

**Metabolismus von alkylierten polyzyklischen
aromatischen Kohlenwasserstoffen – Einfluss der
Struktur auf benzyliche Hydroxylierung und
Sulfonierung in vitro und Modulation des
Metabolismus in vivo**

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

vorgelegt von

**Monika Batke
aus Andernach**

Potsdam 2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/2693/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-26939

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-26939>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bildung und Vorkommen von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen	1
1.2	Humane Exposition	3
1.3	Metabolismus	4
1.3.1	Cytochrome P450	8
1.3.2	Sulfotransferasen	11
1.3.3	Mercaptursäurebildung	11
1.3.4	Carbonsäurebildung	14
1.3.5	Transportprozesse	15
1.4	Bioaktivierung	18
1.5	Mutagenität und Kanzerogenität	19
1.6	Fragestellung	20
2	Ergebnisse	22
2.1	Benzyllische Hydroxylierung von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen	22
2.1.1	Mikrosomen	22
2.1.2	Zellkultur	24
2.1.3	Hydroxyethylpyrene: Positionsisomeren- und Enantiomerenbildung	25
2.2	Stabilität und Bildung benzyllischer Schwefelsäureester	26
2.2.1	Halbwertszeiten	26
2.2.2	Sulfonierung benzyllischer Alkohole durch humane Sulfotransferasen	28
2.3	Transport benzyllischer Schwefelsäureester	29
2.3.1	Albuminbindung	29
2.3.2	Zelluläre Aufnahme über humane organische Anionentransporter	29
2.4	Metabolismus in vivo	31
2.4.1	Substratauswahl für in-vivo-Untersuchungen	31
2.4.2	Metabolismus von 1-Hydroxymethylpyren	34

2.4.3	Metabolismus von 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren	41
2.5	Modulation des Metabolismus	47
2.5.1	Inhibitoren der Sulfotransferasen	47
2.5.2	Inhibitoren der Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen	52
3	Diskussion	54
3.1	Benzyliche Hydroxylierung von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen	54
3.1.1	Ergebnisse im Vergleich	54
3.1.2	Einfluss des Ringsystems	55
3.1.3	Einfluss der Alkylgruppe	55
3.1.4	Aktivitäten der hCYP1A1, 1A2, 1B1 und 3A4	57
3.1.5	Bildung von Positionsisomeren und Enantiomeren	57
3.2	Einfluss der Struktur der benzylichen Schwefelsäureester auf Stabilität und Reaktivität	58
3.2.1	Halbwertszeiten in Wasser	58
3.2.2	Vergleich der Stabilität in Wasser und der Reaktivität in in-vitro-Inkubationen	59
3.3	Sulfonierung benzylicher Alkohole durch humane Sulfotransferasen	61
3.4	Transport benzylicher Schwefelsäureester	62
3.4.1	Albuminbindung	62
3.4.2	Zelluläre Aufnahme über humane organische Anionentransporter	63
3.5	Metaboliten in Urin und Fäzes	64
3.5.1	Mercaptursäuren	64
3.5.2	Carbonsäuren	66
3.6	Modulation des Metabolismus	67
3.6.1	Inhibitoren der Sulfotransferasen	67
3.6.2	Inhibitoren der Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen	71
3.7	Ausblick	75
4	Material und Methoden	76
4.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	76
4.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	76
4.1.2	Geräte	77
4.2	in-vitro-Inkubationen	78
4.2.1	Mikrosomeninkubationen	78
4.2.2	Zellkultur mit CYP profizienten V79-Zelllinien	79
4.2.3	Halbwertszeitbestimmungen benzylicher Schwefelsäureester	80
4.2.4	Cytosolinkubationen	80

Inhaltsverzeichnis

4.2.5	Zellkultur mit hOAT profizienten HEK-Zelllinien	80
4.3	Tierversuche	81
4.3.1	Tiere und Tierhaltung	81
4.3.2	72 Stunden Zeitversuch	81
4.3.3	24 Stunden Versuch mit Modulatoren	81
4.4	Aufarbeitung der in-vivo-Proben	82
4.4.1	Metabolitenanalyse im Urin	82
4.4.2	Analyse der Alkylpyrenylmercaptursäuren in Urin und Fäzes . .	82
4.5	Chromatographie	83
4.5.1	HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung benzyli- scher Alkohole	83
4.5.2	HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung von Enantiome- ren und Positionsisomeren bei Hydroxyethylpyrenen	85
4.5.3	HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung benzyli- scher Schwefelsäureester	85
4.5.4	HPLC-MS-Methode zur Bestimmung benzyli- scher Schwefelsäureester	87
4.5.5	UPLC-MS/MS-Methode zur Metabolitenanalyse im Urin	87
4.5.6	UPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Alkylpyrenylmer- captursäuren	87
A Zytotoxizitätstest		91
Veröffentlichungen		108
Lebenslauf Monika Batke, geb. Stephani		109
Nachwort		110

Abkürzungsverzeichnis

γ -GT	γ -Glutamyltransferase	12
1-HM-8-MP	1-Hydroxymethyl-8-methylpyren	31
3-MC	3-Methylcholanthren	6
ADH	Alkoholdehydrogenase(n)	6
Ah-Rezeptor	Aryl hydrocarbon receptor	6
ALDH	Aldehyddehydrogenase(n)	6
alkPAK	alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	1
Ames-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> His ⁻ Rückmutationstest	11
BP	Benzo[a]pyren	1
BSA	bovines Serumalbumin	29
CID	Collision induced decompostion - durch Kollision induzierter Zerfall	34
CPBP	Cyclopenta[mno]benzo[a]pyren	1
CYP	Cytochrom(e) P450	6
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat	15
DMP	Dimethylpyren(e)	2
DMSO	Dimethylsulfoxid	26
DP	Dipeptidase	12
EBP	Ethylbenzo[a]pyren	2
EP	Ethylpyren(e)	2
GSH	γ -Glutamylcysteinylglycin	6
GST	Glutathion-S-Transferase	11
HEP	Hydroxyethylpyren(e)	11
hL	humane Lebermikrosomen	22
HMBP	Hydroxymethylbenzo[a]pyren(e)	19
HMP	Hydroxymethylpyren(e)	11

Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie	18
hSULT	humane Sulfotransferase(n)	11
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50 % Inhibition bewirkt	73
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes	31
K _m	Michaelis-Menton-Konstante	63
KM	Körpermasse	34
MAA	Methylantranthren(e)	2
MBP	Methylbenzo[<i>a</i>]pyren(e)	2
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase	68
mNAT	mikrosomale <i>N</i> -Acetyltransferase	12
MP	Methylpyren(e)	1
MPMA	Methylpyrenylmercaptursäure	14
MRM	Multiple Reaction Monitoring	37
n.b.	nicht bestimmt	23
OAT	organische Anionentransporter	16
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	1
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat	11
PCB	polychlorierte Biphenyle	10
PCS	Pyrenylcarbonsäure	8
PMO-Theorie	pertubational-molecular-orbital-Theorie	58
rL	Lebermikrosomen von unbehandelten Ratten	22
rLA	Lebermikrosomen von Aroclor behandelten Ratten	22
rSULT	Rattensulfotransferase(n)	11
SEP	Sulfoxyethylpyren(e)	26
SMBP	Sulfoxymethylbenzo[<i>a</i>]pyren(e)	18
SMP	Sulfoxymethylpyren(e)	12
SULT	Sulfotransferase(n)	11
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	10
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	65
V79-Zellen	Zelllinie aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters	25
x-OH-8-M-1-PCS	x-Hydroxy-8-methyl-1-pyrenylcarbonsäure	41

Zusammenfassung

Die Toxizität und Kanzerogenität von rein aromatischen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) ist seit Jahrzehnten bekannt und umfassend erforscht. Den alkylierten PAK (alkPAK) wurde bisher jedoch nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Im Vergleich zu den rein aromatischen PAK besitzen sie aufgrund ihrer Alkylgruppe eine weitere Möglichkeit zur Bioaktivierung und müssen daher gesondert betrachtet werden. Die Alkylgruppe wird im Organismus zunächst hydroxyliert, anschließend zur Säure oxidiert oder direkt konjugiert. Entstehen hierbei instabile benzyliche Sulfoconjugate, so können diese DNA-Addukte bilden und zu Mutationen führen.

In Hinblick auf die Bioaktivierung von alkPAK galt es daher zu klären welchen Einfluss unterschiedliche Positionen und Arten der Alkylgruppe sowie unterschiedliche Ringsysteme auf die benzyliche Hydroxylierung haben. Daher wurde eine Auswahl an zwölf Testsubstanzen getroffen und deren benzyliche Hydroxylierung durch verschiedene Arten von Mikrosomen sowie verschiedene humane Cytochrome P450 verglichen. Des Weiteren wurde untersucht, welche humanen Formen der löslichen Sulfotransferasen besonders an der Umsetzung der alkPAK-Derivate beteiligt sind. Die Untersuchung der Albuminbindung von 2-Sulfoxymethylpyren sowie die Aufnahme von Schwefelsäureestern in Nierenzellen sollten Aufschluss hinsichtlich möglicher Transportvorgänge geben, die für die Lokalisation der Toxizität in vivo wichtig sind. Für die in-vivo-Situation wurde weiterhin die Modulation des Metabolismus ausgewählter benzylicher Alkohole durch verschiedene Nahrungsmittelbestandteile, Arzneimittel und Fremdstoffe an Ratten untersucht. Als Biomarker zur Beurteilung der Interaktion der Modulatoren mit Enzymen, die am Metabolismus der alkPAK beteiligt sind, wurden benzyliche Carbonsäuren im Urin und die entsprechenden Mercaptursäuren in Urin und Fäzes betrachtet.

Zunächst wurde anhand von Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen festgestellt, dass insbesondere Methylpyrene mit einer Methylgruppe in Position 1 bevorzugt benzylich hydroxyliert werden. Alkylgruppen in anderen Positionen sowie größere Ringsysteme wie etwa 2-Methylpyren bzw. alkylierte Benzo[*a*]pyrene wurden hingegen in wesentlich geringerem Umfang zum benzylichen Alkohol umgesetzt. Dies wurde auch in Untersuchungen mit humanen Lebermikrosomen bestätigt, die zum Teil alkPAK mit größeren aromatischen Ringsystemen gar nicht messbar umsetzten.

Untersuchungen an einzelnen humanen Cytochromen P450 zeigten, dass insbesondere die durch PAK induzierbaren Formen hCYP1A1 und 1B1 hohe Umsatzraten für Methyl- und Ethylpyrene aufwiesen. Die hepatisch exprimierten Formen hCYP1A2 und 3A4 waren jedoch auch zur Bildung der benzyllischen Alkohole in der Lage. Aufgrund der Enzymexpression und der guten Durchblutung, die eine gute Substratversorgung ermöglicht, ist die Leber als Hauptort der benzyllischen Hydroxylierung anzusehen.

Für die anschließende Sulfonierung der benzyllischen Alkohole wurden besonders hohe Aktivitäten mit den humanen Sulfotransferasen hSULT1A1, 1A2, 1C2 und 1E1 festgestellt. Aufgrund der Enzymausstattung können neben der Leber auch Lunge, Nieren, Mamma, Endometrium und Jejunum als Orte der Sulfonierung sein. Zur Abschätzung der in-vivo-Situation muss zusätzlich noch die Versorgung mit Substrat und Co-Substrat betrachtet werden. Diese ist aufgrund der hohen Durchblutungsrate sowie der Expression von Cytochromen P450 und PAPS-Synthase 2 in der Leber optimal. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Leber ein Hauptorgan für die Sulfonierung darstellt.

Die Organe, in denen die Sulfonierung stattfindet, sind jedoch nicht zwangsläufig Zielorgane der Toxizität der Schwefelsäureester. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass nach 1-Hydroxymethylpyren-Applikation bei Ratten die Niere die höchste Zahl an DNA-Addukten aufweist, obwohl die Sulfonierung aufgrund der Enzymexpression auf die Leber fokussiert ist. Einzig plausible Erklärung hierfür ist die systemische Verteilung der Schwefelsäureester. So wurde im Rahmen dieser Arbeit eine hochaffine Bindungsstelle für 2-Sulfoxymethylpyren an Albumin beschrieben ($K_D = 0,059 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). Des Weiteren wurde die Aufnahme von benzyllischen Sulfaten der alkPAK in Nierenzellen, die humane organische Anionentransporter exprimieren, in vitro untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Transport durch die organischen Anionentransporter hOAT1, 3 und 4 vermittelt wurde. Experimente mit und ohne Albuminzugabe zeigten, dass lediglich nicht albumingebundenes Sulfat von den Transportern aufgenommen wurde. Diese Transportvorgänge können die hohen DNA-Adduktzahlen den Nieren der behandelten Ratten erklären.

Für die in-vivo-Situation wurde der Einfluss von Ethanol, 4-Methylpyrazol, Pentachlorphenol, Quercetin und Disulfiram auf Enzyme, die am Metabolismus der alkPAK beteiligt sind, untersucht. Diese Effekte lassen sich anhand von Metabolitenanalysen nach Exposition gegenüber alkPAK nachweisen. Die renal ausgeschiedenen Metaboliten von 1-Hydroxymethylpyren und 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren wurde in beiden Fällen von den entsprechenden Carbonsäuren 1-Pyrenylcarbonsäure und α -Hydroxy-8-methyl-1-pyrenylcarbonsäure dominiert (30 bzw. 66 % bezogen auf alle Metaboliten mit Pyrenchromophor). Für 1-Hydroxymethylpyren konnte auch noch ein phenolischer Schwefelsäureester der 1-Pyrenylcarbonsäure als weiterer Metabolit be-

schrieben werden (35 % bezogen auf alle Metaboliten mit Pyrenchromophor).

Neben der durch die Detoxifizierung mittels Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase entstandenen benzyllischen Carbonsäure kann als Biomarker die entsprechende Mercaptursäure herangezogen werden. Sie wird durch Glutathionkonjugation und anschließende weitere Prozessierung aus den Schwefelsäureestern gebildet und ist somit ein indirekter Nachweis für die reaktiven und toxischen benzyllischen Sulfate der alkPAK. Für die beiden im Tierversuch eingesetzten benzyllischen Alkohole konnte sie in Urin und Fäzes nachgewiesen werden. Es wurde jedoch ein deutlicher Unterschied in der gebildeten Menge sowie der Verteilung zwischen Urin und Fäzes für die beiden Mercaptursäuren festgestellt. So entsprach die ausgeschiedene Menge an 1,8-Dimethylpyrenylmercaptursäure (17 ppm der Dosis) lediglich einem Zehntel der 1-Methylpyrenylmercaptursäure-Menge (177 ppm der Dosis) und ist im Gegensatz zu dieser hauptsächlich auf die Fäzes fokussiert (90 % gegenüber 30 %). Hierfür sind wahrscheinlich Unterschiede im Transport der benzyllischen Schwefelsäureester sowie der Spezifität der an der Mercaptursäurebildung beteiligten Enzyme verantwortlich. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der humane organische Anionentransporter hOAT1 1,8-Dimethylpyrenmercaptursäure nicht und der hOAT3 nur mit niedrigen Umsatzraten transportiert. Aufgrund der hohen Aminosäureidentität von Mensch und Ratte bei diesen Transportern ist es möglich, dass dieser Effekt die Unterschiede in der Verteilung zwischen Urin und Fäzes bei der Ratte zum Teil erklärt.

Im Tierversuch an Ratten zeigte sich nach 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren-Applikation und gleichzeitiger Gabe der kompetitiven Alkoholdehydrogenase-Hemmstoffe Ethanol und 4-Methylpyrazol die Bedeutung der Alkoholdehydrogenasen für die Entgiftung der benzyllischen Alkohole. Die Oxidation zur entsprechenden Carbonsäure war in diesen Fällen reduziert (auf 44 bzw. 38 % der Kontrolle) und gleichzeitig die Bildung der Mercaptursäure erhöht (10600 bzw. 1300 % der Kontrolle). Eine Hemmung der Toxifizierung vermittelt durch Sulfotransferase-Inhibitoren konnte nur für Pentachlorphenol beim Metabolismus des 1-Hydroxymethylpyrens beobachtet werden. Sowohl die Kombination von Pentachlorphenol und 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren und der Einsatz von Quercetin als Sulfotransferase-Inhibitor mit beiden benzyllischen Alkoholen zeigte keine signifikanten Effekte. Dies ist höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Enzymaffinitäten sowie die geringe Bioverfügbarkeit von unverändertem Quercetin zurückzuführen. Pentachlorphenol erwies sich auch als kompetitiver Alkoholdehydrogenase-Inhibitor, da in vivo für 1-Hydroxymethylpyren eine signifikant geminderte Carbonsäureausscheidung zu beobachten war (9 % der Kontrolle). Bei 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren trat diese Inhibition vermutlich aufgrund der höheren katalytischen Effizienz der Alkoholdehydrogenase für den Umsatz dieses Alkohols nicht auf.

In Hinblick auf die humane Situation ist zunächst festzustellen, dass eine Expositi-

tion gegenüber alkPAK im Bereich von einigen μg pro Tag in Abhängigkeit von den individuellen Lebensverhältnissen als gesichert angesehen werden kann. Die hier im Tierversuch eingesetzte Dosis von 19 mg/kg KM liegt jedoch ca. 100 000-fach höher und bezieht sich bereits auf eine metabolische Zwischenstufe, den benzyllischen Alkohol. Da in diesem Fall bereits nur wenige ppm der Dosis als Mercaptursäure ausgeschieden werden, ist die Eignung dieses Metaboliten als Biomarker für die menschliche Exposition fraglich. Bezüglich der Ergebnisse der hier eingesetzten Modulatoren ist insbesondere Ethanol für die humane Alltagssituation dennoch von Interesse. Die kompetitive Hemmung der ADH-vermittelten Detoxifizierung der alkPAK könnte eine Erklärung für den vielfach diskutierten indirekten kanzerogenen Effekt des Ethanols sein.

Summary

The toxicity and carcinogenicity of purely aromatic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) is known for decades and has been thoroughly investigated. In contrast, less attention has been paid to the alkylated PAH (alkPAH). Compared to the purely aromatic PAH the alkPAH exhibit an additional possibility for biological activation due to their alkyl group. The alkyl group is hydroxylated and subsequently oxidised to the corresponding acid or conjugated. If unstable benzylic sulfoconjugates arise from this metabolism, DNA adducts may be formed and can induce mutations.

Concerning the bioactivation of alkPAH this work should help to learn which influence different positions and kind of alkyl substituent and different kind of ring systems have on the benzylic hydroxylation. For this purpose a set of twelve test compounds was selected and their benzylic hydroxylation was compared for different types of liver microsomes and human cytochromes P450. Furthermore it was analysed which forms of soluble human sulfotransferases catalyse the sulfonation of benzylic alcohols. Regarding the localisation of toxic effects *in vivo* transport processes are of importance. Therefore the albumin binding of 2-sulfoxymethylpyrene and the uptake of sulfuric acid esters into kidney cells by human organic anion transporters have been analysed. For the *in-vivo*-situation the modulation of enzyme activities by food compounds, pharmaceuticals and xenobiotics is of interest. To assess these interactions with the metabolism of alkPAH the respective benzylic carboxylic acid in urine and mercapturic acid in urine and feces were measured.

Regarding the influence of the position of the alkyl group, it turned out by the use of incubations with rat liver microsomes that methylpyrenes having a methyl group at position 1 were preferentially hydroxylated to benzylic alcohols. Alkyl groups at other positions as well as compounds with larger ring systems (e.g. 2-methylpyrene, benzo[*a*]pyrenes) were benzylically hydroxylated to a remarkably less extent. For larger ring systems this observation was also made with incubations of human liver microsomes as some of these compounds did not show any formation of benzylic alcohol at all.

In vitro experiments addressing the activity of single human cytochromes P450 revealed that PAH-inducible forms hCYP1A1 and 1B1 had highest hydroxylation rates for methyl- and ethylpyrenes. However also the hepatically expressed forms hCYP3A4 and CYP1A2 catalysed the benzylic hydroxylation. Due to the enzyme expression and

the high blood circulation ensuring the substrate supply it can be suspected that liver is the main organ where benzylic hydroxylation takes place.

The subsequently following sulfonation of the benzylic alcohols was catalysed with high rates by human sulfotransferases hSULT1A1, 1A2, 1C2 and 1E1. These enzymes can be found in several organs like liver, lung, kidneys, mamma, endometrium and jejunum. In order to assess the site of this bioactivation additionally the supply with substrate and cofactor has to be considered. Thus the presence of cytochromes P450 and PAPS synthase II as well as the high blood circulation suggest the liver as main organ for benzylic sulfonation in man.

These assumptions do not necessarily mean that organs in which benzylic sulfonation takes place are also the major target organs for the toxic effect of the sulfuric acid esters. MA showed that after 1-hydroxy methyl pyrene exposure, rats had higher levels of DNA adducts in kidneys than in liver, although hydroxylation and sulfonation of alkPAK is more or less limited to the latter. In the course of this work a high affinity albumin binding site for 2-sulfoxymethylpyrene was identified ($K_D = 0,059 \cdot 10^{-6}$ M). Furthermore, the uptake of sulfuric acid esters into cells expressing human organic anion transporters was analysed in vitro. This transport was mediated by human organic anion transporters 1, 3 and 4. The addition of albumin to the incubations revealed that only the free concentration of sulfuric acid esters was taken up by these transporters. These findings support the hypothesis that the sulfates formed in liver are transported to the kidneys and thus may explain the results of MA described above.

For the further estimation of the in vivo bioactivation of alkPAH the modulation of enzyme activities by ethanol, 4-methylpyrazole, quercetin, pentachlorophenol and disulfiram was explored. Those effects were assessed by metabolite analysis after alkPAH exposition with and without concurrent modulator exposition. The renally excreted metabolites after 1-hydroxymethylpyrene and 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene treatment of rats showed the corresponding benzylic carboxylic acids as major metabolites (30 and 66 % of metabolites with pyrene chromophore in a 24 h urine sample). A phenolic sulfuric acid ester of the 1-pyrenyl carboxylic acid was described as a second predominant metabolite for urine samples of 1-hydroxymethyl pyrene treated rats (35 % of metabolites with pyrene chromophore in a 24 h urine sample).

These carboxylic acids formed via alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase may be used as biomarkers as well as the mercapturic acids originated from glutathione conjugates of the benzylic sulfuric acid esters. The occurrence of these mercapturic acids is an indirect proof for the reactive and toxic benzylic sulfo conjugates. In the urine and fecal samples of rats treated with either 1-hydroxymethylpyrene or 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene the corresponding benzylic mercapturic acids were found, even though the absolute amount excreted and the distribution in urine and

fecal samples were quite different. The amount of 1,8-dimethylpyrenyl mercapturic acid found was about 17 ppm of the applied dose of 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene, whereas the amount of the overall excreted 1-methylpyrenyl mercapturic acid was 177 ppm of the applied dose of 1-hydroxymethylpyrene and thus 10 times higher. The later mercapturic acid was predominantly excreted via urine (70 %) but the excretion of 1,8-dimethylpyrenyl mercapturic acid was focused to feces (90 %). This observation may be explained by differences in transport of the sulfuric acid esters as well as by different specificities of the enzymes responsible for mercapturic acid formation. Additionally it was shown that the human organic anion transporter 1 does not transport 1,8-dimethylpyrenyl mercapturic acid and the human organic anion transporter 3 only with very little turnover, whereas 1-methylpyrenyl mercapturic acid was well transported by both transporters. The high structural similarity between human and rat organic anion transporters supports the hypothesis that the observed difference of transport specificity *in vitro* can be transferred to the *in-vivo*-situation in rats.

The concurrent application of 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene and ethanol or 4-methylpyrazole to rats revealed the important role of alcohol dehydrogenase for the detoxification of benzylic alcohols. The formation of the corresponding carboxylic acid was remarkably reduced. Compared to the controls only 44 and 38 % of the carboxylic acid was found in urine of ethanol and 4-methylpyrazole co-treated rats, respectively. Whereas the co-treatment with ethanol and 4-methylpyrazole increased the total excretion of the mercapturic acid to 10600 and 1300 % of the controls.

In order to observe an inhibition of sulfotransferases pentachlorophenol and quercetin were concurrently applied to rats treated with either 1-hydroxymethylpyrene or 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene. An inhibitory effect by means of reduced excretion of mercapturic acid was only observed for pentachlorophenol in animals treated with 1-hydroxymethylpyrene. These differences may be ascribed to different enzymatic affinities and in the case of quercetin to the low bioavailability of unmetabolised substance. In addition it turned out that pentachlorophenol was a potent competitive alcohol dehydrogenase inhibitor as the renal excretion of the corresponding carboxylic acid of 1-hydroxymethylpyrene was reduced to 9 % compared to control samples. For 1-hydroxymethyl-8-methylpyrene this modulation was not observed most probably due to a higher catalytic efficiency of alcohol dehydrogenase for the oxidation of this benzylic alcohol.

Regarding the human situation it has to be taken into account that human exposure to alkPAH is estimated to some μg per day depending on the individual lifestyle. The doses of benzylic alcohols, already metabolites of alkPAH, applied in the animal experiments here were 19 mg/kg bodyweight and thus about 100 000 times higher than human exposure to alkPAH. As the amounts of mercapturic acids of the corresponding sulfo conjugates were only a few ppm of the doses applied, it is questionable whether

Summary

this metabolite could serve as general biomaker of human exposure.

With regard to the modulation of the metabolism of alkPAH especially the effects observed with ethanol may be of relevance for the human situation. The competitive inhibition of alcohol dehydrogenase mediated detoxification of alkPAH may be one explanation for the often discussed indirect carcinogenic effect of ethanol.

1 Einleitung

Die Bioaktivierung, Mutagenität und Kanzerogenität von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) ist bereits ausführlich beschrieben worden. Während dabei rein aromatische Verbindungen im Vordergrund standen, gilt das Augenmerk in dieser Arbeit der Bioaktivierung ausgewählter alkylierter PAK (alkPAK).

In der Literatur gibt es einige Hinweise dazu, dass die alkPAK durchaus von Bedeutung sind. So kann nach einer Abschätzung von Hoffmann und Wynder (1971) das kanzerogene Potential eines PAK-haltigen Zigarettenkondensats nur zu 1–3 % mit der Wirkung der enthaltenen rein aromatischen PAK erklärt werden. Weiterhin führen Mumford u. a. (1995) die fünffach erhöhte Mortalität durch Lungenkrebs in Xuan Wei (China) auf eine fünf bis zehnfach höhere Exposition gegenüber mono-alkylierten PAK zurück.

Die Besonderheit der alkPAK ist die Tatsache, dass sie über die Alkylgruppe einen weiteren Angriffspunkt für den Fremdstoffmetabolismus bieten: Nach einer Hydroxylierung und Sulfonierung entstehen benzyliche Schwefelsäureester, die unter Umständen sehr reaktiv sind. Bei Pyren ermöglicht beispielsweise erst die Alkylierung eine kanzerogene Aktivierung (Rice u. a., 1987).

1.1 Bildung und Vorkommen von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Die alkPAK stellen eine Untergruppe der PAK dar. Sie besitzen zusätzlich zu den rein aromatischen PAK, die aus einem aromatischen Ringsystem mit mindestens zwei kondensierten aromatischen Ringen bestehen, noch einen oder mehrere Alkylsubstituenten bzw. Alkanobrücken. Als Beispiele für alkPAK sind 1-Methylpyren (1-MP) und Cyclopenta[*mno*]benzo[*a*]pyren (CPBP) in Abb. 1.1 dargestellt.

Allgemein entstehen PAK – reine Aromaten und alkylierte Kongenere – bei der Verbrennung von organischem Material oder durch geochemische Diagenese. Bei Verbrennungstemperaturen >1000 °C überwiegt die De-novo-Synthese aus kleineren Kohlenwasserstoffen, die eine Bildung der rein aromatischen Verbindungen wie Pyren, Chyrsen und Benzo[*a*]pyren (BP) begünstigt. Optimal für die Entstehung von PAK und insbesondere von alkPAK sind Verbrennungstemperaturen von 660–740 °C (Bay-

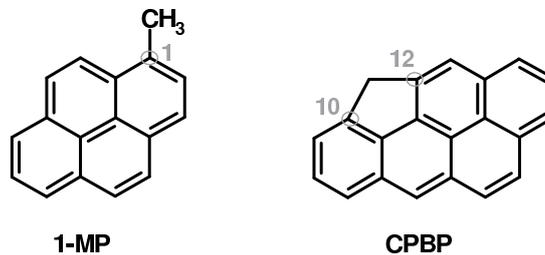


Abbildung 1.1: Beispiele für alkPAK: 1-Methylpyren (1-MP) und Cyclopenta[*mno*]benzo[*a*]pyren (CPBP)

ram und Muezzinoglu, 1996). Bei tieferen Temperaturen hat die Zusammensetzung des organischen Ausgangsmaterials einen größeren Einfluss auf die Struktur der entstehenden PAK. Dies gilt insbesondere für die geochemischen Entstehungsprozesse, die über längere Zeiträume bei Temperaturen von 100–200 °C stattfinden (Blumer und Youngblood, 1975).

Die große strukturelle Vielfalt der PAK im Allgemeinen und der alkPAK im Besonderen bedingt, dass ihr Vorkommen in den wiederum vielfältigen Matrices wie Lebensmitteln, Konsumgütern und Umweltkompartimenten nur teilweise untersucht ist. Insbesondere für alkPAK liegen hierzu nur relativ wenige Untersuchungen vor. In Tab. 1.1 sind die bisher unveröffentlichten Ergebnisse von SEIDEL bezüglich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten alkPAK zusammengefasst. Neben den in der Tabelle aufgeführten MP und Dimethylpyrenen (DMP) wurden die gleichen Matrices auch auf 1-,2- und 4-Ethylpyren (EP), 6-Methylantranthen (MAA) und 6-Ethylantranthen sowie 6-, 10- und 11-Methylbenzo[*a*]pyren (MBP) und 6-Ethylbenzo[*a*]pyren (6-EBP) untersucht. Diese letztgenannten alkPAK konnten – mit Ausnahme von 0,185 µg/kg 6-MBP- und 6-EBP in gegrilltem Schweinesteak – nicht nachgewiesen werden. Das Auftreten von 1-MP, sowie 1- und 2-Methylphenanthren und 2- und 9-Methylantracen in Grillwürstchen wurde bereits von Larsson u. a. (1983) nachgewiesen. Der Gehalt an 1-MP variierte bei diesen Untersuchungen je nach Zubereitungsart von nicht nachweisbar bei der Zubereitung in der Bratpfanne bis zu 16,2 µg/kg im Mittel beim Grillen über einem Holzfeuer.

Einige Jahre zuvor beschäftigten sich Snook u. a. (1978) mit der Analyse von PAK in Zigarettenrauchkondensat. Sie isolierten insgesamt 20 PAK-haltige Fraktionen, wobei fünf Fraktionen ausschließlich mono- und multialkylierte PAK beinhalten. Neben methylierten und ethylierten Furanen, Indenen, Naphthalenen, Fluorenen, Phen-

Tabelle 1.1: Daten zur Analyse von Zigarettenrauch, Motorenöl, Boden, Sediment und Grillgut hinsichtlich des Gehaltes an ausgewählten alkPAK, Pyren und BP. Diese bisher unveröffentlichten Daten stammen von der Arbeitsgruppe SEIDEL, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Grosshansdorf.

	Probe	1-MP	2-MP	4-MP	1,6 + 1,8-DMP	Pyren	BP
Zigaretten in µg/Packung	Kentucky 2R4F	0,108	0,062	0,08	0,024	0,18	0,014
	Marlboro	0,114	0,058	0,09	0,03	0,208	0,038
Motorenöl in mg/kg/ 1000 gefahrte km	Motorrad	0,5	0,5	0,4	0,09	1,3	1,1
	Ottomotor	1,73	1,8	1,48	0,19	4,47	2,23
Umweltproben in mg/kg	Boden (CRM 524)	6,0	6,8	6,1	0,44	107	3,5
	Sediment (CRM 535)	0,09	0,19	0,14	0,01	1,79	0,99
Grillgut in µg/kg	Schinken	5,9	2,5	5,6	0,5	52,3	6,8
	Schweinesteak	6,7	2,9	6,1	0,6	54,8	6,6

anthrenen, Anthracenen und Chrysenen wurden auch DMP nachgewiesen. In einer neueren Arbeit von Guillén u. a. (2004) wurde die Bedeutung von alkPAK bei der Belastung von Speiseölen mit PAK besonders deutlich. Eine umfangreiche Analyse von 58 ausgewählten alkylierten und nicht alkylierten PAK in Oliven- und Sonnenblumenölen zeigte, dass mehr als 50 % des PAK-Gehaltes (140–1470 µg/kg je nach Probe) auf alkylierte Derivate zurückzuführen waren. Naphthalen und seine Alkylderivate waren mit durchschnittlich über 40 % die dominanten Vertreter, aber auch 1-MP wurde mit 0,3 bis 2,7 µg/kg nachgewiesen. PAK mit mehr als vier kondensierten aromatischen Ringen spielten bei den Speiseölen mit Gehalten von zumeist 4 % und weniger eine untergeordnete Rolle.

1.2 Humane Exposition

Der menschliche Organismus ist gegenüber PAK über verschiedene Absorptionswege und Quellen exponiert. So können PAK inhalativ über Atemluft und Tabakrauch, dermal durch Hautkontakt mit PAK-haltigen Gemischen und oral über Lebensmittel aufgenommen werden. Hinsichtlich der individuellen Hauptbelastungsquellen können Arbeiter, Raucher und nicht beruflich exponierte Nichtraucher unterschieden werden. Die Exposition am Arbeitsplatz findet in der Regel über die Atemluft z.B. bei Verbren-

nungsprozessen oder über die Haut z.B. beim Umgang mit Rohöl, Motorenöl oder verschiedenen PAK-haltigen Syntheseprodukten statt.

Der Zigarettenkonsum führt pro Packung gerauchter Zigaretten zur Aufnahme von mehreren μg PAK über die Lunge (Menzie u. a., 1992; Roemer u. a., 2004).

Für beruflich nicht exponierte Nichtraucher sind Lebensmittel mit einem Anteil von über 90 % die bedeutendste PAK-Quelle (Lodovici u. a., 1995; Menzie u. a., 1992; Van Rooij u. a., 1994). Bei der Aufnahme über die Nahrung werden die PAK über den Gastrointestinaltrakt absorbiert, wobei die Absorption von der Zusammensetzung der verzehrten Nahrung abhängig zu sein scheint. So wird diskutiert, ob unlösliche Kohlenhydrate die Aufnahme verringern und Fette sie erhöhen (Stavric und Klassen, 1994). Ungeachtet der Bioverfügbarkeit liegt die tägliche Aufnahme an PAK über eine durchschnittliche Ernährung verschiedenen Berechnungen zu Folge bei einigen μg , wie in Tab. 1.2 dargestellt ist. Diese Daten zu aufgenommenen Mengen sind durch die Auswahl der 10 bis 20 quantifizierten PAK-Vertreter limitiert.

Bezüglich der alkPAK zeigen bisher unveröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe SEIDEL, dass gerade die Monomethylpyrene 1-, 2- und 4-MP in Zigaretten, Grillgut, Motorenölen und auch Umweltproben in ähnlichen Konzentrationen wie BP vorliegen (vgl. Tab. 1.1 und 1.2). Auch Arbeiten von Larsson u. a. (1983), Guillén und Sopolana (2004b) und Guillén und Sopolana (2004a) weisen 1-MP in ähnlichen Größenordnungen wie BP in Lebensmitteln nach. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die humane Belastung mit MP für beruflich nicht exponierte Nichtraucher im Bereich von einigen 100 ng/Tag liegt. Für Raucher und exponierte Arbeiter könnte sie jedoch noch höher liegen, unter Umständen bishin zu wenigen μg .

Eine umfassende Abschätzung der humanen Exposition gegenüber PAK und insbesondere alkPAK ist aufgrund der enormen strukturellen Komplexität nicht möglich. Eine Abschätzung der Exposition gegenüber PAK über BP oder eine kleine Gruppe von 10–20 PAK ist eine praktikable Möglichkeit, führt aber nur zu einer Mindestbelastung, die oftmals die alkPAK außer Acht lässt.

Zur Klärung substanzspezifischer Fragen sowie der Bioverfügbarkeit können Biomarker von einzelnen Vertretern der PAK gemessen werden. Oftmals fehlende Korrelationen mit der Expositions-dosis und die technische Beschränkung auf wenige spezifische PAK begrenzen die Anwendung dieser Methoden jedoch.

1.3 Metabolismus

Die Lipophilie der alkPAK – wie auch die der nicht alkylierten PAK – führt ohne Metabolisierung zu einer Anreicherung im Organismus. Diese Anreicherung kann beispielsweise bei Muscheln beobachtet werden (Meador u. a., 1995). Säugetiere können

Tabelle 1.2: Geschätzte tägliche Aufnahme an PAK und BP über die Nahrung. Die Daten wurden jeweils aus Ernährungsprotokollen und repräsentativen PAK-Gehalten der Lebensmittel berechnet. Für die Abschätzung der PAK-Aufnahme wurden je nach Veröffentlichung verschiedene Vertreter der PAK berücksichtigt. Ergänzend sind die Hauptquellen für die jeweiligen Belastungen angegeben.

	Aufnahme	Daten aus	Hauptquellen
<i>PAK</i> , µg/Tag	3,7	Großbritannien (Dennis u. a., 1983)	je 30 % Getreideprodukte bzw. Öle und Fette
	5–17	Niederlande (de Vos u. a., 1990)	Getreideprodukte, Pflanzenöle und -fette
	3	Italien (Lodovici u. a., 1995)	Getreideprodukte, Obst und Gemüse, Grill- und Backgut
	1,2	Neuseeland (Thomson u. a., 1996)	keine Angaben
	1–5	USA (Menzie u. a., 1992)	Getreideprodukte, Fleisch, Gemüse
<i>BP</i> , ng/Tag	40–60	USA (Kazerouni u. a., 2001)	je 30 % Getreideprodukte und Gemüse, 20 % gegrilltes Fleisch, 10 % Obst
	16,3	USA (Anderson u. a., 2005)*	Fleisch
	560	Deutschland (Scherer u. a., 2000)	Getreideprodukte, Fleisch, Gemüse, Obst, Milchprodukte, Fisch
	176	USA (Buckley u. a., 1995)**	keine Angaben

* Daten der Kontrollgruppe dieser Studie, die den Zusammenhang zwischen Pankreastumoren und der Aufnahme von BP sowie von heterozyklischen Amininen untersucht.

** Duplikatstudie

jedoch durch die Enzyme des fremdstoffmetabolisierenden Systems die PAK und alkPAK so funktionalisieren und konjugieren, dass die dadurch erreichte höhere Hydrophilie und strukturelle Veränderung wie z. B. eine negative Ladung eine aktive oder passive Sekretion und somit die Ausscheidung aus dem Organismus ermöglicht. Der Fremdstoffmetabolismus untergliedert sich in drei zu betrachtende Phasen: Phase I – Funktionalisierung, Phase II – Konjugation, Phase III – Transport. Im Folgenden wird auf die Biotransformation von alkPAK, den Transport der Metaboliten und die wichtigsten daran beteiligten Proteine eingegangen.

