

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

**Heterologe Koexpression  
von humanem Cytochrom P450 1A2 und polymorphen  
Formen humaner *N*-Acetyltransferase Typ-2 in V79  
Chinesischen Hamsterzellen zur *in vitro*-Untersuchung  
von Toxizität und Metabolismus von Chemikalien und  
Arzneimitteln**

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

vorgelegt von

**Jürgen Scheuenpflug**

aus Regensburg

2004



Technische Universität München  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

**Heterologe Koexpression  
von humanem Cytochrom P450 1A2 und polymorphen Formen  
humaner *N*-Acetyltransferase Typ-2 in V79 Chinesischen  
Hamsterzellen zur *in vitro*-Untersuchung  
von Toxizität und Metabolismus von Chemikalien und  
Arzneimitteln**

**Jürgen Scheuenpflug**

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation :

1. apl. Prof. Dr. J. Döhmer
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
3. Priv.-Doz. Dr. H. Spielmann, Freie Universität Berlin

Die Dissertation wurde am 01.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 13.07.2004 angenommen.

*Meiner Familie*

*„... and she had never forgotten that, if you drink much from a bottle marked “poison”, it is almost certain to disagree with you sooner or later.”*

***Alice`s Adventures in Wonderland, by Lewis Carroll***

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Döhmer für die Überlassung des Themas, seine offene, geradlinige und ergebnisorientierte Art, sowie für seine über den Rahmen dieser Arbeit hinaus gehende Unterstützung danken.

Großer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. N. Krebsfänger, welcher mir trotz seiner immensen Arbeitsbelastung mit fruchtbaren Diskussionen und Ratschlägen, sowie beim Redigieren der Arbeit zur Seite stand.

Herrn PD Dr. A. Seidel danke ich im Zusammenhang mit der Synthese des Referenzmetaboliten N-Ac-SMZ und für seine Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion der Arbeit.

Recht herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Spielmann für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit, welche von seinem Institut, der ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung zu Alternativen zum Tierversuch), gefördert wurde.

Besonders danke ich unserer Auszubildenden C. Ebel, welche mir bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit durch ihr weit überdurchschnittliches Engagement, ihre Eigenständigkeit und Lernbereitschaft eine große Hilfe war.

Meinen Kollegen Herrn H. Muschik und W. Mayer danke ich für Ihren Einsatz bei der Durchführung der LC-MS Analysen.

Einen Dank auch an meine Kollegen Dr. T. Meyer, Dr. S. Janku, A. Bernhardt, K. Gritzko und J. Michorl für die konstruktive und erfüllende Pionierarbeit beim Laboraufbau.

Für die freundlich-entspannte Atmosphäre danke ich C. Pohl, M. Finelli, N. Herrmann und auch ganz besonders B. Ammermann, welche sich sehr für mein gesundheitliches Wohlergehen sorgte – insbesondere wenn es mal wieder "länger" wurde.

Meinem Bruder Joachim und meinen Eltern danke ich über alles Gesagte hinaus.

Diese Arbeit wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) im Rahmen der wissenschaftlichen Erarbeitung von Tierversuchersatzmethoden (WK1-1328) gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>I. Allgemeiner Teil</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Biotransformation und Fremdstoffmetabolismus	1
1.2. Cytochrome P450	2
1.3. Cytochrom P450 1A2	5
1.4. Humane <i>N</i> -Acetyltransferase	9
1.5. Humane <i>N</i> -Acetyltransferase 1 und 2	13
1.6. Bedeutung des NAT2-Polymorphismus	14
<b>2. Aufgabenstellung</b>	<b>20</b>
<b>3. Lösungsstrategie</b>	<b>20</b>
3.1. Konstruktion der rekombinanten Zelllinien	20
3.2. Charakterisierung der neuen Zelllinien	23
3.3. Anwendung der neuen Zelllinien	24
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
1. Laborgeräte	25
2. Rechner und Software	26
3. Chemikalien	27
4. Enzyme, Antikörper und biologische Materialien	28
5. Mikrobiologisches Material und Methoden	28
5.1. Bakterienstämme	29
5.2. Stammhaltung	29
5.3. Übernachtkultur	30
6. Zellbiologische Materialien und Methoden	30
6.1. Die Zelllinie V79MZ	30
6.2. Verwendete Zelllinien	31
6.3. Kultivieren von V79MZ-Zellen	31
6.4. Ablösen von V79MZ-Zellen mittels Trypsin/EDTA	31
6.5. Passagieren von V79MZ-Zellen	32
6.6. Einfrieren von V79MZ-Zellen	32
6.7. Auftauen von V79MZ-Zellen	32

6.8. Herstellen von Zellhomogenat	32
7. Gentechnologische Methoden	33
7.1. Vektoren	33
7.2. hCYP2D6-cDNAs	33
7.3. Primer	34
7.4. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	37
7.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	37
7.6. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	37
7.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	37
7.8. Ligation von DNA-Fragmenten	38
7.9. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	38
7.10. Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	38
7.11. DNA-Sequenzierung	39
7.12. Stabile Transfektion von V79MZ-Zellen	39
7.13. Isolierung genomischer DNA aus V79MZ-Zellen	40
7.14. Isolierung der Gesamt-RNA aus V79MZ-Zellen	40
7.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
7.16. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	44
8. Proteinanalytische Methoden	45
8.1. <i>In situ</i> -Immunfluoreszenz	45
8.2. Proteingehaltbestimmung	45
9. Biokatalytische Methoden	47
9.1. Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylierung (EROD)	47
9.2. <i>N</i> -Acetylierung von Sulfamethazin	48
9.3. Metabolismus von 2-Aminofluoren	49
10. Toxikologische Methoden	51
9.1. MTT-Test zur Erfassung cytotoxischer Effekte	51
9.2. HPRT-Test zur Erfassung genotoxischer Effekte	52
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>54</b>
1. Konstruktion der Zelllinien und Auswahl repräsentativer Klone	54
1.1. Kontroll-Zelllinien V79MZhCYP1A2 und hNAT2*4, *5B, *6A,*13	55
1.2. Koexprimierende Zelllinien V79MZhCYP1A2/hNAT2*4, *5B, *6A, *13	60
2. Transfektion und Auswahl positiver Klone	60

---

3. Charakterisierung der neuen Zelllinien	64
3.1. Nachweis der genomisch integrierten cDNAs	64
3.2. Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene : RT-PCR	65
3.3. <i>In situ</i> -Immunfluoreszenz	66
4. Biokatalytische Validierung	67
4.1. 7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylierung (EROD)	67
4.2. <i>N</i> -Acetylierung	69
4.2.1. <i>N</i> -Acetylierung von Sulfamethazin	72
4.2.2. <i>N</i> -Acetylierung von 2-Aminofluoren	74
5. Toxikologische Untersuchungen	77
5.1. 2-Aminofluoren	77
5.1.1. Metabolismus	77
5.1.2. Genotoxizität	80
5.2. Cytotoxizität oxidativer Haarfarben-Vorstufen	81
<b>IV. Diskussion</b>	<b>84</b>
1. Charakterisierung und Auswahlverfahren	84
2. Molekulare Mechanismen	85
3. Physiologische Relevanz und Vergleich mit anderen Expressions-Systemen	87
4. Metabolische Aktivierung von 2-Aminofluoren	89
5. Toxizität oxidativer Haarfarben-Vorstufen	90
<b>V. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>VI. Literatur</b>	<b>94</b>

## Abkürzungen

Außer den im Duden gebräuchlichen Abkürzungen, den üblichen Codes für Aminosäuren und Nukleotide, sowie den gängigen Kürzeln für Restriktionsenzyme, Polymerasen, usw. wurden verwendet :

A	Absorption
AC	2-Amino- $\alpha$ -Carbolin
Acetyl-CoA	Acetyl-Koenzym A
2-AF	2-Aminofluoren
ABP	4-Aminobiphenyl
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalovirus
CYP	Cytochrom P450-Protein, -mRNA, -cDNA
<i>CYP</i>	<i>Cytochrom P450-Gen</i>
CYPOR	NADPH-abhängige Cytochrom P450-Oxidoreduktase
Cyt b <sub>5</sub>	Cytochrom b <sub>5</sub>
Cyt <sub>c</sub>	Cytochrom c
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
DMBA	Dimethylbenz[a]anthrazen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. Coli</i>	<i>Escherischia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G418	Geneticin 418-Sulfat
Glu-P1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol

HAA	Heterozyklische aromatische Amine
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin
kbp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria Broth
MeIQ	2-Amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinolin
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
mRNA	Messenger-RNA
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH + H <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
NaF	Natriumfluorid
2-NA	2-Naphtylamin
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase-Protein, -mRNA, -cDNA
<i>NAT</i>	<i>N</i> -Acetyltransferase-Gen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (=Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>rounds per minute</i> (=Umdrehungen pro minute)
SDS	Sodiumdodecylphosphate
SMZ	Sulfamethazin
SV40	Simian-Virus 40
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp-P	2,3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
TSS	<i>transformation storage solution</i>
U	<i>Unit(s)</i> (=Enzymeinheit(en))

---

UV	Ultraviolett
V	Volt
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V79-Zellen	V79 Chinesische Hamster Fibroblasten
V79MZ-Zellen	V79 Chinesische Hamster Fibroblasten, Mainzer Subklon
V79MZhCYP1A2-Zellen	V79 Chinesische Hamster Fibroblasten, welche humanes Cytochrom P450 1A2 exprimieren
V79MZhNAT2-Zellen	V79 Chinesische Hamster Fibroblasten, welche humane <i>N</i> -Acetyltransferase exprimieren
XRE	<i>Xenobiotic Responsive Element</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (= Gewicht pro Volumen)
Z	Zellen



# I. Allgemeiner Teil

## 1. Einleitung

### 1.1 Biotransformation und Fremdstoffmetabolismus

Die Biotransformation natürlich vorkommender oder industriell produzierter Fremdstoffe (Xenobiotika) ist ein komplexer enzymatischer Prozess der sich evolutiv in allen Lebewesen entwickelt hat. Das Ziel dieses Prozesses besteht in der Regel darin, die Ausscheidungsfähigkeit mehr oder weniger lipophiler Substanzen durch Überführung in hydrophilere Metaboliten zu erhöhen. Dabei kann es entweder zu einer Entgiftung (Detoxifizierung) oder einer metabolischen Aktivierung (Toxifizierung) der betreffenden Substanz kommen. Betrachtet man lediglich die Verstoffwechslung exogener Stoffe ohne Berücksichtigung möglicher endogener Substrate, so spricht man von Fremdstoffmetabolismus. Dieser Stoffwechselprozess kann formal in zwei Phasen eingeteilt werden (Goldstein und Faletto, 1993) :

In Phase I werden bei den in Frage kommenden Fremdstoffen funktionelle Gruppen durch Oxidationsreaktionen eingeführt oder demaskiert (Funktionalisierungsreaktion). Dabei spielen Cytochrom P450-Enzyme eine Schlüsselrolle, indem sie stereo- und regioselektiv den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Fremdstoffmolekül katalysieren. Daneben sind die in dieser Phase stattfindenden Desaminierungen unter Ausbildung einer Carbonyl- bzw. Carboxyl-Gruppe und Ammoniakfreisetzung, sowie die oxidative Spaltung der Seitenkette des endogenen Cholesterins unter Bildung von Gallensäuren erwähnenswert. Sehr selten werden Fremdstoffe durch Reduktionen modifiziert. In Phase II werden die in Phase I entstandenen Metabolite mit hydrophilen Molekülen, wie zum Beispiel Sulfaten, Zuckern, Glutathion, Aminosäuren oder Carbonsäuren konjugiert (Konjugationsreaktion). Die Kopplung von funktionalisiertem Metabolit mit hydrophilen Komponenten wird durch zytosolische und membranständige Transferaseenzyme katalysiert. Der so modifizierte Stoff weist nun eine ausreichende Hydrophilie auf und kann renal oder biliär ausgeschieden werden. Weitere Phase II-Reaktionstypen sind Methylierungen, Acetylierungen sowie Thioetherbildungen, wodurch allerdings keine Steigerung der Hydrophilie von Phase I-Metaboliten erreicht wird.

