der männlichen und weiblichen Ratte gleichermaßen exprimierte r1B1 gezeigt (Abb. 23 und 24). Hierdurch kann die bislang nicht erklärbare PAPS-abhängige Aktivierung von 6-HMBP durch Leberhomogenat einer männlichen Ratte auf die Anwesenheit von r1B1 zurückgeführt werden. Bei 4-OH-CPC, das sowohl bei Zusatz von weiblichem als auch von männlichem Rattenleberhomogenat im Ames Test mutagen war (Glatt *et al.*, 1994a), ist neben der r1A1 im Männchen und der rSTa im Weibchen (Glatt *et al.*, 1995) ebenfalls die r1B1 beteiligt.

Die im Rahmen dieser und anderer Studien durchgeführten *in-vitro* Mutagenitätsexperimente belegen, daß ein breites Spektrum hydroxylierter Derivate von PAK durch SULT aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, daß diese Enzyme in bedeutender Menge in Zellen des Gastrointestinaltrakts exprimiert werden, in denen die Bildung reaktiver Metabolite keine Gefahr bedeutet. Tatsächlich ist eine Beteiligung von PAK bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms lediglich bei einem Inzuchtstamm des Syrischen Hamsters bekannt (Homburger *et al.*, 1972). Allerdings wird diskutiert, inwieweit das Rauchen ein Risikofaktor für die Darmkrebsentstehung beim Menschen ist. Epidemiologische Studien zeigen eine Erhöhung des Risikos für Adenome im Darm, aber ob dies auch für Karzinome zutrifft, ist strittig (Heineman *et al.*, 1995; Neugut and Terry, 2000; Terry and Neugut, 1998). Zumindest stellt der Zigarettenrauch eine Quelle für PAK und damit B[a]P dar. Dessen mutagene Wirkung wird hauptsächlich auf die Bildung der diastereoisomeren Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxide zurückgeführt, die kovalent an die DNA binden können. DNA-Addukte eines dieser Diastereoisomeren wurden in vier von sieben humanen Colonmucosaproben aus operativ entferntem Gewebe untersucht (Alexandrov *et al.*, 1996). Die Autoren vermuten, daß die gefundenen Adduktemengen (0,2 - 1 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide) eine relevante Belastung der Darmmukosa durch PAK darstellen. Die Werte waren jedoch niedriger als die in weißen Blutkörperchen von gesunden Arbeitern einer Aluminiumfabrik (4 - 10 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide) und in nicht tumorösem Lungenparenchym von Lungenkrebspatienten (0,6 - 9,9 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide) (Alexandrov *et al.*, 1992). Bei stark rauchenden Lungenkrebspatienten wurden in

den weißen Blutkörperchen sehr viel höhere Werte gefunden (62 – 533 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide) (Rojas *et al.*, 1994). Ein Vergleich der DNA-Addukt mengen in Colonmukosa von Patienten mit und ohne Tumoren im Darm zeigte eine Korrelation zwischen hohen Addukt mengen und Dickdarmkrebs (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1995).

Trotz DNA-Addukten in der Colonmucosa zeigen funktionelle Varianten fremdstoffmetabolisierender Enzyme in epidemiologischen Untersuchungen erstaunlich wenig Einfluß auf das Darmkrebsrisiko. Es wurde beschrieben, daß Raucher mit dem Nullallel der Glutathiontransferase M1-1 (GSTM1-1) ein moderat erhöhtes Risiko haben, an Lungenkrebs zu erkranken (McWilliams *et al.*, 1995). Dies wurde auf die Detoxifizierung von u.a. (+)-*anti*- Benzo[*a*]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid durch GSTM1-1 zurückgeführt. Auf die Entstehung von Darmkrebs jedoch zeigte der Polymorphismus der GSTM1-1 keinen Einfluß (Gertig *et al.*, 1998; Lin, 1995). Auch für eine andere Glutathiontransferase mit Nullallel (GST-T1) wurde keine Assoziation gefunden (Gertig *et al.*, 1998). Da die GSTM1-1 im humanen Colon im Vergleich zur Leber nur in geringen Mengen vorkommt, könnte sie im Darm eine untergeordnete Rolle spielen, selbst wenn sie dort induzierbar ist (Massaad *et al.*, 1992; Odwyer *et al.*, 1996). Die Studien zu den bei den N-Acetyltransferasen bekannten Phänotypen des schnellen und langsamen Acetylieres zeigten keine konsistenten Assoziationen zur Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (Brockton *et al.*, 2000).

Bei den Sulfotransferasen liegen Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen polymorphen Formen und dem Risiko für maligne Entartungen nicht vor. Für die in allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts detektierte Form h1A1 gibt es 13 verschiedene Allele (Raftogianis *et al.*, 1997), von denen vier zu einem Aminosäureaustausch führen. Von diesen kommt das Allel, das eine Substitution von R durch H an Position 213 bewirkt, am häufigsten vor. Zudem wurde gezeigt, daß sowohl die h1A1-Aktivität als auch die Thermostabilität in Thrombozyten aus für *h1A1\*H* homozygoten Personen erniedrigt sind (Raftogianis *et al.*, 1997). Eine Reihe von Promutagenen werden durch *h1A1\*H* schlechter aktiviert als durch *h1A1\*R* (Glatt *et al.*, 2000), jedoch ist nicht bekannt, ob sich die polymorphen Formen der h1A1 in ihrer Fähigkeit zur Bioaktivierung der im Zusammenhang mit Colonkrebs diskutierten N-Hydroxyderivate der „Cooked Food Mutagens“ unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde gefunden, daß sich die Allelhäufigkeit von *h1A1\*R* und *h1A1\*H* in 38 Probanden mit Darmkrebs nicht von der in einem Kollektiv aus gesunden oder zufällig ausgewählten Personen unterscheidet (3.1.2.2.1). Einen Einfluß dieses Polymorphismus würde man am ehesten bei den für eine Variante homozygoten Personen

erwarten. Aufgrund deren geringen Anteils reicht die Anzahl der in diesem Rahmen untersuchten Proben nicht aus, um ein statistisch abgesichertes Ergebnis zu erhalten.

Um ein möglicherweise verändertes Expressionsmuster der Sulfotransferasen bei Darmkrebspatienten zu erfassen, wurde das Verhältnis der einzelnen im Colon und Rektum vorkommenden SULT (h1A1, h1A3 und h1B1) unter Verwendung eines Antiserums, das mit allen Formen reagiert, untersucht (Abb. 5 und 6). Die Formen wurden in jeder Probe in einem ähnlichen Verhältnis detektiert. Weder die für die h1A1-Varianten beschriebene unterschiedliche Stabilität war zu erkennen, noch fiel eine der anderen Formen durch besonders starke oder schwache Expression auf, was einen Hinweis auf einen veränderten Status der Sulfotransferasen bei Darmkrebspatienten hätte liefern können. Unterschiede, die die Stabilität von Varianten einer Form beeinflussen, könnten sich vielleicht aufgrund der Kurzlebigkeit der Epithelzellen nicht auf die im Immunblot detektierbare Enzymmenge auswirken. Die Probe von dem Patienten mit Colitis Ulcerosa zeigte insofern einen Unterschied, als daß gar keine Sulfotransferasen nachzuweisen waren. Da es nur diese eine Probe gab, kann lediglich vermutet werden, daß ein Zusammenhang zur Art der Erkrankung besteht.

Zur Aufklärung der Rolle der Sulfotransferasen bei der Darmkrebsentstehung ist die Ratte ein ungeeignetes Modell, da sie sich in ihrer Ausstattung mit SULT im Gastrointestinaltrakt sowohl bezüglich der Anzahl als auch der Menge der Formen vom Menschen stark unterscheidet. Dies zeigt sich besonders daran, daß beim Menschen einige Formen (h1A3, h1B1) in höherem Maß im Darm als in der Leber exprimiert werden, während im Darm der Ratte keine Form zu mehr als 30 % im Vergleich zur Leber gefunden wurde. Zusätzlich zeigte sich die humane Variante der 1B1 viel aktiver bei der Toxifizierung von benzyllischen Alkoholen als die der Ratte. In der Abteilung ist daher die Herstellung einer transgenen Maus geplant, die die humane 1B1 im Darm exprimiert. Des weiteren könnten zukünftige Studien zur Assoziation des h1A1\*R/H-Polymorphismus und der Inzidenz von Darmkrebs zeigen, ob die Sulfotransferase-vermittelte Bioaktivierung hierbei eine Rolle spielt. Dies könnte sich insbesondere bei hohem Verzehr von heterozyklischen aromatischen Aminen auswirken, falls sich herausstellen sollte, daß sich die allelischen Varianten in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung dieser Substanzklasse unterscheiden.

## 5 Zusammenfassung

Die Ausstattung der gastrointestinalen Mukosa des Menschen und der Ratte mit Sulfotransferasen wurde mit Hilfe von Immunodetektion und Enzymaktivitätsmessungen untersucht. In Proben aus Colon und Rektum von 39 Personen wurden die Formen h1A1, h1A3 und h1B1 identifiziert, wobei in einer weiteren Probe, die als einzige von einem an Colitis Ulcerosa erkrankten Patienten stammte, keine Sulfotransferasen nachgewiesen werden konnten. Bei der Immunblot-Analyse war das Expressionsmuster der einzelnen Formen in allen Proben ähnlich. In wenigen Proben waren die relativen Signalintensitäten der h1A1 und der h1B1 um die Hälfte erniedrigt. Der Gehalt von SULT an zytosolischem Protein zeigte einen bis zu 8 – 10fachen Unterschied, er betrug jedoch bei zwei Dritteln der Proben zwischen 0,15 und 0,3 (h1A1 und h1A3) bzw. 0,6 und 0,8 Promille (h1B1). Die Variation konnte nicht auf Alter, Geschlecht oder Krankheitsbild der Patienten zurückgeführt werden. Auch der für die allelischen Varianten der h1A1 beschriebene Effekt auf die Enzymaktivität bzw. Stabilität konnte in der Menge an immunreaktivem Protein nicht in diesem Ausmaß detektiert werden. Die Allelhäufigkeit von *h1A1*\*R und *h1A1*\*H war gegenüber der gesunden Bevölkerung nicht verändert.

In den sieben Proben aus dem Dünndarm (Coecum, viermal Ileum, Jejunum) konnten zusätzlich die Formen h1E1 und h2A1 identifiziert werden. Ein möglicherweise der Form h1C1 entsprechendes Protein wurde im Magen detektiert.

Im Vergleich zum Menschen war die Expression in der Ratte stärker auf die Leber konzentriert. Während beim Menschen in allen untersuchten Abschnitten Sulfotransferasen in Mengen detektiert wurden, die in zwei Fällen (h1B1 und h1A3) sogar den Gehalt in der Leber überstiegen, beschränkte sich die Expression in der Ratte auf im Vergleich zur Leber geringe Mengen im Magen und Dickdarm. Nachgewiesen wurden die r1B1, r1A1 sowie eine nicht identifizierte Form von 35kD, bei der es sich vermutlich um die r1C2 handelt. Im Vergleich zur Leber enthielt der Dickdarm der Ratte 20 – 30 % an r1B1 und 3 % an r1A1, während im Dickdarm des Menschen die 3 – 5fache Menge an h1B1 und 25 – 50 % an h1A1 gefunden wurden. Die nicht identifizierte Form verhielt sich wie die r1B1. Die für die Leber der Ratte bekannte geschlechtsabhängige Expression wurde im Gastrointestinaltrakt nicht beobachtet.

Die Verteilung der Sulfotransferasen im Colon und Ileum des Menschen wurde immunhistochemisch untersucht; für die Gewebe der Ratte war die Spezifität der zur Verfügung stehenden Antiseren nicht ausreichend. Im Colon traten h1B1-spezifische Färbungen in den differenzierten Enterozyten am oberen Ende der Krypten auf, im Dünndarm wurden die Epithelzellen der Zotten gefärbt. Die Färbung konzentrierte sich auf das

Zytoplasma. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich für h1A1 und h1A3, außer daß zusätzlich eine intensive Färbung der Endothelzellen der Kapillaren in der Submukosa des Ileums auftrat. Im Dickdarm war dies nur bei den Kapillaren in den Lymphfollikeln zu erkennen. Die h2A1 war lediglich im Zytoplasma der Epithelzellen der Zotten des Ileums nachzuweisen, während im Colon keine Farbreaktion auftrat.

Durch die Verwendung der rekombinanten Indikatorstämme TA1538-h1A1, -h1A3 und -h1B1 und des Ausgangsstammes *Salmonella typhimurium* TA1538 im Ames-Test wurde gezeigt, daß verschiedene benzyliche und allyliche Alkohole durch im humanen Colon exprimierte Sulfotransferasen zu Mutagenen aktiviert werden. In den meisten Fällen erwies sich eine der drei Sulfotransferasen als besonders effizient in der Bioaktivierung, während durch die anderen Formen kein oder nur ein schwacher Effekt verursacht wurde.

Die Bioaktivierung von Promutagenen durch Sulfotransferasen im Colon muß im Zusammenhang mit der Lokalisation diskutiert werden. Die Zellen im Darm, in denen immunhistochemisch Sulfotransferasen detektiert wurden, haben mit Ausnahme des Endothels je nach Abschnitt eine Lebensdauer von maximal fünf Tagen und machen keine weiteren Zellteilungen mehr durch. Daher sind DNA-Schäden in diesen Zellen ein sehr geringes Risiko für den Organismus. Soweit die reaktiven Metabolite in diesen Zellen gefangen bleiben, kann die Bioaktivierung in diesen Zellen und die Bildung von Addukten als protektiv betrachtet werden, da letztere nach wenigen Tagen mit den toten Zellen in das Darmlumen abgegeben werden.

