

Aktivität der N-Acetyltransferasen

NAT1 und NAT2

in menschlichen Geweben

Bernhard F. Bornschein

2000

Institut für Toxikologie und Umwelthygiene
der Technischen Universität München

und

Institut für Toxikologie des
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Neuherberg
(komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Greim (i.R.))

**Aktivität der N-Acetyltransferasen
NAT1 und NAT2
in menschlichen Geweben**

Bernhard F. Bornschein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

1. Prüfer: apl. Prof. Dr. F. J. Wiebel

2. Prüfer: Univ.-Prof. Dr. H. Greim, i.R. (komm. Direktor)

Die Dissertation wurde am 20.04.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 08.11.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	VIII
1 Einführung.....	1
1.1 Genetische Grundlagen des Acetyltransferase-Polymorphismus	1
1.1.1 Gene der Acetyltransferasen.....	1
1.1.2 Molekularer Mechanismus des Polymorphismus	2
1.1.3 Nomenklatur	3
1.1.4 Verteilung der Isoniazid-Acetyltransferase in verschiedenen Bevölkerungen.....	3
1.1.5 Verteilung der PABA-Acetyltransferase in verschiedenen Bevölkerungen.....	6
1.2 Enzymologie der Acetyltransferasen.....	6
1.2.1 N-Acetylierung.....	8
1.2.2 O-Acetylierung und Transacetylierungen	9
1.2.3 Deacetylasen.....	9
1.2.4 Substrate der Acetyltransferasen und deren Herkunft.....	9
1.3 Verfahren zur Bestimmung von Phänotyp und Genotyp	13
1.3.1 Phänotypisierung	13
1.3.2 Genotypisierung.....	14
1.4 Bedeutung der Acetyltransferasen.....	15
1.4.1 Hinweise aus bakteriellen und rekombinanten Testsystemen.....	15
1.4.2 Hinweise aus epidemiologischen Untersuchungen.....	15
1.5 Fragestellung.....	16
2 Material.....	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 HPLC Anlage.....	19

2.3 Gewebeproben.....	20
2.3.1 Probenherkunft	20
2.3.2 Probenbegleitprotokoll.....	20
2.3.3 Gewebeproben und Patienten.....	21
2.3.3.1 Haut.....	21
2.3.3.2 Niere und Harnleiter	24
2.3.3.3 Harnblase.....	26
2.3.3.4 Prostata	28
2.3.3.5 Dünn-, Dick- und Mastdarm.....	30
2.3.3.6 Pankreas.....	32
2.3.3.7 Leber.....	34
2.3.3.8 Lunge.....	35
3 Methoden.....	38
3.1 Auswahl der Gewebearten.....	38
3.2 Probenentnahme.....	38
3.2.1 Haut	39
3.2.2 Niere, Harnleiter und Harnblase.....	39
3.2.3 Leber, Darm und Pankreas.....	39
3.2.4 Lunge	40
3.3 Datenerhebung mit dem Probenbegleitprotokoll.....	40
3.4 Lagerung und Transport.....	40
3.5 Gewebeaufschluß	41
3.6 Gewinnung von Cytosol.....	41
3.7 Proteinbestimmung.....	42
3.8 Acetyltransferase-Assay	42
3.8.1 Inkubationsansatz.....	43
3.8.1.1 Acetylierung von PABA	43
3.8.1.2 Acetylierung von Isoniazid	44

3.8.2	Nachweis und Quantifizierung	44
3.8.2.1	N-Acetyl-PABA	45
3.8.2.2	N-Acetyl-Isoniazid	45
3.9	Auswertung	46
3.9.1	Berechnung der spezifischen Aktivität.....	46
3.9.2	Berechnung der Nachweisgrenzen.....	47
3.9.3	Statistische Auswertung	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	HPLC-Analysen von N-Acetyl-PABA und N-Acetyl-Isoniazid	48
4.2	Abklärung der Versuchsbedingungen.....	50
4.2.1	Transport- und Lagerungsbedingungen.....	51
4.2.1.1	Stabilität von Acetyltransferasen der Ratte bei Lagerung auf Eis	51
4.2.1.2	Stabilität von Acetyltransferasen der Ratte bei Tiefkühlung.....	52
4.2.2	Einfluß eingesetzter Proteinmengen.....	54
4.2.3	Einfluß der Inkubationszeit	59
4.2.4	Acetyltransferase-Aktivitäten bei unterschiedlichen Cytosolpräparationen.....	62
4.3	Lagerungsstabilität der acetylierten Markersubstrate.....	63
4.4	Acetyltransferase-Aktivitäten in menschlichen Geweben.....	64
4.4.1	Haut.....	64
4.4.2	Niere und Harnleiter	66
4.4.3	Harnblase.....	68
4.4.4	Prostata	69
4.4.5	Dünndarm, Kolon und Rektum	70
4.4.6	Pankreas.....	73
4.4.7	Leber.....	74
4.4.8	Lunge.....	74

5	Diskussion.....	77
5.1	Störeinflüsse und Variabilitätsfaktoren.....	77
5.1.1	Blut.....	77
5.1.2	Geschlecht.....	78
5.1.3	Alter.....	79
5.1.4	Einfluß von Glukose.....	79
5.1.5	Glucokortikoide.....	80
5.1.6	H ₂ -Rezeptor Antagonisten.....	80
5.1.7	Sonstige Medikamente.....	81
5.1.8	Deacetylase-Aktivität.....	82
5.2	Stabilität der AT.....	82
5.2.1	Stabilität bei Raum- und Körpertemperatur.....	83
5.2.2	Einfrieren.....	83
5.2.3	Lagerung bei +4 °C.....	84
5.3	Fehlerabschätzung.....	85
5.3.1	Inkubationszeit.....	85
5.3.2	Cytosolbereitung.....	85
5.4	Verteilung von AT-Aktivitäten beim Menschen.....	86
5.4.1	Haut.....	86
5.4.2	Niere.....	87
5.4.3	Harnleiter und Blase.....	87
5.4.4	Prostata.....	89
5.4.5	Dünndarm, Kolon und Rektum.....	90
5.4.6	Leber.....	92
5.4.7	Pankreas.....	92
5.4.8	Lunge.....	93
5.5	Enzymaktivität und Genotyp der Isoniazid-Acetyltransferase.....	94
5.6	Rolle der AT für die Kanzerogenese beim Menschen.....	95

5.6.1	Kolorektale Karzinome	96
5.6.2	Blasenkarzinome	96
5.6.3	Bronchialkarzinome	97
5.7	Acetyltransferasen beim Menschen und in Versuchstiermodellen.....	98
5.7.1	Bedeutung von Acetyltransferasen im menschlichen Metabolismus	98
5.7.2	Acetyltransferasen in Maus, Hamster, Ratte und Kaninchen.....	100
5.7.3	Ausblick.....	103
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	107
8	Abbildungsverzeichnis.....	126
9	Tabellenverzeichnis.....	127

Abkürzungen

2-AF.....	2-Aminofluoren
4-ABP	4-Aminobiphenyl
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
Ac-INH	N-Acetyl-Isoniazid
Ac-PABA	N-Acetyl-p-Aminobenzoessäure
AT	Acetyltransferase/n
Bp.....	Basenpaare (Nukleotidpaare)
BSA.....	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CYP 1A2	Cytochrom P450 1A2
DTT	Dithiothreitol (Cleveland's reagent)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery.....	Erythrozytenzahl im Serum
Glu-P-1.....	2-Amino-6-Methyldipyrido-[1,2- <i>a</i> :3,2- <i>d</i>]-Imidazol (heterozyklisches Arylamin)
Hb.....	Hämoglobin
Hk.....	Hämatokrit
HPLC	High pressure / performance liquid chromatography, Hochdruck / -leistungs- flüssigkeitschromatographie
INH	Isoniazid
IQ	2-Amino-3-Methylimidazo-[4,5- <i>f</i>]-Quinolin (heterozyklisches Arylamin)
Leuko.....	Leukozytenzahl im Serum
MeIQ	2-Amino-3,4-Dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]-Quinolin (heterozyklisches Arylamin)
MW	Mittelwert, arithmetisches Mittel
NAT	N-Acetyltransferase
OAT	O-Acetyltransferase
PABA.....	p-Aminobenzoessäure
PAS	p-Aminosalizylsäure
PBS	phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
R _T	Retentionszeit eines Peaks
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SMZ.....	Sulfamethazin
TCA.....	Trichloressigsäure
Trp-P-1.....	3-Amino-1,4-Dimethyl-5 <i>H</i> -Pyrido[4,3- <i>b</i>]-Indol (heterozyklisches Arylamin)
V.a.....	Verdacht auf

1 Einführung

Bereits ein Jahr nach der Einführung von Isoniazid (INH) in die Therapie der Tuberkulose im Jahr 1952 wurden große interindividuelle Unterschiede in Nebenwirkungsrate und Metabolismus des Tuberkulostatikums festgestellt, die das Patientenkollektiv in zwei Gruppen teilte. Es dauerte noch einige Jahre, bis erkannt wurde, dass dies auf Unterschieden in der Fähigkeit, INH zu acetylieren beruht (Evans 1989, S. 157; Grant 1993, S. 45).

Dieser sog. „historische Acetyltransferase-Polymorphismus“ führte zu der Benennung des das INH acetylierenden Enzyms als „polymorphe“ Acetyltransferase (AT, Acetyl-Coenzym A: Arylamin N-Acetyltransferase, E.C. 2.3.1.5). Aus Gründen der besseren Übersicht wird diese AT im folgenden substratdefiniert generell als INH-AT bzw. gelegentlich als Sulfamethazin (SMZ) -AT bezeichnet. Eine weitere AT, die p-Aminobenzoensäure (PABA) acetyliert (in dieser Arbeit als PABA-AT bezeichnet), wies in der Bevölkerung eine unimodale Verteilung auf und wurde analog als „monomorphe“ AT bezeichnet (Motulsky und Steinmann 1962, S. 1387; Vatsis und Weber 1993, S. 71). Neuere Befunde zeigen jedoch, dass auch die PABA-AT einem Polymorphismus unterliegt (Grant *et al.* 1992b, S. 244; Vatsis und Weber 1993, S. 73f.). In der Literatur wird die monomorphe AT unabhängig vom Substratspektrum üblicherweise als NAT1 und die polymorphe AT als NAT2 bezeichnet. Neuerdings werden die AT nach einer international einheitlichen Systematik auf Gen- und Proteinebene benannt (s. Kap. 1.1.3).

1.1 Genetische Grundlagen des Acetyltransferase-Polymorphismus

1.1.1 Gene der Acetyltransferasen

Die Gene beider AT wurden beim Menschen in der Region 8p21.3 – 23.1 des Chromosoms 8 lokalisiert. Sie sind durch mindestens 25.000 Basenpaare voneinander getrennt (Hickman *et al.* 1994, S. 445, Ilett *et al.* 1999, S. 957ff.; Hirvonen 1999, S. 253). Beide Gene wurden inzwischen sequenziert. Sie umfassen einen offenen Leserahmen von 870 Basenpaaren (Bp), der keine Introns enthält (Blum *et al.* 1990, S. 195ff.). Das Gen der INH-AT weist im 5'-nichtkodierendem Bereich ein Intron von ca. 8.000 Bp Länge auf, das Gen der PABA-AT besteht aus einem einzigen Exon (Ebisawa und Deguchi 1991, S. 1254). Beide Gene zeigen eine Homologie von 87% im kodierenden Bereich, 5'- und

3'-nichtkodierende Bereiche stimmen nahezu perfekt überein (Blum *et al.* 1990, S. 195). Es wurde daher vermutet, dass die INH-AT aus der entwicklungsgeschichtlich älteren PABA-AT entstanden ist (Ebisawa und Deguchi 1991, S. 1255). Ein drittes AT-Gen weist 8 deletäre Mutationen auf, von denen vier zu Verschiebungen des Leserasters führen und zwei weitere vorzeitige Translationsstops kodieren, so dass kein Genprodukt kodiert wird. Es handelt sich um ein sog. Pseudogen (Blum *et al.* 1990, S. 197).

1.1.2 Molekularer Mechanismus des Polymorphismus

Der genetische Polymorphismus der INH-AT entsteht durch Punktmutationen im kodierenden Bereich des INH-AT Gens, die zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führen. Darüber hinaus bestehen stille Mutationen ohne Einfluß auf die Aktivität der INH-AT, jedoch möglicherweise auf die Translation (Abe *et al.* 1993, S. 813; Lin *et al.* 1993, S. 217ff.; Agundez *et al.* 1994, S. 202ff.; Cascorbi *et al.* 1995, S. 581ff.; Martinez *et al.* 1995, S. 207ff.; Hirvonen 1999, S. 256f.). Derzeit sind 12 Mutationen bekannt, aus denen durch unterschiedliche Kombination 27 Genotypen hervorgehen (Vatsis *et al.* 1995, S. 4f.; Ilett *et al.* 1999, S. 958f.). Die Mutationen können ohne Auswirkungen auf die Enzymaktivität bleiben (Hein *et al.* 1994b, S. 729ff.; Cascorbi *et al.*, 1996a, S. 257ff.), bei gleichbleibenden Mengen an mRNA zu reduzierten Proteingehalten führen (Blum *et al.* 1991, S. 5239, Deguchi 1992, S. 18140ff.), die Stabilität (gemessen als Halbwertszeit des aktiven Enzyms) oder die kinetischen Parameter einschließlich der Substrataffinität beeinträchtigen (Ferguson *et al.* 1994b, S. 373; Hickman *et al.* 1995, S. 699). Tab. 1 illustriert die Vielzahl der inzwischen beschriebenen Mutationen.

Auch das PABA-AT Gen weist Punktmutationen im kodierenden und nichtkodierenden Bereich auf, die die Aminosäuresequenz an einer (Hughes *et al.* 1998, S. 55ff; Payton *et al.* 1998, S. 361ff; Hubbard *et al.* 1998, S. 913ff) oder mehreren Stellen (Doll *et al.* 1997, S.584ff.) verändern können oder nicht (sog. stille Mutationen; Vatsis und Weber, 1993, S. 73f.). Weiterhin kommen verschiedene kurze Deletionen oder Insertionen vor (Doll *et al.* 1997, S. 584ff.). Die Veränderungen haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Stabilität und damit Menge des Enzyms (Vatsis und Weber 1993, S. 73f.) oder auch die Enzymkinetik. Einige Mutationen kodieren einen Stopkodon, der zum Abbruch der Proteinsynthese und damit zu enzymatisch inaktiven Bruchstücken führt (Hughes *et al.* 1998, S. 55ff.; Hubbard *et al.* 1998, S. 913ff.; Lin *et al.* 1998, S. 269ff.). Derzeit sind 24 verschiedene Allele bekannt.

1.1.3 Nomenklatur

In der Vergangenheit wurde von jeder Arbeitsgruppe ein eigenes Klassifikationssystem für die einzelnen Genotypen der INH-AT etabliert. So entstand die M-Klassifikation der Arbeitsgruppe um U.A. MEYER (Blum *et al.* 1991; S. 5239; Bell *et al.* 1993, S. 1691), die S-Klassifikation von E. SIM (Hickman und Sim 1991, S. 1012), die R-Klassifikation unter W.W. WEBER (Vatsis *et al.* 1991, S. 6336) sowie weitere Bezeichnungen (Ohsako und Deguchi 1990, S. 4632; Deguchi 1992a, S. 18141). Weiterhin war verwirrend, dass PABA-AT in einigen Spezies mono-, in anderen jedoch polymorph exprimiert wird.

1994 wurde ein systematisches Nomenklatorsystem zur eindeutigen Bezeichnung aller AT erarbeitet und im Rahmen einer Konsensuskonferenz 1998 modifiziert und aktualisiert (Ilett *et al.*, 1999, S. 957ff.). Hierbei werden alle bekannten AT in der Reihenfolge ihrer Entdeckung bzw. Beschreibung numeriert. Der Bezeichnung NAT1 bzw. NAT2 folgt ein Stern (für das Allel, zusätzlich kursive Schreibweise) bzw. ein Leerzeichen (für das Protein) sowie eine fortlaufende Nummer in der Reihenfolge der Entdeckung (Vatsis *et al.* 1995, S. 10ff.). Ähnliche Allele werden durch gleiche Ziffern zu einer Gruppe zusammengefasst und durch Buchstaben differenziert. Die Mitglieder der Nomenklaturkomitees vergeben die Bezeichnungen für neue Varianten und informieren zeitnah über den aktuellen Stand der Nomenklatur über das Internet unter <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>. Tab. 1 zeigt beispielhaft die Bezeichnung der Mutationen des menschlichen INH-AT Gens nach alter und neuer Nomenklatur.

1.1.4 Verteilung der Isoniazid-Acetyltransferase in verschiedenen Bevölkerungen

Weltweit sind in verschiedenen geographischen Regionen und Bevölkerungen unterschiedliche Anteile schneller und langsamer Acetylierer anzutreffen. Der Anteil langsamer Acetylierer erreicht bis zu 95% unter Marokkanern, Libanesen oder Ägyptern, während im asiatischen Raum bei Japanern und Koreanern langsame Acetylierer nur ca. 11% ausmachen. Europäer und insbesondere Deutsche sind mit ca. 60 - 70% überwiegend langsame Acetylierer (Asproдини *et al.* 1998, S. 501ff.; Evans 1989, S. 197ff.; Sunahara *et al.* 1961, S. 1530; Woolhouse *et al.* 1997, S. 73ff.; Xie *et al.* 1997, S. 503ff.).

Tab. 1: Mutationen im menschlichen INH-AT Gen

neue Nomenklatur		alte Nomenklatur	Nukleotid- wechsel	Aminosäuren- wechsel	Phänotyp
Allel	Protein				
<i>NAT2*4</i>	NAT2 4	Wildtyp O-7 R ₁ Allel 1	---	---	schnell
<i>NAT2*5A</i>	NAT2 5A	M1 S1b	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T	Ile ¹¹⁴ Thr stille Mutation	langsam
<i>NAT2*5B</i>	NAT2 5B	r ₃ S1a Allel 4	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ Thr stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*5C</i>	NAT2 5C	S1c	T ³⁴¹ C A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ Thr Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*5D</i>	NAT2 5D		T ³⁴¹ C	Ile ¹¹⁴ Thr	langsam
<i>NAT2*5E</i>	NAT2 5E		T ³⁴¹ C G ⁵⁹⁰ A	Ile ¹¹⁴ Thr Arg ¹⁹⁷ Gln	langsam
<i>NAT2*5F</i>	NAT2 5F		T ³⁴¹ C C ⁴⁸¹ T C ⁷⁵⁹ T A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ Thr stille Mutation stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*6A</i>	NAT2 6A	M2 r ₂ Allel 3 S2	C ²⁸² T G ⁵⁹⁰ A	stille Mutation Arg ¹⁹⁷ Gln	langsam
<i>NAT2*6B</i>	NAT2 6B		G ⁵⁹⁰ A	Arg ¹⁹⁷ Gln	langsam
<i>NAT2*6C</i>	NAT2 6C		C ²⁸² T G ⁵⁹⁰ A A ⁸⁰³ G	stille Mutation Arg ¹⁹⁷ Gln Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*6D</i>	NAT2 6D		T ¹¹¹ C C ²⁸² T G ⁵⁹⁰ A	stille Mutation stille Mutation Arg ¹⁹⁷ Gln	langsam
<i>NAT2*7A</i>	NAT2 7A	M3 D14	G ⁸⁵⁷ A	Gly ²⁸⁶ Glu	langsam

Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Tab. 1 (Fortsetzung):

<i>NAT2*7B</i>	NAT2 7B	S3 Allel 2 D-14	C 282 T G 857 A	stille Mutation Gly ²⁸⁶ Glu	langsam
<i>NAT2*12A</i>	NAT2 12A		A 803 G	Lys ²⁶⁸ Arg	schnell
<i>NAT2*12B</i>	NAT2 12B		C 282 T A 803 G	stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	schnell
<i>NAT2*12C</i>	NAT2 12C		C 481 T A 803 G	stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	schnell
<i>NAT2*13</i>	NAT2 13	S4	C 282 T	stille Mutation	schnell
<i>NAT2*14A</i>	NAT2 14A	M4/M4a	G 191 A	Arg ⁶⁴ Gln	langsam
<i>NAT2*14B</i>	NAT2 14B	M4b AT2B	G 191 A C 282 T	Arg ⁶⁴ Gln stille Mutation	langsam
<i>NAT2*14C</i>	NAT2 14C		G 191 A T 341 C C 481 T A 803 G	Arg ⁶⁴ Gln Ile ¹¹⁴ Thr stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*14D</i>	NAT2 14D		G 191 A C 282 T G 590 A	Arg ⁶⁴ Gln stille Mutation Arg ¹⁹⁷ Gln	langsam
<i>NAT2*14E</i>	NAT2 14E		G 191 A A 803 G	Arg ⁶⁴ Gln Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*14F</i>	NAT2 14F		G 191 A T 341 C A 803 G	Arg ⁶⁴ Gln Ile ¹¹⁴ Thr Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*14G</i>	NAT2 14G		G 191 A C 282 T A 803 G	Arg ⁶⁴ Gln stille Mutation Lys ²⁶⁸ Arg	langsam
<i>NAT2*17</i>	NAT2 17		A 434 C	Gln ¹⁴⁵ Pro	???
<i>NAT2*18</i>	NAT2 18		A 845 C	Lys ²⁸² Thr	???
<i>NAT2*19</i>	NAT2 19		C 190 T	Arg ⁶⁴ Trp	langsam

Mutationen im INH-AT Gen, Auswirkung auf die Struktur und Aktivität der INH-AT. Die bisherige und die neue Nomenklatur wurde den einzelnen Mutationen zugeordnet. Daten aus Vatsis *et al.* 1995, S. 4f.; Lin *et al.* 1994, S. 125ff. und Hein *et al.* 1995, S. 3553f. sowie unter <http://www.louisville.edu/med-school/pharmacology/NAT.html> (Stand: 15.02.2000).

Diese unterschiedlichen Häufigkeiten sind auf die Verteilung der verschiedenen Mutationen der INH-AT in verschiedenen Populationen zurückzuführen. So kommt das Allel *NAT2*7* vorwiegend unter Orientalen, Asiaten und Chinesen vor (Xie *et al.* 1997, S. 503ff.), während *NAT2*14* ein afrikanisches Gen darzustellen scheint, da es nahezu ausschließlich unter Afrikanern vorkommt (Lin *et al.* 1994, S. 125ff.; Delomenie *et al.* 1996, S. 177ff). Unter Weißen (Kaukasiern) ist *NAT2*5* mit Abstand am häufigsten anzutreffen. Tab. 2. zeigt an ausgewählten Beispielen, wie sich der Anteil schneller und langsamer Acetylierer in Abhängigkeit von der ethnischen Zusammensetzung der Bevölkerung ändert.

1.1.5 Verteilung der PABA-Acetyltransferase in verschiedenen Bevölkerungen

Da der Polymorphismus der PABA-AT erst in jüngerer Zeit entdeckt wurde, liegen zur Verteilung der Genotypen in den Populationen verschiedener Länder bislang nur wenig Daten vor. So kommt der Wildtyp *NAT1*4* unter Schotten mit einer Häufigkeit von 98% vor (Hubbard *et al.* 1998, S. 913ff.), bei Indern, Malaien und Chinesen jedoch nur zu 51%, 30% bzw. 35%. Während das Allel *NAT1*10* mit 17%, 39% und 30% unterschiedlich verteilt ist, sind die Allele *NAT1*3* (29-33%) und *NAT1*11* (2%) sind in diesen Volksgruppen weitgehend gleich verteilt (Zhao *et al.* 1998, S. 299ff.). In einer überwiegend kaukasischen Bevölkerungsstichprobe traten *NAT1*11* mit 2,1%, *NAT1*14* mit 2,8% und *NAT1*15* mit 1,4% selten auf (Hughes *et al.* 1998, S. 55ff.).

Der Anteil langsamer Acetylierer wurde in einer überwiegend kaukasischen Bevölkerung mit ca. 8% angegeben (Butcher *et al.* 1998, S. 67ff.), in anderen Untersuchungen wurde ein Anteil von 71% (Bell *et al.* 1995, S. 3537ff.), 50% (Probst-Hensch *et al.* 1996, S. 2125ff.) und 57% gefunden (Bouchardy *et al.* 1998, S. 291ff.). Als schnell acetylierend werden die Allele *NAT1*4* (Wildtyp), *NAT1*3*, langsam acetylieren *NAT1*14* sowie *NAT1*15*. Wie die Genotypen *NAT1*10* und *NAT1*11* einzustufen sind, wird noch kontrovers diskutiert, möglicherweise handelt es sich um schnell acetylierende Allele (Doll *et al.* 1997, S. 584ff.; Butcher *et al.* 1998, S. 67ff.; Bruhn *et al.* 1999, S. 1759ff.; Hirvonen 1999, S. 254f.).

1.2 Enzymologie der Acetyltransferasen

AT sind ausschließlich cytosolisch verteilte Enzyme. Beide AT enthalten 290 Aminosäuren mit deduzierten Molekulargewichten von 33,9 (PABA-AT) bzw. 33,5 kDa (INH-AT). Für die Katalyse ist ein hochkonserviertes Cystin (Kodon 68) essentiell (Dupret und Grant 1992, S. 7382).

Tab. 2: Häufigkeit von schnellen und langsamen Allelen und Phänotypen der INH-AT in verschiedenen Bevölkerungen.

	n	Genotyp (% der Gesamtbevölkerung)					Phänotyp (%)		Ref.
		*4	*5A/B/C	*6A/B	*7A/B	*14A/B	schnell	langsam	
Afrikanische Herkunft									
Schwarze US Amerikaner	172	32	29	24	7	8	54	46	1
	128	36	30	22	2	9	59	41	2
Asiatische Herkunft									
Chinesen (Hong Kong)	140	47	6	31	16	0	72	28	1
Chinesen (Singapur)	187	51	7	32	10		72	28	3
Chinesen (Taiwan)	200	51	3	31	15		76	24	1
Chinesen	3516	52	6	31	11		77	23	10
Filipinos	200	39	7	36	18		63	37	1
Inder	122	26	33	38	3		45	55	1
Japaner	158	64	2	23	11		87	13	1
Japaner	51	73	1	20	7		93	7	4
Japaner	145	70	1	21	8		91	9	5
Japaner	145	69	2	19	10		90	10	11
Koreaner	170	68	2	18	11	1	90	10	1
Kaukasische Herkunft									
Weißer US Amerikaner	372	25	45	28	2		44	56	2
Weißer US Amerikaner	98	23	41	34	2		41	59	1
Juden (USA)	99	23	41	34	2		41	59	6
Türken (Südost Anatolien)	303	23	42	31	5		41	59	12
Deutsche	100	23	46	27	4		41	59	6
Engländer	31	26	45	27	2		45	55	7
Engländer	48	20	49	30	1		36	64	8
Schweizer	44	46	25	27	2		71	29	9
Slawische Herkunft									
Polen	248	22	44	30	3		39	61	13
Hispanische Herkunft									
Südamerikaner (USA)	166	42	23	17	17	1	66	34	1
Südamerikaner (USA)	130	38	32	19	10	1	62	38	1
Nicaraguaner	137	42	31	17			66	34	14
Portugiesen	128	21	43	33	3		38	62	15

Häufigkeiten von Mutationen im INH-AT-Gen und Phänotyp in verschiedenen Bevölkerungen und Umfang der jeweiligen Untersuchungen. Die Daten wurden aus den folgenden Veröffentlichungen entnommen: 1: Lin *et al.* 1994, S. 132; 2: Bell *et al.* 1993, S. 1691f.; 3: Lee *et al.* 1994, S. 356f.; 4: Mashimo *et al.* 1992, S. 141; 5: Deguchi 1992a, S. 18147; 6: Lin *et al.* 1993, S. 830ff.; 7: Hickman und Sim 1991, S. 1012f.; 8: Hickman *et al.* 1992, S. 219; 9: Blum *et al.* 1991, S. 5240; 10: Xie *et al.* 1997, S. 503ff.; 11: Okumura *et al.* 1997, S. 509ff.; 12: Aynacioglu *et al.* 1997, S. 327ff.; 13: Mrozikiewicz *et al.* 1996, S. 376ff.; 14: Martinez *et al.* 1998, S. 623ff.; 15: Lemos und Regateiro 1998, S. 561ff.

Die Aminosäuren von Kodon 210 bis 250 sind für die Stabilität des Enzyms bedeutsam, insbesondere das ebenfalls hochkonservierte Cystin 223. Die zentrale Region mit dem aktiven Zentrum (Kodons 47 - 111) und das C-terminale Ende des Proteins (Kodons 250 - 290, insbesondere Kodon 286) tragen zur Affinität und Substratspezifität bei, während der Bereich der Kodons 112 - 210 für die Reaktionsgeschwindigkeit bedeutsam erscheint (Dupret *et al.* 1994, S. 26834; Dupret und Grant 1992, S. 7382; Hickman *et al.* 1995, S. 700). Insbesondere die streng konservierte Aminosäure Arginin an den Kodons 9 und 64 scheint wesentlich zur Substratbindung und Stabilisierung eines katalytischen Übergangszustands beizutragen. Sie sind essentiell für die intrinsische Stabilität und katalytische Funktionsfähigkeit beider AT (Delomenie *et al.* 1997, S. 207ff.).

1.2.1 N-Acetylierung

Bei der N-Acetylierung übertragen AT (dann als NAT bezeichnet) einen Acetylrest vom Kofaktor AcCoA auf die primäre Amin- bzw. Hydrazingruppe ihrer Substrate. Sowohl PABA-AT als auch INH-AT sind zur N-Acetylierung in der Lage. Zwei Gruppen von NAT sind zu unterscheiden: direkt an aromatische Ringsysteme gebundene Amingruppen werden durch die Arylamin-NAT acetyliert, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist. Alkylarylamine, bei denen die Amingruppe über eine Carbonkette indirekt am aromatischen Ringsystem angebracht ist, wie dies z.B. bei Serotonin oder Dopamin der Fall ist, werden durch die Alkylarylamin-NAT acetyliert. Sie kommt vorwiegend in der Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*) vor (Deguchi 1992b, S. 231f.). Bei höheren Säugetieren findet sich keine signifikante Überlappung der Substratspektren der genannten Enzyme (Deguchi 1992b, S. 235).

Die Acetylierung verläuft im Sinne einer Ping-Pong-Reaktion, bei der in einem ersten Schritt AcCoA an das Enzym gebunden und der Acetylrest auf ein Cystin übertragen wird. Nach Abdiffusion des CoA-Rests wird Substrat gebunden und die Acetylgruppe auf dessen primäre Amingruppe übertragen. Nach Freisetzung des Produktes beginnt der Zyklus von neuem (Weber und Cohen 1968, S. 277; Kilbane *et al.* 1991, S. 505). Das pH-Optimum scheint zwischen pH 6,0 und 7,4 zu liegen (Mandelbaum-Shavit und Blondheim 1981, S. 66; McQueen und Weber 1980, S. 895). Schwermetallionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} oder Hg^{2+} inaktivieren die AT irreversibel. Sulfhydrylgruppeninhibitoren wie N-Ethylmaleinamid oder p-Chloromercuribenzoat hemmen besonders potent (McQueen und Weber 1980, S. 894; Mandelbaum-Shavit und Blondheim 1981, S. 67). PABA-AT wird darüber hinaus durch Folsäure und Amethopterin stark gehemmt (Ward *et al.* 1992, S. 1100; Mandelbaum-Shavit und Blondheim 1981, S. 67; Ward *et*

al. 1995, S. 1763). Eine Produkthemmung besteht offensichtlich nur in geringem Maße (McQueen und Weber 1980, S. 894).

1.2.2 O-Acetylierung und Transacetylierungen

AT acetylieren neben primären Amingruppen von Arylaminen (N-Acetylierung) auch Hydroxylgruppen von N-Hydroxy-Arylaminen (O-Acetylierung, OAT). N-Acetylgruppen können intramolekular auf die Hydroxylgruppe von N-Hydroxy-Arylaminen übertragen werden (N, O-Acetyltransferase KING, King 1974, S. 1506ff.). Weiterhin können Acetylreste intermolekular von Amingruppen auf Hydroxylgruppen (N, O-Transacetylase BARTSCH, Bartsch *et al.* 1972, S. 281ff.) oder Amingruppen eines zweiten Moleküls übertragen werden (N, N-Transacetylase BOOTH, Booth 1966, S. 746ff.; Übersicht bei Hein 1988, S. 40ff.). Diese Aktivitäten können sowohl durch PABA-AT als auch durch INH-AT vermittelt werden, wenngleich zu - substratabhängig - unterschiedlichem Ausmaß (Hein *et al.* 1993b, S. 1635f.; Hein *et al.* 1995, S. 3533f.). Eine Übersicht dieser Reaktionen zeigt folgende Graphik (Abb. 1).

1.2.3 Deacetylasen

Deacetylasen katalysieren die Abspaltung der Acetylgruppe von Amiden oder Hydroxamsäuren durch Ester- oder Amidhydrolyse. Sie sind bei den meisten Versuchstierspezies mikrosomal verteilt (Glowinski *et al.* 1983, S. 69). Durch 100 µM Paraoxon sind sie irreversibel und quantitativ hemmbar (Hein *et al.* 1993a, S. 512). Ihre Substratspezifität ist gering, sie deacetylieren ein breites Substratspektrum (Evans 1989, S. 189; Land *et al.* 1989, S. 729; Probst *et al.* 1992, S. 1715; Hein 1988, S. 44). Deacetylasen scheinen im Körper ubiquitär vorhanden zu sein (Hein 1988, S. 44). Beim Menschen wurden sie u.a. in Leber (Probst *et al.* 1991, S. 455), Blase (Land *et al.* 1989, S. 729) und im Blut (Lindsay *et al.* 1991, S. 1673) nachgewiesen. Eine Korrelation der Aktivitäten von Deacetylase mit NAT oder OAT konnte beim Menschen nicht nachgewiesen werden (Land *et al.* 1989, S. 729).

1.2.4 Substrate der Acetyltransferasen und deren Herkunft

Primäre Arylamine und Hydrazine als Substrate der AT umfassen ein großes Spektrum von Einzelsubstanzen. Arylamine entstehen auch *in vivo* durch Reduktion polyzyklischer Nitroaromaten (Beland *et al.* 1983, S. 128).

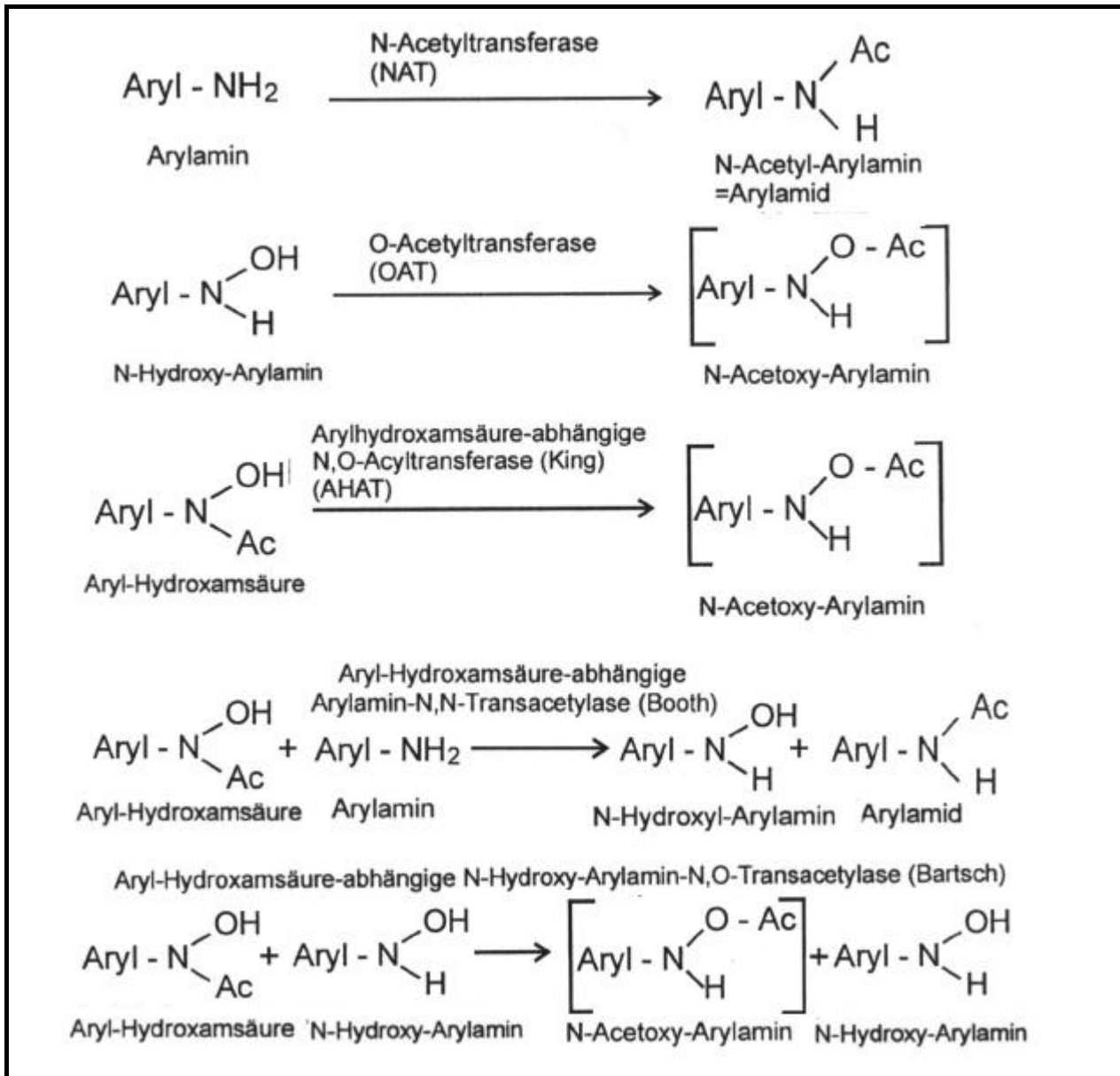


Abb. 1: Durch AT katalysierte Reaktionen.

N- und O-Acetylierung, N, O-Transacetylierungsreaktionen nach den Erstbeschreibern KING und BARTSCH sowie N, N-Transacetylierung nach BOOTH. In eckigen Klammern dargestellt sind instabile Zwischenprodukte. Aryl = Arylrest; Ac = Acetylrest

Darüber hinaus sind die N-oxidierten Derivate meist ebenfalls gute Substrate der AT (Minchin *et al.* 1992, S. 843; Hein *et al.* 1994c, S. 131).

Nitroaromaten entstehen bei fast allen Verbrennungsvorgängen fossiler Brennstoffe wie Holz, Kohle, Stadtgas, Kerosin, Heizöl oder Kraftstoff; also bei der Heizung im häuslichen oder industriellen Bereich, durch Kraftfahrzeuge - hier sind insbesondere Dieselabgase zu nennen - oder akzidentell, z.B. bei Bränden. Auch in Nahrungsmitteln wie gegrilltem Huhn oder in Tee wurden kanzerogene Nitroaromaten nachgewiesen (Tokiwa und Ohnishi 1986, S. 23ff.; Hein 1988, S. 39). Eine Exposition gegenüber Ary-

laminen ist darüberhinaus im industriellen Bereich bei der Arylaminherstellung und -verwendung gegeben, also v.a. im Bereich der Farbenherstellung und -verarbeitung, in der Plastik-, Gummi- und Kabelindustrie, sowie in metall-, textil- und lederverarbeitenden Betrieben (Lower 1982, S. 1060; Cartwright 1983, S. 13ff.; S. ; Risch *et al.* 1995, S. 232; Sinués *et al.* 1992, S. 4886f.). Auch im Zigarettenrauch sind Arylamine in signifikantem Ausmaß enthalten (Lower 1982, S. 1060; Hein 1988, S. 38; Bartsch *et al.* 1990, S. 1828).

Weitere Substrate der AT sind die sog. heterozyklischen aromatischen Amine. Diese entstehen durch Pyrolyse aus Aminosäuren wie Tryptophan, Glutamat oder Lysin (Sugimura und Sato 1983, S. 2415s) oder Gemischen von Kreatinin, Zuckern und Aminosäuren bei hohen Temperaturen beim Braten von Fleisch, Fisch oder Sojaprodukten (Sugimura 1986, S. 5). Auch im Kondensat des Zigarettenrauchs sind sie enthalten (Sugimura 1986, S. 6). Möglicherweise sind auch bestimmte Pestizide Substrate der AT (Falck *et al.* 1999, S. 225ff.). Schließlich wird eine größere Zahl von Arzneimitteln durch AT metabolisiert (Clark 1985, S. 350; Deguchi 1992b, S. 231f.). Die Strukturformeln einiger beispielhaft ausgewählter Substrate sind in Abb. 2 dargestellt.

In der Regel überlappen sich die Substratspektren beider AT stark (Hein *et al.* 1993b, S. 1635). Je nach Beitrag der einzelnen AT wird im Metabolismus der jeweiligen Substanzen in der Bevölkerung eine ein- (monomorphe) oder mehrgipflige (polymorphe) Häufigkeitsverteilung beobachtet. So wurden beispielsweise die Medikamente Procainamid, Dapson, Hydralazin, Phenelzin, Nitrazepam und Clonazepam als polymorphe, und Sulfamethoxazol als monomorphes Substrat bezeichnet, obwohl sie alle durch beide AT acetyliert werden (Clark 1985, S. 350; Hein *et al.* 1993b, S. 1635; Cribb *et al.* 1993, S. 1277ff.). Auch chemische Kanzerogene wie 2-Aminofluoren (2-AF), 4-Aminobiphenyl (4-ABP), β -Naphthylamin oder Benzidin sind Substrate beider AT, mit einer Präferenz der Acetylierung durch PABA-AT (Hein *et al.* 1993b, S. 1635; Minchin *et al.* 1992, S. 841; Zenser *et al.* 1996, S. 3941ff.). Für heterozyklische Arylamine gilt gleiches, wobei diese schlechte Substrate für die N-Acetylierung sind.

Die O-Acetylierung dieser Substanzen wird scheinbar jedoch in erster Linie durch die INH-AT katalysiert zu werden (Hein *et al.* 1993b, S. 1635; Hein *et al.* 1994c, S. 131; Wild *et al.* 1995, S. 644f.).