Um flexibel auf veränderte Expositionssituationen reagieren zu können, unterliegt der Fremdstoffmetabolismus über repressive und induktive Mechanismen einer regulatorischen Kontrolle. Dies kann beispielsweise bedeuten, dass die Aktivität eines spezifischen Phase I-Enzyms bei besonders hoher und/oder lang andauernder Zufuhr der betreffenden Verbindung

durch vermehrte Synthese des Enzymproteins zunimmt während die Aktivität des korrespondierenden Phase II-Enzyms davon unberührt bleibt. Derartig eingeleitete spezifische Ungleichgewichte zwischen Phase I und Phase II-System können zur Bildung elektrophiler Metaboliten führen, welche kovalent an zelluläre Funktionsträger wie Proteine oder Nucleinsäuren binden. Dies kann eine Initiation von Sensibilisierungsreaktionen und kanzerogenen Prozessen zur Folge haben.

## 1.2 Cytochrome P450

### Bedeutung

Cytochrome P450 stellen die wichtigste Gruppe fremdstoffmetabolisierender Enzyme dar. Mehr als 200.000 Chemikalien werden von Cytochromen P450 metabolisiert (Lewis, 2001). Cytochrom P450-Enzyme (EC 1.14.14.1, unspezifische Monooxygenasen) werden der Superfamilie der Häm-Thiolat-Proteine zugerechnet, welche nach aktuellem Kenntnisstand 1200 Enzyme umfasst. Sie wurden erstmals 1958 als "zellfärbendes Pigment" der Leber beschrieben (Garfinkel *et al.*, 1958; Klingenberg *et al.*, 1958). Der Name Cytochrom P450 basiert darauf, dass Cytochrome im reduzierten Zustand und nach Begasung mit Kohlenmonoxid ein Differenzspektrum mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweisen. Über den molaren Extinktionskoeffizienten kann man bei dieser Wellenlänge den Cytochromgehalt exakt quantifizieren (Omura und Sato, 1964a; Omura und Sato, 1964b). Cytochrome P450 kommen sowohl in prokaryontischen als auch eukaryontischen Organismen vor. Man nimmt daher an, dass sich die P450 Superfamilie von einem "Ur-P450-Gen" ableiten lässt, welches vor mehr als 3 Milliarden Jahren existierte (Danielson PB, 2002). Die Cytochrome P450 sind unter zwei Aspekten von besonderer Bedeutung : Zum einen aufgrund der hohen Diversität der von ihnen katalysierten Reaktionen und zum anderen wegen des sehr breiten Spektrums an Substraten. So sind diese Enzyme verantwortlich für den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Metabolismus von endogenen Substraten wie zum Beispiel Hormonen. Darüber hinaus werden besonders Xenobiotika wie beispielshalber sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Pflanzenschutzmittel, Arzneimittel und Industriechemikalien metabolisiert. Die Cytochrom P450 Superfamilie umfasst derzeit 481 Isoformen in 85 verschiedenen Eu- und 20 Prokaryontenspezies (Nelson *et al.*, 1996). Die Einteilung der Cytochrom P450 Enzyme basiert *per conventionem* auf ihren Aminosäuren-Sequenzhomologien. Innerhalb einer Familie sind sie zu mehr als 40 %,

innerhalb einer Subfamilie mindestens zu 55 % identisch. Cytochrom P450-Gene werden in kursiver Schreibweise mit “*CYP*“, cDNAs, mRNAs und Proteine mit “*CYP*“ abgekürzt. Darauf folgt eine arabische Ziffer, welche die Familie bezeichnet und ein lateinischer Großbuchstabe für die jeweilige Subfamilie. Einzelne Isoenzyme werden mit einer weiteren arabischen Ziffer chronologisch durchnummeriert. Demnach symbolisiert für das humane Cytochrom P450 1A2 der Ausdruck *hCYP1A2* das Gen während hCYP1A2 für cDNA, mRNA und Protein steht.

### Funktion

Cytochrome P450 kommen bei Säugtieren in den meisten Geweben vor. Dennoch ist der größte Anteil an Cytochrom P450 in der Leber lokalisiert (Ruckpaul und Rein, 1984; Stier, 1976). Dort sind die Enzyme über eine hydrophobe N-terminale Aminosäuresequenz in den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien verankert und weisen eine cytoplasmatische Orientierung auf (Monier *et al.*, 1988).

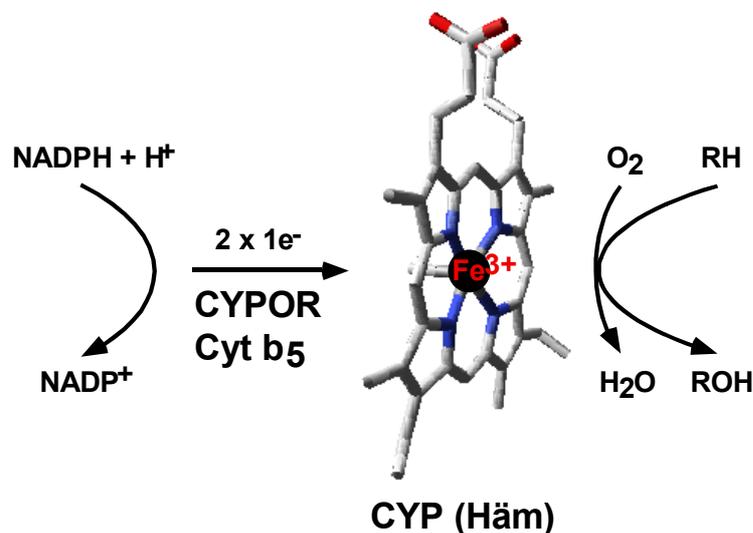


Abb. 1: Schema zur Monooxygenierung eines Substrates durch Cytochrom P450. Das Substrat RH wird im aktiven Zentrum des CYP gebunden. Anschließend wird durch die CYPOR ein Elektron auf das zentrale  $\text{Fe}^{3+}$  der Häm-Gruppe übertragen. Der nun zweiwertige Häm-Eisen-Komplex kann molekularen Sauerstoff als sechsten Liganden binden. Durch Übertragung des Elektrons auf den Sauerstoff entsteht ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplex mit einem Superoxidation. Nach Übernahme eines zweiten Elektrons, das statt von der CYPOR auch von Cytochrom  $\text{b}_5$  übertragen werden kann, disproportioniert der Sauerstoff zu  $\text{H}_2\text{O}$  und aktiviertem Sauerstoff. In einer homolytischen Reaktion wird das aktivierte Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das oxidierte Produkt ROH verläßt die Bindungsstelle des Enzyms.

Cytochrome P450 monooxygenieren Substrate in einem NADPH-abhängigen Reaktionszyklus zu Alkoholen, Epoxiden sowie *O*- und *N*-Dealkylierungsprodukten. Zudem entsteht aufgrund der Disproportionierung des Sauerstoffmoleküls Wasser (Abb. 1). Dabei bilden Cytochrome P450 einen Multienzymkomplex mit der NADPH-abhängigen P450-Oxidoreduktase (CYPOR) und Cytochrom  $b_5$ , die den Elektronentransfer von NADPH auf das Cytochrom P450 katalysieren. Aufgrund der sich hieraus ergebenden Vereinigung von oxidativem und reduktivem Metabolismus in einem Enzymkomplex, werden Cytochrom P450-Enzyme auch vielfach als mischfunktionelle Monooxygenasen bezeichnet (Nebert *et al.*, 1983; Guengerich und McDonald, 1984). Der Ausprägungsgrad dieser Komplexbildung ist jedoch innerhalb der Cytochrom P450-Isoformen unterschiedlich und bestimmt deren Aktivität. (Schenkman und Greim, 1993). Besonders deutlich tritt dieser Zusammenhang für hCYP3A4 in Erscheinung, weil diese Isoenzymform in hohem Maße von der CYPOR und Cytochrom  $b_5$  abhängig ist (Buters *et al.*, 1994). Zudem wird bei hCYP3A4 die Affinität zu bestimmten Substraten durch Cytochrom  $b_5$  erhöht (Schenkman *et al.*, 1989). Generell ist die Substratspezifität einzelner Cytochrome P450 allerdings gering und häufig überlappend, so dass eine ausreichende Plastizität gewährleistet ist, um der enormen Diversität an zu metabolisierenden Xenobiotika begegnen zu können. Insgesamt gesehen handelt es sich bei dem Cytochrom P450 katalysierten Fremdstoff- bzw. Arzneimittel-Metabolismus um ein ausserordentlich komplexes System, welches neben der organspezifischen Expression der Cytochrome P450, auf deren Polymorphie und der Induzierbarkeit vieler dieser Isoenzyme basiert. Hinzu kommt eine weitere Komplexierung dieses Systems durch induktive und inhibitorische Prozesse, welche speziell bei gleichzeitiger Gabe mehrerer Arzneimittel oder allgemein bei einer kumulativen Inzidenz von Xenobiotika ablaufen. Gerade im Hinblick auf die Vermeidung unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen ist deshalb die detaillierte Kenntnis des Cytochrom P450-Enzymsystem unter Berücksichtigung genetischer, regulatorischer und enzymkinetischer Zusammenhänge von entscheidender Bedeutung.