Für den Vergleich der Bioaktivierung von Promutagenen durch die Form 1B1 des Menschen und der Ratte wurden aus V79 Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters abgeleitete Zelllinien hergestellt, die je eine der beiden Formen stabil exprimieren. Damit standen 1B1-profiziente Indikatorzellen für den HPRT-Genmutationstest zur Verfügung, und die 1B1-abhängige Bioaktivierung konnte in einem System untersucht werden, die dem eukaryontischen Organismus näher steht als die für die Ames-Tests verwendeten Bakterien. So war z.B. die Sulfotransferase wie im Gewebe im Zytoplasma lokalisiert. Als Modellsubstanzen wurden hierbei die bereits in TA1538-h1B1 mutagen wirkenden benzylichen Alkohole 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren und 4-Hydroxycyclopenta-[*def*]chrysen getestet.

Da die Sensitivität einer Sulfotransferase-exprimierenden V79-Zelllinie sowohl durch die Menge an Sulfotransferase als auch durch die Verfügbarkeit des Sulfodonors limitiert sein könnte, wurden die Mutagenitätsexperimente mit V79-r1B1-Zelllinien durchgeführt, die sich in ihrer Enzymaktivität um das Zwanzigfache unterschieden: V79-r1B1/A und -/B. Eine

starke Erhöhung der Mutantenfrequenz wurde nur in der hoch exprimierenden Zelllinie V79-r1B1/A ( $1019 \pm 224$  pmol/mg/min) beobachtet, so daß eine gravierende Beeinträchtigung der Sensitivität durch einen Mangel an Kosubstrat ausgeschlossen wurde. In der niedriger exprimierenden Zelllinie V79-r1B1/B ( $57 \pm 9$  pmol/mg/min) war nur mit 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren ein schwacher Anstieg der Mutantenfrequenz zu erkennen, der mit  $0,3 \mu\text{M}$  bei einer in etwa 100fach höheren Konzentration begann als bei V79-r1B1/A. Die zytosolische Fraktion aus V79-r1B1/B-Zellen enthielt in etwa die dreifache Menge an r1B1-Protein wie die aus Colonmucosa der Ratte. Da zumindest für die humane Mukosa gezeigt wurde, daß die 1B1 nur im einschichtigen Epithel, nicht aber in allen Zellen der Mukosa exprimiert wird, repräsentiert die zytosolische Fraktion aus der Mukosa nur bedingt die Expression in den Epithelzellen und der Vergleich mit den V79-1B1-Zellen ist grob.

Im Gegensatz zu V79-r1B1/B war die Zelllinie V79-h1B1, die ebenfalls nur mit Darm und Leber vergleichbare Mengen an h1B1 exprimierte, in der Lage, beide benzyllischen Alkohole zu aktivieren. Der Erhöhung der Mutantenfrequenz im Vergleich zur Kontrollzelllinie war ähnlich wie bei der stark exprimierenden Zelllinie V79-r1B1/A, erforderte aber 10fach höhere Konzentrationen.

Somit unterscheiden sich Mensch und Ratte nicht nur insgesamt in ihrer Ausstattung des Gastrointestinaltrakts mit Sulfotransferasen, auch bei Betrachtung einer einzelnen Form zeigten sich deutliche Unterschiede in der Aktivierung von zwei Promutagenen. Die Ratte ist daher ein ungeeignetes Modell, um die Rolle von Sulfotransferasen bei tumorinitiierenden Prozessen im Darm zu untersuchen. Dies unterstreicht die Bedeutung von rekombinanten *in-vitro*-Systemen für die Erfassung des humanen Metabolismus von Fremdstoffen.

Insgesamt kennt man nur eine geringe Anzahl von Substanzen, die im Tierexperiment Colontumore erzeugen, und mit Ausnahme der heterozyklischen aromatischen Amine sind diese lediglich von experimenteller Bedeutung. Dies spricht für effiziente Schutzmechanismen der Darmmukosa gegenüber Mutagenen und läßt die Frage nach der hohen Inzidenz des Kolorektalkarzinoms offen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, J.D., LaVoie, E.J. and Hoffmann, D. (1982) Analysis of methylated polynuclear aromatic hydrocarbons by capillary gas chromatography: influence of temperature on the pyrosynthesis of anthracene, phenanthrene and their methylated derivatives. *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 274-277.
- Aksoy, I.A. and Weinshilboum, R.M. (1995) Human thermolabile phenol sulfotransferase gene (STM): molecular cloning and structural characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 786-795.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A.M., Petruzzelli, S., Giuntini, C. and Bartsch, H. (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, **52**, 6248-6253.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Kadlubar, F.F., Lang, N.P. and Bartsch, H. (1996) Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis*, **17**, 2081-2083.
- Araki, Y., Sakakibara, Y., Boggaram, V., Katafuchi, J., Suiko, M., Nakajima, H. and Liu, M.-C. (1997) Tissue-specific and developmental stage-dependent expression of a novel rat dopa/tyrosine sulfotransferase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 801-806.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (eds.) (1999) *Krebs in Deutschland. 2. aktualisierte Ausgabe*, Saarbrücken.
- Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M. and Hauser, H. (1988) Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene*, **68**, 213-219.
- Augustsson, K., Skog, K., Jagerstad, M., Dickman, P.W. and Steineck, G. (1999) Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet*, **353**, 703-707.
- Back, D.J., Madden, S. and Orme, M.L. (1990) Gastrointestinal metabolism of contraceptive steroids. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **163**, 2138-2145.
- Baijal, P.K., Fitzpatrick, D.W. and Bird, R.P. (1997) Phenobarbital and 3-methylcholanthrene treatment alters phase I and II enzymes and the sensitivity of the rat colon to the carcinogenic activity of azoxymethane. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 789-798.
- Baijal, P.K., Fitzpatrick, D.W. and Bird, R.P. (1998) Modulation of colonic xenobiotic metabolizing enzymes by feeding bile acids: comparative effects of cholic, deoxycholic, lithocholic and ursodeoxycholic acids. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 601-607.
- Baranczyk-Kuzma, A., Audus, K.L. and Borchardt, R.T. (1989) Substrate specificity of phenol sulfotransferase from primary cultures of bovine brain microvessel endothelium. *Neurochem. Res.*, **14**, 689-691.
- Beckmann, J.D., Spurzem, J.R. and Rennard, S.I. (1993) Phenol sulfotransferase expression in the airways: enzymological and immunohistochemical demonstration. *Cell Tissue Res.*, **274**, 475-485.
- Belinsky, M. and Jaiswal, A.K. (1993) NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.*, **12**, 103-117.
- Bernier, F., Soucy, P. and Luu-The, V. (1996) Human phenol sulfotransferase gene contains two alternative promoters: structure and expression of the gene. *DNA Cell Biol.*, **15**, 367-375.
- Borthwick, E.B., Burchell, A. and Coughtrie, M.W.H. (1993) Purification and immunochemical characterization of a male-specific rat liver oestrogen sulphotransferase. *Biochem. J.*, **289**, 719-725.

- Bowman, K.G. and Bertozzi, C.R. (1999) Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chem. Biol.*, **6**, R9-R22.
- Britelli, A., de Santi, C., Raunio, H., Pelkonen, O., Rossi, G. and Pacifici, G.M. (1999) Interethnic and interindividual variability of platelet sulfotransferase activity in Italians and Finns. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **55**, 691-695.
- Brockmüller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., Sachse, C. and Roots, I. (1998) Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol. Lett.*, **102-103**, 173-183.
- Brockton, N., Little, J., Sharp, L. and Cotton, S.C. (2000) N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, **151**, 846-861.
- Bullas, L.R. and Ryu, J.-I. (1983) *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r<sup>-</sup> m<sup>+</sup> for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J. Bacteriol.*, **156**, 471-474.
- Cashman, J.R., Xiong, Y.N., Xu, L. and Janowsky, A. (1999) N-oxygenation of amphetamine and methamphetamine by the human flavin-containing monooxygenase (form 3): role in bioactivation and detoxication. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 1251-1260.
- Catania, V.A., Luquita, M.G., Pozzi, E.J.S. and Mottino, A.D. (1998) Differential induction of glutathione S-transferase subunits by spironolactone in rat liver, jejunum and colon. *Life Sci.*, **63**, 2285-2293.
- Chen, J., Stampfer, M.J., Hough, H.L., Garcia-Closas, M., Willett, W.C., Hennekens, C.H., Kelsey, K.T. and 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. and Kadlubar, F.F. (1995) Metabolic activation of the N-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **16**, 413-417.
- Comer, K.A. and Falany, C.N. (1992) Immunological characterization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase from human liver and adrenal. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 645-651.
- Crofts, F.G., Strickland, P.T., Hayes, C.L. and Sutter, T.R. (1997) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by human cytochrome P4501B1. *Carcinogenesis*, **18**, 1793-1798.
- Crofts, F.G., Sutter, T.R. and Strickland, P.T. (1998) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis*, **19**, 1969-1973.
- Czich, A., Bartsch, I., Dogra, S., Hornhardt, S. and 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.
- de Kok, T.M.C.M., Pachen, D.M.F.A., van Maanen, J.M.S., Lafleur, M.V.M., Westmijze, E.J., ten Hoor, F. and Kleinjans, J.C.S. (1994) Role of oxidative DNA damage in the mechanism of fecapentaene-12 genotoxicity. *Carcinogenesis*, **15**, 2559-2565.
- de la Luna, S., Soria, I., Pulido, D., Ortin, J. and Jimenez, A. (1988) Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, **62**, 121-126.
- DeBaun, J.R., Rowley, J.Y., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1968) Sulfotransferase activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rodent livers susceptible and resistant to this carcinogen. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **129**, 268-273.
- Debiec-Rychter, M., Land, S.J. and King, C.M. (1996) Histological localization of messenger RNAs for rat acetyltransferases that acetylate serotonin and genotoxic arylamines. *Cancer Res.*, **56**, 1517-1525.
- Delker, D.A., McKnight, S.J., 3rd and Rosenberg, D.W. (1998) The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol. *Toxicol. Sci.*, **45**, 66-71.

- Demyan, W.F., Song, C.S., Kim, D.S., Her, S., Gallwitz, W., Rao, T.R., Slomczynska, M., Chatterjee, B. and 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. and Oesch, F. (1988) Stable expression of rat cytochrome P450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5769-5773.
- Dooley, T.P., Haldeman-Cahill, R., Joiner, J. and 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.
- Dunn, R.T., 2nd, Gleason, B.A., Hartley, D.P. and Klaassen, C.D. (1999) Postnatal ontogeny and hormonal regulation of sulfotransferase SULT1B1 in male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **290**, 319-324.
- Dunn, R.T. and Klaassen, C.D. (1998) Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 598-604.
- Durant, J.L., Busby, W.F., Lafleur, A.L., Penman, B.W. and Crespi, C.L. (1996) Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Res.*, **371**, 123-157.
- Engeland, K. and Maret, W. (1993) Extrahepatic, differential expression of four classes of human alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 47-53.
- Engelke, C.E., Meinl, W., Boeing, H. and Glatt, H. (2000) Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Pharmacogenetics*, **10**, 163-169.
- Falany, C.N. (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, **11**, 206-216.
- Falany, C.N., Krasnykh, V. and 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, C.N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J. and Falany, J.L. (2000) Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem. J.*, **346**, 857-864.
- Falany, J.L., Azziz, R. and Falany, C.N. (1998) Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium. *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 329-339.
- Feng, Y., Fretland, A.J., Rustan, T.D., Jiang, W., Becker, W.K. and Hein, D.W. (1997) Higher frequency of aberrant crypt foci in rapid than slow acetylator inbred rats administered the colon carcinogen 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 56-62.
- Flammang, T.J., Yamazoe, Y., Benson, R.W., Roberts, D.W., Potter, D.W., Chu, D.Z., Lang, N.P. and Kadlubar, F.F. (1989) Arachidonic acid-dependent peroxidative activation of carcinogenic arylamines by extrahepatic human tissue microsomes. *Cancer Res.*, **49**, 1977-1982.
- Flesher, J.W., Myers, S.R., Bergo, C.H. and Blake, J.W. (1986) Bioalkylation of dibenz[*a,h*]anthracene in rat liver cytosol. *Chem.-Biol. Interact.*, **57**, 223-233.
- Flesher, J.W., Stansbury, K.H. and Sydnor, K.L. (1982) *S*-Adenosyl-L-methionine is a carbon donor in the conversion of benzo[*a*]pyrene to 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrene by rat liver S-9. *Cancer Lett.*, **16**, 91-94.
- Flesher, J.W. and Sydnor, K.L. (1973) Possible role of 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrene as a proximate carcinogen of benzo[*a*]pyrene and 6-methylbenzo[*a*]pyrene. *Int. J. Cancer*, **11**, 433-437.