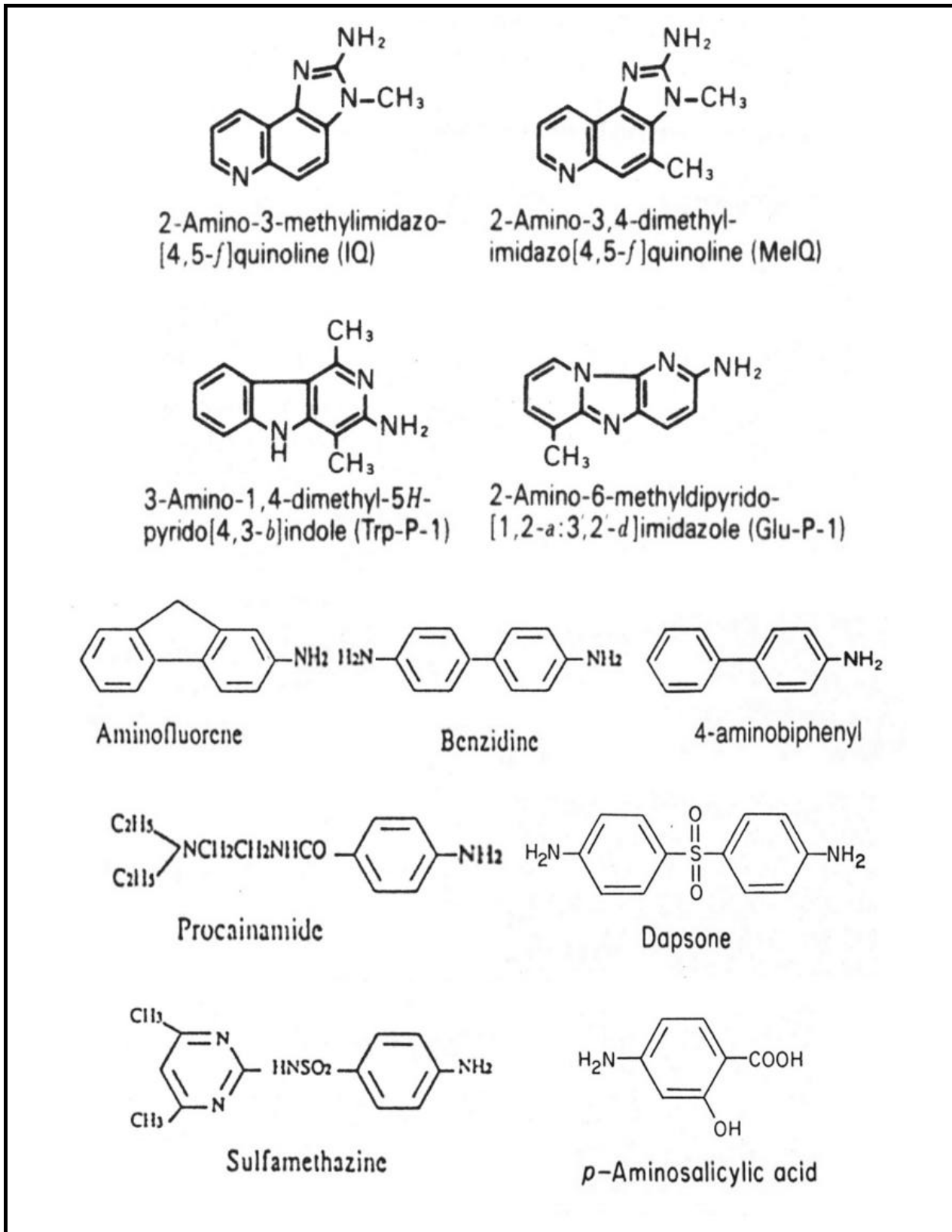


Abb. 2: Strukturformeln von Substraten der AT

Strukturformeln der heterozyklischen Arylamine IQ, MeIQ, Trp-P-1 und Glu-P-1, der Kanzerogene 2-AF, Benzidin und 4-ABP sowie der als Arzneimittel verwendeten Substanzen Procainamid, Dapson, SMZ und PAS. Strukturformeln der verwendeten Substrate PABA und INH s. S. 43

Eine Sonderstellung nehmen die Substanzen PABA, p-Aminosalizylsäure (PAS), Sulfamethazin (SMZ) und INH ein. PABA und PAS werden spezifisch durch die PABA-AT acetyliert. Die Werte der MICHAELIS-Konstante K_m betragen für die beiden Substanzen 15 μM und 11 μM , die Verhältnisse der spezifischen Aktivität der PABA-AT zu der der INH-AT etwa 47.000 und 19.000 : 1 (Hein *et al.* 1993b, S. 1635; Grant *et al.* 1991, S. 187). SMZ und INH gelten als Markersubstrate für die INH-AT. Für diese Substanzen liegen die K_m -Werte bei 123 μM und 374 μM (Hickman *et al.* 1995, S. 701). Umgekehrt beträgt die K_m -Konstante für die Acetylierung von PAS durch die INH-AT ca. 3.000 bis 6.000 μM und für die Acetylierung von SMZ durch die PABA-AT 3.500 μM (Hein *et al.* 1993b, S. 1635; Grant *et al.* 1991, S. 187).

1.3 Verfahren zur Bestimmung von Phänotyp und Genotyp

Abhängig von der jeweiligen Fragestellung sind unterschiedliche Verfahren in Gebrauch, um den Genotyp bzw. Phänotyp der INH-AT von Untersuchungspersonen zu bestimmen.

1.3.1 Phänotypisierung

Zur Bestimmung des Phänotyps wurden im Wesentlichen zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde versucht, von der Aktivität einer Probe, meist aus der Leber (z.B. bei Organspendern) auf den Phänotyp zu schließen. Häufiger, gerade bei epidemiologischen Fragestellungen wurde eine Testsubstanz verabreicht, nach definierten Zeiträumen Muttersubstanz und acetylierte Metaboliten im Blut, Urin oder Speichel bestimmt und ins Verhältnis gesetzt bzw. alternativ Plasmahalbwertszeit berechnet. Als Testsubstanzen für die metabolischen Phänotypisierungstests kamen für die AT2 Dapson, Procainamid, INH oder - am häufigsten - SMZ zum Einsatz (Evans 1989, S. 159ff.; Clark 1985, S. 345ff.; Meisel *et al.* 1997, S. 241ff.; Okumura *et al.* 1997, S. 509ff.). Seit einigen Jahren wird bevorzugt Koffein als Testsubstanz verwendet, da es die Möglichkeit bietet, gleichzeitig den Phänotyp des INH-AT- und des P450 1A2-Polymorphismus zu bestimmen (Evans 1989, S. 190ff.; Grant *et al.* 1990, S. 969; Butler *et al.* 1989, S. 7698; Rostami-Hodjegan *et al.* 1996, S. 121ff.; Fuhr *et al.* 1996, S. 159ff.). Alle metabolischen Tests korrelieren zu über 90% mit den aus dem Genotyp abgeleiteten Acetyliererstatus (Hirvonen 1999, S. 254ff.). Eine zuverlässige Bestimmung des Phänotyps von AT1 kann *in vivo* mit der Testsubstanz PAS erfolgen (Hughes *et al.* 1998, S. 55ff.).

Assays zur Aktivitätsbestimmung der INH-AT basieren auf drei Nachweisverfahren: der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen (sog. Radioassays), chromatographische Verfahren wie HPLC (High Performance Liquid Chromatography) und colorimetrische Messungen. Radioassays messen die Radioaktivität, die ein Produkt durch die Acetylierung mit radioaktiv markiertem AcCoA erhält. Dieses Verfahren ist auf verschiedene Substrate relativ einfach adaptierbar und von der Durchführung wenig aufwendig (Sonawane und Lucier 1975, S. 104). Es zeigt eine gute Spezifität und eine sehr gute Sensitivität mit Nachweisgrenzen von einigen nmol, entsprechend AT-Aktivitäten von ca. 0,1 nmol/mg Protein/min und darunter (Sonawane und Lucier 1975, S. 99f.).

Auf HPLC basierende Verfahren sind aufwendiger als Radioassays. Sie gelten als hochspezifisch und weisen eine Empfindlichkeit auf, die in der Lage ist, auch noch wenige nmol des Produktes, und damit Aktivitäten im pmol-Bereich nachzuweisen (Baty *et al.* 1986, S. 330f.; Pink *et al.* 1992, S. 561). Colorimetrische Assays als älteste Verfahren weisen die Zu- oder Abnahme des Substrates oder Produktes durch Messung einer Absorptionsänderung nach. Sie sind aufwendig, fehleranfällig und nicht für alle Substrate anwendbar (Sonawane und Lucier 1975, S. 98f.; Andres *et al.* 1985, S. 368ff.). Je nach eingesetzter Nachweisreaktion sind colorimetrische Verfahren durch erhebliche Unspezifität gekennzeichnet und überschätzen so AT-Aktivitäten (Pink *et al.* 1992, S. 563). Im direkten Vergleich mit einem HPLC-Verfahren wurden Aktivitäten ermittelt, die um über 100% über den mit HPLC ermittelten lagen (Pink *et al.* 1992, S. 563, Berechnung durch den Autor). Darüber hinaus sind colorimetrische Verfahren - je nach Substrat - bis zu ca. 200-fach weniger sensitiv als die beiden vorgenannten Verfahren (Pink *et al.* 1992, S. 561; Andres *et al.* 1985, S. 373ff.).

1.3.2 Genotypisierung

Mit fortschreitender Anwendung der PCR-Technik wird zunehmend routinemäßig der Genotyp anstelle des Phänotyps bestimmt. Aufgrund des hohen prädiktiven Werts des Genotyps ist ein derartiger Ansatz mit ausreichender Sicherheit möglich (Hickman *et al.* 1992, S. 224; Meisel *et al.* 1997, S. 241ff.). Die Genotypisierung erfordert im Gegensatz zur Bestimmung des Phänotyps (s.o.) lediglich die Entnahme weniger Blutropfen (Lin *et al.* 1993, S. 828). Die Bestimmung des Genotyps erfolgt über den sog. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus: durch die Punktmutationen der verschiedenen AT-Allele entfallen Schnittstellen definierter Restriktionsendonukleasen, so dass sich Anzahl und Größe der Fragmente je nach Allel ändern. So wird z.B. beim Allel *NAT2*7B* durch die Mutation des Guanin-857 zu

Adenin eine Schnittstelle für *Bam*HI abgeschafft, so dass nur eine Bande anstelle von zweien bei anderen Allelen in der Gelelektrophorese sichtbar wird (Hickman und Sim 1991, S. 1008ff.).

1.4 Bedeutung der Acetyltransferasen

Schon sehr früh wurde erkannt, dass für die kanzerogene Wirkung bestimmter Chemikalien AT eine bedeutende Rolle spielen. So wurden nach oraler Gabe von Benzidin beim Hund, der keine AT besitzt, Blasen tumoren gefunden, wohingegen bei Ratten und Hamstern, welche eine hohe Kapazität für N-Acetylierung aufweisen, Lebertumoren entstanden (Kirlin *et al.* 1989, S. 2448). Weitere Hinweise stammen aus Testsystemen auf Mutagenität, wie im folgenden dargestellt werden wird.

1.4.1 Hinweise aus bakteriellen und rekombinanten Testsystemen

Teststämme von *Salmonella typhimurium*, die gegen die Mutagenität von Nitroaromaten wie 1,6-Dinitropyren resistent sind, besitzen keine AT (McCroy *et al.* 1983, S. 22). Bei chemischer Hemmung der AT wird die Mutagenität von N-Hydroxy-Arylaminen im AMES-Test erheblich reduziert (Saito *et al.* 1985, S. 291). Testerstämme mit erhöhter AT-Aktivität sind gegen die mutagene Potenz von Nitroaromaten, Arylaminen und heterozyklischen aromatischen Aminen um ein Vielfaches empfindlicher (Watanabe *et al.* 1987, S. 977f.; Grant *et al.* 1992a, S. 3963; Wild *et al.* 1995, S. 644ff.).

Versuche mit eukaryoten Zellen, die humane rekombinante AT exprimieren, bestätigen die Bedeutung der AT für die metabolische Aktivierung von Arylaminen (Minchin *et al.* 1992, S. 842f.). In besonderem Maße zeigt sich dies bei Koexpression von humanen AT und CYP 1A2, die zu einer Steigerung der Rate von DNS-Addukten auf das nahezu 20-fache führt (Probst *et al.* 1992, S. 1715).

1.4.2 Hinweise aus epidemiologischen Untersuchungen

Bei Untersuchungen an Blasenkarzinompatienten zeigte sich in vielen Studien eine signifikante Häufung unter langsamen Acetylierern (Hanssen *et al.* 1985, S. 264; Risch *et al.* 1995, S. 233). In einigen Studien war dies nur als Trend zu erkennen (Mommssen *et al.* 1985, S. 199f.; Cartwright *et al.* 1982, S. 844); einzelne Studien konnten keinen Zusammenhang finden (Woodhouse *et al.* 1982, S. 444; Lower *et al.* 1979, S. 75). Eine Beziehung zwischen dem Grad der Exposition gegenüber Arylaminen und der Häufigkeit von Blasen tumoren wurde mehrfach nachgewiesen. Auch hierbei war der Anteil langsa-

mer Acetylierer erhöht (Ladero *et al.* 1985, S. 97; Risch *et al.* 1995, S. 233). Eine Zusammenfassung der Daten der mehr als 1.200 Patienten aus den vorgenannten Studien und einer weiteren Studie (Mommsen und Aagaard 1986, S. 201) weist einen hochsignifikanten Zusammenhang mit dem langsamen Phänotyp auf ($\chi^2 = 17,05$; $p < 0,001$). Unter der meist beruflichen Exposition kommt es zu einer deutlichen, aber auch bereits unter Alltagsbedingungen zu einer leichten Risikoerhöhung.

Im Gegenzug tragen schnelle Acetylierer ein erhöhtes Risiko, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. In der Mehrzahl einer Serie von Untersuchungen wurde ein signifikant erhöhter Anteil schneller Acetylierer unter den Karzinompatienten gefunden (Ladero *et al.* 1991, S. 2098; Ilett *et al.* 1987, S. 1468; Lang *et al.* 1986, S. 1260; Lang *et al.* 1994, S. 677f.), mit einem geschätzten relativen Risiko für schnelle Acetylierer von 1,8 - 2,5 geschätzt (Wohlleb *et al.* 1990, S. 23; Roberts-Thomson *et al.* 1996, S. 1373). Das Risiko steigt dosisabhängig mit dem Fleischkonsum, d.h. der Exposition gegenüber heterozyklischen Arylaminen unter schnellen, nicht jedoch unter langsamen Acetylierern (Roberts-Thomson *et al.* 1996, S. 1373). Allerdings zeigt sich in einer Reihe weiterer Studien keine Risikoerhöhung für schnelle Acetylierer (Bell *et al.* 1995, S. 3537ff.; Hirvonen 1999, S. 261f.).

1.5 Fragestellung

Wie oben ausgeführt, sind Acetyltransferasen für die chemische Kanzerogenese, insbesondere in der Harnblase und im kolorektalen Gewebe, von großer Bedeutung. Trotz der zentralen Rolle, die diese Enzyme für die metabolische Aktivierung der Prokanzerogene vom Typ der aromatischen Amine und Nitroarene spielen, sind die Kenntnisse über ihre Aktivitäten und Verteilung in den menschlichen Geweben nur unvollständig bzw. unsicher. Die Gründe für die Unsicherheiten sind vor allem in methodischen Problemen zu suchen. So haben die bisherigen Untersuchungen oft nicht berücksichtigt, dass die Lagerungsbedingungen für das Untersuchungsmaterial, vor allem das Einfrieren der Gewebsproben, zu erheblichen Aktivitätsverlusten führen können. Weiterhin hat wahrscheinlich eine wenig schonende Behandlung der Proben bei diesen instabilen Enzymen häufig zu den beobachteten widersprüchlichen Ergebnissen beigetragen. Eine zusätzliche Quelle für die unklare Datenlage besteht darin, dass die bisher verwendeten Untersuchungsmethoden entweder zu unspezifisch oder zu unempfindlich waren, oder sich auf Markersubstrate stützten, die nur eine unzureichende Enzymspezifität aufweisen, wie z.B. 2-Aminofluoren.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die methodischen Unsicherheiten in der Bestimmung der AT-Aktivitäten von Gewebeproben soweit wie möglich zu beseitigen, und, darauf aufbauend, einen Überblick über die Aktivität der beiden AT in menschlichen Geweben zu gewinnen. Zu den Untersuchungen sollte ein hochsensitives, HPLC-gestütztes Verfahren eingesetzt werden, das sich zum Nachweis der acetylierten Produkte von PABA und INH eignet. Im Einzelnen standen folgende Fragen im Vordergrund des Interesses:

1. Unter welchen Bedingungen ist das Probenmaterial vor der Enzymbestimmung aufzubewahren? Wie lange sind die AT-Aktivitäten nach Entnahme der Gewebe stabil? Bestehen Unterschiede in der Stabilität der beiden AT-Formen?
2. In wieweit läßt sich die Sensitivität der Nachweismethode durch Veränderung der Versuchsbedingungen, z.B. den Einsatz größerer Probenmengen im Inkubationsgemisch oder die Verlängerung der Inkubationszeit, erhöhen?
3. In welchen menschlichen Geweben ist PABA-AT bzw. INH-AT nachweisbar? Wie hoch sind diese Aktivitäten? Wie groß sind die interindividuellen Unterschiede?
4. Besteht eine Korrelation in der Expression der beiden AT-Formen in den menschlichen Geweben?
5. Gibt es Hinweise auf endogene oder exogene Faktoren, die auf die AT-Aktivitäten einen Einfluß ausüben?

Die Ergebnisse sollten dazu beitragen, das Verständnis der in der Literatur beschriebenen Befunde zu den AT-Aktivitäten in menschlichen Geweben zu verbessern. Weiterhin war von ihnen zu erhoffen, dass sie einen Vergleich der Organspezifität der AT des Menschen und der verschiedenen Versuchstierarten erlauben und damit eine Extrapolation von Tierversuchen auf die Situation beim Menschen ermöglichen oder verbessern. Letztlich zielte die Studie also darauf ab, einen Beitrag zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos des Menschen zu leisten, das aus der Belastung mit prokanzerogenen Substraten der AT entstehen kann.

2 Material

2.1 Chemikalien

Für die Versuche wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Chemikalien eingesetzt:

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
Acetyl-Coenzym A (Trilithiumsalz)	Boehringer Mannheim, Mannheim	
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt	pro analysi
Dithiothreitol	Boehringer Mannheim, Mannheim	
Ethylacetat (Essigsäureester)	Merck, Darmstadt	pro analysi
Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumdihydrogensalz)	Merck, Darmstadt	pro analysi
Folin Ciocalteu Phenolreagenz	Merck, Darmstadt	
Isoniazid	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA	
Kalium-Natrium-Tartrat (Tetrahydrat)	Merck, Darmstadt	pro analysi
Kaliummetaborat	Riedel deHaën, Seelze	rein
Kupfer-(II)-sulfat (Pentahydrat)	Merck, Darmstadt	
Natriumhydroxid-Lösung, 1N	Merck, Darmstadt	
Acetyl-p-Aminobenzoesäure	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA	
p-Aminobenzoesäure	Serva, Heidelberg	rein
phosphate-buffered saline (Dulbecco), mit Kalzium und Magnesium	BioChrom KG, Berlin	
Salzsäure, 1N	Merck, Darmstadt	
Trichloressigsäure	Merck, Schuchardt	zur Synthese

N-Acetyl-Isoniazid (Ac-INH) wurde in diesem Labor enzymatisch aus INH und AcCoA synthetisiert und gereinigt.

Für den HPLC-Nachweis fanden die folgenden Lösungsmittel Verwendung:

Tab. 4: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Hersteller	Reinheitsgrad
Methanol LiChrosolv	Merck, Darmstadt	gradient grade
Acetonitril Chromasolv	Riedel deHaën, Seelze	für HPLC
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt	pro analysi

Für alle Experimente wurde Wasser verwendet, das entionisiert und mehrfach über eine Millipore Filteranlage (Wasseraufbereitungssystem Typ Super Q plus mit 4 Patronen, Millipore SA, 67120 Molsheim, Frankreich) gefiltert wurde.

Für den Transport von Gewebeproben wurden verschraubbare 50 ml Polypropylen Flaschen eingesetzt. Als Transportpuffer fand die entsprechend Herstellervorschrift zubereitete PBS-Lösung (phosphate-buffered saline) mit einem pH von 7,4 Verwendung.

2.2 HPLC Anlage

Der Nachweis der acetylierten Produkte Ac-INH bzw. Ac-PABA erfolgte mittels HPLC. Die zur Verfügung stehende HPLC-Anlage bestand aus den folgenden Bauelementen:

Wahlweise eine Kolbenpumpe der Firma Lattek, Heidelberg, Deutschland, Typ P400 oder der Firma Besta, Wilhelmsfeld, Deutschland, Typ HD 2-400, die alternierend eingesetzt wurden. Gesteuert wurden diese Pumpen über ein Steuergerät (gradient master) der Firma Laboratory Data Control, Typ 1601 (LDC, Florida, USA). Die Probenaufgabe erfolgte entweder manuell mit 50 oder 100 µl Glas-spritzen über ein Rheodyne-Ventil mit fest eingebauter 100 µl Schleife oder einen automatischen Probengeber der Firma Spark, Typ Marathon (Spark BV, Emmen, Holland) mit einer fest installierten 50 µl Probenschleife.

Detektiert wurden die Proben mittels eines multiwavelength-detectors, Typ HP 1050 Series der Firma Hewlett Packard (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland). Zur Ausgabe der Meßdaten diente ein Integrator, Typ 3396A ebenfalls der Firma Hewlett Packard (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA), der sowohl das Chromatogramm aufzeichnete als auch gleichzeitig die Peakflächen rechnerisch integrierte und in Form von Datenlisten ausgab. Zwischen den einzelnen Bauteilen bestand, abgesehen vom Steuergerät und den Pumpen, keine Kommunikation; eine Koordination erfolgte ausschließlich manuell.

2.3 Gewebeproben

2.3.1 Probenherkunft

Für Vorversuche im Zeitraum zwischen November 1993 und Februar 1994 wurden Leberstücke einer männlichen, etwa ein halbes Jahr alten Ratte (Wistar) untersucht. Die Ratte stammte aus den Versuchstierstallungen des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit.

Die Gewinnung menschlicher Gewebeproben erfolgte in erster Linie in Kliniken des Universitätsklinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München. Da die Größe endoskopischer gewinnbarer Proben für die geplanten Untersuchungen nicht ausreichte, mußten die Proben aus Organen und Organanteilen entnommen werden, die im Rahmen von Operationen entfernt wurden.

Proben der menschlichen Haut konnten in der Ambulanz der Dermatologischen Klinik des Universitätsklinikums, Biedersteinerstr.29, 80802 München (damaliger Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Borelli), erhalten werden. Die Gewinnung von Proben aus Niere, Harnleiter, Prostata und Blase konnte in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums, Ismaningerstr.22, 81675 München (Direktor: Prof. Dr. R. Hartung), realisiert werden. Proben aus menschlichen Lungen wurden in der Abteilung für Thoraxchirurgie der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Rechts der Isar, Ismaningerstr.22, 81675 München (Leitender Arzt: Prof. Dr. H. Präuer) gewonnen. Proben aus Leber, Darm und Pankreas konnten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Abdominalchirurgie des städtischen Krankenhauses München-Neuperlach, Oskar-Maria-Graf-Ring 51, 81737 München (Direktor: Prof. Dr. B. Günther) erhalten werden.

2.3.2 Probenbegleitprotokoll

Für Dokumentationszwecke wurde ein Probenbegleitprotokoll entwickelt (Abb. 3), in dem die Herkunft der Proben, etwaige für die AT-Aktivität bedeutsame Besonderheiten des Patienten, wie z.B. die Medikation, sowie die Lagerungsbedingungen der Probe während des Transportes bis zur Untersuchung der AT-Aktivität festgehalten wurden. Verschiedene klinisch-chemische Untersuchungswerte, die möglicherweise einen Einfluß auf die AT-Aktivität ausüben, wurden aus der Krankenakte übernommen.

Alle Patientendaten wurden anonym erhoben. Zur Identifikation diente eine Patientenkenung bestehend aus den Namensinitialen und dem Lebensalter der Patienten.

2.3.3 Gewebeproben und Patienten

Insgesamt wurden im Zeitraum zwischen März 1994 und Februar 1995 45 menschliche Gewebeproben untersucht. Dabei handelte es sich bei 8 Proben um Hautproben, bei jeweils 5 Proben um Gewebestücke aus Niere und Harnleiter (Nierenbecken) sowie bei 4 Proben um Harnblasengewebe. 4 Proben stammten aus dem Mastdarm, 5 aus dem Dickdarm, eine aus dem Dünndarm und je 2 Proben aus Leber und Pankreas. Aus Lungenresektaten konnten insgesamt 7 Proben untersucht werden. Darüber hinaus wurden zu Beginn der Arbeiten 2 Proben aus der Prostata orientierend untersucht.

2.3.3.1 Haut

Bei dermatologischen Operationen werden Hautstücke, soweit immer es die Situation ermöglicht, in spitzovaler Form herausgeschnitten, da die so entstehende Wunde leichter zu nähen ist, komplikationsloser verheilt und ein besseres kosmetisches Ergebnis erbringt, als dies bei rundovaler Schnittführung der Fall wäre. Das ärztliche Interesse richtet sich auf die Untersuchung der im Zentrum des Exzidates gelegenen Läsion, so dass die beiden Ecken ohne Beeinträchtigung des Untersuchungsergebnisses anderen Zwecken zugeführt werden konnten.

Die hier untersuchten Hautproben stammten entweder aus den oben beschriebenen Ecken oder aus dem kompletten Exzidat, sofern eine kosmetische Korrektur der Anlaß des Eingriffs war, und ein weiteres diagnostisches Interesse seitens der Klinik am Exzidat nicht bestand.

Die wichtigsten demographischen Daten der Patienten, von denen die Hautproben stammen können Tab. 5. entnommen werden.

Bedingt durch die Tatsache, dass die sich in der dermatologischen Ambulanz vorstellenden Patienten in aller Regel keine weiteren Erkrankungen hatten, waren bis auf einen Fall keine hämatologischen Laborparameter zu erfragen. Die Frage nach einer eventuell bestehenden Medikation wurde in allen Fällen verneint.

Die Daten über den Anlaß des hautchirurgischen Eingriffs und die Lokalisation, an der das Gewebestück entnommen wurde sind in Tab. 6 zusammengestellt:

Tab. 5: Patientendaten zu den Hautproben

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Raucher	Proben-Code
JP18	M	18	Schüler	N	4411 HA01
KK46	F	46	Ärztin		4411 HA02
ET70	F	70	Rentnerin	N	4411 HA03
AS42	M	42	Industrievertreter	J	4418 HA04
SG51	M	51	Hotelkaufmann		4627 HA05
JF50	M	50	Bankkaufmann	N	4711 HA06
GH49	F	49	Apothekerin	J	4711 HA07
HP61	M	61	Kaufmann	N	4718 HA08

Geschlecht, Alter, Beruf und Rauchgewohnheiten der Patienten, von denen die Hautproben stammen.

Tab. 6: Entnahmebedingungen der Hautproben

Patient	Operationsgrund	Ort des Eingriffs	Proben-Code
JP18	Nävusentfernung	Sternum	4411 HA01
KK46	Entfernung multipler Fibrome	Brust, Hals, Schultern	4411 HA02
ET70	Fibromentfernung	Hals, Rücken	4411 HA03
AS42	Entfernung subcutaner Lipome	linke Flanke, rechter Oberarm, rechte Schulter	4418 HA04
SG51	Nävusentfernung	rechter Unterarm	4627 HA05
JF50	Nävusentfernung	linker Oberschenkel, linke Schulter	4711 HA06
GH49	Nävusentfernung	rechte Brust	4711 HA07
HP61	V.a. Basaliom	linker Oberarm	4718 HA08

Indikation zu den dermatologischen Operationen bzw. Diagnose und Lokalisation des Eingriffs.

Die Probe 4711 HA07 war so klein, dass nicht genügend Material für eine Mehrfachbestimmung beider AT-Aktivitäten zur Verfügung stand. Die Aktivität der INH-AT konnte daher nur als Einzelwert bestimmt werden.

Aufgrund der hohen Instabilität der AT wurde großer Wert auf eine ausführliche Dokumentation der Probenlagerung gelegt. Tab. 7 zeigt die jeweilige Lagerungsdauer bis zur Inkubation auf.

Wie aus Tab. 7 ersichtlich ist, wurden die Hautproben meist innerhalb kürzester Zeit bei +4 °C gelagert und innerhalb von weniger als 6 Stunden untersucht.

Tab. 7: Lagerungszeiten der Hautproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4411 HA01	10	5.40	5.50
4411 HA02	15	5.00	5.15
4411 HA03	5	4.20	4.25
4418 HA04	55	4.00	4.55
4627 HA05	5	4.40	4.45
4711 HA06	15	5.10	5.25
4711 HA07	10	4.50	5.00
4718 HA08	5	4.55	5.00

Lagerungszeiten der Hautproben bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme während der Operation bis zur Inkubation

2.3.3.2 Niere und Harnleiter

Bei Nephrektomien erfolgt die Entfernung der Niere unter Mitnahme des dazugehörigen Harnleiters. Ausschließliche Operationen des Harnleiters stellen eine Rarität dar. Die Gewebeproben von Niere und Harnleiter stammen aus den Resektaten des gleichen Patienten. Die Daten beider Gewebe werden aus diesem Grunde hier gemeinsam dargestellt.

Da die Harnleiter aufgrund krankenhauserinterner Konventionen für Versuchszwecke nicht zur Verfügung standen, wurde ersatzweise Schleimhaut des Nierenbeckens, die histologisch der des Harnleiters entspricht, verwendet. Unabhängig davon war die Verwendung der Schleimhaut des Nierenbeckens anstelle des Harnleiters aufgrund der größeren verfügbaren Gewebemenge und der leichteren Präparierbarkeit vorteilhaft.

In der folgenden Tabelle sind die wesentlichen demographischen Daten der Patienten, von denen die Nieren- und Harnleiterproben stammen, dargestellt.

Die Gewebeproben wurden sofort nach der operativen Entnahme auf Eis gelagert und in das Institut für Pathologie transportiert. Dort wurde von einem Facharzt für Pathologie aus einer makroskopisch gesunden Region ein Gewebestück entnommen. Die Nierenproben stammten ganz oder überwiegend aus der Rindenregion, die Harnleiterproben, wie bereits oben ausgeführt, aus dem Nierenbecken.

Mit Ausnahme der Patientin EB72 (Proben-Code 4425 NI02 und 4425 HL02), die aufgrund eines Harnleitertumors operiert wurde, waren alle Patienten aufgrund eines Nierentumors in Behandlung. Kei-

ner der Patienten (s. Tab. 8) litt an kolorektalen Tumoren oder einer Lebererkrankung. Außer bei der Patientin EB72 fanden sich in der Krankengeschichte auch keine Blasen-tumoren oder Erkrankungen an Diabetes mellitus.

Tab. 8: Patientendaten zu den Nieren- und Harnleiterproben

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Raucher	Proben-Code
MS62	M	62	Rentner (Architekt)		4328 NI01 / 4328 HL01
EB72	F	72	Rentnerin (Verkäuferin)		4425 NI02 / 4425 HL02
AA88	M	88	Elektriker	N	4627 NI03 / 4627 HL03
BI63	M	63	Rentner (Werkmeister)	J	4A26 NI04 / 4A26 HL04
HD44	M	44	Architekt	N	4B14 NI05 / 4B14 HL05

Geschlecht, Alter, Beruf und Rauchgewohnheiten der Patienten, von denen die Nieren- und Harnleiterproben stammen.

Die jeweiligen Werte für die Erythrozyten- und Leukozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin und Gesamtprotein sowie Blutzuckerwerte sind in Tab. 9 zusammengestellt. Die Werte wurden aus der Krankenakte übernommen. Die Bestimmung erfolgte fast ausschließlich im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar nach Routineverfahren.

Medikamente, deren Einnahme unter Umständen einen Einfluß auf die Aktivität der AT ausüben könnte, wurden von dreien der fünf Patienten eingenommen. Es waren dies der H₂-Antagonist Ranitidin (300 mg/die, AA88), das Fibrat Bezofibrat (BI63), Acetylsalicylsäure (BI63 und HD44) sowie das Benzodiazepinderivat Bromazepam (6-12 mg/die, HD44).

Tab. 9: Laborwerte der Patienten der Nieren- und Harnleiterproben

Patient	Ery Mio./µl	Leuko pro µl	Hk Vol. %	Hb g/l	Protein g/l	Glucose g/l	Proben-Code
MS62	4,50	7.200	36,0	0,12	72	1,09	4328 NI01/4328 HL01
EB72	3,70	5.000	31,9	0,10	59	1,01	4425 NI02/4425 HL02
AA88	4,64	7.000	42,7	0,14		1,41	4627 NI03/4627 HL03
BI63	5,41	8.100	46,8	0,16	73		4A26 NI04/4A26 HL04
HD44	4,99	4.600	43,5	0,15	75		4B14 NI05/4B14 HL05

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der Patienten, von denen die Nieren- und Harnleiterproben stammen

Eine Darstellung der jeweiligen Probenlagerungsdauer unter den entsprechenden Lagerungsbedingungen ist in der folgenden Tabelle (Tab. 10) zu finden:

Tab. 10: Lagerungszeiten der Nieren- und Harnleiterproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4328 NI01	20	4.30	4.50
4328 HL01			
4425 NI02	40	6.30	7.10
4425 HL02			
4627 NI03	30	9.05	9.35
4627 HL03			
4A26 NI04	15	5.00	5.15
4A26 HL04			
4B14 NI05	5	5.05	5.10
4B14 HL05			

Lagerungszeiten der Nieren- und Harnleiterproben bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Organentnahme während der Operation bis zur Inkubation des Cytosols

Wie Tab. 10 zu entnehmen ist, wurden die Proben in aller Regel in weniger als 8 Stunden aufgearbeitet. Ausnahmen stellen die Proben 4627 NI03 bzw. 4627 HL03 dar, bei denen es aufgrund von zeitlich weit auseinander liegenden Operationsterminen zu einer u.U. kritisch langen Lagerungsdauer kam. Auf die Lagerung bei Raumtemperatur konnte wenig Einfluß genommen werden, da diese durch die Vorgehensweise der Operateure und Pathologen vorgegeben war.

2.3.3.3 Harnblase

Im Folgenden wird der Begriff „Blase“ synonym mit *Harnblase* gebraucht.

Operationen der Harnblase stellen ausgesprochen massive Eingriffe dar und erfolgen naturgemäß nur bei schwerem Leiden, d.h. in aller Regel erst bei Hinweisen auf invasives Wachstum von Blasentumoren.

Die Gewinnung von Blasenproben gestaltete sich analog der Gewinnung von Proben aus Niere und Harnleiter: Das Organ wurde nach seiner Entnahme steril bei +4 °C gelagert und sofort in das Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar verbracht. Von einem Pathologen wurde sodann ein Gewebe-

stück aus einem makroskopisch tumorfreien Bezirk entnommen und in das Transportgefäß in eiskalten Puffer (PBS) überführt.

In der folgenden Tabelle sind die grundlegenden demographischen Daten der Patienten dargestellt, von denen die Blasenproben entstammen.

Tab. 11: Patientendaten zu den Blasenproben

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Raucher	Proben-Code
MJ67	M	67	Busfahrer		4418 BL01
KE71	M	71	Rentner (Beamter)	J	4718 BL02
KG76	F	76	Rentnerin (Schneiderin).	N	4B07 BL03
KK44	M	44	Elektrikermeister	J	4B17 BL04

Geschlecht, Alter, Beruf und Rauchgewohnheiten der Patienten, von denen die Blasenproben stammen.

Alle Patienten waren Deutsche. Wie bereits schon weiter oben angedeutet, wurden alle Patienten aufgrund von Blasentumoren operiert, die z.T. schon über längere Zeit bekannt waren und auf konservative Behandlungsmethoden nicht angesprochen hatten. Keiner der Patienten hatte in der Vergangenheit ein kolorektales Tumorleiden. Ein Diabetes mellitus bestand bei den Patienten KE71 (Proben-Code 4718 BL02) und KK44 (4B17 BL04). Die Patientin KG76 (Proben-Code 4B07 BL03) wies eine Lebererkrankung nach einer unklaren Hepatitis vor 20 Jahren auf.

Die Laborwerte, die im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der AT-Aktivität erhoben wurden, sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 12: Laborwerte der Patienten der Blasenproben

Patient	Ery	Leuko	Hk	Hb	Protein	Glucose	Proben-Code
	Mio./ μ l	pro μ l	Vol. %	g/l	g/l	g/l	
MJ67	5,26	9.000	44,1	0,14	66		4418 BL01
KE71	5,84	14.000	53,3	0,18		2,04	4718 BL02
KG76	4,00	4.600	36,7	0,13	75	1,16	4B07 BL03
KK44	4,99	6.100	46,3	0,17	63	1,73	4B17 BL04

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der Patienten, von denen die Blasenproben stammen.

Die Werte wurden aus den Krankenakten übernommen, die Bestimmung erfolgte fast ausschließlich im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar im Rahmen der Operationsvorbereitungen. Eine Einnahme von potentiell die AT-Aktivität beeinflussenden Medikamenten lag bei den folgenden Patienten vor: bei KE71 mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid (Proben-Code 4718 BL02) und bei KG76 mit dem Sulfonamid Sulfamethoxazol (2 x 800 mg/die, 4B07 BL03).

Eine Dokumentation der Lagerungszeiten unter den verschiedenen Bedingungen gibt Tab. 13 wider.

Tab. 13: Lagerungszeiten der Blasenproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4418 BL01	30	7.20	7.50
4718 BL02	5	7.40	7.45
4B07 BL03	5	5.35	5.40
4B17 BL04	5	4.55	5.00

Lagerungszeiten der Blasenproben bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Organentnahme während der Operation bis zur Inkubation des Cytosols

Auch hier wird deutlich, dass die Proben sofort bei +4 °C gelagert wurden und innerhalb von etwa 8 Stunden aufgearbeitet wurden.

2.3.3.4 Prostata

Zwei Prostataproben wurden stichprobenartig untersucht. Die Probe 4408 PR01 stammte von einem 56 Jahre altem Maschineneinsteller, Patientenkenung RS56, während die Probe 4408 PR02 von einem 82-jährigen ehemaligen Kaufmann stammte (Patientenkenung HP82). Beide Patienten waren deutscher Herkunft und Nichtraucher. Die Prostataproben wurden im Rahmen von transurethralen Resektionen mit der elektrischen Schlinge gewonnen. Operiert wurden beide Patienten aufgrund einer benignen Prostatahyperplasie. Weitere Erkrankungen wie Tumorleiden, Lebererkrankungen oder ein Diabetes mellitus lagen nicht vor.

In der folgenden Tabelle (Tab. 14) sind die der Krankenakte entnommenen klinisch-chemischen Labor-daten kurz zusammengefaßt.

Beide Patienten nahmen keine Medikamente ein, die Einfluß auf die AT-Aktivität gehabt hätten. Jedoch erhielt HP82 während der Operation intravenös insgesamt 1.600 mg Sulfamethoxazol. Im folgenden ist die Lagerungsdauer der beiden Proben in Tab. 15 dargestellt:

Tab. 14: Laborwerte der Patienten der Prostataprobe

Patient	Ery Mio./µl	Leuko pro µl	Hk Vol. %	Hb g/l	Protein g/l	Glucose g/l	Proben-Code
RS56	4,80	8.000	43,3	0,15		0,76	4408 PR01
HP82	4,44	9.000	43,0	0,15	72	0,76	4408 PR02

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der Patienten, denen im Rahmen eines endoskopischen Eingriffs Prostatagewebe entnommen wurde

Tab. 15: Lagerungszeiten der Prostataprobe

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4408 PR01	20	6.50	7.10
4408 PR02	15	4.55	5.10

Lagerungszeiten der Prostataresektate bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Gewebeentfernung während der Operation bis zur Inkubation

Die Vorgehensweise bei transurethralen Prostataresektionen ist derart, dass die mit einer elektrischen Schlinge thermisch abgetrennten Späne des Gewebes durch den Fluß einer fortwährenden Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem Körper ausgewaschen werden, und erst nach Ende der Operation aus einem Filter zurückgewonnen werden können. Die Dauer derartiger Eingriffe schwankt in aller Regel zwischen 20 und 45 Minuten.

Die in Tab. 15 genannten Zeiten für die Lagerung bei Raumtemperatur beziehen sich auf den Zeitraum zwischen dem Ende der Operation und der Leerung des Filtersiebes durch das Operationspersonal. Die tatsächliche Lagerungsdauer bei Raumtemperatur liegt jedoch höher. Die Raumtemperatur liegt in Operationssälen bei 18 - 21 °C. Diese Tatsache ist in besonderer Weise für Probe 4408 PR01 von Bedeutung, da die Operationsdauer hier bei über 2 Stunden lag.

2.3.3.5 DÜnn-, Dick- und Mastdarm

Direkt nach der Organentnahme wurde noch im Operationssaal aus einem makroskopisch tumorfreien Bezirk ein 2 - 5 cm² großes Stück entfernt, in Transportpuffer übertragen und auf Eis deponiert. Bedingt durch die Entnahme großer Organteile durch die Chirurgen standen ausgedehnte Gewebestücke für die Untersuchungen zur Verfügung.

Die Proben aus DÜnn-, Dick- und Mastdarm werden hier gemeinsam dargestellt. Die Grunddaten der 10 Patienten sind in Tab. 16 zusammengefaßt. Bei dem Patienten JP69 (4928 CO04) konnten keine Daten aus der Krankenakte erhoben werden.

Bis auf die Patientin MZ70 (4516 DU01), die vermutlich aus Rumänien stammte, waren alle Patienten deutscher Herkunft. Alle Patienten wurden aufgrund eines Kolon- bzw. Rektumkarzinoms operiert, im Fall von MZ70 wegen des Rezidivs eines Kolontumors im Dünndarm. Patientin GD62 wurde präventiv aufgrund bestehender Polyposis coli kolektomiert.

Keiner der Patienten litt an weiteren Tumoren anderer Organe. Die Patienten EF78 (Gewebeprobe Nr. 4711 CO03), MH82 (4A11 CO05) und MZ70 (4516 DU01) hatten einen Diabetes mellitus. Die Patientin EF78 (4711 CO03) wies darüber hinaus mit einer Leberzirrhose eine Lebererkrankung auf.

Tab. 16: Patientendaten zu den Darmproben

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Raucher	Proben-Code
HS68	M	68	Elektrotechniker	N	4421 CO01
GD62	F	62	Rentnerin	N	4425 CO02
EF78	F	78	k.A.	N	4711 CO03
JP69	M	69	k.A.		4928 CO04
MH82	F	82	Rentnerin (Bildhauerin)	J	4A11 CO05
MZ70	F	70	Rentnerin		4516 DU01
AZ49	M	49	Arzt	N	4421 RE01
JW63	M	63	Rentner	J	4425 RE02
FW55	M	55	Maurer	J	4715 RE03
MM65	M	65	Betriebsinspektor	J	4715 RE04

Geschlecht, Alter, Beruf und Rauchgewohnheiten der Patienten, denen die Darmproben entstammen. Angaben zum ehemaligen oder aktuellen Beruf konnten den Krankenunterlagen nicht in jedem Fall entnommen werden (k.A.: keine Angaben).

Über die nähere Lokalisation der Gewebeentnahme informiert Tab. 17.

Tab. 17: Entnahmeort der Darmproben

Patient	Darmabschnitt	Ort der Probenentnahme	Proben-Code
HS68	Dickdarm	Nähe linke Flexur	4421 CO01
GD62	Dickdarm	Cäcum, Colon ascendens	4425 CO02
EF78	Dickdarm	Colon ascendens, Nähe Cäcum	4711 CO03
JP69	Dickdarm	Sigma	4928 CO04
MH82	Dickdarm	Colon descendens	4A11 CO05
MZ70	Dünndarm	ca. Mitte des Ileums	4516 DU01
AZ49	Mastdarm	ca. 15 cm präanal	4421 RE01
JW63	Mastdarm	ca. 5 cm präanal	4425 RE02
FW55	Mastdarm	ca. 8 cm präanal	4715 RE03
MM65	Mastdarm	ca. 5 cm präanal	4715 RE04

Ein Auswahl relevanter hämatologischer und serologischer Laborparameter wird in der folgenden Tabelle präsentiert (Tab. 18).

Tab. 18: Laborwerte der Patienten der Darmproben

Patient	Ery	Leuko	Hk	Hb	Protein	Glucose	Proben-Code
	Mio./ μ l	pro μ l	Vol. %	g/l	g/l	g/l	
HS68	4,80	7.000	44,9	0,15	69	1,09	4421 CO01
GD62	4,60	6.000	43,5	0,14			4425 CO02
EF78	2,80	9.000	24,4	0,09	54	1,30	4711 CO03
JP69							4928 CO04
MH82	4,50	8.300	42,9	0,14	82	1,67	4A11 CO05
MZ70	4,00	10.000	34,7	0,11	72	1,73	4516 DU01
AZ49	5,20	8.000	46,2	0,15	78	1,59	4421 RE01
JW63	5,10	7.000	45,7	0,15	76	1,33	4425 RE02
FW55	5,10	8.000	499,0	0,17	76	0,82	4715 RE03
MM65	4,80	8.000	48,7	0,16	73	0,12	4715 RE04

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der Patienten, aus deren Operationsresektaten Darmproben entnommen wurden.

Die Bestimmung der Laborwerte erfolgte routinemäßig präoperativ im klinisch-chemischen Labor des Krankenhauses Neuperlach.

Unter den von den Patienten eingenommenen, oder während der Operation intravenös verabreichten Medikamenten stehen die folgenden aufgrund von Strukturmerkmalen im Verdacht, möglicherweise als kompetitive Substrate der AT deren Aktivität für die Markersubstrate zu verringern: Metronidazol bei MH82 (Probe Nr. 4A11 CO05), bei MZ70 (4516 DU01, 500 mg), bei FW55 (4715 RE03) und bei MM65 (4715 RE04). Weiterhin Furosemid bei EF78 (4711 CO03) und Thiazid bei MH82 (4A11 CO05, 300 mg/die), Glibenclamid bei MZ70 (4516 DU01), Acetylcystein bei FW55 (4715 RE03) und schließlich Cefuroxim bei den Patienten FW55 (4715 RE03) und MM65 (4715 RE04).

Die Transport- bzw. Lagerungszeiten sind in Tab. 19 dargestellt. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, schwanken die Zeiten sehr stark zwischen etwas über 4 Stunden und fast 12 Stunden. Mit einer Ausnahme wurde alle Proben jedoch sehr schnell bei +4 °C gelagert (4928 CO04).