### 1.3 Cytochrom P450 1A2

Cytochrom P450 1A2 (EC 1.14.14.1) gehört zur Cytochrom P450 1-Superfamilie, deren cirka 30 Vertreter in verschiedenen humanen Geweben exprimiert werden (Nelson *et al.*, 1996). Zusammen mit dem zu 72 % homologen Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) bildet das P450 1A2 (CYP1A2) die Cytochrom P450 1A-Subfamilie. Die Gene der beiden Isoenzyme bestehen jeweils aus 7 Exons und 6 Introns, befinden sich in Tandemanordnung auf Chromosom 15 (15q22qter) und sind aus einer Gen-Duplikation während der Säugetier-Evolution hervorgegangen (Landi *et al.*, 1999). Eine alleinig auf *CYP1*-Gene beschränkte Besonderheit ist das Vorhandensein eines nicht-kodierenden ersten Exons (Wölfel *et al.*, 1991, Nebert *et al.*, 1987). Der offene Leserahmen des CYP1A2-Gens umfasst 1548 Basenpaare, welche für ein 58,294 Kilodalton schweres Protein kodieren. Die auf die Leber beschränkte Expression und die Induzierbarkeit des bei Säugetieren zu mehr als 70 % homologen *CYP1A2*-Gens, ist abhängig von der untersuchten Spezies und den Spezifikationen des verwendeten Stammes. Individuell unterschiedliche Expressionslevel, welche sich letztlich in veränderten CYP1A2-Aktivitäten manifestieren, sind auch beim Menschen vorzufinden. Diese Unterschiede können unter anderem auf der ethnischen Herkunft, dem Geschlecht, den jeweiligen Ernährungsgewohnheiten und/oder auf individuell unterschiedlichen Expositionsbedingungen des untersuchten Individuums basieren. Weitgehend unklar ist bisher, ob der für CYP1A2 festgestellte Polymorphismus signifikante Auswirkungen auf das Expressionsniveau hat. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass in der kaukasischen Population im Rahmen von Phänotypisierungsstudien mit Koffein und gleichzeitiger Genotypisierung keinerlei Polymorphismen des CYP1A2 identifiziert werden konnten (Welfare *et al.*, 1999), so dass man zumindest für diese Bevölkerungsgruppe einen nennenswerten Beitrag ausschließen kann.

#### Substrate und Reaktionen

Humanes CYP1A2 ist durchschnittlich zu 8,2 % am Metabolismus aller Arzneimitteln beteiligt, welche in der Zeit bis 1997 in der Klinik zur Anwendung kamen (Rendic und DiCarlo, 1997). Darüber hinaus zählen Umwelt- und Nahrungskarzinogene, sowie endogene Östrogene zu den Substraten des CYP1A2 (Tab. 1). Diese aus sehr unterschiedlichen chemischen Stoffklassen stammenden Substanzen werden über Oxidation am Stickstoff- und Kohlenstoffatom durch CYP1A2 metabolisiert. Dabei entstehen *N*-Hydroxyl-Arylamine, Phenole, Epoxide und Carbinole, wobei letztere oft instabil sind und zur Dealkylierung neigen

(Kadlubar und Hammons, 1987, Lemoine *et al.*, 1993, Bertilsson *et al.*, 1994, Eaton *et al.*, 1995, Shimada *et al.*, 1996, Carlson *et al.*, 1995, Spaldin *et al.*, 1995, Sharer and Wrighton, 1996). Aufgrund der CYP1A2-spezifischen  $N_3$ -Demethylierung am Koffein, wird dieses seit einiger Zeit als Markersubstrat zu Phänotypisierungszwecken verwendet (Rendic und DiCarlo, 1997). Es löste damit das früher verwendete Analgetikum Phenacetin ab, für welches ein kanzerogenes Potenzial festgestellt wurde (Bengtsson *et al.*, 1978).

Für CYPs wird allgemein angenommen, dass während der Katalyse radikale Zwischenprodukte entstehen, bevor der Sauerstoff durch Substrat und Hydroxid-Ionen gebunden werden kann (Guengerich and MacDonald, 1984).

Stoffklasse	Substrate	Katalysierte Reaktion
Arznei- und Genussmittel	Koffein, Theophyllin, Phenacetin, Acetaminophen, Nikotin, Tacrin, Imipramin, Antipyrin, Clozapin	Dealkylierung, Ring-Oxidierung
Aromatische Amine	4-Aminobiphenyl, 2-Naphtylamin, 2-Aminofluoren, Aminoanthrazen, 2-Acetylaminofluoren	<i>N</i> -Oxidierung, Ring-Oxidierung
Heterozyklische Amine	PhIP, IQ, MeIQx, AaC, Trp-P2, Glu-P1, MeIQ, DiMeIQx	<i>N</i> -Oxidierung, Ring-Oxidierung
Nitrosamine	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-Butanon	Dealkylierung
Mykotoxine	Aflatoxin B <sub>1</sub> , Ipomeanol, Sterigmatocystin	Epoxidierung, Ring-Oxidierung
Nitroaromaten	6-Nitrochrysen	Epoxidierung
Östrogene	17 $\beta$ -Östradiol	Ring-Oxidierung

**Tab. 1 : Auswahl der von CYP1A2 katalysierten Umsetzung von Substraten aus unterschiedlichen Stoffklassen. Aufgeführt sind Substrate an deren Metabolismus CYP1A2 den grössten Anteil hat.**

**Abkürzungen :** PhIP, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin, IQ, 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin, MeIQx, 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin, AC, 2-Amino- $\alpha$ -Carbolin, Trp-P, 2,3-Amino-1-Methyl-5H-Pyrido[4,3-b]indol, Glu-P1, 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol, MeIQ, 2-Amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinolin, DiMeIQx, 2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin. Daten nach Landi *et al.* (1999).

Abweichend davon gibt es im Falle des CYP1A2 Hinweise für eine radikalfreie, direkte Umwandlung eines instabilen Enzym-Substrat-Komplexes zum finalen Metaboliten. Möglich wäre dies über die Bildung eines Hydroxyl-Zwischenproduktes, welches unter Abgabe von zwei Elektronen entstehen könnte (Hammons *et al.*, 1985). Diese Hypothese könnte die im Vergleich mit anderen CYPs unterschiedliche regioselektive Katalyse von Substraten durch CYP1A2 erklären.

## Regulation der Genexpression

Viele der in Tab. 1 aufgeführten Substrate sind gleichzeitig regulatorische Faktoren der Expression des *CYP1A2*-Gens. So wird *CYP1A2* zum Beispiel durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische Amine und verschiedene mit Zigarettenrauch assoziierte Stoffe induziert. Im Bereich der Arzneimittel wirken unter anderem Omeprazol, Phenytoin und Rifampin induzierend. Inhibitorische Auswirkungen auf die *CYP1A2*-Aktivität wurden dagegen beispielsweise bei *in vivo*-Applikationen von Arzneimitteln wie Fluvoxamine, Enoxacin, Ciprofloxacin und Furafylline festgestellt (Eaton *et al.*, 1995, Kunze und Trager, 1993). Interessanterweise inhibiert auch Grapefruitsaft über seinen Hauptbestandteil Naringenin die *CYP1A2*-Aktivität (Fuhr und Kummert, 1995). Ungeachtet der Vielzahl an identifizierten Induktoren und Inhibitoren sind die molekularen Mechanismen der *CYP1A2*-Regulation bis heute allerdings weitgehend unklar. Lediglich Ergebnisse aus Phänotypisierungsstudien deuten darauf hin, dass die Regulation von *CYP1A2* über wenigstens zwei molekulare Mechanismen erfolgt: Einer davon kontrolliert demnach das konstitutive Expressionsniveau, während der andere die Induzierbarkeit steuert (Butler *et al.*, 1992, Sinha *et al.*, 1994, Lang *et al.*, 1994, Kadlubar, 1994). Darüber hinaus führten Untersuchungen an der dem 5'-Ende des *CYP1A2*-Gens benachbarten Region zur Entdeckung mehrerer putativer regulatorischer Elemente. So wurden DNA-Sequenzen identifiziert, die den bereits bekannten "Interleukin-6-responsive Elementen" und "Xenobiotika-responsiven Elementen" (XRE) ähneln, wobei an letztere der im Zusammenhang mit *CYP1A1* bekannte Arylhydrocarbon-(Ah-)Rezeptor binden könnte. Darüber hinaus existieren weitere potenzielle Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Eaton *et al.*, 1995, Chung und Bresnick, 1995, Muntané-Relat *et al.*, 1995)

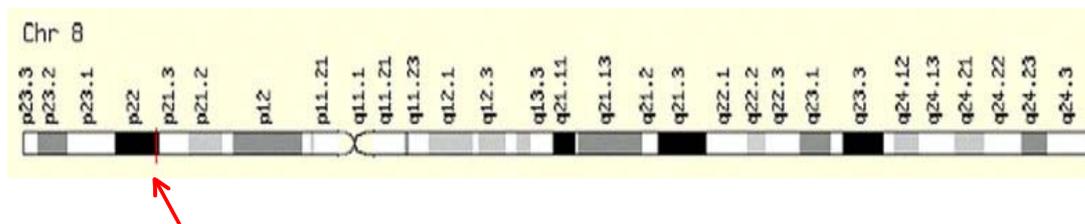
## Metabolische Aktivierung

Einige der in Tab. 1 aufgeführten Substrate weisen nach ihrer metabolischen Aktivierung durch *CYP1A2* ein kanzerogenes Potenzial auf, indem sie labile, elektrophil reagierende Zwischenprodukte bilden. Fundierte Erkenntnisse bezüglich der kanzerogenen Wirkung aromatischer Amine resultieren aus einer großen Anzahl tierexperimenteller Studien und Untersuchungen am Menschen (Garner *et al.*, 1984). Aromatische Amine, wie zum Beispiel 4-Aminobiphenyl (ABP), 2-Naphtylamin (2-NA) und *o*-Toluidin wurden sowohl in