Ein alkPAK bietet für die Biotransformation zwei Angriffsmöglichkeiten: das aromatische Ringsystem und die Alkylgruppe. Der Metabolismus von aromatischen Ringsystemen ist weitgehend aufgeklärt (Hertel u. a., 1998). Für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind das Pyren (Abb. 1.2) und das BP zu betrachten.

In der Phase I des Fremdstoffmetabolismus findet eine durch Cytochrome P450 (CYP) vermittelte Oxidation der aromatischen Ringsysteme zu entsprechenden Epoxiden, Phenolen und Diolen statt. Die CYP1A1 und 1B1, die über den „aryl hydrocarbon receptor“ (Ah-Rezeptor) auch durch PAK selbst induziert werden können, weisen eine besonders hohe katalytische Aktivität für diese Oxidationen auf. Als sekundäre Metaboliten der Phase I treten Dirole, Diolepoxide, Tetrahydrotetrole und Phenolepoxide auf. Die Bildung der Dirole aus den entsprechenden Epoxiden wird durch Epoxidhydrolase vermittelt. Diese primären und sekundären Metaboliten der Phase I werden durch Enzyme der Phase II zu Glutathion- (GSH), Glucuronsäure- oder Sulfokonjugaten umgesetzt. Die somit erreichte Zunahme der Hydrophilie hat eine verbesserte Ausscheidung der Fremdstoffe aus dem Organismus zur Folge. Eine Ausnahme stellen die Diolepoxide des BP dar. Diese sind hoch reaktiv und führen zur Bildung von DNA-Addukten, die, wenn sie nicht repariert werden, Mutationen im betroffenen Organismus hervorrufen können.

Zusätzlich zur Transformation des Ringsystems wird bei den alkPAK die Seitenkette durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme modifiziert. In der Phase I findet eine CYP-vermittelte Hydroxylierung der Seitenkette statt. Der gebildete benzyliche Alkohol ist zum einen ein Substrat für die Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Aldehyddehydrogenasen (ALDH), zum anderen kann er durch die konjugierenden Enzyme der Phase II zum Glucuronid oder Sulfat metabolisiert werden. Bei einer Analyse der Metaboliten der alkPAK tritt eine Vielzahl von Kombinationen aus verschiedenen Metaboliten des Ringsystems und der Seitenkette auf.

Dieser Metabolismus wurde am Beispiel des 1-MP für die Ratte in den Arbeiten von Rice u. a. (1988), Engst u. a. (1999), Ma (2001) und Ma u. a. (2000) aufgeklärt und ist in Abb. 1.3 skizziert. Rice u. a. und Engst u. a. verwendeten für ihre Untersuchungen 1-MP sowie Rattenleberhomogenat von Aroclor-behandelten Tieren bzw. Rattenlebermikrosomen von unbehandelten und 3-Methylcholantren (3-MC) behandelten Tieren.

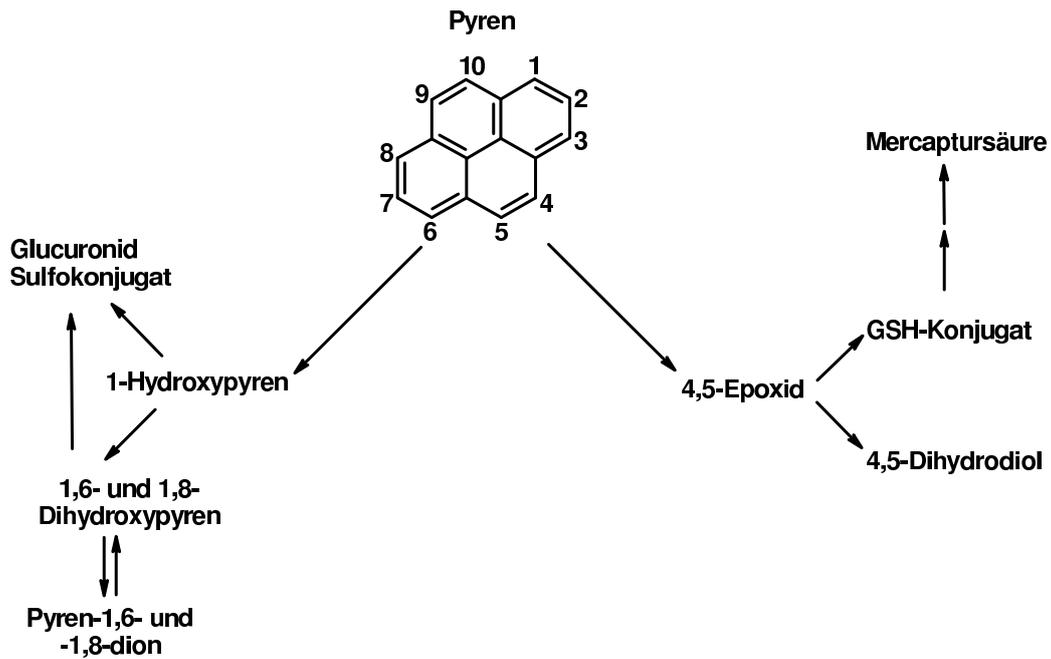


Abbildung 1.2: Übersicht zum Metabolismus von Pyren bei der Ratte (Boyland und Sims, 1964; Jacob u. a., 1982; Ruzgyte u. a., 2005): Zunächst erfolgt eine CYP-vermittelte Oxidation zu 1-Hydroxypyren oder [4,5-]Epoxid. 1-Hydroxypyren wird zum Einen weiter oxidiert, zum Anderen aber auch zum entsprechenden Glucuronid bzw. Schwefelsäureester konjugiert. Das [4,5-]Epoxid wird entweder ebenfalls konjugiert, allerdings zum entsprechenden GSH-Kongugate, dass zur Mercaptursäure abgebaut werden kann, oder es erfolgt eine Hydrolyse zum Diol.

Die Ergebnisse von Ma beziehen sich hingegen auf Urin- und Fäzesanalysen von 1-HMP-behandelten Ratten.

Als Metaboliten aus den in-vitro-Inkubationen mit 1-MP werden *trans*-4,5-Dihydrodiol-1-MP, 3-, 6- oder 8-Hydroxy-1-MP bzw. -1-HMP, 1-HMP und 1-Pyrenylcarbonsäure (1-PCS) beschrieben (Engst u. a., 1999; Rice u. a., 1988). Diese Metaboliten entstehen durch Aktivitäten von CYP, ADH und ALDH. Die Aktivitäten konjugierender Enzyme werden in diesen in-vitro-Inkubationen nicht beobachtet. Sie finden sich aber in den in-vivo-Ergebnissen von Ma (2001) wieder: Das Metabolitenspektrum in Urin und Fäzes setzt sich aus etwa 30 % phenolischen Schwefelsäureestern der ringhydroxylierten 1-PCS, 1 % phenolischer Schwefelsäureester des ringhydroxylierten 1-HMP, 17 % Glucuronsäurekonjugate der 1-PCS, 1 % (Männchen) bzw. 7 % (Weibchen) Glucuronsäurekonjugat des 1-HMP, 30 % 1-PCS sowie 2 % ringhydroxyliertem 1-HMP und unmetabolisiertem 1-HMP zusammen. Diese Angaben beziehen sich auf die Gesamtheit der ausgeschiedenen Metaboliten innerhalb von 24 h nach Applikation von 40 µmol/kg KM [¹⁴C]1-HMP. In dieser Zeitspanne werden bei weiblichen Ratten 18 % der applizierten Dosis renal und rund 31 % biliär ausgeschieden, bei männlichen Ratten hingegen 30 % der Dosis renal und 14 % biliär.

1.3.1 Cytochrome P450

Die benzyliche Hydroxylierung als erster Schritt im Fremdstoffmetabolismus der Seitenkette der alkPAK wird durch Enzyme der Superfamilie der CYP katalysiert. Diese mikrosomalen Häm-Thiolat-Monooxygenasen vermitteln den Einbau eines Sauerstoffs in ihre Substrate unter Bildung von Wasser und Oxidation von NADPH. Neben der Hydroxylierung von aliphatischen Kohlenwasserstoffen und der bereits beschriebenen Epoxidierung von Aromaten oxidieren CYP noch eine Vielzahl weiterer Substrate (Sono u. a., 1996). Das menschliche Genom enthält 18 Familien, unterteilt in 41 Subfamilien mit insgesamt 57 aktiven Genen (Gibbs u. a., 2004; Guengerich, 2004). Bei der Ratte liegen noch keine endgültigen Zahlen vor. Nach Ergebnissen des „Rat Genome Sequencing Project Consortium“ von 2004 hat das Genom der Ratte 18 CYP-Familien gegliedert in 44 Subfamilien mit insgesamt 84 aktiven Genen (Gibbs u. a., 2004).

Die Familien 1 bis 3 umfassen diejenigen Enzyme, die insbesondere für den Fremdstoffmetabolismus von Bedeutung sind (Lewis, 2001). Bei der benzylichen Hydroxylierung von 1-MP und 1-EP sind nach Untersuchungen von Engst u. a. die humanen Formen CYP1A1, 1A2, 1B1, und 3A4 besonders aktiv. Geringere Aktivitäten wurden mit hCYP2A6 und 2E1 festgestellt (Engst u. a., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit werden alle Untersuchungen mit den vier besonders aktiven Formen durchgeführt. In Tab. 1.3 sind ihre Gewebeverteilung, Substratspezifität und Induktoren zusammengefasst. Die Induktion der CYP erfolgt über verschiedene ligandenaktivierte Transkriptionsfakto-

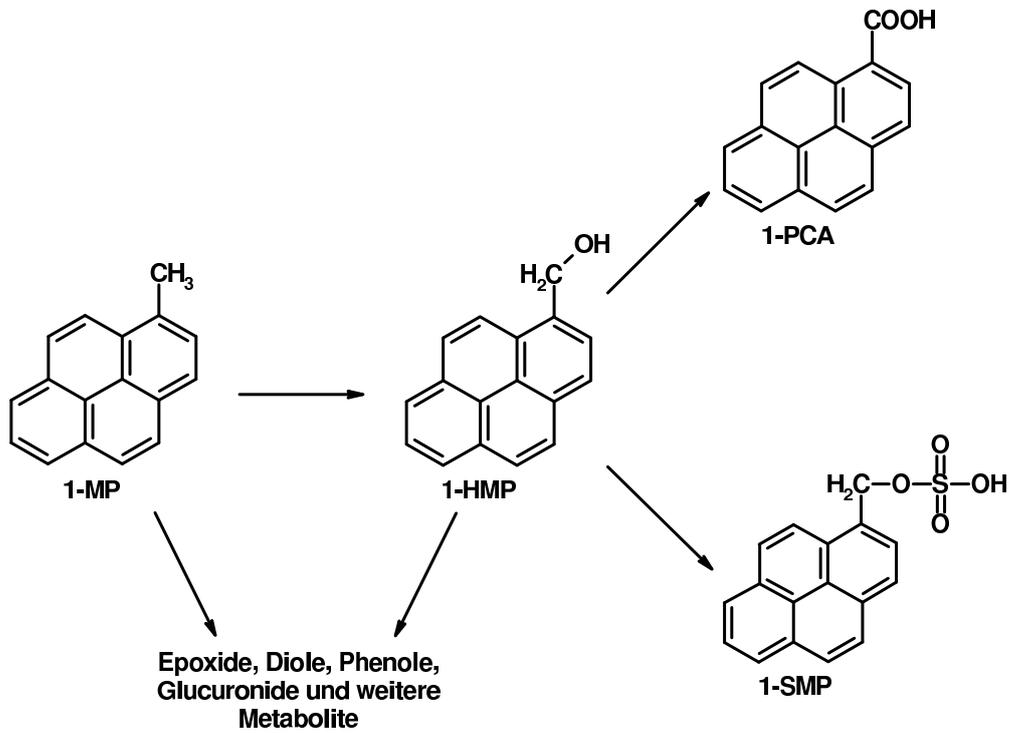


Abbildung 1.3: Übersicht zum Metabolismus von 1-MP (Ma, 2001): Zusätzlich zum Metabolismus des Ringsystems wird die Methylgruppe transformiert. Zu nächst erfolgt eine CYP-vermittelte Hydroxylierung, gefolgt von einer weiteren Oxidation durch ADH und ALDH zur Pyrenylcarbonsäure oder eine Konjugation zum Schwefelsäureester vermittelt durch SULT. Auch eine Konjugation des benzylichen Alkohols mit Glucuronsäure zum entsprechenden Glucuronid wird beschrieben, ebenso wie die Kombination von Methylgruppen- und Ringmetabolismus.

ren. Für die Enzyme der Familie 1 ist der Ah-Rezeptor zu nennen. Dieses cytosolische Protein liegt zunächst inaktiv in den Zellen vor, erst durch eine Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und Aktivierung. Nach der Translokation in den Zellkern und Dimerisierung mit ARNT (Ah-receptor nuclear translocator) bindet der Komplex unter Hinzuziehung weiterer Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden responsiven Elemente im regulatorischen Genabschnitt der CYP und aktivieren die Gentranskription. Typische Liganden für den Ah-Rezeptor sind 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), PAK sowie chlorierte PAK und polychlorierte Biphenyle (PCB) wie z. B. Aroclor 1254. Die für die CYP3-Familie bekannten Transkriptionsfaktoren sind der Glukokortikoidrezeptor und der Pregnan-X-Rezeptor, die durch Steroidhormone respektive Pregnane und eine Vielzahl von Fremdstoffen aktiviert werden (Tab. 1.3, hCYP3A4). Die Art der Liganden, die CYP1- und CYP3-Enzyme induzieren, zeigt, dass diese Enzyme abhängig von den jeweiligen Lebensumständen durchaus sehr unterschiedliche Expressionsniveaus aufweisen können. Tabakkonsum und die Belastung mit PCB können zu einer Erhöhung der CYP1-Enzyme führen und verschiedene Medikamente wie Rifampicin, Dexamethason oder Johanniskraut modulieren die Expression der CYP3-Enzyme (Guengerich, 2002; Lewis, 2001).

Tabelle 1.3: Substratspezifität, Gewebeverteilung und Induktoren von hCYP1A1, 1A2, 1B1 und 3A4 (Lewis, 2001).

Enzym	Substrate	Gewebeverteilung	Induktoren
hCYP1A1	PAK	Lunge, Niere, Gastrointestinaltrakt, Haut, Plazenta, Lymphozyten	PAK, TCDD, PCB
hCYP1A2	heterozyklische Amine, PAK	Leber	PAK, TCDD, PCB
hCYP1B1	PAK, heterozyklische Amine	Haut, Niere, Mamma, Prostata, Uterus, Fötus	PAK, TCDD, PCB
hCYP3A4	Steroidhormone, Makrolidantibiotika, PAK	Leber, Gastrointestinaltrakt, Plazenta, Fötus	Rifampicin, Dexamethason, Johanniskraut

1.3.2 Sulfotransferasen

Unter den Enzymen, die die benzyllischen Alkohole konjugieren, werden in dieser Arbeit die löslichen Sulfotransferasen (SULT) betrachtet. Die gebildeten Sulfokonjugate können Addukte mit zellulären Makromolekülen bilden und somit die Toxizität der alkPAK vermitteln (Abs. 1.4). Die SULT katalysieren die Übertragung des Sulfonylrestes von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf einen nukleophilen Akzeptor, im Fall der alkPAK den benzyllischen Sauerstoff. Weitere Substrate der SULT sind beispielsweise Amine, Hydroxylamine und Phenole. Diese Akzeptormoleküle können sowohl endogenen wie exogenen Ursprungs sein. Eine Übersicht zu den 12 humanen SULT (hSULT) sowie den 13 Rattensulfotransferasen (rSULT), ihrer Gewebeverteilung und Substratspezifität ist in den Tabellen 1.4 und 1.5 aufgeführt. Im Vergleich der Daten von Mensch und Ratte ist zunächst die Fokussierung der rSULT auf die Leber interessant, die bei den hSULT-Formen nicht in dem Maße zu beobachten ist. Des Weiteren ist bei der Extrapolation von der Ratte auf den Menschen die bei ersteren gegebene geschlechtsabhängige Expression der SULT zu berücksichtigen.

Die Sulfonierung benzyllischer Alkohole durch hSULT und rSULT wurde von Landsiedel u. a. (1998) und weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe Glatt u. a. indirekt nachgewiesen. Landsiedel u. a. zeigte diese Aktivität durch die Inversion des 1- α -Hydroxyethylpyrens (1- α -HEP) vom (-)-S-1-HEP zum (+)-R-1-HEP, welche bei Inkubationen mit der stereoselektiven hSULT1E1 auftritt. Die Mutagenität von benzyllischen Alkoholen wie 1- und 2-Hydroxymethylpyren (1- und 2-HMP), 1- α -HEP, 9-Hydroxymethylantrazen, 7-Hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthrazen und 4H-Cyclopenta[def]chrysen-4-ol im *Salmonella typhimurium* His⁻ Reversionstest (Ames-Test) mit cytosolischen Extrakten und PAPS als aktivierendem System oder mit SULT-profizienten *Salmonella typhimurium* ist ein weiterer Hinweis auf die Sulfonierung dieser Verbindungen durch rSULT und hSULT (Czich u. a., 1992; Glatt u. a., 1993, 1990, 1995, 1994a). Der direkte Nachweis eines benzyllischen Schwefelsäureesters der alkPAK in einer in-vitro-Inkubation konnte aufgrund der Instabilität der bisher untersuchten Verbindungen jedoch nicht erbracht werden.

1.3.3 Mercaptursäurebildung

Mercaptursäuren entstehen durch Katabolismus von GSH-Konjugaten potentieller Alkylantien, wie beispielsweise Carbokationen oder positiv polarisierten Kohlenstoffatomen. Somit weisen Mercaptursäuren auf intermediär gebildete reaktive Metaboliten hin, die als solche nur schwer oder gar nicht nachgewiesen werden können.

Die Bildung der GSH-Konjugate wird durch Glutathion-S-Transferasen (GST) vermittelt, da GSH ein weiches Nukleophil ist und nicht spontan mit den zumeist harten

Tabelle 1.4: Gewebeverteilung und Substrate der hSULT basierend auf der Zusammenfassung in Glatt (2002). Soweit nicht anders vermerkt, wurde die mRNA der einzelnen Formen nachgewiesen.

hSULT	Gewebeverteilung	Substrate
1A1 *	Leber, ubiquitär	Xenobiotika (Phenole, arom. Amine)
1A2	Leber, Gehirn, Lunge, Niere, Darm	vergleichbar mit hSULT1A1
1A3 *	Darm, Leber, ubiquitär	Catecholamine
1B1 *	Darm, Leber, Leukozyten, Gehirn, Ovarien, Niere	Iodothyronine, einige Phenole
1C1	Niere, Magen, Schilddrüse	unbekannt
1C2	Niere, Ovarien, Rückenmark	unbekannt
1C3	über Genbankanalyse identifiziert	1'-Hydroxysafrol, einige Phenole
1E1 *	Leber, Mamma, Endometrium, Darm	Estradiol, Iodothyronine, einige Phenole
2A1 *	Leber, Nebenniere, Darm	Dehydroepiandrosteron, Gallensäuren, aliphatische Amine, Fremdstoffalkohole
2B1a	Plazenta, Prostata, Trachea	Hydroxysteroid
2B1b	Plazenta, Prostata, Haut, Lunge	Hydroxysteroid
4A1	Gehirn	unbekannt

* Als Protein nachgewiesen

elektrophilen Alkylantien reagiert. Die GSH-Konjugate werden mit Hilfe der Ectoenzyme γ -Glutamyltransferase (γ -GT) und Dipeptidase (DP) zu Cysteinyl-S-konjugaten abgebaut. Diese bilden nach einer N-Acetylierung vermittelt durch mikrosomale N-Acetyltransferase (mNAT) die entsprechenden Mercaptursäuren. Die Lokalisation der verschiedenen beteiligten Enzyme bedingt, dass es sich bei der Mercaptursäuresynthese je nach Organismus und Fremdstoff um einen hepato-renalen, einen rein hepatischen oder einen hepato-biliären Stoffwechselvorgang handelt (Hinchman und Ballatori, 1994). Die Ausscheidung der Mercaptursäuren erfolgt wiederum je nach Struktur und Organismus über Urin oder Fäzes.

Die Konjugation der beim Metabolismus von alkPAK gebildeten benzyllischen Schwefelsäureester mit GSH wurde in der Diplomarbeit von Hessel (2006) in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es wurde gezeigt, dass die GST T2 der Ratte Sulfoxymethylpyrene (SMP) in Abhängigkeit von der Position ihrer Sulfatgruppe mit unterschiedlichen, aber

Tabelle 1.5: Überblick über die Gewebeverteilung und Substrate der rSULT. Soweit keine anderen Quellen angegeben sind, stammen die Daten zu den Substraten aus den Review-Artikeln von Blanchard u. a. (2004) sowie Nagata und Yamazoe (2000). Die Gewebeverteilung wurde weitestgehend von Dunn und Klaassen (1998) untersucht. Die einzelnen Formen wurden über ihre mRNA nachgewiesen.

	rSULT	Gewebeverteilung	Substrate
bei männlichen Tieren in der Leber überwiegende Formen:	1A1	Leber, Lunge, Milz, Hoden, Herz, Niere, Gehirn, Darm, Nebenniere	Xenobiotika (Phenole, arom. Amine)
	1C1	Leber, Niere, Magen, Herz, Milz	Iodothyronine
	1E1/2	Leber, Herz	Estradiol
bei weiblichen Tieren in der Leber überwiegende Formen:	2A1/2/3	Leber, Gehirn (nur 2A1/2)	Hydroxysterioide
keine Geschlechtsspezifität bekannt:	1B1	Leber, Darm, Niere	Iodothyronine
	1C2/3	Niere, Magen, Leber (Xiangrong u. a., 2000)	nicht untersucht
	1D1	nicht untersucht	nicht untersucht
	2B1a/b (Kohjitani u. a., 2006)	a: Gehirn, Hoden; b: Haut, Darm, Niere (Kohjitani u. a., 2006)	Pregnenolon, Cholesterol (Kohjitani u. a., 2006)
	4A1 (Falany u. a., 2000)	Gehirn (Falany u. a., 2000)	nicht untersucht

hohen katalytischen Effizienzen umsetzt. Von Ma (2001) konnte gezeigt werden, dass die 1-Methylpyrenylmercaptursäure (1-MPMA) einen geeigneten Biomarker für den Nachweis der Bildung des benzylichen Schwefelsäureesters 1-SMP nach einer 1-MP-Exposition darstellt. Die Bildung von 1-MPMA ausgehend von 1-SMP ist in Abb. 1.4 dargestellt.

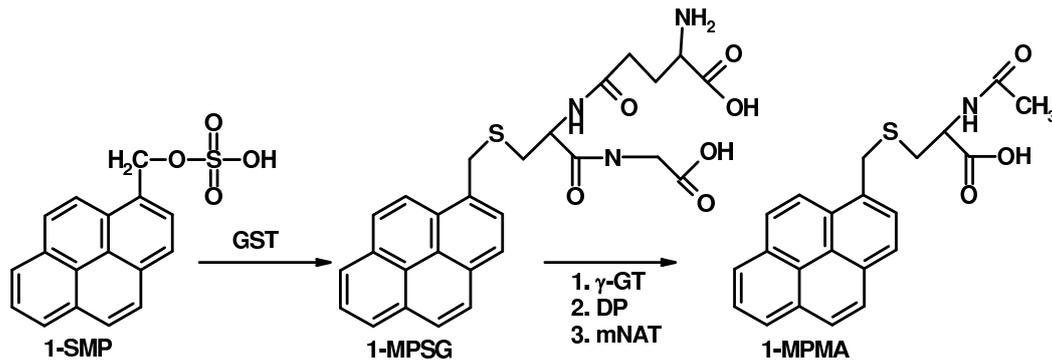


Abbildung 1.4: Bildung von 1-MPMA: Ausgehend von 1-SMP erfolgt zunächst eine GSH-Konjugation zum 1-Methylpyrenylglutathion (1-MPSG). Dieses wird anschließend durch γ -GT und DP zum Cysteinyl-Konjugat abgebaut und dann durch die mNAT zur Mercaptursäure acetyliert.

1.3.4 Carbonsäurebildung

Neben der Mercaptursäure als indirektem Nachweis des toxischen Sulfokonjugates sind die entsprechenden Carbonsäuren der benzylichen Alkohole von besonderem Interesse. Sie entstehen bei der zur Sulfokonjugation in Konkurrenz ablaufenden Oxidation des Alkohols und stellen bei 1-HMP den mengenmäßig bedeutendsten Metaboliten dar (Ma, 2001). An der Bildung der Carbonsäuren sind die überwiegend hepatisch exprimierten ADH und ALDH beteiligt (Edenberg und Bosron, 1997; Hoog u. a., 2001; Vasiliou u. a., 2000). Die Familie der ADH umfasst sechs Enzymklassen (ADH1–6), die Familie der ALDH neun (ALDH1–9). Für den Ethanolmetabolismus sind sowohl bei den ADH als auch bei den ALDH die Enzyme der Klassen 1 und 2 von Bedeutung (Hoog u. a., 2001; Vasiliou u. a., 2000). Die Spezifität der verschiedenen Enzymformen hinsichtlich der Umsetzung benzylicher Alkohole wurde von Kollock u. a. und Glatt u. a. aus unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Daten in Kollock u. a.

(2008b) und Kollock u. a. (2008a) zeigen, dass besonders die humane ADH2 hohe Umsatzraten für verschiedene untersuchte Hydroxymethyl- und Hydroxydimethylpyrene aufweist. Für die weitere Umsetzung der benzylischen Aldehyde zur entsprechenden Carbonsäure zeigt beispielsweise die humane ALDH2 eine hohe katalytische Effizienz, wie von Glatt u. a. (im Druck) ermittelt wurde.

1.3.5 Transportprozesse

Die Bedeutung der Phase III des Fremdstoffmetabolismus der alkPAK wird durch die Ergebnisse von Glatt u. a. (2003b) deutlich: Trotz der Fokussierung der rSULT-Expression auf die Leber erweist sich die Niere als ein Hauptzielorgan der DNA-Adduktbildung durch 1-HMP. Der Transport des reaktiven und negativ geladenen Sulfates aus der Leber zur Niere erfordert zum einen Transporter in den jeweiligen Organen und zum anderen eine Stabilisierung des reaktiven Metaboliten im Blut. Die Beobachtung von Glatt u. a. (2003a), dass Blutplasma die Halbwertszeit von 1-SMP in wässriger Lösung von 5 Minuten auf bis zu 16,5 Stunden verlängert, ist ein Hinweis auf eine mögliche Albuminbindung der Schwefelsäureester. Für eine Bindung an Rinderserumalbumin wurde von Glatt u. a. eine Dissoziationskonstante von $0,67 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ abgeschätzt. Albumin ist neben seiner bedeutenden Rolle bei der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks für den Transport einer Vielzahl endogener und exogener Substanzen wie Fettsäuren, Billirubin und Pharmaka bekannt. Das globuläre humane Serumalbumin (HSA) besteht aus 585 Aminosäuren und stellt 60% des Proteingehaltes des Blutserums. Es wird in der Leber synthetisiert und erreicht im Serum eine Konzentration von $700 \mu\text{M}$. Die herzförmige Faltung des Albumins besteht zu 67% aus α -Helices und beinhaltet keine β -Faltblattstrukturen. Des Weiteren kann das Protein in drei homologe Domänen (I, II, III) mit je zwei Subdomänen (A und B) eingeteilt werden. Nach der Nomenklatur von Sudlow (Sudlow u. a., 1975) finden sich die zwei Hauptbindungsstellen Sudlow I und Sudlow II in den Subdomänen IIA bzw. IIIA. An der Bindungsstelle Sudlow I werden große heterozyklische Anionen (z. B. Warfarin) und an Sudlow II Carboxylate (z. B. Ibuprofen) gebunden (Evans, 2002).

Auch die Bindung von Sulfokonjugaten an Albumin wird verschiedentlich in der Literatur beschrieben, wobei je nach Struktur eine oder mehrere unterschiedliche Bindungsstellen angenommen werden, ohne diese näher zu charakterisieren (Mizuma u. a., 1991; Plager, 1965). Insgesamt gesehen ist die reversible Bindung von Metaboliten und Xenobiotika für deren Verteilung im Organismus von entscheidender Bedeutung. Als ein Beispiel kann hier die verminderte renale Sekretion von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) im Vergleich zu Androsteronsulfat und Etiocholanolonsulfat genannt werden (Plager, 1965). Sie ist wahrscheinlich auf eine stärkere Albuminbindung des DHEA-S zurückzuführen.

In Hinblick auf die renale Sekretion und das hohe Maß an DNA-Schäden durch 1-SMP stellt sich die Frage nach der Aufnahme der negativ geladenen Schwefelsäureester in die Tubuluszellen der Niere. Hierzu befähigte Transporter sind die basolateralen „Organischen Anionentransporter“ OAT1 und OAT3 und der luminal OAT4, die die Aufnahme aus dem Blut bzw. die tubuläre Reabsorption vermitteln (Wright und Dantzer, 2004). Diese Transporter sind in Abb. 1.5 schematisch dargestellt. Sie sind über die verschiedenen Spezies hoch konserviert und werden hauptsächlich in der Niere exprimiert. Ihre endogenen und exogenen Substrate sind strukturell sehr unterschiedlich und umfassen Verbindungen wie Prostaglandine, zyklische Nukleotide und Urate, nicht steroidale Antiphlogistika, Diuretika, Antibiotika und antivirale Wirkstoffe (Burckhardt und Burckhardt, 2003). Die OAT schützen den Organismus daher durch die Vermittlung der Sekretion von Schadstoffen und ihren Metaboliten, können aber auch dazu führen, dass sich eben diese Stoffe in den proximalen Tubuluszellen anreichern. Durch Ochratoxin A (Tsuda u. a., 1999), Cephalosporine (Takeda u. a., 2002) und Indoxylsulfat (Enomoto u. a., 2002) werden somit OAT-vermittelte Nephropathien ausgelöst.

Betrachtet man den Transport der Schwefelsäureester im Zusammenhang, so stellt sich die Frage, wie es möglich ist, dass eine proteingebundene Substanz durch OAT in die Tubuluszellen aufgenommen werden kann. Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse von Glatt u. a. (2003a) von einer reversiblen Proteinbindung ausgegangen werden kann, ist weiterhin davon auszugehen, dass sich in Abhängigkeit von der Assoziationsstärke ein Gleichgewicht zwischen einem großen gebundenen und einem geringen freien Anteil an Schwefelsäureester in der Blutbahn einstellt. Dieser geringe freie Anteil könnte dann durch die OAT in die Tubuluszellen aufgenommen werden. In der Literatur gibt es allerdings widersprüchliche Untersuchungen zum Einfluss von Albumin auf die Sekretion und die Aufnahme von Substanzen in die Tubuluszellen. In Besseghir u. a. (1989) wird von einer gesteigerten Sekretionsrate von *p*-Aminohippurat bei isolierten perfundierten Tubuli in Gegenwart von Albumin berichtet. Bei Bow u. a. (2006) hingegen führt der Zusatz von Albumin in in-vitro-Transportexperimenten zu einer Verminderung der Aufnahme von Ochratoxin A, Methotrexat und Estronsulfat. Unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten ist allerdings auch fraglich, wie Albumin und daran gebundene Sulfate überhaupt in größerem Umfang aus der Blutbahn bis zu den Tubuluszellen gelangen können (Hook und Goldstein, 1993). Die verschiedenen Phasen des Transportprozesses sowie ihr Zusammenspiel bedürfen daher noch weiterer Untersuchungen.

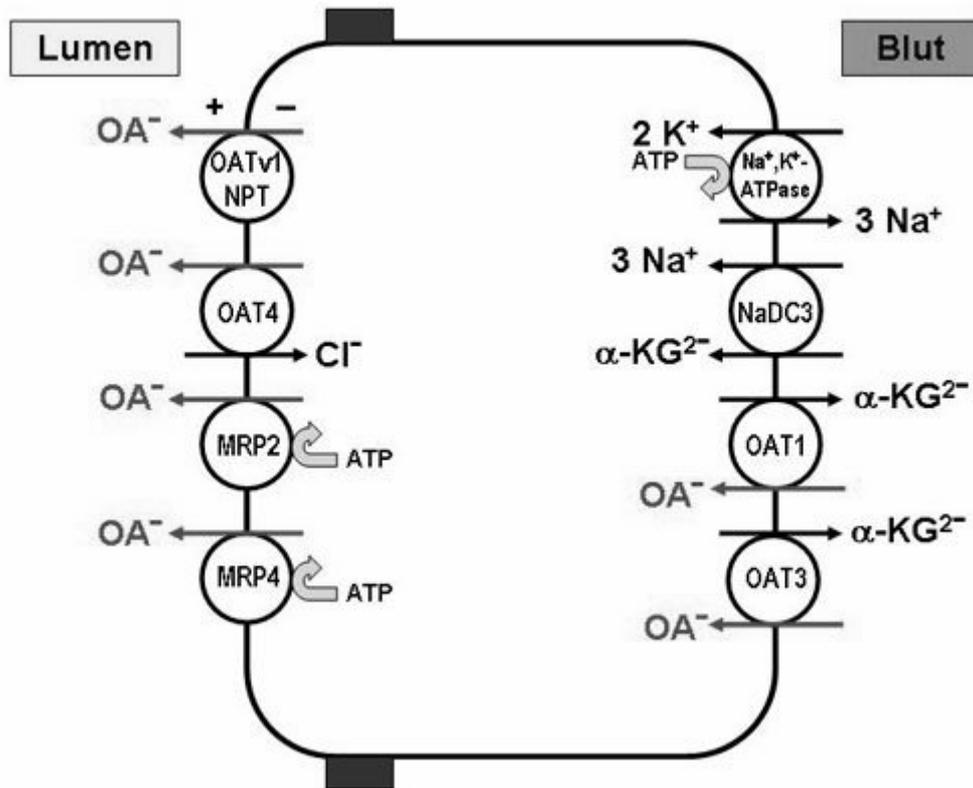


Abbildung 1.5: Übersicht zu den Transportern einer proximalen Nierentubuluszelle. Für die vorliegende Arbeit wurden die basolateralen hOAT1 und 3 sowie der lumenale hOAT4 untersucht (Abb. modifiziert nach Burckhardt und Burckhardt (2003)). Sowohl hOAT1 wie 3 vermitteln die Aufnahme von organischen Anionen in die Zellen im Austausch gegen intrazelluläres α -Ketoglutarat. Für hOAT4 ist hier der Effluxmodus dargestellt: organische Anionen werden im Austausch gegen Chlorid-Ionen in den Harn abgegeben. Des Weiteren kann hOAT4 im Influxmodus Urat oder Estronsulfat aus dem Harn im Austausch gegen Dicarboxylate oder Hydroxylionen aufnehmen (Hagos u. a., 2007).

1.4 Bioaktivierung

Die Funktionalisierung und Konjugation von Fremdstoffen ermöglicht in den meisten Fällen eine verbesserte Ausscheidung der körperfremden Stoffe. In einigen Fällen kommt es jedoch zur Bioaktivierung der Fremdstoffe, d.h. es werden reaktive Metaboliten gebildet, die mit zellulären Makromolekülen wie DNA und Proteinen Addukte bilden. Werden diese Protein- oder DNA-Addukte nicht repariert, kann es zu Funktionsstörungen und Mutationen der betroffenen Zellen kommen.

Beispiele für die Bioaktivierung von alkPAK sind die Bildung von 1-SMP und 6-Sulfoxymethylbenzo[*a*]pyren (6-SMBP) (Flesher u. a., 1997; Glatt u. a., 1993; Monnerjahn u. a., 1993). Die Sulfatgruppe ist aufgrund ihrer Elektronegativität und der Mesomeriestabilisierung des entstehenden benzyllischen Carbokations eine gute Abgangsgruppe. Die benzyllischen Schwefelsäureester reagieren daher, sofern sie nicht hydrolysiert werden, mit DNA-Basen (Abb. 1.6) oder werden beispielsweise durch GSH abgefangen (Abb. 1.4). Die DNA-Addukte können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mittels ^{32}P -Postlabeling oder HPLC nachgewiesen werden (Cavalieri u. a., 2000; Monnerjahn u. a., 1993). Außerdem findet man *N*²-(1-Methylpyrenyl)-desoxyguanosin im Urin von 1-SMP behandelten Ratten. Ebenso ist im Urin dieser Tiere das *N*-Acetyl-S-methylpyrenyl-L-cystein (1-MPMA) nachweisbar (Ma u. a., 2000). Das Vorkommen dieser Metaboliten im Urin kann somit als indirekter Nachweis für die Bioaktivierung herangezogen werden.

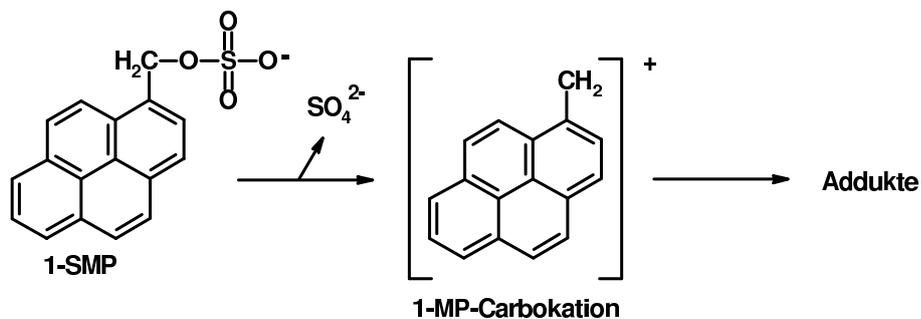


Abbildung 1.6: 1-SMP als bioaktiver Metabolit des 1-MP (vermutlich nach S_N1-Mechanismus (Landsiedel, 1997)): nach Abspaltung der Sulfatgruppe intermediäre Bildung eines elektrophilen Carbokations, das Addukte mit Makromolekülen wie z.B. der DNA bilden kann.

1.5 Mutagenität und Kanzerogenität

Erste Untersuchungen von Dannenberg (1959) zur Kanzerogenität von methylierten Pyrenen auf Mäusehaut im Jahr 1959 ergaben für 1-, 2- und 4-MP, 1,6- und 4,5-DMP, 1,3,6-Trimethylpyren und 1,3,6,8-Tetramethylpyren negative Ergebnisse. Etwa 30 Jahre später erwies sich nach Untersuchungen von Rice u. a. (1987) jedoch 1-MP als komplettes Leberkanzerogen bei neugeborenen männlichen Mäusen. Zwischenzeitlich konnten Flesher und Sydnor (1973) und Cavalieri u. a. (1978) die Mechanismen hinter der Kanzerogenität eines anderen alkPAK, des 6-MBP, aufklären. Flesher und Sydnor zeigten die Bildung von 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren (6-HMBP) aus 6-MBP durch Leberhomogenate der Ratte. Dieser benzyliche Alkohol war nach subkutaner Applikation tumorigen an der Ratte. Cavalieri u. a. bestätigten durch dermale Applikation die lokal kanzerogene Wirkung von 6-HMBP bei der Maus und wiesen auch eine systemische Verteilung durch Tumore in der Lunge und im lymphatischen System nach. Überdies konnte die Bildung von 6-HMBP aus 6-MBP durch murine Lebermikrosomen gezeigt werden.