- Foldes, A. and Meek, J.L. (1973) Rat brain phenolsulfotransferase: partial purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 365-374.
- Fontana, R.J., Lown, K.S., Paine, M.F., Fortlage, L., Santella, R.M., Felton, J.S., Knize, M.G., Greenberg, A. and Watkins, P.B. (1999) Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology*, **117**, 89-98.
- Forbes-Bamforth, K.J. and Coughtrie, M.W.H. (1994) Identification of a new adult human liver sulfotransferase with specificity for endogenous and xenobiotic estrogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 707-711.
- Fujita, K., Nagata, K., Ozawa, S., Sasano, H. and Yamazoe, Y. (1997) Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases. *J. Biochem. Tokyo*, **122**, 1052-1061.
- Gertig, D.M., Stampfer, M., Haiman, C., Hennekens, C.H., Kelsey, K. and Hunter, D.J. (1998) Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**, 1001-1005.
- Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P. and de Waziers, I. (1999) Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*, **9**, 295-306.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A. and Willett, W.C. (1994) Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.*, **54**, 2390-2397.
- Glatt, H., Engelke, C.E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A.L., Coughtrie, M.W., Andrae, U., Falany, C.N. and Meinl, W. (2000) Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.*, **112-113**, 341-348.
- Glatt, H.R. (1993) HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters. In Fahrig, R. (ed.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (Germany), pp. 243-262.
- Glatt, H.R. (1997) Sulfation and sulfotransferases. 4. Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J.*, **11**, 314-321.
- 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. and Yamazoe, Y. (1998) Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem.-Biol. Interact.*, **109**, 195-219.
- Glatt, H.R., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J. and 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., Henschler, R., Frank, H., Seidel, A., Yang, C., Abu-Shqara, E. and Harvey, R.G. (1993) Sulfotransferase-mediated mutagenicity of 1-hydroxymethylpyrene and 4H-cyclopenta[def]chrysen-4-ol and its enhancement by chloride anions. *Carcinogenesis*, **14**, 599-602.
- Glatt, H.R., Henschler, R., Phillips, D.H., Blake, J.W., Steinberg, P., Seidel, A. and Oesch, F. (1990) Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells. *Environ. Health Perspect.*, **88**, 43-48.
- Glatt, H.R., Pabel, U., Hagen, M., Coughtrie, M.W.H., Falany, C.N., Papanikolaou, Z. and Bartsch, I. (1996) Salmonella strains engineered for conjugating enzymes and their application in mutagenicity testing. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **48**, 350.
- Glatt, H.R., Pauly, K., Czich, A., Falany, J.L. and Falany, C.N. (1995) Activation of benzylic alcohols to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Pharmacol.*, **293**, 173-181.

- Glatt, H.R., Pauly, K., Frank, H., Seidel, A., Oesch, F., Harvey, R.G. and Werle-Schneider, G. (1994a) Substance-dependent sex differences in the activation of benzylic alcohols to mutagens by hepatic sulfotransferases of the rat. *Carcinogenesis*, **15**, 2605-2611.
- Glatt, H.R., Pauly, K., Piée-Staffa, A., Seidel, A., Hornhardt, S. and Czich, A. (1994b) Activation of promutagens by endogenous and heterologous sulfotransferases expressed in continuous cell cultures. *Toxicol. Lett.*, **72**, 13-21.
- Glatt, H.R., Pudil, J., Seidel, A. and Czich, A. (1994c) Stable expression of heterologous sulfotransferase in V79 cells: activation of primary and secondary benzylic alcohols. *Polycyclic Aromat. Compds.*, **7**, 153-160.
- Glatt, H.R., Seidel, A., Harvey, R.G. and Coughtrie, M.W.H. (1994d) Activation of benzylic alcohols to mutagens by human hepatic sulphotransferases. *Mutagenesis*, **9**, 553-557.
- Grimmer, G. (1979) In Umweltbundesamt (ed.) *Lufqualitätskriterien für ausgewählte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe*. Erich Schmidt Verlag, Berlin, Vol. 1, pp. 54-76.
- Grimmer, G. (1988) Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. In Eisenbrand, G., Frank, H.K., Grimmer, G., Hapke, H.-J., Thier, H.-P. and Weigert, G. (eds.), *Derzeitige Belastung und Trends bei der Belastung der Lebensmittel durch Fremdstoffe*. Verlag W. Kohlhammer GmbH, Karlsruhe, pp. 151-187.
- Gupta, I., Suzuki, K., Bruce, W.R., Krepinsky, J.J. and Yates, P. (1984) A model study of fecapentaenes: mutagens of bacterial origin with alkylating properties. *Science*, **225**, 521-523.
- Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C.N. and Glatt, H. (1998) Expression of human estrogen sulfotransferase in *Salmonella typhimurium*: differences between hHST and hEST in the enantioselective activation of 1-hydroxyethylpyrene to a mutagen. *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 249-253.
- Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M.J., Ingelman-Sundberg, M. and Badger, T.M. (1996) Effects of diet and ethanol on the expression and localization of cytochromes P450 2E1 and P450 2C7 in the colon of male rats. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 61-69.
- Hartman, A.P., Wilson, A.A., Wilson, H.M., Aberg, G., Falany, C.N. and Walle, T. (1998) Enantioselective sulfation of  $\beta_2$ -receptor agonists by the human intestine and the recombinant M-form phenolsulfotransferase. *Chirality*, **10**, 800-803.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 445-600.
- Hein, D.W., Rustan, T.D., Ferguson, R.J., Doll, M.A. and Gray, K. (1994) Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Arch. Toxicol.*, **68**, 129-133.
- Heineman, E.F., Hoar Zahm, S., McLaughlin, J.K. and Vaught, J.B. (1995) Increased risk of colorectal cancer among smokers: Results of a 26-year follow-up of US veterans and a review. *Int. J. Cancer*, **59**, 728-738.
- Hengstler, J.G., Bottger, T., Tanner, B., Dietrich, B., Henrich, M., Knapstein, P.G., Junginger, T. and Oesch, F. (1998) Resistance factors in colon cancer tissue and the adjacent normal colon tissue: glutathione S-transferases alpha and pi, glutathione and aldehyde dehydrogenase. *Cancer Lett.*, **128**, 105-112.
- Her, C., Kaur, G.P., Athwal, R.S. and Weinshilboum, R.M. (1997) Human sulfotransferase SULT1C1: cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization. *Genomics*, **41**, 467-470.
- Her, C., Szumlanski, C., Aksoy, I.A. and Weinshilboum, R.M. (1996) Human jejunal estrogen sulfotransferase and dehydroepiandrosterone sulfotransferase: immunochemical characterization of individual variation. *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 1328-1335.

- Her, C., Wood, T.C., Eichler, E.E., Mohrenweiser, H.W., Ramagli, L.S., Siciliano, M.J. and Weinshilboum, R.M. (1998) Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics*, **53**, 284-295.
- Hirai, N., Kingston, D.G.I., van Tassell, R.L. and Wilkins, T.D. (1982) Structure elucidation of a potent mutagen from human feces. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6149-6150.
- Homburger, F., Hsueh, S.S., Kerr, C.S. and Russfield, A.B. (1972) Inherited susceptibility of inbred strains of Syrian hamsters to induction of subcutaneous sarcomas and mammary and gastrointestinal carcinomas by subcutaneous and gastric administration of polynuclear hydrocarbons. *Cancer Res.*, **32**, 360 - 366.
- Homma, H., Nakagome, I. and Matsui, M. (1992) Differential localization of sulfotransferase isoenzymes in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 872-878.
- Huttner, W.B. (1987) Protein tyrosine sulfation. *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 361-363.
- Ilett, K.F., David, B.M., Detchon, P., Castleden, W.M. and Kwa, R. (1987) Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, **47**, 1466-1469.
- Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S. and Sugimura, T. (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, **12**, 1503-1506.
- Kaderlik, K.R., Minchin, R.F., Mulder, G.J., Ilett, K.F., Daugaard-Jenson, M., Teitel, C.H. and Kadlubar, F.F. (1994) Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rat extrahepatic tissues. *Carcinogenesis*, **15**, 1703-1709.
- Kadlubar, F.F. (1994) Biochemical individuality and its implications for drug and carcinogen metabolism: recent insights from acetyltransferase and cytochrome P4501A2 phenotyping and genotyping in humans. *Drug Metab. Rev.*, **26**, 37-46.
- Kampman, E., Slattery, M.L., Bigler, J., Leppert, M., Samowitz, W., Caan, B.J. and Potter, J.D. (1999) Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study. *Cancer Epidem. Biomarker Prev.*, **8**, 15-24.
- Kester, M.H.A., Kaptein, E., Roest, T.J., van Dijk, C.H., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H.R., Coughtrie, M.W.H. and Visser, T.J. (1999) Characterization of human iodothyronine sulfotransferases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 1357-1364.
- Kiehlbauch, C.C., Lam, Y.F. and 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.
- Kiss, I., Sandor, J., Pajkos, G., Bogner, B., Hegedus, G. and Ember, I. (2000) Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res*, **20**, 519-22.
- Knobloch, T. and Engewald, W. (1993) Identification of some polar polycyclic compounds in emissions from brown-coal-fired residential stoves. *HRC - J. High Res. Chromatogr.*, **16**, 239-242.
- Kolars, J.C., Awni, W.M., Merion, R.M. and Watkins, P.B. (1991) First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet*, **338**, 1488-1490.
- Kolars, J.C., Benedict, P., Schmied-Linren, P. and Watkins, P.B. (1994a) Aflatoxin B<sub>1</sub>-adduct formation in rat and human small bowel enterocytes. *Gastroenterology*, **106**, 433-439.
- Kolars, J.C., Lown, K.S., Schmiedlin-Ren, P., Ghosh, M., Fang, C., Wrighton, S.A., Merion, R.M. and Watkins, P.B. (1994b) CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics*, **4**, 247-259.
- 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.

- Lang, D.H., Yeung, C.K., Peter, R.M., Ibarra, C., Gasser, R., Itagaki, K., Philpot, R.M. and Rettie, A.E. (1998) Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1005-1012.
- Lang, N.P., Butler, M.A., Massengill, J., Lawson, M., Craig Stotts, R., Hauer-Jensen, H. and Kadlubar, F.F. (1994) Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidem. Biomarkers Prev.*, **3**, 675-682.
- Laqueur, G.L. (1965) The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycone. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **340**, 151-163.
- Laqueur, G.L. and Spatz, M. (1968) Toxicology of cycasin. *Cancer Res.*, **28**, 2262-2267.
- Larsen-Su, S. and Williams, D.E. (1996) Dietary indole-3-carbinol inhibits FMO activity and the expression of flavin-containing monooxygenase form 1 in rat liver and intestine. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**, 927-931.
- Lewis, A.J., Walle, U.K., King, R.S., Kadlubar, F.F., Falany, C.N. and 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.
- Lillie, R. (1954) *Histopathologic technic and practical histochemistry*. The Blakiston Company, New York, Toronto.
- Lin, H.J. (1995) Glutathione S transferase (GSTM1) null genotype. smoking and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Res.*, **55**, 1224-1226.
- Lin, J., Berkman, C.E. and Cashman, J.R. (1996) N-oxygenation of primary amines and hydroxylamines and retroreduction of hydroxylamines by adult human liver microsomes and adult human flavin-containing monooxygenase 3. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 1183-1193.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Madani, S., Paine, M.F., Lewis, L., Thummel, K.E. and Shen, D.D. (1999) Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. *Pharm. Res.*, **16**, 1199-1205.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215.
- Massaad, L., de Waziers, I., Ribrag, V., Janot, F., Beaune, P.H., Morizet, J., Gouyette, A. and Chabot, G.G. (1992) Comparison of mouse and human colon tumors with regard to phase I and phase II drug-metabolizing enzyme systems. *Cancer Res.*, **52**, 6567-6575.
- Matsui, M. and Watanabe, H.K. (1982) Developmental alteration of hepatic UDP-glucuronosyltransferase and sulphotransferase towards androsterone and 4-nitrophenol in Wistar rats. *Biochem. J.*, **204**, 441-447.
- McAllister, J.M. and Hornsby, P.J. (1988) Dual regulation of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17-alpha-hydroxylase, and dehydroepiandrosterone sulfotransferase by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and activators of protein kinase C in cultured human adrenocortical cells. *Endocrinology*, **122**, 2012-2018.
- McKinnon, R.A., Burgess, W.M., Hall, P.M., Roberts-Thomson, S.J., Gonzalez, F.J. and McManus, M.E. (1995) Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, **36**, 259-267.
- McWilliams, J.E., Sanderson, B.J.S., Miller, D.G. and Beattie, E.J. (1995) Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **4**, 589-594.