Zigarettenrauch (IARC-Monographie, 1986) als auch in Folgeprodukten von Kohle und Öl nachgewiesen (Kadlubar und Hammons, 1987). So können bei Rauchern beispielsweise ABP oder andere aromatische Amine über die durch CYP1A2 katalysierte *N*-Hydroxylierung aktiviert werden. Die so modifizierten Stoffe werden daraufhin über den Blutkreislauf der renalen Filtration zugeführt, gelangen in das Lumen der Blase, wo sich im Zuge der Reabsorption durch das Blasenepithel Arylamin-DNA-Addukten bilden können (Kadlubar *et al.*, 1991, Badawi *et al.*, 1995). Außer aromatischen Aminen weisen aber auch einige Vertreter aus der Stoffklasse der heterozyklischen Amine kanzerogenes Potential auf. So konnte in mehreren, voneinander unabhängigen Studien ein Zusammenhang zwischen ernährungsbedingter Exposition gegenüber heterozyklischen Aminen und einer erhöhten Inzidenz von Kolonkrebs hergestellt werden (Landi *et al.*, 1999). Die über die Nahrung aufgenommenen heterozyklischen aromatischen Amine (HAA) entstehen durch Pyrolyse aus Aminosäuren wie Tryptophan, Glutamat oder Lysin (Sugimura und Sato, 1983) oder aus Gemischen von Kreatinin, Zuckern und Aminosäuren bei hohen Temperaturen, was beispielsweise beim Braten von Fleisch, Fisch und Sojaprodukten der Fall ist (Sugimura *et al.*, 1988). Nach der Aufnahme in den Körper können HAA ihre kanzerogene Wirkung nach allgemeinem Verständnis nur nach initialer metabolischer Aktivierung durch CYP1A2 entfalten (Kato, 1986). Diese Ansicht wird durch eine Reihe von *in vitro*-Untersuchungen unterstützt, welche eindeutig zeigen, dass die über *N*-Oxidation erfolgende metabolische Aktivierung nahezu vollständig durch CYP1A2 katalysiert wird (Turesky *et al.*, 1991, Lynch *et al.*, 1995, Raza *et al.*, 1996). Die nun *N*-hydroxylierten HAA werden daraufhin vorwiegend durch polymorphe *N*-Acetyltransferasen Typ2 (NAT2) *O*-acetyliert, worauf es zur Bildung von Arylamin-DNA-Addukten kommen kann (Kaderlik *et al.*, 1994). Schliesslich werden bestimmte Nitrosamine, 6-Nitrochrysen, sowie das stärkste Difuranocoumarin-Mykotoxin, nämlich Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) durch CYP1A2 aktiviert und können so ihre kanzerogene Wirkung entfalten.

## 1.4 Humane *N*-Acetyltransferase

*N*-Acetyltransferasen (NATs, EC 2.3.1.5) sind Fremdstoff-metabolisierende Phase II-Enzyme, die den Transfer der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf Hydrazine sowie heterozyklische und aromatische Amine katalysieren (Weber *et al.*, 1985). NATs sind Produkte der beiden autonomen Genloci NAT1 und NAT2. Ein dritter Genlocus, NATP1 kodiert lediglich für ein funktionsloses Protein (Blum *et al.*, 1990). Wie aus Abb. 2 ersichtlich, befinden sich diese drei Genloci auf dem humanen Chromosom 8 auf Position 8p22 innerhalb einer Region von 170-360 kb (Franke *et al.*, 1994; Matas *et al.*, 1997).



**Abb. 2 : Kartierung des humanen Chromosoms 8 (Chr. 8). Die Lage des *NAT2*-Gens ist rot markiert *NAT1* befindet sich links davon in telomerer Orientierung. Abbildung aus <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?NAT2 &search=NAT2&suff=txt>**

Die cytosolisch exprimierte NATs kommen sowohl bei prokaryontischen, als auch bei eukaryontischen Organismen vor. Unter Säugetieren wurden *N*-Acetyltransferasen mit Ausnahme von Hunden und anderen Caniden (Trepanier *et al.*, 1997) in allen bisher untersuchten Säugetieren identifiziert. Hervorzuheben ist der hohe Homologiegrad eukaryontischer NAT. Beispielsweise stimmen NAT-Sequenzen aus Nagern zu 65,9 bis 81,7 % mit der Sequenz humaner NAT überein (Vatsis *et al.*, 1995). 1990 gelang Ohsako und Deguchi die Klonierung der humanen NAT1 und NAT2. Diese Arbeit war grundlegend, um die durch NAT katalysierte Acetylierung molekular verstehen zu können.

## Struktur und Reaktionen

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde bzw. wird im Hinblick auf Stabilität, Substratspezifität und Reaktionsmechanismus intensiv an der Aufklärung der Struktur eukaryontischer und prokaryontischer NATs gearbeitet. Vorhersagemodelle bezüglich des strukturellen Aufbaus eukaryontischer NAT basieren zu einem grossen Teil auf Untersuchungsergebnissen aus *S. typhimurium*, wonach erstmals die Struktur einer *N*-Acetyltransferase dreidimensional dargestellt werden konnte (Sinclair *et al.*, 2000).

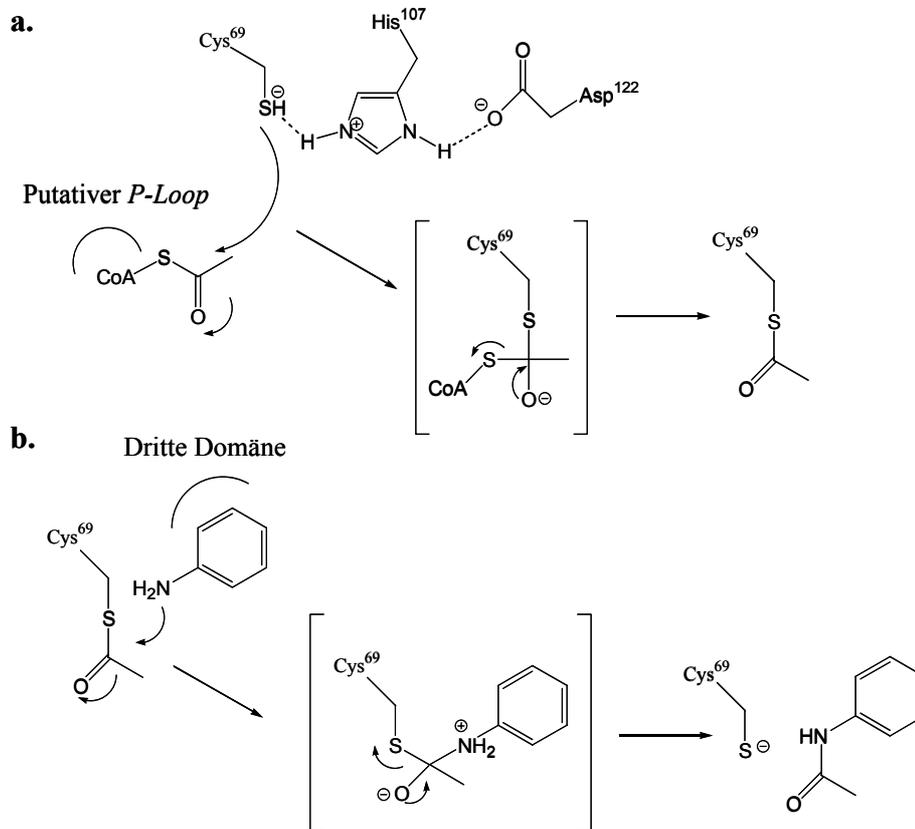
Zunächst nahm man an, dass das in humaner NAT hoch konservierte Arg64 für die enzymatische Katalyse eine Schlüsselrolle einnehme. Aufgrund von Erkenntnissen aus Mutagenese-Experimenten, musste man diese Annahme allerdings zugunsten einer eher strukturellen Funktion von Arg64 revidieren (Delomenie, *et al.*, 1997). Alle NATs besitzen ein stark konserviertes Cystein, Histidin und Aspartat von welchen man annimmt, dass sie eine katalytische Triade bilden (Butcher *et al.*, 2002). Unterstützt wird diese Annahme sowohl durch Inhibitions-Studien (Andres *et al.*, 1988) als auch über *Site-directed Mutagenesis*-Experimente an rekombinanter humaner NAT (Dupret und Grant, 1992).

### *N*-Acetylierung

Frühere zur Charakterisierung von NATs in Vögeln durchgeführten Untersuchungen führten zur Entdeckung des sogenannten "Ping-Pong"-Mechanismus der *N*-Acetylierung (Riddle und Jencks, 1971). Durch diesen Mechanismus unterscheiden sich NATs von vielen anderen Acetyl-CoA-abhängigen Transferasen (Yamamura *et al.*, 2000, Kattner *et al.*, 1981).

Die Acetylierungsreaktion findet in zwei separaten Schritten statt (Abb. 3 a. und b.). In einem ersten Schritt (Abb. 3 a) bindet Acetyl CoA an das Enzym und die Acetyl-Gruppe wird vom Kofaktor auf einen Cystein-Rest (Cys) der NAT übertragen. Bei humanen Isoformen wird die Acetyl-Gruppe durch Cys gebunden und CoA wird freigesetzt. In einem zweiten Schritt (Abb. 3 b) erfolgt die enzymkatalysierte Substratbindung und die Übertragung der Acetyl-Gruppe auf das Substrat. Schliesslich wird das acetylierte Produkt freigesetzt. Formal entspricht dieser Vorgang einer nukleophilen Substitution des Enzym-Cysteinrestes durch das aromatische Amin. Bemerkenswert ist der Befund, dass der Schritt der Acetyl-CoA-Bindung auch ohne die Anwesenheit eines Arylamin-Substrates ablaufen kann (Riddle und Jencks, 1971). Demzufolge wäre es grundsätzlich möglich, dass das Enzym unabhängig vom Substrat in einem acetyliertem Zustand vorliegt. Allerdings wurde diese These bis heute nicht über Stabilitätsuntersuchungen an den acetylierten Intermediaten verifiziert. Desweiteren ist

unklar, welche Struktur motive, NATs zur Diskriminierung diverser Substrate befähigen (Butcher *et al.*, 2002).



**Abb. 3 :** Modellvorschlag zum Reaktionsmechanismus der durch *N*-Acetyltransferase katalysierten *N*-Acetylierung. (a.) Erster Schritt des “Ping Pong”-Mechanismus : Acetyl-Gruppen-Transfer mit Acetyl-Enzym-Übergangszustand, wobei die Partialladungen entlang der Cys-His-Asp-Triade stabilisiert werden. Der putative *P-Loop* der Acetyl-CoA-Bindungsstelle ist hier gezeigt. (b.) Zweiter Schritt der Reaktion : Nukleophile Substitution des acetylierten Übergangszustandes durch ein aromatisches Amin. Die Lebensdauer des acetylierten Übergangszustandes wurde bis jetzt noch nicht bestimmt Allerdings ist anzunehmen, dass die Thioesterbindung durch einen nukleophilen Angriff des Arylamins hydrolytisch gespalten wird. Die Position der Arylamin-bindenden dritten Domäne ist markiert. Verändert nach Pompeo *et al.*, (2002).