Erst Arbeiten in den späten 1980er und beginnenden 1990er Jahren setzten sich mit der Mutagenität von alkPAK auseinander. Rice u. a. stellten ein genotoxisches Potential von 1-MP und 1,6-DMP fest, sowie die Mutagenität von 1-MP, 1,3-, 1,6- und 4,9-DMP im Ames-Test nach Aktivierung mit S9-Mix aus Rattenleber (Rice u. a., 1987, 1988). Die Autoren führten diese Mutagenität auf die Bildung von distalen K-Region-Epoxiden beim Auftreten einer Methylgruppe in peri-Position zurück. In Anlehnung an die Überlegungen von Watabe u. a. (1982), dass reaktive elektrophile benzyliche Ester für die Aktivierung verantwortlich sind, zeigten die zuvor bereits beschriebenen Untersuchungen von Glatt u. a. (Abs. 1.3.2), dass die Schwefelsäureester die potenteren Mutagene darstellten. Der indirekte Nachweis über den *in vitro* gebildeten benzylichen Schwefelsäureester als ultimales Mutagen wurde in weiteren Untersuchungen durch Inkubation von 1-SMP im Ames-Test und im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test bestätigt. Eine Vielzahl weiterer Untersuchungen beschäftigte sich mit der Rolle unterschiedlicher Lebercytosole und SULT bei der Aktivierung verschiedenster benzylicher Alkohole. Im Ames-Test erwiesen sich neben dem 1-HMP und 1-SMP auch 2-HMP, 1- und 2- α -HEP sowie 6- und 10-SMBP als mutagen (Glatt u. a., 1995, 1994a,b; Landsiedel u. a., 1996, 1998).

Die Aktivierung der alkPAK stellt an *in-vitro*- sowie an *in-vivo*-Systeme zur Bestimmung von Mutagenität und Kanzerogenität gewisse Anforderungen. So muss die Bildung benzylicher Alkohole und deren Veresterung zu reaktiven benzylichen Schwefelsäureestern möglich sein. Bei *in-vitro*-Untersuchungen ist daher die Anwesenheit von CYP und SULT und deren ausreichende Versorgung mit Cofaktoren notwendig, um positive Ergebnisse erzielen zu können. Bei *in-vivo*-Studien sind zum einen die

Bioverfügbarkeit der Substanzen und zum anderen die Lokalisation der entsprechenden Enzyme sowie die daraus resultierende Organotropie der Tumorbildung zu berücksichtigen. So konnte in Untersuchungen von Glatt u. a. (1994c) die schwach initiierende und stark promovierende Wirkung von 1-HMP an Hand von präneoplastischen Foci (ATPase defizienten Foci) in der Leber von behandelten Ratten nachgewiesen werden. Auch Flesher u. a. (1999) erhielten bei subkutaner Mehrfachapplikation von 1-SMP, 6-HMBP und 6-SMBP positive tumorigene Wirkungen bei Ratten.

1.6 Fragestellung

Die Bedeutung der benzyllischen Hydroxylierung und Sulfonierung für die Bioaktivierung von 1-MP, 1-EP und 6-MBP ist hier bereits dargestellt worden (Abs. 1.3.1 und 1.3.2). Für 1-MP wurde auch der Metabolismus *in vivo* in der Ratte von Ma (2001) untersucht. Die strukturelle Vielfalt der alkPAK und die vielfältigen Modulationsmöglichkeiten des *in-vivo*-Metabolismus lassen jedoch noch einige Fragen offen:

1. Welchen Einfluss haben die Art des Ringsystems sowie die Art und Position der Alkylgruppe auf die benzyllische Hydroxylierung bei verschiedenen Spezies wie Ratte und Mensch? Und welche Aktivitäten weisen die für die 1-MP-Hydroxylierung besonders aktiven humanen CYP1A1, 1A2, 1B1 und 3A4 auf?
2. Welche Folgen hat die Struktur der benzyllischen Schwefelsäureester hinsichtlich ihrer Stabilität und Reaktivität?
3. Welche humanen SULT katalysieren die Bildung von benzyllischen Schwefelsäureestern und welchen Einfluss hat die Art der Alkylgruppe darauf?
4. Welche Charakteristika weisen die Albuminbindung der Schwefelsäureester und ihr Transport durch hOAT auf?
5. Welchen Einfluss *in vivo* haben Nahrungsmittelinhaltsstoffe sowie Umweltkontaminaten und Pharmazeutika, die auf die einzelnen an der Biotransformation beteiligten Enzyme hemmend wirken? Kann hier ein Unterschied in der Ausscheidung von Metaboliten und insbesondere der Mercaptursäure beobachtet werden?

Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit anhand einer Auswahl von zwölf alkylierten PAK (Abb. 1.7) geklärt werden. Ergänzend zu dieser chemisch-analytischen Arbeit, beschäftigte sich Donath (2008) mit der Mutagenität und DNA-Adduktbildung *in vitro* sowie der DNA-Adduktbildung *in vivo*.

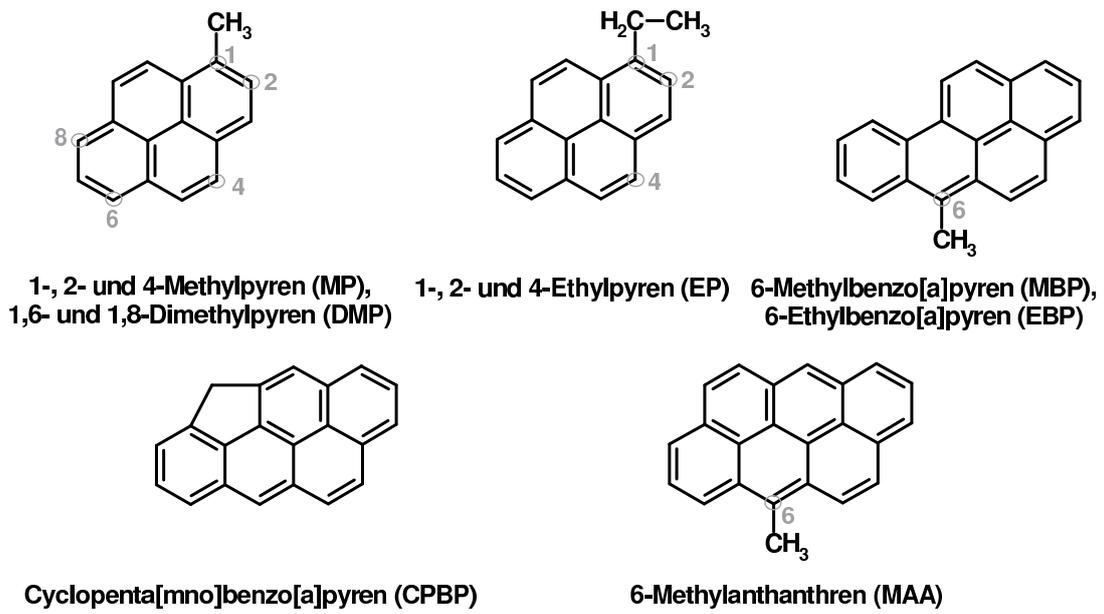


Abbildung 1.7: Strukturformeln zu den in dieser Arbeit untersuchten alkPAK.

2 Ergebnisse

2.1 Benzylische Hydroxylierung von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

2.1.1 Mikrosomen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus Inkubationen der ausgewählten alk-PAK mit mikrosomalen Fraktionen dargestellt.

Lebermikrosomen wurden aus humanen Proben (hL), aus unbehandelten (rL) und Aroclor behandelten (rLA) Ratten gewonnen (Abs. 4.2.1). Die Bildungsraten der jeweiligen benzylischen Alkohole sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Bei den Ethylderivaten wurde nicht zwischen den beiden Enantiomeren des α -HEP und der ω -Verbindung unterschieden. Ergebnisse zur Enantiomeren- und Positionsisomerentrennung werden in Abs. 2.1.3 dargestellt.

Die Inkubationen erfolgten in Anlehnung an Engst u. a. (1999) unter gleichen Bedingungen für alle alk-PAK hinsichtlich Konzentration, Zeit und eingesetzter Proteinmenge (Abs. 4.2.1). Die Umsatzraten, die mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt wurden (Abs. 4.5.1), sind somit nicht optimal hinsichtlich der einzelnen Substrate, jedoch vergleichbar in Bezug auf die Versuchsbedingungen. Die Negativkontrollen (reines DMSO ohne weiteres Substrat, Substrat ohne mikrosomales Protein und Substrat mit mikrosomalem Protein ohne Cofaktoren) wiesen keine Aktivitäten auf.

Der Anteil an benzylischem Alkohol am gesamten Umsatz wurde repräsentativ für 1-MP und 1-EP bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Hierbei wird deutlich, dass die Aroclorinduktion zu einer deutlichen Umsatzsteigerung führt, wenn auch nicht unbedingt zu einem höheren Anteil an benzylischem Alkohol. Diese hohe Umsatzrate war auch der Grund für die kürzere Inkubationszeit von 7 min bei Mikrosomen von Aroclor behandelten Ratten, da bei 30 min – wie sie für rL- und hL-Mikrosomen gewählt wurde – kein Substrat mehr vorhanden war.

Aus den Ergebnissen der mit allen Testsubstanzen durchgeführten Inkubationen ließen sich folgende Trends ablesen:

- Die benzylischen Hydroxylierungsraten für Pyrenderivate waren höher als für Benzo[a]pyrenderivate.

Tabelle 2.1: Bildungsraten für benzyliche Alkohole in Mikrosomeninkubationen von Rattenleber (rL), Rattenleber von Aroclor behandelten Tieren (rLA) und humaner Leber (hL) mit den entsprechenden alkPAK. Die Analyse der über Festphasenextraktion aufgereinigten Inkubationen erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (Abs. 4.2.1, 4.5.1). Die beiden Enantiomeren des α -HEP sowie die ω -Verbindung wurden nicht getrennt bestimmt. Eine detaillierte Analyse hierzu ist in Abs. 2.1.3 zu finden. Die Werte sind Mediane von mindestens drei Messungen mit der Standardabweichung für Mediane normalverteilter Messwerte angegeben in pmol/mg Protein/min.

alkPAK	pmol/mg Protein/min		
	rL	rLA	hL
1-MP	176±20	389±144	15± 2*
1-EP	48± 5	1067±351	13± 3*
1,6-DMP	110± 7	210± 47	100±34***
1,8-DMP	137±32	57± 17	23± 1***
2-MP	77±29	54± 1	18± 2** 7±1***
2-EP	129± 5	308± 72	41± 2.5** 31±5.5***
4-MP	61±20	9± 2	22± 1** 7±2***
4-EP	35± 5	856±184	24± 9** 22±6***
CPBP	24± 4	29± 8	<1
6-MBP	13± 5	4.1± 3,7	1± 0.7**
6-EBP	17± 1	10± 0,3	<1
6-MAA	7± 4	2± 1	n.b.

*Person Nr. 2; ** Person Nr. 4; ***Person Nr. 5 (Nummerierung s. Abs. 4.2.1)

Tabelle 2.2: Prozentuale Anteile der benzylichen Alkohole und übriger Metaboliten an eingesetztem 1-MP und 1-EP in Inkubationen mit rL und rLA. Die Differenz aus eingesetztem Substrat und wiedergefundenem Substrat sowie gebildetem Alkohol ergibt den Prozentsatz übriger Metaboliten. Diese Anteile beziehen sich auf die in Tab. 2.1 aufgeführten Ergebnisse.

alkPAK	rL, %		rLA, %	
	Alkohol	übrige Metaboliten	Alkohol	übrige Metaboliten
1-MP	17	20	2	53
1-EP	4,8	39	6,5	43

- Unter den MP zeigten 1-MP, 1,6- und 1,8-DMP die höchsten Umsatzraten bei den Rattenlebermikrosomen.
- Die insgesamt höchsten Umsatzraten erreichten Mikrosomen Aroclor behandelte Ratten, besonders bei EP- und 1-MP-Derivaten.
- Die humanen Lebermikrosomen wiesen die niedrigsten Hydroxylierungsraten auf, insbesondere bei den Benzo[a]pyrenderivaten waren hier z.T. keine Umsetzungen zu beobachten.

Hinsichtlich der deutlichen Unterschiede zwischen den Hydroxylierungsraten der Pyren- und Benzo[a]pyrenderivate stellte sich im Verlauf dieser Arbeit die Frage, ob die Versuchsbedingungen für die Benzo[a]pyrenderivate ungeeignet waren. Es wurde daher für 6-MBP die Wiederfindung für den benzyllischen Alkohol sowie die Gesamtumsatzrate bestimmt. Desweiteren wurde die maximale Bildungsrate für 6-HMBP bei Variation der Substrat- und Proteinmenge ermittelt. Die Wiederfindung für 6-HMBP betrug $77 \pm 6\%$ bei Inkubation mit Rattenlebermikrosomen ohne Cofaktoren. Für 6-MBP ergab sich bei Inkubation mit Rattenlebermikrosomen von Tieren ohne Aroclorbehandlung eine Wiederfindung von $76 \pm 3\%$ ohne Cofaktoren und mit Cofaktoren von nur noch $29,5 \pm 1\%$. Hieraus errechnete sich eine Gesamtumsatzrate von etwa 46% , wobei der Anteil an 6-HMBP bei $<4\%$ lag. Die ermittelte niedrige Bildungsrate des benzyllischen Alkohols war daher realistisch und nicht auf einen *per se* geringen Metabolismus zurückzuführen. Eine Verringerung der Substratkonzentration von $12\ \mu\text{M}$ auf $1\ \mu\text{M}$, um mögliche Löslichkeitsprobleme auszuschließen, und eine Variation der Proteinmenge ergab für 6-HMBP eine maximale Bildungsrate von $27 \pm 2\ \text{pmol/mg/min}$ bei $25\ \mu\text{g}$ mikrosomalem Leberprotein von nicht behandelten Ratten. Die Inkubationszeit wurde bei allen Messungen bei 30 Minuten belassen. Gegenüber den nicht optimierten Versuchsbedingungen ergab sich eine marginale Erhöhung des Umsatzes von $15 \pm 4\ \text{pmol/mg/min}$ auf $27 \pm 2\ \text{pmol/mg/min}$, der jedoch noch immer deutlich unter den Umsatzraten für die Pyrenderivate lag. Mit diesen Ergebnissen der Untersuchungen zur Eignung der Versuchsbedingungen für Benzo[a]pyrenderivate wurde der Trend untermauert, dass alkylierte Benzo[a]pyrenderivate schlechter benzyllisch hydroxyliert werden als die alkylierten Pyrene.

2.1.2 Zellkultur

Die Umsatzraten der Mikrosomen aus humanen Leberproben waren bei allen untersuchten alkPAK niedriger als die der Rattenlebermikrosomen. Aktivitäten waren zumindest mit den Pyrenderivaten auch mit Humanlebermikrosomen gut messbar. Der Einfluss der Aroclorinduktion bei den Rattenlebermikrosomen deutete auf die Beteiligung von induzierbaren Enzymen wie CYP1A1 bei der benzyllischen Hydroxylierung

hin. Es war daher von besonderem Interesse zu erkennen, welche humanen Enzyme in welchem Umfang zur Hydroxylierung der alkPAK beitragen. Die Untersuchungen hierzu wurden an lebenden V79-Zellen, die die entsprechenden CYP heterolog exprimieren, durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die vier bezüglich ihrer Bildung von benzyllischen Alkoholen vermutlich bedeutendsten Enzyme hCYP1A1, 1B1, 3A4 und 1A2 ausgewählt und mit 1-, 2- und 4-MP, 1-, 2- und 4-EP und 1,6-DMP inkubiert. Diese Ergebnisse sind in Tab. 2.3 zu sehen. Die Substratkonzentration von 1 μ M ist nach Untersuchungen zur Zytotoxizität von 2-MP an V79-hCYP1A1 Zellen mittels [3 H]Thymidin-Einbau festgelegt worden (Abs. A). Hierbei erwiesen sich die bei den Untersuchungen von Engst u. a. (1999) verwendeten 10 μ M bereits als zytotoxisch. Die Inkubationszeiten sind dem z.T. sehr schwankenden Zellwachstum angepasst worden, so dass sie bei 1-MP 4 h, 1-, 2- und 4-EP 8 h und 1,6-DMP 24 h betragen. Eine bis zu 10-stündige Inkubation von 2- und 4-MP ergab keine Bildung der entsprechenden benzyllischen Alkohole, wobei Positivkontrollen mit 1-MP die Versuchsbedingungen absicherten.

Tabelle 2.3: Bildungsraten der jeweiligen benzyllischen Alkohole aus den aufgeführten alkPAK in hCYP-profizienten V79-Zellen mit einer Substratkonzentration von 1 μ M. Die Inkubationszeiten betragen bei 1-MP 4 h, bei 1-, 2- und 4-EP 8 h und bei 1,6-DMP 24 h. Die 10-stündigen Inkubationen von 2- und 4-MP ergaben keine Alkoholbildung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Doppelbestimmungen mit Range.

Zelllinie	pmol/10 ⁶ Zellen/4 h				
	1-MP	1-EP	2-EP	4-EP	1,6-DMP
V79 hCYP1A1	14±1	73±10	44±15	78±10	17±1
V79 hCYP1A2	2±1	12±0,4	8±5	7±2	0,6±0,2
V79 hCYP3A4	7±1	59±12	< 0,5±8	2±0,2	0,1
V79 hCYP1B1	27±4	82±3	68±35	71±20	1,2±0,6

2.1.3 Hydroxyethylpyrene: Positionsisomeren- und Enantiomerenbildung

Bei der benzyllischen Hydroxylierung von EP kann sowohl der primäre ω -Alkohol als auch der sekundäre α -Alkohol gebildet werden. Der α -Alkohol hat mit dem benzyllischen Kohlenstoff ein chirales Zentrum. Aufgrund der Stereoselektivität einiger konjugierender Enzyme wie beispielsweise der hSULT1E1 oder 2A1 ist eine mögliche stereoselektive Bildung der HEP von Bedeutung (Landsiedel u. a., 1998; Sheng und Duffel, 2003).

Einige Proben aus Inkubationen der drei EP mit den verschiedenen Mikrosomenarten wurden zur Analyse der gebildeten Positionsisomere und Enantiomere einer Trennung mittels einer chiralen HPLC-Säule unterworfen. Die Bildung des ω -Alkohols konnte dabei aufgrund fehlender Standards von 2- und 4- ω -HEP lediglich für 1- ω -HEP untersucht werden. In keiner der analysierten Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen oder humanen Lebermikrosomen wurde 1- ω -HEP nachgewiesen. Für die α -HEP-Enantiomere wurden die in Tab. 2.4 aufgeführten Enantiomerenüberschüsse beobachtet. Eine deutliche Stereoselektivität zugunsten des (+)-Enantiomers ergab sich bei Ratte wie Mensch für 2- und 4- α -HEP. Dies war für 1- α -HEP nicht der Fall: rL ergab einen leichten Überschuss an (-)-1- α -HEP, hL umgekehrt einen für (+)-1- α -HEP und eine Aroclorinduktion führte bei der Ratte zu einem deutlichen Überschuss des (+)-Enantiomers.

Tabelle 2.4: Ergebnisse der Enantiomeren-trennungen für 1-, 2- und 4- α -HEP von jeweils einer repräsentativen Probe der verschiedenen Mikrosomenarten. Die Auftrennung erfolgte mittels chiraler HPLC und Fluoreszenzdetektion (Abs. 4.5.2).

verwendete Mikrosomen	Enantiomer	Enantiomerenüberschuss, %
rL	(-)-1- α -HEP	60
rLA	(+)-1- α -HEP	87
hL	(+)-1- α -HEP	55
rL	(+)-2- α -HEP	> 99
rLA	(+)-2- α -HEP	> 99
hL	(+)-2- α -HEP	89
rL	(+)-4- α -HEP	> 99
rLA	(+)-4- α -HEP	> 99
hL	(+)-4- α -HEP	> 99

2.2 Stabilität und Bildung benzylischer Schwefelsäureester

2.2.1 Halbwertszeiten

Die Halbwertszeiten der Schwefelsäureester der in dieser Arbeit verwendeten benzylischen Alkohole wurden in reinem Wasser mit 1% Dimethylsulfoxid (DMSO) über HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt, soweit keine anderen Angaben gemacht werden (Abb. 2.1, Abs. 4.2.3). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 2.5 dargestellt.

In Abhängigkeit von den Positionen der Alkylsubstituenten in Pyrenderivaten war die Reaktivitätsfolge: 1>4>2. Die Sulfoxyethylpyrene (SEP) waren insgesamt reaktiver

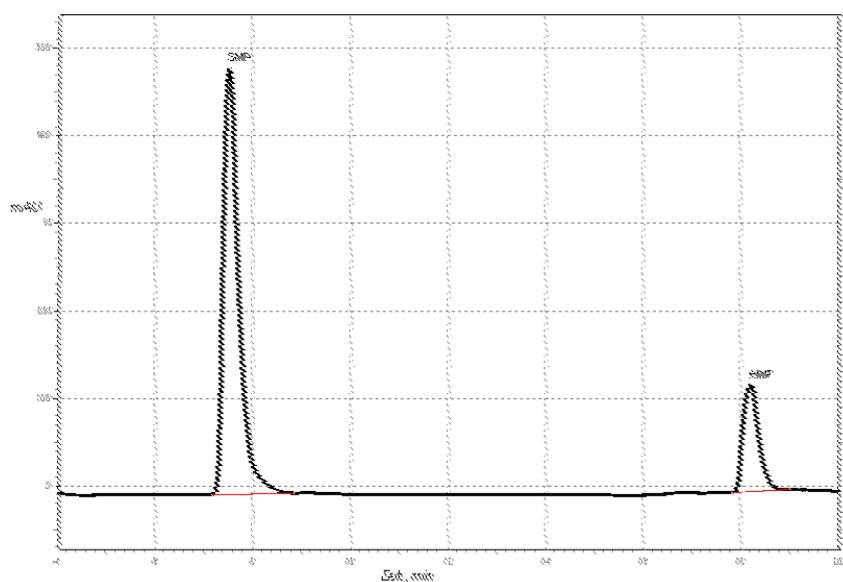


Abbildung 2.1: Ausschnitt aus einem HPLC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Standards mit je 400 nM 2-SMP und 2-HMP. Die Retentionszeiten betragen 7,5 bzw. 18,2 min. Die Chromatographiemethode ist in Abs. 4.5.3 beschrieben.

Tabelle 2.5: Halbwertszeiten benzylischer Schwefelsäureester der alkPAK in Wasser. Die Lösungen enthielten 1 oder 10 % DMSO und wurden über HPLC mit Fluoreszenzdetektor oder über Massenspektrometrie vermessen. Die Temperatur wurde bei sehr niedrigen Halbwertszeiten aus methodischen Gründen auf 20 °C gesenkt (Abs. 4.2.3).

Substanz	T, °C	t _{1/2}
1-SMP ^{a,c}	37	5,2 min
2-SMP ^{b,c,e}	37	> 6 Tage
4-SMP ^{b,c}	37	67 h
1- α -SEP ^{a,d}	20	1,7 min
2- α -SEP ^{a,c}	37	72 min
4- α -SEP ^{a,c}	37	12 min
1-SM-6-MP ^{b,d}	20	1,9 min
1-SM-8-MP ^{b,c}	37	2 min
6-SMBP ^{b,d}	20	1,2 min
6- α -SEBP ^{b,d}	20	2 min
10-SMBP ^{b,c}	37	56 min

^a 10 % DMSO

^b 1 % DMSO

^c mittels HPLC-Fluoreszenz bestimmt

^d mittels MS bestimmt

^e kein Zerfall über 6 Tage

als die homologen Methylpyrenester. Für die Alkylbenzo[a]pyrensulfate zeigte die Position 6 eine höhere Reaktivität als Position 10.

2.2.2 Sulfonierung benzylischer Alkohole durch humane Sulfotransferasen

In der vorliegenden Arbeit wurden alle elf derzeit bekannten hSULT-Formen (Abs. 1.3.2 und Tab. 1.4) auf ihre Fähigkeit 2-HMP und 2- α -HEP zu sulfonieren untersucht. Diese beiden benzylischen Alkohole werden zu Schwefelsäureestern umgesetzt, deren Stabilität eine einfache Messung der Sulfonierungsaktivität ermöglicht. Hierzu wurden Cytosole aus hSULT profizienten *S. typhimurium* TA1538(a), PAPS und die benzylischen Alkohole inkubiert und die Überstände der Inkubationen nach Abstoppen der Reaktion mittels HPLC-Fluoreszenz analysiert. Die verwendeten Methoden sind in Abs. 4.2.4 und 4.5.3 beschrieben. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 2.6 aufgeführt. Für die Bildung der Schwefelsäureester ergab sich mit abnehmender maximaler Aktivität:

2-SMP: hSULT1C2 \gg 1E1 > 1A2 \approx 1A1 > 1C1 \approx 2A1 > 1A3 \gg 1B2

2- α -SEP: hSULT1A2 \gg 1E1 \approx 1A1 > 1C1 > 2A1 > 1C2 > 1A3 \gg 1B2

Insgesamt waren mit Ausnahme von hSULT1A2, die für 2- α -SEP deutlich höhere Bildungsraten aufwies, und hSULT1B1, die ähnliche Bildungsraten zeigte, alle Sulfonie-

rungsraten von 2-HMP höher als von 2- α -HEP. Die größten Unterschiede hinsichtlich der maximalen Aktivität zeigten hSULT1A2 und 1C2. Die Sulfonierung von 2-HMP erfolgte durch hSULT1C2 42-fach stärker als die von 2- α -HEP, die hSULT1A2 war bei der Sulfonierung von 2- α -HEP dreieinhalbfach aktiver. Bei hSULT1C1 und 1E1 war ein Affinitätsunterschied zu verzeichnen, da hSULT1E1 für 2-SMP bereits bei 1,6 μ M, für 2- α -SEP allerdings erst bei 50 μ M die maximale Bildungsrate aufwies; für hSULT1C1 war die maximale Aktivität bei 2-HMP bei einer Inkubation von 50 μ M höher als die von 2- α -HEP, die jedoch schon bei 10 μ M erreicht wurde. Hieraus konnte gefolgert werden, dass hSULT1C2 und 1E1 die dominanten Formen für die Bildung des Sulfoxymethylpyrens waren. Für die Bildung des Ethylderivates waren hSULT1A2, 1E1 und 1A1 die wichtigsten Formen.

2.3 Transport benzylischer Schwefelsäureester

2.3.1 Albuminbindung

In Zusammenarbeit mit Hübel (2007) wurde mittels Gleichgewichtsdialyse für die Bindung von 2-SMP an Rinderserumalbumin (BSA) eine Dissoziationskonstante von $0,059 \cdot 10^{-6}$ M bestimmt. Dies weist die Bindung von 2-SMP an BSA als hoch affin aus. Interaktionsversuche mit Probenecid und DHEA-S ergaben nur für DHEA-S einen Einfluss auf die Gleichgewichtslage sowie die Bindungskapazität. Die Zugabe von Probenecid hatte keinen Effekt. Aufgrund von Ergebnissen in Vorversuchen, die keinen Unterschied zwischen humanem Serumalbumin und BSA zeigten, wurden alle Versuche letztlich mit BSA durchgeführt.

Desweiteren wurde mittels Fluoreszenzanalyse eine Dissoziationskonstante von $18 \cdot 10^{-6}$ M bestimmt. Aufgrund des methodisch notwendigen Überschusses an 2-SMP gegenüber BSA handelte es sich hierbei um eine weitere, niedrig affine Bindungsstelle.

2.3.2 Zelluläre Aufnahme über humane organische Anionentransporter

Zur Untersuchung, ob die benzylischen Schwefelsäureester Substrate für OAT1, 3 und 4 darstellen, wurden rekombinante Zellen der humanen epithelialen Nierenzelllinie T-REx HEK293-hOAT1/3/4 verwendet (Abs. 4.2.5). Die Wechselwirkungen der Sulfate mit den jeweiligen Transportern können mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden:

- Hemmung der Aufnahme von radioaktiv markierten Standardsubstraten wie [Glycyl-2- 3 H]*p*-Aminohippurat und [6,7- 3 H(N)]Estronsulfat für hOAT1 bzw. hOAT3 und 4.

Tabelle 2.6: Bildung von 2-SMP und 2- α -SEP in Inkubationen (15 min) mit hSULT profizienten *S. typhimurium*-Cytosolen (75 μ g), den entsprechenden benzyllischen Alkoholen sowie 50 mM TRIS-Puffer (pH 7,0) mit 50 μ M PAPS und 5 μ M Magnesiumchlorid. Dargestellt sind die Bildungsraten bei den entsprechenden Substratkonzentrationen bezogen auf den SULT-Proteingehalt im Cytosol nach Meinel u. a. (2006) jeweils als Mittelwert einer Doppelbestimmung. Folgende Enzyme zeigten bei den getesteten Konzentrationen von 1,6; 10; 50 μ M keine messbaren Aktivitäten: hSULT1C3, 2B1a/b und 4A1.

hSULT	c, μ M	pmol/mg/min	
		2-SMP	2- α -SEP
1A1	50	11400	18400
	10	22800	3600
	1,6	12600	0
1A2	50	26800	74800
	10	26300	95000
	1,6	15200	0
1A3	50	14000	4900
	10	3500	0
	1,6	0	0
1B1	50	300	500
	10	400	200
	1,6	0	0
1C1	50	18600	8000
	10	16000	10900
	1,6	8400	6500
1C2	50	281000	6600
	10	142600	1900
	1,6	16900	0
1E1	50	8800	19300
	10	24200	0
	1,6	52900	0
2A1	50	9200	6600
	10	18200	8800
	1,6	2000	300

- Quantitativer Nachweis von DNA-Addukten in behandelten Zellen mittels ^{32}P -Postlabeling, besonders bei der Verwendung instabiler Isomere wie 1-SMP.
- Quantitativer Nachweis der Schwefelsäureester in Zelllysaten mittels HPLC-Fluoreszenz, nur geeignet bei stabileren Isomeren wie 2- und 4-SMP.

Die Experimente zu diesem Projektteil wurden in Zusammenarbeit mit BAKHIYA und HÜBEL durchgeführt. Sie waren für die Zellkultur und das ^{32}P -Postlabeling zuständig. Die eigene Arbeit bestand in der Durchführung der HPLC-Analysen.

Eine Interaktion von 2- und 4-SMP mit den Transportproteinen konnte durch die Reduktion der Aufnahme der radioaktiven Standardsubstrate (hOAT1: [Glycyl-2- ^3H]-*p*-Aminohippurat, hOAT3 und 4: [6,7- ^3H (N)]Estronsulfat) bis auf das Niveau der entsprechenden Kontrollzellen ohne Transporterexpression nachgewiesen werden. Eine kinetische Analyse ergab für alle drei Transporter eine kompetitive Hemmung durch 4-SMP und K_i -Werte von hOAT1 5,1 μM und hOAT3 sowie hOAT4 1,9 μM .

Zum Nachweis eines aktiven Transports wurden in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zum Einen die DNA-Addukte, zum Anderen die absoluten intrazellulären Konzentrationen zwischen Transporter exprimierenden Zellen und Kontrollzellen verglichen. Hierbei zeigte sich für 1-SMP (10 μM) bei hOAT1 ein vierfach und bei hOAT3 ein dreifach höheres DNA-Adduktniveau, welches sich durch Zugabe des klassischen OAT-Inhibitors Probenecid auf die Höhe der Kontrollzellen reduzierte. Die Bestimmung der intrazellulären 4-SMP Konzentrationen ergab gegenüber den Kontrollen für hOAT1 dreifach, für hOAT4 zweieinhalbfach und für hOAT3 anderthalbfach höhere Werte. Diese Substanzaufnahme in die Zellen konnte wiederum durch die Zugabe von Probenecid auf das Maß der Kontrollzellen reduziert werden (Tab. 2.7, Daten zu hOAT4 bisher unveröffentlicht) (Bakhiya u. a., 2006).

Weiterhin wurde die Aufnahme von 2-SMP in hOAT1-profiziente Zellen in Gegenwart von BSA durch Hübel (2007) untersucht. Hierbei konnte in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration eine Reduktion der Aufnahme beobachtet werden, die der Aufnahme der berechneten freien Konzentration entsprach. Die freie Konzentration wurde unter Annahme einer Dissoziationskonstanten von $0,059 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ nach Friedhoff (2006) berechnet.

2.4 Metabolismus in vivo

2.4.1 Substratauswahl für in-vivo-Untersuchungen

Die Analyse des Metabolismus von alkPAK in vivo in der Ratte wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch mit 1-HMP und 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren (1-HM-8-MP) durchgeführt, die aufgrund folgender Kriterien ausgewählt worden sind:

Tabelle 2.7: Aufnahme von 4-SMP in hOAT-profiziente T-REx HEK293-Zellen. Die Zellen wurden für 15 min mit 10 μ M 4-SMP inkubiert, anschließend gewaschen und lysiert und das Lysat mittels HPLC-Fluoreszenz untersucht (Abs. 4.2.5 und 4.5.3). Aufgeführt sind die relativen Aufnahmen im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen mit und ohne Hemmung durch Probenecid (1 mM). Der absolute Wert für die Aufnahme an 4-SMP in Kontrollzellen betrug 380 ± 65 pmol/mg Protein/15 min. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten (Bakhiya u. a., 2006), (Daten zu hOAT4 bisher unveröffentlicht).

Zelllinie	relative Aufnahme von 4-SMP, %	
	ohne Probenecid	mit Probenecid
Kontrollzellen	100	
hOAT1	295 ± 48	120 ± 24
hOAT3	166 ± 22	108 ± 11
hOAT4	265 ± 31	130 ± 15

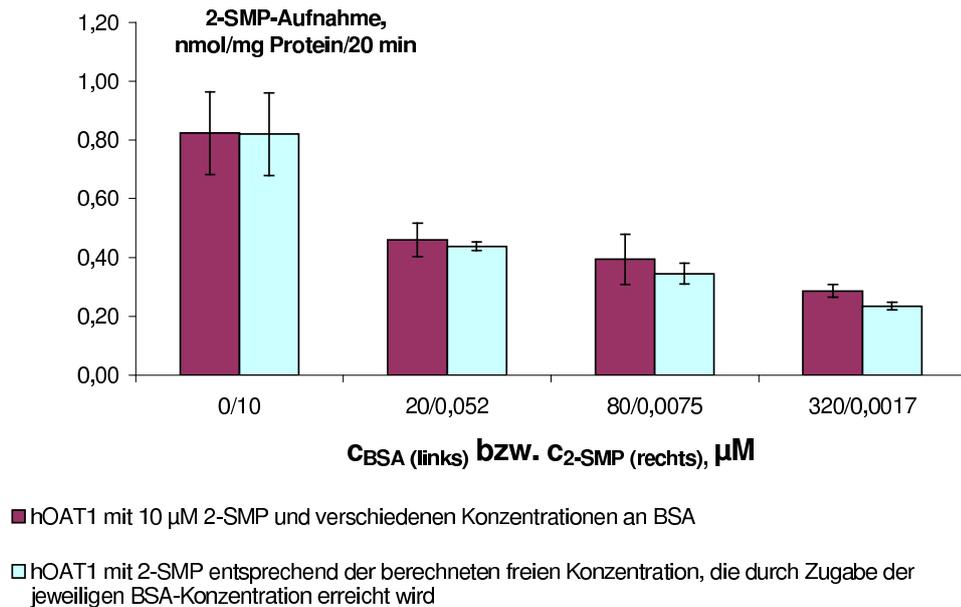


Abbildung 2.2: Aufnahme von 2-SMP in hOAT1 profiziente T-REx HEK293-Zellen in Abhängigkeit von BSA. Die Zellen wurden zum Einen mit 10 μM 2-SMP in Gegenwart von 0, 20, 80 und 320 μM BSA inkubiert (links), zum Anderen wurden die aufgrund der Dissoziationskonstante zu erwartenden freien 2-SMP-Konzentrationen bei den entsprechenden BSA-Konzentrationen berechnet und die Zellen mit diesen inkubiert (rechts; 10, 0,52, 0,0075, 0,0017 μM). Die Inkubation allgemein und die Analyse der intrazellulären 2-SMP-Konzentration erfolgte wie in Tab. 2.7 bzw. Abs. 4.2.5 und 4.5.3 beschrieben. Dargestellt ist hier die Aufnahme von 2-SMP als Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung. (Hübel, 2007)

1. In den in-vitro-Untersuchungen zeigten diese benzylichen Alkohole die höchsten Bildungsraten bei unbehandelten Rattenlebermikrosomen (1-HMP 176 pmol/mg/min, 1-HM-8-MP 137 pmol/mg/min, Tab. 2.1).
2. In den untersuchten Matrices können die entsprechenden alkPAK 1-MP und 1,8-DMP nachgewiesen werden, so dass von einer humanen Exposition ausgegangen werden kann (Tab. 1.1).
3. Die benzylichen Schwefelsäureester 1-SMP und 1-SM-8-MP weisen niedrige Halbwertszeiten (1-SMP 5,2 min, 1-SM-8-MP 2 min bei 37 °C, Tab. 2.5) und hohe Mutagenitäten im Ames-Test auf (1-SMP 250 Revertanten/nmol, 1-SM-8-MP 1200 Revertanten/nmol, Tab. 3.2). Daher ist von einer genotoxischen Gefährdung durch die Exposition gegenüber diesen Substanzen auszugehen.

2.4.2 Metabolismus von 1-Hydroxymethylpyren

Der benzyliche Alkohol 1-HMP des alkPAK 1-MP wurde intraperitoneal, gelöst in DMSO mit einer Dosis von 83,3 µM/kg KM an männliche adulte Ratten verabreicht (Abs. 4.3). Die Einzelhaltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen ermöglichte die Sammlung von Urin und Fäzes. Diese Proben wurden auf ihr Metabolitenspektrum sowie auf den Gehalt an 1-MPMA und 1-PCS untersucht.

Metabolitenspektrum

Das typische Metabolitenspektrum einer 24 h-Urinprobe einer 1-HMP behandelten Ratte ist in Abb. 2.3 dargestellt. Die schwarz ausgefüllten Peaks des Chromatogramms weisen auf ein Pyrenchromophor im UV-Spektrum hin und wurden in die Quantifizierung einbezogen. Bei dieser Quantifizierung über die UV-Signalstärke bei 245 nm dominieren zwei Metaboliten mit einem Anteil von jeweils 30 % das Metabolitenspektrum.

Bei dem Metaboliten mit einer Retentionszeit von 4,40 min handelt es sich um 1-PCS. Ihr Nachweis erfolgte mittels Massenspektrometrie sowohl im negativen wie im positiven Elektrospray-Ionisationsmodus. Bei einer negativen Ionisation erhielt man das deprotonierte Molekül $[M - H]^-$ mit einer Masseladungszahl von m/z 245 (Abb. 2.4). Dessen CID-Analyse ergab das Produkt-Ion von m/z 201. Der Massenverlust von m/z 44 ist charakteristisch für Carbonsäuren. Bei der positiven Ionisation erfolgte eine „In-Source“-Fragmentierung, bei der Wasser abgespalten wurde und ein Ion $[M+H^+ - H_2O]^+$ mit m/z 229 entstand. Diese Fragmentierung ist in Abb. 2.5 schematisch dargestellt.