- Mercurio, M.G., Shiff, S.J., Galbraith, R.A. and Sassa, S. (1995) Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 350-355.
- Mojarrabi, B. and Mackenzie, P.I. (1998) Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 704-709.
- Mori, H., Mori, Y., Tanaka, T., Yoshimi, N., Sugie, S., Kawamori, T. and Narisawa, T. (1992) Cell kinetic analysis of the mucosal epithelium and assay of ornithine decarboxylase activity during the process of 1-hydroxyanthraquinone-induced large bowel carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **13**, 2217-2220.
- Munzel, P.A., Schmohl, S., Heel, H., Kalberer, K., Bock-Hennig, B.S. and Bock, K.W. (1999) Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 569-573.
- Murray, G.I., Taylor, M.C., Morag, C.E., McFadyen, J.A., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D. and Melvin, W.T. (1997) Tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.*, **57**, 3026-3031.
- Nagao, M. (1999) A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens--heterocyclic amines--based on molecular information. *Mutat. Res.*, **431**, 3-12.
- Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Gong, D.W., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1993) Isolation and expression of a cDNA encoding a male-specific rat sulfotransferase that catalyzes activation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24720-24725.
- Nagata, K. and Yamazoe, Y. (2000) Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 159-176.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42.
- Neugut, A.I. and Terry, M.B. (2000) Cigarette Smoking and Microsatellite Instability: Causal Pathway or Marker-Defined Subset of Colon Tumors? *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1791-1793.
- Odwyer, P.J., Szarka, C.E., Yao, K.S., Halbherr, T.C., Pfeiffer, G.R., Green, F., Gallo, J.M., Brennan, J., Frucht, H., Goosenberg, E.B., Hamilton, T.C., Litwin, S., Balshem, A.M., Engstrom, P.F. and Clapper, M.L. (1996) Modulation of gene expression in subjects at risk for colorectal cancer by the chemopreventive dithiolethione oltipraz. *J. Clin. Invest.*, **98**, 1210-1217.
- Ogura, K., Satsukawa, M., Okuda, H., Hiratsuka, A. and Watabe, T. (1994) Major hydroxysteroid sulfotransferase STa in rat liver cytosol may consist of two microheterogeneous subunits. *Chem.-Biol. Interact.*, **92**, 129-144.
- Orzechowski, A., Schrenk, D., Bock-Hennig, B.S. and Bock, K.W. (1994) Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their *N*-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene complex. *Carcinogenesis*, **15**, 1549-1553.
- Ozawa, S., Nagata, K., Gong, D.W., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1993) Expression and functional characterization of a rat sulfotransferase (ST1A1) cDNA for sulfations of phenolic substrates in COS-1 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **61**, 153-156.
- Ozawa, S., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1995) Formation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline- and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline-sulfamates by cDNA-expressed mammalian phenol sulfotransferases. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 264-269.

- Pacifici, G.M., Dalessandro, C., Gucci, A. and Giuliani, L. (1997a) Sulphation of the heterocyclic amine 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the human liver and intestinal mucosa: Interindividual variability. *Arch. Toxicol.*, **71**, 477-481.
- Pacifici, G.M., Eligi, M. and Giuliani, L. (1993) (+) and (-) terbutaline are sulphated at a higher rate in human intestine than in liver. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 483-487.
- Pacifici, G.M., Franchi, M., Gervasi, P.G., Longo, V., di Simplicio, P., Temellini, A. and Giuliani, L. (1989) Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacology*, **38**, 137-145.
- Pacifici, G.M., Gucci, A. and Giuliani, L. (1997b) Testosterone sulphation and glucuronidation in the human liver: interindividual variability. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 253-258.
- Paine, M.F., Khalighi, M., Fisher, J.M., Shen, D.D., Kunze, K.L., Marsh, C.L., Perkins, J.D. and Thummel, K.E. (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1552-1562.
- Patel, H.R., Hewer, A., Hayes, J.D., Phillips, D.H. and Campbell, F.C. (1998) Age-dependent change of metabolic capacity and genotoxic injury in rat intestine. *Chem. Biol. Interact.*, **113**, 27-37.
- Paulsen, J.E., Steffensen, I.L., Namork, E., Hein, D.W. and Alexander, J. (1996) Effect of acetylator genotype on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl induced aberrant crypt foci in the colon of hamsters. *Carcinogenesis*, **17**, 459-465.
- Peters, W.H., Kock, L., Nagengast, F.M. and Kremers, P.G. (1991) Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut*, **32**, 408-412.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Carriere, V., Cugnenc, P.H., Berger, A., Carnot, F., Beaune, P. and de Waziers, I. (1995) High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. *Cancer Res.*, **55**, 5611-5616.
- Plummer, S.M., Hall, M. and Faux, S.P. (1995) Oxidation and genotoxicity of fecapentaene-12 are potentiated by prostaglandin h synthase. *Carcinogenesis*, **16**, 1023-1028.
- Radke, M. (1987) Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. In Brooks, J. and Welte, D.H. (eds.), *Advances in Petroleum Geochemistry*. Academic Press, London, Vol. 2, pp. 141-207.
- Radomska-Pandya, A., Little, J.M., Pandya, J.T., Tephly, T.R., King, C.D., Barone, G.W. and Raufman, J.-P. (1998) UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Bba Lipid Lipid Metab.*, **1394**, 199-208.
- Raftogianis, R.B., Wood, T.C., Otterness, D.M., van Loon, J.A. and 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.
- Ramdahl, T. (1985) Polycyclic aromatic ketones in source emissions and ambient air. In Cooke, M. and Dennis, A.J. (eds.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms, Methods and Metabolism*. Battelle Press, Columbus (Ohio), pp. 1075-1087.
- Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B., Zang, E., Hamid, R., Kelloff, G.J., Steele, V. and Reddy, B.S. (1995) Enhancement of experimental colon carcinogenesis by dietary 6-phenylhexyl isothiocyanate. *Cancer Res.*, **55**, 4311-4318.
- Rice, J.E., Makowski, G.S., Hosted, T.J. and LaVoie, E.J. (1985) Methylene-bridged bay region chrysene and phenanthrene derivatives and their keto-analogs: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and tumor-initiating activity on mouse skin. *Cancer Lett.*, **27**, 199-206.

- Rijke, R.P., Plaisier, H.M. and Langendoen, N.J. (1979) Epithelial cell kinetics in the descending colon of the rat. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **30**, 85-94.
- Rogan, E.G., Hakam, A. and Cavalieri, E.L. (1983) Structure elucidation of a 6-methylbenzo[a]pyrene-DNA adduct formed by horseradish peroxidase *in vitro* and mouse skin *in vivo*. *Chem.-Biol. Interact.*, **47**, 111-122.
- Rogge, W.R., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R. and Simoneit, B.R.T. (1993) Sources of fine organic aerosol: 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-duty diesel trucks. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 636-651.
- Rojas, M., Alexandrov, K., Vanschooten, F.J., Hillebrand, M., Kriek, E. and Bartsch, H. (1994) Validation of a new fluorometric assay for benzo[a]pyrene diolepoxide DNA adducts in human white blood cells: comparisons with <sup>32</sup>P-postlabeling and ELISA. *Carcinogenesis*, **15**, 557-560.
- Rosenberg, D.W. (1991) Tissue-specific induction of the carcinogen inducible cytochrome P450 isoform, P450IAI, in colonic epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.*, **284**, 223-226.
- Runge-Morris, M. and Wilusz, J. (1991) Age and gender-related gene expression of hydroxysteroid sulfotransferase-a in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 1051-1056.
- Runge-Morris, M.A. (1997) Sulfation and sulfotransferases .2. Regulation of expression of the rodent cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, **11**, 109-117.
- Sakakibara, Y., Takami, Y., Zwieb, C., Nakayama, T., Suiko, M., Nakajima, H. and 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. and 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sattar, A., Hewer, A., Phillips, D.H. and Campbell, F.C. (1999) Metabolic proficiency and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in APCMin mouse adenomas and uninvolved mucosa. *Carcinogenesis*, **20**, 1097-1101.
- Saura, J., Nadal, E., van den Berg, B., Vila, M., Bombi, J.A. and Mahy, N. (1996) Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.*, **59**, 1341-1349.
- Schauss, S.J., Henry, T., Palmatier, R., Halvorson, L., Dannenbring, R. and Beckmann, J.D. (1995) Characterization of bovine tracheobronchial phenol sulphotransferase cDNA and detection of mRNA regulation by cortisol. *Biochem. J.*, **311**, 209-217.
- Sharp, S., Barker, E.V., Coughtrie, M.W.H., Lowenstein, P.R. and Hume, R. (1993) Immunochemical characterisation of a dehydroepiandrosterone sulfotransferase in rats and humans. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 539-548.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. and Sutter, T.R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.*, **56**, 2979-2984.
- Shimada, T., Watanabe, J., Kawajiri, K., Sutter, T.R., Guengerich, F.P., Gillam, E.M. and Inoue, K. (1999) Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis*, **20**, 1607-1613.

- Steffensen, I.L., Fretland, A.J., Paulsen, J.E., Feng, Y., Eide, T.J., Devanaboyina, U.S., Hein, D.W. and Alexander, J. (2000) DNA adduct levels and intestinal lesions in congenic rapid and slow acetylator syrian hamsters admitt food mutagens 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Pharmacol. Toxicol.*, **86**, 257-263.
- Strassburg, C.P., Nguyen, N., Manns, M.P. and Tukey, R.H. (1998) Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 647-654.
- Strassburg, C.P., Nguyen, N., Manns, M.P. and Tukey, R.H. (1999) UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, **116**, 149-160.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sugimura, T. (1997) Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Res.*, **376**, 211-219.
- Sugimura, T. (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, **21**, 387-95.
- Sundaram, R.S., Szumlanski, C., Otterness, D., Van Loon, J.A. and Weinshilboum, R.D. (1989) Human intestinal phenol sulfotransferase: assay conditions, activity levels and partial purification of the thermolabile form. *Drug Metab. Dispos.*, **17**, 255-264.
- Surh, Y.-J., Kwon, H.J. and Tannenbaum, S.R. (1993) Sulfotransferase-mediated activation of 4-hydroxy- and 3,4-dihydroxy-3,4-dihydrocyclopenta[*c,d*]pyrene, major metabolites of cyclopenta[*c,d*]pyrene. *Cancer Res.*, **53**, 1017-1022.
- Surh, Y.-J., Liem, A., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1989) Metabolic activation of the carcinogen 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrene: formation of an electrophilic sulfuric acid ester and benzylic DNA adducts in rat liver *in vivo* and in reactions *in vitro*. *Carcinogenesis*, **10**, 1519-1528.
- Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R. and Kagami, S. (2000) Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Oncol. Rep.*, **7**, 501-508.
- Terry, M.B. and Neugut, A.I. (1998) Cigarette smoking and the colorectal adenoma-carcinoma sequence: a hypothesis to explain the paradox. *Am. J. Epidemiol.*, **147**, 903-910.
- Traber, P.G., McDonnell, W.M., Wang, W. and Florence, R. (1992) Expression and regulation of cytochrome P-450I genes (CYP1A1 and CYP1A2) in the rat alimentary tract. *Biochim Biophys Acta*, **1171**, 167-175.
- Turesky, R.J., Lang, N.P., Butler, M.A., Teitel, C.H. and Kadlubar, F.F. (1991) Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, **12**, 1839-1845.
- van Lieshout, E.M.M., Bedaf, M.M.G., Pieter, M., Ekkel, C., Nijhoff, W.A. and Peters, W.H.M. (1998) Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis*, **19**, 2055-2057.
- van Lieshout, E.M.M., Peters, W.H.M. and Jansen, J.B.M.J. (1996) Effect of oltipraz,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*, **17**, 1439-1445.
- Vang, O., Jensen, M.B. and Autrup, H. (1990) Induction of cytochrome P450IA1 in rat colon and liver by indole-3-carbinol and 5,6-benzoflavone. *Carcinogenesis*, **11**, 1259-1263.
- Wang, J., Falany, J.L. and 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.

- Watabe, T., Ogura, K., Satsukawa, M., Okuda, H. and 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.
- Weisburger, J.H., Jones, R.C., Wang, C.X., Backlund, J.Y., Williams, G.M., Kingston, D.G., Van Tassell, R.L., Keyes, R.F., Wilkins, T.D., de Wit, P.P. and et al. (1990) Carcinogenicity tests of fecapentaene-12 in mice and rats. *Cancer Lett.*, **49**, 89-98.
- Welfare, M., Adeokun, M.A., Bassendine, M.F. and Daly, A.K. (1999) Polymorphisms in *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, **8**, 289-292.
- Wild, D. and Degen, G.H. (1987) Prostaglandin H synthase-dependent mutagenic activation of heterocyclic aromatic amines of the IQ type. *Carcinogenesis*, **8**, 541-545.
- Windmill, K.F., Gaedigk, A., Hall, P.M., Samaratinga, H., Grant, D.M. and McManus, M.E. (2000) Localization of N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol. Sci.*, **54**, 19-29.
- Windmill, K.F., McKinnon, R.A., Zhu, X.Y., Gaedigk, A., Grant, D.M. and McManus, M.E. (1997) The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutation Res.*, **376**, 153-160.
- Wise, S.A., Benner, B.A., Chesler, S.N., Hilpert, L.R., Vogt, C.R. and May, W.E. (1986) Characterization of the polycyclic aromatic hydrocarbons from two standard reference material air particulate samples. *Anal. Chem.*, **58**, 3067 - 3077.
- Wölfel, C., Platt, K.-L., Dogra, S., Glatt, H.R., Wächter, F. and Doehmer, J. (1991) Stable expression of rat cytochrome P450IA2 cDNA and hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol and 2-aminofluorene in V79 Chinese hamster cells. *Mol. Carcinogen.*, **4**, 489-498.
- Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen, N.P.E. (1999) Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-Transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, **29**, 59-124.
- Wu, R.W., Panteleakos, F.N., Kadkhodayan, S., Bolton-Grob, R., McManus, M.E. and Felton, J.S. (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., Johnk, C., Hartmann, D., Schestag, F., Kromer, W. and 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.
- Xu, M.R., Schut, H.A.J., Bjeldanes, L.F., Williams, D.E., Bailey, G.S. and Dashwood, R.H. (1997) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline-DNA adducts by indole-3-carbinol: Dose-response studies in the rat colon. *Carcinogenesis*, **18**, 2149-2153.
- Yamazoe, Y., Abu-Zeid, M., Staiano, N. and Kato, R. (1993) Sulfotransferase- and acetyltransferase-mediated activation of carcinogenic N-hydroxyarylamines in mammals and bacteria, and their modulation by thiols. *Basic Life Sci*, **61**, 161-169.
- Yang, H.Y., Namkung, M.J., Nelson, W.L. and Juchau, M.R. (1986) Phase II biotransformation of carcinogens/atherogens in cultured aortic tissues and cells. I. Sulfation of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene. *Drug. Metab. Dispos.*, **14**, 287-292.
- Yeung, C.K., Lang, D.H., Thummel, K.E. and Rettie, A.E. (2000) Immunoquantitation of FMO1 in human liver, kidney, and intestine. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1107-1111.
- Yoshinari, K., Nagata, K., Ogino, M., Fujita, K., Shiraga, T., Iwasaki, K., Hata, T. and Yamazoe, Y. (1998) Molecular cloning and expression of an amine sulfotransferase cDNA: a new gene family of cytosolic sulfotransferases in mammals. *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 479-486.