Tab. 19: Lagerungszeiten der Darmproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4421 CO01	10	4.35	4.45
4425 CO02	30	9.30	10.00
4711 CO03	10	8.40	8.50
4928 CO04	60	6.40	7.40
4A11 CO05	15	5.20	5.35
4516 DU01	5	11.45	11.50
4421 RE01	15	4.55	5.10
4425 RE02	15	10.00	10.15
4715 RE03	25	7.05	7.30
4715 RE04	5	4.05	4.10

Lagerungszeiten der Darmproben bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Organentnahme während der Operation bis zur Inkubation des Cytosols

2.3.3.6 Pankreas

Stichprobenartig wurden auch zwei Gewebeproben der menschlichen Bauchspeicheldrüse untersucht.

Die beiden untersuchten Pankreasproben stammen von männlichen Patienten deutscher Herkunft, die aufgrund chronisch rezidivierender Pankreatitiden operiert wurden. Bei LN39 (Proben-Code

4516 PA01) handelte es sich um einen 39-jährigen Stahlbauschlossler, bei RM51 (Proben-Code 4928 PA02) um einen 51-jährigen Schlosser. LN39 war anamnestisch Raucher, RM51 Nichtraucher. Bei keinem der beiden Patienten war ein Tumorleiden diagnostiziert worden, und auch ein Leberleiden war nicht bekannt. Jedoch bestand aufgrund der fortgeschrittenen Pankreasinsuffizienz ein insulinabhängiger Diabetes mellitus.

In Tab. 20 sind die möglicherweise die AT-Aktivität beeinflussenden Laborparameter zusammengestellt. Patient RM51 (4928 PA02) nahm keine Medikamente ein, die im Verdacht stehen könnten, die AT-Aktivität zu beeinflussen. Hingegen wurde LN39 (4516 PA01) während der Operation auf intravenösem Wege Ranitidin (300 mg) sowie Metronidazol (500 mg) appliziert. Eine langfristige Einnahme eines H₂-Blockers lag der Krankenakte zufolge nicht vor.

Tab. 20: Laborwerte der Patienten der Pankreasproben

Patient	Ery Mio./µl	Leuko pro µl	Hk Vol. %	Hb g/l	Protein g/l	Glucose g/l	Proben-Code
LN39	4,9	8.000	47,3	0,15	72		4516 PA01
RM51	4,0	4.300	38,4	0,13	68	1,27	4928 PA02

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der Patienten, deren Bauchspeicheldrüsengewebe untersucht wurde

Die Zeitdauer bis zur endgültigen Aufarbeitung der Gewebe ist Tab. 21 zu entnehmen.

Tab. 21: Lagerungszeiten der Pankreasproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4516 PA01	10	6.50	7.00
4928 PA02	10	6.00	6.10

Lagerungszeiten der Pankeasgewebeproben bei Raumtemperatur und bei +4 °C vom Zeitpunkt der Organentnahme während der Operation bis zur Inkubation

Wie aus Tab. 21 zu ersehen ist, liegen die Lagerungszeiten der zwei Gewebeproben bei 6 - 7 Stunden.

2.3.3.7 Leber

Die zwei untersuchten Leberproben entstammen Patienten, denen aufgrund von Metastasen eines Kolontumors Teile der Leber entfernt wurden. Die Gewebeproben wurden noch im Operationssaal direkt nach der Organentnahme aus makroskopisch tumorfreien Bezirken entnommen und sofort bei +4 °C gelagert.

Der Patient JW63 (Gewebeprobe Nr. 4425 LE01) wurde bereits unter den Darmproben näher beschrieben (s. S. 30ff.), so dass sich hier eine detailliertere Erwähnung erübrigt. Die zweite Leberprobe (4516 LE02) stammte von einem 68-jährigen männlichen Patienten, Patientennummer HB68, deutscher Herkunft war. HB68 war Rentner (der frühere Beruf war aus der Krankenakte nicht zu eruieren), Nichtraucher, und wurde wegen eines Sigma-Karzinoms mit Lebermetastasen operiert. Weitere Tumorerkrankungen, Lebererkrankungen oder ein Diabetes mellitus lagen nicht vor. Die Gewebeprobe stammte aus einem Randbezirk des linken Leberlappens.

Im Rahmen der Operationsvorbereitung wurden die Laborwerte des Patienten im Kliniklabor der Krankenhaus Neuperlach bestimmt. Als relevante Werte wurden aus der Akte übernommen: Erythrozytenzahl 5,1 Mio./ μ l, Leukozytenzahl 7.000/ μ l, Hämoglobin 0,15 g/l, Hämatokrit 45,6% und Gesamtprotein 75 g/l. Während der Operation erhielt der Patient 500 mg des Antibiotikums Metronidazol intravenös verabreicht. Eine darüber hinaus eventuell störend wirkende Medikation bestand bei HB68 nicht.

Wie bereits weiter oben kurz erwähnt, konnten die Gewebestücke sehr schnell bei +4 °C gelagert werden (Tab. 22). Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die beiden Proben praktisch identische Lagerungszeiten erfuhren. Schonend war weiterhin eine nur kurze Verweildauer bei Raumtemperatur.

Tab. 22: Lagerungszeiten der Leberproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4425 LE01	15	9.05	9.20
4516 LE02	10	9.05	9.15

Lagerungszeiten der Leberproben bei Raumtemperatur ab der Organentnahme während der Operation, und bei +4 °C im Eisbad bis zur Inkubation

2.3.3.8 Lunge

Die Lungenproben wurden anlässlich operativer Eingriffe gewonnen, bei denen eine der beiden Lungen ganz oder teilweise entfernt wurde. Sofort nach Organentnahme wurde das Resektat zur Probengewinnung an mich weitergeleitet. Daraus resultierten sehr kurze Lagerungszeiten (Tab. 26).

Im Folgenden sind die demographischen Basisdaten der Patienten dargestellt (Tab. 23). Bis auf JK60 (Probe Nr. 4B07 LP07), die Kroatian war, waren alle Patienten deutscher Herkunft.

Tab. 23: Patientendaten zu den Lungenproben

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Raucher	Proben-Code
PK54	M	54	Taxifahrer	N	4928 LP01
EM47	F	47	Facharbeiter: Buchbinder	J	4A05 LP02
IF51	F	51	Kauffrau	J	4A07 LP03
FM60	M	60	Rentner (Hausmeister)	J	4A12 LP04
HP56	M	56	Rentner (EDV-Operator)	N	4A26 LP05
BS13	M	13	Schüler	N	4B04 LP06
JK60	F	60	Geschäftsfrau	J	4B07 LP07

Geschlecht, Alter, Beruf und Rauchgewohnheiten der Patienten, von denen die Lungenproben stammen.

Einen Überblick über den Operationsgrund sowie den Entnahmeort der Probe gibt Tab. 24.

Tab. 24: Entnahmebedingungen der Lungenproben.

Patient	Operationsgrund	Ort der Probenentnahme	Proben-Code
PK54	Adenokarzinom der Lunge	rechter Lungenoberlappen	4928 LP01
EM47	Adenokarzinom der Lunge	rechter Lungenunterlappen	4A05 LP02
IF51	Rundherd mit V.a. Carcinoidtumor	linker Lungenunterlappen	4A07 LP03
FM60	Bronchiales Plattenepithelkarzinom	linke Lunge	4A12 LP04
HP56	chronische Entzündung nach operiertem bronchialem Plattenepithelkarzinom	rechter Lungenoberlappen	4A26 LP05
BS13	Metastasen eines Nierentumors (Wilmstumor)	rechter Lungenoberlappen	4B04 LP06
JK60	Bronchiales Plattenepithelkarzinom	rechte Lunge	4B07 LP07

Operationsindikation bzw. Diagnose und Lokalisation der Probenentnahme

Bei keinem der Patienten lag ein Tumorleiden eines weiteren Organs, eine Lebererkrankung oder ein Diabetes mellitus vor. Patient BS13 (Probe Nr. 4B04 LP06) wurde präoperativ strahlentherapeutisch mit 15 Gray gegen Lungenmetastasen vorbehandelt.

Die Laborwerte der folgenden Tabelle (Tab. 25) entstammen den jeweiligen Krankenakten und wurden im Rahmen der Diagnosestellung bzw. der Operationsvorbereitung im Kliniklabor der Klinikums Rechts der Isar (Institut für klinische Chemie) bestimmt.

Tab. 25: Laborwerte der Patienten der Lungenproben

Patient	Ery	Leuko	Hk	Hb	Protein	Glucose	Proben-Code
	Mio./ μ l	pro μ l	Vol. %	g/l	g/l	g/l	
PK54	3,73	8.000	42,6	0,15	76	0,94	4928 LP01
EM47	3,49	6.700	25,6	0,09	66	1,18	4A05 LP02
IF51	4,00	5.900		0,13	74	0,96	4A07 LP03
FM60	4,46	6.500	40,5	0,13	64	0,92	4A12 LP04
HP56	5,23	6.400	47,0	0,15	80	1,06	4A26 LP05
BS13	2,99	2.100	29,0	0,09	63	0,89	4B04 LP06
JK60	4,26	4.300	41,3	0,14	74	0,86	4B07 LP07

Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit-, Hämoglobin-, Gesamtprotein- und Blutzuckerwerte der lungenoperierten Patienten

Tab. 26: Lagerungszeiten der Lungenproben

Proben-Code	bei Raumtemperatur	bei +4 °C bis zur Inkubation	insgesamt
	in Min.	in Std. und Min.	in Std. und Min.
4928 LP01	0.10	8.40	8.50
4A05 LP02	0.05	4.35	4.40
4A07 LP03	0.05	3.55	4.00
4A12 LP04	0.05	3.10	3.15
4A26 LP05	0.05	6.55	7.00
4B04 LP06	0.05	4.15	4.20
4B07 LP07	0.05	4.45	4.50

Lagerungszeiten der Lungengewebsproben bei Raumtemperatur und +4 °C vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme während der Operation bis zur Inkubation des Cytosols.

Hinsichtlich möglicher Störwirkungen wurde auch bei den Lungenpatienten die aktuelle Medikation einer näheren Betrachtung unterworfen. Als eventuell bedeutsam wurde die Einnahme von Acetylsalicylsäure bei Patient FM60 (Probe Nr. 4A12 LP04), Acetylcystein, dem Isoniazid-Analogon Pyrazinamid und Rifampicin bei JK60 (Probe Nr. 4B07 LP07) gewertet. Die Inhalation von 4-6 Hüben/die Budesonid durch EM47 (4A05 LP02, seit 14 Tagen) und FM60 (4A12 LP04), sowie die Einnahme von Famotidin durch PK54 (4928 LP01, seit wenigen Tagen), standen im Verdacht, induzierende Effekte ausüben (s. S. 80). Schließlich sind Sulfamethoxazol, das von EM47 (4A05 LP02) eingenommen wurde und Theophyllin bei FM60 (4A12 LP04) mögliche Substrate der AT.

3 Methoden

3.1 Auswahl der Gewebearten

Die Auswahl der zu untersuchenden Gewebearten erfolgte nach Gesichtspunkten einer möglichen Exposition gegenüber toxischen Substanzen, d.h. untersucht wurden in erster Linie Gewebe, die an der Aufnahme resp. Ausscheidung von Xenobiotika beteiligt sind. Proben aus Prostata und Pankreas wurden stichprobenartig mit untersucht.

Auf eine nähere Untersuchung von Leber und Blut wurde verzichtet, da diese beim Menschen bereits ausführlich untersucht wurden (Ward *et al.* 1992, S. 1100; Cribb *et al.* 1991, S. 1243f; Mandelbaum-Shavit und Blondheim 1981, S. 66ff.; McQueen und Weber 1980, S. 893; Jenne und Orser 1965, S. 1995f.; Glowinski *et al.* 1978, S. 945; Kilbane *et al.* 1988, A1140; Ohsako und Deguchi 1990, S. 4632f.). Leberproben wurden nur insoweit in die Untersuchungen mit einbezogen, als dies der Validierung der Versuchsbedingungen diene.

3.2 Probenentnahme

Während der jeweiligen operativen Eingriffe war der Autor im Operationssaal mit anwesend, um eine optimale Probenbehandlung und lückenlose Dokumentation zu gewährleisten. Hierbei wurden Probengefäße, ausreichende Mengen an Transportpuffer, ein mit Eiswasser gefüllter Styroporbehälter zur Kühlung der Probe während des Transportes, sowie mehrere Blankoprobenbegleitprotokolle bereithalten.

Während der Operation wurden anhand der Krankenakten oder durch Patientenbefragung (Hautproben) die unten näher beschriebenen Daten erhoben. Darüber hinaus wurde der Zeitpunkt der jeweiligen Resektatentnahme und der Zeitpunkt der Lagerung der Probe bei +4 °C im Eiswasserbad dokumentiert. Die Erfassung des Zeitpunkts der Unterbindung der Blutversorgung zum operierten Organ war in der Praxis nicht möglich.

Das Vorgehen im Einzelfall unterschied sich geringfügig entsprechend dem Gewebe und der jeweiligen Klinik.

3.2.1 Haut

Sofort nach Entfernung der Hautstücke während der Operationen wurden die medizinisch entbehrlichen Anteile des Gewebes durch den Operateur abgetrennt und einer sofortigen Kühlung zugeführt. Meist waren an einem Operationstag mehrere Hautproben zu gewinnen. Daraus ergaben sich allerdings z.T. längere Lagerungszeiten für die zuerst gewonnenen Proben.

3.2.2 Niere, Harnleiter und Harnblase

Gewebeentnahmen aus Operationsresektaten der urologischen Klinik wurden ausschließlich durch das Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt. Der Transport der Gewebe dorthin unmittelbar nach der Resektion wurde durch den Autor gewährleistet.

Im Institut für Pathologie wurde aus den Operationsresektaten von Blase oder Niere und Harnleiter durch einen Pathologen ein in sicherer Entfernung vom Tumor befindliches und makroskopisch tumorfrei erscheinendes Gewebestück in ausreichender Größe herausgetrennt und zur weiteren Untersuchung überlassen. Der weitere Transport der Gewebeprobe erfolgte in eiskaltem Transportpuffer.

Die beiden Prostataprobe wurden, da es sich um endoskopische Gewebeabtragung ohne Organentnahme handelte, nach Ende des Eingriffs direkt aus dem Filtersieb der Spülung in die Probengefäße auf Eis übernommen.

3.2.3 Leber, Darm und Pankreas

Nach Entfernung des Resektates wurde mir dieses mit einem Hinweis auf die zu schonenden Stellen überlassen. Unter Berücksichtigung dieser Stellen wurde noch im Operationssaal ein ausreichend großes Stück aus einem Bereich herausgetrennt, der einen ausreichenden Sicherheitsabstand von mehreren Zentimetern zum Tumor besaß. Die Gewebeprobe wurde alsdann sofort in eiskaltem Transportpuffer bei +4 °C gelagert.

Gelegentlich konnten mehrere Proben am gleichen Tag zu gewonnen werden. Wie bereits bei der Beschreibung der Gewinnung von Hautproben erwähnt, führte dies jedoch für die als erstes gewonnenen Gewebeproben teilweise zu längeren Lagerungszeiten.

3.2.4 Lunge

Im Operationssaal der thoraxchirurgischen Abteilung des Klinikums Rechts der Isar wurde das komplette Resektat unmittelbar nach der Entnahme an den Autor weitergereicht, so dass das Probenmaterial binnen weniger Minuten einer gekühlten Lagerung zugeführt werden konnte.

Eine Probenentnahme durch das Institut für Pathologie, wie dies oben für die urologischen Proben beschrieben wurde, war nicht zwingend erforderlich. In Einzelfällen wurde bereits vom Operateur ein Gewebestück herauspräpariert, so dass nach der Probenentnahme eine Diagnosestellung seitens der Pathologen nicht durch Fehlen relevanten Gewebes gefährdet war. Auch bei diesem Vorgehen ergaben sich sehr kurze Lagerungszeiten der Lungenproben bei Raumtemperatur.

3.3 Datenerhebung mit dem Probenbegleitprotokoll

Das Probenbegleitprotokoll (s. Abb. 3, S. 22) wurde vor der Probenentnahme anhand der Krankenakte ausgefüllt. Übernommen wurden die grundlegenden Patientendaten Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft, Beruf, Rauchgewohnheit und Vorerkrankungen, soweit diese dort dokumentiert waren. Die Patientendokumentation erfolgte in anonymer Form.

Darüber hinaus wurden einige klinisch-chemische Laborwerte übernommen, um auf möglicherweise bedeutsame Störgrößen hin zu kontrollieren. Im Einzelnen waren dies Erythrozyten- (Ery) und Leukozytenzahlen (Leuko), Werte für Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk) und Gesamtprotein im Serum, sowie Blutzuckerwerte, sofern diese prä- oder intraoperativ bestimmt wurden. Bei Mehrfachbestimmungen wurde der aktuellste Wert übernommen.

Um die möglicherweise von Arzneimitteln ausgehenden Störwirkungen erfassen zu können, wurde die aktuelle Medikation der Patienten auf relevante Arzneimittel hin geprüft und entsprechend im Probenbegleitprotokoll dokumentiert. Wie bereits erwähnt, wurden auch die Lagerungszeiten der jeweiligen Proben im Probenbegleitprotokoll vermerkt.

3.4 Lagerung und Transport

In Modifikation der von WEBER und GLOWINSKI 1980 (S. 171) und LAND *et al.* 1993, (S. 1446) beschriebenen Verfahren fand als Transportpuffer isotone phosphatgepufferte Natriumchloridlösung mit

einem pH von 7,4 Verwendung, die durch Zusatz von Magnesium und Kalzium humanphysiologischen Verhältnissen angeglichen wurde (PBS-Lösung).

Für die Untersuchungen der optimalen Transport- und Lagerungsbedingungen an der Rattenleber wurde eine Ratte mit Ethylether und Barbituraten narkotisiert und getötet. Die Leber wurde entnommen, in eiskaltem Pyrophosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) wiederholt gewaschen, in etwa kirschkernegroße Stücke zerteilt und binnen 30 Minuten unter -80 °C oder -180 °C eingefroren.

Die Ergebnisse von Vorversuchen an der Rattenleber legten einerseits nahe, Transport und Lagerung menschlicher Gewebeproben bei Temperaturen von +4 °C zu durchzuführen, andererseits waren minimale Zeiten zwischen der Probenentnahme und der Inkubation anzustreben. Eine Lagerung und der Transport der Proben auf Eis stellte gleichzeitig auch die am einfachsten durchführbare Vorgehensweise dar.

3.5 Gewebeaufschluß

Nach Ankunft im Labor wurden die Gewebeproben wiederholt in mehreren Millilitern eiskalter PBS-Lösung gewaschen, um eine mögliche Kontamination durch Körpersekrete und Bakterien zu beseitigen und Blut zu entfernen. Transportpuffer und Spülfraktion wurden verworfen.

Die weiteren Schritte bis zur Inkubation fanden im Eiswasserbad bei +4 °C statt. Alle Lösungen mit Ausnahme der PABA- bzw. INH-Lösung wurden vor der Verwendung auf +4 °C gehalten.

3.6 Gewinnung von Cytosol

Die Proben wurden mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und anschließend in 3 - 5 ml PBS unter Eiswasserkühlung mit einem Potter-Elvehjem homogenisiert (Fa. Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland; 1.000 U/min, ca. 10 Stöße über etwas 3 - 5 Minuten). Das Homogenat wurde zur Gewinnung von sog. S10-Cytosol in verschließbaren Reaktionsgefäßen aus Plastik 15 Minuten bei 10.000 x g (12.000 rpm) zentrifugiert (Mikro Rapid /K, Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde in frische Reagenzgläser überführt, das Pellet verworfen. Mit dem im folgenden verwendete Begriff *Cytosol* wird Bezug auf diesen Überstand genommen.

Im Rahmen orientierender Studien zur Cytosolgewinnung kam auch sog. S100-Cytosol zur Verwendung. Hierbei wurde das Homogenat bei +4 °C zuerst 15 Minuten bei 10.000 x g, und anschlie-

ßend zusätzlich 60 Minuten bei 100.000 x g (Beckman Ultrazentrifuge, Typ L8-55M, Fa. Beckman, Palo Alto, CA, USA) zentrifugiert.

3.7 Proteinbestimmung

Vor der Messung der AT-Aktivität wurde der Proteingehalt des jeweilig eingesetzten Cytosols bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte leicht modifiziert nach dem Protokoll von LOWRY *et al.*, 1951. Die Messungen wurden auf Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Merck) als Standard bezogen. Bei jeder Bestimmung wurde eine Eichkurve mit aufgenommen. Cytosole wurden jeweils als Triplikat gemessen.

In Polystyrolreagenzgläsern wurden entweder 50 µl PBS als Negativkontrolle, 50 µl BSA-Standards der Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 und 4,0 mg/ml oder 50 µl des Cytosols der zu bestimmenden Probe pipettiert. Anschließend wurden 2,5 ml einer frisch bereiteten Lösung bestehend aus 100 Volumenanteilen Na_2CO_3 (30 g/l) mit NaOH (4 g/l) und je einem Teil K-Na-Tartrat (40 g/l) und Cu(II)SO_4 (20 g/l) hinzugefügt. Nach einigen Minuten Einwirkzeit wurde unter kräftigem Schütteln 0,25 ml der verdünnten Folin Ciocalteus Phenolreagenzlösung (1:4 in bidestilliertem Wasser) zugegeben. Die Reagenzgläser wurden einige Minuten stehengelassen, um die Bildung der blauen Farbe abzuwarten.

Anschließend wurden aus jedem Reagenzglas 350 µl in 96-well-Mikrotiterplatten (NUNC) pipettiert und die optische Dichte mit einem Detektor (Elisareader, Typ Ear 340 AT, Fa. SLT Labinstruments, Österreich) bei 620 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte über das Softwarepaket EASY-FIT der Firma SLT Labinstruments (Crailsheim, Deutschland) auf einem PC.

Die Proteinkonzentrationen der Cytosole wurden durch Vergleich mit der Eichkurve berechnet und in mg/ml ausgedrückt. Bei Werten über 4 mg/ml wurde die Bestimmung mit einer Verdünnung der Cytosole wiederholt, da oberhalb dieses Wertes in der Regel keine Linearität der Eichkurve mehr bestand.

3.8 Acetyltransferase-Assay

Die Assays beruhen auf dem Prinzip eines quantitativen Nachweises der durch die cytosolischen AT acetylierten Markersubstrate PABA und INH. Um einer möglichen Enzymhemmung durch Schwermetallionen und Oxidation entgegenzuwirken (vgl. S. 8), werden dem Inkubationsgemisch als Komplex-

bildner EDTA und als Reduktionsmittel DTT zugesetzt. Die Strukturformeln von PABA und INH sind in den beiden folgenden Abb. dargestellt.

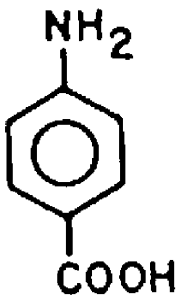


Abb. 4: Strukturformel von PABA

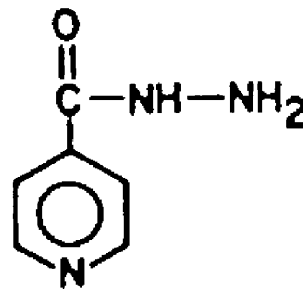


Abb. 5: Strukturformel von INH

3.8.1 Inkubationsansatz

3.8.1.1 Acetylierung von PABA

Es wurde die Methode von KAWAKUBO *et al.* (1988, S. 266) übernommen und leicht modifiziert. In Spitzbodenglasröhrchen wurden 140 µl PBS, 5 µl 100 mM EDTA-Lösung und 5 µl 100 mM DTT-Lösung pipettiert. Anschließend wurden 250 µl Cytosol entsprechend 0,15 mg Protein hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente 250 µl Rattenlebercytosol, als Negativkontrolle 250 µl PBS anstelle von Gewebecytosol. Schließlich wurden 50 µl 1 mM PABA-Lösung und 50 µl AcCoA (4 mg/ml in PBS) hinzupipettiert.

Um auch bei größeren Probenzahlen eine Synchronisation zu erreichen, wurden alle Pipettierschritte im Eiswasserbad durchgeführt. Einzelne Versuche bestätigten, dass unter diesen Bedingungen eine Acetylierung allenfalls in nicht meßbarem Umfang stattfindet. Die Reaktion wurde sodann durch Einbringen der Proben in ein Wasserbad von +37 °C gestartet. Während der Inkubationszeit wurde das Inkubationsgemisch kontinuierlich geschwenkt. Zur synchronen Abstopfung der Reaktion nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reagenzgläser in ein Eiswasserbad überführt, und die Proteine durch Zusatz von 500 µl 1 N HCl denaturiert. Anschließend wurden 2,0 ml wassergesättigtes Ethylacetat hinzugefügt, die Reagenzgläser verschlossen und für ca. 15 Minuten ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung erfolgte ein Zentrifugationsschritt über weitere 15 Minuten bei 3.000 rpm (Megafuge, Typ 1,0 R, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Von der organischen Phase wurden sodann 1,5 ml in frische Reagenzgläser überführt. Dort wurde die organische Phase mit Hilfe eines durch Pasteurpipetten geleiteten f-

kussierten Stickstoffstroms bis zur Trockenheit eingengt und in 500 µl HPLC-Laufmittel (s. unten) wieder aufgenommen. Die wäßrige Phase wurde verworfen.

Um die durch gelegentlichen Bruch der Pasteurpipetten beim Trockenvorgang eingeschleppten Glassplitter wieder zu entfernen, wurden die Proben vor der Messung durch Filter mit 0,45 µm Porengröße (Typ HV, Fa. Nihon / Millipore, Kogyo / Yonezawa, Japan) gefiltert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße aus Plastik (Fa. Eppendorf) überführt, verschlossen und unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur gelagert.

3.8.1.2 Acetylierung von Isoniazid

Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes und die weitere Behandlung entsprachen dem oben beschriebenen Vorgehen. Unterschiede bestanden einerseits im Einsatz von Eppendorfcups anstelle der Spitzbodenreagenzgläser und in der Verwendung von 50 µl 10 mM INH-Lösung als Substrat anstelle o.g. PABA-Lösung.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Übertragung der Reaktionsgefäße in Eiswasser gestoppt, Proteine mit 100 µl 20%iger Trichloressigsäure ausgefällt und bei 5.000 x g während 5 Minuten Zentrifugation sedimentiert (Hettich-Zentrifuge, 6.000 rpm). Der Überstand wurde, ohne den Bodensatz wieder zu lösen, in frische Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, mit 150 µl 1 N NaOH auf pH 9 eingestellt und mit 200 µl 0,8 M Kaliumboratpuffer mit pH 9 abgepuffert. Der verbleibende Rückstand wurde verworfen. Schließlich wurden die Gefäße verschlossen, durchmengt und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß bis zur Messung aufbewahrt.

3.8.2 Nachweis und Quantifizierung

Der Nachweis der acetylierten Reaktionsprodukte erfolgte durch Verwendung von HPLC unter isokratischen Bedingungen. Zur Auftrennung wurden Reversed-Phase C-18 Nucleosil-Säulen der Firma Macherey und Nagel, Düren, Deutschland, Typ 120 - 5 C 18 vom Format 250 x 8 x 4 mm (Länge x Außendurchmesser x Innendurchmesser) und der Partikelgröße 5 µm benutzt. Über einen Vergleich mit einem externen Standard bekannter Konzentration wurden die Reaktionsprodukte quantifiziert. Bei Messung mit Hilfe des automatischen Probengebers wurden alle Proben doppelt injiziert.

3.8.2.1 N-Acetyl-PABA

Die Bedingungen wurden von KAWAKUBO *et al.* 1988, (S. 266) übernommen. Das nachzuweisende Reaktionsprodukt Ac-PABA war durch die vorangehenden Analysenschritte bereits von den wäßrigen Anteilen des Inkubationsansatzes abgetrennt und angereichert worden. Auch war die Probe bereits im HPLC-Laufmittel gelöst. Injiziert wurden wahlweise von Hand oder automatisch über einen Probengeber ein Volumen von 50 µl.

Die mobile Phase bestand aus einem Puffer, der sich zu 85 Volumenteil aus 50 mM Essigsäure und zu 15 Teilen aus Acetonitril zusammensetzte. Der Laufpuffer wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur ruhend aufbewahrt, um eine ausreichende Entgasung herbeizuführen.

Die Analysen wurden mit einer Flußrate von 1,2 ml/min gefahren. Der Druck lag dabei in Abhängigkeit vom Alter der Säule bei 170 - 180 bar. Während eines Laufes blieb der Druck konstant (± 2 bar). Die Druckunterschiede hatten im o.g. Bereich keine Auswirkungen auf das chromatographische Bild oder die Peakfläche des Standards. Die Detektion fand bei 263 nm statt. Bei jeder Analysenserie wurde zu Beginn ein Standard, bestehend aus 1 µM Ac-PABA in Laufpuffer mehrfach bestimmt.

3.8.2.2 N-Acetyl-Isoniazid

Auch hier wurden Volumina von jeweils 50 µl injiziert. Da hier jedoch eine insgesamt größere Probenmenge zur Verfügung stand, konnten an der Nachweisgrenze liegende Werte im Einzelfall durch manuelle Injektion von 100 µl Probe überprüft werden.

Die mobile Phase für den Nachweis von Ac-INH bestand aus einer wäßrigen Lösung von 160 mM Kaliumborat. Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH-Lösung auf 9 eingestellt. Nach Herstellung des Puffers wurde die Lösung mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Typ N026.3 AN 18, Fa. Herion; Filter: Type GV 0,22 µm, Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich) filtriert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen.

Zur Entgasung des Laufmittels war eine ruhige Lagerung über ca. 12 Stunden hinweg erforderlich. Zusätzlich wurde vor der Verwendung noch etwa 3 Minuten eine Entgasung im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Typ RK 100, Fa. Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die Flußrate betrug 1,5 ml/min, der Arbeitsdruck lag bei 190 - 220 bar. Druckunterschiede hatten im o.g. Bereich keine merklichen Auswirkungen auf das chromatographische Bild oder die Peakfläche des externen Standards. Während eines Laufes blieb der Druck jeweils konstant (± 2 bar). Detektiert wurde bei 303 nm. Der Standard bestand aus 20 µM Ac-INH in Laufmittelpuffer.

3.9 Auswertung

3.9.1 Berechnung der spezifischen Aktivität

Nach der HPLC-Messung erfolgte die Analyse des ausgegebenen Chromatogramms. Die Reaktionsprodukte wurden durch Vergleich mit der Retentionszeit R_T des jeweiligen Standards identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Peakfläche des jeweiligen Acetylierungsproduktes mit der Peakfläche des Standards.

Diese im Injektionsvolumen enthaltene Stoffmenge wurde auf das Gesamtvolumen der vorliegenden Probe hochgerechnet. Dabei wurde berücksichtigt, dass bei der Acetylierung von PABA das Produkt in 2,0 ml Ethylacetat ausgeschüttelt wurde, in den weiteren Arbeitsschritten jedoch nur 1,5 ml verwendet wurden.

Durch Bezug der im Probenvolumen insgesamt enthaltenen Stoffmenge des Produktes auf die bei der Inkubation eingesetzte Proteinmenge und die Dauer der Inkubation ergab sich die spezifische Aktivität in der Einheit pmol/mg Protein/min bzw. nmol/mg Protein/min. Zusammenfassend erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität der PABA-AT nach der Berechnungsformel:

$$spA = F_p / F_{St} \times 50 \text{ pmol} / V_p [\mu\text{l}] \times 500 \mu\text{l} / 1,5 \text{ ml} \times 2,0 \text{ ml} / m_p [\text{mg}] / t [\text{min}]$$

Für die Aktivität der INH-AT ergab sich folgender Berechnungsgang:

$$spA = F_p / F_{St} \times 1.000 \text{ pmol} / V_p [\mu\text{l}] \times 950 \mu\text{l} / m_p [\text{mg}] / t [\text{min}]$$

Abkürzungen:

- spA: spezifische Aktivität
- F_p : Peakfläche des Produkts in der Probe
- F_{St} : arithmetisches Mittel der Peakflächen der Standards
- V_p : injiziertes Probenvolumen
- m_p : eingesetzte Proteinmenge
- t: Inkubationszeit

3.9.2 Berechnung der Nachweisgrenzen

Bei der Berechnung der Nachweisgrenzen der spezifischen Aktivität wurde zugrundegelegt, dass erst Peaks von mehr als 15.000 Flächeneinheiten (zum Vergleich: 50 pmol Ac-PABA entsprechen ca. 100.000, 1 nmol Ac-INH ca. 600.000 Flächeneinheiten) deutlich vom Grundrauschen zu unterscheiden sind.

Aus den mittleren Peakflächen der Standards wurde die Stoffmenge errechnet, die einer Peakfläche von 15.000 Einheiten entsprochen hätte. Diese in 50 µl Probe minimal nachweisbare Menge wurde auf das vorliegende Gesamtvolumen der Probe hochgerechnet. Die so ermittelte Stoffmenge wurde auf die maximal mögliche Inkubationszeit und die im jeweiligen Experiment maximal einsetzbare Proteinmenge bezogen.

3.9.3 Statistische Auswertung

Die spezifischen Aktivitäten wurden als arithmetisches Mittel (MW) zweier Einzelversuche \pm Abweichung vom Mittelwert bzw. \pm Standardabweichung (SD) bei Triplikaten angegeben. Die auf den MW bezogene SD in % wird im Folgenden als *relativer Fehler* bezeichnet.

Störeinflüsse und Abhängigkeiten wurden mit linearer Regressionsanalyse und Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman r_s geprüft. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte durch 2-seitigen T-Test. Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

Für die Umrechnung von AT-Aktivitäten im Blut wurden die folgenden Normwerte und Umrechnungsfaktoren zugrundegelegt: 5×10^9 Erythrozyten pro ml, 7×10^6 Leukozyten pro ml, ca. $2,3 \times 10^6$ Lymphozyten pro ml, $0,4 \times 10^6$ Monozyten pro ml und $3,9 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten pro ml Vollblut, Hämatokrit 46%, sowie 0,1 ng Protein pro Zelle (Wissenschaftliche Tabellen Geigy 1985, S. 188ff.).

4 Ergebnisse

Voraussetzung für eine zuverlässige Bestimmung von AT-Aktivitäten ist ein geeigneter Assay. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden HPLC-gestützte Verfahren eingesetzt, da diese als ausgesprochen spezifisch und höchst sensitiv gelten.

4.1 HPLC-Analysen von N-Acetyl-PABA und N-Acetyl-Isoniazid

Die gesamte Meßdauer einer einzelnen Probe (Einfachbestimmung) zum Nachweis von Ac-PABA betrug etwa 7- 8 Minuten. Nicht acetyliertes PABA wurde mit einer R_T von ca. 4 Minuten und Ac-PABA bei einer R_T von ca. 6 Minuten detektiert, so dass Substrat und Produkt deutlich voneinander zu differenzieren waren. Die Herkunft weiterer, unspezifischer und unregelmäßig auftretender Peaks ist unbekannt. Diese beeinträchtigten die Quantifizierung der Substrat- oder Produktpeaks jedoch nicht.

Das chromatographische Bild bei der HPLC-Analyse von Ac-PABA wies kein Muster auf, das einen Rückschluß auf das untersuchte Gewebe ermöglicht hätte. Quantitative Unterschiede waren, außer bei Substrat- und Produktpeak vernachlässigbar. Abb. 6 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Die Auswertung der Chromatogramme beim Nachweis von Ac-INH wurde dadurch kompliziert, dass die HPLC-Säulen unter den experimentellen Bedingungen eine durchschnittliche Lebensdauer von nur etwa 40 Tagen aufwiesen, im Extremfall lediglich 14 Tage. So variierte die Trennleistung bereits zwischen verschiedenen Messungen des gleichen Tages merklich. Abb. 7 stellt ein typisches Chromatogramm dar.

Die Chromatogramme verschiedener Gewebe zeigten unterschiedliche Peakmuster. Diese waren jedoch nicht so spezifisch, dass sie für das jeweilige Gewebe charakteristisch gewesen wären. Ac-INH wurde bei ca. 4 - 5 Minuten detektiert, nicht umgesetztes INH hatte eine R_T von ca. 7 - 9 Minuten. Die Peaks von EDTA und DTT hatten mit noch längeren Retentionszeiten eine ausreichende Distanz von Ac-INH (s. Abb. 7).

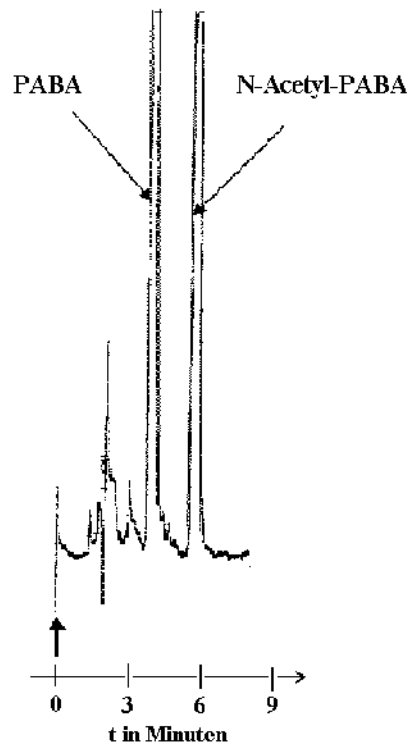


Abb. 6: HPLC-Nachweis von Ac-PABA

HPLC-Chromatogramm beim Nachweis von Aktivitäten der PABA-AT in einer Nierenprobe (Probe Nr. 4A26 NI04). Der Pfeil markiert den Injektionszeitpunkt.

Die dem Ac-INH-Peak direkt benachbarten Peaks hatten bei geringen bis mittelgroßen Produktmengen in der Probe einen befriedigenden Abstand. Zunehmende Säulenalterung oder große Produktmengen führten zunehmend zu Überlagerungen. Bei großen Produktmengen konnte der Beitrag der Nachbarpeaks quantitativ vernachlässigt werden. Bei deutlich nachlassender Trennleistung wurden die Säulen frühzeitig erneuert.

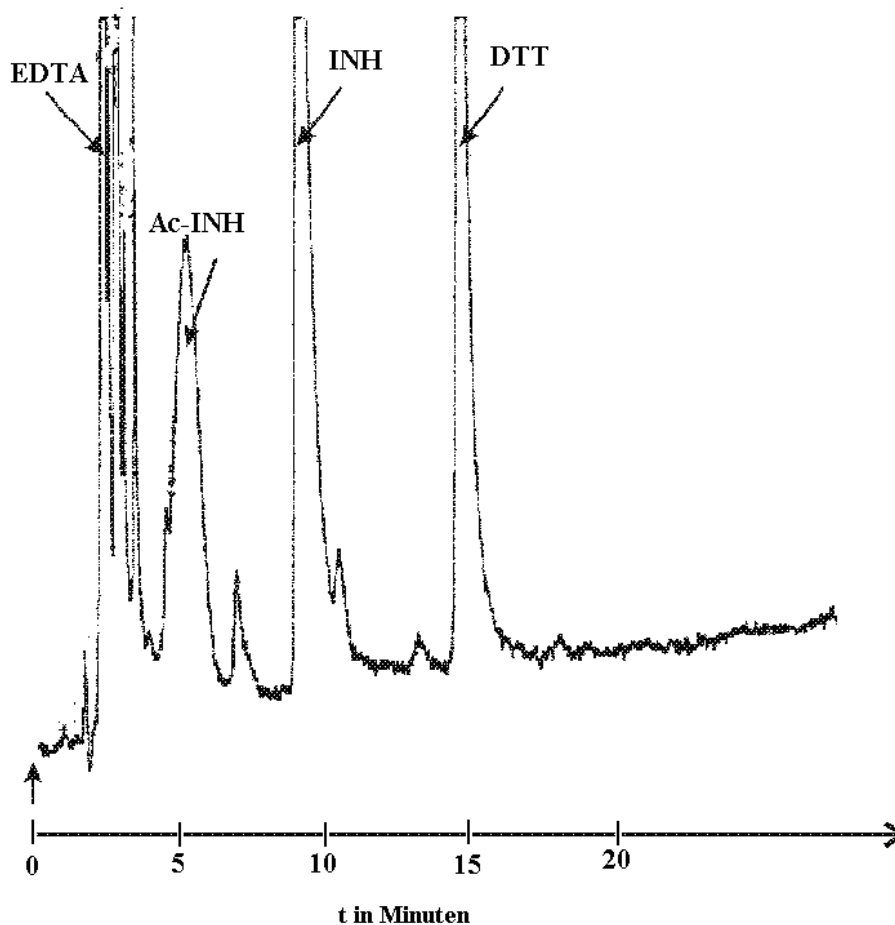


Abb. 7: HPLC-Nachweis von Ac-INH

HPLC-Chromatogramm beim Nachweis von Aktivitäten der INH-AT in einer Leberprobe (Probe Nr. 4516 LE02). Der Pfeil markiert den Injektionszeitpunkt. Ein unspezifischer Spätpeak bei ca. 50 Minuten ist nicht mehr dargestellt. Die Auftrennung wurde auf einer neuen Trennsäule vorgenommen.

4.2 Abklärung der Versuchsbedingungen

Aufgrund unzureichender Datenlage aus der Literatur, oder um diese im Einzelfall zu überprüfen, wurden eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Diese hatten zum Ziel, einerseits eine möglichst schonende kurz- und mittelfristige Lagerungsmöglichkeit zu definieren, und andererseits Sensitivitätsoptima für die Aktivitätsbestimmungen hinsichtlich der bei der Inkubation eingesetzten Proteinmenge und der Inkubationsdauer zu bestimmen.

4.2.1 Transport- und Lagerungsbedingungen

Wie die im Folgenden beschriebenen Resultate zeigen, ist eine kurzfristige Lagerung von Proben bei +4 °C über mehrere Stunden hinweg ohne größere Aktivitätsverluste möglich. Hinsichtlich der Stabilität bestehen jedoch deutliche Unterschiede zwischen der mono- und polymorphen Form der AT.

4.2.1.1 Stabilität von Acetyltransferasen der Ratte bei Lagerung auf Eis

Es wurde gemessen, wie sich die spezifische Aktivität der PABA-AT unter einer Lagerung bei +4 °C über mehrere Stunden verhält. Dabei wurden Proben aus Rattenleber nach einer Lagerungsdauer von 2 - 25 Stunden untersucht. Der Wert nach 2 Stunden war der technisch frühestmögliche Meßwert. Die Lagerungsdauer umfaßt dabei den Zeitraum zwischen dem Töten der Ratte und der Inkubation bei +37 °C. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt.

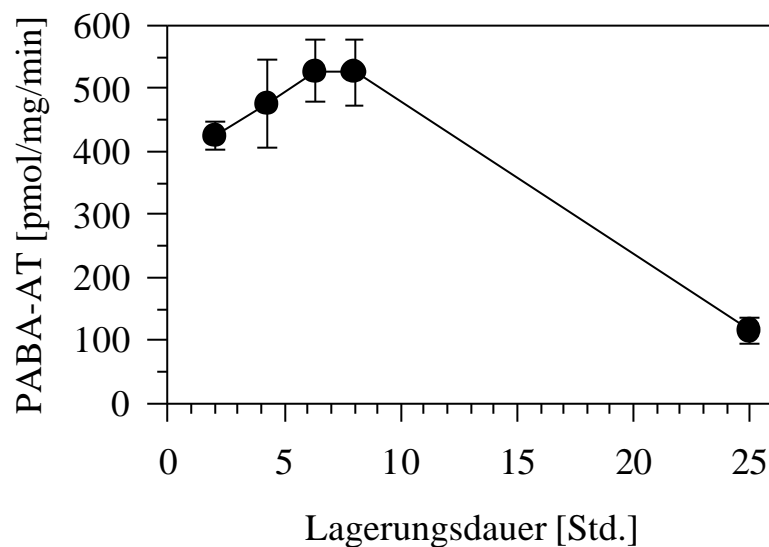


Abb. 8: Lagerungsstabilität der PABA-AT der Ratte bei +4 °C

Verlauf der spezifischen Aktivität der PABA-AT der Rattenleber während 25-stündiger Lagerung auf Eis. Die Inkubation erfolgte nach 2; 4,5; 6,3; 8 und nach 25 Stunden. Die Angabe der Lagerungsdauer bezieht sich auf den Zeitraum vom Töten der Ratte bis zur Inkubation. Das Inkubationsgemisch enthielt 0,15 mg cytosolisches Protein, die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die Werte stellen den MW dreier Ansätze \pm Standardabweichung dar.

Es ist zu erkennen, dass bei der Ratte die Aktivität der PABA-AT bei einer Inkubation innerhalb von 10 - 15 Stunden nicht merkbar verändert ist. Es ist zu beachten, dass PABA bei der Ratte durch die polymorphe Form der AT umgesetzt wird, während beim Menschen die monomorphe AT PABA verstoff-

wechselt. INH wird entsprechend bei der Ratte mono-, beim Menschen polymorph acetyliert (Details s. S. 102).