2 Ergebnisse

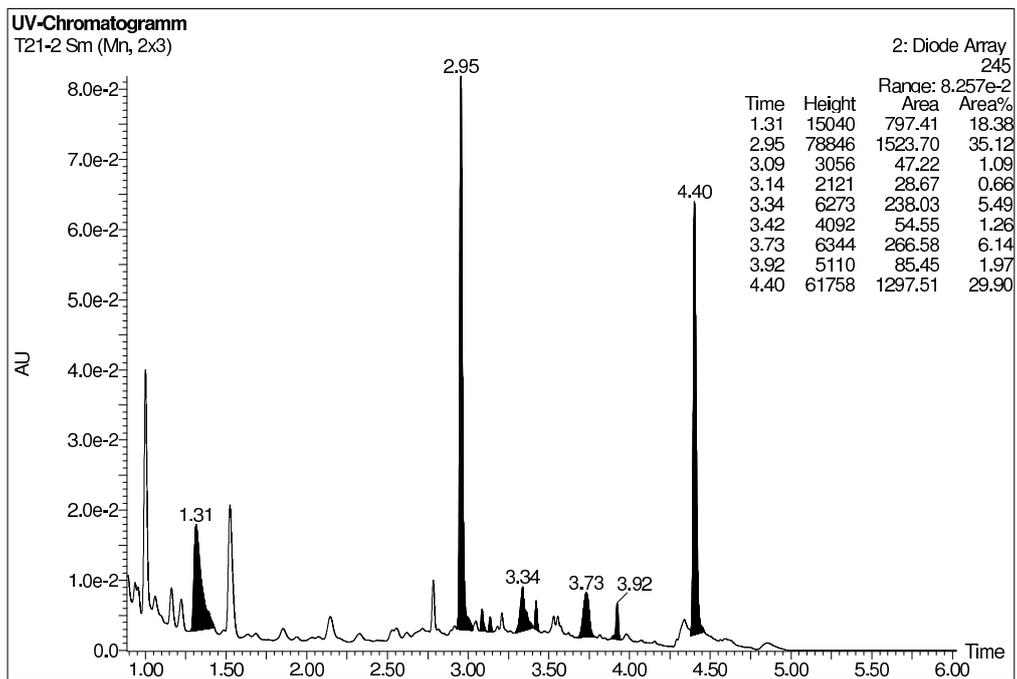


Abbildung 2.3: UV-Chromatogramm bei 245 nm einer Rattenurinprobe. Dem Tier wurden $83,3 \mu\text{mol/kg}$ KM 1-HMP i.p. appliziert (Abs. 4.3), der Urin über 24 h gesammelt und 1 zu 10 verdünnt mit der Methode aus Abs. 4.5.5 vermessen.

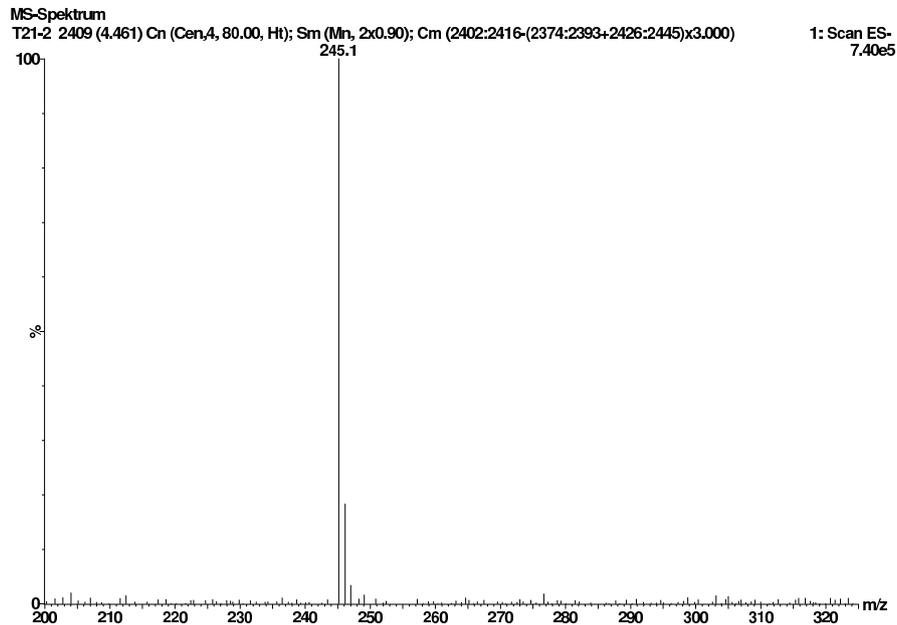
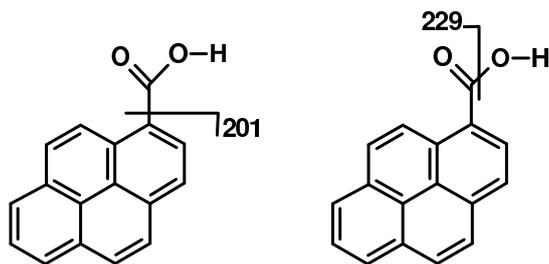


Abbildung 2.4: MS-Spektrum des Metaboliten mit R_t 4,40 min (1-PCS) im negativen Elektrospraymodus. Bei der Urinproben handelt es sich um 24-Stunden Urin einer mit $83,3 \mu\text{mol/kg}$ KM 1-HMP behandelten Ratte, der 1 zu 10 verdünnt wurde und nach der Methode in Abs. 4.5.5 mit den MS-Einstellungen in Tab. 4.2 vermessen wurde.

Abbildung 2.5:

Fragmentierungsstellen bei negativer (links) bzw. positiver (rechts) Elektrosprayionisation von 1-PCS ($u=246$).



Das deprotonierte Molekül des bei 2.95 min eluierenden Metaboliten wies eine Masseladungszahl von m/z 341 auf. Als weitere Fragmente aus diesem Molekülion ergaben sich: m/z 297, 261, 217 und 80 (Abb. 2.6). In Analogie zu den Ergebnissen von Ma (2001) kann angenommen werden, dass es sich bei diesem Metabolit um einen Schwefelsäureester eines Ringhydroxylierungsprodukts der 1-PCS handelt. Eine schematische Darstellung der Fragmentierung ist in Abb. 2.7 zu sehen.

1-Methylpyrenylmercaptursäure, 1-MPMA

Der Nachweis der 1-MPMA aus Urin und Fäzes erfolgte nach Extraktion und Aufkonzentrierung durch eine Festphasenextraktion (Abs. 4.4.2) mittels UPLC-MS/MS mit „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) im negativen Modus (Abs. 4.5.6). Hierbei wurde parallel die Entstehung zweier Produkt-Ionen zur Identifizierung herangezogen. Das deprotonierte Molekül $[M - H]^-$ trug die Masseladungszahl m/z 376. Nach dem für Mercaptursäuren charakteristischen Neutralverlust der *N*-Acetyl-2-aminopropionsäure (m/z 129), erhielt man als Produkt-Ion m/z 247. Eine Abspaltung der gesamten Seitenkette, des *N*-Acetyl-*S*-methylcysteins, führte zum zweiten aufgezeichneten Produkt-Ion, dem Pyrenylion (m/z 201). Diese Fragmentierung ist in Abb. 2.8 schematisch dargestellt.

Die Wiederfindung in Urin- und Fäzesproben betrug nach der in Abs. 4.4.2 beschriebenen Festphasenextraktion 91 % bzw. 95 %. Die Nachweisgrenze der gesamten Methode lag bei jeweils 10 ppb in Urin oder Fäzes.

In einem Vorversuch wurde der Urin von 1-HMP behandelten Tieren in verschiedenen Zeitspannen gesammelt. Tab. 2.8 stellt den zeitlichen Verlauf der 1-MPMA-Ausscheidung dar. Es zeigte sich, dass 96 % der über 72 h nach Applikation gefundenen Menge innerhalb der ersten 24 h ausgeschieden wurde. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Ma (2001). Für die weiteren Analysen wurde daher der Urin der ersten 24 h nach 1-HMP-Gabe gesammelt.

Innerhalb der ersten 24 h wurden bei den vier in die Auswertung einbezogenen Ratten im Mittel 177 ppm des applizierten 1-HMP in Form der Mercaptursäure ausgeschieden (Tab. 2.9). Auch diese Daten entsprechen den Ergebnissen von Ma (2001). Der größere Anteil (ca. 70 %) wurde über die Niere in den Urin sekretiert.

Eines der fünf behandelten Tiere konnte nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da es während des Versuches nichts gefressen hatte, obwohl Futter zur Verfügung stand. Die zum Teil recht großen Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren (bis zu Faktor 6 bei den Urinproben) sind nicht ohne Weiteres zu erklären. Die Wiederfindung sowie die Standards bei der Messung ergaben keinen Anlass zur Beanstandung und auch aus den Beobachtungen der Tiere sowie den Befunden bei der Sektion konnten hierzu keine Schlüsse gezogen werden. Es muss daher davon ausgegangen

2 Ergebnisse

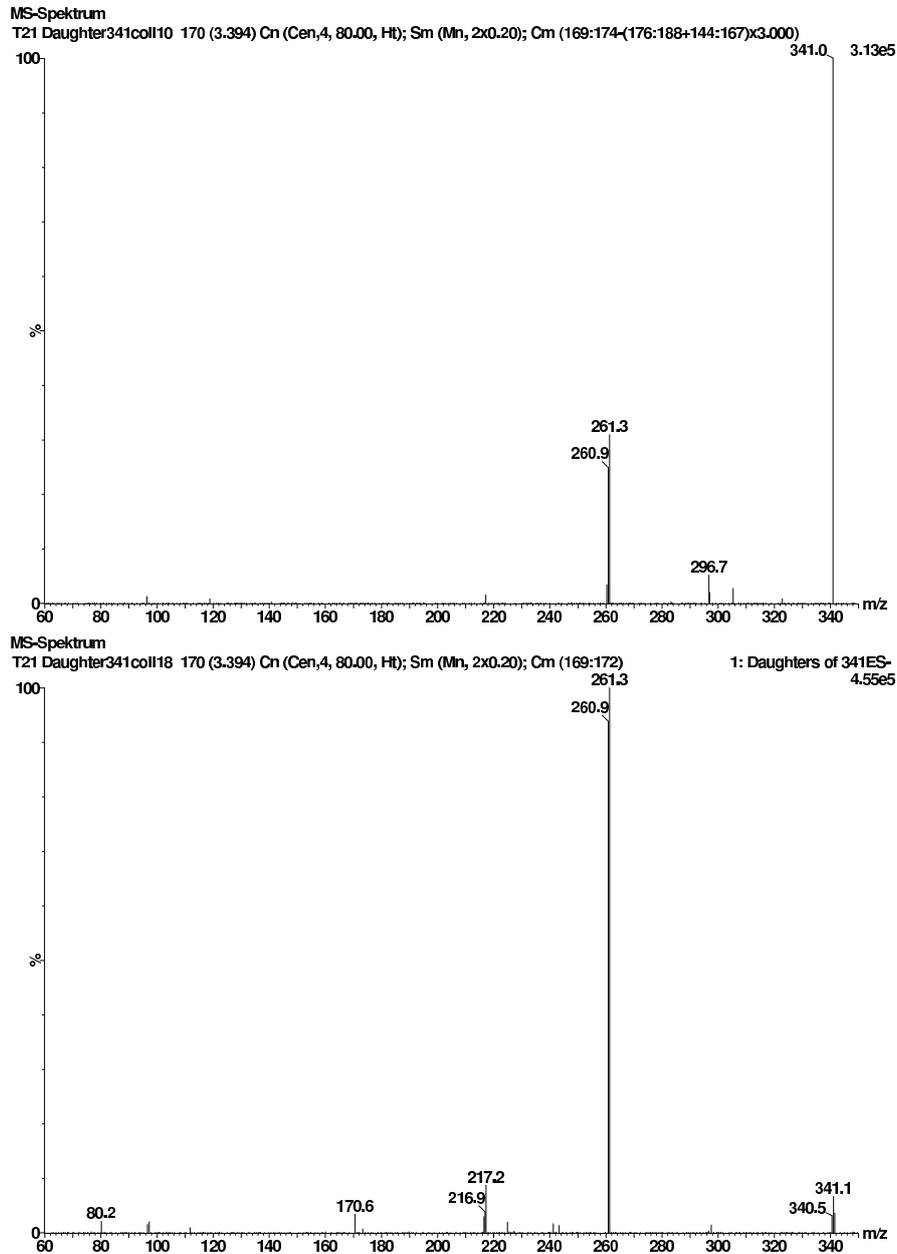


Abbildung 2.6: Produkt-Ionenscans von m/z 341 mit Kollisionsenergien von 10 eV (oben) und 18 eV (unten) im negativen Elektrospraymodus. Als Probe wurde eine 24-Stunden Urinprobe einer mit $83,3 \mu\text{mol/kg}$ KM 1-HMP behandelten Ratte verwendet, die 1 zu 10 verdünnt wurde und nach der Methode in Abs. 4.5.5 mit den MS-Einstellungen in Tab. 4.2 vermessen wurde.

Abbildung 2.7:

Fragmentierungsstellen des phenolischen Schwefelsäureesters der 1-PCS ($u=342$) bei negativer Elektrosprayionisation.

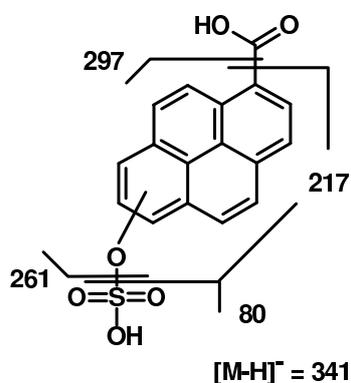


Abbildung 2.8:

Fragmentierungsstellen der 1-MPMA ($u=377$) bei negativer Elektrosprayionisation.

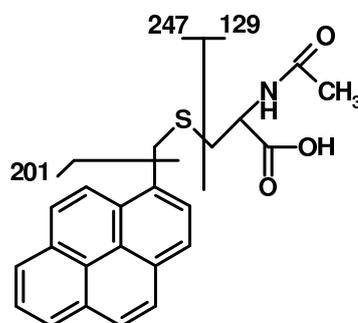


Tabelle 2.8: Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung von 1-MPMA im Urin nach Applikation von 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM bei einer Ratte (Abs. 4.3, Analysemethoden Abs. 4.4.2, 4.5.6 und Tab. 4.2).

Zeit, h	1-MPMA, μmol	1-MPMA-Anteil an applizierter Dosis, ppm	Anteil an gesamter 1-MPMA-Ausscheidung, %
0-8	0,00218	151	39
8-24	0,00318	221	57
24-32	0,00009	6	1,6
32-48	0,00003	2	0,5
48-52	0,00004	3	0,8

Tabelle 2.9: Ausscheidung von 1-MPMA innerhalb von 24 h nach Verabreichung von 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM 1-HMP. Dargestellt sind die Ergebnisse ausgedrückt in ppm der Dosis von 1-HMP für vier einzelne Ratten. Die Tierhaltung ist in Abs. 4.3, die Analysemethoden in Abs. 4.4.2 und 4.5.6 sowie Tab. 4.2 beschrieben.

Tier, Nr	Fäzes, ppm	Urin, ppm	Gesamt, ppm	Fäzes, %	Urin, %
21	39,6	43,0	82,6	48,0	52,0
22	19,9	314,0	333,9	6,0	94,0
23	57,3	151,0	208,3	27,5	72,5
24	26,5	56,7	83,2	31,9	68,1

werden, dass diese Schwankungen entweder durch unterschiedliche Bioverfügbarkeit der Substanz oder interindividuellen Unterschiede hervorgerufen wurden. Bei den Ergebnissen von Ma (2001) traten sowohl bei den Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf als auch bei Untersuchungen mit Modulatoren bei der renalen Ausscheidung von 1-MPMA bei männlichen Ratten interindividuelle Schwankungen bishin zu einem Faktor von Zehn auf.

1-Pyrenylcarbonsäure, 1-PCS

Die 1-PCS stellt, wie bereits zuvor erwähnt, einen der beiden Hauptmetaboliten im Urin dar. Ihr Anteil an den Metaboliten mit Pyrenchromophor im Urin beträgt im Mittel über 24 h 30 %, wie aus dem Chromatogramm in Abb. 2.3 ersichtlich ist. Die Daten aus Tab. 2.10 zeigen, dass durchschnittlich 1,8 % der applizierten 1-HMP-Dosis in 24 h als 1-PCS über den Urin ausgeschieden werden.

Tabelle 2.10: Ausscheidung von 1-PCS im Urin der ersten 24 h nach Applikation von 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM 1-HMP bei vier Ratten. Die Tierhaltung ist in Abs. 4.3, die Analysemethoden in Abs. 4.4.1 und 4.5.5 sowie Tab. 4.2 beschrieben.

Tier	1-PCS, μmol	% der Dosis
21	0,191	1,5
22	0,305	2,4
23	0,275	2,2
24	0,083	0,6

2.4.3 Metabolismus von 1-Hydroxymethyl-8-methylpyren

Der benzyliche Alkohol 1-HM-8-MP wurde ebenso wie 1-HMP intraperitoneal, gelöst in DMSO mit einer Dosis von 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM an männliche, adulte Ratten verabreicht (Abs. 4.3). Die Probensammlung und -analyse erfolgte analog zu den mit 1-HMP behandelten Tieren (Abs. 2.4.2).

Metabolitenspektrum

Wie Abb. 2.9 zeigt, wurden die über den Urin ausgeschiedenen Metaboliten des 1-HM-8-MP von der im Folgenden näher charakterisierten Verbindung mit einer Retentionszeit von 3,68 min dominiert. Diese Verbindung machte bei 245 nm knapp 70 % der Metaboliten aus, die ein Pyrenchromophor aufweisen. Diese sind in Abb. 2.9 als schwarz hinterlegte Signale dargestellt.

Charakterisierung des Metaboliten mit R_t 3,68 min

Das Signal bei 3,68 min des UV-Chromatogramms eines 1-HM-8-MP behandelten Tieres (Abb. 2.9) wies bei negativer Elektrosprayionisation ein deprotoniertes Molekül mit m/z 275 auf, ein Produkt-Ionenscan im negativen Modus ergab ein Produkt-Ion mit m/z 231. Der Verlust von m/z 44 deutet auf eine Carbonsäure hin. Im positiven Elektrosprayionisationsmodus wurde ein protoniertes Molekül mit m/z 259 erhalten. Dieser Befund direkter Wasserabspaltung am Molekülion bestärkt den Hinweis auf eine Carbonsäure. Die Differenz von m/z 16 zwischen dem Produkt-Ion m/z 231 und dem Methylpyrenylion deutet auf eine weitere Hydroxylierung hin. Bei diesem Metaboliten handelt es sich somit aller Wahrscheinlichkeit nach um eine x -Hydroxy-8-methyl-1-pyrenylcarbonsäure (x -OH-8-M-1-PCS). Die entsprechenden Massenspektren sind in den Abb. 2.10, 2.11 und 2.12 dargestellt. Da kein Standard vorliegt, erfolgt die Quantifizierung anhand der Intensität des deprotonierten Moleküls m/z 275 relativ zu den jeweiligen Kontrollproben.

1,8-Dimethylpyrenyl-1-mercaptursäure, 1,8-DMPMA

Die Aufarbeitung der Urin- und Fäzesproben zur Analyse auf 1,8-DMPMA erfolgte analog zu der der 1-MPMA-Proben (Abs. 4.4.2). Für den Nachweis mittels UPLC-MS/MS wurde ebenso ein MRM im negativen Modus durchgeführt (Abs. 4.5.6). Hierbei wurde parallel die Entstehung zweier Produkt-Ionen zur Identifizierung herangezogen. Das deprotonierte Molekül $[M - H]^-$ hatte die Masseladungszahl m/z 390. Nach dem für Mercaptursäuren charakteristischen Neutralverlust der *N*-Acetyl-2-aminopropionsäure (m/z 129), erhielt man als Produkt-Ion m/z 261. Eine Abspaltung der

UV-Chromatogramm

T11-2 Sm (Mn, 2x3)

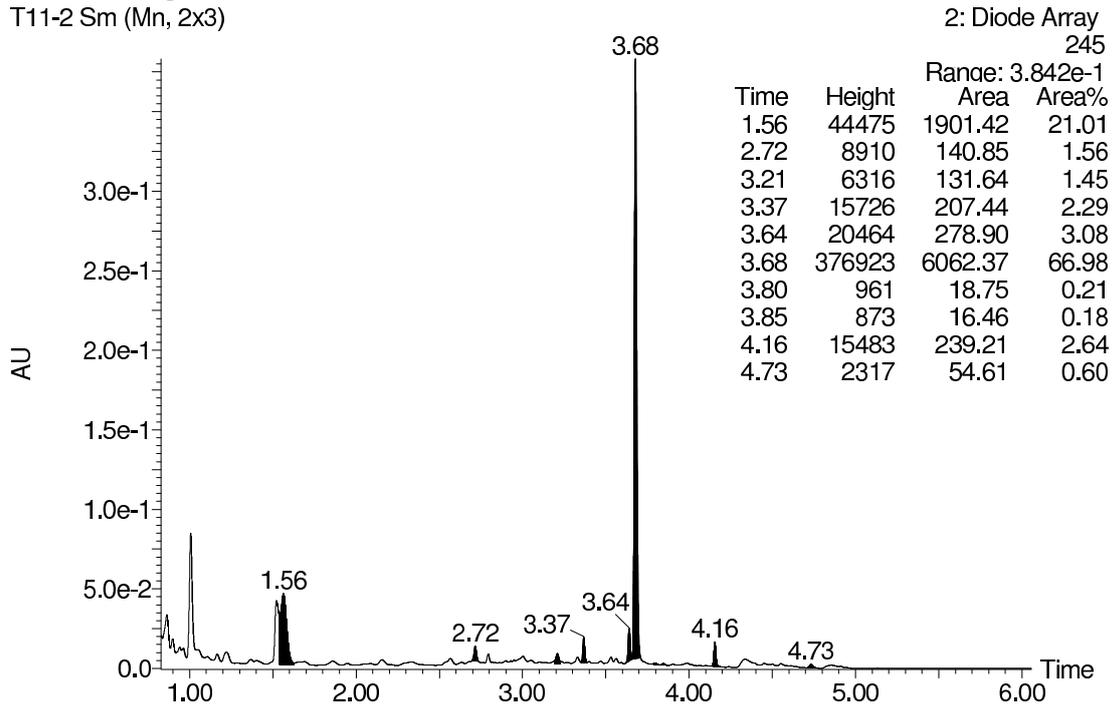


Abbildung 2.9: UV-Chromatogramm bei 245 nm einer Rattenurinprobe. Dem Tier wurden 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM 1-HM-8-MP i.p. appliziert, der Urin über 24 h gesammelt und 1 zu 10 verdünnt mit der Methode in Abs. 4.5.5 vermessen.

2 Ergebnisse

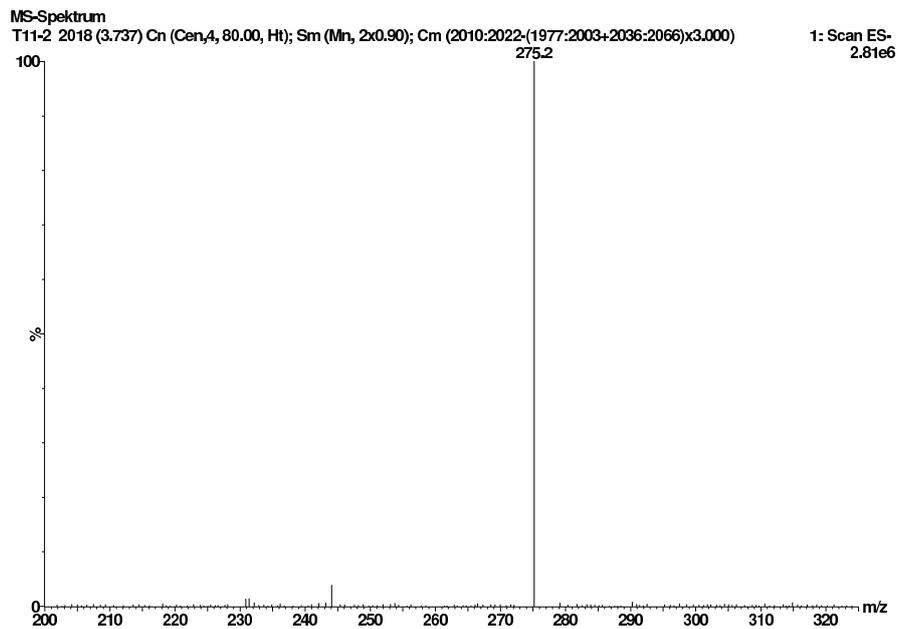


Abbildung 2.10: Deprotoniertes Molekül mit m/z 275 im negativen Elektrospraymodus. Dieser Metabolit eluiert bei der Analyse einer 24-Stunden Urinprobe einer mit $83,3 \mu\text{mol}$ 1-HM-8-MP/kg KM behandelten Ratte nach 3,7 min (Analysebedingungen siehe Abs. 4.5.5 und Tab. 4.2).

2 Ergebnisse

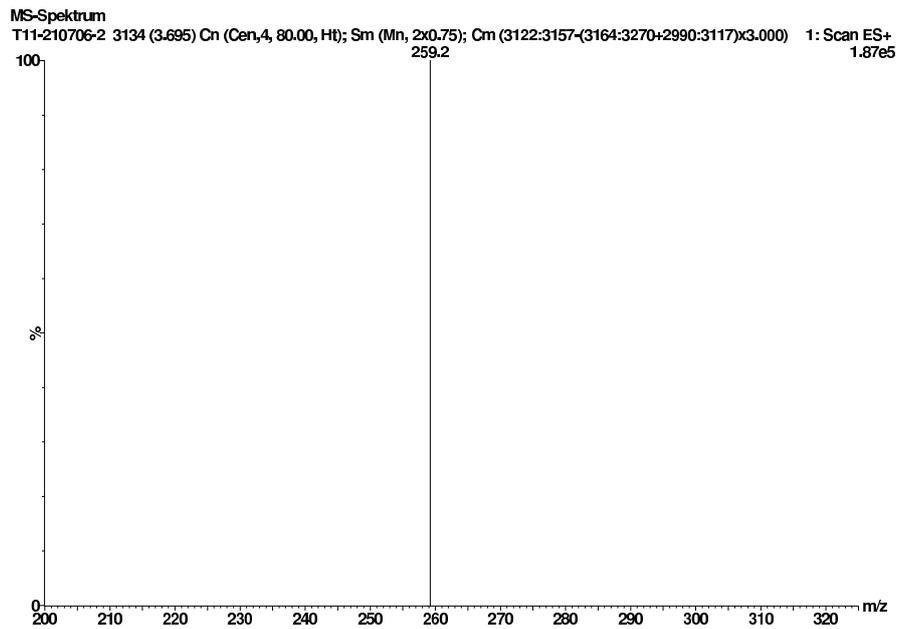


Abbildung 2.11: Protoniertes Molekül nach Wasserabspaltung mit m/z 259 im positiven Elektrospraymodus. Dieser Metabolit eluiert bei der Analyse einer 24-Stunden Urinprobe einer mit $83,3 \mu\text{mol}$ 1-HM-8-MP/kg KM behandelten Ratte nach 3,7 min (Analysebedingungen siehe Abs. 4.5.5 und Tab. 4.2).

2 Ergebnisse

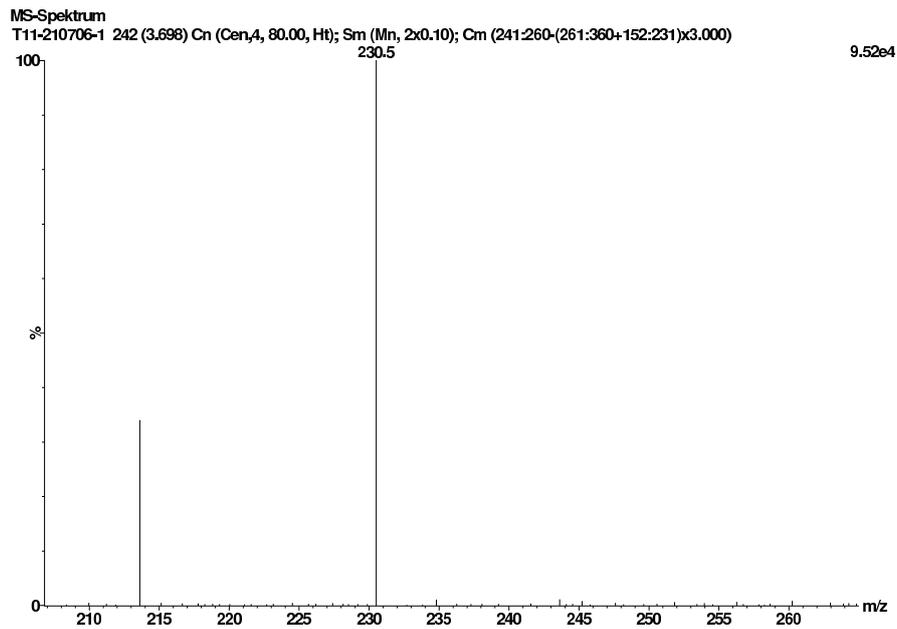
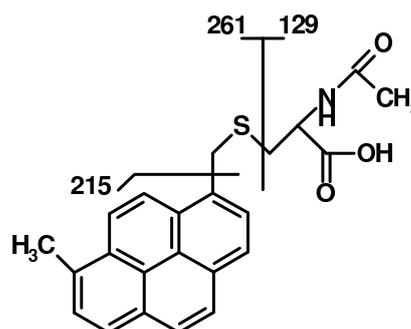


Abbildung 2.12: Nachweis der Bildung des Produkt-Ions m/z 231 nach CID-Fragmentierung des deprotonierten Moleküls mit m/z 275 im negativen Elektrospraymodus. Dieser Metabolit eluiert bei der Analyse einer 24-Stunden Urinprobe einer mit $83,3 \mu\text{mol}$ 1-HM-8-MP/kg KM behandelten Ratte nach 3,7 min (Analysebedingungen siehe Abs. 4.5.5 und Tab. 4.2).

gesamten Seitenkette, des *N*-Acetyl-*S*-methylcysteins, führte zum zweiten aufgezeichneten Produkt-Ion, dem Methylpyrenylion (m/z 215). Diese Fragmentierung ist in Abb. 2.13 schematisch dargestellt. Die Wiederfindung und Nachweisgrenze wurden für 1,8-DMPMA nicht bestimmt.

Abbildung 2.13:
Fragmentierungsstellen der 1,8-DMPMA ($u=391$) bei negativer Elektrosprayionisation.



Eine Untersuchung der 1,8-DMPMA-Ausscheidung während der ersten 24 h ergab im Mittel 16,6 ppm der applizierten 1-HM-8-MP Dosis. Weiterhin war zu beobachten, dass 90 % der 1,8-DMPMA über die Fäzes eliminiert wurden. Die Daten hierzu sind in Tab. 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Ausscheidung von 1,8-DMPMA innerhalb von 24 h nach Verabreichung von je 83,3 $\mu\text{mol/kg}$ KM 1-HM-8-MP an 5 Ratten (Abs. 4.3, Analysemethoden Abs. 4.4.2, 4.5.6 und Tab. 4.2.)

Tier, Nr	Fäzes, ppm	Urin, ppm	Gesamt, ppm	Fäzes, %	Urin, %
26	3	1,3	4,3	70,3	29,7
27	19,4	0,7	20,1	96,3	3,7
28	13,2	1,8	15,0	88,3	11,7
29	14,9	1,7	16,6	90,0	10,0
30	59,9	1,4	61,3	97,7	2,3

Die relativ großen Schwankungen insbesondere bei der fäkalen Ausscheidung von 1,8-DMPMA können mehrere Ursachen haben. Bei Tieren mit geringer Ausscheidung ist nicht auszuschließen, auch wenn bei der Sektion keine Punktion zu sehen war, dass es dennoch zu einer Punktion des Caecums gekommen ist und somit die Substanz nur teilweise über die Bauchhöhle absorbiert wurde. Da es selbst bei einer Dosis von 250 $\mu\text{mol/kg}$ KM zu sichtbaren Substanzablagerungen in der Bauchhöhle gekommen

war, ist nicht auszuschließen, dass bei dem hier verwendeten Drittel dieser Dosis, minimale, nicht direkt sichtbare Substanzablagerungen in der Bauchhöhle die Bioverfügbarkeit einschränkten. Auch denkbar sind eine inhomogene Verteilung in den Fäzes trotz Homogenisation, wobei bei vereinzelt durchgeführten mehrfachen Bestimmungen aus einer Probe maximal Schwankungen um den Faktor zwei auftraten (Daten nicht gezeigt). Desweiteren sind auch bei den Untersuchungen von Ma (2001) mit 1-MPMA Schwankungen in der hier beobachteten Größenordnung aufgetreten.

2.5 Modulation des Metabolismus

2.5.1 Inhibitoren der Sulfotransferasen

Pentachlorphenol

Eine Dosis von 40 μ M Pentachlorphenol wurde gelöst in Wasser (10 ml/kg KM) oral verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich Wasser. Die Applikation der benzyli-schen Alkohole erfolgte 40 min nach der des Modulators bzw. Vehikels. Ein Tier der Kontrollgruppe musste von der Auswertung ausgeschlossen werden, da es trotz Futterangebot nichts gefressen hatte.

Die Vorbehandlung mit Pentachlorphenol führte zu einer Reduktion der renalen 1-MPMA-Ausscheidung um 80 %, die fäkale Elimination wurde um 33 % gemindert. Eine signifikante Verringerung (Mann-Whitney-Wileex-Test) der 1-MPMA-Ausscheidung war nur für den Urin zu beobachten.

Die Verringerung der renalen Ausscheidung von 1,8-DMPMA um 20 %, sowie die Erhöhung der fäkalen um 25 % waren beide nicht signifikant. Da 90 % des 1,8-DMPMA über die Fäzes ausgeschieden wurden, war die im Urin auftretenden Menge sehr gering, so dass kleine Schwankungen hier einen Effekt suggerierten (Wasser $1,4 \pm 0,5$ ppm der Dosis; Pentachlorphenol $1,1 \pm 0,3$ ppm der Dosis). Die geringfügige Steigerung der fäkalen Elimination nach Pentachlorphenolbehandlung war wahrscheinlich auf die großen Schwankungen in der Kontrollgruppe (3 bis 60 ppm der Dosis) zurückzuführen. Die Daten hierzu sind in Tab. 2.12 dargestellt.

Tabelle 2.12: Ergebnisse der Analysen von Urin und Fäzes auf den Mercaptursäuregehalt. Die einzelnen Tiere sind sortiert nach Behandlungsgruppen aufgeführt. Alle Angaben sind Einzelmessungen und werden in ppm der applizierten Dosis an 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP angegeben. Signifikante Effekte der Modulatorwirkung (bestimmt nach Mann-Whitney-Wilcoxon) sind bei der entsprechenden behandelten Gruppe mit * für $\alpha=0,05$ bzw. ** für $\alpha=0,01$ angezeigt. Die Tierhaltung ist in Abs. 4.3, die Analysemethoden in Abs. 4.4.2 und 4.5.6 sowie Tab. 4.2 beschrieben.

Behandlung	Tier, Nr	ppm der Dosis		
		Urin	Fäzes	Gesamt
Kontrolle Wasser, 1-HMP	21	43	40	83
	22	314	20	334
	23	151	57	208
	24	57	26	83
	Median	104	33	146
Quercetin, 1-HMP	1	72	30	102
	3	40	15	45
	4	43	6	49
	5	129	13	142
	Median	60	14	78
Pentachlorphenol, 1-HMP	6	20	79	99
	7	28	60	87
	8	18	13	31
	9	15	19	34
	10	50	11	61
Median	20 *	19	61	
Kontrolle Wasser, 1-HM-8-MP	26	1,3	3	4
	27	0,7	19	20
	28	1,8	13	15
	29	1,7	15	17
	30	1,4	60	61
Median	1,4	15	17	
Quercetin, 1-HM-8-MP	11	1,7	17	19
	12	4,5	17	21
	13	4,8	30	35

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 2.12: Ergebnisse der Analysen von Urin und Fäzes auf den Mercaptursäuregehalt (Fortsetzung)

Behandlung	Tier, Nr	ppm der Dosis		
		Urin	Fäzes	Gesamt
	14	2,2	24	26
	15	1,9	12	14
	Median	2,2 *	18	21
Pentachlorphenol, 1-HM-8-MP	16	1,1	16	17
	17	1,3	21	22
	18	1,0	26	27
	19	1,1	10	11
	Median	1,1	16	18
Ethanol, 1-HM-8-MP	61	0,6	271	271
	62	1,8	200	202
	63	2,4	102	104
	64	1,1	191	192
	65	2,9	169	172
	Median	1,8	191 **	192
4-Methylpyrazol, 1-HM-8-MP	66	6,4	46	53
	67	10,4	40	51
	68	1,9	74	76
	69	2,5	61	64
	70	3,5	45	48
	Median	3,5 **	45	53
Kontrolle DMSO, 1-HM-8-MP	36	2,0	84	86
	37	3,1	112	115
	38	3,8	17	21
	40	2,9	12	15
	Median	3,0	51	54
Disulfiram, 1-HM-8-MP	32	3,0	23	26
	34	4,3	35	39
	35	3,1	4	7
	Median	3,1	23	26

Aufschluss darüber, ob eine ADH-Hemmung vorliegt, geben die Daten zur Carbonsäureausscheidung. Die Reduktion der 1-PCS-Ausscheidung nach Pentachlorphenol-Gabe legt eine ADH-Hemmung nahe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Ausscheidung von 1-PCS bei Pentachlorphenol-Vorbehandlung um 91 % geringer (Tab. 2.13).

Für die α -OH-8-M-1-PCS-Elimination war bei Pentachlorphenol-Behandlung kein deutlicher Effekt zu sehen (Abb. 2.14).

Tabelle 2.13: Ausscheidung von 1-PCS über den Urin nach 1-HMP-Applikation und Vorbehandlung mit den SULT-Inhibitoren Pentachlorphenol und Quercetin sowie bei Vehikelkontrollen. Die 1 zu 10 verdünnten Urinproben wurden mittels UPLC-MS/MS und 1-PCS als Standard quantifiziert (Abs. 4.5.5 und Tab. 4.2). Dargestellt sind Ergebnisse von Einzelmessungen berechnet als Prozent der applizierten 1-HMP Dosis (83,3 μ mol/kg KM). Signifikante Effekte der Modulatorwirkung (bestimmt nach Mann-Whitney-Wilcoxon) sind bei der entsprechenden behandelten Gruppe mit * für $\alpha=0,05$ angezeigt.

Behandlung	Tier	1-PCS, % der applizierten 1-HMP Dosis
Kontrolle, Wasser	21	1,45
	22	2,40
	23	2,23
	24	0,63
	Median	1,84
Pentachlorphenol	6	0,16
	7	0,22
	8	0,03
	9	0,10
	10	0,68
	Median	0,16 *
Quercetin	1	1,75
	3	2,28
	4	1,75
	5	2,24
	Median	1,99

Quercetin

Quercetin wurde mit einer Dosis von 40 μ mol/kg KM eingesetzt. Die orale Applikation in Wasser (10 ml/kg KM) erfolgte 90 min vor der Verabreichung der entsprechenden benzyllischen Alkohole. Als Kontrollgruppe diente die selbe Gruppe wie bei Pentachlorphenol.