- Zarkovic, M., Qin, X.S., Nakatsuru, Y., Oda, H., Nakamura, T., Shamsuddin, A.M. and Ishikawa, T. (1993) Tumor promotion by fecapentaene-12 in a rat colon carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, **14**, 1261-1264.
- Zhang, Q.Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J. and Kaminsky, L.S. (1999) Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 804-809.
- Zhu, X.Y., Veronese, M.E., Iocco, P. and McManus, M.E. (1996) cDNA cloning and expression of a new form of human aryl sulfotransferase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 565-571.

## 7 Abkürzungen

AA	aromatische Amine
ADH	Aldehyddehydrogenase
ALDH	Alkoholdehydrogenase
ARS	Arylsulfatase
B[a]P	Benzo[a]pyren
BSA	Bovines Serumalbumin
COX	Cyclooxygenase
β-NF	β-Naphtoflavon
CPC	Cyclopenta[def]chrysen
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
EH	Epoxidhydrolase
FKS	fötale Kälberserum
FMO	Flavinmonooxygenase
GST	Glutathiontransferase
HAA	heterozyklische aromatische Amine
6-HMBP	6-Hydroxymethylpyren
HPRT	Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
6-MBP	6-Methylbenzo[a]pyren
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MF	Mutantenfrequenz
NAT	N-Acetyltransferase
NSAID	„non-steroid antiinflammatory drugs“
4-OH-CPC	4-Hydroxycyclopenta[def]chrysen
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGHS	Prostaglandin-H-synthetase
PHIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler

---

SULT	Sulfotransferase
TA1538	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538
TA1538-h1B1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538-h1B1
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase

## *Danksagung*

Mein Dank gilt zunächst Prof. Glatt für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die Förderung meiner toxikologischen Weiterbildung.

Außerdem danke ich dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung, unter dessen Dach diese Arbeit angefertigt wurde, und der DFG für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke Dr. Walter Meinl und Dr. Eva Muckel für die Hilfe bei den molekularbiologischen Fragestellungen, die Diskussionen und die kritische Durchsicht der Manuskripte.

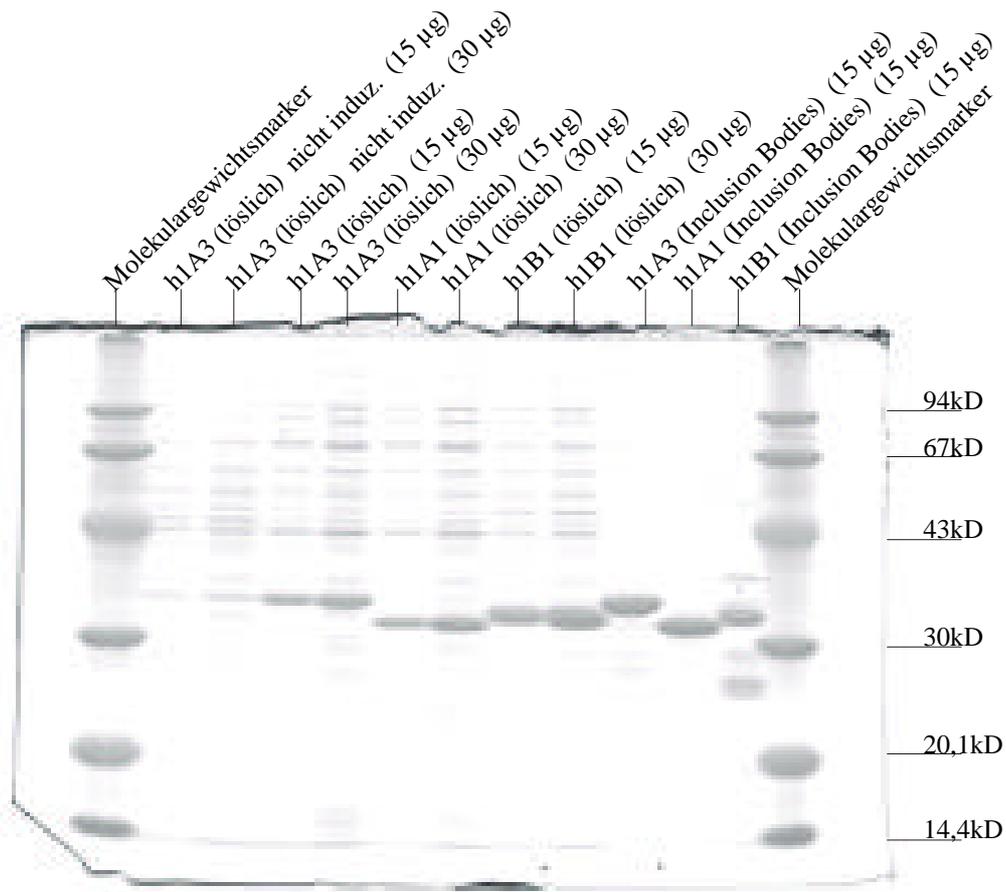
Des weiteren danke ich Sabine Braune für ihre Hilfsbereitschaft und umfangreiche Erfahrung in der Kunst des Western Blottings. Ebenso danke ich Andrea Katschak und Jutta Schwenk für die Durchführung der Ames- und HPRT-Tests. Die Immunhistochemie habe ich in der Abteilung PML des DIfE gelernt, hier danke ich Prof. G. Jacobasch, Dr. Kathrin Schmehl, Simone Florian und Morana Marinovic. Im Folgenden hat Elisabeth Meyer wundervolle immunhistochemische Präparate hergestellt.

Dr. Michael Kretzschmar von der Klinik für Intensivmedizin und Anästhesiologie in Gera danke ich für die Bereitstellung der humanen Gewebeproben.

Meinen Mitstreitern Christina Engelke, Heli Hollnagel, Andeas Kuhlow, Ma Lan, Robert Landsiedel und Ulrike Pabel sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Ernährungstoxikologie danke ich für den guten Zusammenhalt im und außerhalb des Labors.

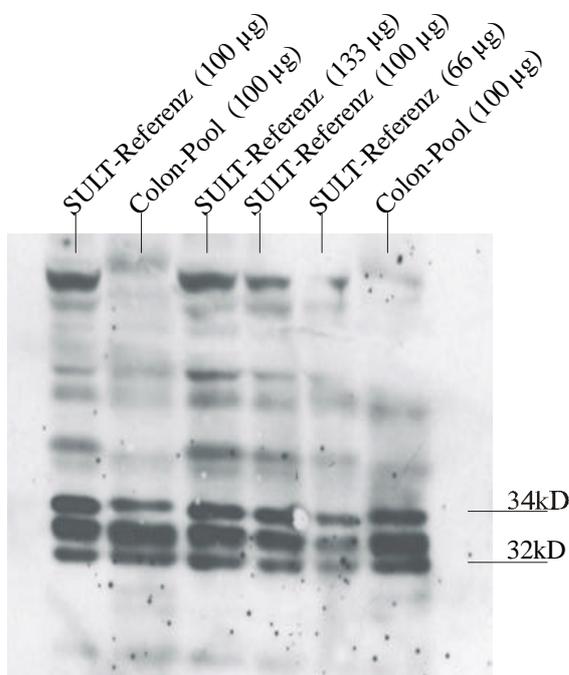
Das gleiche gilt für die Abteilung Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam, die mich während des Schreibens unterstützt hat.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, meinen Brüdern für den technischen Notdienst bei Computerabstürzen und meiner WG für die moralische Unterstützung.



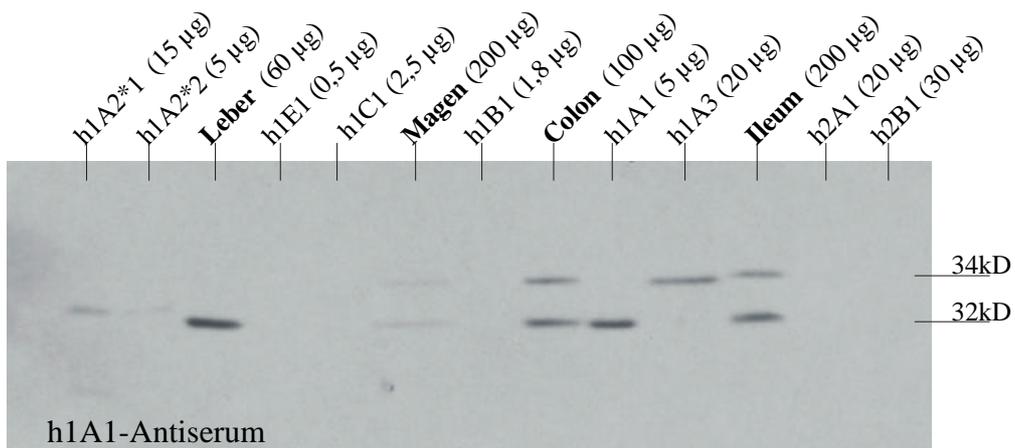
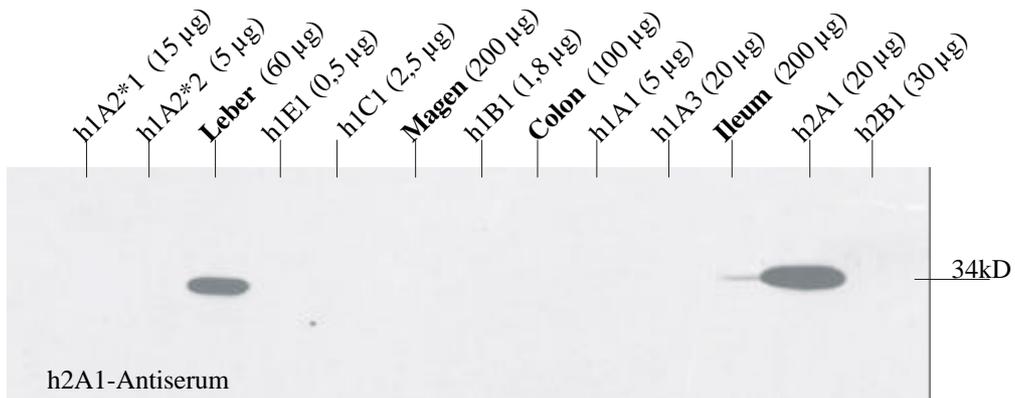
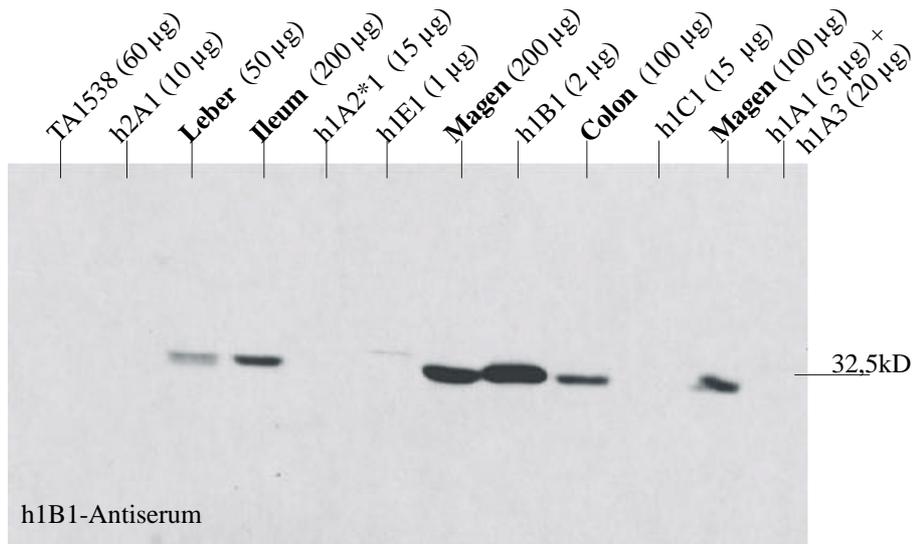
**Abbildung A1: Analyse der löslichen Fraktion und der „Inclusion Bodies“ von BL21-h1A1, -h1A3 und -h1B1: SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung**