### ***O*-Acetylierung**

Neben der *N*-Acetylierung von Arylaminen katalysieren NATs auch die *O*-Acetylierung von *N*-Hydroxy-Arylaminen. Im Falle der potenziell kanzerogenen Stoffe *N*-Hydroxy-2-Aminofluoren und *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl führt die *O*-Acetylierung zu instabilen

Produkten, welche zu DNA- oder protein-reaktiven Nitrenium-Ionen zerfallen (Hein *et al.*, 1993, Badawi, *et al.*, 1995, Thompson *et al.*, 1999).

### **Intramolekularer *N*, *O*-Acetyltransfer**

Als dritte Möglichkeit können Acetylreste durch NATs intramolekular von Aminogruppen auf Hydroxylgruppen übertragen werden, wie dies zum Beispiel bei *N*-Hydroxy-*N*-acetylarylaminen (Hydroxamsäuren) der Fall ist. Diese Reaktionsmöglichkeit wurde über rekombinant in *E. coli* exprimierter humaner *N*-Acetyltransferase nachgewiesen (Hein *et al.*, 1993).

### **Nomenklatur**

Die ersten für *N*-Acetyltransferasen allgemein geltenden Nomenklaturregeln wurden von Vatsis *et al.* (1995) publiziert. Seitdem erfolgte eine regelmäßige Aktualisierung dieser Bestimmungen (Hein *et al.*, 2000). Gemäss geltender Nomenklatur kennzeichnet man Gene der *N*-Acetyltransferase durch kursiver Schreibweise, während man die entsprechenden Proteine mit normaler Schreibweise darstellt. Allele werden durch einen Stern hinter der Genbezeichnung angezeigt, darauf folgt eine arabische Zahl für das jeweilige Allel. Ist eine Unterscheidung innerhalb des Alleles erforderlich, wird die arabische Zahl zusätzlich mit einem Grossbuchstaben versehen. Somit symbolisiert der Ausdruck *NAT2\*6A* das Allel 6A des *NAT2*-Gens, während *NAT2\*6A* für das Protein steht. Seit der Erstellung der allgemeinen Nomenklaturregeln sind in vielen Spezies neue Allele in *NAT*-Genen identifiziert worden. Diese Tatsache führte zur Gründung des "Arylamin-*N*-Acetyltransferase-Nomenklatur-Komitees", dessen Mitglieder zeitnah über den aktuellen Stand der Nomenklatur informieren, sowie über die Vergabe von Bezeichnungen für neu entdeckte Varianten unter <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html> entscheiden.

## 1.5 Humane *N*-Acetyltransferase 1 und 2

Bei der humanen *N*-Acetyltransferase 2 (hNAT2) handelt es sich wie bei humaner *N*-Acetyltransferase 1 (hNAT1) um ein 870 Basenpaare langes Gen ohne Introns, welches für ein aus 290 Aminosäuren bestehendes 34 kDa schweres Protein codiert (Blum *et al.*, 1990, Ohasko und Deguchi, 1990). Am 5'-Ende wird das Gen von einem Exon flankiert, welches allerdings nicht für Aminosäuren codiert (Ebisawa und Deguchi, 1991).

Vergleicht man die DNA-Sequenzen von *hNAT1* und *hNAT2* findet man eine Übereinstimmung von 87 %. Die Proteinsequenzen der beiden Enzyme sind zu 81 % identisch. Die Aktivität von hNAT1 ist in vielen humanen Geweben sowohl in juvenilen (Pacifci *et al.*, 1986) als auch in adulten Entwicklungsstadien (Stanley *et al.*, 1996, Williams, J.A., 2001) nachweisbar, wohingegen hNAT2-Aktivitäten lediglich in der Leber und Intestinum gefunden werden (Jenne, 1965, Hickman *et al.*, 1998). Untersucht man die Expression von NAT auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung erhöht sich aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode der Anteil der Gewebe in denen insbesondere auch NAT2-Expression detektierbar ist (Windmill *et al.*, 2000). In Geweben in denen sowohl NAT1 als auch NAT2 aktiv sind, ist für beide Isoenzyme eine unterschiedliche Verteilung auf verschiedene Zellen feststellbar (Hickman *et al.*, 1998). Beide NAT-Isoenzyme katalysieren *N*-Acetylierungen, *O*-Acetylierungen und *N,O*-Acetyltransfer von Xenobiotika und Karzinogenen, unterscheiden sich jedoch wie Tab. 2 zeigt, hinsichtlich ihrer Substratspezifität (Minchin *et al.*, 1992). So weist NAT1 eine besonders hohe Affinität zu Substraten wie *p*-Aminosalicylsäure, *p*-Benzoessäure (Grant *et al.*, 1991, Ohasko und Deguchi, 1990) und *p*-Aminobenzoylglutamat auf. Da *p*-Aminobenzoylglutamat ein Abbauprodukt der Folsäure ist, könnte es sich hierbei folglich um ein endogenes NAT-Substrat handeln (Minchin, 1995, Sim *et al.*, 2000). Zu denen von hNAT2 spezifisch metabolisierten Substraten gehören Arzneimittel wie zum Beispiel Sulfamethazin und Isoniazid (Weber und Hein, 1985, Ohasko und Deguchi, 1990). Darüber hinaus sind Pyrolyseprodukte aus Fleisch wie beispielsweise 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhiP) und 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol (Glu-P-1) spezifische NAT2-Substrate und unterliegen vorwiegend einem für heterozyklische Amine typischen *N,O*-Acetylgruppentransfer (Turesky *et al.*, 1991, Fretland *et al.*, 2001). Beispiele für die sich überschneidenden Substratspektren von hNAT1 und hNAT2 stellen das Modellkarzinogen 2-Aminofluoren und das im Zigarettenrauch

vorkommende 4-Aminobiphenyl dar (Minchin *et al.*, 1992, Turesky *et al.*, 1991, Hein *et al.*, 1993).

Substrat	hNAT1	hNAT2	hNAT1/hNAT2	Referenz
<i>p</i> -Aminosalicylsäure	X			(Grant <i>et al.</i> , 1991)
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	X			(Grant <i>et al.</i> , 1991, Ohasko und Deguchi, 1990)
<i>p</i> -Aminobenzoylglutamat	X			(Minchin, 1995, Sim <i>et al.</i> , 2000)
Isoniazid		X		(Weber und Hein, 1985)
Sulfamethazin		X		(Ohsako und Deguchi, 1990, Fretland <i>et al.</i> , 2001)
PhIP		X		(Turesky <i>et al.</i> , 1991)
Glu-P-1		X		(Turesky <i>et al.</i> , 1991)
2-Amino-fluoren			X	(Minchin, 1992, Turesky <i>et al.</i> , 1991, Hein <i>et al.</i> , 1993)
4-Aminobiphenyl			X	(Minchin, 1992, Turesky <i>et al.</i> , 1991, Hein <i>et al.</i> , 1993)

**Tab. 2 : Beispiele für hNAT1 und hNAT2 Substrate, sowie für gemeinsame Substrate beider Isoenzyme. Abkürzungen : PhIP : 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin, Glu-P-1 : 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol.**

## 1.6 Bedeutung des NAT2-Polymorphismus

Als ein Jahr nach der Einführung des Isoniazids in die Tuberkulose-Therapie im Jahr 1952 grosse interindividuelle Unterschiede in Nebenwirkungsrate und Metabolismus des Tuberkulostatikums festgestellt wurden, wusste man noch nichts über die molekularen Ursachen dieses Befundes. 8 Jahre danach fand man heraus, dass die bimodale Verteilung des Patientenkollektivs auf genetische Unterschiede zurückzuführen ist (Evans *et al.*, 1960). Schliesslich entdeckte man viele Jahre später, dass diese Beobachtungen durch die individuell unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit, Isoniazid zu acetylieren zu erklären waren. Somit waren NATs die ersten Enzyme für die ein kausaler Zusammenhang bezüglich interindividuellen Schwankungen beim Metabolismus von Arzneimitteln hergestellt werden konnte (Evans, 1989, Grant, 1993).

### Humane NAT2 Allele

Nachdem man erkannt hatte, dass der klassische Acetylierungs-Polymorphismus auf Mutationen am *NAT2*-Locus zurückzuführen ist (Blum *et al.*, 1991, Grant *et al.*, 1991), wurde intensiv an allelischen Varianten humaner *NAT2* geforscht. Bis heute wurden bereits 36 verschiedene Allele identifiziert (Tab. 3). Die bemerkenswerte Vielfalt der *NAT2*-Allele ist

unter anderem durch die spezifische Kombination verschiedener Punktmutationen zu erklären. Als Folge der zunehmenden Globalisierung und der damit verbundenen Aufweichung der ethnischen Grenzen, ist die Entdeckung weiterer Allele wahrscheinlich. Obwohl das *NAT2\*4*-Allel in vielen ethnischen Gruppen nicht das häufigste Allel darstellt, wird es allgemein als Wildtyp-Allel angesehen, da es keine der für *NAT2* spezifischen Mutationen trägt. Dagegen weisen alle andere bisher beschriebenen Allele in ihrer kodierenden DNA-Sequenz ein bis maximal vier Nukleotid Substitutionen auf. Insgesamt wurden für das *NAT2*-Gen 17 Mutationen und 1 Deletion nachgewiesen. Davon haben 12 Mutationen (C190T, G191A, T341C, G364A, A411T, A434C, G499A, G590A, A803G, A845C, G857A, T859C) einen Aminosäuren-Austausch zur Folge, 1 Mutation (G364A) bewirkt eine Leserasterverschiebung und 4 Nukleotidsubstitutionen (T11C, C282T, C481T und C759T) stellen sogenannte stille Mutationen dar, welche ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz sind (Tab. 3). Zur Bestimmung der Korrelation zwischen *NAT2* Genotyp und Phänotyp wurden in der Vergangenheit mehrere Studien durchgeführt (Bell *et al.*, 1993, Cascorbi *et al.*, 1995, Hickman *et al.*, 1992). Frühe Genotypisierungsstudien zeigen für die Mutationen C481T, G590A, G857A und obgleich seltener, auch für G191A, eine positive Korrelation zu einem langsamen Acetylierer-Phänotyp. Desweiteren fand man heraus, dass Individuen, welche homozygot für den *NAT2*-Polymorphismus waren, einen langsamen Acetylierer-Phänotyp aufwiesen, während für heterozygote Individuen ein intermediärer Acetylierer-Phänotyp und schliesslich für homozygote Individuen ohne *NAT2*-Polymorphismus ein schneller Acetylierer-Phänotyp feststellbar war. Diese Beobachtungen zeigen, dass dem Acetylierer-Status eine Gen-Dosis-Wirkungsbeziehungen zugrunde liegt.