Die Acetylierung von INH durch Proben der Rattenleber ergab ähnliche Ergebnisse (Abb. 9):

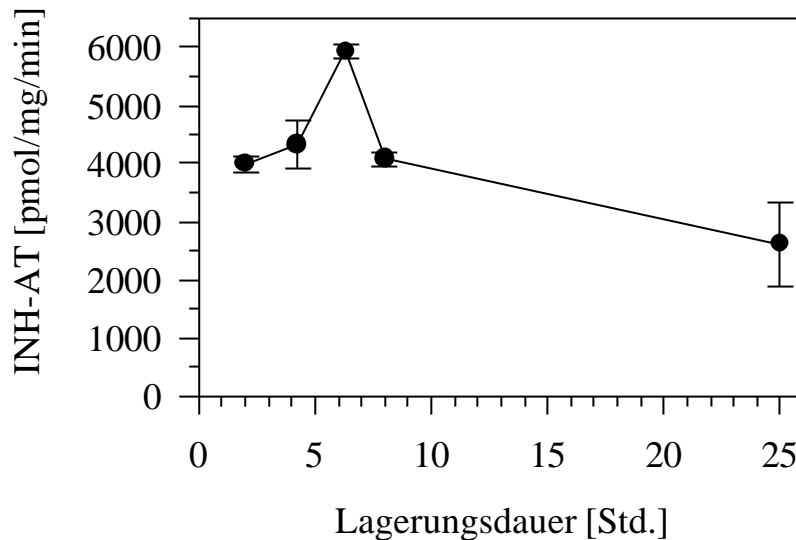


Abb. 9: Lagerungsstabilität der INH-AT der Ratte bei +4 °C

Verlauf der spezifischen Aktivität der INH-AT der Rattenleber während 25-stündiger Lagerung auf Eis. Die Inkubation erfolgte nach 2; 4,5; 6,3; 8 und nach 25 Stunden. Die Angabe der Lagerungsdauer bezieht sich auf den Zeitraum vom Töten der Ratte bis zur Inkubation. Das Inkubationsgemisch enthielt 0,15 mg zytosolisches Protein, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die angegebenen Werte stellen den MW \pm Standardabweichung von Triplikaten dar.

Die spezifische Aktivität nimmt innerhalb der untersuchten 25 Stunden insgesamt weniger ab, als dies bei der PABA-AT der Fall ist. Eine Lagerungsdauer bis zu ca. 12 Stunden ist allenfalls mit geringen Aktivitätsverlusten behaftet.

4.2.1.2 Stabilität von Acetyltransferasen der Ratte bei Tiefkühlung

Ein Einfrieren der Proben bei -80 °C bzw. -180 °C ist mit markanten Aktivitätsverlusten der PABA-AT verbunden, wie dies aus den folgenden beiden Abb. deutlich wird:

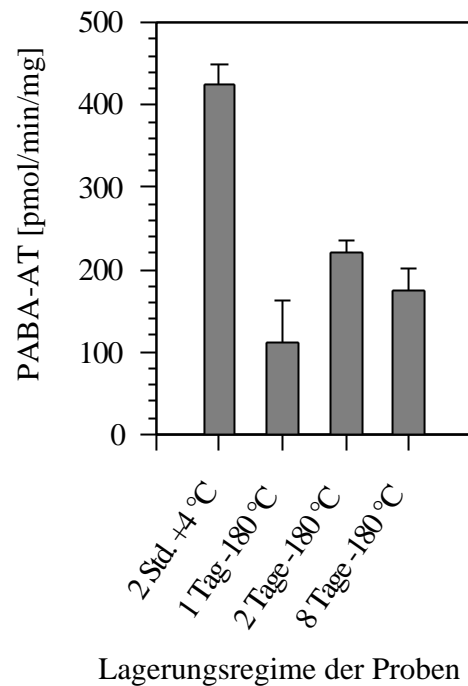
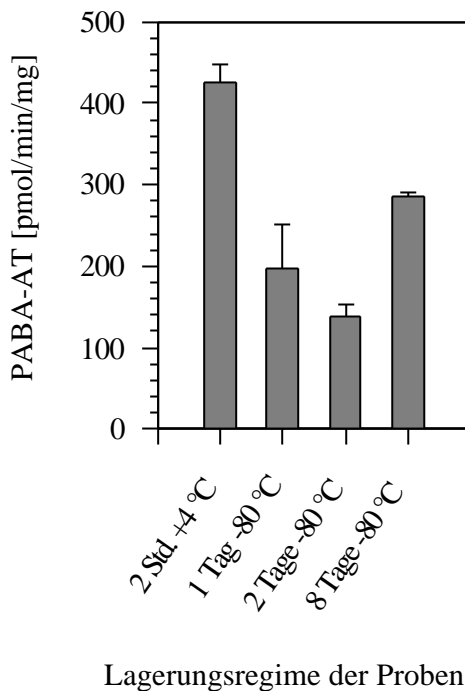
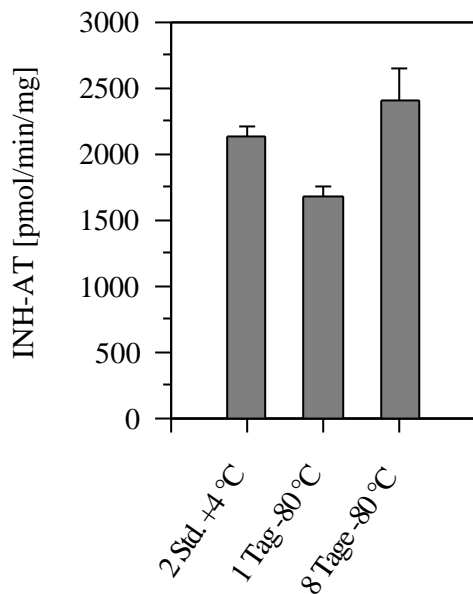


Abb. 10 u. Abb. 11: PABA-AT nach Lagerung unter -80 °C und -180 °C

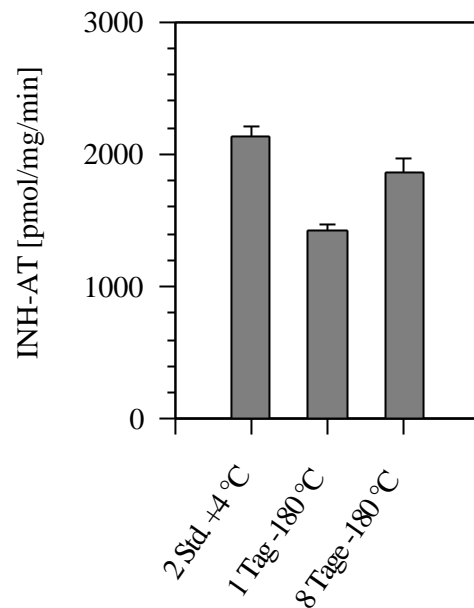
Spezifische Aktivität der PABA-AT nach Tiefkühlung über mehrere Tage. Als Proteinquelle dienten Proben einer Rattenleber. Zum Vergleich ist die Enzymaktivität nach 2 Stunden Lagerung auf Eis dargestellt (MW \pm Standardabweichung, n=3). ;

Nach dem Einfrieren bei -80 °C kommt es zu Aktivitätsabnahmen um bis zu 50% (bezogen auf den 2-Stunden-Wert). Ein plötzliches Einfrieren bei -180 °C führt zu Ergebnissen, die sich nicht grundsätzlich davon unterscheiden. Tendenziell könnte die Lagerung bei -80 °C jedoch marginal schonender zu sein. Entscheidend für den Verlust der Aktivität scheint der Einfriervorgang an sich zu sein, denn mit der Dauer der Lagerung über 8 Tage ergeben sich keine entscheidenden weiteren Veränderungen mehr. Dies ist unter Lagerungsbedingungen von -80 °C als auch unter -180 °C gleichermaßen der Fall.

INH-AT aus der Rattenleber verlieren bei einer Lagerung unter sehr niedrigen Temperaturen offensichtlich nur geringfügig an Aktivität. In den folgenden beiden Abb. sind die Enzymaktivitäten der INH-AT nach Einfrieren bei -80 °C und -180 °C dargestellt:



Lagerungsregime der Proben



Lagerungsregime der Proben

Abb. 12 u. Abb. 13: INH-AT nach Lagerung unter -80 °C und -180 °C

Spezifische Aktivität der INH-AT der Rattenleber nach Tiefkühlung für mehrere Tage. Als Proteinquelle dienten Proben einer Rattenleber. Zum Vergleich ist die Enzymaktivität nach 2 Stunden Lagerung auf Eis dargestellt (MW \pm Standardabweichung, n=3).

Auch hier ist eine Verringerung der spezifischen Aktivität zu verzeichnen, die jedoch nicht über übliche Schwankungsbreiten hinausgeht.

Die Tendenz, die sich bereits bei der Untersuchung der PABA-AT angedeutet hat, dass eine Lagerung unter -80 °C geringfügig schonender sein könnte als unter -180 °C, zeigt sich auch bei der INH-AT.

4.2.2 Einfluß eingesetzter Proteinmengen

Zur Klärung von Fragen der Standardisierung und Sensitivitätsoptimierung sollte geprüft werden, über welchen Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der Produktausbeute besteht.

Erste sondierende Versuche erfolgten an Rattenlebercytosol, das bereits über längere Zeit bei -80 °C gelagert worden war. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse.

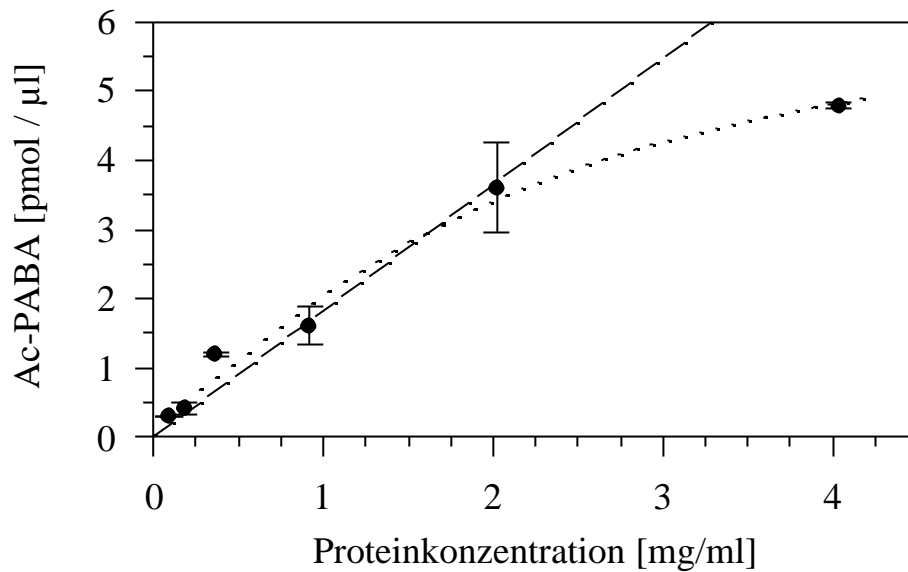


Abb. 14: Abhängigkeit der Bildung von Ac-PABA von der Proteinkonzentration

Pro Inkubationsansatz wurden die folgenden Proteinmengen eingesetzt: 0,046 mg; 0,09 mg; 0,18 mg; 0,46 mg; 1,01 mg; und 2,02 mg. Dargestellt ist die Endkonzentration im Inkubationsansatz. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Als Proteinquelle diente Rattenlebercytosol. Die Werte sind als $MW \pm$ Abweichung von Doppelbestimmungen aufgetragen. Aus den Daten des linearen Bereich (bis 2 mg/ml) wurde die Regressionsgerade bestimmt, die mit gestrichelter Linie dargestellt ist. Der ideale Kurvenverlauf ist mit gepunktet

Bis zu einer Konzentration von etwa 2 mg Protein pro ml Inkubationsansatz besteht ein nahezu linearer Zusammenhang mit der Produktbildung. Bei höheren Proteinmengen strebt diese einer Sättigung zu.

An kurz vorher entnommenen menschlichem Lebergewebe wurden die Ergebnisse der Versuche an der Rattenleber überprüft. Auch hier war eine fast lineare Abhängigkeit bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 1,5 mg/ml festzustellen (Abb. 15). Da die menschliche PABA-AT eine hohe spezifische Aktivität aufweist, genügt bereits der Einsatz geringer Proteinmengen zu einer mit ausreichender Sensitivität erfolgenden Aktivitätsbestimmung.

Stichprobenartig wurde an menschlichem Nierengewebe untersucht, ob die in Lebergewebe gefundene Beziehung zwischen Produktbildung und Proteinkonzentration auch in nichthepatischem Gewebe besteht. Ein grundsätzlicher Unterschied scheint nicht zu bestehen (Abb. 16).

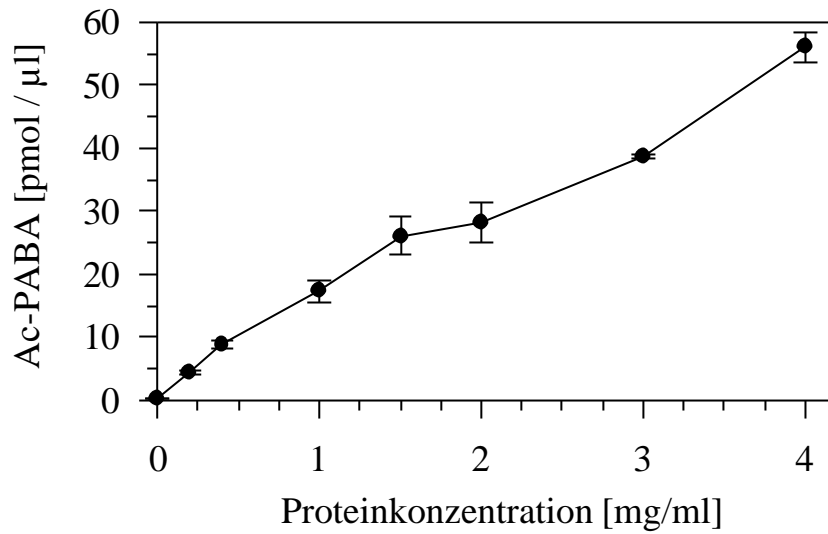


Abb. 15: Abhängigkeit der Bildung von Ac-PABA von der Proteinkonzentration

Es wurden 0 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1,0 mg, 1,5 mg und 2,0 mg Protein eingesetzt. Dargestellt ist die Endkonzentration im Inkubationsansatz. Als Proteinquelle diente frisch entnommenes menschliches Lebergewebe (Probe Nr. 4516 LE02). Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Die Werte sind als MW \pm Abweichung von Doppelbestimmungen aufgetragen.

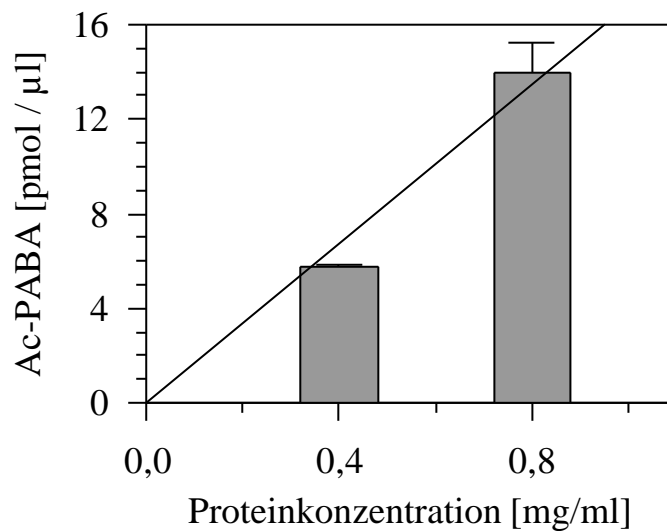


Abb. 16: Bildung von Ac-PABA bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentration

Die Acetylierung von PABA erfolgte mit einer Inkubation von 0,4 und 0,8 mg Protein pro ml Ansatzvolumen. Das Protein entstammte einer kurz zuvor operierten menschlichen Niere (Probe Nr. 4328 NI01). Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Die Werte sind als MW \pm Abweichung (n=2) aufgetragen.

Parallel zur Untersuchung der Proteinmengenabhängigkeit bei der Acetylierung von PABA wurde der Zusammenhang auch mit INH als Substrat untersucht. Bei Verwendung von Rattenlebercytosol wurden folgende Ergebnisse gefunden (Abb. 17).

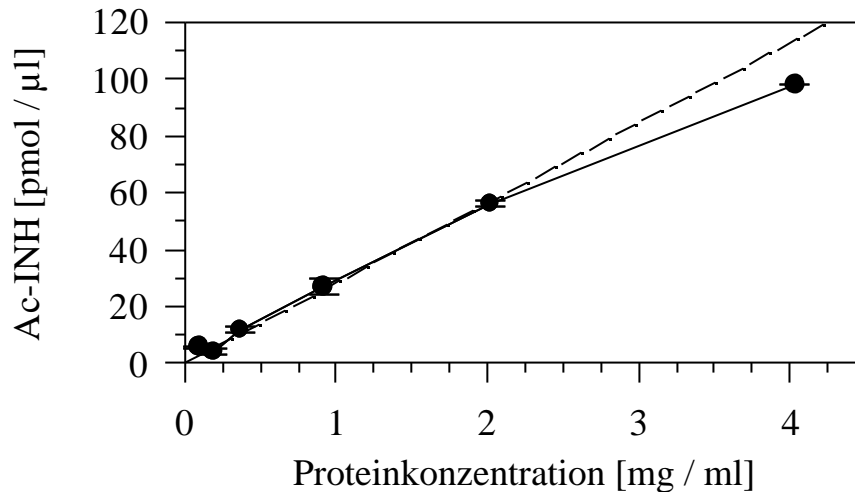


Abb. 17: Bildung von Ac-INH in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Es wurden pro Inkubationsansatz 0,046 mg, 0,09 mg, 0,18 mg, 0,46 mg, 1,01 mg und 2,02 mg Protein eingesetzt. Als Proteinquelle diente Rattenlebercytosol. Aufgetragen ist die Endkonzentration des Proteins im Reaktionsgefäß. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die Meßwerte sind als MW \pm Abweichung von Doppelbestimmungen dargestellt. Für den linearen Bereich (bis 2 mg/ml) wurde die Regressionsgerade errechnet, die mit gestrichelter Linie eingezeichnet ist.

Es fällt auf, dass der Kurvenverlauf dem der Acetylierung von PABA sehr stark ähnlich ist. Dies um so mehr, als die Abweichung vom linearen Bereich bei Proteinkonzentration gleicher Größenordnung zu erkennen ist.

Auch hier wurden die an Rattenleber erhobenen Ergebnisse an menschlichen Gewebeproben überprüft. Bei Verwendung einer Cytosolpräparation aus menschlicher Leber wurde ein linearer Zusammenhang beobachtet, der über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich, d.h. bis zu ca. 4 mg Protein pro ml Inkubationsansatz bestehen blieb. Details sind Abb. 18 zu entnehmen.

Im Anbetracht dieser Befunde wurde zur Sensitivitätssteigerung des Assays bei der Untersuchung verschiedener menschlicher Gewebe die maximal mögliche Proteinkonzentration bis zu einer Obergrenze von 4 mg/ml eingesetzt.

Stichprobenartig wurde auch hier ein nichtheptatisches Gewebe in die Untersuchung einbezogen. Aus Literaturangaben war bekannt, dass im menschlichen Darm INH-AT Aktivitäten nachweisbar sind (z.B.

Ilett *et al.* 1994, S. 915), so dass die Versuche mit einer Kolonprobe durchgeführt wurden. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.

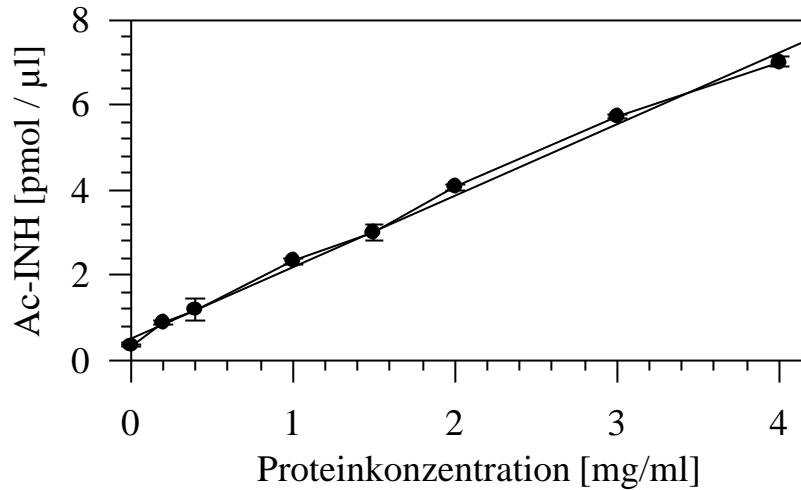


Abb. 18: Bildung von Ac-INH in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Verwendet wurden 0 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1,0 mg, 1,5 mg und 2,0 mg Protein pro Ansatz aus menschlichem Lebergewebe (Probe Nr. 4516 LE02). Aufgetragen ist die Endkonzentration des Proteins im Inkubationsansatz. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die Werte sind als MW \pm Abweichung von Doppelbestimmungen dargestellt.

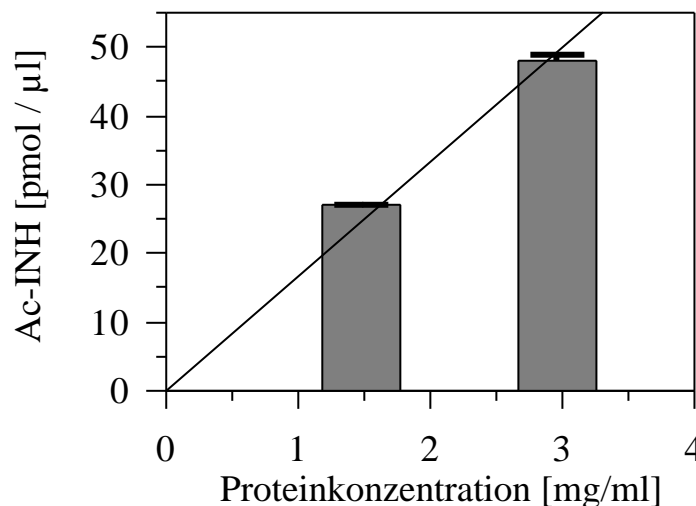


Abb. 19: Bildung von Ac-INH bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Es wurden 0,74 mg bzw. 1,48 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Dargestellt ist die Endkonzentration. Verwendet wurde die Cytosolpräparation einer kurz zuvor operativ entnommenen menschlichen Dickdarmprobe (Probe Nr. 4A11 CO05). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Die Werte sind als MW \pm Abweichung (n=2) dargestellt.

4.2.3 Einfluß der Inkubationszeit

Weitere Vorversuche an Rattenleber und menschlichen Geweben dienten der Abklärung von ausreichender und maximaler Inkubationszeit.

Es wurde untersucht, bis zu welchen Inkubationszeiten eine Produktbildung linear zur Inkubationszeit verläuft. Die Ergebnisse der Untersuchung dieses Zusammenhangs für die PABA-AT in menschlichem Nierengewebe sind in Abb. 20 dargestellt. In Anbetracht dieser Daten erschien es nicht sinnvoll, Inkubationszeiten von mehr als 10 Minuten zu wählen.

Aufgrund der hohen Acetylierungsrate ergibt sich auch unter Aspekten einer Sensitivitätsoptimierung kein Bedarf für eine lange Inkubationsdauer, da die Produktmengen bereits nach einer Inkubationsdauer von 5 Minuten mit 0,2 mg Protein deutlich über der Nachweisgrenze von ca. 10 pmol liegen.

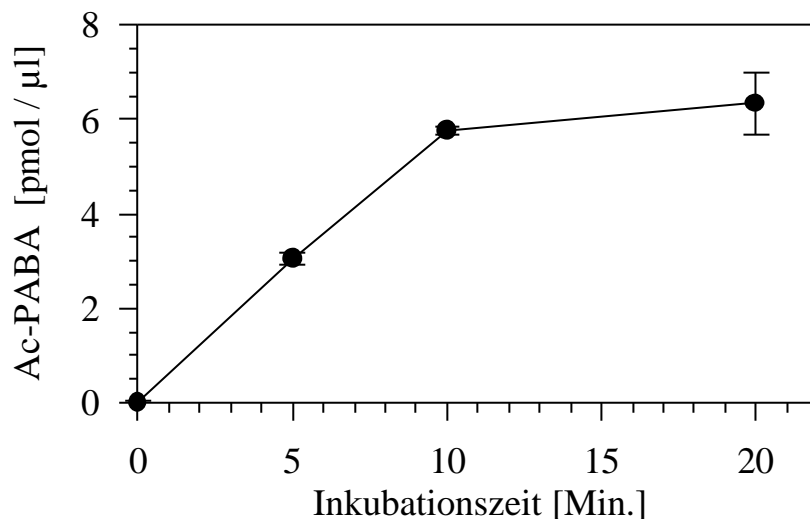


Abb. 20: Acetylierung von PABA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Es wurden 0,2 mg Protein einer frisch entnommenen menschlichen Nierenprobe (Probe Nr. 4328 NI01) für 0, 5, 10 und 20 Minuten inkubiert. Die dargestellten Meßwerte stellen MW \pm Abweichung von Doppelbestimmungen dar.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Inkubationszeit und Acetylierung von INH war die Verbesserung der Nachweismöglichkeiten über ein Erzeugen hoher Produktmengen ein wesentlicher Teil der Fragestellung.

In den ersten Vorversuchen wurde mit gefrorenem Rattenlebercytosol gearbeitet. Um der nach dem Einfrieren mutmaßlich geringeren spezifischen Aktivität der AT Rechnung zu tragen, wurde eine größere

Proteinmenge eingesetzt, um dennoch ein deutlich meßbares Signal zu erhalten. Wie aus Abb. 21 ersichtlich ist, folgt die Reaktion der INH-AT einer Sättigungskinetik.

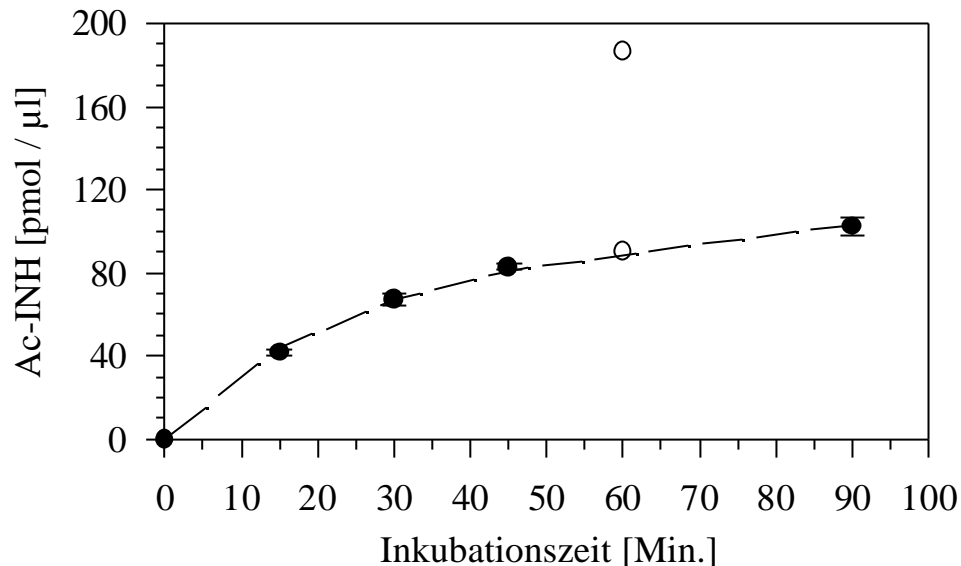


Abb. 21: Acetylierung von INH in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Inkubiert wurden 1,0 mg Rattenlebercytosol für 0; 15; 30; 45; 60 und 90 Minuten. Die dunklen Kreise stellen $MW \pm$ Abweichung von Doppelbestimmungen dar, die hellen Kreise Einzelwerte. Der obere der beiden Einzelwerte wurde als Ausreißer gewertet.

Die an der Rattenleber erhobenen Daten wurden an frisch entnommenen menschlichem Lebergewebe überprüft. Abb. 22 stellt die Ergebnisse dar.

Der Verlauf der Zeit-Produkt-Kurve strebt auch hier einer Sättigung zu. Der stärkste Anstieg der Kurve beschränkt sich auf die ersten ca. 20 Minuten. Anbetracht der eingangs erwähnten Optimierungsbestrebungen wurde der Verlust an spezifischer Aktivität bei längeren Inkubationszeiten in Kauf genommen. Für die weiteren Versuche wurde eine Inkubationsdauer von 60 Minuten gewählt.

Stichprobenartig wurde überprüft, ob menschliche Gewebe nichthepatischen Ursprungs der Lebercharakteristik gleichen. Hierzu wurde aufgrund der inzwischen vorbekannten Aktivität von INH-AT im Darm Kolongewebe (Gewebeprobe Nr. 4A11 CO05) als Modell gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.

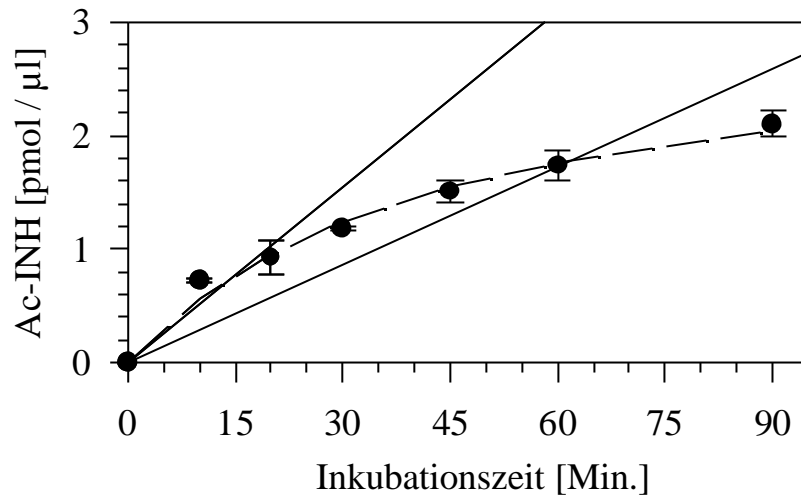


Abb. 22: Acetylierung von INH in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Es wurden jeweils 0,2 mg Cytosol einer frisch entnommenen humanen Leberprobe (Probe Nr. 4516 LE02) für 0, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 Minuten inkubiert. Die Werte sind als MW ± Abweichung von Doppelbestimmungen dargestellt.

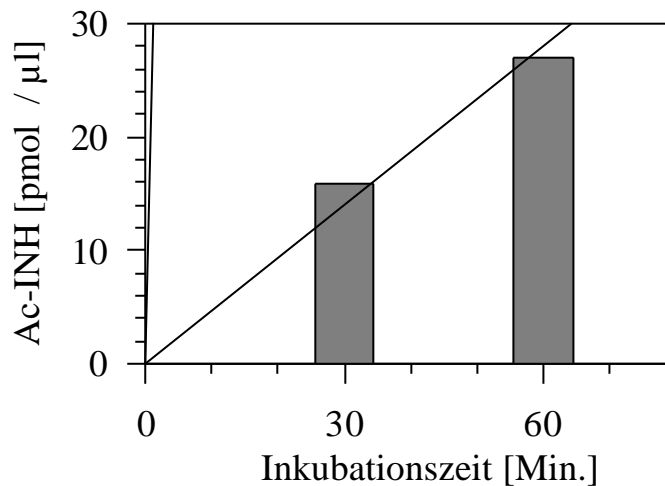


Abb. 23: Bildung von Ac-INH bei zwei verschiedenen Inkubationszeiten

Bildung von acetyliertem INH nach Inkubation mit 0,74 mg Protein für 30 bzw. 60 Minuten. Das Protein stammt aus menschlichem Dickdarm (Probe Nr. 4A11 CO05), der wenige Stunden zuvor entnommen wurde. Die Werte stellen MW von Doppelbestimmungen dar. Die maximalen Abweichungen lagen unter 1% (nicht dargestellt).

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, weicht der 60-Minuten-Wert leicht von der Linearität ab. Der Fehler entspricht in der Größenordnung dem der vorangegangenen Untersuchung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Produktbildung für kurze Inkubationszeiten gegeben ist, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Substraten bestehen. Weiterhin ist festzustellen, dass sich keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen den an Rattenleber und an menschlichen Geweben erhobenen Daten feststellen lassen. Ein Vergleich, der quantitative Aspekte mit einbezieht, kann aufgrund der vorausgehenden Lagerung des Rattenlebercytosols bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht mehr angestellt werden. Wesentliche Unterschiede zwischen menschlichen Geweben hepatischen und nichthepatischen Ursprungs bestehen nicht.

4.2.4 Acetyltransferase-Aktivitäten bei unterschiedlichen Cytosolpräparationen

Die häufig verwendeten Verfahren der Cytosolpräparationen nach dem S100-Protokoll unterscheiden sich von dem hier angewandten S10-Aufschlußverfahren in Dauer und Stärke des Zentrifugationsschritts (z.B. Ilett *et al.* 1994, S. 915). Um einen Vergleich mit in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen zu ermöglichen, wurden die beiden Aufschlußverfahren verglichen (Abb. 24).

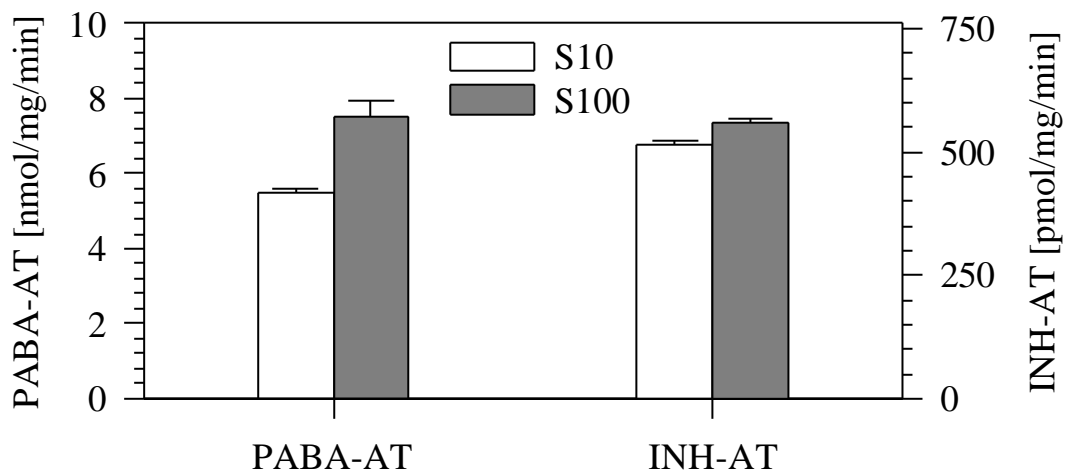


Abb. 24: Vergleich der PABA-AT und INH-AT bei S10- und S100-Cytosol

Bei der S10-Methode wurde das Gewebehomogenat 15 Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert, bei S100 zusätzlich weitere 60 Minuten bei $100.000 \times g$. Es wurden $0,2\text{ mg}$ (PABA-AT) bzw. $1,48\text{ mg}$ (INH-AT, S10) und $1,22\text{ mg}$ (INH-AT, S100) Protein einer Kolonprobe (Probe Nr. 4A11 CO05) eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten für PABA-AT und 60 Minuten für INH-AT. Die Meßwerte stellen den $MW \pm$ Abweichung von Doppelbestimmungen dar.

Die beiden AT weisen ein leicht divergentes Verhalten auf. Während sich für die INH-AT bei Verwendung der S100-Methode eine um 8,6% höhere Aktivität ergibt, beträgt der Unterschied bei der PABA-AT 36,5%.

4.3 Lagerungsstabilität der acetylierten Markersubstrate

Es wurde geprüft, wie lange die Proben nach Abschluß der Inkubation mit den darauffolgenden Neutralisierungs- und Anreicherungsschritten aufbewahrt werden können. Grund dafür war die Möglichkeit, dass oxidative, degradative oder nicht-enzymatische synthetisierende Prozesse in den Proben die später erfolgende HPLC-Analyse kompromittieren könnten. Erfahrungen hierzu liegen bislang nicht vor.

Bei Ac-PABA hatten Aufbewahrungszeiten bis zu 10 Wochen keine qualitativen Auswirkungen auf das Chromatogramm, die eine exakte Auswertung beeinträchtigt hätten. Die Menge des nachzuweisenden Produktes war ebenso hoch, wie bei sofortiger Messung der Probe (Daten nicht gezeigt).

Auch bei Ac-INH ergaben sich keine Veränderungen der Proben bis zu einer Aufbewahrungszeit bei Raumtemperatur von etwa 40 Tagen. Bei mehr als 50 Tagen Aufbewahrungszeit war in allen Proben, einschließlich der Negativkontrollen ein zusätzlicher Peak zu erkennen, der nach Retentionszeit R_T und Peakform als Ac-INH-Peak zu identifizieren war (Abb. 25).

Eine Abhängigkeit dieses Phänomens von der Art des Gewebes oder der Menge eingesetzten Proteins konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war ein Trend zur Zunahme des Ac-INH-Peaks bei längerer Aufbewahrungsdauer erkennbar. Dieser war besonders deutlich an den jeweils mitgeführten Negativkontrollen sichtbar.

Der Problematik wurde mit dem Bestreben begegnet, HPLC-Analysen möglichst nach kurzer Aufbewahrungszeit durchzuführen. Gegebenenfalls wurden in Negativkontrollen gefundene Werte von den Werten der Gewebeproben subtrahiert.

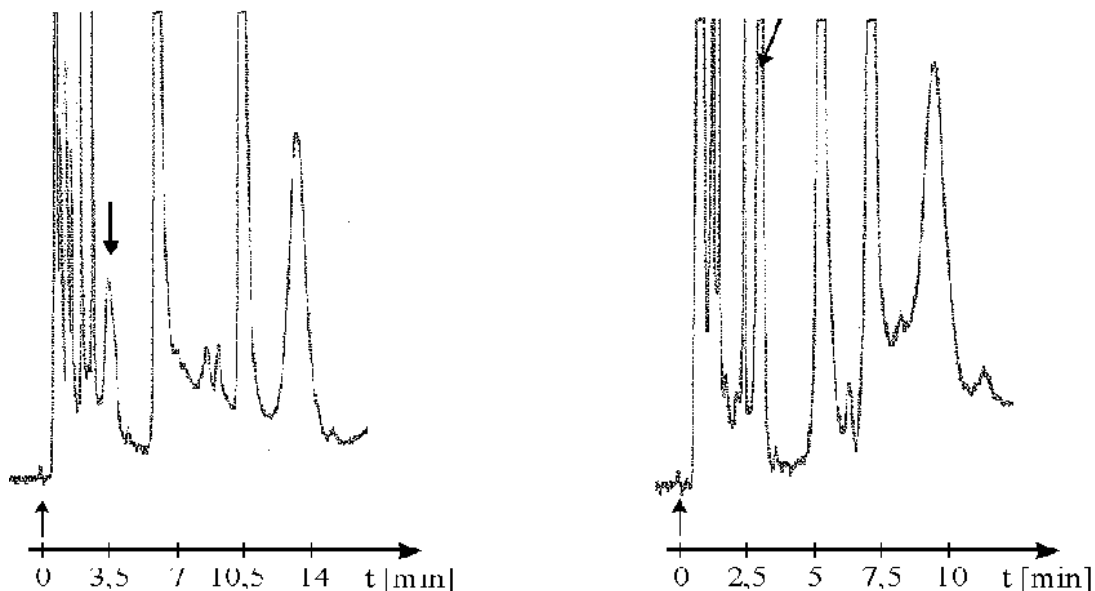


Abb. 25: Chromatogramme von Ac-INH bei Lagerung von Proben für 98 und 137 Tage

Das Chromatogramm stammt aus der Analyse einer Negativkontrolle (ohne Protein). Die Pfeile kennzeichnen Injektionszeitpunkt (unterer Pfeil) bzw. die Ac-INH Peaks (oberer Pfeil). Die Probe wurde bei Zimmertemperatur gelagert. Die Flächenmehrung nach 137 Tagen ist deutlich zu erkennen. Bis zu 40 Tagen Lagerungsdauer war kein Peak mit entsprechender R_T nachweisbar. Details s. Kap. Methoden.

4.4 Acetyltransferase-Aktivitäten in menschlichen Geweben

4.4.1 Haut

Die Ergebnisse der Untersuchung menschlicher Hautproben auf ihre spezifische Aktivität sind der folgenden Abb. 26 zu entnehmen.

Die spezifischen Aktivitäten lagen bei Probe 4411 HA01 um das 4,7-fache, bei Probe 4711 HA07 um das 3,2-fache, und bei allen anderen Proben mindestens um den Faktor 22 über der jeweiligen Nachweisgrenze.

Eine Beeinflussung der PABA-AT konnte durch keinen der per Fragebogen erfassten demographischen oder klinischen Parameter oder durch die Lagerungsbedingungen statistisch wahrscheinlich gemacht werden. Auffallend war jedoch, dass die beiden höchsten Aktivitäten bei Patienten zu finden waren, die aus Ungarn (4411 HA02) und der Tschechei (4411 HA03) stammten.

Eine Aktivität der INH-AT konnte bei keiner der Hautproben nachgewiesen werden. Die Chromatogramme der Hautproben unterschieden sich nicht von denen der Negativkontrollen. In Tab. 27 sind die Nachweisgrenzen der einzelnen Proben zusammengestellt.

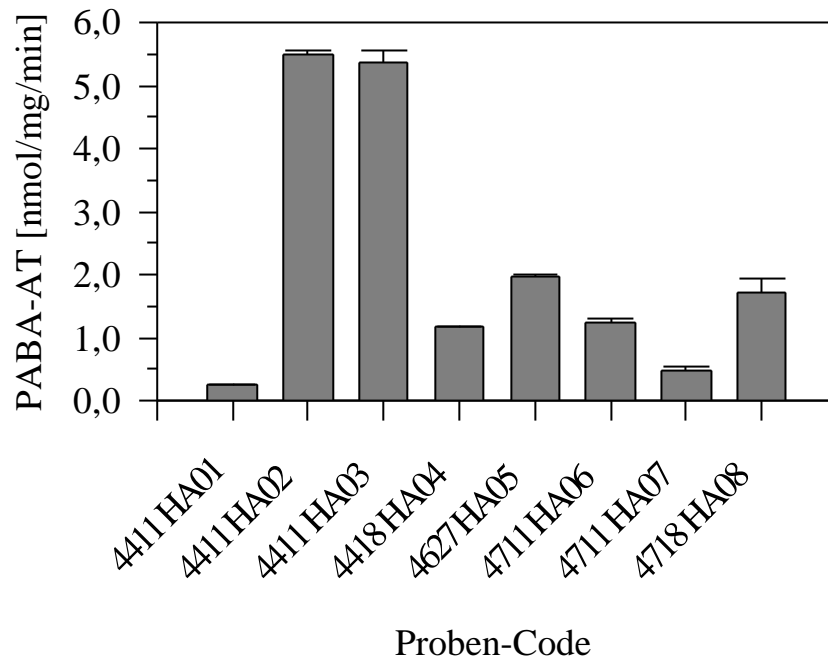


Abb. 26: PABA-AT-Enzymaktivitäten von Hautproben

Dargestellt ist der MW von dreifachen (Proben HA01 - HA04) bzw. zweifachen Ansätzen (HA05 - HA08) mit Standardabweichung bzw. Abweichung vom MW.

Tab. 27: Nachweisgrenzen der INH-AT in der Haut

Gewebeprobe Probe	spezifische Aktivität pmol/mg/min
4411 HA01	< 110
4411 HA02	< 110
4411 HA03	< 110
4418 HA04	< 25
4627 HA05	< 115
4711 HA06	< 20
4711 HA07	< 175
4718 HA08	< 55

Die Inkubationszeit betrug bei den ersten 4 Proben 30, ansonsten 60 Minuten. Bis auf Probe 4711 HA07 (n = 1) erfolgten Doppelbestimmungen

4.4.2 Niere und Harnleiter

Da Gewebeproben aus Niere und Harnleiter jeweils vom gleichen Patienten stammten, werden sie hier im Folgenden gemeinsam dargestellt.