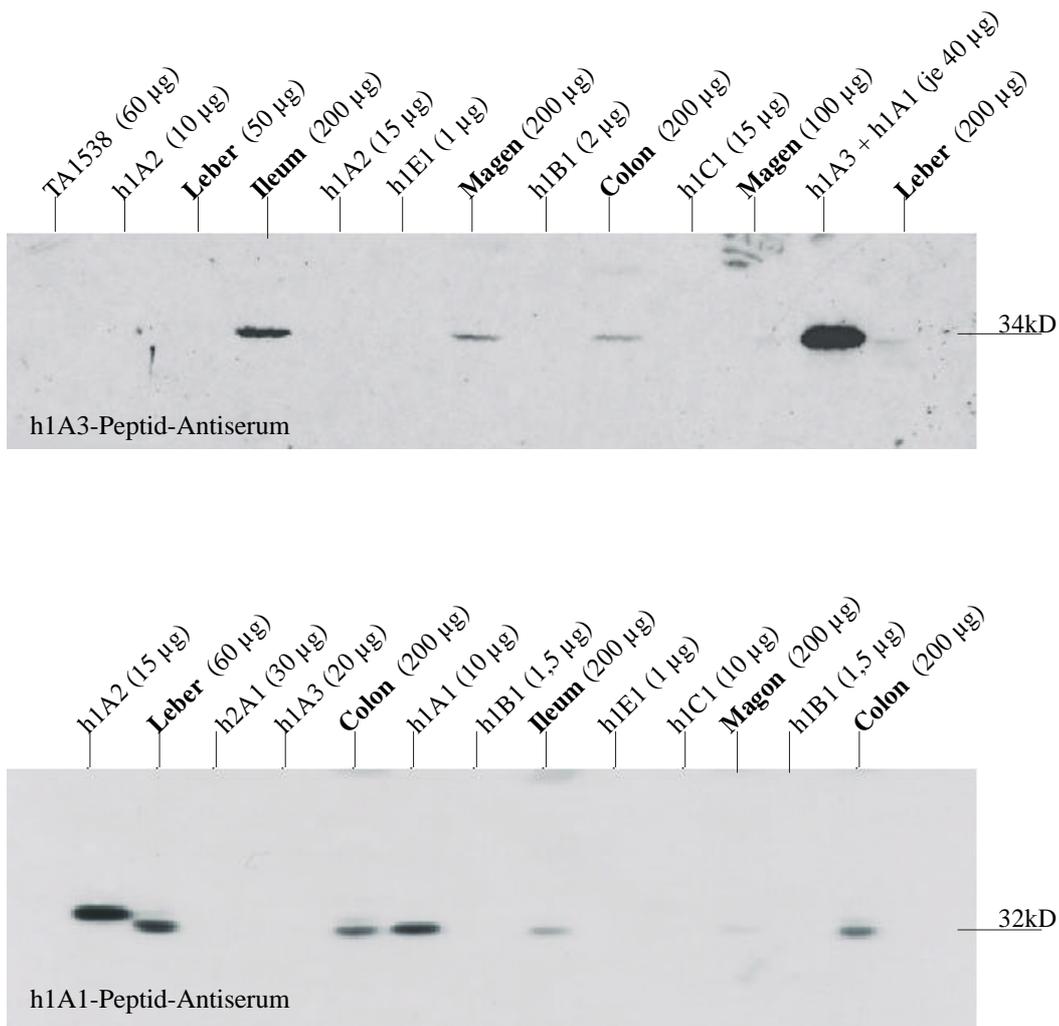
Einzelkolonien von BL21-SULT wurden bis zu einer  $OD_{691}$  von 0,6 – 0,8 vermehrt, mit IPTG (100  $\mu$ M Endkonzentration) versetzt, falls nicht anders spezifiziert, und weitere 4 h im Schüttelinkubator bewegt. Die lösliche Fraktion wurde durch Sonifizieren und Ultrazentrifugation, die „Inclusion Bodies“ durch Behandlung mit Lysozym und Waschen mit Detergenzien erhalten. Es wurde ein 11 %iges Trenngel verwendet.



**Abbildung A2: Vergleich des SULT-Gehalts im Colon-Pool und der SULT-Referenz**

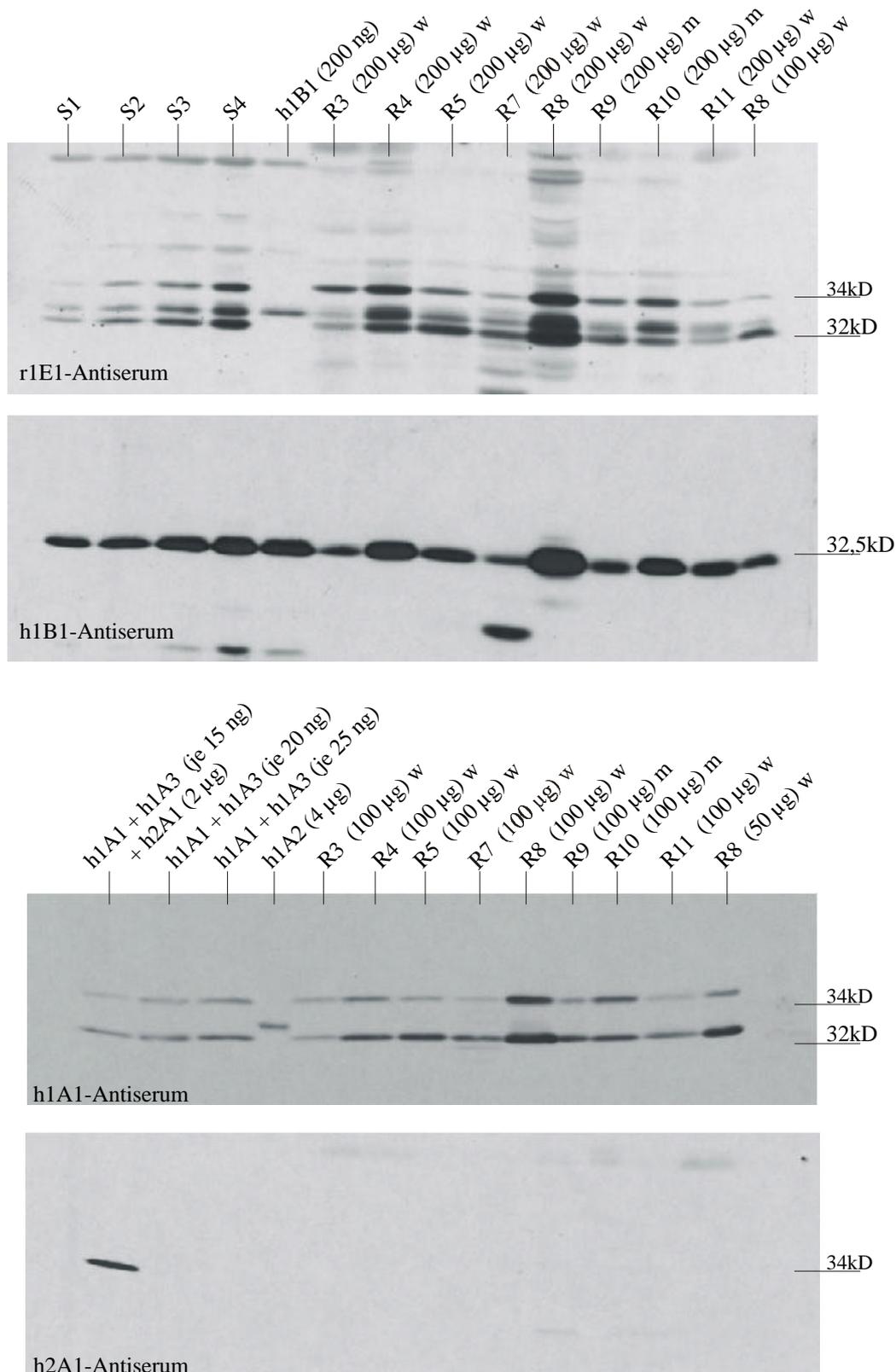
Zu 10 mg zytosolischem Protein aus V79-Zellen wurden folgende Mengen der löslichen Fraktionen von BL21-SULT gegeben: 25,4  $\mu$ g (h1A3), 14,6  $\mu$ g (h1A1) und 15,2  $\mu$ g (h1B1). Dieses Gemisch wurde als SULT-Referenz bezeichnet, während der Colon-Pool aus verschiedenen für h1A1\*R homozygoten Colonproben besteht. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Immundetektion erfolgte unter Verwendung des r1E1-Antiserums als Primär- und des Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats als Sekundärantikörper. Die Immunkonjugate wurden durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.





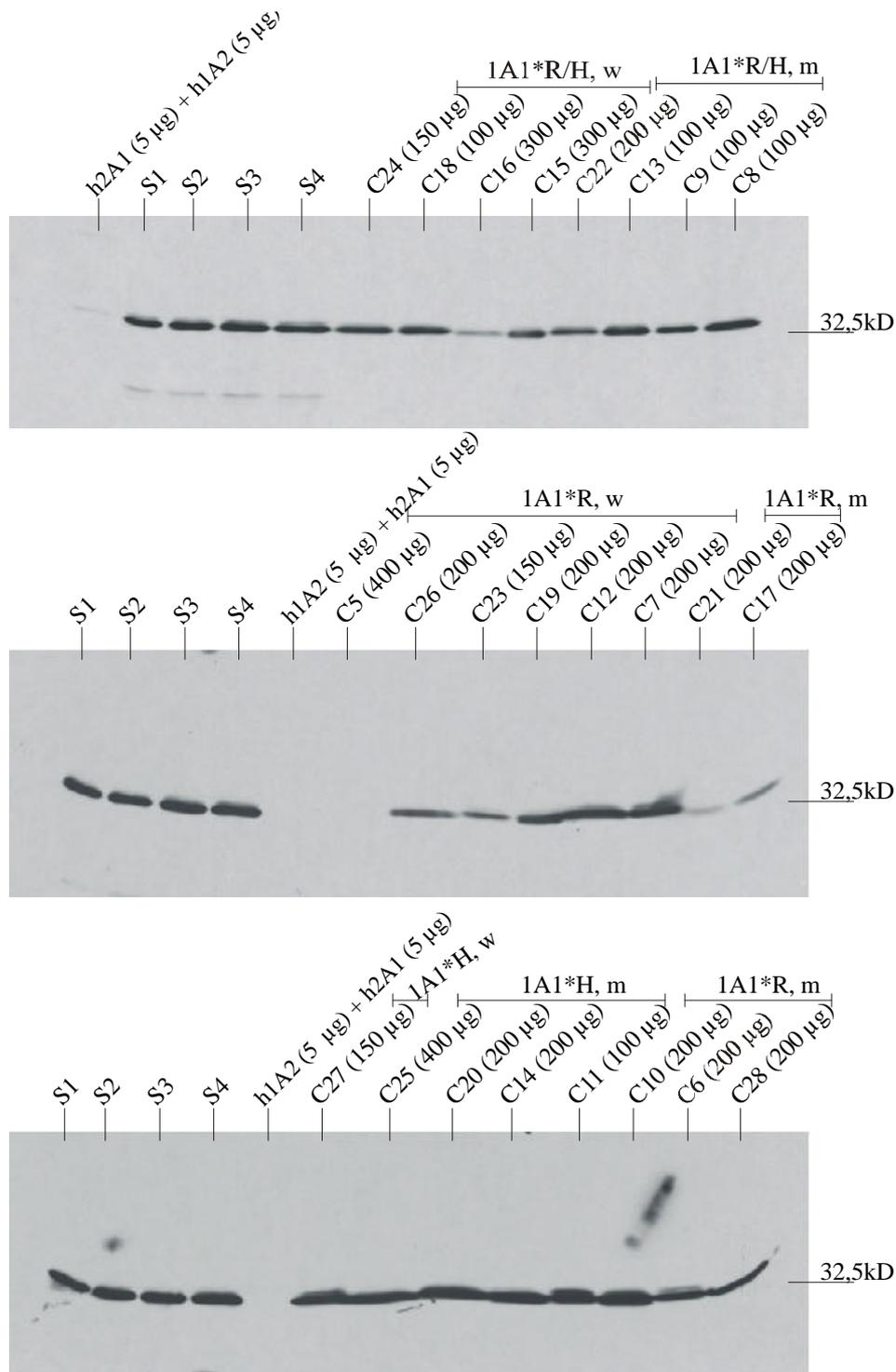
**Abbildung A3: Immundetektion von humanen SULT unter Verwendung der angegebenen Antiseren**

Die zytosolischen Fraktionen von TA1538-SULT und den humanen Geweben wurden in den angegebenen Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