Über molekulare Mechanismen, welche zu einem langsamen Acetylierer-Phänotyp führen, weiß man gegenwärtig noch wenig. So ist lediglich bekannt, dass bestimmte Mutationen wie zum Beispiel C282T ohne Auswirkungen auf die Enzymaktivität bleiben (Hein *et al.*, 1994b, Cascorbi *et al.*, 1996a), während andere Mutationen *ex vivo* bei gleichbleibenden mRNA-Mengen zu reduzierten Proteingehalten führen (Blum *et al.*, 1991, Deguchi, 1992). Auch in der Leber wurden reduzierte *NAT2*-Proteinmengen bei mutierten Allelen festgestellt (Grant *et al.*, 1991). Es könnte jedoch sein, dass die Menge an immunologisch detektierbaren Protein, aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten der verwendeten Antikörper zu den mutierten h*NAT2*-Varianten, in früheren Studien oftmals falsch eingeschätzt wurde (Wormhoudt *et al.*, 1999). Diese Ansicht wird von Untersuchungen unterstützt, bei welchen die Aktivitätsabnahme der mutierten *NAT2*-Varianten nicht auf den Abbau an immunologisch detektierbarem Protein zurückzuführen war. So wurden bei der heterologen Expression von

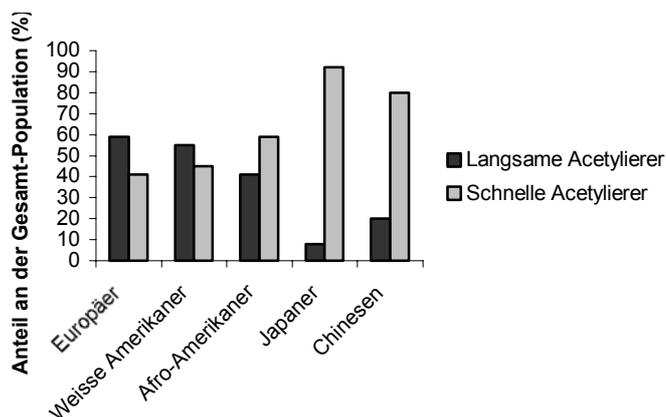
NAT2-Enzymen mit Nukleotid-Substitutionen auf den Positionen 191, 341, 590 und 857 lediglich verringerten Halbwertszeiten der aktiven Enzyme festgestellt (Hein *et al.*, 1994, Ferguson *et al.*, 1994b, Hickman *et al.*, 1995). Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Widerspruch wäre wiederum, dass die artifizielle Umgebung eines bakteriellen Expressionssystems die reale Situation der Säugetierzelle nur unvollständig widerspiegelt.

Allel	Nukleotid-Austausch	Aminosäuren-Austausch	Phänotyp	Referenz
NAT2*4	keiner	keiner	s	Deguchi, T. (1992), Blum <i>et al.</i> (1990), Vatsis <i>et al.</i> (1991), Ebisawa und Deguchi (1991), Ohasko und Deguchi (1990), Grant <i>et al.</i> (1989), Hickman und Sim (1992)
NAT2*5A	T341C, C481T	Ile114 -> Tyr	l	Blum <i>et al.</i> (1990), Hickman <i>et al.</i> (1992), Lin <i>et al.</i> (1993), Ferguson <i>et al.</i> (1994)
NAT2*5B	T341C, C481T, A803G	Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	l	Vatsis <i>et al.</i> (1991), Lin <i>et al.</i> (1993), Abe <i>et al.</i> (1993)
NAT2*5C	T341C, A803G	Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	l	Hickman <i>et al.</i> (1992), Lin <i>et al.</i> (1993), Cascorbi <i>et al.</i> (1995) Ferguson <i>et al.</i> (1994)
NAT2*5D	T341C	Ile114 -> Tyr	l	Martinez <i>et al.</i> (1995), Agundez <i>et al.</i> (1996a und b) Leff <i>et al.</i> (1999)
NAT2*5E	T341C, G590A	Ile114 -> Tyr, Arg197 -> Gln	l	Martinez <i>et al.</i> (1995)
NAT2*5F	T341C, C481T, C759T A803G	Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	l	Woolhouse <i>et al.</i> (1997)
NAT2*5G	C282T, T341C, C481T, A803G	Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	?	Anitha und Banerjee (2003)
NAT2*5H	T341C, C481T, A803G, T859C	Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg, Ile287 -> Tyr	?	Anitha und Banerjee (2003)
NAT2*5I	T341C, A411T, C481T, A803G	Ile114 -> Tyr, Leu137Phe, Lys268 -> Arg	?	Doll <i>et al.</i> (2003)
NAT2*5J	C282T, T341C, G590A	Ile114 -> Tyr, Arg197 -> Gln	?	Tanira <i>et al.</i> (in press)
NAT2*6A	C282T, G590A	Arg197 -> Gln	l	Deguchi, T. (1992), Blum (1990), Vatsis (1991), Hickman <i>et al.</i> (1992), Lin <i>et al.</i> (1993)
NAT2*6B	G590A	Arg197 -> Gln	l	Lin <i>et al.</i> (1993), Agundez <i>et al.</i> (1996a und b)
NAT2*6C	C282T, G590A, A803G	Arg197 -> Gln, Lys268 -> Arg	l	Agundez <i>et al.</i> (1996a und b)
NAT2*6D	T111C, C282T, G590A	Arg197 -> Gln	l	Leff <i>et al.</i> (1999)
NAT2*6E	C481T, G590A	Arg197 -> Gln	?	Cascorbi <i>et al.</i> (1995)
NAT2*7A	G857A	Gly286 -> Glu	l	Blum <i>et al.</i> (1990), Ohasko und Deguchi (1990), Lin <i>et al.</i> (1993)
NAT2*7B	C282T, G857A	Gly286 -> Glu	l	Deguchi, T. (1992), Hickman <i>et al.</i> (1992)
NAT2*10	G499A	Glu167 -> Lys	?	Lee (?)
NAT2*11A	C481T	keiner	?	Lee (?), Sekine <i>et al.</i> (2001)
NAT2*11B	C481T, 859 (Deletion)	Ser287 -> Frameshift	?	Anitha und Banerjee (2003)
NAT2*12A	A803G	Lys268 -> Arg	s	Lin <i>et al.</i> (1993), Cascorbi <i>et al.</i> (1996)
NAT2*12B	C282T, A803G	Lys268 -> Arg	s	Lin <i>et al.</i> (1993), Agundez <i>et al.</i> (1996b)
NAT2*12C	C481T, A803G	Lys268 -> Arg	s	Ferguson <i>et al.</i> (1994), Agundez <i>et al.</i> (1996a und b)
NAT2*12D	G364A, A803G	Asp122 -> Asn, Lys268 -> Arg	?	Doll <i>et al.</i> (2003)
NAT2*13	C282T	keiner	s	Lin <i>et al.</i> (1993), Cascorbi <i>et al.</i> (1995), Martinez <i>et al.</i> (1995), Agundez <i>et al.</i> (1994)
NAT2*14A	G191A	Arg64 -> Gln	l	Ferguson <i>et al.</i> (1994), Bell <i>et al.</i> (1993)
NAT2*14B	G191A, C282T	Arg64 -> Gln	l	Bell <i>et al.</i> (1993), Delomenie <i>et al.</i> (1996)
NAT2*14C	G191A, T341C, C481T, A803G	Arg64 -> Gln, Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	l	Martinez <i>et al.</i> (1995), Agundez <i>et al.</i> (1996a und b)
NAT2*14D	G191A, C282T, G590A	Arg64 -> Gln, Arg197 -> Gln	l	Martinez <i>et al.</i> (1995), Agundez <i>et al.</i> (1996a und b)
NAT2*14E	G191 A, A803G	Arg64 -> Gln, Lys268 -> Arg	l	Martinez <i>et al.</i> (1995)
NAT2*14F	G191A, T341C, A803G	Arg64 -> Gln, Ile114 -> Tyr, Lys268 -> Arg	l	Agundez <i>et al.</i> (1996b)
NAT2*14G	G191A, C282T, A803G	Arg64 -> Gln, Lys268 -> Arg	l	Leff <i>et al.</i> (1999)
NAT2*17	A434C	Gln145 -> Pro	?	Lin <i>et al.</i> (1994)
NAT2*18	A845C	Lys282 -> Thr	?	Lin <i>et al.</i> (1994)
NAT2*19	C190T	Arg64 -> Trp	?	Shishikura <i>et al.</i> (2000), Lee <i>et al.</i> (2002), Zhu <i>et al.</i> (2002)

**Tab. 3 : Mutationen im *hNAT2*-Gen und deren Auswirkung auf Struktur und Phänotypen der bisher identifizierten Allele. Schelle Acetylierer Phänotypen sind mit "s", langsame mit "l" gekennzeichnet. Für die mit "?" versehenen Phänotypen liegen nach aktuellem Kenntnisstand keine entsprechenden Befunde vor. Daten verändert, aus Hein *et al.* (2000) und <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html> (Stand : 5. Juni 2003).**

## Interethnische Variabilität

Beim Vergleich verschiedener ethnischer Populationen unterliegt die Häufigkeit des langsamen Acetylierer-Phänotyps deutlichen Schwankungen (Evans, 1989). Wie aus Abb. 4 ersichtlich liegt der Anteil schneller Acetylierer für die japanische und chinesische Population zwischen 8 und 20 %, wohingegen bei Europäern und weißen Amerikanern vorwiegend langsame Acetylierer vorgefunden werden (Wormhoudt *et al.*, 1999). Die hier gezeigte phänotypische interethnische Variabilität bestätigt sich auch auf Allelebene. Demzufolge wurde bei Genotypisierungsstudien an europäischen Populationen für das Wildtyp-Allel *NAT2\*4* eine Allelfrequenz von 19,9 % festgestellt, während die mit einem langsamen Phänotyp assoziierten Allele *NAT2\*5B* mit 44,8 % und *NAT2\*6A* mit 30,2 % deutlich häufiger auftraten (Hickman *et al.*, 1992). Sehr niedrige Allelfrequenzen wurden für *NAT2\*5A*, *NAT2\*5C* und *NAT2\*7B* (1,0, 3,1 und 1,0 %) festgestellt. Dagegen stellt *NAT2\*7B* in der japanischen Bevölkerung zusammen mit *NAT2\*6A* das häufigste mutierte Allel dar, wohingegen das Allel *NAT2\*5B* hier nahezu gar nicht vorzufinden ist (Deguchi, 1992, Deguchi *et al.*, 1990).