PABA-AT war in allen Proben beider Gewebe mit hoher spezifischer Aktivität nachweisbar (Abb. 27). Die Nachweisgrenzen lagen bei spezifischen Aktivitäten von 30-55 pmol/mg/min. Bis auf die Probe 4B14 HL05 (1,5-fach über Nachweisgrenze) lagen alle nachgewiesenen Aktivitäten deutlich über der Nachweisgrenze.

Bei den Harnleiter- und Nierenproben zeigte sich bei der Korrelationsanalyse ein Zusammenhang der Aktivität der PABA-AT mit der Lagerungsdauer bei Raumtemperatur sowie mit dem Lebensalter (für beide: $r_s = 0,9$; $p = 0,037$; $n = 5$). Nur für die Harnleiterproben ergab sich darüber hinaus eine inverse Korrelation mit dem Proteingehalt im Serum ($r_s = - 1,0$; $p < 0,001$; $n = 4$). Es war ein Trend zur Korrelation der PABA-AT in Nieren- und Harnleiterproben des gleichen Patienten erkennbar, der jedoch eine Signifikanz nicht erreichte ($r = 0,8$; $p = 0,104$).

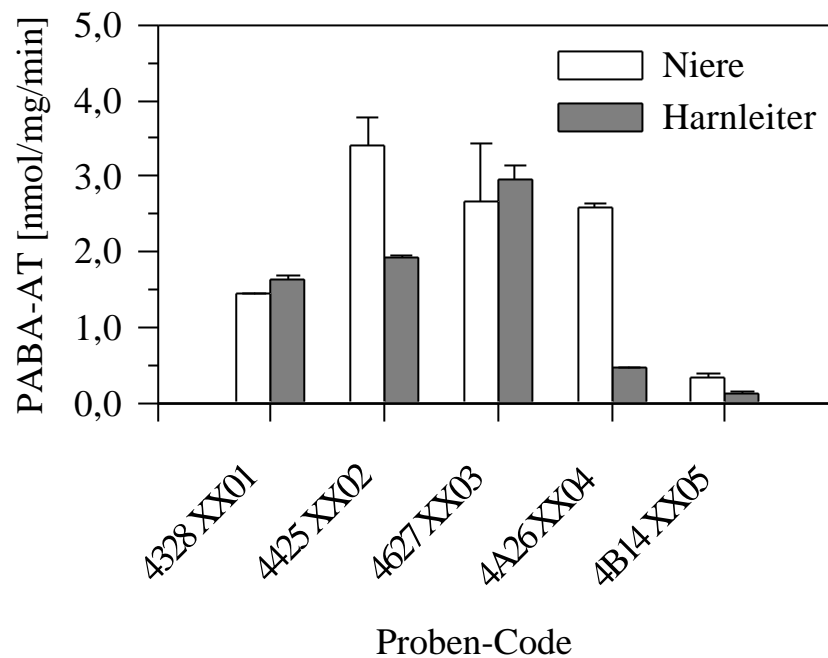


Abb. 27: PABA-AT-Enzymaktivitäten von Nieren- und Harnleiterproben

Nieren- (XX = NI) und Harnleiterproben (XX = HL) stammen vom gleichen Patienten. Dargestellt ist der MW mit Standardabweichung (n = 3, Proben 4425 NI02, 4A26 XX04 und 4B14 XX05) bzw. Abweichung vom MW (n = 2, Proben 4328 XX01, 4425 HL02 und 4627 XX03).

Die Nierenprobe Nr. 4425 NI02 wies die höchste spezifische Aktivität auf. Sie stammte von einem Patienten, der an Diabetes mellitus erkrankt war. Während der Operation befanden sich die Blutzuckerwerte im klinischen Normbereich. Nierenprobe Nr. 4627 NI03 wies eine hohe, Harnleiterprobe Nr. 4627 HL03 sogar die höchste spezifische Aktivität unter den Harnleiterproben auf: beide entstammten einem Patienten, der unter einer langfristigen Therapie mit Ranitidin 300 mg/die stand. Die Patienten der Proben 4A26 XX04 und 4B14 XX05 standen unter Langzeittherapie mit täglich 100 mg Acetylsalicylsäure. Gerade bei letzterem Patienten sind die niedrigen Aktivitäten sowohl in Niere als auch im Harnleiter auffällig, während bei Probe 4A26 HL04 nur im Harnleiter, nicht jedoch in der Niere eine niedrige Aktivität der PABA-AT nachweisbar ist.

Tab. 28: Nachweisgrenzen der INH-AT in Niere und Harnleiter

Nierenprobe Code	spezifische Aktivität pmol/mg/min	Harnleiterprobe Code	spezifische Aktivität pmol/mg/min
4328 NI01	< 20	4328 HL01	< 20
4425 NI02	< 5	4425 HL02	< 10
4627 NI03	< 5	4627 HL03	< 20
4A26 NI04	< 10	4A26 HL04	< 20
4B14 NI05	< 10	4B14 HL05	< 20

Die Nieren- und Harnleiterproben 4328 NI01, 4328 HL01, 4425 NI02, 4425 HL02, 4627 NI03 und 4627 HL03 wurden zweifach bestimmt, die restlichen Proben als Triplikate. Inkubiert wurde für 60 Minuten mit 0,4-2 mg Protein.

Die INH-AT lag in allen Nieren- und Harnleiterproben unter der Nachweisgrenze (Tab. 28). In den Gewebeproben menschlicher Nieren konnte jedoch regelmäßig ein minimaler, nicht mehr quantifizierbarer Ac-INH Peak gefunden werden als Hinweis auf eine unter der Nachweisbarkeit liegende Aktivität, möglicherweise der INH-AT. Dieser Peak fehlte in den Negativkontrollen. In den Harnleiterproben konnte dieses Phänomen gelegentlich ebenfalls beobachtet werden.

4.4.3 Harnblase

In allen untersuchten Harnblasenproben konnte die PABA-AT mit einer hohen spezifischen Aktivität nachgewiesen werden. Untersucht wurde freipräparierte Schleimhaut (Abb. 28). Die Nachweisgrenze lag bei spezifischen Aktivitäten von ca. 30 - 55 pmol/mg/min. Alle Aktivitäten liegen somit mindestens zehnfach über der Nachweisgrenze.

Bei der Korrelationsanalyse zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der PABA-AT und der Lagerungsdauer bei +4 °C ($r_s = 1,0$, $p < 0,001$). Bei einer Zusammenfassung der Daten von Harnleiter und Blase wurde dieser Zusammenhang schwächer und nichtsignifikant ($r_s = 0,7$; $p = 0,053$; $n = 9$). Die durchschnittliche Lagerungsdauer bei +4 °C betrug 380 Minuten für die Blasenproben und 360 Minuten für die Harnleiterproben. Auch bei gemeinsamer Betrachtung der Daten von Blase und Harnleiter blieb die für den Harnleiter gefundene Beziehung mit dem Lebensalter bestehen ($r_s = 0,7$; $p = 0,028$; $n = 9$). Die beiden Blasenproben, die von Patienten stammten, die an Diabetes mellitus litten, hatten höhere durchschnittliche Aktivitäten als die beiden weiteren Proben (1,7 vs. 0,9 nmol/mg/min).

Die Untersuchung der Blasenmukosa auf INH-AT Aktivitäten führte zu Ergebnissen, die den bei Niere und Harnleiter gefundenen entsprachen. Ein kleiner Peak war häufig erkennbar, ohne dass dieser so deutlich über dem Leerwert lag, dass es möglich gewesen wäre, ihn zu quantifizieren.

Die Nachweisgrenze lag bei allen Proben bei ca. 20 pmol/mg/min. Die Blasenproben Nr. 4418 BL01 und 4B17 BL04 wurden als Triplikate, die übrigen als Duplikate bestimmt. Inkubiert wurde für 60 Minuten (4418 BL01: 30 Minuten) mit Proteinmengen von 0,8 bis 1,4 mg pro Inkubationsansatz.

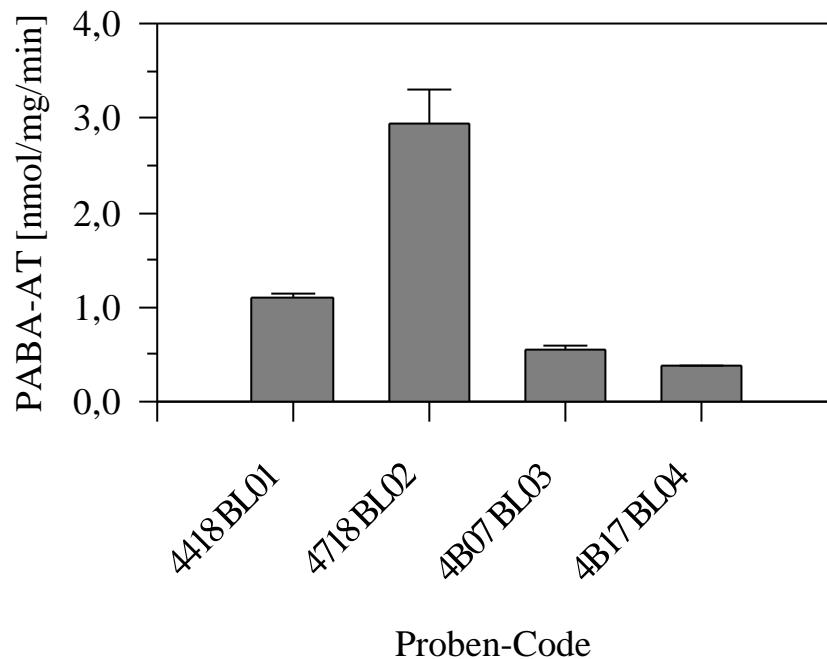


Abb. 28: PABA-AT-Enzymaktivitäten von Blasenproben

Die Werte wurden als Triplikate bestimmt. Dargestellt ist jeweils der MW \pm Standardabweichung. Bei Probe 4718 BL02 ist der MW einer Doppelbestimmung \pm Abweichung aufgetragen.

4.4.4 Prostata

Bei den zwei stichprobenartig untersuchten Prostataprobe konnten Aktivitäten der PABA-AT, jedoch keine der INH-AT nachgewiesen werden (Tab. 29). Aufgrund von Problemen beim Aufschluß der stark bindegewebig durchsetzten Proben wurde eine weitere Untersuchung von Prostatae als von im Gesamtzusammenhang untergeordneter Bedeutung wieder fallengelassen.

Tab. 29: Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Prostataprobe

Prostataprobe Code	PABA-AT nmol/mg/min	INH-AT pmol/mg/min
4408 PR01	3,6 ± 0,0	< 20
4408 PR02	1,9 ± 0,0	< 30

Die Aktivitäten der PABA-AT lagen deutlich über den Nachweisgrenzen von ca. 30 pmol/mg/min, INH-AT Aktivität waren nicht nachweisbar. Zur Bestimmung der PABA-AT wurde für 10 Minuten mit 0,2 mg cytosolischem Protein inkubiert und bei INH-AT mit 0,8 mg (4408 PR01) bzw. 0,6 mg Protein (4408 PR02) für 30 Minuten. Dargestellt sind MW von Duplikaten ± Abweichung bzw. MW ± Standardabweichung (4408 PR01; n=3).

4.4.5 Dünndarm, Kolon und Rektum

Die höchsten Werte, die im Verlauf dieser Studie jemals für PABA-AT gemessen werden konnten, stammen aus den Proben aus dem Darm. Die Aktivitäten sind in Abb. 29 dargestellt.

Die ungewöhnlich niedrige Aktivität der Probe 4425 CO02 gab Anlaß zur Vermutung, dass hier nicht mehr vitales Gewebe vorliegen könnte. Für die weitere Auswertung wurde diese Probe daher unberücksichtigt gelassen. Die Aktivität in der Darmschleimhaut ist interindividuell sehr variabel (Schwankungsbreite zwischen 3,8 und 14,8 nmol/mg/min); insgesamt jedoch immer und auf hohem Niveau exprimiert. Alle Aktivitäten lagen um mindestens eine Größenordnung über der Nachweisgrenze. Eine direkte Abhängigkeit zwischen dem anatomischen Darmabschnitt und der spezifischen Aktivität scheint, soweit aufgrund der geringen Fallzahlen beurteilbar, nicht zu bestehen, denn die Aktivität der PABA-AT in Kolonproben unterschied sich nicht signifikant von der in den Rektumproben ($p = 0,56$). Die Korrelationsanalyse ergab einen Hinweis auf eine mögliche statistische Abhängigkeit der PABA-AT vom Proteingehalt im Serum ($r_s = -0,7$; $p = 0,05$; $n = 8$). Bei Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt waren, war ein Trend zu höheren spezifischen Aktivitäten erkennbar (9,7 vs. 7,8 nmol/mg/min), ohne dass dies statistisch signifikant geworden wäre ($p = 0,88$).

In den Proben aus Dünndarm, Dickdarm und Mastdarm, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnte in jedem Fall auch Aktivität der INH-AT nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten schwankten interindividuell stark (Abb. 30). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 5 - 10 pmol/mg/min.

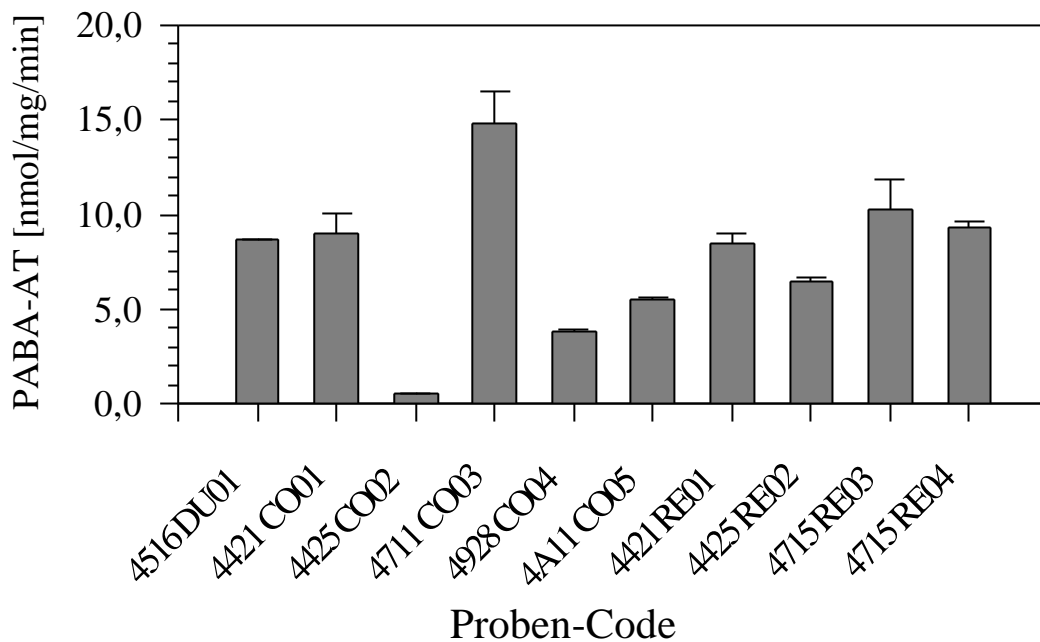


Abb. 29: PABA-AT-Enzymaktivitäten in Proben aus Dünn-, Dick- und Mastdarm

Dargestellt ist der MW ($n=3$) \pm Standardabweichung bzw. Abweichung vom MW ($n=2$, Proben 4425 CO02, 4711 CO03, 4715 RE03 und 4715 RE04).

Die untersuchten Kolonproben - auch hier wurde die Probe 4425 CO02 aus den vorstehend erwähnten Überlegungen in sämtliche Berechnungen nicht mit einbezogen - zeigten eine erhebliche Varianz ihrer spezifischen Aktivitäten (313 ± 126 pmol/mg/min, Spannbreite: 169 - 515 pmol/mg/min). Die INH-AT der Rektumproben wies eine geringere Schwankungsbreite bei einer niedrigeren durchschnittlichen Aktivität auf (94 ± 35 pmol/mg/min, Spannbreite: 58 - 140 pmol/mg/min). Die Aktivität der INH-AT im Kolon unterschied sich signifikant von der im Rektum gefundenen ($p = 0,02$), jedoch fanden sich unter den Proben aus dem Kolon drei schnelle Acetylierer, während alle vier Proben des Rektums von langsamen Acetylierern stammten (Kiefer *et al.*, persönliche Mitteilung).

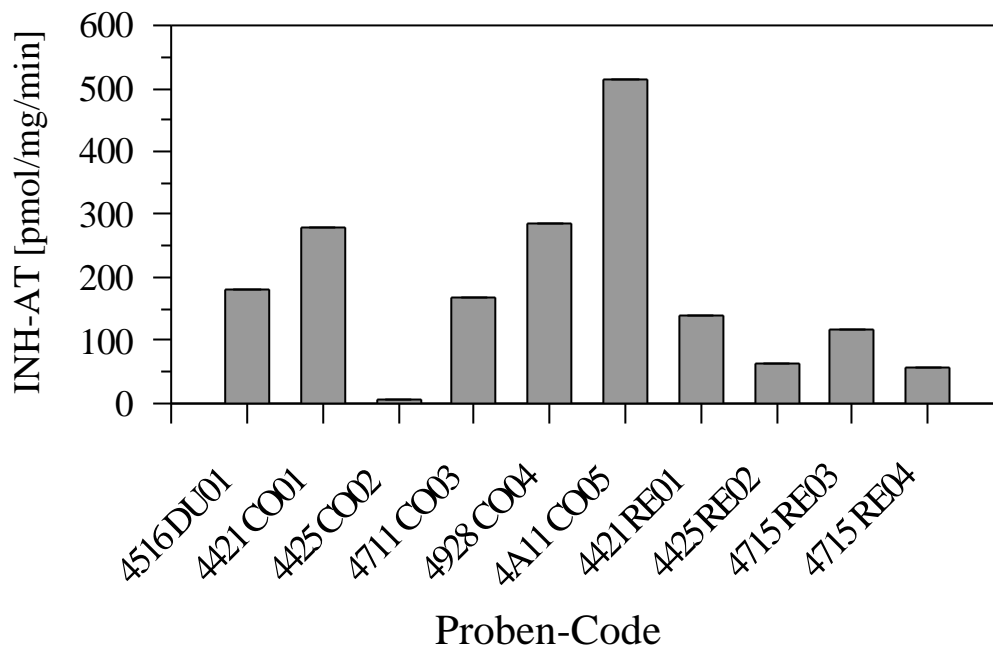


Abb. 30: INH-AT Enzymaktivitäten in Proben aus Dünn-, Dick- und Mastdarm

Die Werte sind als MW \pm Abweichung einer Doppelbestimmung bzw. MW \pm Standardabweichung ($n = 3$, Proben 4516 DU01, 4421 CO01, 4A11 CO05 und 4421 RE01) dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die eingesetzte Proteinmenge 0,8-2,0 mg / Ansatz.

Die Aktivität der Dünndarmprobe liegt in der Größenordnung derer der Kolonproben. Bei der weiteren statistischen Analyse ergab eine schwache Korrelation der INH-AT mit dem Lebensalter ($r_s = 0,7$; $p = 0,04$, $n = 9$). Bei Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt waren, konnten im Schnitt höhere spezifische Aktivitäten nachgewiesen werden (288 vs. 161 pmol/mg/min), ohne dass dies statistisch signifikant geworden wäre ($p = 0,30$).

Ein Vergleich der Aktivitäten von PABA-AT mit INH-AT der einzelnen Darmproben ließ keine Korrelation erkennen ($r_s = -0,5$; $p = 0,19$; $n = 9$, Abb. 31).

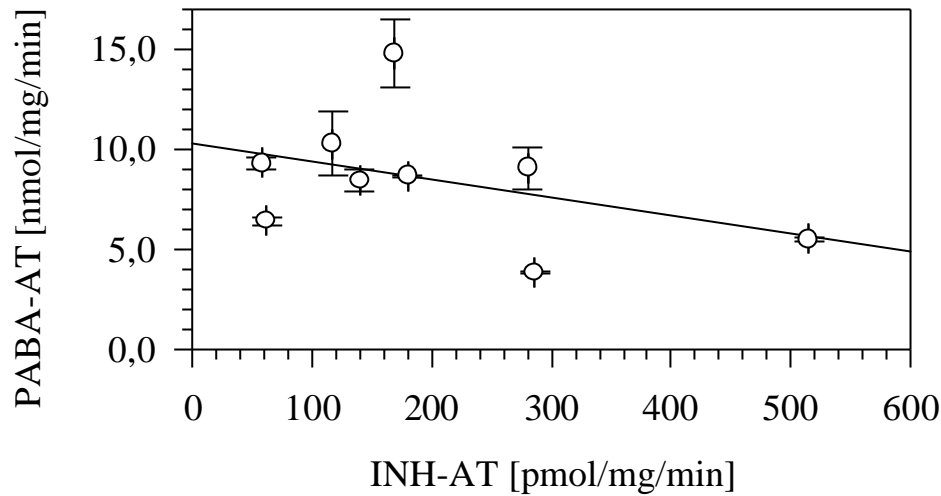


Abb. 31: Vergleich von INH-AT mit PABA-AT in Darmproben

Jeder Meßpunkt repräsentiert eine Gewebeprobe. Die Daten wurden aus den beiden vorherigen Abbildungen übernommen. Der Korrelationskoeffizient r_s beträgt $-0,5$ ($p = 0,19$).

4.4.6 Pankreas

Bei der Untersuchung von zwei Gewebeproben aus menschlicher Bauchspeicheldrüse war in beiden Proben PABA-AT nachweisbar. INH-AT-Aktivitäten wurden nicht gefunden (Tab. 30).

Tab. 30: Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Pankreasproben

Pankreasprobe Code	PABA-AT nmol/mg/min	INH-AT pmol/mg/min
4516 PA01	$0,9 \pm 0,4$	< 10
4928 PA02	$0,5 \pm 0,1$	< 15

Die Aktivitäten der PABA-AT lagen deutlich über den Nachweisgrenzen von ca. 60 pmol/mg/min, INH-AT Aktivität waren nicht nachweisbar. Zur Bestimmung der PABA-AT wurde für 10 Minuten mit 0,2 mg cytosolischem Protein inkubiert und bei INH-AT mit 0,75 mg bzw. 0,83 mg Protein für 60 Minuten. Dargestellt sind MW von 3 Ansätzen \pm Standardabweichung.

4.4.7 Leber

In zwei untersuchten Leberproben fanden sich jeweils deutliche Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT (Tab. 31).

Tab. 31: Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Leberproben

Leberprobe Code	PABA-AT nmol/mg/min	INH-AT pmol/mg/min
4425 LE01	2,8 ± 0,5	90 ± 11
4516 LE02	2,2 ± 0,2	190 ± 2

Die Aktivitäten lagen um den Faktor 2 - 86 über den Nachweisgrenzen. Die Inkubationsbedingungen für PABA-AT waren 10 Minuten mit 0,2 mg cytosolischem Protein und für INH-AT 2,0 mg für 60 Minuten (4425 LE01) bzw. und 0,2 mg Protein für 30 Minuten (4516 LE02). Dargestellt sind MW von Duplikaten ± Abweichung bzw. MW ± Standardabweichung (PABA-AT von 4425 LE01, n=3).

4.4.8 Lunge

Es konnte in allen 7 Lungenproben sowohl PABA-AT- als auch INH-AT Aktivität gefunden werden. Die Höhe der PABA-AT-Aktivität schwankte bei den 7 untersuchten Proben zwischen 0,4 und 2,3 nmol/mg/min und lag durchschnittlich bei $1,4 \pm 0,6$ nmol/mg/min. Die Einzelwerte sind Abb. 32 zu entnehmen.

Ein über mindestens 14 Tage appliziertes inhalatives Glucokortikoid zeigte keine Auswirkung auf die Aktivität der PABA-AT (Proben Nr. 4A05 LP02 und 4A12 LP04; $p = 0,22$). Das gleiche gilt für 300 mg Acetylsalicylsäure (4A12 LP04, $p = 0,86$).

Aktivitäten der INH-AT konnten in 6 der 7 Proben deutlich mit Aktivitäten, die mindestens um den Faktor 5 über der Nachweisgrenze lagen, nachgewiesen werden. Bei Probe Nr. 4A26 LP05, deren Aktivität das Doppelte der Nachweisgrenze betrug, konnte INH-AT zumindest grenzwertig nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten reichten von 11 bis 88 pmol/mg/min bei einem Mittelwert von 50 ± 22 pmol/mg/min. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Proben sind in Abb. 33 angegeben. Bei der statistischen Analyse fand sich kein Hinweis auf Störgrößen, auch nicht im Fall der Probe Nr. 4A12 LP04 mit der Einnahme von Acetylsalicylsäure ($p = 0,86$).

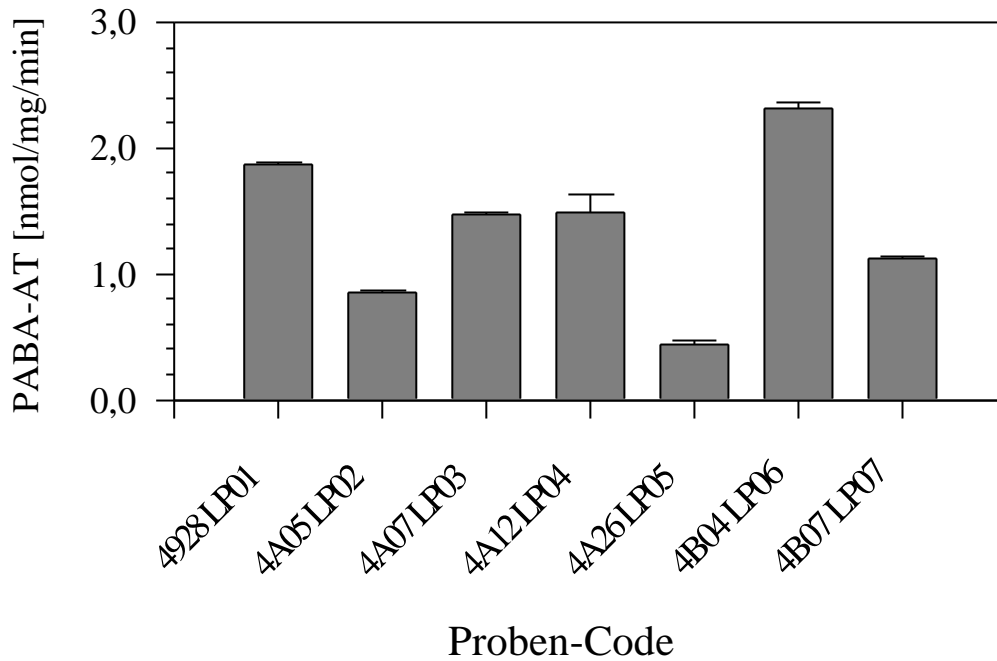


Abb. 32: PABA-AT-Enzymaktivitäten in Lungenproben

Die Werte stammen aus Dreifachbestimmungen (MW \pm Standardabweichung). Die Nachweisgrenze lag bei ca. bei 30-55 pmol/mg/min.

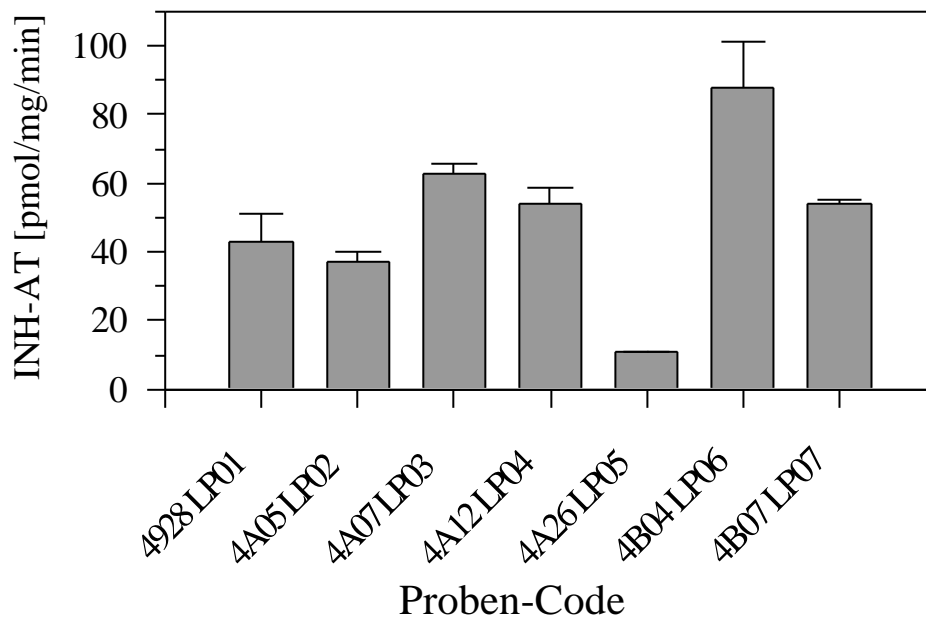


Abb. 33: INH-AT-Enzymaktivitäten in Lungenproben

Die Werte sind als MW \pm Standardabweichung (n=3) bzw. MW \pm Abweichung (n=2, Proben 4A26 LP05 und 4B07 LP07) dargestellt. Inkubiert wurde mit 1 - 2 mg Protein für 60 Minuten.

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Expression von PABA-AT und INH-AT zu überprüfen, wurden die beiden Aktivitäten der jeweiligen Gewebeprobe miteinander verglichen (Abb. 34). Es ergab sich eine Korrelation, die jedoch eine Signifikanz knapp verfehlte ($r_s = 0,75$; $p = 0,05$; $n = 7$). Bei einer abschließenden statistischen Analyse für alle Gewebe gemeinsam konnten über die bisher erwähnten Ergebnisse hinaus keine weiteren Korrelationen von Störgrößen oder Variabilitätsfaktoren mit der spezifischen Aktivität der PABA-AT oder der INH-AT gefunden werden.

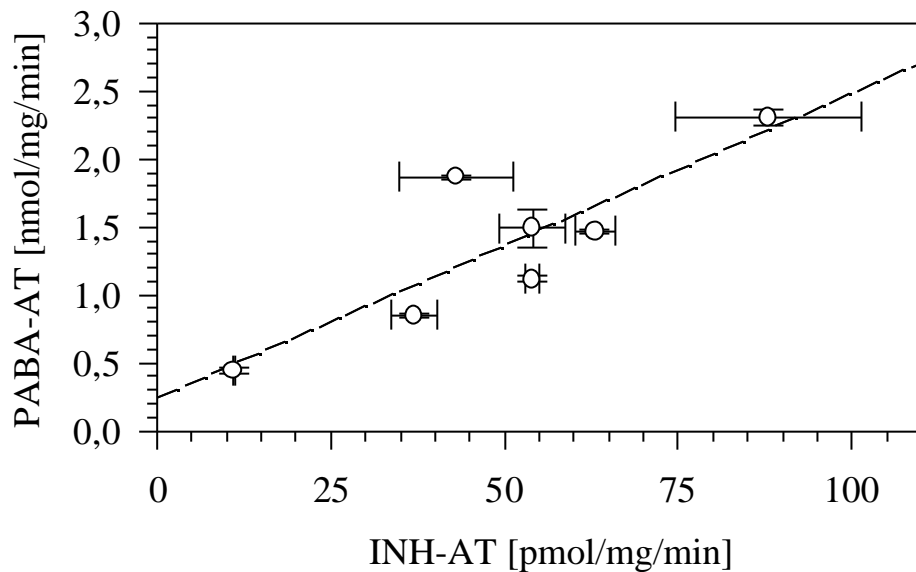


Abb. 34: Vergleich von PABA-AT und INH-AT in Lungenproben.

Jeder Meßpunkt repräsentiert eine Gewebeprobe. Die Werte wurden den beiden vorhergehenden Abbildungen entnommen und stellen $MW \pm$ Standardabweichung dar. Der Korrelationskoeffizient r_s beträgt 0,75.

5 Diskussion

Bei der Untersuchung verschiedener menschlicher Gewebearten auf AT konnte in allen Geweben PABA-AT und in hepatischen, intestinalen und pulmonalen Geweben auch INH-AT nachgewiesen werden. Im folgenden soll nun zuerst endogenen und exogenen Störeinflüssen oder anderen Faktoren nachgegangen werden, die zur Variabilität der Aktivitäten beitragen können. Weiterhin wird auf die Rahmenbedingungen des Assays eingegangen und die eigenen Ergebnisse in Bezug zu Daten der Literatur gesetzt.

5.1 Störeinflüsse und Variabilitätsfaktoren

Unterschiedliche exogene und endogene Faktoren können AT-Aktivitäten beeinflussen. Im folgenden wird versucht, einen möglichen Einfluß von Störgrößen oder zur Variabilität der AT beitragenden Faktoren abzuschätzen.

5.1.1 Blut

Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über PABA-AT in menschlichem Vollblut, Erythrozyten und Leukozyten (Drayer *et al.* 1974, S. 503; Mandelbaum-Shavit und Blondheim 1981, S. 66ff.; McQueen und Weber 1980, S. 897; Ward *et al.* 1992, S. 1100f.). Dagegen sind INH-AT-Aktivitäten in Blutbestandteilen nicht oder allenfalls geringgradig nachweisbar und in keinem Fall mit dem Phänotyp korreliert (Drayer *et al.* 1974, S. 501; Irshaid *et al.* 1993, S. 21). Blutplasma besitzt keine AT-Aktivität (Irshaid *et al.* 1993, S. 21; Baty *et al.* 1986, S. 336).

Um den Einfluß des „Fremdgewebes Blut“ bei der Bestimmung der Gewebeaktivitäten gering zu halten, wurde durch mehrere Waschschrte versucht, die Gewebeprobe weitgehend von Blutbestandteilen zu befreien. Weiterhin wurden hämatologische Laborparameter (Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, Hämatokrit) auf eine Korrelation mit den AT-Aktivitäten analysiert. Aufgrund der Schwankungsbreite der PABA-AT im Blut (vgl. Cribb *et al.* 1991, S. 1243) ist über die Korrelationsanalyse allerdings nur ein Hinweis bei Vorliegen massiver Störgrößen zu erwarten.

Aus Daten von CRIBB *et al.* 1991 (S. 1244) und MANDELBAUM-SHAVIT und BLONDHEIM 1981 (S. 67ff.) konnte eine PABA-AT von ca. 10 - 12 nmol/min/ml Vollblut abgeschätzt werden. Daten an-

derer Autoren führten jedoch zu fragwürdigen Ergebnissen, wie z.B. ca. 180 nmol/min/ml Vollblut (Ward *et al.* 1992, S. 1103).

Da die Größe der Gewebeproben in dieser Studie gewöhnlich unter einem Volumen von 0,5 ml lag und ein Teil des Blutes mit der Waschlösung verworfen wurde, gingen wir davon aus, dass nur wenige Mikroliter Blut in den Proben verblieben waren. Dies entspräche einem Beitrag von weniger als 0,1 nmol/min/mg, so dass eine signifikante Erhöhung der Gewebeaktivitäten durch PABA-AT aus dem Blut nicht anzunehmen ist.

Methodische Überlegungen ließen es als möglich erscheinen, dass die im Blut enthaltenen Eiweißanteile (Gesamtprotein im Serum, Hämoglobin) zu einer Erhöhung des Proteingehaltes des Cytosols führen könnten mit der Folge der Berechnung einer fälschlich zu niedrigen spezifischen AT-Aktivität. Daher wurden diese Parameter auf eine Korrelation mit den AT-Aktivitäten untersucht. Eine generelle Tendenz konnte nicht gefunden werden, obgleich die Harnleiterproben eine grenzwertige Korrelation zeigten. Auch, wenn diese Gewebeproben aufgrund der geringen Probengröße und des geringen Proteingehalts des Cytosols als besonders störanfällig angesehen werden müssen, ist der Zusammenhang doch eher als Zufallsbefund zu werten.

5.1.2 Geschlecht

Das Geschlecht trug den eigenen Daten zufolge nicht zur Variabilität von PABA-AT oder INH-AT bei. Ein sogarteter Beitrag des Geschlechts zur Variabilität der AT-Aktivitäten wurde unseres Wissens bislang beim Menschen nicht gezielt untersucht. Allerdings erscheinen schnelle und langsame Acetylierer zwischen beiden Geschlechtern gleich verteilt (Cartwright *et al.* 1982, S. 843; Philip *et al.* 1987, S. 710; Korrapati *et al.* 1997, S. 83ff.). Aus Daten anderer Autoren lassen sich dem widersprechende Hinweise weder für PABA-AT (Pacifci *et al.* 1986, S. 289; Weber und Vatsis 1993, S. 209) noch für INH-AT (Ilett *et al.* 1994, S. 915) in menschlichen Geweben ableiten.

In Versuchen mit Mäusen jedoch wurde ein Zusammenhang der PABA-AT mit dem Geschlecht und dem Alter nachgewiesen. Die endogene Testosteronproduktion männlicher Mäuse scheint PABA-AT in den Nieren, nicht jedoch in der Leber zu induzieren (Smolen *et al.* 1993, S. 855f.). Eigene Daten und die Datenlage der Literatur legen nahe, dass es sich um ein nicht auf den Menschen übertragbares Phänomen handelt.

5.1.3 Alter

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Ausnahme der Nieren- und Harnleiterproben (PABA-AT) und der Darmproben (INH-AT) keine Beziehung zwischen AT-Aktivitäten mit dem Patientenalter festgestellt werden. Eine Abhängigkeit der PABA-AT vom Alter wurde auch in der Literatur nicht gefunden (Pacifci *et al.* 1986, S. 286ff.; Pacifci *et al.* 1988, S. 852). In Diskussion ist jedoch die Tatsache, dass mit zunehmendem Alter auch der Anteil langsamer Acetylierer in der Bevölkerung anzusteigen scheint. Es könnte daher sowohl von einer Abnahme der Aktivität der INH-AT mit zunehmender Alterung ausgegangen werden als auch von einer durchschnittlich kürzeren Lebendauer schneller Acetylierer (Ilett *et al.* 1987, S. 1468f.; Evans 1989, S. 170ff.). Anderen Studien zufolge besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Verteilung von schnellen oder langsamen Acetylierern (Cartwright *et al.* 1982, S. 843; Philip *et al.* 1987, S. 710; Agundez *et al.* 1997, S. 147ff.). Jedoch wurde eine Erhöhung der AT-Aktivität im Alter nie nachhaltig diskutiert, so dass die gefundenen Zusammenhänge mit hoher Wahrscheinlichkeit als zufallsbedingt zu werten sind.

5.1.4 Einfluß von Glukose

In mehreren Untersuchungen fanden sich Hinweise darauf, dass eine erhöhte Glukosekonzentration *in vitro* oder *in vivo* zu einer vermehrten Acetylierung von Substraten der PABA-AT wie 5-Aminosalizylsäure (Ireland *et al.* 1990, S. 107), Anillin (Lindsay *et al.* 1991, S. 1673) oder PABA (Subrahmanyam *et al.* 1961, S. 139) führen kann. So bewirkte die Koinkubation von radioaktiv markierter Glukose mit SMZ die Entstehung von radioaktiv markiertem AcSMZ, mutmaßlich über eine Metabolisierung zu AcCoA (Lindsay und Baty 1989, S. 1989). Dabei könnten die lange Inkubationszeit von 24 Stunden und die geringe spezifischen Aktivität für eine Acetylierung durch im Blut vorhandene PABA-AT sprechen.

Erhöhte AcCoA-Konzentrationen fördern die (nichtenzymatische) Acetylierung verschiedener Substrate der AT (Minchin *et al.* 1992, S. 842). Ein bei Ratten experimentell induzierter Diabetes mellitus führte zu erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut und einer signifikant erhöhten Acetylierung von SMZ (Lindsay und Baty 1990, S. 1195). Auch unter diabetischen Patienten wurde eine vermehrte Acetylierung durch den erhöhten Glukosespiegel diskutiert, obschon dies ein sehr schwacher Zusammenhang zu sein scheint (Burrows *et al.* 1978, S. 208f.; Evans 1984, S. 246ff.; Evans 1989, S. 214). Die bei unphysiologisch hohen Glukosekonzentrationen deutlich erkennbare Steigerung der Acetylierung (Lindsay

et al. 1991, S. 1673; Subrahmanyam *et al.* 1961, S. 139) ließ sich unter physiologischen Bedingungen nicht mehr nachweisen (Mekonnen *et al.* 1994, Nr.7).

Zusammenfassend läßt sich abschätzen, dass bei den im Rahmen eines Diabetes mellitus erreichbaren Blutzuckerspiegeln und den in der vorliegenden Arbeit benutzten Inkubationszeiten von maximal 90 Minuten davon ausgegangen werden kann, dass eine signifikante Beeinflussung nicht erfolgt ist. Die bei Nierenprobe Nr. 4425 NI02 gefundene höchste spezifische Aktivität unter den Nierenproben muß derzeit als Zufallsbefund gewertet werden. Der während der Operation im Normbereich befindliche Blutzuckerwert sowie die im Vergleich zu den weiteren Proben im Mittelfeld liegende PABA-AT der Harnleiterprobe des gleichen Patienten bestärken diese Annahme. Der sich bei den Darmproben wiederholende Trend, obwohl nicht signifikant, dass Diabetiker höhere PABA-AT und INH-AT Aktivitäten aufwiesen, sollte jedoch Anlaß zu weitergehenden Untersuchungen sein. Möglicherweise spielen insulininduzierte metabolische Veränderungen eine Rolle, die auch die Expression von AT betreffen könnten.

5.1.5 Glucokortikoide

Eine hochdosierte Hydrokortisontherapie über 10 Tage induziert beim Kaninchen für die Dauer der Behandlung INH-AT (duSouich und Courteau 1981, S. 281ff.). Eine Induktion fand sich nur in der Leber, während AT in Duodenum (INH-AT), Lunge oder Niere (PABA-AT) nicht beeinflusst wurden. Die Aktivität bezogen auf die Proteinmenge bleibt dabei jedoch konstant (Reeves *et al.* 1988, S. 113). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, die in der Lunge keine Beeinflussung beider AT durch eine längerfristige Medikation mit Glucokortikoidaerosolen nachweisen konnten.

5.1.6 H₂-Rezeptor Antagonisten

H₂-Rezeptor Antagonisten sollen einzelnen Berichten zufolge einerseits *in vitro* inhibierend (Svensson und Tomilo 1992, S. 75), andererseits bei geringen Dosen *in vivo* induzierend auf INH-AT der Rattenleber wirken (56, Nr. 15). Eine Wirkung auf die PABA-AT wurde nicht beschrieben.

Nierenprobe Nr. 4627 NI03 wies eine hohe, Harnleiterprobe Nr. 4627 HL03 sogar die höchste spezifische Aktivität unter den Harnleiterproben auf. Beide entstammten einem Patienten (AA88), der unter einer langfristigen Therapie mit einem H₂-Antagonisten stand (Ranitidin, 300 mg/die). Diese Einzelbeobachtung könnte einen Hinweis auf eine induzierende Wirkung darstellen. Sie widerspricht jedoch, eben-

so wie die Aktivität der Lungenprobe 4928 LP01, die eine durchschnittliche INH-AT Aktivität aufwies, der Hypothese einer inhibierenden Wirkung. Anscheinend sind die therapeutisch erzielbaren Konzentrationen zu gering, um eine deutliche Hemmung zu bewirken.

5.1.7 Sonstige Medikamente

Patient HP82, von dem die Prostataprobe 4408 PR02 stammt, erhielt während der Operation 1.600 mg Sulfamethoxazol intravenös infundiert. Sulfamethoxazol ist Substrat sowohl der menschlichen PABA-AT als auch der INH-AT mit K_m -Werten von 1,2 bzw. 5 - 15 mM. PABA in einer Konzentration von 100 μ M hemmt die Acetylierung von bis zu 4 mM Sulfamethoxazol durch PABA-AT vollständig, so dass bei der Bestimmung der Aktivität der PABA-AT eine Beeinflussung durch evtl. im Cytosol enthaltenes Sulfamethoxazol ausgeschlossen erscheint. Eine Beeinflussung der INH-AT ist bei therapeutischen Serumspiegeln von Sulfamethoxazol in der Größenordnung von 0,4 - 0,6 mM von noch geringerer Wahrscheinlichkeit (Cribb *et al.* 1993, S. 1279f.).

In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Acetylsalicylsäure menschliche PABA-AT inhibiert (Yeh *et al.* 1999, S. 389ff.). Drei Patienten, von denen jeweils zwei Harnleiter- und Nierenproben sowie eine Lungenprobe stammten, nahmen 100-300 mg Acetylsalicylsäure täglich ein. In drei der fünf Proben zeigte sich eine unerwartet niedrige Aktivität der PABA-AT. Auch wenn die zu erwartenden Serumspiegel bei diesen geringen Dosen eine Hemmung der AT unwahrscheinlich machen, sollte in zukünftigen Studien auf eine Medikation mit nichtsteroidalen Antirheumatika wie Acetylsalicylsäure, Ibuprofen (Chung *et al.* 1999, S. 1ff.) oder Paracetamol (Rothen *et al.* 1998, S. 553ff.) geachtet und möglichen Störeinflüssen *in vivo* weiter nachgegangen werden.