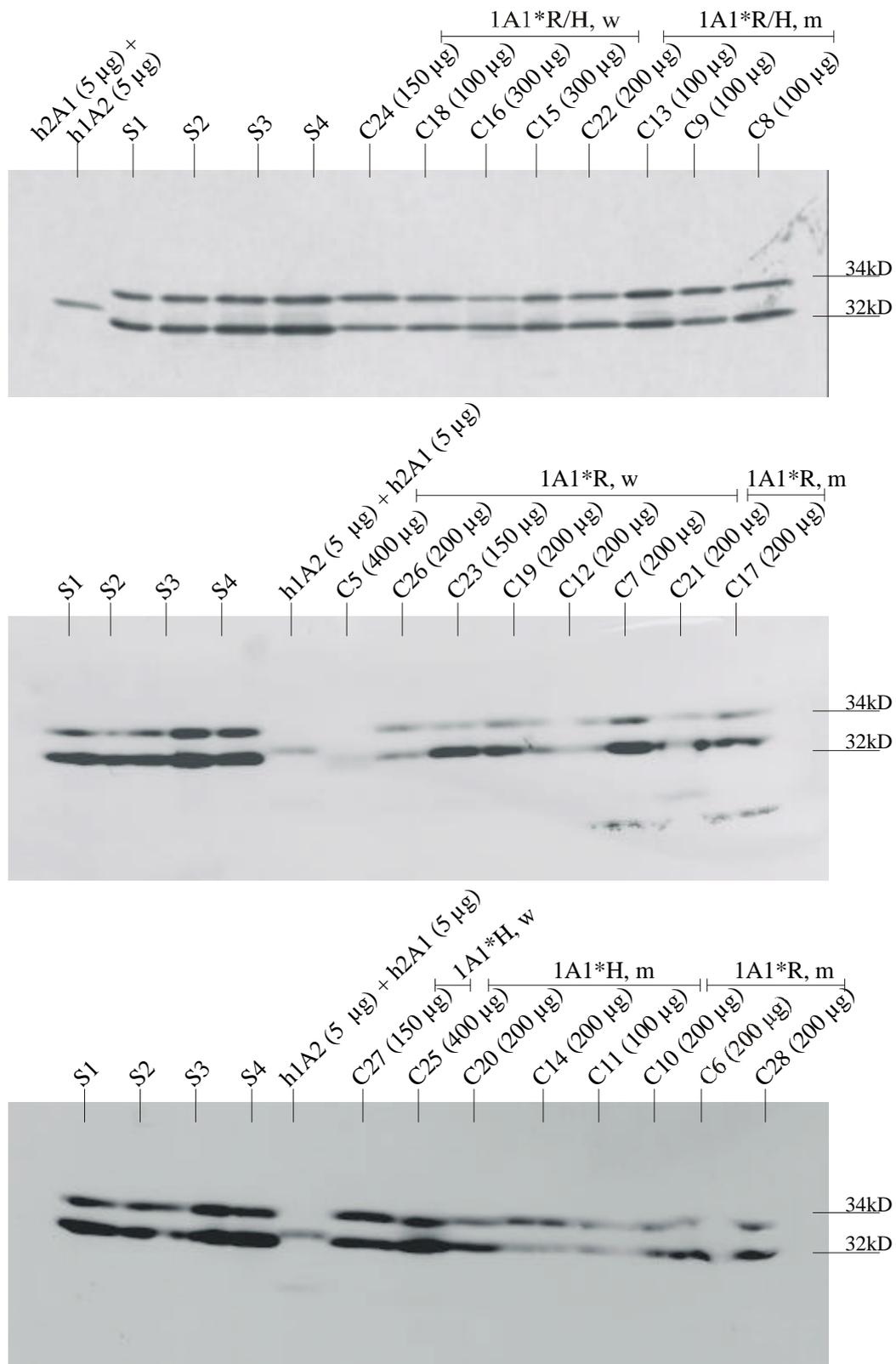
**Abbildung A4: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus dem humanen Rektum (m = männlich, w = weiblich, Tabelle 4) unter Verwendung von gegen r1E1, h1B1, h1A1 und h2A1 gerichteten Antiseren**

Die zytosolischen Fraktionen und Referenzen aus „Inclusion Bodies“ (S1,S2,S3 und S4 enthielten 30, 40, 50 und 60 ng h1A1 und h1A3 sowie 100,120, 140 und 160 ng h1B1) wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



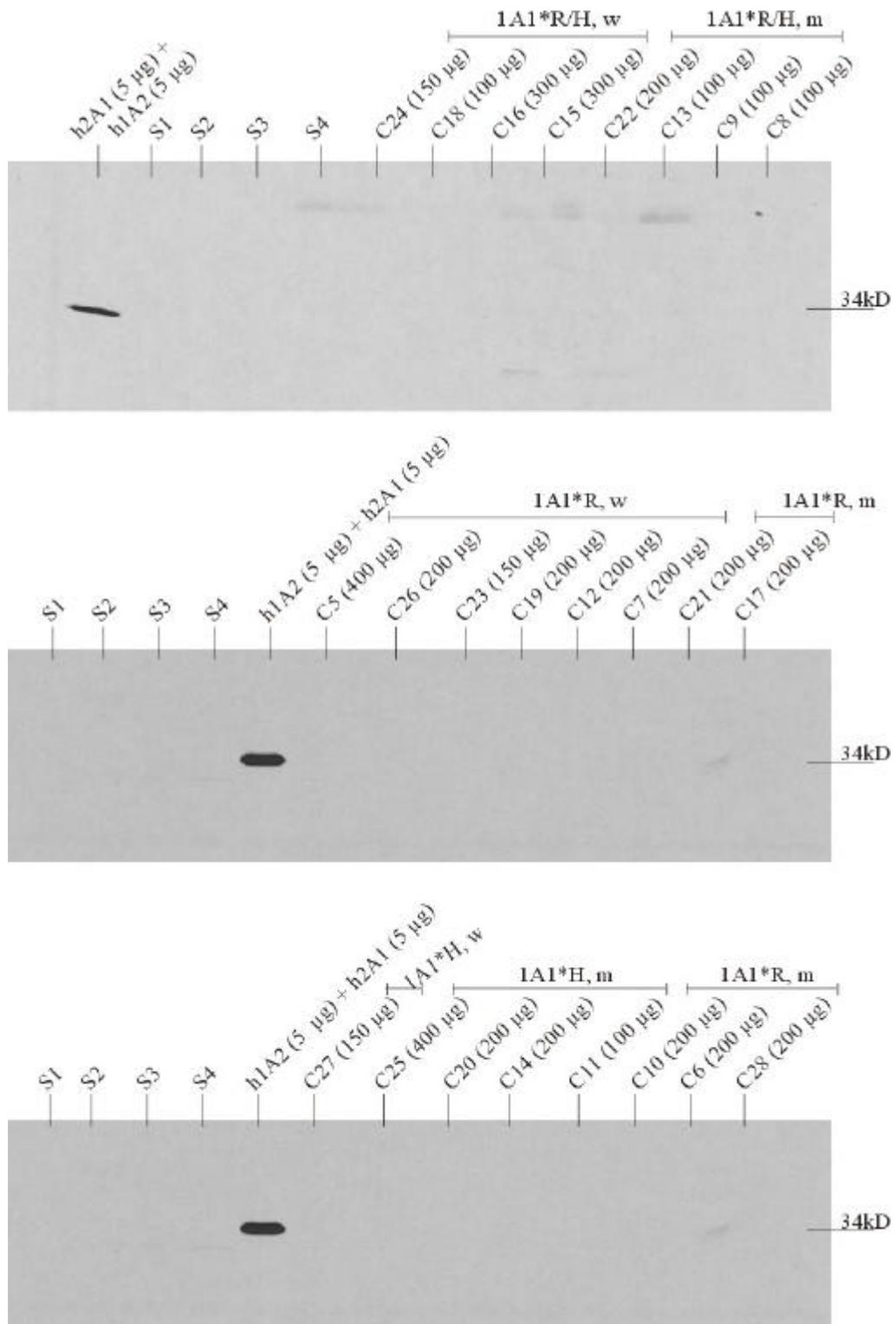
**Abbildung A5: Immundetektion von h1B1 in zytosolischen Fraktionen aus dem humanen Colon (m= männlich, w = weiblich, Tabelle 4) unter Verwendung des Anti-h1B1-Antiserums**

Die zytosolischen Fraktionen und Referenzen aus „Inclusion Bodies“ (S1,S2,S3 und S4 enthielten 30, 40, 50 und 60 ng h1A1 und h1A3 sowie 100,120, 140 und 160 ng h1B1) und TA1538-h1A2 und -h2A1 wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



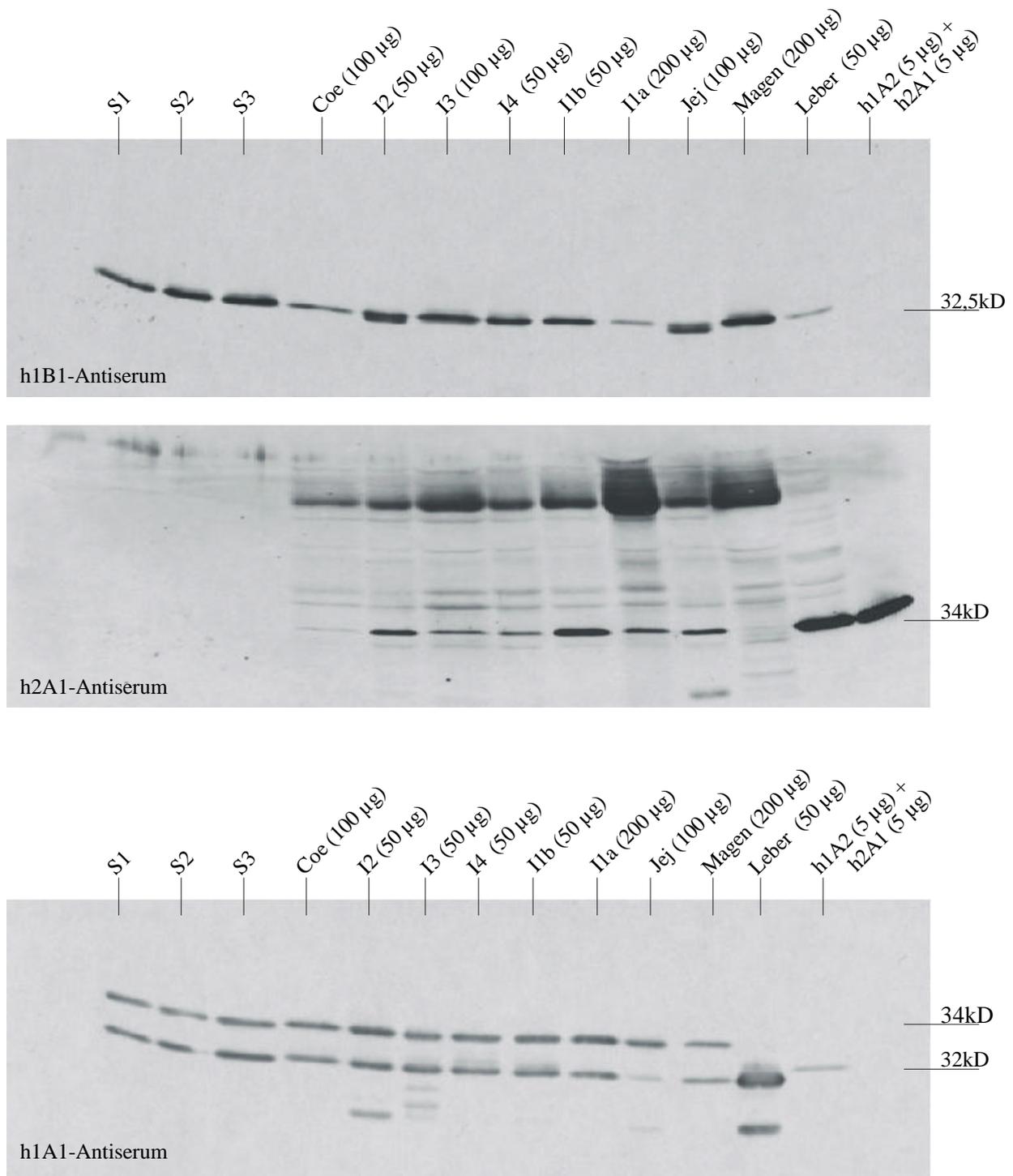
**Abbildung A6: Immundetektion von h1A in zytosolischen Fraktionen aus dem humanen Colon (m = männlich, w = weiblich, Tabelle 4) unter Verwendung des h1A1-Antiserums**

Die zytosolischen Fraktionen und Referenzen aus „Inclusion Bodies“ (S1,S2,S3 und S4 enthielten 30, 40, 50 und 60 ng h1A1 und h1A3 sowie 100,120, 140 und 160 ng h1B1) und TA1538-h1A2 und -h2A1 wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



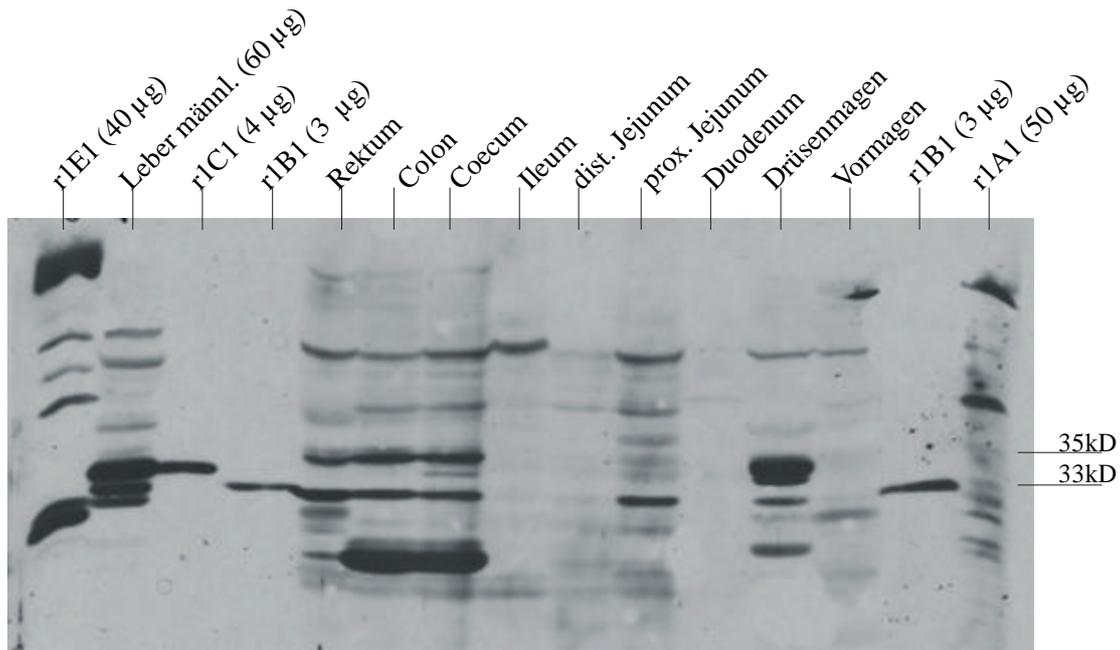
**Abbildung A7: Immundetektion von h2A1 in zytosolischen Fraktionen aus dem humanen Colon (m = männlich, w = weiblich, Tabelle 4) unter Verwendung des h2A1-Antiserums**

Die zytosolischen Fraktionen und Referenzen aus „Inclusion Bodies“ (S1,S2,S3 und S4 enthielten 30, 40, 50 und 60 ng h1A1 und h1A3 sowie 100,120, 140 und 160 ng h1B1) und TA1538-h1A2 und -h2A1 wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.