Insgesamt kam es zu einer nicht signifikanten geringen Ausscheidung von 1-MPMA durch Vorbehandlung mit Quercetin (-47 %) (Tab. 2.12). Als Problem erwies sich, dass ein Tier der Quercetin-Gruppe nur sehr wenig defäkierte. Die Aufarbeitung der gesamten Probe ergab keine messbare Ausscheidung von 1-MPMA über die Fäzes. Da-

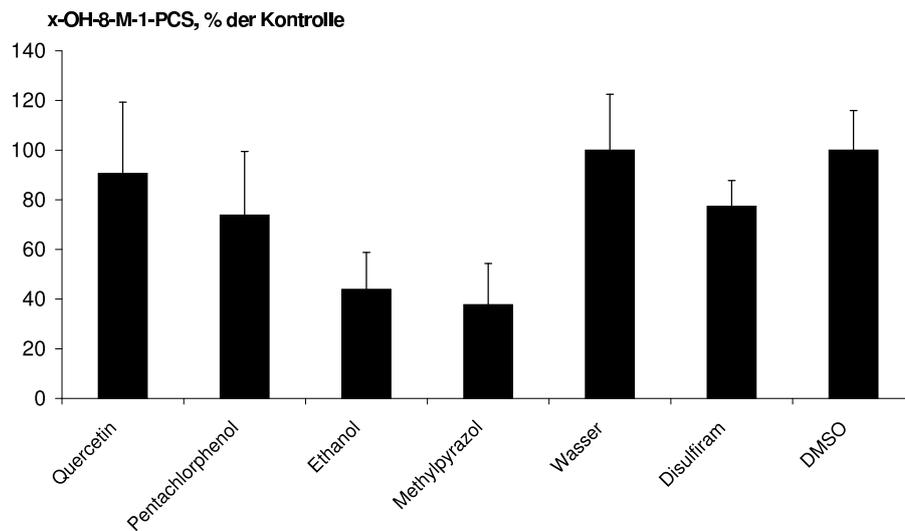


Abbildung 2.14: Ausscheidung der x-OH-8-M-1-PCS über den Urin nach Behandlung mit den SULT-Inhibitoren Quercetin und Pentachlorphenol, den ADH-Hemmstoffen Ethanol und 4-Methylpyrazol sowie dem ALDH-Inhibitor Disulfiram. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Anteile der Flächen des deprotonierten Moleküls in Proben behandelter Tiere im Vergleich zu Vehikelkontrollproben. Die 1 zu 10 verdünnten Urinproben wurden mittels UPLC-MS/MS analysiert (Abs. 4.5.5 und Tab. 4.2).

her konnten nur 4 Tiere in der behandelten Gruppe betrachtet werden, die statistische Aussagekraft war somit vermindert.

Die Modulation des 1-HM-8-MP-Metabolismus mit Quercetin ergab ebenso wie bei Pentachlorphenolbehandlung keine Veränderung hinsichtlich der Mercaptursäureausscheidung. Die Ergebnisse für diese Versuche sind in Tab. 2.12 dargestellt.

Bei der Carbonsäureausscheidung konnte weder für 1-HMP noch für 1-HM-8-MP durch Quercetin eine Veränderung beobachtet werden (Tab. 2.13, 2.14).

2.5.2 Inhibitoren der Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen

Ethanol

In dieser Arbeit wurde Ethanol einmalig oral in Wasser (10 ml/kg KM) mit 1,6 g/kg KM 10 min vor Applikation der Testsubstanz 1-HM-8-MP verabreicht. Die erwünschte Wirkung war somit eine Konkurrenz, insbesondere um die Aktivität der ADH. Als benzylischer Alkohol wurde nur 1-HM-8-MP eingesetzt, da zu 1-HMP bereits Daten von Ma (2001) vorliegen. Als Kontrollgruppe dienten die selben Tiere wie bei Pentachlorphenol und Quercetin.

Bei der behandelten Gruppe kam es in Folge der Ethanolgabe zu einer deutlichen Steigerung der Mercaptursäureausscheidung über die Fäzes von 15 auf 191 ppm der Dosis (Tab. 2.12). Die renal ausgeschiedene Menge blieb mit 1,4 bzw. 1,8 ppm der Dosis jedoch unverändert und stellte mit knapp 10 bzw. 1 % einen deutlich niedrigeren Anteil dar. Ebenso konnte für die Ausscheidung der Carbonsäure α -OH-8-M-1-PCS eine Verringerung um 56 % im Vergleich zu Kontrolle beobachtet werden (Abb. 2.14).

4-Methylpyrazol

Ebenso wie Ethanol wurde 4-Methylpyrazol einmalig oral in Wasser (10 ml/kg KM) 10 min vor Applikation der Testsubstanz 1-HM-8-MP verabreicht. Die Dosis betrug 1 mmol/kg KM. Als benzylischer Alkohol wurde wiederum nur 1-HM-8-MP eingesetzt, da zu 1-HMP bereits Daten von Ma (2001) vorliegen. Als Kontrollgruppe dienten die selben Tiere wie bei Pentachlorphenol und Quercetin.

In den Untersuchungen ergab sich nur eine leicht gesteigerte, etwa dreifach erhöhte Ausscheidung von 1,8-DMPMA in der 4-Methylpyrazol-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Tab. 2.12). Dieser Effekt war nur bei den Urinproben signifikant. Allerdings entsprach der renal ausgeschiedene Anteil im Mittel nur 7 % der gesamten Mercaptursäureausscheidung und die interindividuellen Unterschiede unter den behandelten Tieren waren recht groß, so dass der Effekt letztlich nicht von Bedeutung ist. Wie die Reduktion der Carbonsäureelimination um 62 % jedoch zeigte, hemm-

te 4-Methylpyrazol ebenso wie Ethanol deutlich die renale Carbonsäureelimination (Abb. 2.14).

Disulfiram

Die Verabreichung von Disulfiram erfolgte i.p., gelöst in DMSO (0,5 ml/kg KM) mit einer Dosis von 250 $\mu\text{mol/kg}$ KM. Bis zur Applikation von 1-HM-8-MP wurde 17 h gewartet. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden zeitgleich behandelt, erhielten jedoch anstelle des Disulfirams nur DMSO (0,5 ml/kg KM). Als benzylicher Alkohol wurde wiederum nur 1-HM-8-MP eingesetzt, da Ergebnisse zu 1-HMP bereits von Ma (2001) vorliegen.

Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit zu 1-HM-8-MP war eine Verringerung der Mercaptursäureausscheidung auf 36 % in der behandelten Gruppe gegenüber den Kontrolltieren zu beobachten (Tab. 2.12). Aufgrund der durch Fehlapplikationen verringerten Tierzahlen war jedoch keine statistische Analyse der Daten möglich. Bei der Carbonsäure-Elimination kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion um 23 % (Abb. 2.14).

3 Diskussion

3.1 Benzylische Hydroxylierung von alkylierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

3.1.1 Ergebnisse im Vergleich

Vergleichbare Daten aus unserer Arbeitsgruppe finden sich in Engst u. a. (1999). Hier wurde die Bildung von 1-HMP und 1- α -HEP durch Rattenlebermikrosomen von unbehandelten und mit 3-MC behandelten adulten männlichen Wistar-Ratten untersucht. Die bestimmten Bildungsraten für 1-HMP lagen bei 25 und 30 bzw. 4 und 5 pmol/mg Protein/min, die für 1- α -HEP bei 12 bzw. 17 pmol/mg Protein/min. Nach der Induktion von CYP 1A Enzymen durch 3-MC wurde somit von Engst u. a. eine verminderte 1-HMP-Bildung beobachtet, wohingegen die 1- α -HEP-Bildung unverändert blieb.

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit wurden Mikrosomen von adulten männlichen F344/Clr-Ratten verwendet. Die Induktion der CYP erfolgte mit Aroclor 1254. Die beobachteten Umsatzraten lagen mit Mikrosomen von unbehandelten Tieren für 1-HMP bei 176 pmol/mg Protein/min und für 1- α -HEP bei 48 pmol/mg Protein/min; wurde zuvor mit Aroclor induziert, ergaben sich Raten von 389 bzw. 1067 pmol/mg Protein/min.

Die Daten für unbehandelte Mikrosomen aus der hier vorliegenden Arbeit und von Engst u. a. (1999) zeigen, dass 1-MP besser benzylisch hydroxyliert wird als 1-EP. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind jedoch um den Faktor 5 bis 6 höher als die Ergebnisse von Engst u. a.. Der Unterschied zwischen den beiden Untersuchungen ist möglicherweise auf die Verwendung der verschiedenen Rattenstämme zur Gewinnung der Mikrosomen zurückzuführen (Morita u. a., 1998; Saito u. a., 2004).

Beim Vergleich der Ergebnisse zu vorbehandelten Tieren ist zu berücksichtigen, dass die Inkubationszeit in Experimenten mit Mikrosomen von Aroclor behandelten Tieren auf 7 Minuten reduziert wurde, da die Gesamtaktivität der Mikrosomen so hoch war, dass die eingesetzte Substratmenge für längere Inkubationen nicht ausreichte (Tab. 2.2). Die verstärkte Bildung von benzylischen Alkoholen durch Aroclorbehandlung im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Vorbehandlung oder mit 3-MC-Induktion kann neben den unterschiedlichen Rattenstämmen drei weitere Ursachen haben:

1. Die Induktion der CYP1 Familie ist möglicher Weise durch Aroclor stärker als durch 3-MC.
2. Aufgrund der längeren Inkubationszeit von 15 Minuten in den Untersuchungen von Engst u. a. (1999) kann die Menge an gebildetem benzylichem Alkohol einen anderes Verhältnis der Metaboliten bei der Reaktion vom alkPAK über den benzylichen Alkohol hin zu weiteren Metaboliten darstellen, so dass die beschriebenen Bildungsraten mit den hier gemessenen nicht vergleichbar sind.
3. Bei Guengerich u. a. (1982) ist beschrieben, dass Aroclor neben CYP1 Enzymen auch CYP2B Enzyme induziert. Dies ist bei 3-MC nicht der Fall. Aufgrund der Substratspezifität und den Ergebnissen aus Metabolismusstudien mit rCYP2B1 exprimierenden Zellen kann davon ausgegangen werden, dass rCYP2B1 und 2B2 an den erhöhten Umsatzraten durch die Aroclorinduktion beteiligt sind (Landsiedel, 1997).

Letztlich kann aus den Ergebnissen mit rLA geschlossen werden, dass insbesondere induzierbare CYP wie CYP1A1 für die benzyliche Hydroxylierung verantwortlich sind.

3.1.2 Einfluss des Ringsystems

Aus den vorliegenden Untersuchungen wurde deutlich, dass Pyrenderivate je nach Position und Art der Alkylgruppe um den Faktor 1,5 bis 25 höhere Bildungsraten für die benzylichen Alkohole aufweisen. Probleme mit der Löslichkeit der lipophileren Benzo[*a*]pyren- und Anthanthrenderivate wurden durch Messungen der Gesamtmetabolismusrate und Optimierung der Bildungsrate des benzylichen Alkohols am Beispiel des 6-MBP ausgeschlossen. Unter den gegebenen Bedingungen konnte davon ausgegangen werden, dass der Metabolismus des Ringsystems gegenüber der Hydroxylierung der Alkylgruppe bei den größeren Ringsystemen überwiegt und die Alkylgruppe in diesen Fällen ein schlechteres Substrat für die beteiligten Enzyme darstellt.

3.1.3 Einfluss der Alkylgruppe

Der Vergleich der Daten bezüglich der Art und Position der Alkylgruppe ist, was die Art der Alkylgruppe anbelangt, lediglich allgemein strukturell interessant. Grund hierfür ist, dass EP bisher in keiner der untersuchten Matrices nachgewiesen werden konnten (Abs. 1.1 und Tab. 1.1).

Eine Betrachtung des Einflusses der Position auf die Hydroxylierungsraten bei den Alkylpyrenen ergibt folgendes Bild:

- **MP-Derivate:** Bei rL sind die Umsätze der 1-MP-Derivate zwei- bis dreifach höher als die von 2- und 4-MP. Bei rLA ergibt sich ein für 1-MP und 1,6-DMP im Vergleich zu 2-MP ein Faktor von Sieben bzw. Vier, 1,8-DMP liegt in der gleichen Größenordnung wie 2-MP. Bei 4-MP liegt die benzyliche Hydroxylierungsrate mit letztgenannten Mikrosomen um den Faktor Fünf bis 40 niedriger als bei den 1-MP-Derivaten.
- **EP-Derivate:** Ohne Aroclorinduktion übersteigt die Hydroxylierungsrate der Alkylgruppe in Position 2 die der Positionen 1 und 4 um den Faktor Zweieinhalb bis Drei. Mit Aroclorinduktion sind die Positionen 1 und 4 die bevorzugte Hydroxylierungsstellen. Sie werden mit etwa dreifach höherer Rate hydroxyliert als eine 2-Alkylgruppe.
- Bei der Verwendung von humanen Proben können aufgrund der insgesamt geringen Umsätze aus den Versuchsergebnissen keine Trends abgelesen werden. Die höchsten Umsatzraten findet man bei 1,6-DMP und 2-EP.

Hinsichtlich der Art der Alkylgruppe kann festgehalten werden:

- Bei rL ist in Position 1 und 4 die Methylgruppe bevorzugt (Faktor Drei bzw. Zwei im Vergleich zur Position 2). Für Position 2 ist hingegen die Bildungsrate für 2- α -HEP um den Faktor Zwei höher als die des 2-HMP.
- Bei Inkubationen von rLA sind die Bildungsraten der HEP in jedem Fall höher als die der HMP: Position 1 um den Faktor Zweieinhalb, Position 2 um den Faktor Sechs und Position 4 sogar um den Faktor 95.

Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass ohne Enzyminduktion von CYP1 und CYP2B die Methylgruppe in Position 1 bevorzugt hydroxyliert wird, nach der Induktion die Positionen 1 und 4 der EP jedoch ein noch besseres Substrat darstellen.

Diese Ergebnisse sind insbesondere in Hinblick auf das Vorkommen von Alkylpyrenen interessant. So können EP in den bisher untersuchten Matrices wie Zigarettenrauch, Motorenöl, Sedimenten und Grillgut nicht nachgewiesen werden, MP sind hingegen in allen Proben enthalten. In Zigarettenrauch und Grillgut überwiegt der Gehalt an 1-MP, gefolgt von 4- und 2-MP und zuletzt den DMP, bei den Motorenölen sowie Sedimenten sind die Gehalte annähernd gleich und insgesamt niedriger (s. Abs. 1.1 und Tab. 1.1). Sieht man die Daten dieser Arbeit und das Vorkommen der Verbindungen nun im Zusammenhang mit möglichen Expositionen, so sind Zigarettenrauch und Grillfleisch für den nicht beruflich Exponierten die bedeutendsten Quellen. Interessant ist dann, dass das mengenmäßig am stärksten vertretene 1-MP zumindest von Ratten bevorzugt benzylich hydroxyliert wird.

3.1.4 Aktivitäten der hCYP1A1, 1A2, 1B1 und 3A4

In Untersuchungen von Engst u. a. (1999) wurden zur Bildung der benzylicchen Alkohole folgende Aktivitätsreihenfolgen festgestellt:

1-HMP: hCYP1A1 \approx h1B1 > h3A4 > h1A2 \approx h2E1 > 2A6

1- α -HEP: hCYP1A1 > 1B1 \gg 1A2 > 3A4 \gg 2A6 \approx 2E1.

Für 1-MP und 1-EP bestätigte sich die Reihenfolge der Aktivitäten von Engst u. a. mit hCYP1A1 \approx h1B1 > h3A4 > h1A2, für 2- und 4-EP war die Aktivität von hCYP3A4 deutlich niedriger und bei 1,6-DMP dominierte hCYP1A1 gegenüber allen anderen Enzymformen. Es lässt sich somit festhalten, dass die konstitutiv nicht hepatisch exprimierten hCYP1A1 und 1B1 die höchsten Umsatzraten aufwiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Untersuchungen mit rLA. Die gesteigerten Aktivitäten durch Aroclor-Behandlung ließen bereits vermuten, dass die CYP der Familie 1 entscheidend an der Hydroxylierung beteiligt sein würden. Die hepatischen CYP1A2 und 3A4 waren jedoch auch in der Lage, die Hydroxylierung zu katalysieren und sind aufgrund ihres hohen Anteils von 10 bzw. 30–70 % des Gesamtcytochromgehaltes der humanen Leber von Bedeutung (Marquardt und Schäfer, 2004). Wegen fehlender kinetischer Daten können zur tatsächlichen in-vivo-Hydroxylierung jedoch zum momentanen Zeitpunkt keine gesicherten Aussagen getroffen werden. Es wäre jedoch möglich, dass eine Induktion von CYP1A1 und 1B1, z.B. bedingt durch eine PAK-Belastung, einen Einfluss auf die Hydroxylierung der alkPAK hat (Shimada, 2006).

3.1.5 Bildung von Positionsisomeren und Enantiomeren

Die Bedeutung der in dieser Arbeit beobachteten Stereoselektivität bei der benzylicchen Hydroxylierung von EP für den weiteren Metabolismus wird bei einer Betrachtung der Stereoselektivität der SULT klar. Hierzu liegen Daten von Landsiedel (1997) zur Stereoselektivität von hSULT1E1 und 2A1 sowie rSULT2A1 beim Umsatz von 1- α -HEP sowie unveröffentlichte Daten von SCHNEIDER zu hSULT1A1 und 1E1 beim Umsatz von 2- α -HEP vor. Während hSULT1E1 bei 1- α -HEP das (-)-Enantiomer bevorzugt, wird von 2- α -HEP das (+)-Enantiomer deutlich besser umgesetzt. Das (+)-Enantiomer des 1- α -HEP ist auch das vorrangige Substrat der hSULT2A1 und rSULT2A1. Gleiches ist für den Umsatz von 2- α -HEP durch hSULT1A1 zu beobachten, denn auch hier wird das (+)-Enantiomer favorisiert. Da abgesehen von rL bevorzugt die (+)-Enantiomere der α -HEP gebildet werden, stellt die Stereoselektivität der Sulfonierung zum Einen eine gut abgestimmte Folge der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme dar, zum anderen verstärkt sie aufgrund der Mutagenität der gebildeten Schwefelsäureester die Toxifizierung der EP.

3.2 Einfluss der Struktur der benzylichen Schwefelsäureester auf Stabilität und Reaktivität

3.2.1 Halbwertszeiten in Wasser

Die Halbwertszeiten der benzylichen Schwefelsäureester in Wasser können als Maß für die Reaktivität angesehen werden. Bei der Hydrolyse in reinem Wasser steht lediglich dieses als nukleophiler Reaktionspartner zur Verfügung. Ob die Reaktion mehr nach einem S_N1 - oder S_N2 -Mechanismus abläuft lässt sich nicht mit Sicherheit bestimmen. In der Arbeit von Landsiedel (1997) wurde aufgrund des common-ion-effects bei 1-Chlor-MP und der in Gegenwart verschiedener Arten und Konzentrationen von Nucleophilen gleichbleibenden Reaktionsgeschwindigkeit der Substitution ein S_N1 -Mechanismus und somit die intermediäre Bildung eines Carbokations angenommen. Geht man von einem S_N1 -Mechanismus aus, so spielt die Stabilisierung des intermediär gebildeten Carbokations eine entscheidende Rolle. Diese lässt sich für die methylierten Verbindungen mit Hilfe der pertubational-molecular-orbital-Theorie (PMO-Theorie) nach Dewar und Dougherty (1975) berechnen (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Delokalisierungsenergien ($\Delta E_{\text{deloc}}/\beta$) als Maß für die Stabilisierung der Carbokationen berechnet über die PMO-Theorie nach Dewar und Dougherty (1975).

alkPAK	$\Delta E_{\text{deloc}}/\beta$
1-MP	0,794
2-MP	0,488
4-MP	0,714
6-MBP	1,000
10-MBP	0,658

Ein Vergleich der berechneten Stabilisierung und der bestimmten Halbwertszeit der Schwefelsäureester zeigt, dass eine höhere Stabilisierung des Carbokations mit einer kürzeren Halbwertszeit korreliert. Die gleiche Abfolge der Halbwertszeiten nach Position der Alkylgruppe (1<4<2) wurde auch bei den Ethylpyrensulphaten beobachtet. Insgesamt sind die Halbwertszeiten jedoch deutlich kürzer als die der Methyl-derivate, was auf die zusätzliche Stabilisierung des Carbokations durch die Methylgruppe am benzylichen Kation zurückzuführen ist. Sie ist ein Elektronendonator.

Da in Position 6 des BP bereits für das Methyl-derivat eine hohe Reaktivität und niedrige Halbwertszeit vorliegt, kann kein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Alkylgruppen beobachtet werden. Hinsichtlich des Unterschiedes zwischen Position 6 und 10 des BP gilt wiederum, dass die Erwartungen ausgehend von der PMO-Theorie durch die Messungen bestätigt werden.

3.2.2 Vergleich der Stabilität in Wasser und der Reaktivität in in-vitro-Inkubationen

Anhand der Daten von Donath (2008) zu den in-vitro-DNA-Addukten können die ermittelten Halbwertszeiten mit einem Maß für die Reaktivität im in-vitro-System verglichen werden. Die Abbildung 3.1 zeigt die DNA-Addukte pro 10^8 Nukleotide. Für 1- α -SEP konnte aufgrund von Hydrolyse während der Lagerung der Substanz keine quantitative Bestimmung der DNA-Addukte durchgeführt werden.¹

Bei den MP spiegeln die Zahlen der DNA-Addukte die Ergebnisse der Halbwertszeitbestimmung recht gut wieder: 1-SM-6-MP und 1-SM-8-MP haben kürzere Halbwertszeiten als 1-SMP und ebenso höhere DNA-Adduktzahlen. 2- und 4-SMP waren hingegen deutlich weniger reaktiv gegenüber der DNA und waren auch in wässriger Lösung deutlich stabiler. Der Unterschied zwischen diesen beiden Isomeren ist jedoch bei den DNA-Addukten gegenläufig zu den Ergebnissen der Halbwertszeiten. Im Vergleich hierzu verhalten sich 2- und 4- α -SEP gegenüber der DNA und einer reinen wässrigen Lösung ähnlich: 4- α -SEP ist reaktiver bzw. instabiler als 2- α -SEP. Den deutlichsten Unterschied zwischen den Ergebnissen zur Halbwertszeit und der Reaktivität gegenüber DNA sieht man bei 6- und 10-SMBP. Aufgrund der Halbwertszeiten in Wasser wäre zu vermuten, dass letzteres deutlich niedrigere Adduktzahlen aufweisen würde. Landsiedel (1997) beschreibt jedoch bereits, dass eine geringe Stabilisierung des Carbokations sowie stärkere Nukleophile (Wasser bzw. DNA) dazu beitragen den Reaktionsmechanismus in Richtung eines S_N2 -Verlaufs zu verschieben. Dies könnte die vergleichsweise hohe Zahl an DNA-Addukten erklären. Eine Veränderung des Reaktionsmechanismus von S_N1 zu S_N2 könnte auch ein Grund für die relativ zur hohen Stabilität in wässriger Lösung hohen DNA-Adduktniveaus von 2- und 4-SMP sein.

Insgesamt bestätigen die Daten zur in-vitro-DNA-Adduktbildung die aus den Halbwertszeiten und Stabilisierungsberechnungen abgeleiteten Erwartungen.

Weitere Untersuchungen zur Mutagenität der Schwefelsäureester stimmen in der Tendenz mit den beobachteten Reaktivitäten überein. Beim direkten Test der Substanzen im Ames-Test können zwar Probleme bei der Membranpenetration der in wässriger Lösung negativ geladenen Sulfate vorliegen, dennoch weisen mit Ausnahme des wahrscheinlich bereits hydrolysierten 1- α -SEP die instabilen (1-SM-6-MP, 1-SM-8-MP und 6-SMBP) hohe, die etwas stabileren (1-SMP und 4- α -SEP) niedrige und die recht stabilen (2-, 4-SMP und 2- α -SEP) sehr geringe Mutagenitäten auf (Tab. 3.2).

¹Die Substanz lag als Pulver vor und wurde bei -20°C gelagert, anschließend wurden Stammlösungen in DMSO angesetzt. Kondenswasser und Restwasser in den DMSO-Lösungen haben offensichtlich bereits zu einer Zersetzung des Esters geführt, da er in keinem in-vitro-Test zu positiven Ergebnissen führte und auch mittels Massenspektrometrie nicht mehr nachweisbar war.

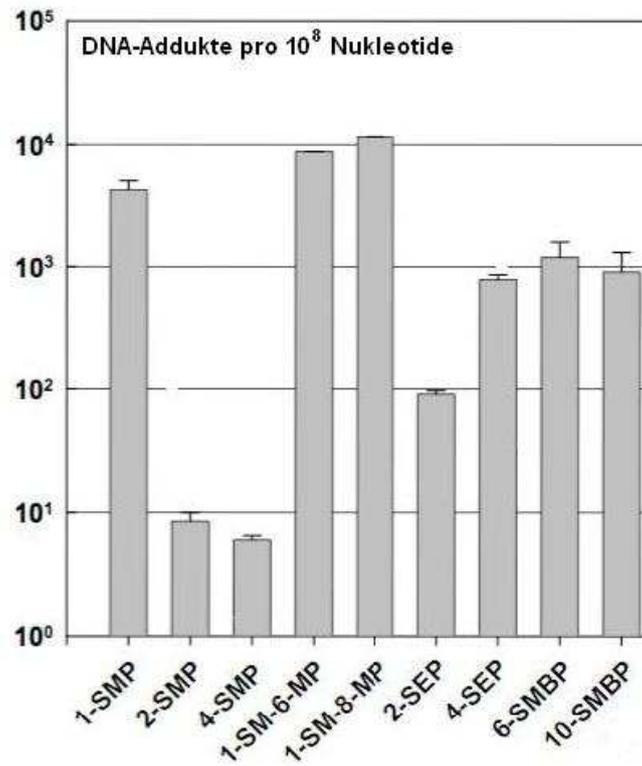


Abbildung 3.1: Ergebnisse von Donath (2008) zur in-vitro-DNA-Adduktbildung durch benzyliche Schwefelsäureester von alkPAK. Hierzu wurden die Schwefelsäureester (20 μ M) für 60 min mit wässrige Heringssperma-DNA-Lösung (1 mg/ml) inkubiert. Die Anzahl der DNA-Addukte wurde mittels ³²P-Postlabeling bestimmt. Angegeben sind die DNA-Addukte pro 10⁸ Nukleotide für die jeweiligen Schwefelsäureester.

Verwendet man im Ames-Test hSULT profiziente Salmonellen und die benzyllischen Alkohole als Vorläufer, so ist durch die Substratspezifität und Kinetik der hSULT eine Beurteilung der reinen Reaktivität der Schwefelsäureester nur begrenzt möglich.

Die hier beobachtete tendenzielle Korrelation zwischen der Halbwertszeit in Wasser und der Mutagenität im Ames-Test ist jedoch nicht auf andere Verbindungen ohne Weiteres übertragbar, da in anderen Fällen durchaus Probleme mit der Membranpenetration oder der Hydrolyse im Medium auftreten können.

Tabelle 3.2: Mutagenität von benzyllischen Schwefelsäureestern der alkPAK im Ames-Test mit *S. typhimurium* TA 1538. Die Daten von Donath (2008) sind in Revertanten pro nmol Substanz als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Substanz	spez. Mutagenität, Revertanten/nmol
1-SMP	250±80
2-SMP	4±1
4-SMP	5±3
1-SM-6-MP	660±150
1-SM-8-MP	1200 *
1- α -SEP	2±0,3
2- α -SEP	7±3
4- α -SEP	180±40
6-SMBP	870±170

* Ergebnis eines einzelnen Experiments

3.3 Sulfonierung benzyllischer Alkohole durch humane Sulfotransferasen

Die in Tab. 2.6 aufgeführten Daten geben Aufschluss über den Einfluss der Art der Alkylgruppe, da sich die untersuchten Hydroxyalkylpyrene nur in dieser Hinsicht unterscheiden, nicht jedoch in der Position. Zum Einen weisen einige hSULT-Formen generell gegenüber einer Art der Alkylgruppe höhere Umsatzraten auf, zum anderen werden von manchen hSULT-Formen die maximalen Umsatzraten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen erreicht. So waren die Sulfonierungsraten von 2-HMP mit Ausnahme von hSULT1A1, 1A2 und 1B1 um den Faktor 2 bis 42 größer als die von 2- α -HEP. Letzteres zeigte mit hSULT1A2 die höchste Sulfonierungsrate. Weiterhin wurde für hSULT1C2 eine besonders hohe Bildungsrate von 2-SMP gefunden und hSULT1E1 zeigte bereits bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration die maximale Bildung von 2-SMP.

Mit hSULT1A1, 1A2, 1C2 und 1E1 als hauptsächlich an der Sulfonierung beteiligten SULT-Formen ist die Leber das Organ, in dem die Schwefelsäureester überwiegend gebildet werden können (s. Tab. 1.4). Neben der Expression der entsprechenden SULT ist für die Sulfonierung in vivo eine ausreichende Konzentration des Cosubstrats PAPS sowie die Bioverfügbarkeit der benzyllischen Alkohole notwendig. Auch diese Anforderungen sind in der Leber erfüllt, da die katalytisch effizientere Form der PAPS-Synthase, PAPS-Synthase 2 in hohem Umfang in der Leber exprimiert wird (Fuda u. a., 2002) und auch die zur benzyllischen Hydroxylierung notwendigen CYP vorkommen. Außerdem ist die menschliche Leber mit 80 ml/min/100 g sehr gut durchblutet, was für den Transport der Substrate und Produkte von Vorteil ist. In Hinblick auf den Antransport der Substrate gilt es zu beachten, dass es 50 ml Pfortaderblut/min/100 g Leber ist, welches mögliche Substrate direkt vom Darm in die Leber führt (Klinke u. a., 2005). Die Expression der hSULT1C2 ist insgesamt im adulten Menschen sehr schwach, stärker jedoch im Fötus. Daher ist dieses Enzym für die Zielorganabschätzung nur für den Sonderfall der Gestation von Bedeutung. Die höchste Aktivität der hSULT1E1 ist bei der niedrigsten Konzentration von 1,6 μM aufgetreten. Da niedrigere Konzentrationen nicht getestet wurden, ist das Erreichen noch höherer Bildungsraten nicht ausgeschlossen. Für die in-vivo-Situation sind hohe Aktivitäten bei niedrigen Substratkonzentrationen besonders wichtig, da die benzyllischen Alkohole nur in niedrigen Konzentrationen auftreten (Abs. 1.1). Neben der Leber sind daher auch Mamma, Endometrium und Jejunum als Orte der Sulfonierung in Betracht zu ziehen, wengleich hier die weiteren Bedingungen (Versorgung mit PAPS und benzyllischen Alkoholen) vermutlich nicht so optimal sind wie in der Leber.

3.4 Transport benzyllischer Schwefelsäureester

3.4.1 Albuminbindung

Im Vergleich mit anderen Dissoziationskonstanten wie $0,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ für *p*-Aminohippurat (Bakhiya u. a., 2006), $0,77 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ für DHEA-S (Puche und Nes, 1962) und $0,37 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ für Ibuprofen (Kragh-Hansen u. a., 2002) wird deutlich, dass es sich bei der Bindung von 2-SMP an BSA (Dissoziationskonstante: $0,059 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) um eine hoch affine Bindung mit niedriger Dissoziationskonstanten handelt. Die von Glatt u. a. (2003a) bestimmte, etwa zehnfach höhere Dissoziationskonstante für die Bindung von 1-SMP an BSA ist aufgrund der großen methodischen Unterschiede sowie der unterschiedlichen Struktur der beiden Schwefelsäureester nicht vergleichbar. Die mittels Fluoreszenzanalyse ermittelte niedrig affine Bindungsstelle ist methodische bedingt und dürfte aufgrund der zu erwartenden geringen in-vivo-Konzentration von SMP ohne Bedeutung sein.

Desweiteren kann aus den Ergebnissen zur Modulation der SMP-BSA-Bindung die Schlussfolgerung gezogen werden, dass DHEA-S ein positiv allosterischer Effektor ist und kein kompetitiver Inhibitor (Hübel, 2007). Demnach wäre, ginge man nur von den zwei Bindungsstellen nach Sudlow aus, eine Bindung des 2-SMP an Bindungsstelle I anzunehmen. Da die Klassifikation der Bindungsstellen am Albumin nach Sudlow jedoch insbesondere auf Substanzen, die eine hoch affine Bindung an Albumin aufweisen, nicht immer zutrifft, ist diese Schlussfolgerung nicht gesichert (Kragh-Hansen u. a., 2002).

3.4.2 Zelluläre Aufnahme über humane organische Anionentransporter

Der Vergleich der hier bestimmten K_i -Werte (hOAT1 5,1 μM , hOAT3 und hOAT4 1,9 μM) mit den K_m -Werten der Standardsubstrate (hOAT1 10 μM , hOAT3 und hOAT4 2 bis 4 μM) zeigt die hohe Affinität des Schwefelsäureesters zu den Transportern. Diese Interaktion ist jedoch nicht zwangsläufig mit einem Transport der Sulfate gleichzusetzen, auch eine Blockade der Transportproteine ist denkbar.

Die Ergebnisse der Versuche mit ^{32}P -Postlabeling und HPLC-Analyse zeigen, dass hOAT1, 3 und 4 mit einer hohen Affinität benzylische Schwefelsäureester binden und transportieren. Sowohl das instabilere Isomer 1-SMP als auch das stabilere 4-SMP werden aufgenommen. Vergleicht man für die verschiedenen Transporter die Affinitäten von 4-SMP in Form der Inhibitionskonstanten mit den Aufnahmezeiten, so ist für die basolateralen Proteine hOAT1 und 3 eine höhere Affinität mit einer niedrigeren Aufnahme verbunden. Auf der luminalen Seite hingegen beobachtet man eine hohe Affinität wie auch Umsatzrate.

Die Ergebnisse zum Einfluss von BSA auf die Aufnahme von 2-SMP in hOAT1-profiziente Zellen zeigen, dass die Aufnahme von der freien Konzentration abhängig war. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Beobachtungen von Bow u. a. (2006), der ebenso beschreibt, dass lediglich das freie Substrat aufgenommen werden kann und nicht das proteingebundene. Die hohe Affinität der Albuminbindung ergibt im Zusammenhang mit der hohen Affinität der Transporter ein abgerundetes Bild, da die geringe freie Menge an Sulfat von den hochaffinen Transporter aufgenommen werden kann. Auch in vivo wird letztlich nur die freie Konzentration der Schwefelsäureester zur Aufnahme in die Tubuluszellen zur Verfügung stehen und kann dann effektiv in die Zellen transportiert werden.

3.5 Metaboliten in Urin und Fäzes

3.5.1 Mercaptursäuren

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 erwähnt worden ist, kann es sich bei der Bildung der Mercaptursäuren je nach Spezies um einen hepato-renalen, hepato-biliären oder einen rein hepatischen Prozess handeln. Für diese Arbeit ist die entsprechende Expression der beteiligten Enzyme bei der Ratte zu betrachten. Ausgehend von den SULT sind weiterhin die GST, γ -GT, DP und mNAT zu betrachten. Die SULT-Expression ist bei der Ratte stark auf die Leber fokussiert (vgl. Tab. 1.5). Unter den GST ist insbesondere die Form T2 für die Konjugation von Schwefelsäureestern von Bedeutung (Hiratsuka u. a., 1994). Sie wird sowohl cytosolisch als auch kernständig in Leber, Niere und Gastrointestinaltrakt exprimiert (Hessel, 2006). Die γ -GT-Aktivität ist bei Nagern in der Niere am höchsten, kann aber auch an den Plasmamembranen verschiedener Epithelzellen in Dünndarm, Pankreas, Nebenhoden sowie den Gallengängen der Leber nachgewiesen werden (Tate und Meister, 1981). Bei der DP handelt es sich ebenso um ein Enzym der Plasmamembran, das besonders in der Niere, aber auch in Lunge, Leber und Milz zu finden ist (Inamura u. a., 1994). Das letzte Enzym in der Reihe zur Bildung der Mercaptursäure ist die mNAT. Sie befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums in der Niere und der Leber (Duffel und Jakoby, 1985; Okajima u. a., 1984). Diese Enzymausstattung ermöglicht bei der Ratte somit entweder einen hepato-biliären oder hepato-renalen Mechanismus zur Bildung der Mercaptursäuren. Aufgrund einer fehlenden γ -GT-Aktivität direkt in der Leber ist eine rein hepatische Bildung nicht möglich. Eine hepato-biliäre Bildung würde auch eine Ausscheidung direkt über die Galle und somit die Fäzes begünstigen, bei einer hepato-renalen Bildung ist eine renale Ausscheidung zu vermuten (Hinchman u. a., 1998). Da bei der Mercaptursäurebildung ausgehend von 1-SMP die renale Elimination überwiegt, könnte für 1-MPMA der hepato-renale Mechanismus die größere Rolle spielen.

Die ausgeschiedenen Mengen und die Verteilung auf biliäre und renale Ausscheidung ist insgesamt vergleichbar mit den Ergebnissen von Ma (2001), die im Urin 14 bis 197 ppm und in den Fäzes 18 bis 264 ppm bei männlichen adulten Ratten des Stammes Wistar fand. Die hier mit 83,3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM um den Faktor drei niedrigere Dosis an 1-HMP hatte somit keinen Einfluss auf die Ausscheidung an 1-MPMA. Zur Verwendung von 1-MPMA als Biomarker für eine Belastung mit 1-MP oder 1-HMP fehlen daher weiterhin Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit. Nichts desto trotz ist der Nachweis von 1-MPMA in Urin und Fäzes ein Indikator für die intermediäre 1-SMP-Bildung.

Die Ergebnisse zur fäkalen und renalen Elimination von 1,8-DMPMA weichen von

denen zur 1-MPMA deutlich ab (Tab. 2.9, 2.11). Die Gesamtmenge der Mercaptursäure entspricht nur einem Zehntel der Menge, die bei 1-HMP ausgeschieden wird, und Elimination erfolgt bevorzugt über die Fäzes ($\approx 90\%$ gegenüber $\approx 30\%$ bei 1-MPMA). Diese Unterschiede können mehrere Ursachen haben:

- Es wird anteilig an der applizierten Dosis weniger 1,8-DMPMA gebildet, da 1-HM-8-MP-Metaboliten von den beteiligten Enzymen schlechter umgesetzt werden.
- Es treten noch weitere Biotransformationen auf, die zu anderen Mercaptursäuren und Metaboliten führen.
- Aufgrund von Enzym- und Transporterspezifitäten ist der hepato-biliäre Bildungsweg für 1,8-DMPMA gegenüber dem hepato-renalen bevorzugt.

Keine dieser Ursachen lässt sich nach momentanem Kenntnisstand vollständig bestätigen oder ausschließen, daher sollen einige weitere Ergebnisse hierzu ergänzend diskutiert werden.