Weitere Medikamente, die Substrate der AT (vgl. S. 9ff.) oder mit diesen strukturverwandt sind, wurden von den Patienten nicht eingenommen. Auch andere Arzneimittel, die aufgrund von Literaturberichten Interaktionen hätten befürchten lassen müssen, waren nicht mediziert worden. Insbesondere wurden keine Vitaminpräparate mit inhibierend hohen Dosen an Vitamin C eingenommen (Wu und Chung, 1998, S. 3481ff.) und waren keine Immunstimulantien verschrieben, die zu einer Induktion von AT hätten führen können (Reeves *et al.* 1988, S. 110).

5.1.8 Deacetylase-Aktivität

Die Acetylierung von Arylaminen steht im Gleichgewicht mit der Deacetylierung durch Deacetylasen (Evans 1989, S. 189; Lindsay *et al.* 1991, S. 1673; Hirvonen 1998, S. 260), die in vielen Geweben verschiedener Tierspezies und des Menschen vorhanden und überwiegend mikrosomal lokalisiert sind (Glowinski *et al.* 1983, S. 69; Hein 1988, S. 44). Deacetylasen der menschlichen Leber setzen bevorzugt hydrophobe Substrate um. Dabei werden acetylierte Derivate von 2-AF oder IQ mit deutlicher Aktivität (Land *et al.* 1989, S. 729; Probst *et al.* 1992, S. 1715), die acetylierten Formen von PABA, p-Aminosalizylsäure, SMZ oder Procainamid jedoch nicht deacetyliert (Probst *et al.* 1991, S. 455; Ward *et al.* 1992, S. 1100). Die Annahme liegt nahe, dass INH diesen Substraten hinsichtlich seiner hydrophoben Eigenschaften ähnlich ist.

Nach der Acetylierung hydrophober Substrate werden beim Menschen 5 - 10% der Produkte wieder deacetyliert (Lindsay *et al.* 1991, S. 1675; Frederickson *et al.* 1994, S. 29). Die gleiche Größenordnung wurde in Hamsterkolon gefunden (Hein *et al.* 1993a, S. 512). Wahrscheinlich verringert die vorsichtige Abtrennung membrangebundener Bestandteile vom Cytosol, wie dies beim S10-Zentrifugationsschritt erfolgt diese Deacetylierungsrate. Zusammen mit der Substratspezifität der Deacetylasen kann davon ausgegangen werden, dass auch ohne eine Hemmung der mikrosomalen Deacetylasen durch Paraoxon, wie dies häufig in Studien praktiziert wird (z.B. Land *et al.* 1989, S. 729) eine mögliche Reduzierung der gemessenen AT-Aktivitäten allenfalls ein vernachlässigbar geringes Ausmaß hatte.

5.2 Stabilität der AT

Das Spannungsfeld zwischen einem praktikablem Vorgehen und der wünschenswerten Bestimmung der aktuellen Aktivitäten, d.h. der sofortigen Aufarbeitung der Proben muß zu Kompromissen führen. Ersteres bedingt meist die Lagerung von Proben über einige Wochen bei -70 oder -180 °C. In der vorliegenden Arbeit war von Interesse, unter welchen Bedingungen der Lagerung die Zeitspanne zwischen der Probenentnahme im Operationssaal und der Versuchsdurchführung im Labor mit dem geringsten Verlust der Enzymaktivität überbrückt werden kann. Eine Inkubation zwei Stunden nach der Probenentnahme war der - im Rahmen der Vorversuche im Labor - technisch frühestmögliche Zeitpunkt. Bei den menschlichen Proben betragen die Lagerungszeiten aus logistischen Gründen mindestens etwa 4 Stunden. Im Extremfall ergaben sich Lagerungszeiten von bis zu 10 - 12 Stunden.

5.2.1 Stabilität bei Raum- und Körpertemperatur

Die Halbwertszeit für die Inaktivierung von menschlicher PABA-AT bei +37 °C schwankt in verschiedenen Studien zwischen 11 Minuten (Hein *et al.* 1981, S. 207) und 3,5 Stunden (Grant *et al.* 1991, S. 186). Eine ältere Studie gibt an, in Leberproben einer Autopsieserie bis zu 2,5 Stunden *post mortem* AT-Aktivitäten von mehr als 70% frisch untersuchter Gewebe gefunden zu haben. Mehr als 3 Stunden *post mortem* war jedoch keine PABA-AT mehr nachweisbar (Glowinski *et al.* 1978, S. 943). Für die Stabilität von AT2, bestimmt als SMZ-AT, gehen die Angaben über die Inaktivierungshalbwertszeiten noch weiter auseinander und liegen zwischen 36 Minuten und 61 Stunden (Hein *et al.* 1981, S. 207; Grant *et al.* 1990, S. 970; Grant *et al.* 1991, S. 63; Blum *et al.* 1991, S. 5240; Ferguson *et al.* 1994b, S. 373). Jedoch ist übereinstimmend SMZ-AT erheblich stabiler als PABA-AT. Es wurde daher vorgeschlagen, eine nachweisbare PABA-AT als Kriterium für die Vitalität von Gewebeproben heranzuziehen (Hein *et al.* 1981, S. 208). Bei einer einzelnen Leberprobe wurde auch die Inaktivierungshalbwertszeit bei 15 °C untersucht. Mit 214 Minuten für die PABA-AT und über 35 Stunden für die SMZ-AT waren beide Aktivitäten bei dieser Temperatur erheblich stabiler (Hein *et al.* 1981, S. 207f.).

Bereits 1975 äußerten sich Autoren einer Studie dahingehend, dass Proben, die bei chirurgischen Eingriffen entnommen wurden, die Aktivitäten besser wiederzugeben scheinen, als Proben die im Rahmen von Autopsien entnommen wurden (King *et al.* 1975, S. 285). Im Lichte der angeführten Literaturberichte und der eigenen Daten ist dem wohl vorbehaltlos zuzustimmen. Die Lagerung von Proben bei Raumtemperatur für maximal 1 Stunde, wie es in dieser Arbeit in den Operationssälen oft schwer vermeidbar war, erscheint dagegen in Bezug auf die AT-Aktivitäten unwesentlich.

5.2.2 Einfrieren

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass ein Einfrieren von Rattenleberproben bei -80 °C bzw. -180 °C zu drastischen Aktivitätsverlusten führte. Hierbei war PABA-AT erheblich stärker betroffen als INH-AT. Lagerung von bis zu 1 Woche in Tiefkühlung führte zu keinen weiteren eindeutigen Aktivitätsverlusten. Diesen Ergebnissen widerspricht der Bericht, dass eine Cytosolpräparation aus menschlichen Leukozyten bei einer Lagerungsdauer von bis zu 18 Tagen bei -20 °C kaum an Aktivität verlor und bei einer Lagerungsdauer von 21 bis 72 Tagen immer noch durchschnittlich 60% der Anfangsaktivität aufwies (McQueen und Weber 1980, S. 895f.).

Allerdings machen andere Literaturberichte deutlich, dass Einfrieren auch bei menschlichen AT zu erheblichen Aktivitätsverlusten führt. LAND *et al.* zeigte, dass durch Einfrieren die Acetylierung von PABA-AT und 2-AF auf 60 bis unter 10% der Ausgangsaktivität sank (Land *et al.* 1989, S. 729). Das Einfrieren von Cytosol einer Zellkultur menschlicher Urothelzellen führte zu einer Reduktion der Acetylierung von 4-ABP um eine ganze Größenordnung (Frederickson *et al.* 1994, S. 30). Cytosole frisch gewonnener menschlicher Leberproben zeigten keine Korrelation der Acetylierung von SMZ und 2-AF, das Substrat beider AT ist ($r = -0,12$). Nach Einfrieren und Wiederauftauen korrelierten die beiden Aktivitäten stark ($r = 0,95$), so dass anzunehmen ist, dass PABA-AT durch das Einfrieren nahezu vollständig inaktiviert wurde (Grant *et al.* 1991, S. 186).

5.2.3 Lagerung bei +4 °C

Die Ergebnisse der Vorversuche an der Rattenleber haben gezeigt, dass eine Lagerung bei +4 °C über einen Zeitraum von 10 - 12 Stunden zu keiner bedeutsamen Reduktion der Aktivität führt. Menschliches Lebercytosol scheint zumindest über 5 Stunden keine Aktivitätseinbußen aufzuweisen (Hein *et al.* 1981, S. 206). Somit scheint eine Lagerung der frisch entnommenen Gewebeproben bei +4 °C bis zur Inkubation die für die AT schonendste Behandlung darzustellen.

Mit der Korrelationsanalyse konnten keine Hinweise für eine Beeinträchtigung der INH-AT durch die Lagerungsdauer gefunden werden. Für die PABA-AT hatte sich bei den Harnleiter- und Nierenproben ein Zusammenhang mit der Lagerung bei Raumtemperatur gezeigt und bei den Blasenproben mit der Lagerung bei +4 °C. Eine Zunahme der Aktivität bei marginal längerer Lagerungsdauer legt jedoch die Annahme eines Artefaktes nahe, dies um so mehr, als mit dieser Methodik nur gravierende Einflüsse zu erfassen sind.

In Vorversuchen zeigte sich ein Anstieg der spezifischen Aktivität für beide AT mit einem Gipfel bei ca. 6 - 8 Stunden Lagerung unter +4 °C. Dieser war bei der INH-AT mit einer Zunahme um fast 50% stärker ausgeprägt als bei PABA-AT mit ca. 25%, wobei jedoch die Tendenz gleichläufig ist. Beide AT-Aktivitäten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten aus dem gleichen Gewebestück bestimmt. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden, auch wurde das Experiment nicht wiederholt. Denkbar wäre jedoch ein Konzentrationsabfall eines endogenen Inhibitors durch Diffusion oder Metabolisierung.

5.3 Fehlerabschätzung

5.3.1 Inkubationszeit

Vorversuche ergaben, dass die Acetylierung von INH sowohl durch AT aus der Rattenleber, als auch aus menschlichen Geweben für etwa 20 - 30 Minuten linear zur Inkubationszeit ansteigt um dann einer Sättigung zuzustreben. Zugunsten einer höheren Sensitivität für den Nachweis der INH-AT wurde eine Inkubationsdauer von 60 Minuten gewählt. Dabei wurde der durch eine Messung außerhalb des linearen Bereichs bei der Berechnung der spezifischen Aktivität entstehende Fehler in Kauf genommen.

In Anbetracht der Tatsache, dass der Kurvenverlauf bei Einsatz von menschlichem oder Rattenlebercytosol sehr ähnlich ist, die Umsatzraten bei der Rattenleber jedoch erheblich höher lagen (vgl. Abb. 21 und Abb. 22), ist es zumindest bei den menschlichen Gewebeproben unwahrscheinlich, dass eine Substraterschöpfung oder eine Produkthemmung die Ursachen der Sättigungskinetik darstellen. Vielmehr ist eine zunehmende thermische Inaktivierung anzunehmen (vgl. Hein *et al.* 1981, S. 207).

Retrospektiv kann vermutet werden, dass die INH-AT der meisten Lungenproben bei einer kürzeren Inkubationszeit unter der Nachweisgrenzen gelegen hätte und somit unentdeckt geblieben wäre. Die Aktivität der Darmproben hingegen wurde demzufolge in den meisten Fällen um etwa 20 - 30% unterschätzt. Anbetracht der allgemeinen Schwankungsbreite erscheint dieser Fehler jedoch vertretbar.

5.3.2 Cytosolbereitung

Die bei Untersuchungen anderer am häufigsten angewandte Methode der Cytosolbereitung umfaßt eine Zentrifugation des Gewebehomogenats von 10 - 20 Minuten bei 10.000 x g, dem sich ein weiterer Zentrifugationsschritt von 60 Minuten bei 100 000 x g oder 105 000 x g anschließt (z.B. Glowinski *et al.* 1978, S. 943; Ilett *et al.* 1994, S. 915; sog. S100-Protokoll). Diese Methode hat den Nachteil, dass die Lagerungsdauer bis zu Inkubation um 60 Minuten länger ist. Allerdings werden dabei die membrangebundenen Zellbestandteile wie z.B. Mikrosomen vollständig abgetrennt. Im Gegenzug hat das von uns eingesetzte Verfahren, das auf den zweiten Zentrifugationsschritt verzichtet (sog. S10-Protokoll), den Vorteil einer kürzeren Lagerungsdauer. Neben einer möglicherweise hier noch restweise vorhandenen mikrosomalen Deacetylase-Aktivität muß vor allem die nicht mehr gegebene direkte Vergleichbarkeit mit Literaturangaben als Nachteil gesehen werden. Um dem zu begegnen wurden verglei-

chende Abschätzungen vorgenommen. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß, dass AT bei Anwendung des S100-Protokolls stärker angereichert werden und so zu höheren spezifischen Aktivitäten führen. Dieser Effekt war bei PABA-AT stark, und bei INH-AT hingegen nur sehr mäßig ausgeprägt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für die Bestimmung der INH-AT die Wahl der Cytosolbereitung von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Für die Bestimmung der PABA-AT könnte bei kurzen vorangegangenen Lagerungszeiten das S100-Protokoll, bei längeren Lagerungsdauern das S10-Protokoll vorteilhafter sein.

5.4 Verteilung von AT-Aktivitäten beim Menschen

5.4.1 Haut

Cytosolpräparationen aus menschlicher Haut zeigten eine deutliche Aktivität von PABA-AT, während keine INH-AT nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der bei den Hautproben besonders geringen Probengröße und dem hohen Faseranteil des Gewebes konnten nur geringe Proteinmengen im Assay eingesetzt werden. Dies führte zu erheblich höheren Nachweisgrenzen für INH-AT, als dies bei anderen Geweben der Fall war. Es ist daher nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass eine geringe Aktivität der INH-AT vorhanden ist.

In Untersuchungen an menschlichen Hautproben wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine PABA-AT von $6,9 \pm 4$ nmol/mg/min nachgewiesen (Kawakubo *et al.* 1990, S. 182). Die verwendete Nachweismethode stimmt mit der unserigen weitestgehend überein. Ein Unterschied ergibt sich lediglich in der Cytosolbereitung. Die Autoren verwendeten einen Zentrifugationsschritt von 60 Minuten bei $105.000 \times g$, während es in unserer Studie nur 15 Minuten bei $10.000 \times g$ waren (Kawakubo *et al.* 1990, S. 181). Ersteres führt unseren Ergebnissen zufolge zu etwa 40% höheren Aktivitäten der PABA-AT. Dies erklärt jedoch nicht, warum die publizierten Aktivitäten um den Faktor 2- 3 über den von uns gefundenen Werten liegen. Anbetracht der in beiden Studien gleichermaßen zu beobachtenden großen Variabilität ist es denkbar, dass eine zufällige, unterschiedliche Probenselektion die Ursache hierfür darstellt.

5.4.2 Niere

Wir fanden in menschlichem Nierengewebe, das vorwiegend der Nierenrinde entstammte, mittlere Aktivitäten der PABA-AT von $2,1 \pm 1,1$ nmol/mg/min. Die Werte schwankten um das 11-fache (0,3 bis 3,4 nmol/mg/min). INH-AT konnte in keiner Probe entdeckt werden.

Bei im Rahmen von Autopsien 6 - 18 Stunden *post mortem* entnommenem Nierengewebe wurde keine mit AT assoziierte O-Acetyltransferase- oder Transacetylierungsaktivität gefunden (King *et al.* 1975, S. 286). In einer ersten kleinen Studie an 4 Nierenproben, die später auf 8 Patienten ausgedehnt wurde, zeigte sich eine mittlere PABA-AT von 1,34 bzw. später 1,75 nmol/mg/min (Pacifci *et al.* 1986, S. 289; Pacifci *et al.* 1988, S. 852). Zwischen Nierenrinde und -mark fand sich kein Unterschied (Pacifci *et al.* 1986, S. 287f.). Erstaunlich ist die in beiden Studien ungewöhnlich geringe Schwankungsbreite von lediglich 3 - 7%. Die Aktivitäten selbst entsprechen etwa unseren Werten, obwohl die Proben in den beiden letztgenannten Studien bis zu 6 Monate lang tiefgefroren gelagert wurden. Der hierdurch bewirkte Aktivitätsverlust wird offensichtlich durch eine Cytosolbereitung nach dem S100-Protokoll, dem Einsatz einer hohen AcCoA-Konzentration von 2 mM und saccharosehaltiger Pufferlösung kompensiert, da höhere AcCoA-Konzentrationen zu vermehrter Acetylierung führen. Die von uns und vielen anderen Autoren nun verwendete initiale AcCoA-Konzentration beträgt etwa 0,5 mM (z.B. Ilett *et al.* 1994, S. 915; Ward *et al.* 1995, S. 1761). In 14 Autopsieproben, die bis zu 21 Stunden *post mortem* entnommen wurden und anschließend maximal 2 Monate eingefroren gelagert wurden, konnte trotz teilweise hoher AcCoA-Konzentrationen keine INH-AT nachgewiesen werden (Jenne und Orser 1965, S. 1993 1998). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 10 nmol/mg/min, so dass lediglich sehr hohe Aktivitäten der INH-AT erkannt worden wären. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bis unter eine Nachweisgrenze von 10 - 20 pmol/mg/min keine INH-AT vorhanden ist.

Der beobachtete Trend der PABA-AT in Proben von Niere und Harnleiter des selben Patienten zu korrelieren, legt es nahe, dass in allen Organen des gleichen Individuums ein - möglicherweise organspezifisch modifiziertes - Aktivitätsniveau existiert, das genetisch determiniert sein könnte. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenzahlen sind zur Bestätigung dieser Vermutung erforderlich.

5.4.3 Harnleiter und Blase

Aufgrund der Ähnlichkeit des Epithels von Harnleiter und Blase wird in einigen Studien kein Unterschied zwischen den beiden Geweben gemacht, sondern lediglich von „urothelialen Zellen“ gesprochen (z. B.

Kloth *et al.* 1994, S. 2786). Angelehnt an diese Praxis und aufgrund der Tatsache, dass sich unsere Daten der PABA-AT in Proben von Harnleiter und Blase nicht signifikant voneinander unterscheiden (1,4 vs. 1,2 nmol/mg/min, $p = 0,9$), werden die beiden Gewebe im folgenden zusammengefaßt.

Die meisten Studien wurden mit unspezifischen AT-Substraten wie 4-ABP oder 2-AF durchgeführt, die Proben bzw. Cytosole in der Regel tiefgefroren (Land *et al.* 1989, S. 727; Kirilin *et al.* 1989, S. 2449). Unter diesen Bedingungen ergaben sich PABA-AT Aktivitäten von ca. 300 - 3.000 pmol/mg/min in 21 Blasenproben, die 4 - 8 Stunden *post mortem* entnommen wurden (Land *et al.* 1989, S. 730). Die Verwendung einer geringen AcCoA-Konzentration von ca. 80 μ M, die postmortale Probengewinnung und das Einfrieren der Proben hatten einen eher aktivitätsreduzierenden Effekt, während die Verwendung von S100-Zyosol einen leicht steigernden gehabt haben dürfte, so dass der Nettoeffekt als leicht erniedrigt angenommen werden kann. In einer anderen Studie an 9 Blasenproben von Organspendern, die binnen einer Stunde entnommen worden waren, wurden PABA-AT Aktivitäten von 1,3 - 6,4 nmol/mg/min gefunden werden (Kirilin *et al.* 1989, S. 2450). Der Verwendung von 1 mM AcCoA, von S100-Cytosol sowie eines spektrophotometrischen Nachweisverfahrens als aktivitätserhöhende Einflüsse stehen das Einfrieren als aktivitätssenkender Einfluß gegenüber, so dass zusammenfassend von einer fälschlich zu hohen PABA-AT ausgegangen werden kann. Insgesamt stimmen unsere Ergebnisse zu den Aktivität der PABA-AT von 0,4 - 2,9 nmol/mg/min gut mit den Daten der anderen Arbeitsgruppen überein, soweit die genannten Einschränkungen berücksichtigt werden.

In beiden vorgenannten Studien konnte keine Korrelation zwischen PABA-AT und der Acetylierung von 2-AF bzw. 4-ABP gefunden werden (Land *et al.* 1989, S. 729; Kirilin *et al.* 1989, S. 2450). Dies wurde von den jeweiligen Autoren als Hinweis auf eine INH-AT Aktivität gewertet. Unlängst wurde in Primärkulturen urothelialer Zellen menschlicher Ureteren mRNA sowohl von PABA-AT als auch von INH-AT gefunden (Kloth *et al.* 1994, S. 2783). Jedoch waren bis zu 35 Verstärkungszyklen für den Nachweis erforderlich, was in der reversen PCR-Technologie eine Obergrenze darzustellen scheint (M. Ismail, persönliche Mitteilung). Ein Artefakt kann somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden, insbesondere unter Berücksichtigung des massiven Wachstumsanreizes und der Kulturbedingungen, die einem physiologischen Milieu unangemessen sind. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete in einem späteren Beitrag über Inhibitionstudien mit 4-ABP, PABA und SMZ an urothelialen Zellen. Die Autoren kommen nun zu dem Schluß, dass in der Blase ausschließlich PABA-AT exprimiert wird (Frederickson *et al.* 1994, S. 29). Auch die Arbeitsgruppe um E. SIM konnte mit immunologischen Methoden und Anwendung der sehr sensitiven Western Blot-Technik ausschließlich PABA-AT, jedoch keine INH-AT in

menschlichen Blasenproben nachweisen (Stanley *et al.* 1996, S. 1059ff.). Unsere Ergebnisse stehen somit mit diesen letztgenannten indirekten Schlußfolgerungen in vollem Einklang.

5.4.4 Prostata

In zwei Prostataprobe konnten PABA-AT Aktivitäten von 1,9 und 3,6 nmol/mg/min gemessen werden. Dies liegt in der Größenordnung der Aktivitäten der übrigen Gewebe des Urogenitaltraktes. Eine INH-AT war, wie auch bei den anderen Geweben des Urogenitaltraktes trotz niedriger Nachweisgrenzen nicht meßbar.

In der Literatur finden sich Hinweise auf AT-Aktivität in der Prostata von Ratten (Hein *et al.* 1991a, S. 233) oder Hamstern (Hein *et al.* 1992, S. 114). Der Versuch, O-Acetylierung oder Transacetylierung im Cytosol einer menschlichen Prostataprobe nachzuweisen, führte zu einem negativen Ergebnis (King *et al.* 1975, S. 286). Jedoch betrug die Inkubationszeit nur 20 Minuten, es wurde kein AcCoA zugesetzt und auch nur eine einzige Probe untersucht. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungstechnik wurden bei der Untersuchung zweier menschlicher Prostataprobe Transkripte von NAT1 und NAT2 in Epithelzellen, nicht jedoch in den entsprechenden Stromazellen festgestellt (Wang *et al.* 1999, S. 1591ff.). In einer anderen Untersuchung an 11 Proben wurde neben der Bestimmung des Genotyps auch SMZ-AT mit einer Aktivität von $4,8 \pm 4,4$ pmol/mg/min nachgewiesen. Diese zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit dem Genotyp und wies zudem andere kinetische Eigenschaften auf, als die entsprechende SMZ-AT der Leber, die in einigen Fällen gleichzeitig bestimmt wurde. Die Autoren schließen daraus, dass in der menschlichen Prostata keine NAT2 exprimiert wird (Agundez *et al.* 1998b, S. 1361ff.).

Auch wenn die Nachweisgrenze bei unseren Arbeiten zu hoch lag um eine Aktivität dieser Größenordnung quantifizieren zu können, muß jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei der o.g. Messung am ehesten um die unspezifische Aktivität der PABA-AT handelt. Der Nachweis von Transkripten der NAT2 kann derzeit nicht erklärt werden und bedarf einer Bestätigung in unabhängigen Studien.

5.4.5 Dünndarm, Kolon und Rektum

Die Proben aus dem Darm wiesen eine durchschnittliche PABA-AT von 8,5 nmol/mg/min bei der üblicherweise großen Schwankungsbreite (3,8 - 14,8 nmol/mg/min) auf. Die entsprechenden INH-AT Aktivitäten betragen 200 pmol/mg/min (58 - 515 pmol/mg/min).

Die Kolonprobe 4425 CO02 lag mit einer Aktivität der PABA-AT von 0,5 nmol/mg/min und einer grenzwertig meßbaren INH-AT von 6 pmol/mg/min etwa 10-fach unterhalb des niedrigsten im Darm gefundenen Werts, auch wenn sich in anderen Geweben noch niedrigere PABA-AT Aktivitäten fanden. Es wurde diese Probe daher unter der Annahme einer massiven Inaktivierung oder mangelhaften Vitalität von den Auswertungen ausgeschlossen. Eine stichhaltige Erklärung für die geringen Aktivitäten kann weder in Daten der Krankenakte noch der Behandlung der Probe gefunden werden. Bei der Inspektion des Gewebestückes waren keine Auffälligkeiten festzustellen. Da allerdings beide AT in gleicher Weise massiv betroffen sind, erscheint ein exogener Einfluß, der in erster Linie die PABA-AT betroffen hätte, wie z.B. eine fehlerhafte Lagerung, als Ursache ebenso unwahrscheinlich wie eine genetische Besonderheit. Vielmehr wird eine bereits länger währende, intravitale, möglicherweise hypoxische Schädigung der Probe angenommen.

In der Literatur finden sich fast ausschließlich Angaben über PABA-AT, die in zuvor gefrorenen Proben bestimmt wurden. TURESKY *et al.* fand 0,8 - 3,5 nmol/mg/min in 8 Proben (Turesky *et al.* 1991, S. 1843), KIRLIN *et al.* gibt Mittelwerte von 8,3 und 48,4 nmol/mg/min an (Kirlin *et al.* 1991, S. 552) und HICKMAN *et al.* zeigten Aktivitäten von ca. 1,5 bis etwa 12 nmol/mg/min. Dem Aktivitätsverlust durch Einfrieren stehen in beiden Arbeiten als aktivitätserhöhende Faktoren die Cytosolbereitung nach S100-Protokoll, die Verwendung eines zuckerhaltigen Puffers, eine AcCoA-Konzentration von 1 mM oder die Verwendung von colorimetrischen Nachweisverfahren entgegen (Turesky *et al.* 1991, S. 1841; Kirlin *et al.* 1991, S. 550; Hickmann *et al.* 1998, S. 403ff.), so dass fälschlich zu hohe PABA-AT Werte zu erwarten waren. PACIFICI *et al.* geben mit einem Radioassay bestimmte Werte von $3 \pm 0,5$ nmol/mg/min in 8 Proben an, jedoch unter Verwendung eines saccharosehaltigen Puffers und einer AcCoA-Konzentration von 2 mM (Pacifci *et al.* 1988, S. 851f.). Unter diesen Bedingungen erscheinen die Werte erstaunlich niedrig, wie auch die Schwankung erheblich geringer als üblicherweise berichtet angegeben werden (s. oben). In einer weiteren Studie, in der im wesentlichen die auch in dieser Arbeit verwendeten Verfahren eingesetzt wurden, fanden sich in 23 Darmproben PABA-AT Aktivitäten von 1 - 50 nmol/mg/min (Ilett *et al.* 1994, S. 915). Die Maximalwerte der PABA-AT dieser letzten Untersuchung liegen weit über denen der eigenen Untersuchungen und der meisten Anderen. Die

einzigsten Unterschiede zwischen dem eigenen Protokoll und dem Protokoll dieser Arbeitsgruppe bestanden im Einsatz des S100-Protokolls bei der Cytosolbereitung und in der Verwendung eines saccharosehaltigen Puffers durch letztere. Diese Unterschiede können jedoch derart hohe Abweichungen sicherlich nicht erklären.

Über INH-AT in menschlichen Darmproben wurde bislang nur sehr wenig berichtet. In einer sehr frühen Arbeit konnten JENNE *et al.* in 14 Darmproben deutliche Aktivitäten nachweisen, die aufgrund eines völlig unterschiedlichen Protokolls jedoch quantitativ nicht vergleichbar sind (Jenne und Orser 1965, S. 1998). Nach langer Pause wurden erst in jüngster Zeit weitere Daten hierzu veröffentlicht. So wurden mit SMZ als Substrat in 23 Kolonproben Aktivitäten von 42 - 174 pmol/mg/min bei langsamen, und 107 - 324 pmol/mg/min bei schnellen Acetylierern gefunden (Ilett *et al.* 1994, S. 915). Diese Daten sind von unseren nicht signifikant unterschiedlich, die relativen Standardabweichungen sind praktisch identisch (40% *vs.* 43% bei langsamen, 37% *vs.* 38% bei schnellen Acetylierern). Ein weiterer Bericht nennt Aktivitäten der SMZ-AT von etwa 100-1.200 pmol/mg/min bei der Untersuchung von Darmproben von 4 Organspendern – allerdings unter Verwendung eines zuckerhaltigen Puffers (Hickmann *et al.* 1998, S. 403ff.).

Bislang fehlten systematische Untersuchungen zur Verteilung von AT entlang des menschlichen Darms. Ein ursprüngliches Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen AT-Aktivitäten und dem Darmabschnitt zu untersuchen, mußte fallengelassen werden, da es nicht möglich war, über den groben anatomischen Darmabschnitt hinaus die genaue Lokalisation des Resektates zu bestimmen. Darüber hinaus waren Dünndarmproben aufgrund einer sehr geringen Operationshäufigkeit nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand zu erlangen, so dass ausführlichere Untersuchungen dieses Gewebes im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

In der o.g. Studie am Darm von vier Organspendern konnte gezeigt werden, dass sowohl PABA-AT als auch SMZ-AT ubiquitär zwischen Duodenum und Rectum mit hohen Aktivitäten vorhanden sind. Während sich für PABA-AT kein Schwerpunkt erkennen ließ, zeigte sich für die SMZ-AT ein Trend zu von proximal nach distal abnehmenden Aktivitäten, insbesondere bei schnellen Acetylierern. In anbetracht der geringen Probenzahl ist dies jedoch vorsichtig zu sehen (Hickman *et al.* 1998, S. 404 ff.). In einer älteren kleinen Studie konnte in Proben von 6 Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen der PABA-AT in Ileum und Kolon gefunden werden (Pacifci *et al.* 1989, S. 141). Im Gegensatz zu dieser Studie stammen unsere Proben aus Kolon und Rektum. Auch wurden sie nicht paarweise vom gleichen Patienten gewonnen. Es konnte aber auch hier bei etwa gleicher Probenzahl kein Bezug der

PABA-AT zum anatomischen Darmabschnitt gezeigt werden ($p = 0,56$). Unsere Daten erlauben aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von schnellen und langsamen Acetylierern unter den Kolon- und Rektumproben leider keine weiteren Schlußfolgerungen zur Verteilung der INH-AT.

Eine Korrelation der Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT ist nicht zu erkennen ($r = -0,5$; $p = 0,187$; $n = 9$; vgl. Abb. 31). Dies war aufgrund der molekulargenetischen Grundlage auch nicht zu erwarten und steht im Einklang mit Literaturberichten (z.B. Grant *et al.* 1991, S. 188; Ilett *et al.* 1994, S. 915f.).

Bestandteile von Darmflora oder Faeces wurden verdächtigt, Aktivität gegenüber dem Substrat der PABA-AT 5-Aminosalizylsäure aufzuweisen (Dull *et al.* 1987, S. 3773). Für Inkubationszeiten, wie sie bei uns verwendet wurden, war in der obigen Studie jedoch nahezu keine acetylierende Aktivität nachweisbar. Daher kommen Anteil von Darmflora oder Fäzes als verzerrende Faktoren für PABA-AT nicht in Betracht und sind auch für INH-AT höchst unwahrscheinlich (Allgayer *et al.* 1989, S. 39).

5.4.6 Leber

Eine frühe Studie berichtet Aktivitäten 1,2 - 4,3 nmol/mg/min ($n = 7$) für PABA-AT und von 0,1 - 2 nmol/mg/min ($n = 9$) für INH-AT in frischen menschlichen Leberproben (Glowinski *et al.* 1978, S. 945). Diese Werte stimmen mit den von uns gefundenen sehr gut überein, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Autoren der Studie S100-Cytosol verwendeten. Die PABA-AT wurde mit einer colorimetrischen Bestimmungsmethode bei einer AcCoA-Konzentration von 2,2 mM bestimmt und dürfte somit zu hoch angegeben worden sein (Glowinski *et al.* 1978, S. 943f.).

5.4.7 Pankreas

Es wurden in Pankreasproben PABA-AT Aktivitäten von 0,5 und 0,9 nmol/mg/min gefunden, während INH-AT unter der Nachweisgrenze von 10 - 15 pmol/mg/min lag. Die Gewebeproben waren aufgrund der Grunderkrankung der Patienten stark verkalkt. Dies ließ befürchten, dass nicht genügend vitales Gewebe für den Nachweis von INH-AT verblieben war. Da jedoch die erheblich instabilere PABA-AT deutlich nachweisbar war und sich auch qualitativ im Chromatogramm kein Hinweis auf Ac-INH fand, kommen wir zu der Schlußfolgerung, dass INH-AT in menschlichem Pankreas nicht exprimiert wird.

Im Gegensatz zur Datenlage bei Labortieren (Hearse und Weber 1973, S. 591; Martell und Weber 1988, Nr. 4903; Hein *et al.* 1992, S. 14) ist über AT-Aktivitäten in menschlichem Pankreas wenig bekannt. In dem einzigen unseren Kenntnissen nach hierzu vorliegenden Bericht wurden sowohl Aktivitäten der PABA-AT von etwa 2 nmol/mg/min als auch der SMZ-AT von 23 pmol/mg/min gefunden. Letztere wies allerdings keine Beziehung zum Genotyp auf (Anderson *et al.* 1997, S. 1088). Die Proben dieser Studie wiesen eine lange Lagerungsdauer von bis zu 30 bei +4 °C auf, wurden eingefroren und mit einem zuckerhaltigen Puffer aufbereitet (a.a.O., S. 1086), so dass sich aktivitätsmindernde und –steigernde Einflüsse in etwa ausgeglichen haben könnten. Zieht man zudem in Betracht, dass unsere Proben mit gewisser Wahrscheinlichkeit krankheitsbedingt vorgeschädigt waren, stimmen unsere Daten zur Aktivität der PABA-AT mit denen von ANDERSON *et al.* sehr gut überein. Eine Aktivität der INH-AT zwischen 20 und 25 pmol/mg/min hätte mit unserem Assay nachweisbar sein müssen, jedoch fanden selbst die Autoren in weniger als der Hälfte ihrer Proben Aktivität. Die geringe Aktivität, die weniger als 5% der im Kolon nachweisbaren beträgt und die fehlende Assoziation mit dem Genotyp veranlassen die Autoren, ein Fehlen der Expression der NAT2 im menschlichen Pankreas anzunehmen. Dies deckt sich mit unseren Erkenntnissen trotz unserer geringen Probenzahl.

5.4.8 Lunge

In menschlichem Lungengewebe konnten wir PABA-AT mit durchschnittlichen Aktivitäten von 1,4 nmol/mg/min sowie eine geringe, aber deutlich meßbare Aktivität von INH-AT von durchschnittlich 50 pmol/mg/min nachweisen.

Zu AT-Aktivitäten in menschlicher Lunge liegen unseres Wissens nur zwei Arbeiten vor. Eine bereits ältere Studie umfaßte 4 Lungenproben, die später auf 8 Proben ausgedehnt wurde (Pacifci *et al.* 1986, S. 289; Pacifci *et al.* 1988, S. 852). Dabei wurde eine mittlere PABA-AT von 0,95 nmol/mg/min gefunden. Einerseits waren die Gewebeproben zur Lagerung eingefroren worden, was die Aktivität im Sinne einer Senkung beeinflußt haben wird, andererseits wurde S100-Cytosol verwendet und eine hohe AcCoA-Konzentration von 2 mM eingesetzt, was zu einer Erhöhung der Aktivität beigetragen haben könnte. Die berichteten Werte stehen in Einklang mit unseren Werten und spiegeln die intravitalen Aktivitäten einigermaßen gut wieder. Der zweite Bericht wies Aktivitäten der PABA-AT von bis zu 0,21 nmol/mg/min und der SMZ-AT von 0,67 bis 2,9 pmol/mg/min in 6 Lungenproben nach. Nach Lagerungszeiten von unter 2 Stunden bei +4 °C wurden die Proben eingefroren (Culp *et al.* 1997, S. 99ff.).

Die geringen Werte für Aktivitäten der PABA-AT überraschen, sind aber möglicherweise auf die Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zurückzuführen. Noch deutlicher ist die Diskrepanz zu unseren Daten bei den Aktivitäten der INH-AT, hier liegen die beschriebenen Werte um 1-2 Größenordnungen unter unseren Ergebnissen. Anhaltspunkte, die diese extremen Abweichungen erklären könnten, finden wir nicht, so dass das Ergebnis weiterer Studien abgewartet werden muß.

5.5 Enzymaktivität und Genotyp der Isoniazid-Acetyltransferase

In den Proben aus Lunge, Leber und Darm wurde der Genotyp bestimmt (Kiefer *et al.*, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse zeigen für Proben aus Leber und Darm eine gute Übereinstimmung von INH-AT mit dem Genotyp, wie dies allgemein literaturbekannt ist (Deguchi *et al.* 1990, S. 12759; Hickman und Sim 1991, S. 1012f.; Mashimo *et al.* 1992, S. 142; Hirvonen 1999, S. 254ff.).

Unseren Daten zufolge zeigt sich jedoch in den Lungenproben keine derartige Korrelation. Die Aktivitäten der INH-AT von genotypisch schnellen und langsamen Acetylierern sind nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abb. 35). Auch, wenn in der Lunge bisher kaum NAT2 nachgewiesen wurde, ist nach allgemeiner Anschauung ein Zusammenhang von Phänotyp und Genotyp zu fordern. Eine fehlende Korrelation war für andere Arbeitsgruppen Anlaß, gemessene Aktivitäten der SMZ-AT nicht der NAT2 zuzuschreiben (Agundez *et al.* 1998b, S. 1361ff; Anderson *et al.* 1997, S. 1088). Jedoch waren die gemessenen Aktivitäten entweder mit etwa 10% unserer Werte deutlich geringer oder ließen sich in einem Großteil der Proben gar nicht erst nachweisen. Eine Erklärung hierfür könnte in einer überlappenden Substratspezifität der in allen Fällen nachweisbaren PABA-AT liegen. Diese Erklärungsmöglichkeit erscheint für die Aktivitäten unserer Größenordnung unwahrscheinlich. Auch konnten wir in allen Proben INH-AT nachweisen, wenngleich mit 7 Proben auch nur eine geringe Anzahl untersucht werden konnte.

Wertet man die Lungenprobe mit dem Genotyp WT/M2 als Fehlbestimmung und läßt sie beim Gruppenvergleich außer Betracht, so ergeben sich mittlere Aktivitäten von 36 vs 68 pmol/mg/min für die langsamen bzw. schnellen Acetylierer. Der Unterschied erreicht keine Signifikanz ($p = 0,1$; einseitig, exakter Test), was an Betracht der geringen Besetzungszahlen nicht überrascht. Es scheint daher erforderlich, eine größere Anzahl von Lungenproben zu untersuchen, um den bestehenden Widerspruch aufklären zu können. Sollte es sich bewahrheiten, dass in der Lunge INH-AT mit deutlicher Aktivität experi-

miert wird, so könnte dies Auswirkungen auf die Diskussion um die Karzinogenese der Bronchialkarzino-
nome haben (s. S. 97, vgl. auch Culp *et al.* 1997, S. 97ff.).

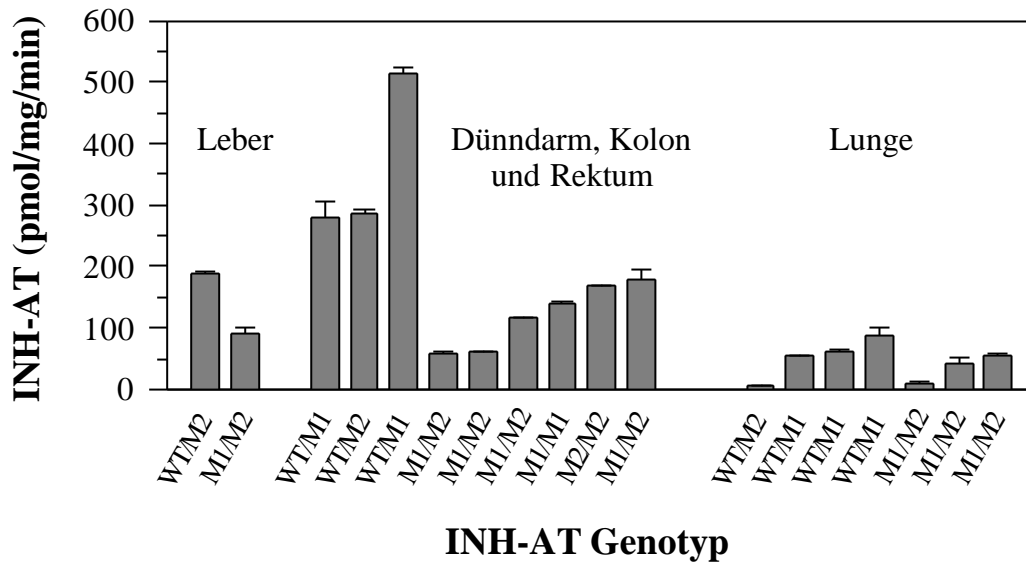


Abb. 35: INH-AT Genotyp und Enzymaktivitäten in Leber-, Darm- und Lungenproben.

Der Genotyp wurde über Restriktionslängenpolymorphismen bestimmt. Das Allel WT (Wildtyp) führt zum Phänotyp des schnellen Acetylierers, Kombinationen ohne dieses Allel zu langsamen Acetylierern. INH-AT Aktivitäten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (s. Kapitel 4, Ergebnisse).

5.6 Rolle der AT für die Kanzerogenese beim Menschen

Die physiologische Funktion der AT ist bislang unklar. Für die PABA-AT wurde eine Schlüsselrolle im Folsäuremetabolismus vorgeschlagen (Minchin 1995, S. 2; Ward *et al.* 1995, S. 1765f.). Die Bedeutung der AT für Mutagenese und Kanzerogenese ist dagegen seit langem bekannt.

Arylamine werden entweder direkt N-acetyliert oder zu N-Hydroxy-Arylaminen oxidiert. Die Oxidation erfolgt bevorzugt in der Leber durch Cytochrom P450 1A2 (CYP 1A2), kann aber auch durch leukozytäre Myeloperoxidasen bei Entzündungen oder durch Prostaglandin H Synthasen in Blase oder Lunge vermittelt werden (Butler *et al.* 1989, S. 7698f.; Kadlubar *et al.* 1992, S. 72; Culp *et al.* 1997, S. 97ff.). Die korrespondierenden N-Hydroxy-Arylamine können O-acetyliert, oder zu Sulfate-
stern konjugiert werden. In beiden Fällen sind die Produkte nicht stabil, sondern zerfallen und binden

kovalent an zelluläre Proteine, RNS und DNS (Flammang *et al.* 1987, S. 1969; Gilissen *et al.* 1994, S. 41; Chou *et al.* 1994, S. 527). Hierzu konkurrieren Konjugationsreaktionen mit Glutathion oder Glucuronsäure. Während N-Glucuronide stabile Transportformen darstellen, sind O-Glucuronide erheblich instabiler (Kadlubar *et al.* 1977, S. 808; Saito *et al.* 1983, S. 1554; Bock 1991, S. 131ff.; Lin *et al.* 1994, S. 4923).

5.6.1 Kolorektale Karzinome

In der Leber gebildete N-Glucuronide chemischer Karzinogene können über die Galle in den Darm gelangen, passieren den Dünndarm und erreichen das Kolon. Dort werden durch bakterielle Glucosidasen die N-Hydroxy-Arylamine abgespalten und durch die hohen Aktivitäten der AT in der Darmschleimhaut O-acetyliert (Bock 1991, S. 133f.). Eigene Versuche an 5 Darmproben zeigten eine enge Korrelation der Aktivität der OAT (gemessen über die Bildung von DNS-Addukten) mit der INH-AT ($r = 0,9$; $p = 0,037$), nicht jedoch mit PABA-AT ($r = 0,7$; $p = 0,188$). Dies steht in Einklang mit früheren Arbeiten (Flammang *et al.* 1988, S. 144f.).