**Abb. 4 : Verteilung des langsamen und schnellen Acetylierer-Phänotyps auf unterschiedliche ethnische Gruppierungen. Verändert nach Wormhoudt *et al.* (1999).**

Die für das *NAT2\*5B*-Allel kennzeichnende C481T-Mutationen kommt deutlich häufiger in der europäischen Population vor und könnte somit ein Erklärungsgrund für die interethnische Verteilung des *NAT2\*5*-Allels darstellen. Analog hierzu tritt die für das *NAT2\*7B*-Allel ausschlaggebende A857G-Mutation sehr selten in europäischen Populationen auf und scheint eine für orientalische und amerindische Bevölkerungsgruppen typische Mutation zu sein (Lin

*et al.*, 1994, Arias *et al.*, 1993). Somit ist anzunehmen, dass die zu beobachtenden interethnischen Variabilitäten bezüglich des Acetylierer-Phänotyps letztlich auf einer spezifischen Allokation individueller Mutationen basieren.

### **Auswirkungen des Acetylierer-Status**

Der Zusammenhang zwischen Acetylierer-Status und verschiedenen Krankheitsbildern und unterschiedlichen Therapieerfolgen war und ist Gegenstand intensiver Forschung. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, wurde der genetische Polymorphismus der *N*-Acetyltransferase erstmals in Tuberkulose-Patienten entdeckt, welche mit Isoniazid behandelt wurden. Isoniazid wird dabei primär über Acetylierung durch NAT2 ausgeschieden. Seitdem sind viele polymorph acetylierte Arzneimittel entdeckt worden (Tab. 4). Desweiteren zeigten Phänotypisierungsstudien dass, in Abhängigkeit davon, ob ein schneller oder langsamer Acetylierer-Status vorliegt, hieraus unter anderem veränderte Risiken für eine Erkrankung an Blasen-, Kolon-, und Brustkrebs sowie systemischen *Lupus erythematosus*, sowie diversen anderen Krankheiten resultieren können (Butcher *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse implizieren darüber hinaus Umweltchemikalien, welche vornehmlich durch NAT2 metabolisiert werden. Allerdings gestaltet sich die Identifizierung dieser Faktoren bis heute schwierig und nur wenige Studien liefern konsistente Ergebnisse. So wird in vielen Untersuchungen der schnelle Acetylierer-Phänotyp für ein erhöhtes Kolonkrebs-Risiko verantwortlich gemacht (Wohlleb *et al.*, 1990, Ilett *et al.*, 1987, Lang *et al.*, 1986), während andere Forschungsgruppen dieses Ergebnis nicht bestätigen konnten (Brockton *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 1998, Welfare *et al.*, 1997). Geographische und ethnische Unterschiede, zu geringe Probandenzahlen, sowie unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten stellen mögliche Ursachen für die widersprüchliche Datenlage dar. Konsistentere Ergebnisse ergeben sich, wenn die verschiedenen Krankheiten und den Acetylierer-Phänotyp in einer konkreten Expositionssituation untersucht werden. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass schnelle Acetylierer nach einer Exposition gegenüber heterozyklischen aromatischen Aminen aus pyrolysiertem Fleisch ein deutlich höheres Risiko bezüglich der Erkrankung an Kolonkrebs aufweisen als langsame Acetylierer (Chen *et al.*, 1998, Welfare *et al.*, 1997, Lang *et al.*, 1994). Dieselbe Situation zeigt sich für die Korrelation zwischen aromatischen Aminen wie beispielsweise 4-Aminobiphenyl aus dem Zigarettenrauch und Blasenkrebs, wo ebenfalls ein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden konnte - wobei hier langsame Acetylierer ein höheres Blasenkrebs-Risiko aufweisen (Ladero *et al.*, 1985, Risch *et al.*, 1995).

Kategorie	Stoffbezeichnung	Acetylierer-Status	Effekt
Arzneimittel	Dapson	l	Neurotoxizität
	Sulphamethoxazol	l	Hypersensitivität
	Hydralazin	l	Systemischer <i>Lupus erythematosus</i>
		s	Erniedrigter Therapie-Erfolg
	Isoniazid	l	Interaktion mit Phenytoin
		l	Interaktion mit Rifampicin
	Cotrimoxazol	l	Diverse unerwünschte Nebenwirkungen
	Sulphasalazin	l	Verschiedene toxische Effekte
		l	Hepatotoxizität
		l	Brechreiz, Übelkeit
		s	Leukopenie
Aromatische Amine	<i>p</i> -Phenylendiamin	l	Kontaktdermatitis
	Anilin	l	Blasenkrebs
Heterozyklische Amine	Diverse	s	Kolon-Krebs

**Tab. 4 : Auswirkungen von Acetylierer-Phänotypen auf Therapie-Erfolg und Toxizitäten. Daten verändert nach Butcher *et al.* (2002). l = langsam, s = schnell.**

## 2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die stabile Koexpression von humanen Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) und polymorphen Formen humaner *N*-Acetyltransferase Typ 2 (hNAT2) in V79-Zellen zur Demonstration ihres Nutzens in der präklinischen Arzneimittelentwicklung und bei der Bewertung von Chemikalien. Dies impliziert eine formelle Erweiterung der *V79 Cell Battery*<sup>™</sup>, eine umfassende *in vitro*-Darstellung des humanen *N*-Acetyltransferase Typ 2-Polymorphismus und nicht zuletzt die Möglichkeit, die toxikologischen Relevanz der Interaktion von humanen CYP1A2 und humaner *N*-Acetyltransferase Typ 2 bei der Aktivierung aromatischer Amine zu verifizieren. Letztlich soll die *in vitro*-Darstellung des humanen *N*-Acetyltransferase Typ 2-Polymorphismus die Möglichkeit einer individuellen Risikoabschätzung aufzeigen.

## 3. Lösungsstrategie

### 3.1 Konstruktion der rekombinanten V79MZ-Zelllinien

#### Auswahl der Allele der polymorphen hNAT2

Um den für die kaukasische Bevölkerung charakteristischen Polymorphismus humaner *N*-Acetyltransferase Typ 2 in rekombinanten V79-Zelllinien möglichst vollständig abzubilden, wurden die am häufigsten vorkommenden Allele *NAT2\*4*, *\*NAT2\*5B* und *NAT2\*6A* ausgewählt. Zur Überprüfung der Validität des schnellen Acetylierer-Phänotyps wurde zusätzlich *NAT2\*13* exprimiert, da diese Allelvariante keine enzymkinetischen Unterschiede zu *NAT2\*4* aufweist.

#### Auswahl der Enzymkombination hCYP1A2/hNAT2

Die oben erwähnten polymorphen Formen der hNAT2 sollten mit humanem CYP1A2 koexprimiert werden, da es für die toxikologische Relevanz der Kombination von hCYP1A2 und hNAT2 bei der Aktivierung aromatischer Amine viele Hinweise gibt (Probst *et al.*, 1992, Constable *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 2001, Dominguez *et al.*, 2003).

### Auswahl des Expressionssystems

*In vivo*-Systeme, wie sie beispielsweise Versuchstiere repräsentieren, sind sehr komplex, haben einen unspezifischen Hintergrund, sind nur eingeschränkt standardisierbar und spielen daher bei der Beantwortung mechanistischer Fragestellungen nur eine untergeordnete Rolle. Demzufolge sind die aus Inhibitions-, Induktions- und *Knock-Out*-Studien resultierenden Daten oft widersprüchlich und nur bedingt miteinander vergleichbar. Rekombinante *in vitro*-Testsysteme sind dagegen durch eine gute Standardisierbarkeit, hohe Spezifität, niedrige Komplexität und hohe Prädiktivität gekennzeichnet. Dies trifft auch für das V79-Expressionssystem zu. Im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen bieten V79-Zellen eine Vielzahl toxikologischer Endpunkte bei niedrigem und stabilem Hintergrund und eignen sich daher besonders für Mutagenitäts- und Toxizitätsstudien (Bradley *et al.*, 1981). Insbesondere zeichnen sich V79-Zellen gegenüber allen anderen Säugerzelllinien, einschließlich humanen, durch einen außergewöhnlich stabilen, pseudodiploiden Karyotyp mit konstanter Chromosomenzahl aus, der auch nach Transfektion mit Fremd-DNA erhalten werden kann (Doepker *et al.*, 1998; Simi *et al.*, 1999). Dies ist gerade im Hinblick auf zytogenetische Endpunkte entscheidend. V79-Zellen haben darüber hinaus eine sehr kurze Generationszeit von weniger als 12 Stunden und lassen sich mit hoher Klonierungseffizienz stabil transfizieren (Doehmer *et al.*, 1988). Für die Spezifität des Testsystems spricht, dass die hier verwendeten V79-Zellen des sogenannten Mainzer Subklons (V79MZ) weder endogenes Cytochrom P450 (Kiefer und Wiebel, 1989; Onderwater *et al.*, 1996, Krebsfänger *et al.*, 2003) noch signifikante *N*-Acetyltransferase-Aktivitäten aufweisen (FJ Wiebel, persönliche Mitteilung). Daher sind sie sowohl für das transfizierte Cytochrom P450-Isoenzym, als auch für die polymorphen Formen der *N*-Acetyltransferase Typ 2 exakt definiert. Folgerichtig wird die heterologe Expression von fremdstoff-metabolisierenden Enzymen, von der OECD als wissenschaftlich gerechtfertigt angesehen, um endogene Bioaktivierungsprozesse abzubilden :

*"A number of developments , including the construction of genetically engineered cell lines expressing specific activating enzymes, may provide the potential for endogenous activation. The choice of the cell lines used should be scientifically justified (e.g. by the relevance of the cytochrome P450 isoenzymes for the metabolism of the test substance)."*

OECD recommendations

Zur heterologen Expression von Cytochromen P450 wurden bisher verschiedene biologische Systeme entwickelt : COS-Zellsystem (McManus *et al.*, 1990), transgene Hefekulturen (Eugster *et al.*, 1990, Ching *et al.*, 1991), Vaccinia- und Epstein-Barr-Virus vermittelte Genexpression in HepG2- und lymphoblastoiden AHH-1-Zellen (Shou *et al.*, 1994a und 1994b) *E. coli*-Expressionssysteme (Bauer *et al.*, 1995, Yamazaki *et al.*, 1995). Auch *N*-Acetyltransferasen wurden bereits in verschiedenen Systemen heterolog exprimiert. So zum Beispiel in COS-Zellen (Rogers *et al.*, 1998, Blum *et al.*, 1991), *E. coli* (Ferguson *et al.*, 1994), und Baculovirus-infizierten Insektenzellen (BD Gentest<sup>TM</sup>-NAT2-Cytosol).