Die Bildung von 1,8-DMPMA setzt das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an 1-SM-8-MP voraus. Hier kann ein Vergleich mit den *in vivo* ermittelten DNA-Addukten als weiterem indirekten Biomarker für die Bildung des Schwefelsäureesters erfolgen. Nach Daten von Donath (2008) weisen Tiere 1,5h nach einer 1-HMP bzw. 1-HM-8-MP Applikation in der Leber 813 ± 99 respektive 1000 ± 337 Addukte pro 10^8 Nukleotide auf. Diese Zahlen legen keinen Unterschied im Umfang der Sulfonierung von 1-HMP und 1-HM-8-MP nahe.

Hinsichtlich möglicher GST-, γ -GT-, DP- und mNAT-Aktivitätsunterschiede im Umsatz dieser beiden Alkylpyrenederivate können keine Aussagen getroffen werden. Es sei jedoch auf die Ergebnisse von Hessel (2006) verwiesen, die beim Vergleich der katalytischen Effizienz der rGST T2 hinsichtlich der drei Monomethylpyrenylsulfate Unterschiede um den Faktor sieben feststellte (V_{max}/K_m für 1-SMP 0,3 und für 4-SMP 2 ml/mg/min). Eine niedrigere Umsatzrate von 1-SM-8-MP durch GST wäre somit in diesem Zusammenhang nicht unwahrscheinlich, kann aber aufgrund der schnellen Hydrolyse des Sulfates nicht experimentell belegt werden (Abs. 2.2.1).

In Hinblick auf unterschiedliche Enzym- und Transporterspezifitäten werden ergänzend Ergebnisse zur DNA-Adduktverteilung und hOAT-Aktivitäten betrachtet. In Untersuchungen von Donath (2008) werden deutliche Unterschiede bei der Verteilung der DNA-Addukte nach 1-HMP und 1-HM-8-MP-Behandlung auf Leber und Niere beobachtet. Nach 1,5 Stunden führt 1-HMP zu einem renalen Adduktniveau, das dem in der Leber vergleichbar ist. Bei 1-HM-8-MP hingegen ist das Adduktniveau in der Niere siebenfach niedriger als in der Leber. Dies spricht für einen Unterschied bei der

systemischen Verteilung der gebildeten Sulfate 1-SMP und 1-SM-8-MP. Eine im Vergleich zu 1-SMP niedrigere renale Konzentration von 1-SM-8-MP könnte auch eine Ursache für eine geringere renale Mercaptursäurebildung sein.

Die wohl konkretesten Ergebnisse zu den Unterschieden zwischen 1-MPMA und 1,8-DMPMA stammen aus gemeinsamen Untersuchungen mit Bakhiya u. a. (2007). In Anlehnung an die Experimente zum Transport von 4-SMP durch hOAT (Abs. 2.3.2) wurde die zelluläre Aufnahme der Mercaptursäuren *in vitro* untersucht. In HEK293-Zellen, die hOAT1 oder hOAT3 exprimieren, wurde 1-MPMA im Vergleich zu Kontrollzellen um den Faktor 3 bzw. 1,75 erhöht aufgenommen. Für 1,8-DMPMA konnte ein geringer Transport vermittelt durch hOAT3 (1,25-fach zur Kontrolle, nicht signifikant) festgestellt werden. Bei hOAT1-Expression ist für 1,8-DMPMA allerdings kein Transport zu beobachten. Dieser deutliche Unterschied hinsichtlich der Transporterspezifität könnte eine mögliche Erklärung für die geringe renale Ausscheidung der 1,8-DMPMA sein: extrarenal gebildete 1,8-DMPMA könnte nicht in gleichem Umfang wie extrarenal gebildete 1-MPMA aufgenommen werden. Die OAT sind über die Spezies hinweg hoch konserviert, so dass die Ergebnisse, die mit humanen Formen gewonnen wurden, vermutlich auf die Ratte übertragbar sind.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die gegenüber 1-MPMA geringere Menge an 1,8-DMPMA und ihre Fokussierung auf die fäkale Ausscheidung wahrscheinlich auf andere Bildungseffizienzen für die GSH-Konjugate oder weitere Vorstufen zur Mercaptursäure, eine Bildung weiterer Metaboliten der 1,8-DMPMA sowie eine geringere systemische Verteilung des 1-SM-8-MP zurückzuführen ist. Auch die geringe Aufnahme von 1,8-DMPMA durch OAT in die Tubuluszellen der Niere wäre eine mögliche Erklärung für die geringe renale Sekretion von 1,8-DMPMA gegenüber 1-MPMA.

Letztlich ist das Auftreten von 1,8-DMPMA ein indirekter Nachweis für die intermediäre Bildung von 1-SM-8-MP. Die Eignung von 1,8-DMPMA als Biomarker ist jedoch aufgrund des noch geringeren Dosisanteils im Vergleich zum 1-MPMA und der hauptsächlich fäkalen Ausscheidung fraglich.

3.5.2 Carbonsäuren

Sowohl nach 1-HMP als auch nach 1-HM-8-MP Behandlung dominieren jeweils die entsprechenden Carbonsäuren das renal ausgeschiedene Metabolitenspektrum. Im Fall des 1-HM-8-MP tritt kein zweiter vergleichbar intensiver Metabolit auf, wohingegen bei 1-HMP neben der 1-PCS auch ein phenolischer Schwefelsäureester der 1-PCS in ähnlicher Intensität zu finden ist. Insgesamt sind somit die Carbonsäuren die dominierenden Metaboliten im Urin nach Behandlung den benzyllischen Alkoholen.

Quantitative Angaben werden im Folgenden jedoch nur zu 1-PCS gemacht, da zur Bestimmung der α -OH-8-M-1-PCS kein Standard zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse zur 1-PCS-Ausscheidung können mit den Untersuchungen von Ma verglichen werden. Nach einer Applikation von radioaktivem [^{14}C]1-HMP (40 $\mu\text{mol/kg KM}$) bei drei männlichen Ratten finden sich im Schnitt 30% Radioaktivität im 24h-Urin wieder. Der Anteil der 1-PCS an den renal ausgeschiedenen Metaboliten beläuft sich auf etwa 10%, wobei je nach Tier die Anteile zwischen 5 und 29,5% schwanken. In Bezug auf die gesamte applizierte Dosis ergibt sich aus diesen Zahlen ein Anteil der 1-PCS von etwa 3%, wobei die interindividuellen Unterschiede in Hinblick auf den Vergleich der Daten berücksichtigt werden müssen (Ma, 2001).

Der mittlere prozentuale Anteil der 1-PCS an der applizierten Dosis von 83,3 $\mu\text{mol/kg KM}$ wurde in dieser Arbeit direkt mittels UPLC-MS/MS bestimmt. Er betrug 1,8%, wobei die Werte der einzelnen Tiere zwischen 0,6 und 2,4% lagen. Zieht man nun die interindividuellen Unterschiede in Betracht, sowie die unterschiedlichen Dosen und Messverfahren, so liegen die Werte von Ma im gleichen Bereich wie die hier erzielten Ergebnisse. Im Vergleich zu Ma (40 $\mu\text{mol/kg KM}$) wurde hier jedoch die doppelte Dosis eingesetzt, was sich jedoch nicht in den Ergebnissen zeigt. Zu diesem Punkt ist anzumerken, dass insgesamt Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit fehlen.

Der Anteil der 1-PCS am Metabolitenspektrum unterstreicht die Bedeutung der ADH und ALDH für die Detoxifizierung des 1-HMP und auch des 1-MP. Interessant sind in dieser Hinsicht die Ergebnisse von Kollock (2007) zu der Aktivität der einzelnen humanen ADH. Die im Umsatz von benzyllischen Alkoholen besonders aktive Form hADH2 unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Ethanolumsatzraten deutlich von der orthologen rADH2 (Hoog u. a., 2001). Dies legt ein unterschiedliches Substratspektrum nahe, so dass sich ein Rückschluss vom Metabolismus der Ratte auf den des Menschen als schwierig gestaltet.

3.6 Modulation des Metabolismus

3.6.1 Inhibitoren der Sulfotransferasen

Pentachlorphenol

Mit Pentachlorphenol wurde in dieser Arbeit ein sowohl aus in-vitro- als auch aus in-vivo-Untersuchungen bekannter kompetitiver Inhibitor der Sulfotransferaseaktivität eingesetzt. In-vitro-Nachweise zur Hemmung einzelner rSULT-Aktivitäten wurden bisher nur für rSULT1A1 und 1C1 durchgeführt (Glatt, 2002). Bei den humanen Formen hemmt Pentachlorphenol hSULT1B1 und bindet auch an hSULT1A1 und 1C2, ohne dass hierfür eine Hemmung nachgewiesen wäre (Allali-Hassani u. a., 2007). Die

Dosis von 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM für Pentachlorphenol orientiert sich an Beispielen aus der Literatur wie den Untersuchungen von Chidgey u. a. (1986), die einen Rückgang in der Ausscheidung von Mercaptursäuren beobachten konnten. Neben der Hemmung der SULT liegen in der Literatur auch Hinweise vor, dass Pentachlorphenol die cytosolischen Arylamin-*N*-Acetyltransferasen (Shinohara u. a., 1986) und bestimmte Formen der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH, Maus, Leber), der GST (Pferd) (Moorthy und Randerath, 1996) und der ADH (Hefe) (Stockdale und Selwyn, 1971) hemmt. Im Gegensatz zu mEH, GST und ADH sind die Arylamin-*N*-Acetyltransferasen für den Metabolismus von alkPAK nicht von Bedeutung. Die mEH hydrolysiert die Epoxide der alkPAK. Die ADH vermittelt die Bildung der benzyllischen Carbonsäuren und die GST katalysiert die Glutathionkonjugation der benzyllischen Sulfate. Für den in dieser Arbeit betrachteten Metabolismus der Seitenkette ist daher eine mögliche Inhibition der ADH und GST zu betrachten. Eine Hemmung der ADH würde zu einer erhöhten Substratkonzentration für die SULT führen und könnte somit die kompetitive Hemmung der SULT durch Pentachlorphenol aufheben. Die Hemmung der GST würde die Bildung des GSH-Konjugates und somit der Mercaptursäure reduzieren. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob und in welchem Umfang die Inhibition dieser Enzyme bei der Ratte auftritt.

Die Verabreichung von Pentachlorphenol hatte bei anschließender Gabe von 1-HMP eine deutliche Reduktion der Mercaptursäuresekretion (Urin -80 %, Fäzes -30 %) zur Folge, bei 1-HM-8-MP Gabe ließ sich jedoch eine tendenzielle Erhöhung der fäkalen Ausscheidung (+25 %) erkennen. Nimmt man an, dass Pentachlorphenol lediglich die SULT hemmt und der resultierende Eduktmangel zur geringeren Ausscheidung an Mercaptursäure führt, so deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass entweder unterschiedliche SULT an der Umsetzung beteiligt sind und/oder Affinitätsunterschiede der SULT zu 1-HM-8-MP und 1-HMP vorliegen. Diese Thesen werden durch die Ergebnisse von Donath (2008) zur DNA-Adduktbildung in Leber und Niere der Tiere unterstützt. Tiere, denen 1-HMP appliziert wurde, wiesen nach Pentachlorphenol-Vorbehandlung sowohl reduzierte Adduktniveaus in der Leber wie in der Niere auf. Nach der Applikation von 1-HM-8-MP zeigte sich jedoch nur in der Niere eine Reduktion. Es kann somit vermutet werden, dass entweder die höhere Affinität von 1-HM-8-MP zu den entsprechenden SULT durch Pentachlorphenol in geringerem Umfang gehemmt wird oder nicht durch Pentachlorphenol gehemmte Formen an der Sulfonierung von 1-HM-8-MP beteiligt sind.

In wieweit eine Hemmung der GST durch Pentachlorphenol zur Reduktion der Mercaptursäurebildung beiträgt, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Mercaptursäureausscheidung nicht beurteilt werden. Der signifikante Rückgang der DNA-Adduktzahlen nach der Pentachlorphenol-Behandlung spricht jedoch für eine Hemmung der SULT, so dass man davon ausgehen kann, dass dies die Ursache für die

geringere 1-MPMA-Ausscheidung ist. Der Einfluss einer möglichen ADH-Hemmung auf die Daten zur Mercaptursäure ist schwer abzuschätzen. Eine Hemmung würde zu einer erhöhten Alkohol- und somit Eduktkonzentration für die SULT führen. Dies könnte entweder einen höheren Umsatz oder eine Substrathemmung zur Folge haben. Da aber eine Reduktion der Mercaptursäure im Fall des 1-HMP und der DNA-Addukte sowohl bei 1-HMP wie auch bei 1-HM-8-MP beobachtet werden kann, ist von einer SULT-Hemmung auszugehen. Diese könnte zum Einen direkt durch Pentachlorphenol, zum Anderen durch eine Substrathemmung bedingt sein. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Hemmung aufgrund einer höheren Eduktkonzentration niedriger ausfällt als eine reine SULT-Hemmung durch Pentachlorphenol.

Aufschluss darüber, ob eine ADH-Hemmung vorliegt, geben die Daten zur Carbonsäureausscheidung. Die Reduktion der 1-PCS-Ausscheidung nach Pentachlorphenol-Gabe legt eine ADH-Hemmung nahe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Ausscheidung von 1-PCS bei Pentachlorphenol-Vorbehandlung um 91 % geringer (Abb. 2.13). Auch bisher unveröffentlichte Untersuchungen von KOLLOCK zeigen, dass Pentachlorphenol ein kompetitiver ADH-Inhibitor ist. Des Weiteren zeigte Kollock (2007), dass die Affinität für 1-HM-8-MP beispielsweise bei der hADH2 deutlich höher liegt (K_m 6,4 μ M) als für 1-HMP (K_m 76 μ M), ist davon auszugehen, dass ähnliche Affinitätsunterschiede bei der Ratte vorliegen. Damit ließe sich erklären, warum bei der α -OH-8-M-1-PCS-Ausscheidung bei Pentachlorphenol-Behandlung kein Effekt zu sehen ist (Abb. 2.14).

In Hinblick auf die Modulation durch Pentachlorphenol lässt sich somit abschließend festhalten, dass die signifikant verringerte renale Ausscheidung von 1-MPMA als Bestätigung für eine Beteiligung der SULT an der Mercaptursäurebildung gesehen werden kann. Die Daten der 1-HM-8-MP behandelten Tiere legen ausgehend von den renalen DNA-Adduktniveaus die gleiche Schlussfolgerung nahe, werden jedoch durch die Mercaptursäuredaten nicht gestützt. Des Weiteren deuten die bei 1-HMP und 1-HM-8-MP unterschiedlichen Anteile von renal und fäkal ausgeschiedener Mercaptursäure auf die Existenz eines hepato-renalen und eines hepato-biliären Bildungswegs der Mercaptursäure hin. Die Gabe von Pentachlorphenol scheint sich jedoch nur auf ersteren auszuwirken, sei es durch eine direkte SULT-Hemmung oder eine Hemmung durch Substratzunahme aufgrund der ADH-Hemmung. Diese kompetitive Hemmung der ADH kann bei der Bildung von 1-PCS beobachtet werden, nicht jedoch bei α -OH-8-M-1-PCS. Somit wird durch die Modulation mit Pentachlorphenol auch die Bedeutung der ADH für die Detoxifizierung der alkPAK deutlich.

Quercetin

Als weitere Substanz zur Hemmung der SULT-Aktivität *in vivo* wurde Quercetin eingesetzt. Quercetin ist nach den Untersuchungen von Allali-Hassani u. a. (2007) ein universeller SULT-Inhibitor, der vermutlich an der PAP/PAPS-Bindungsstelle bindet. Die Dosis von 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KM orientiert sich an der für den Menschen zur Nahrungsergänzung vorgeschlagenen Höchstdosis von 1 g/Tag (NaturalEyeCare, Stand 16.03.2007; NutraSanus, Stand 16.03.2007). Mit der Nahrung werden üblicherweise bis zu 34 mg/Tag aufgenommen (Scalbert und Williamson, 2000).

Da lediglich die renale Ausscheidung von 1-MPMA, nicht jedoch die fäkale, sowie die Ausscheidung von 1,8-DMPMA und der entsprechenden Carbonsäuren durch Quercetin gemindert wurde, kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht von einer Hemmung der SULT durch Quercetin ausgegangen werden. Auch die von Donath (2008) erhobenen Daten zur DNA-Adduktbildung weisen keine Modulation durch Quercetin auf. Ursache hierfür könnte die geringe Bioverfügbarkeit an freiem Quercetin, der umfassender Metabolismus sowie der zeitliche Verlauf von Aufnahme und Metabolismus sein, da diese Faktoren zu einer geringen Wirkkonzentration von unmetabolisiertem Quercetin in der Leber führen.

Nach einer Studie von Chen u. a. (2005) liegt die Bioverfügbarkeit von unverändertem Quercetin nach oraler Einmalapplikation bei 5,3%. Berücksichtigt man des Weiteren die verschiedenen glucuronidierten und sulfonierten Metaboliten, erreicht man eine Bioverfügbarkeit von 59,1%. Die wichtigsten Metaboliten in der Leber sind nach Graf u. a. (2005) methyliertes und sulfoniertes Quercetinmonoglucuronid und Quercetindiglucuronid. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der oralen Aufnahme von Quercetin und seinen Glykosiden zeigen die Untersuchungen von Manach u. a. (1997), Graf u. a. (2005) und Chen u. a. (2005) unterschiedliche Ergebnisse. Die maximale Plasmakonzentration der Metaboliten wird bei Manach u. a. nach 12 h (Quercetin) bzw. 24 h (Rutin) erreicht. Die Applikation des Quercetin-4-glykosids bei Graf u. a. führt bereits nach 1 h zu einem Maximum an Metaboliten im Plasma. Und Chen u. a. zeigt für Quercetin eine maximale Plasmakonzentration der Metaboliten nach schon 0,27 h. In dieser Arbeit wurde eine Zeitdifferenz zwischen oraler Gabe des Quercetins und der i.p.-Applikation der benzyllischen Alkohole von 1,5 h gewählt. Sie orientiert sich zum einen an der Quercetinaufnahme (20% nach 2 h (Manach u. a., 1997)) und einer stabilen Gleichgewichtslage hinsichtlich des Metabolismus, wie sie durch eine gleichbleibende Plasmakonzentration der Metaboliten angezeigt wird (Chen u. a., 2005).

Die beobachtete Reduktion der renalen 1-MPMA-Exkretion könnte als Hinweis auf eine möglich Interaktion von Quercetin oder seinen Metaboliten mit Enzymen des fremdstoffmetabolisierenden Systems, insbesondere der SULT gesehen werden. Genauere Untersuchungen mit größeren Tierzahlen unter Berücksichtigung des Querce-

tinmetabolismus könnten jedoch erst zu abschließenden Schlussfolgerungen führen.

3.6.2 Inhibitoren der Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen

Ethanol

Eine einmalige akute Gabe von Ethanol wirkt im Fremdstoffmetabolismus in erster Linie als konkurrierendes Substrat für CYP, ADH, ALDH und Katalase. Auf diese Weise kann Ethanol dosisabhängig die Detoxifizierung anderer Fremdstoffe inhibieren. Auch weitere Wirkungen wie die Störung des Redox-Gleichgewichts und daraus resultierende Hemmungen z.B. der Uridindiphosphatglucuronosyltransferase sind von der Höhe der Exposition abhängig. Ein chronische Verabreichung von Ethanol hat weiter reichende Folgen für das detoxifizierende System. Die Induktion von CYP2E1 führt beispielsweise zu erhöhten Hydroxylierungsraten bestimmter Medikamente wie Paracetamol und Chlorzoxazon und verstärkt somit deren Hepatotoxizität. Die hier gewählte einmalige Gabe von Ethanol 10 min vor Applikation des benzyllischen Alkohols zielt auf eine Konkurrenz an den Enzymen des fremdstoffmetabolisierenden Systems ab.

Im Vergleich zu den für 1-HMP ermittelten Daten von Ma u. a. (2002) zeigt sich aufgrund der Gruppengröße von je fünf Tieren, der etwas geringeren interindividuellen Variation und der in den vorliegenden Untersuchungen höheren Ethanoldosis ein stärkerer Effekt bei der Ausscheidung der entsprechenden Mercaptursäure. In den Untersuchungen von Ma u. a. verdoppelte sich bei einer Ethanolgabe von 0,8 g/kg KM die gesamte mittlere Ausscheidung von 1-MPMA, während die doppelte Ethanoldosis in dieser Arbeit zu einer 13-fachen Menge an 1,8-DMPMA führt. Für die Ausscheidung der Carbonsäure α -OH-8-M-1-PCS liegen jedoch keine Vergleichsdaten aus der Arbeit von Ma u. a. vor. Die hier beobachtete Verringerung um 56 % entspricht jedoch den Erwartungen, dass eine Ethanolgabe die Carbonsäurebildung hemmt, bei gleichzeitigem Anstieg der Mercaptursäureausscheidung aufgrund der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Oxidation und Sulfonierung.

Im Gegensatz zu den deutlicheren Ergebnissen für die Mercaptursäuren fällt der Vergleich für die DNA-Addukt-Daten von 1-HMP von Ma u. a. und 1-HM-8-MP von Donath unter Ethanoleinfluss anders aus. Ist für 1-HMP durch Ethanol eine Steigerung des Adduktniveaus in der Leber um 1500 % zu beobachten (Ma u. a., 2002), so liegt der Anstieg bei 1-HM-8-MP lediglich bei 305 % trotz der doppelten Ethanoldosis (Donath, 2008). Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Tendenzen bei der DNA-Adduktbildung im Vergleich zur Mercaptursäureausscheidung können die hier erhaltenen Daten wiederum als Beleg für die Hypothese der unterschiedlichen Bildungswege für 1-MPMA und 1,8-DMPMA (Abs. 1.3.3) gewertet werden. Offensichtlich führt

eine Erhöhung der hepatischen Sulfokonjugat-Konzentration bei 1-HM-8-MP zu einer effektiveren Detoxifizierung über den Mercaptursäure-Weg, als dies bei 1-HMP der Fall ist. Dies könnte zum einen durch die unterschiedlichen Affinitäten der beteiligten Enzyme und zum anderen, wie die unterschiedlichen Ausscheidungswege nahelegen, auch durch ihre andere Lokalisation bedingt sein. Insgesamt weisen diese Ergebnisse jedoch auf die Bedeutung der ADH für die Detoxifizierung von alkPAK hin. Die vielfach diskutierte mögliche kanzerogene Wirkung von Alkohol könnte durch diesen hier beobachteten synergistischen Effekt teilweise erklärt werden (Boffetta und Hashibe, 2006).

4-Methylpyrazol

4-Methylpyrazol ist ein spezifischer, kompetitiver ADH-Hemmstoff. Ebenso wie Pyrazol selbst bildet es einen Komplex mit ADH und NAD^+ , führt aber nicht zur Katalaseinhibition wie die unsubstituierte Ausgangsverbindung. In Deutschland ist es seit 2006 unter dem Namen Fomepizol als Antidot zur Behandlung von Ethylenglykolvergiftungen zugelassen (Gensthaller und Gräfe, 2006). Für Ratten liegen die K_i -Werte von 4-Methylpyrazol gegenüber Ethanol *in vitro* und *in vivo* im niedrigen mikromolaren Bereich (*in vitro*: 0,11 μM (Plapp u. a., 1984), 0,43 μM (Cornell u. a., 1983); *in vivo*: 1,4 $\mu\text{mol/kg KM}$ (Plapp u. a., 1984)). Die in diesen Untersuchungen applizierte Dosis von 1 mmol/kg KM liegt etwa 700-fach über dem für Ethanol *in vivo* bestimmten K_i -Wert von 1,4 $\mu\text{mol/kg KM}$ und fünffach über der für den Menschen empfohlenen initialen Behandlungsdosis von 0,18 mmol/kg KM. Sie wurde zum Erhalt von vergleichbaren Daten in Anlehnung an Untersuchungen von Ma u. a. (2002) zum Einfluss von 4-Methylpyrazol auf den Metabolismus von 1-HMP gewählt.

Bei Ma u. a. führte die Methylpyrazol-Gabe bei gleichzeitiger Gabe von 1-HMP während der ersten 24 h nach der Applikation zu einem 15-fachen Anstieg der Mercaptursäureausscheidung. Die Hemmung der Oxidation des 1-HMP durch die ADH führte somit zu einer verstärkten Schwefelsäureesterbildung, die indirekt durch die Mercaptursäureausscheidung nachgewiesen wurde.

Der in dieser Arbeit beobachtete Effekt mit einer dreifachen Erhöhung der 1,8-DMPMA-Ausscheidung nach 4-Methylpyrazol-Gabe entspricht in der Tendenz der Erwartung. Er fällt allerdings deutlich schwächer aus als dies bei den Untersuchungen von Ma u. a. zum 1-MPMA der Fall war. Auch im Vergleich zu den hier mit Ethanol als ADH-Inhibitor erzielten Ergebnissen ist der Effekt deutlich schwächer. Wäre die Hemmung der ADH durch 4-Methylpyrazol aufgrund der hohen Affinität des 1-HM-8-MP nicht ausreichend, so sollte keine deutliche Verminderung in der Ausscheidung der entsprechenden Carbonsäure auftreten. Diese wird jedoch um 62 % reduziert. Vergleichbare Daten zu 1-PCS von Ma u. a. liegen allerdings nicht vor. Es kann somit nur festgehalten

werden, dass 4-Methylpyrazol ebenso wie Ethanol deutlich die renale Carbonsäure-Ausscheidung hemmt.

Weiterhin zeigen die Daten zur DNA-Addukt-Bildung von Donath (2008) sowohl für Ethanol als auch für 4-Methylpyrazol einen zwei- bis dreifachen Anstieg in der Niere bzw. Leber. Die Stärke des Effektes des 4-Methylpyrazols auf DNA-Addukte und Mercaptursäureausscheidung als jeweils indirekte Biomarker für eine gesteigerte Sulfonierung von 1-HM-8-MP ist mit dem Faktor 3 somit gleich. Allerdings ist der Effekt schwächer als im Falle des 1-HMP mit einer 28-fach höheren hepatischen DNA-Adduktmenge und 15-fach erhöhter 1-MPMA-Elimination. Aufgrund der bereits erwähnten möglichen höheren Effizienz der ADH im Umsatz von 1-HM-8-MP im Vergleich zu 1-HMP erscheint dieses Ergebnis plausibel. Die Verschiebung der Detoxifizierung von 1-HM-8-MP von der Carbonsäure hin zur Mercaptursäure über das Sulfokonjugat als reaktive Zwischenstufe unterstreicht wiederum die Bedeutung der ADH bei der Entgiftung von alkPAK.

Disulfiram

Mit Disulfiram (Bis-(diethylthiocarbamoyl)-disulfid), auch als Antabus bekannt, wird ein früher zeitweise medizinisch genutzter, irreversibler Hemmstoff der ADH eingesetzt. Die bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen verwendete Dosis von 0,25 mmol/kg KM führt nach Angaben von Lipsky u. a. (2001a) bei Ratten zu einer Reduktion der ALDH-Aktivität um 77 % gegenüber unbehandelten Kontrollen. Im Gegensatz zu Ethanol und 4-Methylpyrazol ist die inhibitorische Wirkung von Disulfiram *in vivo* nicht auf die Ausgangssubstanz, sondern auf Metaboliten zurückzuführen (Hu u. a., 1997). Zwar ist Disulfiram selbst *in vitro* auch in der Lage, die ALDH durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen im aktiven Zentrum zu hemmen. Aber der IC_{50} Wert hierfür liegt mit 36 μ M achtfach über dem der Metaboliten *in vivo* (*S*-Methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoylsulfoxid IC_{50} 4,6 μ M) (Lipsky u. a., 2001b). Die Hemmung der ALDH *in vivo* ist nicht auf Disulfidbrücken oder die Störung der Homotetramerbildung zurückzuführen, sondern auf kovalente Carbamoyl-Addukte an Cystein 302 im aktiven Zentrum. Dieser Befund sowie die Tatsache, dass eine Hemmung der Disulfiram-metabolisierenden Enzyme wie z.B. der CYP zu einer Aufhebung der Wirkung führen, zeigt den deutlichen Unterschied zwischen der *in-vitro*- und *in-vivo*-Inhibition von ALDH durch Disulfiram (Lipsky u. a., 2001a). *In vivo* ist daher zunächst die Aktivität einer Vielzahl von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen notwendig, um die inhibitorische Wirkung von Disulfiram zu ermöglichen. Dies ist in Hinblick auf eine Interaktion mit anderen Fremdstoffen zu berücksichtigen, da nicht nur Disulfiram den Metabolismus der Fremdstoffe hemmen kann, sondern

diese möglicherweise auch die Bildung der inhibitorisch wirkenden Disulfiram-Metaboliten reduzieren.

In Folge einer Disulfiramgabe sind weitere veränderte Enzymaktivitäten beschrieben worden. Die für ALDH beschriebene Modifikation von Cysteinresten durch Disulfiram-Metaboliten führt auch bei GST zu einem Aktivitätsverlust, der jedoch reversibel ist (Ploemen u. a., 1996). Des Weiteren sind Modulationen der Aktivitäten von CYP, Glutathionreduktasen und Glucuronosyltransferasen beschrieben. Nach Untersuchungen von Kharasch u. a. (1999) führt eine einmalige Gabe von Disulfiram bezüglich der CYP zu einer spezifischen Hemmung von CYP2E1. Eine chronische Disulfiramapplikation verursacht bei Ratten eine deutlichen Verringerung des Anteils an reduziertem GSH in Leber und Gehirn. Grund hierfür ist nach Nagendra u. a. (1994) eine verminderte Glutathionreduktase-Aktivität. Gesteigerte Aktivitäten der Uridindiphosphatglucuronosyltransferase sowie einer Anzahl weiterer Enzyme des Glucuronsäure-Metabolismus durch Disulfiram stellte Marselos u. a. (1976) in seinen Untersuchungen fest.

In vorangegangenen Analysen von Ma (2001) zeigte sich für 1-HMP tendenziell eine Erhöhung der DNA-Addukt-niveaus sowie der Mercaptursäureausscheidung. Die Variabilität innerhalb der von Ma behandelten Gruppe von fünf Tieren war jedoch recht hoch, so dass keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden konnte.

Hinsichtlich der ebenso im Rahmen dieses Projektes von Donath (2008) bestimmten Modulation DNA-Addukte durch Disulfiram zeigt sich bei den 1-HM-8-MP behandelten Tieren nach 1,5 h ein leichter Anstieg sowohl in Leber als auch in der Niere mit 153 bzw. 126 % gegenüber den Kontrollen. Nach 24 h ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr feststellbar.

Der Einfluss des Disulfirams auf die Mercaptursäurebildung von 1-HM-8-MP erweist sich als gegenläufig im Vergleich zu 1-HMP. Ein Grund hierfür könnte die höhere Effizienz der ALDH beim Umsatz des entsprechenden Aldehyds 1-Formyl-8-methylpyren (1-F-8-MP) sein. Denn nach Daten von Glatt u. a. (im Druck) zeigt die hALDH2 für den Umsatz des 1-F-8-MP im Gegensatz zu 1-FMP eine wesentlich höhere Effizienz (V_{max}/K_m 9100 bzw. 103 ml/min/mg). Hierfür sprechen auch die Ergebnisse zur Ausscheidung des Carbonsäure-Metaboliten, die trotz der Disulfiramgabe keine Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Die beobachtete, reduzierte Mercaptursäureausscheidung der Disulfiram behandelten Ratten könnte auf eine Hemmung der GST zurückzuführen sein. Nach Ploemen u. a. (1996) liegt der IC_{50} für Diethyldithiocarbamat der rGSTT bei 350 μ M. Diese Konzentration ist bei der verwendeten Dosis von 0,25 mmol/kg KM theoretisch erreichbar, wobei der umfassende Metabolismus sowie die Reversibilität der Hemmung berücksichtigt werden muss. Gerade die lange Zeitdifferenz von 17 Stunden zwischen Disulfiram- und 1-HM-8-MP-Applikation ermöglicht einen umfassenden Metabolismus des Disulfirams. Somit ist

aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten zu ALDH bzw. GST und den daraus resultierenden Substratverhältnissen *in vivo* offensichtlich bei 1-HM-8-MP die Hemmung der GST und nicht der ALDH zu beobachten, der umgekehrte aber Fall bei 1-HMP. Hinsichtlich der von Donath (2008) beobachteten leichten Erhöhung der hepatischen und renalen DNA-Addukt-niveaus ist es somit fraglich, ob diese durch eine ALDH-Hemmung oder vielmehr durch eine Hemmung der GST hervorgerufen werden.

Eine reduzierte Wirkung des Disulfiram durch eine 1-HM-8-MP vermittelte Hemmung der an seiner Bioaktivierung beteiligten Enzyme (Glutathionreduktase, S-Methyltransferase, CYP, GST, γ -GT, DP und mNAT) ist aufgrund der großen Zeitdifferenz von 17 h zwischen den Applikationen unwahrscheinlich.

3.7 Ausblick

Ein Aspekt, der sich in dieser Arbeit immer wieder als interessant erwiesen hat, ist die Frage nach dem Transport von alkPAK-Metaboliten. In vorangegangenen Untersuchungen von Ma (2001) zeigten sich bereits höhere DNA-Schäden in der Niere als in der Leber von 1-HMP behandelten Ratten, obwohl letztere die deutlich höhere Sulfonierungskapazität aufweist. Hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, dass 2-SMP hochaffin an Albumin bindet und 4-SMP durch OAT in Nierenzellen aufgenommen wird. Unklar ist jedoch der Export der z. T. instabilen benzyllischen Sulfate aus der Leberzelle, der Einfluss der Struktur der benzyllischen Sulfate auf die Albuminbindung und die Substratspezifität der OAT. Ebenso sind Messungen der Sulfatkonzentration *in vivo* und Versuche mit Modulatoren für die Albuminbindung und die entsprechenden beteiligten Transporter mögliche Fragestellungen künftiger Untersuchungen.

In den hier beschriebenen *in-vivo*-Ergebnissen zeigte sich für 1-HM-8-MP eine weniger ausgeprägte DNA-Schädigung in der Niere als bei der Behandlung mit 1-HMP (Donath, 2008). Weiterhin unterschied sich die Verteilung zwischen Urin und Fäzes für die entsprechenden Mercaptursäuren deutlich 3.5.1. Diese Beobachtungen deuten auf Unterschiede in der Substratspezifität der beteiligten Enzyme und Transporter hin. Für eine weitere Aufklärung des Metabolismus von alkPAK sind hierzu detaillierte Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* erforderlich.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bei der Probenaufarbeitung sowie als Fließmittel für die HPLC und UPLC wurde generell Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit $<0,06 \mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Die für die Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität und wurden entweder von Roth (Karlsruhe) oder Promochem (Wesel) bezogen. Für die Massenspektrometer wurden die Reinstgase Stickstoff und Argon verwendet. Alle anorganischen Säuren, Laugen und Salze waren mindestens von p.a. Qualität und wurden von Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) oder Acros (Geel, Belgien) bezogen. Alle alkPAK und alkPAK-Derivate wurden durch die Arbeitsgruppe Seidel, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, Lurup 4, 22927 Grosshansdorf zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurden folgende Chemikalien und Verbrauchsmaterialien verwendet:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 4500 g/l D-Glucose und L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat, Gibco BRL, Eggstein
- Fötales Kälberserum (FKS) Charge 548 B, Biochrom, Berlin
- Penicillin/Streptomycin: 5000 Einheiten/ml Penicillin G (Na-Salz), 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin-Sulfat, Gibco BRL, Eggstein
- Trypsin: 0,05 % in 0,53 mM EDTA \times 4Na, Invitrogen, Karlsruhe
- [Methyl- ^3H]Thymidin, 740 GBq/mmol, ICN Eschwege
- Gewebekulturschalen (T75) 75 cm 2 , Greiner, Frickenhausen
- Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe, 140 Einheiten/mg, 10 mg/2 ml, Roche Applied Science, Mannheim
- PAPS, Dr. Schneider, Abteilung Ernährungstoxikologie, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, 14558 Nuthetal

- BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford USA
- SPE-Säulen Chromabond C18 ec Polypropylensäulen in den Größen 100 mg, 1 ml und 200 mg, 3 ml, Macherey & Nagel, Düren
- Isolute Sorbent, MSPD C18, 40-70 micron, Separtis, Grenzach-Wyhlen
- Leere SPE Tubes 12cc Polypropylen, Phenomenex, Aschaffenburg
- Nutrient Broth Nr.2, Oxoid, Basingstoke UK
- Ampicillin Na-Salz, Biomol, Hamburg
- Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium mit 4500 g/l D-Glucose, Gibco BRL, Eggstein
- Blastocidin, Sigma-Aldrich, München

4.1.2 Geräte

- Ultra-Turax zur Herstellung der Fäzeshomogenate: Ultra-Turax T25 von IKA Labortechnik (Staufen)
- Zellzähler: Casy-1, Schärfer System (Reutlingen)
- Plattenlesegerät für [³H]Thymidin: Micro Beta Trilux von Wallac (Turku, Finnland)
- Zellernter: Cell Harvester von Inotech (Dottikon, Schweiz)
- Ultraschallsonde zur Herstellung der Salmonella-Cytosole: Vibra Cell von Bio-block Scientific (Frankreich)
- HPLC-System zur Analyse der Mikrosomeninkubationen: Hochdruckpumpe 600E, Autosampler 717AS, Photodiodenarray-Detektor 996PDA und Steuerungssoftware Millennium Version 2.10 von Waters (Eschborn) und Fluoreszenzdetektor RF-551 von Shimadzu (Duisburg)
- HPLC-MS zur Analyse der Halbwertszeiten der benzylichen Schwefelsäureester: Tandem-Massenspektrometer Triple Quadrupol Quattro II mit Elektrosprayionisation von Micromass (Altincham, UK) gekoppelt mit Waters Alliance separations module 2690 mit Steuerungssoftware MassLynx 3.10 von Waters (Eschborn)

- HPLC-System zur Analyse der Sulfonierungsaktivitäten und der Halbwertszeiten der benzyliischen Schwefelsäureester: Pumpensystem SLC-10Avp, Autosampler SIL-M10Avp und Fluoreszenzdetektor SPD-M10 Avp mit Steuerungssoftware Class-VP6 von Shimadzu (Duisburg)
- UPLC-MS zur Analyse der Metabolitenspektren, der Mercaptursäure und benzyliischen Carbonsäure-Proben: Tandem Quadrupol Massenspektrometer Micro-mass Quattro Premier XE gekoppelt an das UPLC-System ACQUITY mit Steuerungssoftware MassLynx V4.1 von Waters (Eschborn)

4.2 in-vitro-Inkubationen

4.2.1 Mikrosomeninkubationen

Biologisches Material

Die Rattenleberproben stammen von acht bis neun Wochen alten männlichen Fischer 344/Crl Ratten und wurden im Rahmen der Arbeit von Hollnagel (2004) gewonnen.

Die humanen Leberproben wurden von R. Santos vom Institut für Toxikologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Proben stammen von drei männlichen Patienten, zu deren medizinischer Vorgeschichte keine näheren Angaben vorliegen. Die vorgegebene Nummerierung der Proben wurde in dieser Arbeit beibehalten, d.h. es wurden die Proben der Personen 2, 4 und 5 eingesetzt.