Mit der Nahrung werden eine Reihe von Kanzerogenen wie z.B. die heterozyklischen Arylamine aufgenommen, deren N-Hydroxy-Derivate im Darm fast ausschließlich durch die INH-AT O-acetyliert werden und dort genotoxisch wirken können (Turesky *et al.* 1991, S. 1839 ff.; Boobis *et al.* 1994, S. 92f.; Wild *et al.* 1995, S. 645f.). Dies könnte der Hintergrund sein für epidemiologische Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Inzidenz kolorektaler Karzinome und dem Vorliegen schneller NAT2-Genotypen, insbesondere bei häufigem Konsum von gebratenem Fleisch (Roberts-Thomson *et al.* 1996, S. 1373; Chen *et al.* 1998, S. 3307ff.). Allerdings ist die epidemiologischen Datenlage noch widersprüchlich (z.B. Hubbard *et al.* 1997, S. 229ff.; Hirvonen 1999, S. 261f.). Neuerdings werden auch schnelle NAT1-Genotypen mit Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht, hier besonders unter Rauchern (Bell *et al.* 1995, S. 3537ff.).

5.6.2 Blasenkarzinome

N-Hydroxy-Arylamine können als N-Glucuronide weiterhin über den Blutkreislauf und aktive Transportmechanismen der Niere die Blase erreichen (Bock 1991, S. 133). So wurde gezeigt, dass der Urin arylaminexponierter Textilarbeiter nach Behandlung mit β -Glucosidase eine im Vergleich zu nicht exponierten Arbeitern signifikant erhöhte Mutagenität im AMES-Test aufwies (Sinués *et al.* 1992, S. 4886).

Die bei neutralen pH-Werten stabilen N-Glucuronide einiger N-Hydroxy-Arylamine sind bei pH 5 instabil und zerfallen. Die freigesetzten N-Hydroxy-Arylamine werden im sauren Milieu protoniert, reagieren spontan weiter zu reaktiven Nitreniumionen und binden an DNS (Kadlubar *et al.* 1977, S. 810). Ergänzend können in die Blase gelangte Arylamine direkt durch die dort nachgewiesene Prostaglandin H-Synthase oxidiert werden (Culp *et al.* 1997, S. 108f.).

Die in der Blase eher geringe Aktivität der OAT (Land *et al.* 1989, S. 730; Kirilin *et al.* 1989, S. 2450) dürfte für die Adduktbildung der N-Hydroxy-Arylamine eine eher untergeordnete Rolle spielen. In die Blase gelangen nicht nur Glucuronide, sondern in geringerem Maße auch Arylamine, Arylamide und N-Hydroxy-Arylamine (Bock 1991, S. 133; Sinués *et al.* 1992, S. 4886). Ein oxidativer Metabolismus von Arylaminen in der Blase ist beim Menschen quantitativ von untergeordneter Bedeutung (Schut *et al.* 1984, S. 1288f.; Culp *et al.* 1997, S. 108f.). Acetyliertes 2-AF ist im AMES-Test weniger mutagen als 2-AF (Schut *et al.* 1984, S. 1290), wobei der Beitrag von Deacetylasen zum mutagenen Geschehen möglicherweise noch nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Die N-Glucuronide sind somit als Hauptkanzerogene zu betrachten. Insgesamt scheint daher eine genotoxische Wirkung von Arylaminen auf die Blase bei entsprechender Exposition in erster Linie durch die N-Acetylierungskapazität und Aktivität der CYP 1A2 der Leber bestimmt zu werden.

5.6.3 Bronchialkarzinome

Die Lunge ist, mehr noch als Blase und Darm exogenen, potentiell kanzerogenen Substanzen ausgesetzt. Prostaglandin H Synthase und Myeloperoxidase sind in der Lage, Arylamine wie 4-ABP, Benzol oder Heterozyklen zu oxidieren und damit metabolisch zu aktivieren. Diese Oxidasen zeigen in der Lunge zwar deutlich geringere Aktivität als in der Leber, können jedoch durch Entzündungsreaktionen stark induziert werden (Kadlubar *et al.* 1992, S. 72; Culp *et al.* 1997, S. 97ff.). Weiterhin kann die Reduktion von Nitroaromaten wie dem in der Luft weitverbreiteten 4-Nitrobiphenyl durch Nitroreduktasen der Lunge zu aktivierten Zwischenprodukten führen (Culp *et al.* 1997, S. 107ff.). Eine nachfolgende O-Acetylierung durch die AT der Lunge könnte zu der auch in anderen Organen beobachteten genotoxischen Wirkung führen. Vorläufige Ergebnisse von Versuchen an zwei Lungenproben ergaben eine deutliche DNS-Adduktbildung, so dass eine Rolle der AT bei der Entstehung von Bronchialkarzinomen nicht ausgeschlossen werden kann (Kiefer *et al.*, persönliche Mitteilung).

Epidemiologische Studien beschäftigen sich gerade in jüngerer Zeit vermehrt mit der Frage, ob ein bestimmter Phänotyp einer der beiden AT mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko assoziiert ist. Zwei Studien hierzu mit 126 (Philip *et al.* 1988, S. 491) bzw. 53 Patienten (Burgess und Trafford 1985, S. 17) fanden keinen Zusammenhang mit NAT2. Auch zwei neuere Studien konnten keine Risikoerhöhung aufzeigen (Cascorbi *et al.* 1996b, S. 3961ff.; Bouchardy *et al.* 1998, S. 291ff.). Einzelne Studien wiesen jedoch auf ein erhöhtes Risiko unter langsamen Acetylierern (INH-AT), insbesondere bei Nichtrauchern hin (Oyama *et al.* 1997, S. 577ff.; Nyberg *et al.* 1998, S. 875ff.; Seow *et al.* 1999, S. 1877ff.). Auch für PABA-AT zeigte sich für Träger langsamer Allele eine deutliche Risikoerhöhung, an Lungenkrebs zu erkranken. So erhöhte sich das Erkrankungsrisiko für langsame NAT1-Genotypen im Vergleich zu homozygot Schnellen um den Faktor 11,7 (Bouchardy *et al.* 1998, S. 291ff.).

Es wurde vermutet, dass bei langsamen Acetylierern durch eine verminderte Entgiftung über die AT erhöhte Mengen von Karzinogenen Zielorgane wie die Lunge erreichen und dort direkt aktiviert werden (Oyama *et al.* 1997, S. 577ff.; Hirvonen 1999, S. 263). Jedoch sollten, zumindest nach der Modellvorstellung zum Mechanismus der Karzinogenese, geringe lokale AT- und damit OAT-Aktivitäten zu einer Reduktion des Krebsrisikos führen. Hier bestehen noch deutliche Diskrepanzen zwischen der Grundlagenforschung und den Ergebnissen epidemiologischer Studien, die einer weiteren Klärung bedürfen.

5.7 Acetyltransferasen beim Menschen und in Versuchstiermodellen

Die Bedeutung der AT für die Aktivierung von Prokanzerogenen aus der Substanzklasse der Arylamine und Nitroarene wurde schon eingangs dargelegt (s. S. 15f.). Im Metabolismus derartiger Xenobiotika interagieren mehrere, unabhängig voneinander regulierte Enzymsysteme. Die AT stellen nur eines dieser Systeme dar, wenngleich auch ein sehr wesentliches. Dies führt zwangsläufig zu komplexen Wechselwirkungen, deren Klärung nicht selten im Rahmen von Tierversuchen angegangen wird. Somit stellt sich auch die Frage, welche der gängigen Versuchstierarten bezüglich der AT ein dem Menschen ähnliches Modell darstellt.

5.7.1 Bedeutung von Acetyltransferasen im menschlichen Metabolismus

Eine Exposition besteht gegenüber Arylaminen insbesondere durch Verbrennungsemissionen und Passivrauchen (Bartsch *et al.* 1990, S. 1829; Vineis *et al.* 1994, S. 156; vgl. auch S. 9). Durch Aktivrauchen steigt diese Exposition dosisabhängig stark an (Yu *et al.* 1994, S. 715). Heterozyklische Amine

werden ausschließlich über die Nahrung aufgenommen und sind in erster Linie von der konsumierten Menge an gebratenem Fleisch oder Fisch abhängig. Unter Zugrundelegen eines Fleischverzehr von 200 g wurde eine tägliche Aufnahme von 0,1 - 15 µg heterozyklischer Amine geschätzt (Wakabayashi *et al.* 1993, S. 132). Es ist daher von einer dauerhaften Belastung bereits unter Alltagsbedingungen auszugehen.

Der Stoffwechsel von Arylaminen verzweigt sich rasch mit unterschiedlichen Auswirkungen: aufgenommene Amine können, wie oben dargelegt, über die N-Acetylierung durch PABA-AT oder INH-AT detoxifiziert (Bartsch *et al.* 1990, S. 1829), oder konkurrierend über die Sequenz N-Hydroxylierung und O-Acetylierung zu genotoxischen Produkten aktiviert werden (s. S. 95).

Neben den Acetylierungsreaktionen der PABA-AT im gesamten Organismus und der INH-AT in Leber und Darm unterliegt auch die N-Hydroxylierung durch CYP 1A2 in der Leber einem signifikanten genetischen Polymorphismus. Darüber hinaus ist CYP 1A2 induzierbar, z.B. durch Nahrungsbestandteile oder Zigarettenrauchen (Sinha *et al.* 1994, S. 6157; vgl. Lang *et al.* 1994, S. 675). Je nach Aktivität von AT und CYP 1A2 und der Affinität eines Arylamins zu einem dieser Enzyme wird es metabolisch aktiviert oder inaktiviert werden.

Das Ausmaß der Acetylierung eines bestimmten Substrats, z.B. eines Arylamins, wird weiterhin durch seine relative Affinität zu den beiden AT-Formen bestimmt. Dabei stellt die unterschiedliche Gewebeverteilung von PABA-AT, die in fast allen Geweben zu finden ist und INH-AT, das lediglich in Verdauungstrakt, Leber und Lunge Aktivitäten aufweist, zusätzlich ein modifizierendes Moment dar. Für die N-Hydroxy-Arylamine kann das Affinitätsmuster wieder anders ausfallen, als für die entsprechenden Arylamine. So wird N-oxidiertes 4-ABP bevorzugt durch PABA-AT O-acetyliert, während die N-Acetylierung von 4-ABP überwiegend durch INH-AT erfolgt. 2-AF und N-Hydroxy-2-AF werden beide überwiegend durch PABA-AT metabolisiert. Heterozyklische Arylamine und deren N-oxidierte Derivate dagegen werden nahezu ausschließlich durch INH-AT verstoffwechselt (Minchin *et al.* 1992, S. 841ff.).

Die Aktivität der CYP 1A2 ist für die genotoxische Potenz der Arylamine von zentraler Bedeutung, da einerseits die N-Oxidation mit der detoxifizierenden N-Acetylierung konkurriert, andererseits N-oxidierte Arylamine als Substrate verschiedener anschließender Konjugationsreaktionen, wie z.B. der O-Acetylierung oder Sulfatierung, weiter aktiviert werden können. Auch diese nachgeschalteten Enzym-

systeme unterliegen einer bestimmten Organverteilung und Variabilität oder sogar genetischen Polymorphismen (Kadlubar *et al.* 1992, S. 71ff.; Goldstein und Faletto 1993, S. 174f.).

Die Aktivitäten der PABA-AT schwanken *in vivo* um das 3 - 4-fache und die der INH-AT etwa um einen Faktor von 2 - 4. Die Variationsbreite von CYP 1A2 hingegen beträgt *in vivo* etwa das 15-fache (Weber und Vatsis 1993, S. 209; Sinha *et al.* 1994, S. 6157). Allein das Ausmaß dieser Variationsbreiten legt es bereits nahe, dem oxidativen Phänotyp hinsichtlich des Nettoeffekts eine größere Bedeutung zuzumessen, als dem der beiden AT. Hohe Affinitäten bestimmter Fremdstoffe zur PABA-AT oder INH-AT können jedoch im Einzelfall Anlaß zu einer anderen Bewertung geben.

Darüber hinaus belegen verschiedene Studien die zentrale Rolle der CYP 1A2. So fand man bei Exposition von Zellkulturen, die humane AT und CYP 1A2 gemeinsam exprimierten eine gegenüber 100 μM IQ (einem heterozyklischen Amin) 18-fach, 147-fach bzw. 156-fach erhöhte Rate an DNS-Addukten, als in Zellen, die CYP 1A2, PABA-AT oder INH-AT allein exprimierten (Probst *et al.* 1992, S. 1715). Eine epidemiologische Studie ergab, dass Personen mit schnellem Phänotyp für INH-AT und CYP 1A2 ein im Vergleich zum langsam/langsamen Phänotyp etwa 3-fach höheres Risiko aufweisen, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. Bei erhöhter Exposition gegenüber heterozyklischen Arylaminen durch häufigeren Genuß von stark gebratenem Fleisch oder Fisch steigt das Risiko auf das 6,5-fache an (Lang *et al.* 1994, S. 679ff.).

5.7.2 Acetyltransferasen in Maus, Hamster, Ratte und Kaninchen

Zur Untersuchung der Auswirkungen dieser komplexen Enzymsysteme auf den Metabolismus und damit die Toxizität von Chemikalien wird häufig auf tierexperimentelle Studien zurückgegriffen. Bei den meisten der gängigen Versuchstierspezies sind neben der Primärstruktur der AT und damit deren katalytischen Eigenschaften auch die molekularen Grundlagen des Polymorphismus und die Organverteilungen der AT vom Menschen sehr verschieden. Es stellt sich daher die Frage nach dem Tiermodell, das den menschlichen Verhältnissen am nächsten kommt. Tab. 32 zeigt den Grad der Verwandtschaft der AT zwischen den Spezies, gemessen an der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz.

Mäuse besitzen drei Gene für AT (Martell *et al.* 1991, S. 223). Zwei davon, die Gene einer monomorphen (AT1) und einer polymorphen AT (AT2) umfassen wie beim Menschen 870 Bp, die für 290 Aminosäuren kodieren und in einem einzigen Exon organisiert sind. Grundlage des genetischen Polymorphismus ist die Mutation der 99. Aminosäure (Martell *et al.* 1991, S. 220f.). Diese Mutation des En-

zyms führt zu einer um ca. 30% reduzierten Aktivität sowie einer stark verkürzten Halbwertszeit. Dabei werden Transkription und Translation nicht beeinträchtigt, wie dies bei dem entsprechenden Isoenzym des Menschen der Fall ist (Blum *et al.* 1991, S. 5239f.; Martell *et al.* 1992, S. 267ff.).

Tab. 32: Homologie der Aminosäuresequenz von Acetyltransferasen bei verschiedenen Versuchstierspezies und dem Menschen

	Mensch	Maus		Hamster		Kaninchen	
	NAT2	NAT1	NAT2	NAT1	NAT2	NAT1	NAT2
Mensch							
NAT1	81,0	74,5	81,7	71,4	81,7	74,8	72,0
NAT2		71,7	74,5	68,6	74,8	72,8	73,1
Maus							
NAT1			81,4	83,8	82,1	65,2	66,9
NAT2				78,3	92,8	72,4	73,1
NAT3				67,2	73,1	62,8	61,4
Hamster							
NAT1					79,0	69,7	70,3
NAT2						73,4	74,1
Kaninchen							
NAT1							95,2

Dargestellt ist der Grad der Homologie von NAT1 und NAT2 sowohl innerhalb der Spezies, als auch zwischen den Spezies Maus, Hamster, Kaninchen und Mensch. Für die Ratte sind keine Angaben verfügbar. Angaben in %. Daten aus Vatsis *et al.* 1995, S. 3

Weiterhin ist nachteilig, dass sich nicht nur die Substratspezifitäten beider muriner AT in hohem Maße überlappen, sondern diese großen Unterschiede zum Menschen aufweisen. So wird beispielsweise SMZ von keiner der murinen AT und PABA ausschließlich durch AT2 metabolisiert (Martell *et al.* 1992, S. 267f.). Die für die Kanzerogenese wichtigen Substanzklassen der N-Hydroxy-Arylamine und besonders der Heterozyklen sind schlechte Substrate beider AT bei Mäusen (Shinohara *et al.* 1986, S. 4364).

Die Organverteilung des Polymorphismus, der bei der Maus in Leber, Blut, Blase, Niere, Lunge, Haut und Darm exprimiert wird, unterscheidet sich deutlich von der Verteilung beim Menschen (Litterst *et al.* 1975, S. 261; Glowinski und Weber 1982, S. 1435; Mattano und Weber 1987, S. 134ff.; Kawakubo *et al.* 1988, S. 267). Darüber hinaus unterliegen die AT-Aktivitäten einer hormonellen Kontrolle - eine Eigenschaft, die nur bei der Maus zu finden ist (Glowinski und Weber 1982, S. 1435; Smolen *et al.* 1993, S. 855).

Der syrische Hamster, ein ebenfalls weithin benutztes Tiermodell, besitzt zwei Gene für AT, die in Länge und Struktur den menschlichen Genen gleichen (Ferguson *et al.* 1994a, S. 86; Nagata *et al.* 1994, S. 95). Das AT2-Gen weist neben stillen Mutationen eine weitere Mutation auf, die bei der Translation zum einem vorzeitigen Kettenabbruch führt. Homozygote Hamster mit dieser Mutation zeigen daher keine AT2-Aktivität (Nagata *et al.* 1994, S. 98).

Die AT1 des Hamsters setzt bevorzugt Substrate der menschlichen INH-AT, wie INH oder Procainamid um, während AT2 bevorzugt PABA acetyliert. Aktivitäten der O- oder Transacetylierung sind im wesentlichen auf die AT1 beschränkt, was einen weiteren Unterschied zu menschlichen AT darstellt (Hein 1988, S. 52; Ozawa *et al.* 1990, S. 2140f.; Ferguson *et al.* 1994a, S. 86f.; Nagata *et al.* 1994, S. 97).

AT2 konnte im Blut und in der Milz, in Leber, Magen, Dünndarm, Kolon, Niere, Blase, Lunge, Haut und Gehirn des Hamsters nachgewiesen werden, und entspricht damit etwa der Verteilung der PABA-AT beim Menschen (Hein *et al.* 1987, S. 69; Kawakubo *et al.* 1988, S. 267; Land *et al.* 1994, S. 1587; Hein *et al.* 1994a, S. 19f.). Die Organverteilung der AT1 des Hamsters scheint im wesentlichen der von AT2 zu folgen (Hein *et al.* 1991c, S. 700f.; Land *et al.* 1994, S. 1587), auch hier ein deutlicher Unterschied zum Menschen.

Bei der Ratte ist interessanterweise relativ wenig über die AT bekannt (Weber 1987, S. 127; vgl. Vatsis *et al.* 1995, S. 3). Eine anscheinend monomorphe AT (AT1) acetyliert Procainamid, SMZ, 4-ABP und Heterozyklen, während PABA, p-Aminosalizylsäure und 2-AF vorwiegend durch eine polymorphe AT acetyliert werden (Tannen und Weber 1979, S. 275; Weber und Hein 1985, S. 69; Hein *et al.* 1991b, S. 934f.). Dies entspricht weitgehend dem Muster der Substratspezifitäten der AT bei Maus oder Hamster. Heterozyklen werden durch AT der Rattenleber nur schlecht N-acetyliert, während die N-Hydroxyl-Derivate gute Substrate sind (Shinohara *et al.* 1986, S. 4364). Auch hier scheint die O- und Transacetylierung nahezu ausschließlich durch die AT1 katalysiert zu werden (Wick und Hanna 1990, S. 997ff.; Land *et al.* 1993, S. 1445).

AT2 konnte bei Ratten außer in der Leber noch im Blut, in der Milz, in Dünndarm, Kolon, Pankreas, Lunge, Niere, Prostata, Blase und der Haut nachgewiesen werden (Sonawane und Lucier 1975, S. 101; Weber und Hein 1985, S. 69; Martell und Weber 1988, Nr. 4903; Kawakubo *et al.* 1988, S. 267; Hein *et al.* 1991a, S. 233). AT1 scheint ebenfalls in den meisten Geweben vorzukommen (Lit-

terst *et al.* 1975, S. 261f.; Hein *et al.* 1991a, S. 233). Es zeigt sich somit eine Situation, wie sie auch beim Hamster anzutreffen ist.

Stämme schnell acetylierender Kaninchen besitzen je ein Gen für eine monomorphe und eine polymorphe AT, während bei Stämmen langsamer Acetylierer das AT2-Gen vollständig fehlt (Blum *et al.* 1989, S. 9556; Sasaki *et al.* 1991, S. 13244ff.). Die Gene umfassen wie beim Menschen 870 Bp, die Proteine von jeweils 290 Aminosäuren kodieren. Die Proteine der beiden AT unterscheiden sich lediglich durch 13 Aminosäuren (Andres *et al.* 1987, S. 450; Sasaki *et al.* 1991, S. 13244ff.).

AT2 acetyliert die typischen Substrate der menschlichen INH-AT, wie SMZ, INH, Dapson oder Procainamid, darüber hinaus aber auch Substrate der menschlichen PABA-AT wie 2-AF, p-Aminosalizylsäure und, allerdings schlechter, PABA (Gordon *et al.* 1973, S. 140; Sasaki *et al.* 1991, S. 13244). Auch AT1 scheint SMZ und PABA zu acetylieren, so dass eine erhebliche Überlappung der Substratspezifitäten beider AT besteht (vgl. Andres und Weber 1986, S. 383; Sasaki *et al.* 1991, S. 13249). Anbetracht der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (vgl. Tab. 32) ist dies nicht verwunderlich. AT2 weist zusätzlich O- und Transacetylierungsaktivität auf (Glowinski *et al.* 1980, S. 7885f.; Ilett *et al.* 1991, S. 1466).

AT1 ist in allen Geweben anzutreffen mit Aktivitäten insbesondere in Leber, Darm, Lunge, Niere, Milz, Blut, Pankreas und Gehirn, wohingegen AT2 ausschließlich in der Leber und entlang des Darms, sowie mit geringer Aktivität in der Lunge nachgewiesen wurde (Hearse und Weber 1973, S. 521; Reeves *et al.* 1991, S. 44ff.). Diese Organverteilung stimmt mit der Situation beim Menschen, wie sie von uns gefunden wurde, exakt überein.

5.7.3 Ausblick

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass sich Maus, Hamster und Ratte hinsichtlich des Substratspektrums von AT1 und AT2, der Fähigkeit zur O- oder Transacetylierung und der Organverteilung der AT grundlegend von den Verhältnissen beim Menschen unterscheiden. Dabei weist die Maus aufgrund von Besonderheiten wie einer Hormonabhängigkeit oder eines dritten AT-Gens die größten Unterschiede zum Menschen auf. Das Kaninchen zeigt als einziges der gängigen Labortiere ein dem Menschen ähnliches Substratspektrum der AT. Auch stimmt die Organverteilung der AT dieser Spezies sehr gut mit der beim Menschen gefundenen Verteilung überein. Allerdings bestehen auch für die AT des Kaninchens noch einige Unterschiede zur Situation beim Menschen. So werden die für die zwei

menschlichen AT spezifischen Substrate PABA bzw. INH beide durch die polymorphe AT des Kaninchens acetyliert (Gordon *et al.* 1973, S. 140; Sasaki *et al.* 1991, S. 13244). Für tierexperimentelle Untersuchungen erscheint das Kaninchenmodell daher insgesamt als das am besten geeignete. Auch dann, wenn die Bedeutung der INH-AT für die Toxizität von Chemikalien direkt untersucht werden soll, bieten sich - neben dem etwas schlechter geeigneten Hamstermodell - besonders Kaninchenstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund für dieses Enzym an.

Bisher stand die Klärung der Rolle der AT in der Karzinogenese des Blasen- und Kolonkarzinoms sehr im Vordergrund (z.B. Kadlubar *et al.* 1977, S. 807; Lower *et al.* 1979, S. 75; Risch *et al.* 1995, S. 233; Roberts-Thomson *et al.* 1996, S. 1373), gefolgt von Untersuchungen zum Lungenkarzinom (z.B. Burgess und Trafford 1985, S. 17f.; Philip *et al.* 1988, S. 491ff; Cascorbi *et al.* 1996b, S. 3961ff.; Bouchardy *et al.* 1999, S. 291ff.). Besonders im Hinblick auf die ungelöste Frage, ob und inwieweit Nitroaromaten an der kanzerogenen Wirkung von Dieselabgasen beteiligt sind, erscheint eine intensive Bearbeitung dieser Fragestellung für die Zukunft von Bedeutung.

In letzter Zeit wird ein breites Spektrum von Krankheiten auf einen möglichen Zusammenhang mit den AT-Polymorphismen hin untersucht: Karzinome der Mamma (Ambrosone *et al.* 1996, S. 1494ff.; Hunter *et al.* 1997, S. 2127ff.; Millikan *et al.* 1998, S. 371ff.; Zheng *et al.* 1999, S. 233ff.; Huang *et al.* 1999, S. 175ff.), der Leber (Agundez *et al.* 1996b, S. 501ff.; Chen *et al.* 1997, S. 294ff.), der Prostata (Fukutome *et al.* 1999, S. 83ff.), von Kopf und Hals (Gonzalez *et al.* 1998, S. 294ff.; Henning *et al.* 1999, S. 103ff.; Morita *et al.* 1999, S. 685ff.), Plattenepithelkarzinome von Mund (Katoh *et al.* 1998, S. 1803ff.) und Ösophagus (Morita *et al.* 1998, S. 517ff.), Morbus Parkinson (Bandmann *et al.* 1997, S. 1136ff.; Agundez *et al.* 1998a, S. 1587ff.; Harhangi *et al.* 1999, S. 518ff.; Bandmann *et al.* 1999, S. 199ff.) und Morbus Alzheimer (Rocha *et al.* 1999, S. 9ff.), Endometriose (Baranova *et al.* 1999, S. 636ff.), Sarkoidose (Asada *et al.* 1997, S. 341ff.), atopischen Hautkrankheiten (Zielinska *et al.* 1997, S. 635ff; Gawronska-Szklarz *et al.* 1999, S. 562ff.) und Lupus Erythematodes (v. Schmiedeberg *et al.* 1999, S. 147ff.) und sogar Diabetes mellitus (Agundez *et al.* 1996a, S. 465ff.). In der Regel zeigt sich kein Zusammenhang mit den AT. Angesichts des offensichtlich erwachten Interesse an diesem Bereich der molekularen Epidemiologie stehen für die Zukunft wohl interessante Ergebnisse zu erwarten.

6 Zusammenfassung

Zahlreiche toxikologische und epidemiologische Untersuchungen haben belegt, dass Acetyltransferasen eine zentrale Rolle beim Metabolismus potentiell kanzerogener aromatischer Amine und Nitroarene spielen und ihnen demzufolge eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung von Tumoren durch diese Verbindungen zukommt.

Die Acetyltransferasen (AT) des Menschen liegen in zwei Formen vor, die sich anhand ihrer hohen Spezifität für die Substrate p-Aminobenzoesäure (PABA) und Isoniazid (INH) unterscheiden lassen. Die gegenwärtigen Kenntnisse über das Vorkommen und die Aktivitätsspiegel dieser Enzyme in menschlichen Geweben sind unsicher und lückenhaft. Einer der Gründe dafür ist in der Instabilität der AT zu suchen, die bei den bisherigen Untersuchungen oft nicht genügend berücksichtigt wurde. Ein weiterer Grund liegt in der geringen Spezifität und Sensitivität der Verfahren, die häufig zur Bestimmung der beiden AT-Aktivitäten eingesetzt wurden.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, Bedingungen zu erarbeiten, unter denen der Verlust der Enzymaktivität während des Transportes, der Lagerung und Aufarbeitung des Probenmaterials möglichst gering gehalten werden kann. Nach Etablierung dieser Bedingungen sollte die Aktivität der beiden AT-Formen v.a. in den Ein- und Austrittspforten für potentiell toxische Chemikalien, d.h. in Lunge, Darm, Urogenitaltrakt und Haut, bestimmt werden.

Als Markersubstrate für die Erfassung der beiden AT-Formen wurden PABA und INH gewählt, deren acylierte Produkte mittels HPLC-gestützter Verfahren bestimmt wurden. Diese Verfahren zeichnen sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus. Die Proben menschlicher Gewebe wurden im Rahmen von ohnehin erforderlichen Operationen in Münchener Kliniken gewonnen. Mögliche Einflußfaktoren auf die Aktivität der AT wurden mit einem eigens für diese Studie entwickelten Fragebogen erfaßt.

Die Untersuchungen zu den Versuchsbedingungen ergaben, dass die Aufbewahrung der Proben bei Temperaturen von -80 °C oder -180 °C erhebliche Verluste der AT-Aktivitäten nach sich zieht, wobei diese für die PABA-AT deutlich stärker ausgeprägt sind als für die INH-AT. Wurden die Proben dagegen bei Temperaturen von +4 °C gelagert, so war über einen Zeitraum bis zu zehn Stunden weder für die PABA-AT noch die INH-AT eine signifikante Abnahme zu beobachten. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde daher das Probenmaterial nicht eingefroren, sondern während der Transport- und

Verarbeitungsphase auf etwa +4 °C gekühlt und innerhalb weniger Stunden zur Enzymbestimmung herangezogen.

Unter den genannten Versuchsbedingungen fanden sich in sämtlichen Gewebeproben von Haut, Niere, Harnleiter, Harnblase, Prostata, Leber, Pankreas, Dünndarm, Kolon, Rektum und Lunge deutliche Aktivitäten der PABA-AT. Diese lagen für die meisten Gewebe in der Größenordnung von 1,5 – 3 nmol/mg/min. Aktivitäten in Geweben des Darmtrakts lagen mit etwa 8 nmol/mg/min deutlich höher, in Pankreasproben mit ca. 0,5 – 1 nmol/mg/min etwas niedriger als in den übrigen Geweben. Im Gegensatz dazu waren signifikante INH-AT-Aktivitäten nur in wenigen Geweben zu beobachten. In den Proben von Leber und Darm erreichten sie Größenordnungen von etwa 100 – 300 pmol/mg/min, in der Lunge lediglich 50 pmol/mg/min. Die interindividuellen Schwankungen lagen mit durchschnittlich etwa 50% um den Mittelwert bei der PABA-AT und ca. 40% bei INH-AT für alle Gewebe auf einem Niveau. Die Varianz war dabei bei den Aktivitäten der PABA-AT etwas deutlicher ausgeprägt als bei der INH-AT. Der Befund, dass in einigen Geweben wie Haut oder Niere erhebliche Aktivitäten der PABA-AT, aber keine signifikanten INH-AT-Aktivitäten zu finden sind, verweist nochmals auf die hohe Spezifität der verwendeten Markersubstrate.

Ein eindeutiger Einfluß endogener oder exogener Faktoren auf die Aktivität der beiden AT, z.B. durch das Lebensalter, Höhe der Blutzuckerwerte oder Einnahme bestimmter Arzneimittel, war nicht nachweisbar. In Anbetracht der begrenzten Zahl von Patienten, die für ein einzelnes Gewebe nicht mehr als acht betrug, ist diese Aussage allerdings mit einigem Vorbehalt zu sehen.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse zur Gewebsverteilung der beiden AT-Formen beim Menschen mit Berichten zu ihrer Verteilung bei den gängigen Versuchstierarten, so bestehen für Maus, Ratte und Hamster größere Unterschiede zu den Verhältnissen beim Menschen. Lediglich das Kaninchen zeigt eine gewisse Ähnlichkeit und bietet sich daher am ehesten als Modell zur Untersuchung der Wirkung der AT bei der Aktivierung von Prokanzerogenen an.

Insgesamt erweitern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Aktivität der AT in menschlichen Geweben die Basis, auf der eine Risikoabschätzung für die Belastung des Menschen mit kanzerogenen Substanzen vom Typ der aromatischen Amine und Nitroarene vorgenommen werden kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Abe M., Deguchi T. und Suzuki T. (1993): The structure and characteristics of a fourth allele of polymorphic N-acetyltransferase gene found in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Comm*, **191**, 811-816.
2. Agundez J.A., Jimenez-Jimenez F.J., Luengo A, Molina J.A., Orti-Pareja M., Vazquez A., Ramos F., Duarte J., Coria F., Ladero J.M., Alvarez-Cermeno J.C. und Benitez J. (1998a): Slow allotypic variants of the NAT2 gene and susceptibility to early-onset Parkinson's disease. *Neurology*, **51**, 1587-1592.
3. Agundez J.A., Martinez C., Olivera M., Gallardo L., Ladero J.M., Rosado C., Prados J., Rodriguez-Molina J., Resel L. und Benitez J. (1998b): Expression in human prostate of drug- and carcinogen-metabolizing enzymes: association with prostate cancer risk. *Br J Cancer*, **78**, 1361-1367.
4. Agundez J.A., Martinez C., Olivera M., Ledesma M.C., Ladero J.M. und Benitez J. (1994): Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. *Clin Pharmacol Ther*, **56**, 202-209.
5. Agundez J.A., Menaya J.G., Tejada R., Lago F., Chavez M. und Benitez J. (1996a): Genetic analysis of the NAT2 and CYP2D6 polymorphisms in white patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pharmacogenetics*, **6**, 465-472.
6. Agundez J.A., Olivera M., Ladero J.M., Rodriguez-Lescure A., Ledesma M.C., Diaz-Rubio M., Meyer U.A. und Benitez J. (1996b): Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and CYP2D6-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics*, **6**, 501-512.
7. Agundez J.A., Rodriguez I., Olivera M., Ladero J.M., Garcia M.A., Ribera J.M. und Benitez J. (1997): CYP2D6, NAT2 and CYP2E1 genetic polymorphisms in nonagenarians. *Age and Aging*, **26**, 147-151.
8. Allgayer H., Ahnfelt N.O., Kruis W., Klotz U., Frank-Holmberg K., Söderberg H.N.A. und Paumgartner G. (1989): Colonic N-acetylation of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **97**, 38-41.
9. Ambrosone C.B., Freudenheim J.L., Graham S., Marshall J.R., Vena J.E., Brasure J.R., Michalek A.M., Laughlin R., Nemoto T., Gillenwater K.A. und Shields P.G. (1996): Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *JAMA*, **276**, 1494-1501.
10. Anderson K.E., Hammons G.J., Kadlubar F.F., Potter J.D., Kaderlik K.R., Ilett K.F., Minchin R.F., Teitel C.H., Chou H.C., Martin M.V., Guengerich F.P., Barone G.W., Lang N.P. und Peterson L.A. (1997): Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. *Carcinogenesis*, **18**, 1085-1092.
11. Andres H.H. und Weber W.W. (1986): N-acetylation pharmacogenetics: Michaelis-Menten constants for arylamine drugs as predictors of their N-acetylation rates in vivo. *Drug Metab Dispos*, **14**, 382-385.

12. Andres H.H., Klem A.J., Szabo S.M. und Weber W.W. (1985): New spectrophotometric and radiochemical assays for acetyl-CoA: arylamine N-acetyltransferase applicable to a variety of arylamines. *Analyt Biochem*, **145**, 367-375.
13. Andres H.H., Vogel R.S., Tarr G.E., Johnson L. und Weber W.W. (1987): Purification, physicochemical, and kinetic properties of liver acetyl-CoA: arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylator rabbits. *Mol Pharmacol*, **31**, 446-456.
14. Asada M., Goto H., Abe M., Tachibana T., Suzuki Y. und Suzuki T. (1997): N-acetylation polymorphism in Japanese patients with sarcoidosis. *Pharmacogenetics*, **7**, 341-344.
15. Asproдини E.K., Zifa E., Papageorgiou I. und Benakis A. (1998): Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, **23**, 501-506.
16. Aynacioglu A.S., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. und Roots I. (1997): Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in a Turkish population. *Pharmacogenetics*, **7**, 327-331.
17. Bandmann O., Vaughan J., Holmans P., Marsden C.D. und Wood NW (1997): Association of slow acetylator genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *Lancet*, **350**, 1136-1139.
18. Bandmann O., Vaughan J., Holmans P.A., Marsden C.D. und Wood N.W. (1999): Toxins, genetics, and Parkinson's disease: the role of N-acetyltransferase 2. *Adv Neurol*, **80**, 199-204.
19. Baranova H., Canis M., Ivaschenko T., Albuissou E., Bothorishvilli R., Baranov V., Malet P. und Bruhat M.A. (1999): Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis. *Mol Hum Reprod*, **5**, 636-641.
20. Bartsch H., Caporaso N., Coda M., Kadlubar F.F., Malaveile C., Skipper P.L., Talaska G., Tannenbaum S.R. und Vineis P. (1990): Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 1826-1831.
21. Bartsch H., Dworkin M., Miller J.A. und Miller E.C. (1972): Electrophilic N-acetoxyaminoarenes derived from carcinogenic N-Hydroxy-N-acetylaminoarenes by enzymatic deacetylation and transacetylation in liver. *Biochim Biophys Acta*, **286**, 272-298.
22. Baty J.D., Lindsay R.M. und Sharp S. (1986): Use of high-performance liquid chromatography in the measurement of in vitro acetylation in man. *J Chromatogr*, **353**, 329-337.
23. Beland F.A., Beranek D.T., Dooley K.L., Heflich R.H. und Kadlubar F.F. (1983): Arylamine-DNA adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **49**, 125-134.
24. Bell D.A., Stephens D.A., Castranio T., Umbach D.M., Watson M., Deakin M., Elder J., Handrickse C., Duncan H. und Strange R.C. (1995): Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, **55**, 3537-3542.

25. Bell D.A., Taylor J.A., Butler M.A., Stephens E.A., Wiest J., Brubaker L.H., Kadlubar F.F. und Lucier G.W. (1993): Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*, **14**, 1689-1692.
26. Blum M., Demierre A., Grant D.M., Heim M. und Meyer U.A. (1991): Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 5237-5241.
27. Blum M., Grant D.M., Demierre A. und Meyer U.A. (1989): N-acetylation pharmacogenetics: a gene deletion causes absence of arylamine N-acetyltransferase in liver of slow acetylator rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 9554-9557.
28. Blum M., Grant D.M., McBride W., Heim M. und Meyer U.A. (1990): Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol*, **9**, 193-203.
29. Bock K.W. (1991): Roles of UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **26**, 129-150.
30. Boobis A.R., Lynch A.M., Murray S., de la Torre R., Solans A., Farré M., Segura J., Gooderham N.J. und Davies D.S. (1994): CYP 1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res*, **54**, 89-94.
31. Booth J. (1966): Acetyl transfer in arylamine metabolism. *Biochem J*, **100**, 745-753.
32. Bouchardy C., Mitrunen K., Wikman H., Husgafvel-Pursiainen K., Dayer P., Benhamou S. und Hirvonen A. (1998): N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics*, **8**, 291-298.
33. Bruhn C., Brockmoeller J., Cascorbi I., Roots I. und Borchert H.H. (1999): Correlation between genotype and phenotype of the human arylamine N-acetyltransferase type 1 (NAT1). *Biochem Pharmacol*, **58**, 1759-1764.
34. Burgess E.J. und Trafford J.A.P. (1985): Acetylator phenotype in patients with lung carcinoma - a negative report. *Eur J Respir Dis*, **67**, 17-19.
35. Burrows A.W., Hockaday T.D.R., Mann J.I. und Taylor J.G. (1978): Diabetic dimorphism according to acetylator status. *BMJ*, **1**, 208-210.
36. Butcher N.J., Ilett K.F. und Minchin R.F. (1998): Functional polymorphism of the human arylamine N-acetyltransferase type 1 gene caused by C190T and G560A mutations. *Pharmacogenetics*, **8**, 67-72.
37. Butler M.A., Iwasaki M., Guengerich F.P. und Kadlubar F.F. (1989): Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 7696-7700.
38. Cartwright R.A. (1983): Historical and modern epidemiological studies on populations exposed to N-substituted aryl compounds. *Environ Health Perspect*, **49**, 13-19.

39. Cartwright R.A., Rogers H.J., Barham-Hall D., Glashan R.W., Ahmad R.A., Higgins E. und Kahn M.A. (1982): Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 1982/**II**, 842-846.
40. Cascorbi I., Brockmoeller J., Bauer S., Reum T. und Roots I. (1996a): NAT2*12A (803A--G) codes for rapid arylamine N-acetylation in humans. *Pharmacogenetics*, **6**, 257-259.
41. Cascorbi I., Brockmoeller J., Mrozikiewicz P.M., Bauer S., Loddenkemper R. und Roots I. (1996b): Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res*, **56**, 3961-3966.
42. Cascorbi I., Drakoulis N., Brockmüller J., Mauer A., Sperling K. und Roots I. (1995): Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Gen*, **57**, 581-592.
43. Chen C.J., Yu M.W. und Liaw Y.F. (1997): Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroent Hepatol*, **12**, 294-308.
44. Chen J., Stampfer M.J., Hough H.L., Garcia-Closas M., Willett W.C., Hennekens C.H., Kelsey K.T. und Hunter D.J. (1998): A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, **58**, 3307-3311.
45. Chou H.C., Lang N.P. und Kadlubar F.F. (1994): Metabolic activation of N-Hydroxy arylamines and N-Hydroxy heterocyclic amines by human sulfotransferase(s). *Cancer Res*, **55**, 525-529.
46. Chung J.G., Chang H.L., Lin W.C., Yeh F.T. und Hung C.F. (1999): Effects of ibuprofen on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *J Appl Toxicol*, **19**, 1-6.
47. CIBA-GEIGY AG (Ed.), (1985): Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik. 8. Auflage, Basel: 188-195
48. Clark D.W.J. (1985): Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*, **29**, 342-375.
49. Cribb A.E., Grant D.M., Miller M.A. und Spielberg S.P. (1991): Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **259**, 1241-1246.
50. Cribb A.E., Nakamuro H., Grant D.M., Miller M.A. und Spielberg S.P. (1993): Role of polymorphic and monomorphic human arylamine N-acetyltransferases in determining sulfamethoxazole metabolism. *Biochem Pharmacol*, **45**, 1277-1282.
51. Culp S.J., Roberts D.W., Talaska G., Lang N.P., Fu P.P., Lay J.O. Jr., Teitel C.H., Snawder J.E., von Tungeln L.S. und Kadlubar F.F. (1997): Immunochemical, 32P-postlabeling, and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary N-oxidation, conjugation, and peroxidation. *Mutat Res*, **378**, 97-112.
52. Deguchi T. (1992a): Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver. *J Biol Chem*, **267**, 18140-18147.

53. Deguchi T. (1992b): Physiology and molecular biology of arylamine N-acetyltransferases. *Bio-med Res*, **13**, 231-242.
54. Deguchi T., Mashimo M. und Suzuki T. (1990): Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem*, **265**, 12757-12760.
55. Delomenie C., Goodfellow G.H., Krishnamoorthy R., Grant D.M. und Dupret J.M. (1997): Study of the role of the highly conserved residues Arg9 and Arg64 in the catalytic function of human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem J*, **323**, 207-215.
56. Delomenie C., Sica L., Grant D.M., Krishnamoorthy R. und Dupret J.M. (1996): Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics*, **6**, 177-185.
57. Doll M.A., Jiang W., Deitz A.C., Rustan T.D. und Hein D.W. (1997): Identification of a novel allele at the human NAT1 acetyltransferase locus. *Biochem Biophys Res Com*, **233**, 584-591.
58. Drayer D.E., Strong J.M., Jones B., Sandler A. und Reidenberg M.M. (1974): In vitro acetylation of drugs by human blood cells. *Drug Metab Dispos*, **2**, 499-505.
59. Dull B.J., Salata K. und Goldman P. (1987): Role of intestinal flora in the acetylation of sulfasalazine metabolites. *Biochem Pharmacol*, **36**, 3772-3774.
60. Dupret M.-J. und Grant D.M. (1992): Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in escherichia coli. *J Biol Chem*, **267**, 7381-7385.
61. Dupret M.-J., Goodfellow G.H., Janezic S.A. und Grant D.M. (1994): Structure-function studies of human arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2. *J Biol Chem*, **269**, 26830-26835.
62. duSouich P. und Courteau H. (1981): Induction of acetylating capacity with complete Freund's adjuvant and hydrocortisone in the rabbit. *Drug Metab Dispos*, **9**, 279-283.
63. Ebisawa T. und Deguchi T. (1991): Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem Biophys Res Comm*, **177**, 1252-1257.
64. Evans D.A.P. (1984): Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. *J Med Gen*, **21**, 243-253.
65. Evans D.A.P. (1989): N-acetyltransferase. *Pharmac Ther*, **42**, 157-234.
66. Ferguson R.J., Doll M.A., Rustan T.D., Baumstark B.R. und Hein D.W. (1994a): Syrian hamster monomorphic N-acetyltransferase (NAT1) alleles: amplification, cloning, sequencing, and expression in E. coli. *Pharmacogenetics*, **4**, 82-90.
67. Ferguson R.J., Doll M.A., Rustan T.D., Gray K. und Hein D.W. (1994b): Cloning, expression, and functional characterization of two mutant (NAT2 191 and NAT2 341/803) and wild-type human polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) alleles. *Drug Metab Dispos*, **22**, 371-376.