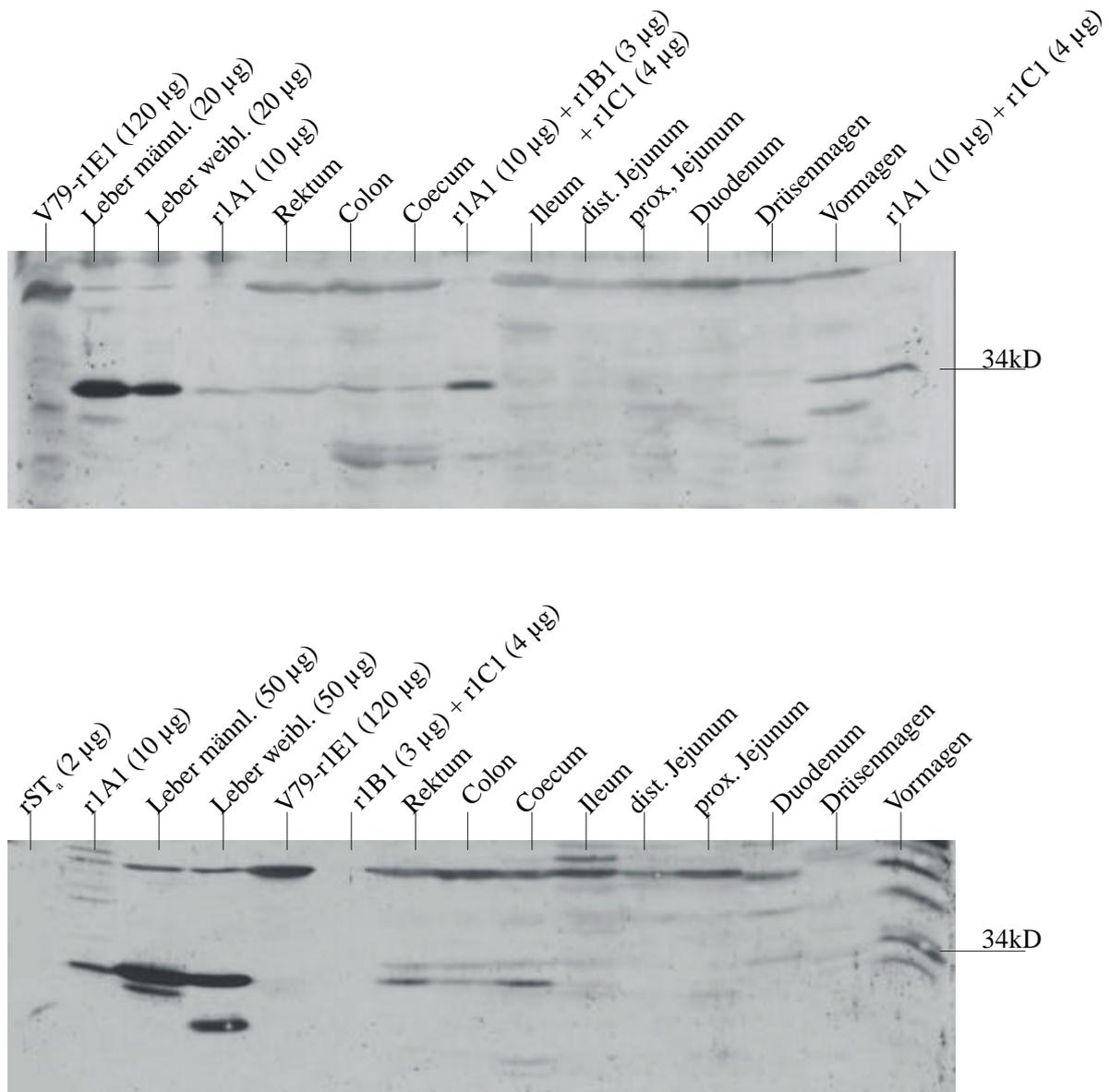


**Abbildung A8: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus dem humanen Dünndarm (Tabelle 4) unter Verwendung von gegen h1B1, h2A1 und h1A1 gerichteten Antisera**

Die zytosolischen Fraktionen der Gewebe, TA1538-h1A2 und -h2A1 sowie der Referenzen aus „Inclusion Bodies“ (S1 - S3 enthielten 30 - 50 ng h1A1 und h1A3 sowie 80 - 100 ng h1B1) wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit den Primärantikörpern erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und durch die Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.

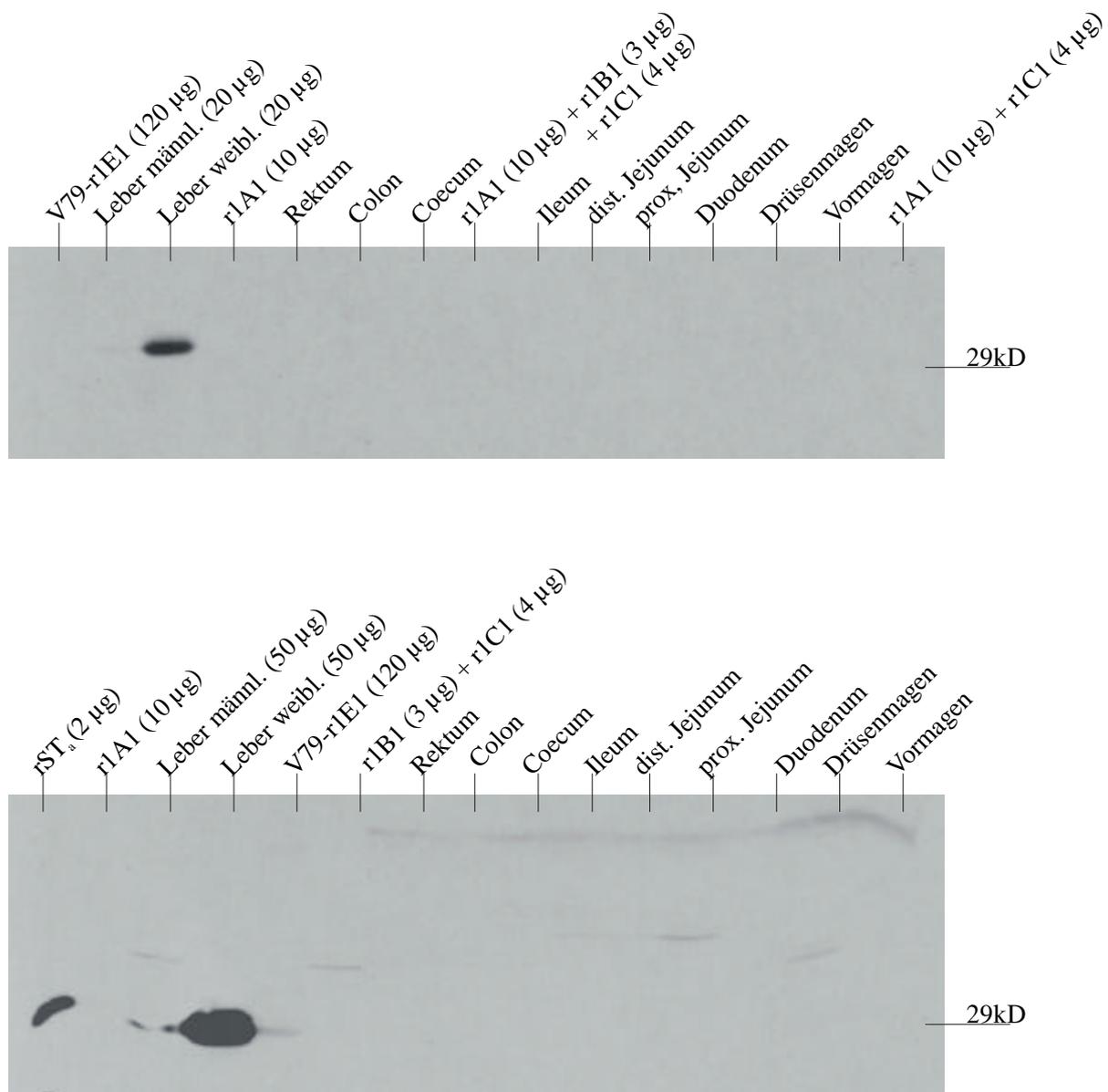


**Abbildung A9: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus Mukosa der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts einer weiblichen (oben) und einer männlichen Ratte (unten) unter Verwendung des gegen h1B1 gerichteten Antiserums**  
 Die zytosolischen Fraktionen der Mucosaproben (je 300 µg) sowie von TA1538-rSULT, V79-r1B1/A und Leber in den angegebenen Mengen wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit dem Primärantikörper erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und mit der Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



**Abbildung A10: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus Mukosa der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts einer weiblichen (oben) und einer männlichen Ratte (unten) unter Verwendung des gegen r1A1 gerichteten Antiserums**

Die zytosolischen Fraktionen der Mucosaproben (je 300 µg) sowie von TA1538-rSULT, V79-r1B1/A, V79-r1E1 und Leber eines weiblichen und männlichen Tieres in den angegebenen Mengen wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit dem Primärantikörper erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden mit der Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.



**Abbildung A11: Immundetektion von SULT in zytosolischen Fraktionen aus Mukosa der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts einer weiblichen (oben) und einer männlichen Ratte (unten) unter Verwendung des gegen h2A1 gerichteten Antiserums**

Die zytosolischen Fraktionen der Mucosaproben (je 300 µg) sowie von TA1538-rSULT, V79-r1B1/A, V79-r1E1 und Leber eines weiblichen und männlichen Tieres in den angegebenen Mengen wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die mit dem Primärantikörper erhaltenen Immunkonjugate wurden durch ein Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat gebunden und mit der Luminol-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen.

## Eigene Veröffentlichungen

### Publikationen

Glatt, C. E. H. Engelke, U. Pabel, W. Teubner, A. L. Jones, M. W. H. Coughtrie, U. Andrae, C. N. Falany, W. Meinel: Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112-113 (2000) 341-348.

H. R. Glatt, H. Boeing, C. E. H. Engelke, L. Ma, A. Kuhlow, U. Pabel, D. Pomplun, W. Teubner, W. Meinel: Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Res.*, im Druck.

W. Teubner, W. Meinel, H. R. Glatt

Mutagenicity of benzylic alcohols in two new V79-derived cell lines engineered for the stable expression of rat sulfotransferase 1B1 (rSULT1B1), eingereichtes Manuskript

### Tagungsbeiträge

W. Teubner, U. Pabel, W. Meinel, M. W. H. Coughtrie, C. N. Falany, M. Kretzschmar, A. Seidel, H. R. Glatt: 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, March 1998. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357 (1998) R 135.

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

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

H. R. Glatt, U. Pabel, W. Teubner, E. Muckel, M. W. H. Coughtrie, C. N. Falany, W. Meinel: Toxicification of xenobiotics by sulfotransferases. *European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics*, Budapest (August 99), *ISSX Proceedings* 14 (1999) 1.

W. Teubner, W. Meinel, S. Florian, M. Kretzschmar, H. R. Glatt: Characterization of sulfotransferases in intestine of man and rat and activation of promutagens in V79-derived cell lines expressing rat and human SULT1B1. Workshop *Molecular Aspects of Gastro-Intestinal Metabolism*, Potsdam, November 10 - 11, 2000, Programme and Abstracts, 16-17.

H. R. Glatt, L. Ma, A. Kuhlow, U. Pabel, W. Teubner, W. Meinel and E. Muckel: Involvement of phase-II enzymes in the activation of dietary carcinogens *International Congress on Dietary Factors, Cancer Causes & Prevention*, Wien, February 2001, Book of Abstracts, im Druck

W. Teubner, W. Meinel, S. Florian, M. Kretzschmar, C. N. Falany, H. R. Glatt: Analyses of sulfotransferases in the intestine of man and rat, and activation of promutagens in V79-derived cells expressing an Intestinal SULT(1B1) of man or rat. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2001. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2001) A-535

U. Bernauer, R. Ellrich, B. Heinrich-Hirsch, W. Teubner, B. Vieth, U. Gundert-Remy  
Expressionsmuster und Variabilität von Cytochrom P450-Enzymen in humanem Colon  
*Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz,  
März 2001. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2001) A-521

### **Manuskripte**

W. Teubner, W. Meinel, C. N. Falany, M. Kretzschmar, H. R. Glatt

Construction of a new V79-derived cell line expressing human sulfotransferase 1B1 and its ability to activate benzylic alcohols

W. Teubner, W. Meinel, C. N. Falany, M. Kretzschmar, H. R. Glatt  
Characterization and of sulfotransferases in human intestinal mucosa

### **Erklärung zur Dissertation**

Hiermit versichere ich, daß die von mir eingereichte Dissertation mit dem oben genannten Titel selbstständig und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde. Des weiteren erkläre ich, daß diese Arbeit an keiner andern Hochschule eingereicht wurde.