Gewinnung der Mikrosomen

Die Mikrosomen werden durch Homogenisation und Zentrifugation aus Lebern von Ratten sowie aus humanen Leberproben gewonnen. Das letzte Pellet der von Glatt u. a. (1994d) beschriebenen Methode zur Cytosolgewinnung stellt die Mikrosomenfraktion dar. Nach einem Waschschrift mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) werden die Mikrosomen bis zur Inkubation bei -80 °C gelagert.

Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Mikrosomen wird nach der Bichinonsäuremethode mit einem Testkit von Pierce (Rockford, USA) durchgeführt. Hierbei führen Proteine zur Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I), welches als Bichinonsäurekomplex mit einer empfindlichen, photometrischen Messung bei 562 nm bestimmt werden kann. Die Bestimmungen erfolgen nach dem „Enhanced Protocol“ für einen Messbereich von 5-250 µg/ml.

Inkubation mit alkPAK

Die alkPAK werden mit 12 μM (6 μl einer 2 mM DMSO-Stammlösung) bei 37 °C für 30 min mit Suspensionen von rL und hL und für 7 min mit rLA inkubiert. Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthält: 400 μg mikrosomales Protein, 50 μM Kaliumphosphatpuffer (pH=7,4), 3 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EDTA und ein NADPH-generierendes System bestehend aus 1 mM NADP, 5 mM Glucose-6-phosphat und 0,7 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die Inkubation wird durch die Substratzugabe gestartet und nach Ende der Inkubationszeit durch Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff gestoppt. Folgende Negativkontrollen werden durchgeführt: reines DMSO ohne weiteres Substrat, Substrat ohne mikrosomales Protein und Substrat mit mikrosomalem Protein ohne Cofaktoren. Die Aufarbeitung der Inkubationen zur anschließenden HPLC-Analyse erfolgt über SPE-Kartuschen. Die Proben werden auf Eis aufgetaut, zur Sammlung kurz zentrifugiert (1 min, 600 g) und mit 6 μl 0,2 mM Pyren als internem Standard versehen. Nach Zugabe von 177 μl 2-Propanol je Probe zur Proteinfällung werden die Proben auf konditionierte 1 ml SPE-Säulen C18ec überführt. Die Konditionierung der Säulen erfolgt mit zweimal 1 ml Methanol und 1 ml Wasser/2-Propanol (85:15). Nach dem Durchlauf der Proben über die Säulen werden diese mit zweimal 0,5 ml Wasser/2-Propanol (85:15) gewaschen. Die anschließende Elution nach dem Trocknen der Kartuschen wird mit zweimal 0,5 ml Dichlormethan vorgenommen.

4.2.2 Zellkultur mit CYP profizienten V79-Zelllinien

In 75 cm² Gewebekulturschalen werden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen für 14 h in 10 ml Medium vorinkubiert (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin). Das Medium wird dann gegen 3 ml DMEM mit 1 μM der entsprechenden Alkylpyrene ausgetauscht. Die Kulturen werden für entsprechenden Inkubationszeiten weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung gehalten. Zur Negativkontrolle werden Zellen ohne Alkylpyrene mit und ohne DMSO sowie Medium mit Alkylpyrenen, aber ohne Zellen inkubiert. Am Versuchsende werden die Zellen bis zur Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Bestimmung der Zellzahl werden Zellen, die nur mit DMSO inkubiert worden sind, direkt geerntet und über einen Zellzähler (Casy-1, Schärfer System, Reutlingen) gezählt. Die Aufarbeitung der Zellinkubation erfolgt wie die der Mikrosomeninkubation über SPE-Kartuschen C18ec, die allerdings eine Kapazität von 200 mg und ein Volumen von 3 ml haben. Die Zellen werden aufgetaut, vom Boden der Kulturflaschen abgeschabt, mit 6 μl 0,2 mM Pyren als internem Standard und zur Proteinfällung mit 0,3 ml konzentrierter H₃PO₄ sowie 0,53 ml 2-Propanol je Probe versehen. Die Konditionierung der SPE-Kartuschen wird mit 2-mal 2 ml Methanol und 2 ml Wasser/2-Propanol (85:15) vor-

genommen. Zum Waschen der Säulen nach Probendurchfluss werden dreimal 0,5 ml Wasser/2-Propanol (85:15) verwendet und nach dem Trocken wird mit dreimal 0,5 ml Dichlormethan eluiert.

4.2.3 Halbwertszeitbestimmungen benzylicher Schwefelsäureester

Die benzylichen Schwefelsäureester werden in DMSO gelöst. Zur Messung werden sie auf entsprechende Konzentrationen in vortemperiertem Wasser zu Lösungen mit 1 oder 10 % DMSO verdünnt. Der Konzentrationsbereich für Pyrenderivate, die mit HPLC-Fluoreszenz gemessen werden, liegt zwischen 100 – 600 nM. Für die Benzo-[a]pyrenderivate werden Konzentrationen von 10 – 20 µM bei der Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Für die Messungen mittels Massenspektrometrie werden 30 µM Lösungen verwendet außer für 1- α -SEP, hier wird eine 3 mM Lösung verwendet. Bei Halbwertszeiten unter 30 min wird für jeden Zeitpunkt eine eigene Verdünnung angesetzt, bei längeren Halbwertszeiten können Mehrfachmessungen aus einer Lösung vorgenommen werden. Die Methode für die HPLC-Fluoreszenz-Detektion ist in Abs. 4.5.3 beschrieben, die HPLC-MS-Methode in Abs. 4.5.4.

4.2.4 Cytosolinkubationen

Die Anzucht der rekombinanten *S. typhimurium* TA1538(a) sowie die Cytosolherstellung erfolgen wie von Meinel u. a. (2002) beschrieben. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt mit dem BCA-Testkit von Pierce (Abs. 4.2.1).

Für die Inkubation werden 75 µg Cytosol in 50 mM TRIS-Puffer (pH 7,0) mit 50 µM PAPS und 5 µM Magnesiumchlorid sowie 50, 10 bzw. 1 µM benzylichem Alkohol verwendet. Die Reaktion wird durch die Substratzugabe gestartet. Das finale Volumen beträgt 0,5 ml. Die Inkubation wird nach 15 min bei 37 °C durch Zugabe von 250 µl kaltem Aceton gestoppt. Der Überstand einer fünfminütigen Zentrifugation bei 11 000 g wird zur HPLC-Analyse eingesetzt. Die HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion ist in Abs. 4.5.3 beschrieben.

4.2.5 Zellkultur mit hOAT profizienten HEK-Zelllinien

Die Anzucht, Behandlung und Aufarbeitung der Zellen ist in Bakhiya u. a. (2006) beschrieben. Die Inkubation erfolgte nach 2-tägiger Anzucht von $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well in Dulbecco's modified minimum essential medium (high glucose) mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 unit/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 5 µg/ml Blastocidin. Inkubiert wurde in Ringerlösung mit 10 µM 4-SMP bei 22 °C für 15 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kalter Ringerlösung gewaschen, mit 1 N Natronlauge

(0,25 ml/Well) lysiert, mit 1 N Salzsäure (0,25 ml/Well) neutralisiert und das Protein mit 1 ml Aceton/Well präzipitiert. Ein Aliquot von 10 µl des Überstandes wurde mittels der unter Abs. 4.5.3 beschriebenen HPLC-Fluoreszenz-Methode untersucht.

4.3 Tierversuche

4.3.1 Tiere und Tierhaltung

Die jungen adulten männlichen Ratten (Stamm: Wistar(HAN), Züchter: Charles River Laboratories, Genetisch/Hygienischer Status: Auszucht/konventionell) im Alter von 6 bis 8 Wochen werden nach einwöchiger Adaptation im Versuch eingesetzt. Das Körpergewicht zu Versuchsbeginn liegt bei etwa 200 g. Sowohl die Hälfte der Adaptation als auch die Versuche erfolgen in Einzelhaltung in Stoffwechsellkäfigen. Soweit nachfolgend nicht anders beschrieben, haben die Tiere während der gesamten Zeit freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

4.3.2 72 Stunden Zeitversuch

Drei Tieren wird zu Versuchsbeginn jeweils 83,3 µmol/kg KM 1-HMP gelöst in DMSO (0,5 ml/kg KM) i.p. appliziert. Anschließend werden Urin und Fäzes nach 8, 24, 32, 48, 56 und 72 h aus den Sammelgefäßen der Stoffwechsellkäfige entnommen. Zu Versuchsende werden die Tiere dekapitiert.

4.3.3 24 Stunden Versuch mit Modulatoren

Jede Versuchsgruppe umfasst 5 Tiere. Diesen wird zu nächst der Modulator und nach einer gewissen Zeitspanne der benzyliche Alkohol verabreicht. Die Tiere werden zur besseren p.o.-Applikation der Modulatoren über Nacht vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten. Die Modulatoren werden als wässrige Lösungen geschlündelt, Dosen und Zeitabstände zur Substanzapplikation sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Die benzylichen Alkohole 1-HMP und 1-HM-8-MP werden i.p. als DMSO-Lösung (0,5 ml/kg KM) in einer Dosis von 83,3 µmol/kg KM injizieren. Nach Applikation der benzylichen Alkohole werden für 24 h bei freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser Urin und Fäzes gesammelt. Zu Versuchsende werden die Tiere durch Dekapitation getötet.

Tabelle 4.1: Dosen und Zeitabstände bis zur Verabreichung der benzyllischen Alkohole der alkPAK für die im Tierversuch eingesetzten Modulatoren.

Modulator	Dosis, mmol/kg KM	Zeit, min
Pentachlorphenol	0,04	40
Quercetin	0,04	90
Ethanol	35	10
4-Methylpyrazol	1	10
Disulfiram	0,25	17 h

4.4 Aufarbeitung der in-vivo-Proben

4.4.1 Metabolitenanalyse im Urin

Die bei -80°C gelagerten Urinproben werden aufgetaut, 10 min bei 13 150 g zentrifugiert und der Überstand 1 zu 10 mit Wasser verdünnt. Zur UPLC-UV-MS-Analyse wird die in Abs. 4.5.5 beschriebene Methode verwendet.

4.4.2 Analyse der Alkylpyrenylmercaptursäuren in Urin und Fäzes

Urin

Die bei -80°C als 1 ml-Aliquots gelagerten Urinproben werden aufgetaut und mit je 200 μl Citratpuffer (20 mM, pH 2) und 500 μl 1 N HCl versetzen, so dass ein pH-Wert von etwa 1,6 erzielt wird. Im Anschluss erfolgt eine Festphasenextraktion über C18ec-Kartuschen von Macherey & Nagel (Kapazität 100 mg). Die Säulen werden mit 1 ml Citratpuffer (20 mM, pH 2) konditioniert und nach Probendurchlauf getrocknet. Die Elution erfolgt mit 1 ml Ethylacetat. Dem Eluat werden 10 μl DMSO hinzugefügt, bevor es mittels SpeedVac bis auf den DMSO Rückstand eingeengt wird. Der Rückstand wird in 90 μl Methanol aufgenommen und nach einer Zentrifugation (5 min, 6700 rpm) zur Analyse eingesetzt. Die UPLC-MS/MS-Analyse wird mit der in Abs. 4.5.6 dargestellten Methode vorgenommen.

Als Positivkontrolle dient Kontrollurin, der von den Tieren vor Substanzapplikation gewonnen wurde, und dem, bevor er obiger Aufarbeitung unterworfen wird, 5 μl 10 μM 1-MPMA zugesetzt wurde. Dies entspricht einer Standardaddition von 0,5 μM bzw. 50 pmol.

Die Wiederfindung der Methode liegt nach 7 Doppelbestimmungen bei $91 \pm 15\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Fäzes

Ein Aliquot von 1 g der bei -80 °C gelagerten Fäzesproben wird jeweils in 3 ml Wasser mit einem Ultra-Turax homogenisiert. Aus 0,25 g dieses Homogenats, 1 g Isolute und 75 µl 1 N HCl wird eine homogene Mischung hergestellt und in SPE-Säulen (Volumen 8 ml, Phenomenex) verfüllt. Diese Säulen werden mit C18ec-Kartuschen (Kapazität 100 mg, Macherey & Nagel) gekoppelt, die zuvor mit je 1 ml Methanol und Citratpuffer (20 mM, pH 2) konditioniert worden sind. Die gekoppelten Säulen werden mit 5 ml Citratpuffer gewaschen, getrocknet und anschließend wird die Mercaptursäure mit 5 ml Methanol eluiert. Dem Eluat werden 20 µl DMSO hinzugefügt, bevor es bis auf dieses Volumen mittels SpeedVac eingeeengt wird. Der Rückstand wird in 180 µl Methanol aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 6700 rpm) und zur Analyse eingesetzt. Die Methode zur UPLC-MS/MS-Analyse ist in Abs. 4.5.6 beschrieben.

Als Positivkontrollen dienen Homogenate von Fäzes, die vor der Substanzapplikation bei den Tieren gewonnen wurden. Den 0,25 g Homogenat werden vor der Aufarbeitung 10 µl 1 µM 1-MPMA zugesetzt. Dies entspricht einer Standardaddition von 50 nM bzw. 10 pmol.

Die Wiederfindung der Methode liegt nach 7 Doppelbestimmungen bei $94 \pm 28\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

4.5 Chromatographie

4.5.1 HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung benzyliischer Alkohole

Pyrenderivate

Die Metaboliten der Mikrosomeninkubation werden mit einer Waters 600E HPLC-Anlage auf einer RP-Säule (Supelcosil LC 18 DB, 4,6*250 mm, 5 µm) getrennt. Die Detektion erfolgt über einen Photodiodenarray-Detektor (PDA) Waters 966 und eine Fluoreszenzdetektor vom Typ Shimadzu RF 551. Als Eluenten werden eingesetzt: A-Wasser mit Phosphorsäure, pH=2,3 und B-Methanol/Acetonitril (50/50). Der Gradient verläuft innerhalb von 5 min von 80 % zu 30 % A, wird für 15 min isokratisch gehalten, gefolgt von Abnahmen auf 15 % A in 18 min und auf 2 % A in 2 min. Nach 6 min bei 2 % A wird auf 80 % A zurückgespült und diese für 14 min gehalten. Die Flussrate beträgt 1 ml/min, die Säulentemperatur 30 °C. Das Injektionsvolumen liegt bei 20 µl. Zur Quantifizierung werden die Fluoreszenzsignale bei $\lambda_{ex} = 334$ nm und $\lambda_{em} = 392$ nm verwendet. In Abb. 4.1 sind beispielhaft Chromatogramme für verschiedene Inkubationen und Kontrollen dargestellt.

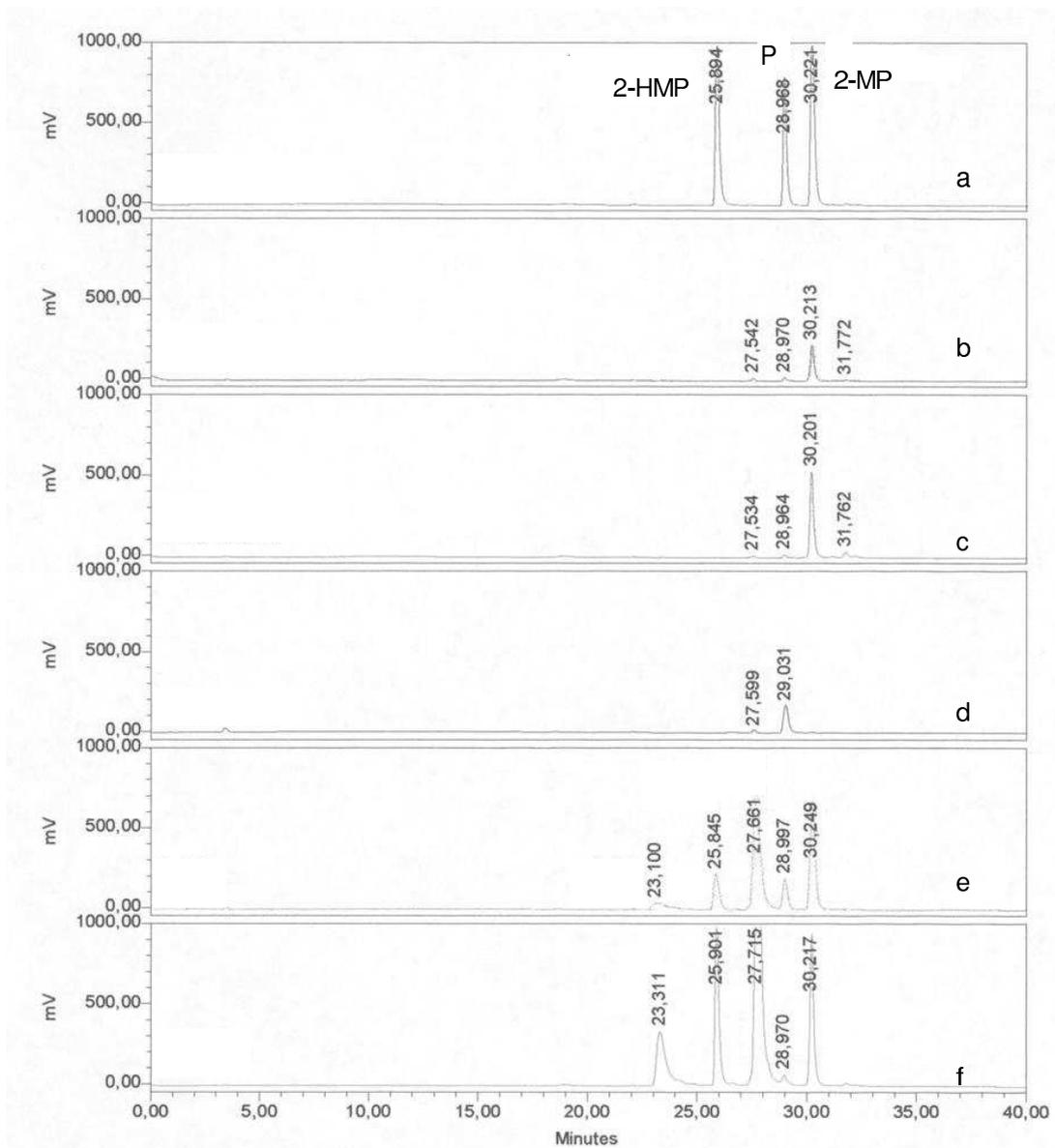


Abbildung 4.1: Fluoreszenz-Chromatogramme von Standards, Mikrosomeninkubationen und Negativkontrollen am Beispiel von 2-MP (Abs. 4.2.1): a – Standard für 2-HMP, P und 2-MP, b – ohne Mikrosomen, c – inaktiv, d – Vehikelkontrolle, DMSO, e und f – repräsentative Inkubationen von 2-MP mit rL-Mikrosomen. Die Chromatographiemethode ist in Abs. 4.5.1 beschrieben.

Benzo[a]pyrenderivate

Die Metaboliten der alkylierten Benzo[a]pyrene werden an der gleichen HPLC-Anlage wie die der alkylierten Pyrene analysiert. Als Säule dient ebenso eine RP-Säule (Supelcosil LC 18, 4,6*250 mm, 5 μ m). Zur Elution wird eingesetzt: A – Wasser mit Phosphorsäure, pH=2,3 und B – Acetonitril. Die Trennung erfolgt isokratisch bei 30 % A über 40 min. Die Flussrate beträgt 1 ml/min, die Säulentemperatur 30 °C. Das Injektionsvolumen liegt bei 20 μ l. Zur Quantifizierung werden die Fluoreszenzsignale bei λ_{ex} = 392 nm und λ_{em} = 432 nm verwendet.

4.5.2 HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung von Enantiomeren und Positionsisomeren bei Hydroxyethylpyrenen

Eine chirale Trennung auf einer ChiralCel OJ (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m, Daicel Chemical Industries LTD) mit einem Gradienten aus Ethanol (A) und n-Heptan (B) (beginnend mit 20 % A über 8-20 min 5 % A und zurück zu 20 % A bei 22 min) wird für Inkubationen aller Mikrosomenarten (rL, rLA, hL) durchgeführt. Bei 1- und 2-HEP wird der HEP-Peak zuvor mittels RP-HPLC aus der Probe isoliert und das Lösungsmittel entfernt, bei 4-HEP wird lediglich die Probe getrocknet. Diese getrockneten Isolate bzw. Proben werden zur Analyse in Ethanol/n-Heptan (50+50,vv) aufgenommen. Bei der Trennung kann auch der ω -Alkohol von den anderen Positionsisomeren unterschieden werden. Eine Untersuchung kann aufgrund fehlender weiterer Standards nur für 1- ω -HEP vorgenommen werden. Die Quantifizierung wird anhand der Fluoreszenzsignale bei λ_{ex} = 334 nm und λ_{em} = 392 nm vorgenommen. Als HPLC-Anlage dient die unter Abs. 4.5.1 erwähnte Waters 600E mit den gleichen weiteren Komponenten. In Abb. 4.2 sind einige mit dieser Methode erzielte Chromatogramme dargestellt.

4.5.3 HPLC-Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung benzylicher Schwefelsäureester

Der Nachweis der benzylichen Schwefelsäureester sowie ihrer Alkohole erfolgt nach Auftrennung über eine RP-Säule (Phenomenex Gemini C18, 250x3 mm, 5 μ m) mit einem isokratischen Fließmittelgemisch aus Methanol mit 20 % Wasser und 0,05 % Triethylamin bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Die Säulentemperatur liegt bei 30 °C, die des Autosamplers bei 4 °C. Zur Quantifizierung werden die Fluoreszenzsignale bei λ_{ex} = 334 nm und λ_{em} = 392 nm für Alkylpyrenensulfate und λ_{ex} = 392 nm und λ_{em} = 432 nm für Alkylbenzyl[a]pyrenensulfate verwendet. Die zur Durchführung genutzte HPLC-Anlage ist eine Shimadzu SLC-10Avp mit einem Shimadzu SIL-M10Avp Autosampler sowie einem Shimadzu SPD-M10 Avp Fluoreszenzdetektor (Bakhiya u. a., 2006).

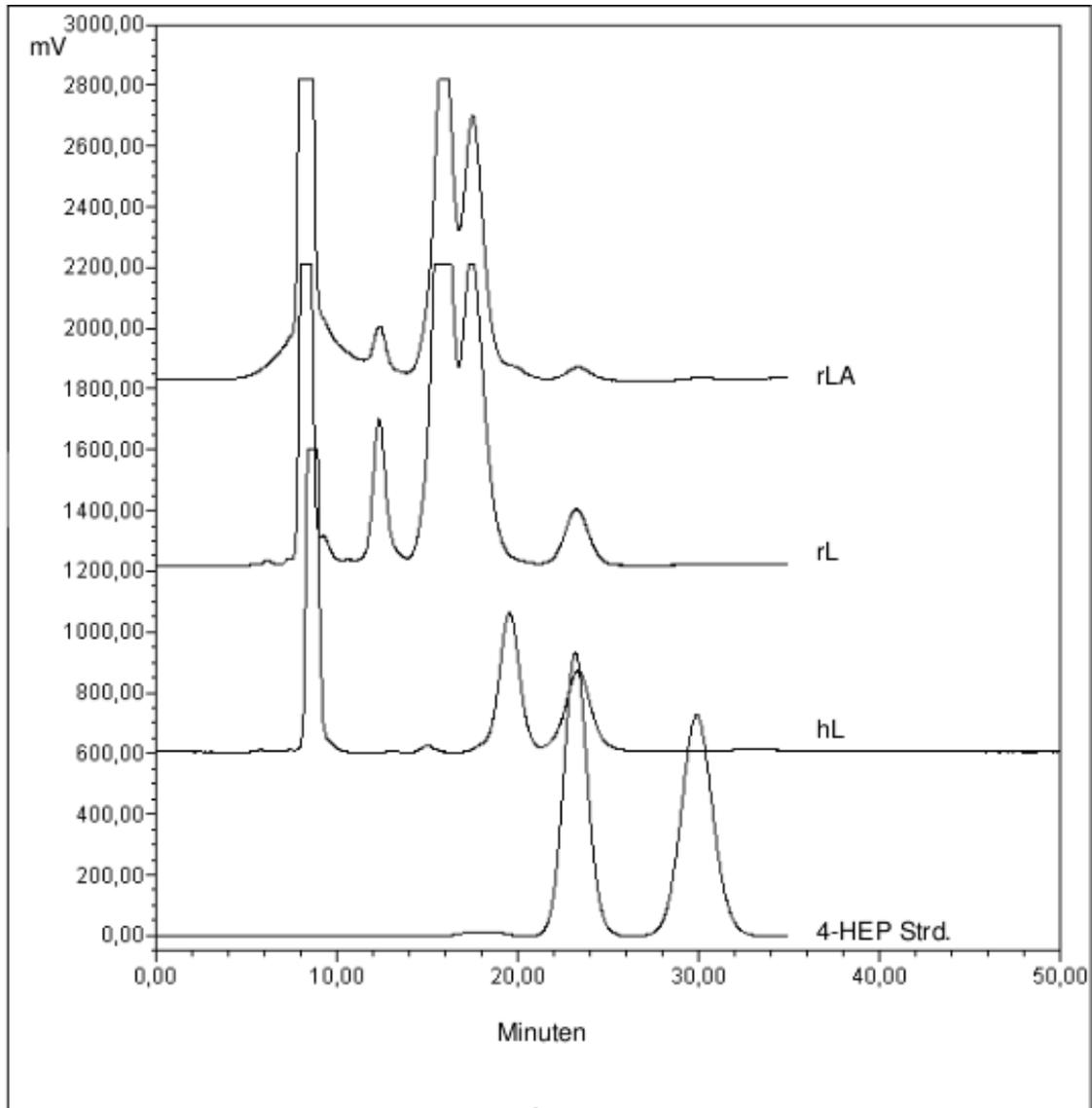


Abbildung 4.2: Fluoreszenz-Chromatogramme für die chirale Trennung von 4- α -HEP aus Mikrosomeninkubationen nach Abs. 4.2.1 mittels der in Abs. 4.5.2 beschriebenen Chromatographie.

4.5.4 HPLC-MS-Methode zur Bestimmung benzylicher Schwefelsäureester

Zur Messung der benzylichen Schwefelsäureester mittels Massenspektrometrie wird eine HPLC-MS-Anlage verwendet. Als Fließmittel wird ein Gemisch aus 95 % Acetonitril mit 4,5 % Ammoniumacetat (5 %, pH 5,5) und 0,5 % Methanol eingesetzt. Die Moleküle der Schwefelsäureester werden bei negativer Elektrosprayionisation mittels „Single Ion Reaction“-Modus detektiert (1-SM-6-MP: m/z 326; 6-SMBP: m/z 361; 6-SEBP: m/z 375). Die Parameter für das Massenspektrometer werden wie folgt eingestellt: Capillary 2 kV, Cone Spannung -20 eV, Extraktionslinse 5 V, RF-Linse 0,3 V, Source-Temperatur 100 °C, Desolvation-Temperatur 300 °C, hohe und niedrige Massenauflösen bei 13 und der Multiplier bei 650 V. Die eingesetzten Lösungen der Schwefelsäureester werden, wie in Abs. 4.2.3 beschrieben, hergestellt.

4.5.5 UPLC-MS/MS-Methode zur Metabolitenanalyse im Urin

Die Analyse der Metaboliten wird mit einem Tandem Quadrupol Massenspektrometer (Waters Micromass Quattro Premier XE) gekoppelt an ein UPLC-System (Waters ACQUITY) durchgeführt. Für die Trennung wird eine RP-Säule (UPLC ACQUITY BEH Phenyl, 1,7 μ m, 2,1 · 100 mm) sowie als Fließmittel A: 90 % Ammoniumacetat (10 mM) mit 10 % Methanol bei pH 7,4 und B: Acetonitril mit 5 % Methanol verwendet. Die Säulentemperatur liegt bei 37 °C, die Proben temperatur bei 4 °C. Bei einer Flussrate von 0,45 ml/min wird nach einer Minute bei 95 % A ein linearer Gradient zu 30 % A innerhalb von 6 min gefahren, bevor wieder auf die Anfangsbedingungen von 95 % A rekonditioniert wird.

Der PDA-Scan verläuft von 210 bis 400 nm. Mittels Massenspektrometrie werden zur Identifizierung der Metaboliten folgende Bereiche gescannt: m/z 90–200, 200–325, 325–450 und 450–575. Die Einstellung für die Scans im negativen wie positiven Elektrospray-Modus sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Zur weiteren Identifizierung von Metaboliten werden jeweils Produkt-Ionen-Scans durchgeführt, deren Einstellungen im einzelnen ebenso in Tab. 4.2 dargestellt sind.

4.5.6 UPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Alkylpyrenylmercaptursäuren

Zur Auftrennung der Proben wird die in Abs. 4.5.5 beschriebene UPLC-Methode verwendet. Das Massenspektrometer wird im negativen Elektrospraymodus und einer kollisionsinduzierten Fragmentierung mit Argon als Kollisionsgas betrieben. Die Einstellung für die einzelnen Parameter sind in Tab. 4.2 in der Spalte „Mercaptursäuren“ aufgeführt.

Die Detektion der Mercaptursäuren erfolgt im MRM-Modus. Der Neutralverlust der *N*-Acetyl-2-aminopropionsäure sowie der Verlust der gesamten konjugierten Sei-

Tabelle 4.2: Einstellungen des Massenspektrometers für die Bestimmungen des Metabolitenspektrums der Urinproben im negativen und positiven Elektrospray-Modus sowie für die Identifizierung der 1-PCS, des benzylichen Schwefelsäureesters der 1-PCS, der x-OH-8-MP-1-PCS und der Mercaptursäuren 1-MPMA und 1,8-DMPMA.

Parameter	Scan		1-PCS	benz. Schwefelsäure- ester 1-PCS	x-OH-8-MP-1- PCS	Mercaptur- säuren
	neg.	pos.				
Capillary, kV	-2,8	+0,5	0,5	-2,8	-2,8	-3,5
Cone Spannung, V	25	30	26	20	25	27
Extraktionslinse, V	5	5	3	5	5	3
RF-Linse, V	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
Source-Temp., °C	100	100	100	120	100	100
Desolvation-Temp., °C	450	450	450	450	450	450
Cone-Gas, l/h	52	52	50	52	52	52
Desolvation-Gas, l/h	750	850	950	750	750	950
Massenauflösung 1	13	13	13	15	13	13
Ionenenergie 1	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
Eingang T-Wave	50	50	-2	-2	-2	-2
Kollisionsenergie	0	0	15	30	30	18/37
Kollisionsgas, mbar	0	0	3×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-3}
Ausgang T-Wave	50	50	2	2	+2	+2
Massenauflösung 2	13,5	13,5	13,5	15	13,5	13,5
Ionenenergie 2	2	1,5	1	2	2	2
Multipller, V	630	650	630	630	630	630

tenkette wird in parallelen MRM-Messungen aufgezeichnet. Zur Quantifizierung wird das aus dem Neutralverlust resultierende Signal verwendet, das zweite Signal dient der Identifizierung. Die Kollisionsenergien für die beiden Übergänge sind bei 1-MPMA und 1,8-DMPMA identisch. Sie liegen bei 18 eV für den Neutralverlust und 37 eV für die Abspaltung der konjugierten Seitenkette. Der erste Übergang für 1-MPMA ist von m/z 376 zu m/z 247, der zweite zu m/z 201. Für 1,8-DMPMA werden die Übergänge m/z 390 zu m/z 261 bzw. zu m/z 215 gemessen. Die Nachweisgrenze bei der massenspektrometrischen Bestimmung liegt für beide Mercaptursäuren bei 10 ppb (Bakhiya u. a., 2007).

Anhang

A Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität einer Substanz auf eine Zellpopulation wird im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle über die während 24 h neu gebildete DNA-Menge bestimmt. Die Messung der DNA-Menge erfolgt mittels [³H]Thymidin-Markierung. Über eine Änderung der Menge der neu gebildeten DNA lassen sich Zytotoxizität, vermindertes Zellwachstum, Änderungen der DNA-Menge pro Zelle und Apoptose erfassen.

Der Test wird in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 500 V79 hCYP1A1 Zellen pro Loch durchgeführt, wobei die äußeren Löcher nur mit Phosphatpuffer belegt werden. Nach einer Vorinkubation von 24 h in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) wird dieses Medium gegen Medium mit 0,2 % DMSO und folgenden Konzentrationen an 2-MP (der getesteten Substanz) getauscht: 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 40 und 80 µM. Pro Konzentration werden 6, für die Lösungsmittelkontrolle 12 Löcher verwendet. Nach 8-stündiger Inkubation der Testsubstanz erfolgt die Zugabe des [³H]-Thymidins (0,25 µCi/Loch) und eine weitere Inkubation für 24 h. Danach wird das Medium entfernt, die Zellen trypsinisiert und die Zellen eines jeden Wells auf ein Feld einer Filterplatte übertragen. Diese Filterplatte wird laminiert und die Verteilung der Radioaktivität mit dem Szintillationsmessgerät Micro Beta Trilux gemessen.

Die Ergebnisse einer Doppelbestimmung sind in Abb. A.1 dargestellt. Bei einer Konzentration von 10 µM Testsubstanz kommt es bereits zu einer Reduktion des DNA-Gehaltes auf 77±4 % (Mittelwert±Range). Die effektive Konzentration, bei der eine Reduktion auf 50 % vorliegt, beträgt 32 µM. Um zytotoxische Effekte bei der Inkubation von alkPAK in V79-Zellen, die CYP heterolog exprimieren, auszuschließen, wird eine Inkubationskonzentration von 1 µM als vertretbar angesehen.

A Zytotoxizitätstest

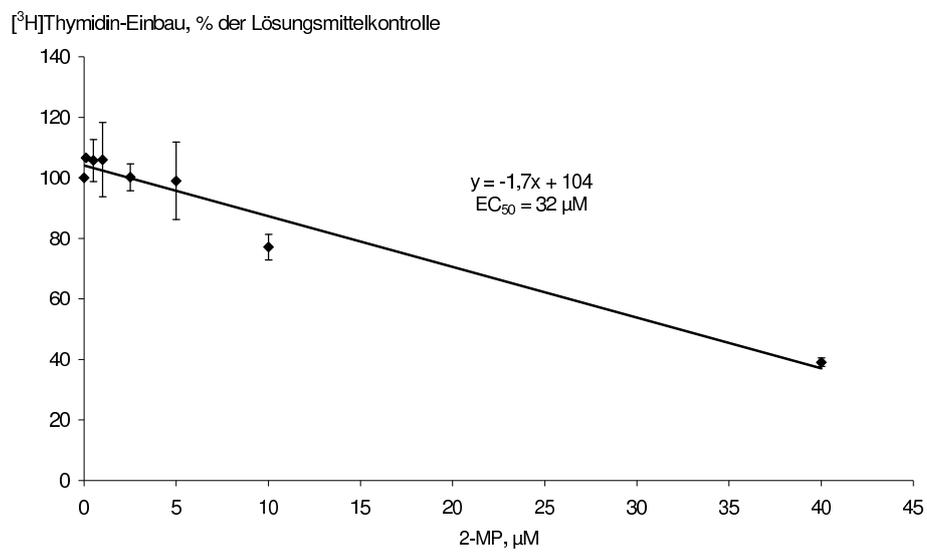


Abbildung A.1: Ergebnisse einer Doppelbestimmung zur Zytotoxizität von 2-MP an V79 hCYP1A1 Zellen mittels [³H]Thymidin-Einbau. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet als Prozente der Lösungsmittelkontrollen.