68. Flammang T.J., Hein D.W., Talaska G. und Kadlubar F.F. (1988): N-Hydroxy-arylamine O-acetyltransferase and its relationship to aromatic amine N-acetyltransferase polymorphism in the inbred hamster and in human tissue cytosol. *In*: King C.M., Romano L.J., Schuetzle D. (Ed.): Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes. New York, Amsterdam, London: Elsevier, 137-148.
69. Flammang T.J., Yamazoe Y., Guengerich F.P. und Kadlubar F.F. (1987): The S-acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of the carcinogen N-Hydroxy-2-aminofluorene by human liver cytosol and its relationship to the aromatic amine N-acetyltransferase phenotype. *Carcinogenesis*, **8** 1967-1970.
70. Frederickson S.M., Messing E.M., Reznikoff C.A. und Swaminathan S. (1994): Relationship between in vivo acetylator phenotypes and cytosolic N-acetyltransferase and O-acetyltransferase activities in human uroepithelial cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **3**, 25-32.
71. Fuhr U., Rost K.L., Engelhardt R., Sachs M., Liermann D., Belloc C., Beaune P., Janezic S., Grant D., Meyer U.A. und Staib A.H. (1996): Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. *Pharmacogenetics*, **6**, 159-176.
72. Fukutome K., Watanabe M., Shiraishi T., Murata M., Uemura H., Kubota Y., Kawamura J., Ito H. und Yatani R. (1999): N-acetyltransferase 1 genetic polymorphism influences the risk of prostate cancer development. *Cancer Lett*, **136**, 83-87.
73. Gawronska-Szklarz B., Luszawska-Kutrzeba T., Czaja-Bulsa G. und Kurzawski G. (1999): Relationship between acetylation polymorphism and risk of atopic diseases. *Clin Pharmacol Ther*, **65**, 562-569.
74. Gilissen R.A.H.J., Bamforth K.J., Stavenuiter J.F.C., Coughtrie M.W.H. und Meerman J.H.N. (1994): Sulfation of aromatic hydroxamic acids and hydroxylamines by multiple forms of human liver sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **15**, 39-45.
75. Glowinski I.B. und Weber W.W. (1982): Biochemical characterization of genetically variant aromatic amine N-acetyltransferases in A/J and C57BL/6J mice. *J Biol Chem*, **257**, 1431-1437.
76. Glowinski I.B., Radtke H.E. und Weber W.W. (1978): Genetic variation in N-acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver. *Mol Pharmacol*, **14**, 940-949.
77. Glowinski I.B., Savage L., Lee M.-S. und King C.M. (1983): Relationship between nucleic acid adduct formation and deacylation of arylhydroxamic acids. *Carcinogenesis*, **4**, 67-75.
78. Glowinski I.B., Weber W.W., Fysh J.M., Vaught J.B. und King C.M. (1980): Evidence that arylhydroxamic acid N,O-acyltransferase and the genetically polymorphic N-acetyltransferase are properties of the same enzyme in rabbit liver. *J Biol Chem*, **255**, 7883-7890.
79. Goldstein J.A. und Faletto M.B. (1993): Advances in Mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ Health Perspect*, **100**, 169-176.
80. Gonzalez M.V., Alvarez V., Pello M.F., Menendez M.J., Suarez C. und Coto E. (1998): Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol*, **51**, 294-298.

81. Gordon G.R., Shafizadeh A.G. und Peters J.H. (1973): Polymorphic acetylation of drugs in rabbits. *Xenobiotica*, **3**, 133-150.
82. Grant D.M. (1993): Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, **3**, 45-50.
83. Grant D.M., Blum M., Beer M. und Meyer U.A. (1991): Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol Pharmacol*, **39**, 184-191.
84. Grant D.M., Josephy P.D., Lord H.L. und Morrison L.D. (1992a): Salmonella typhimurium strains expressing human arylamine N-acetyltransferases: metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res*, **52**, 3961-3964.
85. Grant D.M., Mörike K., Eichelbaum M. und Meyer U.A. (1990): Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Clin Invest*, **85**, 968-972.
86. Grant D.M., Vohra P., Avis Y. und Ima A. (1992b): Detection of a new polymorphism of human arylamine N-acetyltransferase NAT1 using p-aminosalicylic acid as an in vivo probe. *Basic Clin Physiol Pharmacol*, **3**, Suppl., 244
87. Hadasova E., Walter R., Siegmund W. und Scheuch E. (1994): Influence of H₂-receptor antagonists on activities of the polymorphic N-acetyltransferase and of specific monooxygenases in rats. [Abstract] *NS Arch Pharm*, **349** Supp, R4
88. Hanssen H.-P., Agarwal D.P., Goedde H.W., Bucher H., Huland H., Brachmann W. und Ovenbeck R. (1985): Association of N-acetyltransferase polymorphism and environmental factors with bladder carcinogenesis. *Eur Urol*, **11**, 263-266.
89. Harhangi B.S., Oostra B.A., Heutink P., van Duijn C.M., Hofman A. und Breteler M.M. (1999): N-acetyltransferase-2 polymorphism in Parkinson's disease: the Rotterdam study. *J Neurol Neurosurg Psy*, **67**, 518-520.
90. Hearse D.J. und Weber W.W. (1973): Multiple N-acetyltransferases and drug metabolism. *Biochem J*, **132**, 519-526.
91. Hein D.W. (1988): Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **948**, 37-66.
92. Hein D.W., Doll M.A., Gray K., Rustan T.D. und Ferguson R.J. (1993 a): Metabolic activation of N-Hydroxy-2-aminofluorene and N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene by monomorphic N-acetyltransferase (NAT1) and polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) in colon cytosols of syrian hamsters congenic at the NAT2 locus. *Cancer Res*, **53**, 509-514.
93. Hein D.W., Doll M.A., Rustan T.D. und Ferguson R.J. (1995): Metabolic activation of N-Hydroxyarylamines and N-Hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res*, **55**, 3531-3536.
94. Hein D.W., Doll M.A., Rustan T.D., Gray K., Feng Y., Ferguson R.J. und Grant D.M. (1993 b): Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis*, **14**, 1633-1638.

95. Hein D.W., Doll M.A., Rustan T.D., Gray K., Ferguson R.J. und Feng Y. (1994a): Construction of syrian hamster lines congenic at the polymorphic acetyltransferase locus (NAT2): acetylator genotype-dependent N- and O-acetylation of arylamine carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol*, **124**, 16-24.
96. Hein D.W., Ferguson R.J., Doll M.A., Rustan T.D. und Gray K., (1994b): Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *Hum Mol Gen*, **3**, 729-734.
97. Hein D.W., Hirata M. und Weber W.W. (1981): An enzyme marker to ensure reliable determinations of human isoniazid acetylator phenotype in vitro. *Pharmacol*, **23**, 203-210.
98. Hein D.W., Kirilin W.G., Ogolla F. und Trinidad A. (1987): Extrahepatic expression of N-acetylator genotype in the inbred hamster. *Drug Metab Dispos*, **15**, 68-73.
99. Hein D.W., Rustan T.D., Bucher K.D. und Miller L.S. (1991c): Polymorphic and monomorphic expression of arylamine carcinogen N-acetyltransferase isozymes in tumor target organ cytosols of syrian hamsters congenic at the polymorphic acetyltransferase locus. *J Pharmacol Exp Ther*, **259**, 699-704.
100. Hein D.W., Rustan T.D., Bucher K.D., Furman E.J. und Martin W.J. (1991a): Extrahepatic expression of the N-acetylation polymorphism toward arylamine carcinogens in tumor target organs of an inbred rat model. *J Pharmacol Exp Ther*, **258**, 232-236.
101. Hein D.W., Rustan T.D., Bucher K.D., Martin W.J. und Furman E.J. (1991b): Acetylator phenotype-dependent and -independent expression of arylamine N-acetyltransferase isozymes in rapid and slow acetylator inbred rat liver. *Drug Metab Dispos*, **19**, 933-937.
102. Hein D.W., Rustan T.D., Ferguson R.J., Doll M.A. und Gray K. (1994c): Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-Hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Arch Toxicol*, **68**, 129-133.
103. Hein D.W., Rustan T.D., Martin W.J., Bucher K.D., Miller L.S. und Furman E.J. (1992): Acetylator genotype-dependent N-acetylation of arylamines in vivo and in vitro by hepatic and extrahepatic organ cytosols of syrian hamsters congenic at the polymorphic acetyltransferase locus. *Arch Toxicol*, **66**, 112-117.
104. Henning S., Cascorbi I., Muenchow B., Jahnke V. und Roots I. (1999): Association of arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. *Pharmacogenetics*, **9**, 103-111.
105. Hickman D. und Sim E. (1991): N-acetyltransferase polymorphism: comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem Pharmacol*, **42**, 1007-1014.
106. Hickman D., Palamanda J.R., Unadkat J.D. und Sim E. (1995): Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia Coli*. *Biochem Pharmacol*, **50**, 697-703.
107. Hickman D., Pope J., Patil S.D., Fakis G., Smelt V., Stanley L.A., Payton M., Unadkat J.D. und Sim E. (1998): Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine. *Gut*, **42**, 402-409.

108. Hickman D., Risch A., Buckle V., Spurr N.K., Jeremiah S.J., McCarthy A. und Sim E. (1994): Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem Gen*, **297**, 441-445.
109. Hickman D., Risch A., Camilleri J.P. und Sim E. (1992): Genotyping human polymorphic arylamine N-acetyltransferase: identification of new slow allotypic variants. *Pharmacogenetics*, **2**, 217-226.
110. Hirvonen A. (1999): Chapter 20. Polymorphic NATs and cancer predisposition. In: Vineis P., Malats N., Lang M., d'Errico A., Caporaso N., Cuzick J. und Boffetta P. (Ed.): Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. IARC Scientific Publications, **148**, 251-270.
111. Huang C.S., Chern H.D., Shen C.Y., Hsu S.M. und Chang K.J. (1999): Association between N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *Int J Cancer*, **82**, 175-179.
112. Hubbard A.L., Harrison D.J., Moyes C., Wyllie A.H., Cunningham C., Mannion E. und Smith C.A. (1997): N-acetyltransferase 2 genotype in colorectal cancer and selective gene retention in cancers with chromosome 8p deletions. *Gut*, **41**, 229-234.
113. Hubbard A.L., Moyes C., Wyllie A.H., Smith C.A. und Harrison D.J. (1998): N-acetyl transferase 1: two polymorphisms in coding sequence identified in colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, **77**, 913-916.
114. Hughes N.C., Janezic S.A., McQueen K.L., Jewett M.A., Castranio T., Bell D.A. und Grant D.M. (1998): Identification and characterization of variant alleles of human acetyltransferase NAT1 with defective function using p-aminosalicylate as an in-vivo and in-vitro probe. *Pharmacogenetics*, **8**, 55-66.
115. Hunter D.J., Hankinson S.E., Hough H., Gertig D.M., Garcia-Closas M., Spiegelman D., Manson J.E., Colditz G.A., Willett W.C., Speizer F.E. und Kelsey K. (1997): A prospective study of NAT2 acetylation genotype, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, **18**, 2127-2132.
116. Ilett K.F., David B.M., Detchon P., Castleden W.M. und Kwa R. (1987): Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res*, **47**, 1466-1469.
117. Ilett K.F., Ingram D.M., Carpenter D.S., Teitel C.H., Lang N.P., Kadlubar F.F. und Minchin R.F. (1994): Expression of monomorphic and polymorphic N-acetyltransferase in human colon. *Biochem Pharmacol*, **47**, 914-917.
118. Ilett K.F., Kadlubar F.F. und Minchin R.F. (1999): 1998 International Meeting on the Arylamine N-Acetyltransferases: synopsis of the workshop on nomenclature, biochemistry, molecular biology, interspecies comparisons, and role in human disease risk. *Drug Metab Dispos*, **27**, 957-959.
119. Ilett K.F., Reeves P.T., Minchin R.F., Kinnear B.F., Watson H.F. und Kadlubar F.F. (1991): Distribution of acetyltransferase activities in the intestines of rapid and slow acetylator rabbits. *Carcinogenesis*, **12**, 1465-1469.

120. Ireland A., Priddle J.D. und Jewell D.P. (1990): Acetylation of 5-aminosalicylic acid by isolated human colonic epithelial cells. *Clin Sci*, **78**, 105-111.
121. Irshaid Y.M., Al-Hadidi H.F., Abuirjeie M.A., Rawashdeh N.M. und Gharaibeh N.S. (1993): Acetylation of dapsone by human whole blood. *Int J Clin Pharmacol Ther Tox*, **31**, 18-22.
122. Jenne J.W. und Orser M. (1965): Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation of p-aminosalicylic acid. *J Clin Invest*, **44**, 1992-2002.
123. Kadlubar F.F., Butler M.A., Kaderlik K.R., Chou H.C. und Lang N.P. (1992): Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **98**, 69-74.
124. Kadlubar F.F., Miller J.A. und Miller E.C. (1977): Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-Hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res*, **37**, 805-814.
125. Katoh T., Kaneko S., Boissy R., Watson M., Ikemura K. und Bell D.A. (1998): A pilot study testing the association between N-acetyltransferases 1 and 2 and risk of oral squamous cell carcinoma in Japanese people. *Carcinogenesis*, **19**, 1803-1807.
126. Kawakubo Y., Manabe S., Yamazoe Y., Nishikawa T. und Kato R. (1988): Properties of cutaneous acetyltransferase catalyzing N- and O-acetylation of carcinogenic arylamines and N-Hydroxyarylamine. *Biochem Pharmacol*, **37**, 265-270.
127. Kawakubo Y., Yamazoe Y., Kato R. und Nishikawa T. (1990): High capacity of human skin for N-acetylation of arylamines. *Skin Pharmacol*, **3**, 180-185.
128. Kilbane A.J., Petroff T. und Weber W.W. (1988): Michaelis-Menten constants for arylamine drugs in rapid and slow human acetylator liver. *FASEB J*, **2**, A1140
129. Kilbane A.J., Petroff T. und Weber W.W. (1991): Kinetics of acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylator human liver. *Drug Metab Dispos*, **19**, 503-507.
130. King C.M. (1974): Mechanism of reaction, tissue distribution, and inhibition of arylhydroxamic acid acyltransferase. *Cancer Res*, **34**, 1503-1515.
131. King C.M., Olive C.W. und Cardona R.A. (1975): Activation of carcinogenic arylhydroxamic acids by human tissues. *J Natl Cancer Inst*, **55**, 285-287.
132. Kirlin W.G., Ogolla F., Andrews A.F., Trinidad A., Ferguson R.J., Yerokun T., Mpezo M. und Hein D.W. (1991): Acetylator genotype-dependent expression of arylamine N-acetyltransferase in human colon cytosol from non-cancer and colorectal cancer patients. *Cancer Res*, **51**, 549-555.
133. Kirlin W.G., Trinidad A., Yerokun T., Ogolla F., Ferguson R.J., Andrews A.F., Brady P.K. und Hein D.W. (1989): Polymorphic expression of Acetyl Coenzym A-dependent arylamine N-acetyltransferase and Acetyl Coenzyme A-dependent O-acetyltransferase-mediated activation of N-Hydroxyarylamines by human bladder cytosol. *Cancer Res*, **49**, 2448-2454.

134. Kloth M.T., Gee R.L., Messing E.M. und Swaminathan S. (1994): Expression of N-acetyltransferase (NAT) in cultured human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **15**, 2781-2787.
135. Korrapati M.R., Sorkin J.D., Andres R., Muller D.C., Loi C.M., Vesell E.S. und Vestal R.E. (1997): Acetylator phenotype in relation to age and gender in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Pharmacol*, **37**, 83-91.
136. Ladero J.M., Gonzalez J.F., Benitez J., Vargas E., Fernandez M.J., Baki W. und Diaz-Rubio M. (1991): Acetylator polymorphism in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*, **51**, 2098-2100.
137. Ladero J.M., Kwok C.K., Jara C., Fernandez L., Silmi A.M., Tapia D. und Uson A.C. (1985): Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients. *Ann Clin Res*, **17**, 96-99.
138. Land S.J., Jones R.F. und King C.M. (1994): Biochemical and genetic analysis of two acetyltransferases from hamster tissues that can metabolize aromatic amine derivatives. *Carcinogenesis*, **15**, 1585-1595.
139. Land S.J., Zukowski K., Lee M.-S., Debiec-Rychter M., King C.M. und Wang C.Y. (1989): Metabolism of aromatic amines: relationships of N-acetylation, O-acetylation, N,O-acetyltransfer and deacetylation in human liver and urinary bladder. *Carcinogenesis*, **10**, 727-731.
140. Land S.J., Zukowski K., Lee M.-S., Wang C.Y. und King C.M. (1993): Purification and characterization of a rat hepatic acetyltransferase that can metabolize aromatic amine derivatives. *Carcinogenesis*, **14**, 1441-1449.
141. Lang N.P., Butler M.A., Massengill J., Lawson M., Stotts R.C., Hauer-Jensen M. und Kadlubar F.F. (1994): Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P450 1A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **3**, 675-682.
142. Lang N.P., Chu D.Z.J., Hunter C.F., Kendall D.C., Flammang T.J. und Kadlubar F.F. (1986): Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal cancer. *Arch Surg*, **121**, 1259-1261.
143. Lee E.J.D., Zhao B., Moolhala S.M. und Ngoi S.S. (1994): Frequency of mutant CYP 1A1, NAT2 and GST M1 alleles in a normal Chinese population. *Pharmacogenetics*, **4**, 355-358.
144. Lemos M.C. und Regateiro F.J. (1998): N-acetyltransferase genotypes in the Portuguese population. *Pharmacogenetics*, **8**, 561-564.
145. Lin D., Meyer D.J., Ketterer B., Lang N.P. und Kadlubar F.F. (1994): Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res*, **54**, 4920-4926.
146. Lin H.J., Chun-Ya H., Lin B.K. und Hardy S. (1994): Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics*, **4**, 125-134.
147. Lin H.J., Han C.-Y., Lin B.K. und Hardy S. (1993): Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 asians, blacks, hispanics, and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet*, **52**, 827-834.

148. Lin H.J., Probst-Hensch N.M., Hughes N.C., Sakamoto G.T., Louie A.D., Kau I.C.H., Lin B.K., Lee D.B., Lin J., Frankl H.D., Lee E.R., Hardy S., Grant D.M. und Haile R.W., (1998): Variants of N-acetyltransferase NAT1 and a case-control study of colorectal adenomas. *Pharmacogenetics*, **8**, 269-281.
149. Lindsay R.M. und Baty J.D. (1989): Studies on the co-incubation of D-[U-14C]glucose and sulphamethazine with human whole blood in vitro. *Biochem Soc Trans*, **17**, 920-921.
150. Lindsay R.M. und Baty J.D. (1990): The effect of streptozotocin-induced diabetes on the in vivo acetylation capacity and the in vitro blood N-acetyltransferase activity of the adult male sprague-dawley rat. *Biochem Pharmacol*, **39**, 1193-1197.
151. Lindsay R.M., Fox W.R., Baty J.D. und Willis R.G. (1991): In vitro studies on the deacetylation-reacetylation of arylamides and the transacetylation of arylamines by human and rat whole blood. *Biochem Pharmacol*, **41**, 1671-1678.
152. Litterst C.L., Mimnaugh E.G., Reagan R.L. und Gram T.E. (1975): Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver, and kidney of several common laboratory species. *Drug Metab Dispos*, **3**, 259-265.
153. Lower G.M. (1982): Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer*, **49**, 1056-1066.
154. Lower G.M., Nilsson T., Nelson C.E., Wolf H., Gamsky T.E. und Bryan G.T. (1979): N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ Health Perspect*, **29**, 71-79.
155. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.G. und Randall R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
156. Mandelbaum-Shavit F. und Blondheim S.H. (1981): Acetylation of p-aminobenzoic acid by human blood. *Biochem Pharmacol*, **30**, 65-69.
157. Martell K.J. und Weber W.W. (1988): Expression of the rat acetylation polymorphism in pancreas. *FASEB J*, **2**, A1140
158. Martell K.J., Levy G.N. und Weber W.W. (1992): Cloned Mouse N-acetyltransferases: enzymatic properties of expressed NAT1 and NAT2 gene products. *Mol Pharmacol*, **42**, 265-272.
159. Martell K.J., Vatsis K.P. und Weber W.W. (1991): Molecular genetic basis of rapid and slow acetylation in mice. *Mol Pharmacol*, **40**, 218-227.
160. Martinez C., Agundez J.A., Olivera M., Llerena A., Ramirez R., Hernandez M. und Benitez J. (1998): Influence of genetic admixture on polymorphisms of drug-metabolizing enzymes: analyses of mutations on NAT2 and C gamma P2E1 genes in a mixed Hispanic population. *Clin Pharmacol Ther*, **63**, 623-626.
161. Martinez C., Agundez J.A.G., Olivera M., Martin R., Ladero J.M. und Benitez J. (1995): Lung cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics*, **5**, 207-214.
162. Mashimo M., Suzuki T., Abe M. und Deguchi T. (1992): Molecular genotyping of N-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Hum Genet*, **90**, 139-143.

163. Mattano S.S. und Weber W.W. (1987): Kinetics of arylamine N-acetyltransferase in tissues from rapid and slow acetylator mice. *Carcinogenesis*, **8**, 133-137.
164. McCroy E.C., Anders M. und Rosenkranz H.S. (1983): The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP6 to the mutagenic action of nitroarenes. *Mut Res*, **121**, 17-23.
165. McQueen C.A. und Weber W.W. (1980): Characterization of human lymphocyte N-acetyltransferase and its relationship to the isoniazid acetylator polymorphism. *Biochem Gen*, **18**, 889-904.
166. Meisel P., Schroeder C., Wulff K. und Siegmund W. (1997): Relationship between human genotype and phenotype of N-acetyltransferase (NAT2) as estimated by discriminant analysis and multiple linear regression: 1. Genotype and N-acetylation in vivo. *Pharmacogenetics*, **7**, 241-246.
167. Mekonnen G., Siegmund W., Jänichen F., Scheuch E. und Franke G. (1994): Procainamide N-acetylation in isolated perfused rat liver - effects of pravastatin, terbutalin, propranolol, and hyperglycemia. [Abstract] *NS Arch Pharm*, **349 Supp**, R5
168. Millikan R.C., Pittman G.S., Newman B., Tse C.K., Selmin O., Rockhill B., Savitz D., Moorman P.G. und Bell D.A. (1998): Cigarette smoking, N-acetyltransferases 1 and 2, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 371-378.
169. Minchin R.F. (1995): Acetylation of p-aminobenzoylglutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine N-acetyltransferase and U937 cells. *Biochem J*, **307**, 1-3.
170. Minchin R.F., Kadlubar F.F. und Ilett K.F. (1993): Role of acetylation in colorectal cancer. *Mut Res*, **290**, 35-42.
171. Minchin R.F., Reeves P.T., Teitel C.H., McManus M.E., Mojarrabi B., Ilett K.F. und Kadlubar F.F. (1992): N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem Biophys Res Comm*, **185**, 839-844.
172. Mommsen S. und Aagaard J. (1986): Susceptibility in urinary bladder cancer: acetyltransferase phenotypes and related risk factors. *Cancer Lett*, **32**, 199-205.
173. Mommsen S., Barfod N.M. und Aagaard J. (1985): N-acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of a low-risk population. *Carcinogenesis*, **6**, 199-201.
174. Morita S., Yano M., Tsujinaka T., Akiyama Y., Taniguchi M., Kaneko K., Miki H., Fujii T., Yoshino K., Kusuoka H. und Monden M. (1999): Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, **80**, 685-688.
175. Morita S., Yano M., Tsujinaka T., Ogawa A., Taniguchi M., Kaneko K., Shiozaki H., Doki Y., Inoue M. und Monden M. (1998): Association between genetic polymorphisms of glutathione S-transferase P1 and N-acetyltransferase 2 and susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, **79**, 517-520.

176. Motulsky A.G. und Steinmann L. (1962): Arylamine acetylation in human red cells. *J Clin Invest*, **41**, 1387
177. Mrozikiewicz P.M., Cascorbi I., Brockmoeller J. und Roots I. (1996): Determination and allelic allocation of seven nucleotide transitions within the arylamine N-acetyltransferase gene in the Polish population. *Clin Pharmacol Ther*, **59**, 376-382.
178. Nagata K., Ozawa S., Miyata M., Shimada M., Yamazoe Y. und Kato R. (1994): Primary structure and molecular basis of polymorphic appearance of an acetyltransferase (AT-II) in hamsters. *Pharmacogenetics*, **4**, 91-100.
179. Nyberg F., Hou S.M., Hemminki K., Lambert B. und Pershagen G. (1998): Glutathione S-transferase mu1 and N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in nonsmoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 875-883.
180. Ohsako S. und Deguchi T. (1990): Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J Biol Chem*, **265**, 4630-4634.
181. Okumura K., Kita T., Chikazawa S., Komada F., Iwakawa S. und Tanigawara Y. (1997): Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clin Pharmacol Ther*, **61**, 509-517.
182. Oyama T., Kawamoto T., Mizoue T., Yasumoto K., Kodama Y. und Mitsudomi T. (1997): N-acetylation polymorphism in patients with lung cancer and its association with p53 gene mutation. *AntiCancer Res*, **17**, 577-581.
183. Ozawa S., Abu-Zeid M., Kawakubo Y., Toyama S., Yamazoe Y. und Kato R. (1990): Monomorphic and polymorphic isozymes of arylamine N-acetyltransferases in hamster liver: purification of the isozymes and genetic basis of N-acetylation polymorphism. *Carcinogenesis*, **11**, 2137-2144.
184. Pacifici G.M., Bencini C. und Rane A. (1986): Acetyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Pharmacol*, **32**, 283-291.
185. Pacifici G.M., Franchi M., Bencini C., Repetti F., Di Lascio N. und Muraro G.B. (1988): Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica*, **18**, 849-856.
186. Pacifici G.M., Franchi M., Gervasi P.G., Longo V., di Simplicio P., Temellini A. und Giuliani L. (1989): Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacol*, **38**, 137-145.
187. Payton M.A. und Sim E. (1998): Genotyping human arylamine N-acetyltransferase type 1 (NAT1): the identification of two novel allelic variants. *Biochem Pharmacol*, **55**, 361-366.
188. Philip P.A., Fitzgerald D.L., Cartwright R.A., Peake M.D. und Rogers H.J. (1988): Polymorphic N-acetylation capacity in lung cancer. *Carcinogenesis*, **9**, 491-493.
189. Philip P.A., Gayed S.L., Rogers H.J. und Crome P. (1987): Influence of age, sex and body weight on the dapsone acetylation phenotype. *Br J Clin Pharmacol*, **23**, 709-713.

190. Pink J.C., Messing E.M., Reznikoff C.A., Bryan G.T. und Swaminathan S. (1992): Correlation between N-acetyltransferase activities in uroepithelia and in vivo acetylator phenotype. *Drug Metab Dispos*, **20**, 559-565.
191. Probst M.R., Blum M., Fasshauer I., D'Orazio D., Meyer U.A. und Wild D. (1992): The role of the human acetylation polymorphism in the metabolic activation of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Carcinogenesis*, **13**, 1713-1717.
192. Probst M.R., Jenö P. und Meyer U.A. (1991): Purification and Characterization of a human liver arylacetamide deacetylase. *Biochem Biophys Res Comm*, **177**, 453-459.
193. Probst-Hensch N.M., Haile R.W., Li D.S., Sakamoto G.T., Louie A.D., Lin B.K., Frankl H.D., Lee E.R. und Lin H.J. (1996): Lack of association between the polyadenylation polymorphism in the NAT1 (acetyltransferase 1) gene and colorectal adenomas. *Carcinogenesis*, **17**, 2125-2129.
194. Reeves P.T., Kinnear B.F., Minchin R.F. und Ilett K.F. (1991): Immunological evidence for N-acetyltransferase isozymes in the rabbit. *Mol Pharmacol*, **39**, 42-48.
195. Reeves P.T., Minchin R.F. und Ilett K.F. (1988): Induction of sulfamethazine acetylation by hydrocortisone in the rabbit. *Drug Metab Dispos*, **16**, 110-115.
196. Risch A., Wallace D.M.A., Bathers S. und Sim E. (1995): Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet*, **4**, 231-236.
197. Roberts-Thomson I.C., Ryan P., Khoo K.K., Hart W.J., McMichael A.J. und Butler R.N. (1996): Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet*, **347**, 1372-1374.
198. Rocha L., Garcia C., de Mendonca A., Gil J.P., Bishop D.T. und Lechner M.C. (1999): N-acetyltransferase (NAT2) genotype and susceptibility of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics*, **9**, 9-15.
199. Rostami-Hodjegan A., Nurminen S., Jackson P.R. und Tucker G.T. (1996): Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics*, **6**, 121-149.
200. Rothen J.P., Haefeli W.E., Meyer U.A., Todesco L. und Wenk M. (1998): Acetaminophen is an inhibitor of hepatic N-acetyltransferase 2 in vitro and in vivo. *Pharmacogenetics*, **8**, 553-559.
201. Saito K., Shinohara A., Kamataki T. und Kato R. (1985): Metabolic activation of mutagenic N-Hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in Salmonella typhimurium TA98. *Arch Biochem Biophys*, **239**, 286-295.
202. Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T. und Kato R. (1983): Activation and detoxication of N-Hydroxy-Trp-P-2 by glutathione and glutathione transferases. *Carcinogenesis*, **4**, 1551-1557.
203. Sasaki Y., Ohsako S. und Deguchi T. (1991): Molecular and genetic analyses of arylamine N-acetyltransferase polymorphism of rabbit liver. *J Biol Chem*, **266**, 13243-13250.

204. Schmiedeberg S. von, Fritsche E., Roennau A.C., Specker C., Golka K., Richter-Hintz D., Schuppe H.C., Lehmann P., Ruzicka T., Esser C., Abel J. und Gleichmann E. (1999): Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*, **455**, 147-152.
205. Schut H.A.J., Daniel F.B., Schenck K.M., Loeb T.R. und Stoner G.D. (1984): Metabolism and DNA adduct formation of 2-acetylaminofluorene by bladder explants from human, dog, monkey, hamster and rat. *Carcinogenesis*, **5**, 1287-1292.
206. Seow A., Zhao B., Poh W.T., Teh M., Eng P., Wang Y.T., Tan W.C., Lee E.J. und Lee H.P. (1999): NAT2 slow acetylator genotype is associated with increased risk of lung cancer among non-smoking Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis*, **20**, 1877-1881.
207. Shinohara A., Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T. und Kato R. (1986): Acetyl Coenzyme A dependent activation of N-Hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines: mechanism of activation, species difference, tissue distribution, and acetyl donor specificity. *Cancer Res*, **46**, 4362-4367.
208. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Mark S.D., Hoover R.N., Caporaso N.E., Levander O.A., Knize M.G., Lang N.P. und Kadlubar F.F. (1994): Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P450 1A2 activity in humans. *Cancer Res*, **54**, 6154-6159.
209. Sinués B., Pérez J., Bernal M.L., Sáenz M.A., Lanuza J. und Bartolomé M. (1992): Urinary mutagenicity and N-acetylation phenotype in textile industry workers exposed to arylamines. *Cancer Res*, **52**, 4885-4889.
210. Smolen T.N., Brewer J.A. und Weber W.W. (1993): Testosterone modulation of N-acetylation in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, **264**, 854-858.
211. Sonawane B.R. und Lucier G.W. (1975): Hepatic and extrahepatic N-acetyltransferase. Perinatal development using a new radioassay. *Biochim Biophys Acta*, **411**, 97-105.
212. Stanley L.A., Coroneos E., Cuff R., Hickman D., Ward A. und Sim E. (1996): Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J Histochem Cytochem*, **44**, 1059-1067.
213. Subrahmanyam D., Blackwell R.Q. und Fosdick L.S. (1961): Factors that influence the acetylating activity of blood, 1. Effect of addition of certain metabolites and physiologically active substances. *J Periodont*, **32**, 139-143.
214. Sugimura T. (1986): Past, present, and future of mutagens in cooked foods. *Environ Health Perspect*, **67**, 5-10.
215. Sugimura T. und Sato S. (1983): Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res*, **43, Supp.** 2415-2421.
216. Sunahara S., Urano M. und Ogawa M. (1961): Genetical and geographic studies on isoniazid inactivation. *Science*, **134**, 1530-1531.
217. Svensson C.K. und Tomilo M. (1992): Effect of H₂-receptor antagonists on rat liver cytosolic acetyl coA:arylamine N-acetyltransferase activity. *Drug Metab Dispos*, **20**, 74-78.

218. Tannen R.H. und Weber W.W. (1979): Rodent models of the human isoniazid-acetylator polymorphism. *Drug Metab Dispos*, **7**, 274-279.
219. Tokiwa H. und Ohnishi Y. (1986): Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *Crit Rev Toxicol*, **17**, 23-60.
220. Turesky R.J., Lang N.P., Butler M.A., Teitel C.H. und Kadlubar F.F. (1991): Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, **12**, 1839-1845.
221. Vatsis K.P. und Weber W.W. (1993): Structural heterogeneity of caucasian N-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch Biochem Biophys*, **301**, 71-76.
222. Vatsis K.P., Martell K.J. und Weber W.W. (1991): Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 6333-6337.
223. Vatsis K.P., Weber W.W., Bell D.A., Dupret M.-J., Evans D.A.P., Grant D.M., Hein D.W., Lin H.J., Meyer U.A., Relling M.V., Sim E., Suzuki T. und Yamazoe Y. (1995): Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, **5**, 1-17.
224. Vineis P., Bartsch H., Caporaso N., Harrington A.M., Kadlubar F.F., Landi M.T., Malaveile C., Shields P.G., Skipper P., Talaska G. und Tannenbaum S.R. (1994): Genetically based N-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature*, **369**, 154-156.
225. Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S.-B., Hirose M., Ochiai M., Sugimura T. und Nagao M. (1993): Exposure to heterocyclic amines. *Environ Health Perspect*, **99**, 129-133.
226. Wang C.Y., Debiec-Rychter M., Schut H.A., Morse P., Jones R.F., Archer C., King C.M. und Haas G.P. (1999): N-Acetyltransferase expression and DNA binding of N-hydroxyheterocyclic amines in human prostate epithelium. *Carcinogenesis*, **20**, 1591-1595.
227. Ward A., Hickman D., Gordon J.W. und Sim E. (1992): Arylamine N-acetyltransferase in human red blood cells. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1099-1104.
228. Ward A., Summers M.J. und Sim E. (1995): Purification of recombinant human N-acetyltransferase type 1 (NAT1) expressed in *E. coli* and characterization of its potential role in folate metabolism. *Biochem Pharmacol*, **49**, 1759-1767.
229. Watanabe M., Nohmi T. und Ishidate M.J. (1987): New tester strains of salmonella typhimurium highly sensitive to mutagenic nitroarenes. *Biochem Biophys Res Comm*, **147**, 974-979.
230. Weber W.W. und Cohen S.N. (1968): The mechanism of isoniazid acetylation by human N-acetyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, **151**, 276-278.
231. Weber W.W. und Glowinski I.B. (1980): Acetylation. In: Jakoby W.B. (Ed.): Enzymatic basis of detoxication, Volume II. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 169-186.
232. Weber W.W. und Hein D.W. (1985): N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev*, **37**, 25-79.

233. Weber W.W. und Vatsis K.P. (1993): Individual variability in p-aminobenzoic acid N-acetylation by human N-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. *Pharmacogenetics*, **3**, 209-212.
234. Weber W.W., (1987): Acetylator genes in animals. In: Weber W.W., (Ed.): The acetylator genes and drug response. Ann Arbor, Michigan: Oxford University Press, 98-135.
235. Wick M.J. und Hanna P.E. (1990): Bioactivation of N-arylhydroamic acids by rat hepatic N-acetyltransferase. *Biochem Pharmacol*, **39**, 991-1003.
236. Wild D., Feser W., Lord H.L. und Josephy P.D. (1995): Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine N-acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in Salmonella typhimurium. *Carcinogenesis*, **16**, 643-648.
237. Wohlleb J.C., Hunter C.F., Blass B., Kadlubar F.F., Chu D.Z.J. und Lang N.P. (1990): Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer: environmental and demographic associations. *Int J Cancer*, **46**, 22-30.
238. Woodhouse K.W., Adams P.C., Clothier A., Mucklow J.C. und Rawlins M.D. (1982): N-acetylation phenotype in bladder cancer. *Hum Toxicol*, **1**, 443-445.
239. Woolhouse N.M., Qureshi M.M., Bastaki S.M., Patel M., Abdulrazzaq Y. und Bayoumi R.A. (1997): Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) genotyping of Emiratis. *Pharmacogenetics*, **7**, 73-82.
240. Wu L.T. und Chung J.G. (1998): Effects of vitamin C on arylamine N-acetyltransferase activity in human liver tumor cells. *AntiCancer Res*, **18**, 3481-3486.
241. Xie H.G., Xu Z.H., Ou-Yang D.S., Shu Y., Yang D.L., Wang J.S., Yan X.D., Huang S.L., Wang W. und Zhou H.H. (1997): Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics*, **7**, 503-514.
242. Yeh C.C., Chung J.G., Wu H.C., Chang H.L., Yeh F.T. und Hung C.F. (1999): Effects of aspirin on arylamine N -acetyltransferase activity and DNA adducts in human bladder tumour cells. *J Appl Toxicol*, **19**, 389-394.
243. Yu M.C., Skipper P.L., Taghizadeh K., Tannenbaum S.R., Chan K.K., Henderson B.E. und Ross R.K. (1994): Acetylator phenotype, Aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst*, **86**, 712-716.
244. Zenser T.V., Lakshmi V.M., Rustan T.D., Doll M.A., Deitz A.C., Davis B.B. und Hein D.W. (1996): Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Res*, **56**, 3941-3947.
245. Zhao B., Lee E.J., Yeoh P.N. und Gong N.H. (1998): Detection of mutations and polymorphism of N-acetyltransferase 1 gene in Indian, Malay and Chinese populations. *Pharmacogenetics*, **8**, 299-304.
246. Zheng W., Deitz A.C., Campbell D.R., Wen W.Q., Cerhan J.R., Sellers T.A., Folsom A.R. und Hein D.W. (1999): N-acetyltransferase 1 genetic polymorphism, cigarette smoking, well-done meat intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 233-239.

247. Zielinska E., Niewiarowski W., Bodalski J., Stanczyk A., Bolanowski W. und Rebowski G. (1997): Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) gene mutations in children with allergic diseases. *Clin Pharmacol Ther*, **62**, 635-642.

8 Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1:</u>	Durch AT katalysierte Reaktionen.....	10
<u>Abb. 2:</u>	Strukturformeln von Substraten der AT.....	12
<u>Abb. 3:</u>	Probenbegleitprotokoll.....	22
<u>Abb. 4:</u>	Strukturformel von PABA.....	43
<u>Abb. 5:</u>	Strukturformel von INH.....	43
<u>Abb. 6:</u>	HPLC-Nachweis von Ac-PABA.....	49
<u>Abb. 7:</u>	HPLC-Nachweis von Ac-INH.....	50
<u>Abb. 8:</u>	Lagerungsstabilität der PABA-AT der Ratte bei +4 °C.....	51
<u>Abb. 9:</u>	Lagerungsstabilität der INH-AT der Ratte bei +4 °C.....	52
<u>Abb. 10 u. Abb. 11:</u>	PABA-AT nach Lagerung unter -80 °C und -180 °C.....	53
<u>Abb. 12 u. Abb. 13:</u>	INH-AT nach Lagerung unter -80 °C und -180 °C.....	54
<u>Abb. 14:</u>	Abhängigkeit der Bildung von Ac-PABA von der Proteinkonzentration.....	55
<u>Abb. 15:</u>	Abhängigkeit der Bildung von Ac-PABA von der Proteinkonzentration.....	56
<u>Abb. 16:</u>	Bildung von Ac-PABA bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentration.....	56
<u>Abb. 17:</u>	Bildung von Ac-INH in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.....	57
<u>Abb. 18:</u>	Bildung von Ac-INH in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.....	58
<u>Abb. 19:</u>	Bildung von Ac-INH bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.....	58
<u>Abb. 20:</u>	Acetylierung von PABA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	59
<u>Abb. 21:</u>	Acetylierung von INH in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.....	60
<u>Abb. 22:</u>	Acetylierung von INH in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.....	61
<u>Abb. 23:</u>	Bildung von Ac-INH bei zwei verschiedenen Inkubationszeiten.....	61
<u>Abb. 24:</u>	Vergleich der PABA-AT und INH-AT bei S10- und S100-Cytosol.....	62
<u>Abb. 25:</u>	Chromatogramme von Ac-INH bei Lagerung von Proben für 98 und 137 Tage.....	64
<u>Abb. 26:</u>	PABA-AT-Enzymaktivitäten von Hautproben.....	65
<u>Abb. 27:</u>	PABA-AT-Enzymaktivitäten von Nieren- und Harnleiterproben.....	67
<u>Abb. 28:</u>	PABA-AT-Enzymaktivitäten von Blasenproben.....	69
<u>Abb. 29:</u>	PABA-AT-Enzymaktivitäten in Proben aus Dünn-, Dick- und Mastdarm.....	71
<u>Abb. 30:</u>	INH-AT Enzymaktivitäten in Proben aus Dünn-, Dick- und Mastdarm.....	72
<u>Abb. 31:</u>	Vergleich von INH-AT mit PABA-AT in Darmproben.....	73
<u>Abb. 32:</u>	PABA-AT-Enzymaktivitäten in Lungenproben.....	75
<u>Abb. 33:</u>	INH-AT-Enzymaktivitäten in Lungenproben.....	75
<u>Abb. 34:</u>	Vergleich von PABA-AT und INH-AT in Lungenproben.....	76
<u>Abb. 35:</u>	INH-AT Genotyp und Enzymaktivitäten in Leber-, Darm- und Lungenproben.....	95

9 Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1:</u>	Mutationen im menschlichen INH-AT Gen.....	4
<u>Tab. 2:</u>	Häufigkeit von schnellen und langsamen Allelen und Phänotypen der INH-AT in verschiedenen Bevölkerungen.....	7
<u>Tab. 3:</u>	Verwendete Chemikalien.....	18
<u>Tab. 4:</u>	Verwendete Lösungsmittel.....	19
<u>Tab. 5:</u>	Patientendaten zu den Hautproben.....	23
<u>Tab. 6:</u>	Entnahmebedingungen der Hautproben.....	23
<u>Tab. 7:</u>	Lagerungszeiten der Hautproben.....	24
<u>Tab. 8:</u>	Patientendaten zu den Nieren- und Harnleiterproben.....	25
<u>Tab. 9:</u>	Laborwerte der Patienten der Nieren- und Harnleiterproben.....	25
<u>Tab. 10:</u>	Lagerungszeiten der Nieren- und Harnleiterproben.....	26
<u>Tab. 11:</u>	Patientendaten zu den Blasenproben.....	27
<u>Tab. 12:</u>	Laborwerte der Patienten der Blasenproben.....	27
<u>Tab. 13:</u>	Lagerungszeiten der Blasenproben.....	28
<u>Tab. 14:</u>	Laborwerte der Patienten der Prostataproben.....	29
<u>Tab. 15:</u>	Lagerungszeiten der Prostataproben.....	29
<u>Tab. 16:</u>	Patientendaten zu den Darmproben.....	30
<u>Tab. 17:</u>	Entnahmeort der Darmproben.....	31
<u>Tab. 18:</u>	Laborwerte der Patienten der Darmproben.....	31
<u>Tab. 19:</u>	Lagerungszeiten der Darmproben.....	32
<u>Tab. 20:</u>	Laborwerte der Patienten der Pankreasproben.....	33
<u>Tab. 21:</u>	Lagerungszeiten der Pankreasproben.....	33
<u>Tab. 22:</u>	Lagerungszeiten der Leberproben.....	34
<u>Tab. 23:</u>	Patientendaten zu den Lungenproben.....	35
<u>Tab. 24:</u>	Entnahmebedingungen der Lungenproben.....	35
<u>Tab. 25:</u>	Laborwerte der Patienten der Lungenproben.....	36
<u>Tab. 26:</u>	Lagerungszeiten der Lungenproben.....	36
<u>Tab. 27:</u>	Nachweisgrenzen der INH-AT in der Haut.....	66
<u>Tab. 28:</u>	Nachweisgrenzen der INH-AT in Niere und Harnleiter.....	68
<u>Tab. 29:</u>	Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Prostataproben.....	70
<u>Tab. 30:</u>	Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Pankreasproben.....	73
<u>Tab. 31:</u>	Spezifische Aktivitäten von PABA-AT und INH-AT in Leberproben.....	74
<u>Tab. 32:</u>	Homologie der Aminosäuresequenz von Acetyltransferasen bei verschiedenen Versuchstierspezies und dem Menschen.....	101