Erklärung

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

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

Literaturverzeichnis

- [Allali-Hassani u. a. 2007] ALLALI-HASSANI, A. ; PAN, P. W. ; DOMBROVSKI, L. ; NAJMANOVICH, R. ; TEMPEL, W. ; DONG, A. ; LOPPNAU, P. ; MARTIN, F. ; THONTON, J. ; EDWARDS, A. M. ; BOCHKAREV, A. ; PLOTNIKOV, A. N. ; VEDADI, M. ; ARROWSMITH, C. H.: Structural and chemical profiling of the human cytosolic sulfotransferases. In: *PLoS Biol* 5 (2007), S. 1063–78
- [Anderson u. a. 2005] ANDERSON, K. E. ; KADLUBAR, F. F. ; KULLDORFF, M. ; HARNACK, L. ; GROSS, M. ; LANG, N. P. ; BARBER, C. ; ROTHMAN, N. ; SINHA, R.: Dietary intake of heterocyclic amines and benzo[*a*]pyrene: associations with pancreatic cancer. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (2005), S. 2261–5
- [Bakhiya u. a. 2007] BAKHIYA, N. ; BATKE, M. ; LAAKE, J. ; MONIEN, B.H. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; ENGST, W. ; GLATT, H.R.: Directing role of organic anion transporters in the excretion of mercapturic acids of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Drug Metab Dispos* 35 (2007), S. 1824–31
- [Bakhiya u. a. 2006] BAKHIYA, N. ; STEPHANI, M. ; BAHN, A. ; UGELE, B. ; SEIDEL, A. ; BURCKHARDT, G. ; GLATT, H.: Uptake of chemically reactive, DNA-damaging sulfuric acid esters into renal cells by human organic anion transporters. In: *J Am Soc Nephrol* 17 (2006), S. 1414–21
- [Bayram und Muezzinoglu 1996] BAYRAM, A. ; MÜEZZINOGLU, A.: Environmental aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) originating from coal-fired combustion systems and their monitoring requirements. In: RICHARDSON, M. (Hrsg.): *Environmental Toxicology*. London : Francis & Taylor, 1996, S. 333–54
- [Bessegir u. a. 1989] BESSEGHIR, K. ; MOSIG, D. ; ROCH-RAMEL, F.: Facilitation by serum albumin of renal tubular secretion of organic anions. In: *Am J Physiol* 256 (1989), S. F475–84
- [Blanchard u. a. 2004] BLANCHARD, R. L. ; FREIMUTH, R. R. ; BUCK, J. ; WEINSHILBOUM, R. M. ; COUGHTRIE, M. W.: A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. In: *Pharmacogenetics* 14 (2004), S. 199–211

- [Blumer und Youngblood 1975] BLUMER, M. ; YOUNGBLOOD, W.W.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and recent sediments. In: *Science* 188 (1975), S. 53–5
- [Boffetta und Hashibe 2006] BOFFETTA, P. ; HASHIBE, M.: Alcohol and cancer. In: *Lancet Oncol* 7 (2006), S. 149–56
- [Bow u. a. 2006] BOW, D. A. ; PERRY, J. L. ; SIMON, J. D. ; PRITCHARD, J. B.: The impact of plasma protein binding on the renal transport of organic anions. In: *J Pharmacol Exp Ther* 316 (2006), S. 349–55
- [Boyland und Sims 1964] BOYLAND, E. ; SIMS, P.: Metabolism of polycyclic compounds. 23. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. In: *Biochem J* 90 (1964), S. 391–8
- [Buckley u. a. 1995] BUCKLEY, T. J. ; WALDMAN, J. M. ; DHARA, R. ; GREENBERG, A. ; OUYANG, Z. ; LIOY, P. J.: An assessment of a urinary biomarker for total human environmental exposure to benzo[a]pyrene. In: *Int Arch Occup Environ Health* 67 (1995), S. 257–66
- [Burckhardt und Burckhardt 2003] BURCKHARDT, B.C. ; BURCKHARDT, G.: Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146 (2003), S. 95–158
- [Cavaliere u. a. 2000] CAVALIERI, E. ; HANSON, A.A. ; KAI-MING, L. ; CHENG-HUANG, L. ; JANKOWIAK, R. ; SMALL, G.J. ; ROGAN, E.: Synthesis and structure determination of 6-methylbenzo[a]pyrene-desoxyribonucleoside adducts and their identification and quantitation in vitro and in mouse skin. In: *Chem Biol Interact* 128 (2000), S. 65–90
- [Cavaliere u. a. 1978] CAVALIERI, E. ; ROTH, R. ; GRANDJEAN, C. ; ALTHOFF, J. ; PATIL, K. ; LIAKUS, S. ; MARSH, S.: Carcinogenicity and metabolic profiles of 6-substituted benzo[a]pyrene derivatives on mouse skin. In: *Chem Biol Interact* 22 (1978), S. 53–67
- [Chen u. a. 2005] CHEN, X. ; YIN, O. Q. ; ZUO, Z. ; CHOW, M. S.: Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. In: *Pharm Res* 22 (2005), S. 892–901
- [Chidgey u. a. 1986] CHIDGEY, M. A. ; KENNEDY, J. F. ; CALDWELL, J.: Studies on benzyl acetate. II. Use of specific metabolic inhibitors to define the pathway leading to the formation of benzylmercapturic acid in the rat. In: *Food Chem Toxicol* 24 (1986), S. 1267–72
- [Cornell u. a. 1983] CORNELL, N. W. ; HANSCH, C. ; KIM, K. H. ; HENEGAR, K.: The inhibition of alcohol dehydrogenase in vitro and in isolated hepatocytes by 4-substituted pyrazoles. In: *Arch Biochem Biophys* 227 (1983), S. 81–90

- [Czich u. a. 1992] CZICH, A. ; MARTUS, H.J. ; HORNHARD, S. ; GLATT, H.R.: Sulfotransferase mediated activation of benzylic alcohols to mutagens: purification and characterization of rat liver sulfotransferase. In: *Mutagenesis* 7 (1992), S. 153–4
- [Dannenberg 1959] DANNENBERG, H.: Contribution to the cancer-inducing effect of aromatic hydrocarbons and related compounds. In: *Z Krebsforsch* 63 (1959), S. 102–7
- [de Vos u. a. 1990] DE VOS, R. H. ; DOKKUM, W. van ; SCHOUTEN, A. ; DE JONGBERKHOUT, P.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984–1986). In: *Food Chem Toxicol* 28 (1990), S. 263–8
- [Dennis u. a. 1983] DENNIS, M. J. ; MASSEY, R. C. ; MCWEENY, D. J. ; KNOWLES, M. E. ; WATSON, D.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. In: *Food Chem Toxicol* 21 (1983), S. 569–74
- [Dewar und Dougherty 1975] DEWAR, M.J.S. ; DOUGHERTY, R.C.: *The PMO theory of organic chemistry*. 1. New York : Plenum Press, 1975
- [Donath 2008] DONATH, C.: *Sulfotransferase-vermittelte Genotoxizität von benzyllischen Metaboliten alkylierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe*, Universität Potsdam, Dissertation, 2008
- [Duffel und Jakoby 1985] DUFFEL, M. W. ; JAKOBY, W. B.: Cysteine S-conjugate N-acetyltransferase. In: *Methods Enzymol* 113 (1985), S. 516–20
- [Dunn und Klaassen 1998] DUNN, 2nd ; KLAASSEN, C. D.: Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. In: *Drug Metab Dispos* 26 (1998), S. 598–604
- [Edenberg und Bosron 1997] EDENBERG, H.J. ; BOSRON, F.W.: Alcohol Dehydrogenases. In: GUENGERICH, F. P. (Hrsg.): *Comprehensive Toxicology* Bd. 3. New York : Pergamon, 1997, S. 119–27
- [Engst u. a. 1999] ENGST, W. ; LANDSIEDEL, R. ; HERMERSDORFER, H. ; DOEHMER, J. ; GLATT, H.: Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. In: *Carcinogenesis* 20 (1999), S. 1777–85
- [Enomoto u. a. 2002] ENOMOTO, A. ; TAKEDA, M. ; TOJO, A. ; SEKINE, T. ; CHA, S.H. ; KHAMDANG, S. ; TAKAYAMA, F. ; AOYAMA, I. ; NAKAMURA, S. ; ENDOU, H. ; NIWA, T.: Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002), S. 1711–20
- [Evans 2002] EVANS, T. W.: Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. In: *Aliment Pharmacol Ther* 16 (2002), S. 6–11

- [Falany u. a. 2000] FALANY, C. N. ; XIE, X. ; WANG, J. ; FERRER, J. ; FALANY, J. L.: Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. In: *Biochem J* 346 (2000), S. 857–64
- [Flesher u. a. 1997] FLESHER, J. W. ; HORN, J. ; LEHNER, A. F.: 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyrene is an ultimate electrophilic and carcinogenic form of the intermediary metabolite 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene. In: *Biochem Biophys Res Commun* 234 (1997), S. 554–8
- [Flesher u. a. 1999] FLESHER, J.W. ; LEHNER, A.F. ; HORN, J.: Role of hydroxymethyl sulfate esters in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. In: *Polycyclic Aromat Compds* 16 (1999), S. 1–11
- [Flesher und Sydnor 1973] FLESHER, J.W. ; SYDNOR, K.L.: Possible role of 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene as a proximate carcinogen of benzo[a]pyrene and 6-methylbenzo[a]pyrene. In: *Int. J. Cancer* 11 (1973), S. 433–7
- [Friedhoff 2006] FRIEDHOFF, P.: Quantitative Auswertung biochemischer Experimente / Universität Gießen. 2006. – Forschungsbericht
- [Fuda u. a. 2002] FUDA, H. ; SHIMIZU, C. ; LEE, Y. C. ; AKITA, H. ; STROTT, C. A.: Characterization and expression of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate synthase isoforms. In: *Biochem J* 365 (2002), S. 497–504
- [Gensthaller und Gräfe 2006] GENSTHALER, B. M. ; GRÄFE, K. A.: Neu auf dem Markt: Fomepizol, Galsulfase und Rotigotin. In: *Pharmazeutische Zeitung* 14 (2006)
- [Gibbs u. a. 2004] GIBBS, R. A. ; WEINSTOCK, G. M. ; METZKER, M. L. ; MUZNY, D. M. ; SODERGREN, E. J. ; SCHERER, S. ; SCOTT, G. ; STEFFEN, D. ; WORLEY, K. C. ; BURCH, P. E. ; OKWUONU, G. ; HINES, S. ; LEWIS, L. ; DERAMO, C. ; DELGADO, O. ; DUGAN-ROCHA, S. ; MINER, G. ; MORGAN, M. ; HAWES, A. ; GILL, R. ; CELERA ; HOLT, R. A. ; ADAMS, M. D. ; AMANATIDES, P. G. ; BADEN-TILLSON, H. ; BARNSTEAD, M. ; CHIN, S. ; EVANS, C. A. ; FERRIERA, S. ; FOSLER, C. ; GLODEK, A. ; GU, Z. ; JENNINGS, D. ; KRAFT, C. L. ; NGUYEN, T. ; PFANNKOCH, C. M. ; SITTER, C. ; SUTTON, G. G. ; VENTER, J. C. ; WOODAGE, T. ; SMITH, D. ; LEE, H. M. ; GUSTAFSON, E. ; CAHILL, P. ; KANA, A. ; DOUCETTE-STAMM, L. ; WEINSTOCK, K. ; FECHTEL, K. ; WEISS, R. B. ; DUNN, D. M. ; GREEN, E. D. ; BLAKESLEY, R. W. ; BOUFFARD, G. G. ; DE JONG, P. J. ; OSOEGAWA, K. ; ZHU, B. ; MARRA, M. ; SCHEIN, J. ; BOSDET, I. ; FJELL, C. ; JONES, S. ; KRZYWINSKI, M. ; MATHEWSON, C. ; SIDDIQUI, A. ; WYE, N. ; MCPHERSON, J. ; ZHAO, S. ; FRASER, C. M. ; SHETTY, J. ; SHATSMAN, S. ; GEER, K. ; CHEN, Y. ; ABRAMZON, S. ; NIERMAN, W. C. ; HAVLAK, P. H. ; CHEN, R. ; DURBIN, K. J. ; EGAN, A. ; REN, Y. ; SONG, X. Z. ; LI, B. ; LIU, Y. ; QIN, X. ; CAWLEY, S. ; COONEY, A. J. ; D'SOUZA, L. M. ; MARTIN, K. ; WU,

- J. Q. ; GONZALEZ-GARAY, M. L. ; JACKSON, A. R. ; KALAFUS, K. J. ; McLEOD, M. P. ; MILOSAVLJEVIC, A. ; VIRK, D. ; VOLKOV, A. ; WHEELER, D. A. ; ZHANG, Z. ; BAILEY, J. A. ; EICHLER, E. E. ; TUZUN, E. u. a.: Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. In: *Nature* 428 (2004), S. 493–521
- [Glatt 2002] GLATT, H.: Sulphotransferases. In: IOANNIDES, C. (Hrsg.): *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. John Wiley & Sons, 2002, S. 353–439
- [Glatt u. a. 1993] GLATT, H. ; HENSCHLER, R. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; YANG, C. ; ABU-SHQARA, E. ; HARVEY, R. G.: Sulfotransferase-mediated mutagenicity of 1-hydroxymethylpyrene and 4*H*-cyclopenta[*def*]chrysen-4-ol and its enhancement by chloride anions. In: *Carcinogenesis* 14 (1993), S. 599–602
- [Glatt u. a. 1990] GLATT, H. ; HENSCHLER, R. ; PHILLIPS, D. H. ; BLAKE, J. W. ; STEINBERG, P. ; SEIDEL, A. ; OESCH, F.: Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells. In: *Environ Health Perspect* 88 (1990), S. 43–8
- [Glatt u. a. 2003a] GLATT, H. ; KUHLOW, A. ; MA, L.: Albumin strongly prolongs the lifespan of chemically reactive sulphuric acid esters and affects their biological activities in the rat. In: *Nova Acta Leopoldina* 87 (2003), S. 265–72
- [Glatt u. a. 2003b] GLATT, H. ; MEINL, W. ; KUHLOW, A. ; MA, L.: Metabolic formation, distribution, and toxicological effects of reactive sulfuric acid esters. In: *Nova Acta Leopoldina* 87 (2003), S. 151–61
- [Glatt u. a. 1995] GLATT, H. ; PAULY, K. ; CZICH, A. ; FALANY, J. L. ; FALANY, C. N.: Activation of benzylic alcohols to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli*. In: *Eur J Pharmacol* 293 (1995), S. 173–81
- [Glatt u. a. im Druck] GLATT, H. ; ROST, K. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; KOLLOCK, R.: Detoxification of promutagenic aldehydes derived from methylpyrenes by human aldehyde dehydrogenases ALDH2 and ALDH3A1. In: *Arch Biochem Biophys* (im Druck)
- [Glatt u. a. 1994a] GLATT, H. ; SEIDEL, A. ; HARVEY, R. G. ; COUGHTRIE, M. W.: Activation of benzylic alcohols to mutagens by human hepatic sulphotransferases. In: *Mutagenesis* 9 (1994), S. 553–7
- [Glatt u. a. 1994b] GLATT, H. ; STAFFA-PIEE, A. ; ENDERS, N. ; BAIDOSI, W. ; BLUM, J.: The presence of KCl in the exposure medium strongly influences the mutagenicity of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli*. In: *Mutat Res* 324 (1994), S. 111–4

- [Glatt u. a. 1994c] GLATT, H. ; WERLE-SCHNEIDER, G. ; ENDERS, N. ; MONNERJAHN, S. ; PUDIL, J. ; CZICH, A. ; SEIDEL, A. ; SCHWARZ, M.: 1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects in vitro and in vivo, and metabolic aspects. In: *Chem Biol Interact* 92 (1994), S. 305–19
- [Glatt u. a. 1994d] GLATT, H.R. ; PAULY, K. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; OESCH, F. ; HARVEY, R.G. ; WERLE-SCHNEIDER, G.: Substance-dependent sex differences in the activation of benzylic alcohols to mutagens by hepatic sulfotransferases of the rat. In: *Carcinogenesis* 15 (1994), S. 2605–11
- [Graf u. a. 2005] GRAF, B. A. ; MULLEN, W. ; CALDWELL, S. T. ; HARTLEY, R. C. ; DUTHIE, G. G. ; LEAN, M. E. ; CROZIER, A. ; EDWARDS, C. A.: Disposition and metabolism of [2-¹⁴C]quercetin-4'-glucoside in rats. In: *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005), S. 1036–43
- [Guengerich 2002] GUENGERICH, F. P.: Cytochrome P450. In: IOANNIDES, C. (Hrsg.): *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. John Wiley & Sons, 2002, S. 33–65
- [Guengerich 2004] GUENGERICH, F. P.: Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? In: *Drug Metab Rev* 36 (2004), S. 159–97
- [Guengerich u. a. 1982] GUENGERICH, F.P. ; DANNAN, G. A. ; WRIGHT, S.T. ; MARTIN, M.V. ; KAMINSKY, L.S.: Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. In: *Biochemistry* 21 (1982), S. 6019–30
- [Guillén und Sopenana 2004a] GUILLÉN, M. D. ; SOPELANA, P.: Load of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils: importance of alkylated derivatives. In: *J Food Prot* 67 (2004), S. 1904–13
- [Guillén und Sopenana 2004b] GUILLÉN, M. D. ; SOPELANA, P.: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. In: *J. Dairy Sci.* 87 (2004), S. 556–64
- [Guillén u. a. 2004] GUILLÉN, M. D. ; SOPELANA, P. ; PALENCIA, G.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive pomace oil. In: *J Agric Food Chem* 52 (2004), S. 2123–32
- [Hagos u. a. 2007] HAGOS, Y. ; STEIN, D. ; UGELE, B. ; BURCKHARDT, G. ; BAHN, A.: Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. In: *J Am Soc Nephrol* 18 (2007), S. 430–9
- [Hübel 2007] HÜBEL, N.: *Wechselwirkung zwischen Albumin und 2-Sulfooxymethylpyren*, Universität Potsdam, Diplomarbeit, 2007

- [Hertel u. a. 1998] HERTEL, R.F. ; ROSNER, G. ; KIELHORN, J. ; MENICHINI, E. ; GROVER, P.L. ; BLOK, J. ; MULLER, P. ; SCHOENY, R. ; MUMFORD, T.L.: Environmental health criteria 202: selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons / International programme on chemical safety (IPCS): United Nations Environment Programme (UNEP); International Labour Organisation (ILO); World Health Organization (WHO). 1998. – Forschungsbericht
- [Hessel 2006] HESSEL, S.: *Glutathion-S-Transferase T2 aus der Ratte: Expression in Salmonella typhimurium und Charakterisierung*, Universität Potsdam, Diplomarbeit, 2006
- [Hinchman und Ballatori 1994] HINCHMAN, C. A. ; BALLATORI, N.: Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. In: *J Toxicol Environ Health* 41 (1994), S. 387–409
- [Hinchman u. a. 1998] HINCHMAN, C. A. ; REBBEOR, J. F. ; BALLATORI, N.: Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. In: *Am J Physiol* 275 (1998), S. G612–9
- [Hiratsuka u. a. 1994] HIRATSUKA, A. T. ; OKADA, T. ; NISHIYAMA, M. ; FUJIKAWA, K. ; OGURA, H. ; OKUDA ; WATABE, T.: Novel theta class glutathione S-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994), S. 278–84
- [Hoffmann und Wynder 1971] HOFFMANN, D. ; WYNDER, E. L.: A study of tobacco carcinogenesis: XI. Tumor initiators, tumor accelerators, and tumor promoting activity of condensate fractions. In: *Cancer* 27 (1971), S. 848–64
- [Hollnagel 2004] HOLLNAGEL, H.: *2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin: Bioaktivierung und DNA-Adduktbildung in V79-Zelllinien und verschiedenen Rattengeweben*, Universität Potsdam, Dissertation, 2004
- [Hoog u. a. 2001] HOOG, J. O. ; HEDBERG, J. J. ; STROMBERG, P. ; SVENSSON, S.: Mammalian alcohol dehydrogenase - functional and structural implications. In: *J Biomed Sci* 8 (2001), S. 71–6
- [Hook und Goldstein 1993] HOOK, J.B. (Hrsg.) ; GOLDSTEIN, R.S. (Hrsg.): *Toxicology of the kidney*. 2. New York : Raven Press Publications, 1993
- [Hu u. a. 1997] HU, P. ; JIN, L. ; BAILLIE, T. A.: Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. In: *J Pharmacol Exp Ther* 281 (1997), S. 611–7

- [Inamura u. a. 1994] INAMURA, T. ; PARDRIDGE, W. M. ; KUMAGAI, Y. ; BLACK, K. L.: Differential tissue expression of immunoreactive dehydropeptidase I, a peptidyl leukotriene metabolizing enzyme. In: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 50 (1994), S. 85–92
- [Jacob u. a. 1982] JACOB, J. ; GRIMMER, G. ; RAAB, G.: The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. In: *Xenobiotica* 12 (1982), S. 45–53
- [Kazerouni u. a. 2001] KAZEROUNI, N. ; SINHA, R. ; HSU, C. H. ; GREENBERG, A. ; ROTHMAN, N.: Analysis of 200 food items for benzo[*a*]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. In: *Food Chem Toxicol* 39 (2001), S. 423–36
- [Kharasch u. a. 1999] KHARASCH, E. D. ; HANKINS, D. C. ; JUBERT, C. ; THUMMEL, K. E. ; TARADAY, J. K.: Lack of single-dose disulfiram effects on cytochrome P-450 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4 activities: evidence for specificity toward P-450 2E1. In: *Drug Metab Dispos* 27 (1999), S. 717–23
- [Klinke u. a. 2005] KLINKE, R. (Hrsg.) ; PAPE, H.-C. (Hrsg.) ; SILBERNAGL, S. (Hrsg.): *Physiologie*. 5. Thieme, 2005
- [Kohjitani u. a. 2006] KOHJITANI, A. ; FUDA, H. ; HANYU, O. ; STROTT, C. A.: Cloning, characterization and tissue expression of rat SULT2B1a and SULT2B1b steroid/sterol sulfotransferase isoforms: divergence of the rat SULT2B1 gene structure from orthologous human and mouse genes. In: *Gene* 367 (2006), S. 66–73
- [Kollock 2007] KOLLOCK, R.: *Humane Alkoholdehydrogenasen und Aldehyddehydrogenasen: Bedeutung für den Metabolismus von Methylpyrenderivaten und von 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural*, Universität Potsdam, Dissertation, 2007
- [Kollock u. a. 2008a] KOLLOCK, R. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; MEINL, W. ; GLATT, H.: Oxidation of alcohols and reduction of aldehydes derived from methyl- and dimethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenases. In: *Toxicology* 245 (2008), S. 65–75
- [Kollock u. a. 2008b] KOLLOCK, R. ; MEINL, W. ; SCHNEIDER, H. ; BATKE, M. ; FRANK, H. ; SEIDEL, A. ; GLATT, H.: Efficient oxidation of promutagenic hydroxymethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenase ADH2 and its inhibition by various agents. In: *Biochem Pharmacol* 75 (2008), S. 527–37
- [Kragh-Hansen u. a. 2002] KRAGH-HANSEN, U. ; CHUANG, V. T. G. ; OTAGIRI, M.: Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. In: *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002), S. 695–704

- [Landsiedel 1997] LANDSIEDEL, R.: *Stoffwechsel und Mutagenität benzylicher Verbindungen*, Universität Kaiserslautern, Dissertation, 1997
- [Landsiedel u. a. 1996] LANDSIEDEL, R. ; ENGST, W. ; SEIDEL, A. ; GLATT, H.: Physicochemical properties and mutagenicity of benzylic compounds. In: *Exp Toxicol Pathol* 48 (1996), S. 366–7
- [Landsiedel u. a. 1998] LANDSIEDEL, R. ; PABEL, U. ; ENGST, W. ; PLOSCHKE, J. ; SEIDEL, A. ; GLATT, H.: Chiral inversion of 1-hydroxyethylpyrene enantiomers mediated by enantioselective sulfotransferases. In: *Biochem Biophys Res Commun* 247 (1998), S. 181–5
- [Larsson u. a. 1983] LARSSON, B. K. ; SAHLBERG, G. P. ; ERIKSSON, A. T. ; BUSK, L. A.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food. In: *J Agric Food Chem* 31 (1983), S. 867–73
- [Lewis 2001] LEWIS, D. F. V.: *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*. 1. London : Taylor & Francis, 2001
- [Lipsky u. a. 2001a] LIPSKY, J. J. ; SHEN, M. L. ; NAYLOR, S.: In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. In: *Chem Biol Interact* 130-132 (2001), S. 93–102
- [Lipsky u. a. 2001b] LIPSKY, J. J. ; SHEN, M. L. ; NAYLOR, S.: Overview—in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. In: *Chem Biol Interact* 130-132 (2001), S. 81–91
- [Lodovici u. a. 1995] LODOVICI, M. ; DOLARA, P. ; CASALINI, C. ; CIAPPELLANO, S. ; TESTOLIN, G.: Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. In: *Food Addit Contam* 12 (1995), S. 703–13
- [Ma 2001] MA, L.: *Mercaptursäure und Nucleosidaddukt im Harn als Biomarker in 1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten*, Universität Potsdam, Dissertation, 2001
- [Ma u. a. 2002] MA, L. ; KUHLOW, A. ; GLATT, H.: Ethanol enhances the activation of 1-hydroxymethylpyrene to DNA adduct-forming species in the rat. In: *Polycyclic Aromat Compds* 22 (2002), S. 933–46
- [Ma u. a. 2000] MA, L. ; LANDSIEDEL, R. ; KUHLOW, A. ; ENGST, W. ; SEIDEL, A. ; GLATT, H.: Detection of mercapturic acids and nucleoside adducts in blood, urine and feces of rats treated with metabolites of methylpyrene. In: *Polycyclic Aromat Compds* 21 (2000), S. 135–49

- [Manach u. a. 1997] MANACH, C. ; MORAND, C. ; DEMIGNE, C. ; TEXIER, O. ; REGERAT, F. ; REMESY, C.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats. In: *FEBS Lett* 409 (1997), S. 12–6
- [Marquardt und Schäfer 2004] MARQUARDT, H. (Hrsg.) ; SCHÄFER, S. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Stuttgart : WVG, 2004
- [Marselos u. a. 1976] MARSELOS, M. ; LANG, M. ; TORRONEN, R.: Modifications of drug metabolism by disulfiram and diethyldithiocarbamate. II. D-Glucuronic acid pathway. In: *Chem Biol Interact* 15 (1976), S. 277–87
- [Meador u. a. 1995] MEADOR, J.P. ; STEIN, J.E. ; REICHERT, W.L. ; VARANASI, U.: Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. In: *Rev Environ Contam Toxicol* 143 (1995), S. 79–165
- [Meinl u. a. 2002] MEINL, W. ; MEERMAN, J. H. ; GLATT, H.: Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. In: *Pharmacogenetics* 12 (2002), S. 677–89
- [Meinl u. a. 2006] MEINL, W. ; PABEL, U. ; OSTERLOH-QUIROZ, M. ; HENGSTLER, J. G. ; GLATT, H.: Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. In: *Int J Cancer* 118 (2006), S. 1090–7
- [Menzie u. a. 1992] MENZIE, C.A. ; POTOCKI, B.B. ; SANTODONATO, J.: Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. In: *Environ Sci Technol* 26 (1992), S. 1278–84
- [Mizuma u. a. 1991] MIZUMA, T. ; KOMORI, M. ; UENO, M. ; HORIKOSHI, I.: Sulphate conjugation enhances reversible binding of drug to human serum albumin. In: *J Pharm Pharmacol* 43 (1991), S. 446–8
- [Monnerjahn u. a. 1993] MONNERJAHN, S. ; SEIDEL, A. ; STEINBERG, P. ; OESCH, F. ; HINZ, M. ; STEZOWSKY, J. J. ; HEWER, A. ; PHILLIPS, D. H. ; GLATT, H. R.: Formation of DNA adducts from 1-hydroxymethylpyrene in liver cells in vivo and in vitro. In: *IARC Sci Publ* 124 (1993), S. 189–93
- [Moorthy und Randerath 1996] MOORTHY, B. ; RANDERATH, K.: Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo[a]pyrene-induced hepatic DNA adduct formation in vivo and inhibits microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in vitro: likely inhibition of epoxide detoxication by pentachlorophenol. In: *Arch Toxicol* 70 (1996), S. 696–703
- [Morita u. a. 1998] MORITA, K. ; MAEDA, Y. ; MASUDA, M. ; KAZUSAKA, A. ; IMAOKA, S. ; FUNAE, Y. ; FUJITA, S.: Strain differences in CYP3A-mediated C-8 hydroxylation

- (1,3,7-trimethyluric acid formation) of caffeine in Wistar and Dark Agouti rats. Rapid metabolism of caffeine in debrisoquine poor metabolizer model rats. In: *Biochem Pharmacol* 55 (1998), S. 1405–11
- [Mumford u. a. 1995] MUMFORD, J. L. ; LI, X. ; FUDING, H. ; LU, X. B. ; CHUANG, J. C.: Human exposure and dosimetry of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from Huan Wei, China with high lung cancer mortality associated with exposure to unvented coal smoke. In: *Carcinogenesis* 16 (1995), S. 3031–6
- [Nagata und Yamazoe 2000] NAGATA, K. ; YAMAZOE, Y.: Pharmacogenetics of sulfotransferase. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 (2000), S. 159–76
- [Nagendra u. a. 1994] NAGENDRA, S. N. ; SHETTY, K. T. ; RAO, K. M. ; RAO, B. S.: Effect of disulfiram administration on rat brain glutathione metabolism. In: *Alcohol* 11 (1994), S. 7–10
- [NaturalEyeCare Stand 16.03.2007] NATURALEYECARE: *Food Sources for Nutrients*. <http://www.naturaleyecare.com/prev-food.asp>. Stand 16.03.2007
- [NutraSanus Stand 16.03.2007] NUTRASANUS: *Quercetin*. <http://www.nutrasanus.com/quercetin.html>. Stand 16.03.2007
- [Okajima u. a. 1984] OKAJIMA, K. ; INOUE, M. ; MORINO, Y. ; ITOH, K.: Topological aspects of microsomal N-acetyltransferase, an enzyme responsible for the acetylation of cysteine S-conjugates of xenobiotics. In: *Eur J Biochem* 142 (1984), S. 281–6
- [Plager 1965] PLAGER, J. E.: The binding of androsterone sulfate, ethiocholanolone sulfate, and dehydroisoandrosterone sulfate by human plasma protein. In: *J Clin Invest* 44 (1965), S. 1234–9
- [Plapp u. a. 1984] PLAPP, B. V. ; LEIDAL, K. G. ; SMITH, R. K. ; MURCH, B. P.: Kinetics of inhibition of ethanol metabolism in rats and the rate-limiting role of alcohol dehydrogenase. In: *Arch Biochem Biophys* 230 (1984), S. 30–8
- [Ploemen u. a. 1996] PLOEMEN, J. P. ; IERSEL, M. L. van ; WORMHOUDT, L. W. ; COMMANDEUR, J. N. ; VERMEULEN, N. P. ; BLADEREN, P. J. van: In vitro inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by disulfiram and diethyldithiocarbamate. In: *Biochem Pharmacol* 52 (1996), S. 197–204
- [Puche und Nes 1962] PUCHE, R. C. ; NES, W. R.: Binding of dehydroepiandrosterone sulfate to serum albumin. In: *Endocrinology* 70 (1962), S. 857–63

- [Rice u. a. 1987] RICE, J. E. ; RIVENSON, A. ; BRALEY, J. ; LAVOIE, E. J.: Methylated derivatives of pyrene and fluorene: evaluation of genotoxicity in the hepatocyte/DNA repair test and tumorigenic activity in newborn mice. In: *J Toxicol Environ Health* 21 (1987), S. 525–32
- [Rice u. a. 1988] RICE, J.E. ; GEDDIE, N.G. ; DEFLORIA, M.C. ; LAVOIE, E.J.: Structural requirements favoring mutagenic activity among methylated pyrenes in *S. typhimurium*. In: COOKE, M. (Hrsg.) ; DENNIS, A. (Hrsg.): *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: A Decade of Progress*. Columbus (Ohio) : Battelle Press, 1988, S. 773–85
- [Roemer u. a. 2004] ROEMER, E. ; STABBERT, R. ; RUSTEMEIER, K. ; VELTEL, D.J. ; MEISGEN, T. J. ; REININGHAUS, R.A. ; CARCHMAN, C.L. ; GAWORSKI, K.F.: Chemical composition, cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoke under two sets of machine smoking conditions. In: *Toxicology* 195 (2004), S. 31–5
- [Ruzgyte u. a. 2005] RUZGYTE, A. ; BOUCHARD, M. ; VIAU, C.: Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. In: *J Anal Toxicol* 29 (2005), S. 533–8
- [Saito u. a. 2004] SAITO, K. ; SAKAI, N. ; KIM, H. S. ; ISHIZUKA, M. ; KAZUSAKA, A. ; FUJITA, S.: Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. In: *Drug Metab Dispos* 32 (2004), S. 959–65
- [Scalbert und Williamson 2000] SCALBERT, A. ; WILLIAMSON, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. In: *J Nutr* 130 (2000), S. 2073S–85S
- [Scherer u. a. 2000] SCHERER, G. ; FRANK, S. ; RIEDEL, K. ; MEGER-KOSSIEN, I. ; RENNER, T.: Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (2000), S. 373–80
- [Sheng und Duffel 2003] SHENG, J. J. ; DUFFEL, M. W.: Enantioselectivity of human hydroxysteroid sulfotransferase ST2A3 with naphthyl-1-ethanols. In: *Drug Metab Dispos* 31 (2003), S. 697–700
- [Shimada 2006] SHIMADA, T.: Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Drug Metab Pharmacokinet* 21 (2006), S. 257–76
- [Shinohara u. a. 1986] SHINOHARA, A. ; SAITO, K. ; YAMAZOE, Y. ; KAMATAKI, T. ; KATO, R.: Inhibition of acetyl-coenzyme A dependent activation of N-hydroxyarylamines

- by phenolic compounds, pentachlorophenol and 1-nitro-2-naphthol. In: *Chem Biol Interact* 60 (1986), S. 275–85
- [Snook u. a. 1978] SNOOK, M. E. ; SEVERSON, R. F. ; ARRENDALE, R. F. ; HIGMAN, H. C. ; CHORTYK, O. T.: Multi-alkylated polynuclear aromatic hydrocarbons of tobacco smoke: separation and identification. In: *Beiträge zur Tabakforschung International* 9 (1978), S. 222–47
- [Sono u. a. 1996] SONO, M. ; ROACH, M. P. ; COULTER, E. D. ; DAWSON, J. H.: Heme-Containing Oxygenases. In: *Chem Rev* 96 (1996), S. 2841–88
- [Stavric und Klassen 1994] STAVRIC, B. ; KLASSEN, R.: Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. In: *Food Chem Toxicol* 32 (1994), S. 727–34
- [Stockdale und Selwyn 1971] STOCKDALE, M. ; SELWYN, M. J.: Influence of ring substituents on the action of phenols on some dehydrogenases, phospholinas and the soluble ATPase from mitochondria. In: *Eur J Biochem* 21 (1971), S. 416–23
- [Sudlow u. a. 1975] SUDLOW, G. ; BIRKETT, D. J. ; WADE, D. N.: The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. In: *Mol Pharmacol* 11 (1975), S. 824–32
- [Takeda u. a. 2002] TAKEDA, M. ; BABU, E. ; NARIKAWA, S. ; ENDOU, H.: Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. In: *Eur J Pharmacol* 438 (2002), S. 137–42
- [Tate und Meister 1981] TATE, S. S. ; MEISTER, A.: gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. In: *Mol Cell Biochem* 39 (1981), S. 357–68
- [Thomson u. a. 1996] THOMSON, B. ; LAKE, R. ; LILL, R.: The contribution of margarine to cancer risk from polycyclic aromatic hydrocarbons in the New Zealand diet. In: *Polycyclic Aromat Compds* 11 (1996), S. 177–84
- [Tsuda u. a. 1999] TSUDA, M. ; SEKINE, T. ; TAKEDA, M. ; CHA, S.H. ; KANAI, Y. ; KIMURA, M. ; ENDOU, H.: Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter 1. In: *J Pharmacol Exp Ther* 289 (1999), S. 1301–5
- [Van Rooij u. a. 1994] VAN ROOIJ, J. G. ; VEEGER, M. M. ; BODELIER-BADE, M. M. ; SCHEEPERS, P. T. ; JONGENEELLEN, F. J.: Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. In: *Int Arch Occup Environ Health* 66 (1994), S. 55–65

- [Vasiliou u. a. 2000] VASILIOU, V. ; PAPPA, A. ; PETERSEN, D. R.: Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. In: *Chem Biol Interact* 129 (2000), S. 1–19
- [Watabe u. a. 1982] WATABE, T. ; ISHIZUKA, T. ; ISOBE, M. ; OZAWA, N.: A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. In: *Science* 215 (1982), S. 403–5
- [Wright und Dantzler 2004] WRIGHT, S. H. ; DANTZLER, W. H.: Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. In: *Physiol Rev* 84 (2004), S. 987–1049
- [Xiangrong u. a. 2000] XIANGRONG, L. ; JOHNK, C. ; HARTMANN, D. ; SCHESTAG, F. ; KROMER, W. ; GIESELMANN, V.: Enzymatic properties, tissue-specific expression, and lysosomal location of two highly homologous rat SULT1C2 sulfotransferases. In: *Biochem Biophys Res Commun* 272 (2000), S. 242–50

Veröffentlichungen

- **Stephani M.**; Donath C.; Frank H.; Seidel A.; Glatt H.: Die mutagene Wirkung von 10-Sulfooxy- und 10-Chloromethylbenzo[*a*]pyren in *Salmonella typhimurium* wird durch Kaliumchlorid im Inkubationsmedium gegenteilig beeinflusst. 22. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung e. V., 21–24. Februar 2006. Programm und Abstracts, S. 55
- Bakhiya N.; **Stephani M.**; Bahn A.; Ugele B.; Seidel A.; Burckhardt G.; Glatt H.: Uptake of chemically reactive, DNA-damaging sulfuric acid esters into renal cells by human organic anion transporters. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006), Nr. 5, S. 1414–21;
- Bakhiya, N.; **Batke, M.**; Laake, J.; Seidel, A.; Engst, W.; Glatt, H. R.: Urinary and faecal excretion of mercapturic acids of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons: directing role of organic anion transporters (OATs). In: *Arch. Pharmacol.* 375 (2007), Nr. S 1, S. 92
- Bakhiya N.; **Batke M.**; Laake J.; Monien B.H.; Frank H.; Seidel A.; Engst W.; Glatt H.: Directing role of organic anion transporters in the excretion of mercapturic acids of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Drug Metab. Dispos.* 16 (2007)
- Kollock, R.; Meinl, W.; Schneider, H.; **Batke, M.**; Frank, H.; Seidel, A.; Glatt, H.: Efficient oxidation of promutagenic hydroxymethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenase ADH2 and its inhibition by various agents. In: *Biochem Pharmacol*, im Druck (2007)

Lebenslauf Monika Batke, geb. Stephani

- 1979 geboren in Andernach
- 1998 Abitur am Gymnasium an der Burgstraße, Kaiserslautern
- 1998–2003 Studium der Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern, Abschluss: 1. Staatsexamen und Diplom
- Januar–April 2002 Auslandsaufenthalt an der Universität Murcia, Spanien (Universidad Murcia, Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología)
- 2003–2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam Rehbrücke, Abteilung Ernährungstoxikologie bei Prof. Dr. H. R. Glatt
- seit 2004 Teilnahme am Fortbildungsprogramm zur Fachtoxikologin der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
- seit 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin, Hannover, Abteilung Chemikalienbewertung bei Frau Dr. I. Mangelsdorf

Nachwort

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung Ernährungstoxikologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke.

Für die Stellung des Themas, die fachliche Betreuung sowie die vielfältigen technischen Möglichkeiten und Freiheiten bei der praktischen Durchführung gilt mein Dank Herrn Professor Hansruedi Glatt. Für die Begutachtung der Arbeit danke ich Herrn Professor Manfred Metzler und Herrn Professor Edmund Maser.

In Hinblick auf die tägliche Laborarbeit möchte ich mich besonders bei drei KollegInnen für ihre Teilnahme an allen Höhen und Tiefen bedanken: Bei meinem Betreuer Dr. Heiko Schneider für alle „tief durchatmen, locker durchschwingen“-Ansagen; bei Dr. Wolfram Engst für die Zuflucht im Analytiklabor und die vielen, langen Gespräche gerade gegen Ende der Arbeit; schließlich bei Frau Brigitte Knuth für die tagtägliche Hilfe bei den Versuchen und ihre liebevolle „Rundum-Versorgung“.

Diese Arbeit ist Teil des Projekts „Sulfotransferase-mediated activation of alkylated and alkanobridged polycyclic aromatic hydrocarbons present in tobacco smoke, and its modulation by alcohol and drugs“ finanziert durch das „Philip Morris External Research Program“. An diesem Projekt waren als weitere WissenschaftlerInnen Claudia Donath, Dr. Simone Florian, Dr. Nadiya Bakhiya und Dr. Ronny Kollock beteiligt. Ihnen möchte ich für die kollegiale und mitunter intensiv freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Zum Gelingen dieser Arbeit sowie des Gesamtprojekts trug die Unterstützung der erfahrenen KollegInnen der Abteilung Ernährungstoxikologie und der des Max-Rubner-Laboratoriums wesentlich bei. Daher gilt mein Dank Martina Scholtyssek, Sabine Braune, Dr. Walter Meinl, Andrea Katschak, Jutta Schwenk, Christine Gumz, Elke Thom sowie dem weiteren Team des MRL.

Die Zeit einer Doktorarbeit wird auch wesentlich durch die Gruppe der Doktoranden geprägt. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei allen bisher noch ungenannten MitstreiterInnen und -Zug-FahrerInnen für die schöne gemeinsame Zeit bedanken: Chimgee Bassanjav-Gerber, Gila Dobbernack, Korinna Wend, Mandy Osterloh-Quiroz, Stephan Solloch, Ruchika Mohan, Anna Kipp, Yasmin Sommer, Heli Hollnagel und Ulrike Pabel.

Ein Ausspruch einer ehemaligen Kollegin hat mich bis zuletzt begleitet: „Man bekommt das Alles nur für's Durchhalten, nur für's Durchhalten!“ Aus meiner Familie habe ich die notwendige Unterstützung zum Durchhalten bekommen, um diese Arbeit anfertigen zu können. Ganz besonders möchte ich meinem Mann Jan-Mark danken: für die Unterstützung beim Schreiben und Setzen der Arbeit, für das Durchleiden aller Höhen und Tiefen, für das gemeinsame Durchhalten auch während seiner Promotionszeit und nicht zuletzt für die Papa-Tage, -Nachmittage und -Abende, an denen ich schreiben und korrigieren konnte. Auch meinen Eltern und Geschwistern danke ich für alle praktische Hilfe und die seelische und moralische Unterstützung.