Im Hinblick auf die Fremdexpression von Cytochrom P450 tritt bei stark exprimierenden Systemen wie Baculovirus-infizierten Insektenzellen vor allem das Problem auf, dass die endogene Häm-Synthese für die Sättigung des exprimierten Cytochroms mit prosthetischem Häm nicht ausreichend ist (Asseffa *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1994; Buters *et al.*, 1994; Paine *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu werden in V79-Zellen Häm sowie Cytochrom b<sub>5</sub> in ausreichender Menge endogen synthetisiert (Onderwater *et al.*, 1996). Außerdem ist eine Supplementierung oder Koexpression mit Cytochrom P450-NADPH-Oxidoreduktase nur in Ausnahmefällen notwendig (Schneider *et al.*, 1996). Gegenüber evolutiv weiter entfernten, prokaryontischen Expressionssystemen ist es von Vorteil, dass die cDNA-Sequenzen der Fremd-DNA nicht wie beispielsweise bei einer Expression in *E. coli* adaptiert werden müssen (Sengstag *et al.*, 1994). Desweiteren sind zur Cytochrom P450-Inkorporation geeignete intrazelluläre Membransysteme vorhanden, so dass keine nachträgliche Rekonstitution erforderlich ist (Gillam *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu Hefen sind V79-Zellen für viele Substrate permeabel. Metabolismus-Untersuchungen können daher auch unter Ausnutzung des zelleigenen Stoffwechsels, beispielsweise zur NADPH-Regeneration, direkt in der Zellkultur durchgeführt werden.

### **Transfektionsansätze**

Zunächst wurde ein geeignetes Expressionssystem gewählt, welches folgenden Anforderungen standhalten musste : Selektion mit unterschiedlichen Resistenzmarkern unter Gewährleistung eines vergleichbaren Expressionsniveaus der jeweiligen cDNAs. Die Wahl fiel auf das pcDNA3.1-Expressionssystem von Invitrogen. Dieses besteht aus zwei identischen Vektoren welche sich lediglich hinsichtlich ihres Resistenzgens unterscheiden : pcDNA3.1Neo(+) zur Selektion mit Neomycin und pcDNA3.1Hygro(+), welcher eine simultane Selektion mittels Hygromycin ermöglicht.

Die Konstruktion der Zelllinien erfolgte in zwei Schritten :

- **Konstruktion der Kontroll-Zelllinien V79MZhCYP1A2 und V79MZhNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13** : Die hCYP1A2-cDNA wurde in einen pcDNA3.1(+)-Vektor kloniert, welcher ein Neomycin-Resistenzgen enthielt. Die polymorphen hNAT2-cDNAs wurden analog in einen pcDNA3.1Hygro-Vektor kloniert.
- **Konstruktion der koexprimierenden Zelllinien V79MZhCYP1A2/hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13** : Die polymorphen koexprimierenden Zelllinien wurden konstruiert, indem die bereits generierte V79MZhCYP1A2-Kontroll-Zelllinie mit den hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13 pcDNA3.1Hygro-Konstrukten transfiziert wurde. Daraufhin erfolgte eine simultane Selektion mittels Hygromycin und Neomycin.

### 3.2 Charakterisierung der neuen Zelllinien

#### V79MZhCYP1A2-Zelllinie

Im Rahmen einer Vorauswahl wurden die nach Transfektion und Selektion erhaltenen Klone im Falle von V79MZhCYP1A2-Klonen mittels *In situ*-Immunfluoreszenz hinsichtlich homogener und stabiler Expression des rekombinanten Cytochroms P450 untersucht. Die Charakterisierung der positiven Klone erfolgte

- auf DNA-Ebene durch Reamplifikation der transfizierten cDNA
- auf mRNA-Ebene durch RT-PCR,
- auf funktionaler Ebene durch Messung der Ethoxyresorufin-*O*-deethylierung (EROD)

#### V79MZhNAT2-Zelllinien

Da für die Vorauswahl von V79MZhNAT2-Klonen kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, wurden direkt Enzymaktivitäten bezüglich der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren bestimmt, einige Klone ausgewählt, subkloniert und auf Homogenität und Stabilität überprüft. Um die Aktivitäten der verschiedenen polymorphen Formen miteinander vergleichen zu können, erfolgte die Festlegung auf bestimmte Klone nach einem standardisierten Auswahlverfahren. Demnach wurden nur diejenigen Klone akzeptiert, deren Aktivitäten innerhalb einer Schwankungsbreite von 10 % um das mittlere Aktivitätsniveau lagen. Die weitere Charakterisierung der Klone erfolgte auf mRNA und DNA-Ebene, wie bereits für die V79MZhCYP1A2-Klone geschildert.

### **V79MZhCYP1A2/hNAT2-Zelllinien**

Die Charakterisierung dieser Zelllinien erfolgte wie oben beschrieben.

### **3.3 Anwendung der neuen Zelllinien**

Zunächst sollten die neuen Zelllinien unter Verwendung des Markersubstrates Sulfamethazin validiert werden. In diese auf den Metabolismus des Sulfamethazin beschränkte Validierung war biologisches Referenzmaterial, wie beispielsweise humanes Leberzytosol, mit einzubeziehen, um eine Vergleichbarkeit mit Literaturdaten zu ermöglichen. Anhand von Metabolismusuntersuchungen am Modellkarzinogen 2-Aminofluoren, sollte die *in vitro*-Darstellung des humanen *N*-Acetyltransferase Typ 2-Polymorphismus die Möglichkeit einer individuellen Risikoabschätzung aufzeigen. Weiter war für 2-Aminofluoren und für eine Auswahl an oxidativen Haarfarben-Vorstufen die toxikologische Relevanz der Kooperation von humanem CYP1A2 und humaner *N*-Acetyltransferase Typ 2 bei der Aktivierung aromatischer Amine zu verifizieren. Im Falle des 2-Aminofluorens wurden dabei genotoxische Auswirkungen mittels HPRT-Test untersucht, wohingegen sich die Untersuchungen der oxidativen Haarfarben-Vorstufen auf Ergebnisse aus dem MTT-Cytotoxizität-Test beschränkten. Schliesslich sollte mit Hilfe dieser Anwendungsbeispiele der Nutzen rekombinanter V79-Zellen in der präklinischen Arzneimittelentwicklung und bei der Bewertung von Chemikalien demonstriert werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Laborgeräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
Automatischer Kolonienzähler	Biologics AccuCount	HPRT-Test
Thermomixer	Eppendorf	Enzyminkubationen
Fluoroscans Ascent CF	Thermolab	EROD-Test
Multiscan Ascent	Thermolab	Proteinbestimmung
Semimicrowaage BP2100S	Sartorius	Abwiegen von Proben (1000 bis 0,01 g)
Präzisionswaage BP211D	Sartorius	Abwiegen von Proben (100 g bis 0,1 mg)
Gene Genius Geldokumentationssystem	Merck	Geldokumentation
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf	Zentrifugation (1,5 ml- und 2 ml Cups)
Mastercycler Gradient	Eppendorf	PCR, RT-PCR, SDR-Mutagenesis
Elektrophorese Power Supply		Gelelektrophorese,
Schüttelinkubator (Multitron)	Infors	<i>E. coli</i> -Kultivierung
Kühlzentrifuge Sigma 4K 15	Sigma	Zentrifugation von V79-Zellen
Gelkammer	Pharmacia Biotech	Lauf von Agarose-Gelen
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Sanyo	Kultivierung von V79-Zellen
Brutschrank	Binder	<i>E. coli</i> -Kultivierung
Heissluftsterilisator	Werner	Sterilisieren von Glaswaren
Magnetrührer MR3001	Heidolph	Herstellen von Puffern & Lösungen
Ultrazentrifuge Avanti J30I (Rotor JA 10)	Beckmann	Ernten von <i>E. coli</i> V79-Homogenate
pH-Meter inoLab Level 2P	WTW	pH-Wert-Einstellung von Puffern & Lösungen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss	Optische Kontrolle von V79 -Zellen (Normallicht)

Mikroskop Axiolab	Zeiss	Optische Kontrolle von V79-Zellen (Fluoreszenzlicht)
Spektrophotometer 300 Bio	Varian	Bestimmung DNA-Konzentration, optische Dichte, Absorptionsverhalten von Substraten und Metaboliten
HPLC-Anlage (1100 Series)	Agilent	Aminofluoren- und Sulfamethazin-Analytik
- Degaser (G1322A)	Agilent	dto.
- Binäre Pumpe (G1312A)	Agilent	dto.
- WPLAS Probengeber (G1367A)	Agilent	dto.
- Säulenofen (G1316A)	Agilent	dto.
- DAD-Detektor (G1315B)	Agilent	dto.

## 2. Rechner und Software

Die Planung und Dokumentation der Klonierungsexperimente wurde mit dem Programm Clone Manager for Windows 4.01 (Fa. Scientific and Education Software, Durham, NC 27722-2045 USA) durchgeführt. Standardsoftware bei der Erstellung von Graphiken und Tabellen sowie der Textverarbeitung waren MS-Excel 2000, MS-Word 2000 und MS-Powerpoint 2000 (Fa. Microsoft, Redmond, WA, USA). Chemische Strukturformeln wurden mittels ChemDraw 6.0 (Fa. Cambridge Soft Corporation, Cambridge, MA, USA) entworfen. Die Berechnung enzymkinetischer Parameter erfolgte mit SigmaPlot 2001 (Fa. SPSS Science Marketing Department, Chicago, IL, USA). Das Scannen und die grafische Aufbereitung von Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop 6.0 (Fa. Adobe Systems incorporated, San Jose, CA, USA) vorgenommen. Die Dokumentation und Auswertung von Agarosegelen erfolgte mit dem Syngene Gene Genius mit der Software Genesnap 4.00.00 (Syngene, Cambridge, GB).

### 3. Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril (HPLC-Reinheitsgrad)	Applichem (Darmstadt)
Agar-Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarose (ultra pure)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
2-Aminofluoren	Merck (Hohenbrunn)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	NewEnglandBiolabs (Schwalbach/Taunus)
DEPC	Sigma (Taufkirchen)
Dicumarol	Sigma (Taufkirchen)
DMBA	Fluka (Buchs, Schweiz)
DMEM	Gibco (Karlsruhe)
DMSO	Applichem (Darmstadt)
EDTA	Applichem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
7-Ethoxyresorufin	Sigma (Taufkirchen)
FCS	Gibco (Karlsruhe)
Geneticin 418-Lösung	Gibco (Karlsruhe)
Glycerin (87%)	Fluka (Buchs, Schweiz)
HEPES	Applichem (Darmstadt)
Hygromycin B	Calbiochem (Schwalbach)
Luria Broth	Gibco BRL (Eggenstein)
Methanol (HPLC-Reinheitsgrad)	Applichem (Darmstadt)
MTT	Applichem (Darmstadt)
NADPH	Applichem (Darmstadt)
<i>N</i> -Acetyl-Aminofluoren	Fisher Scientific (Schwerter)
PBS	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)

Sulfamethazin	Sigma (Taufkirchen)
Thioguanin	Sigma (Taufkirchen)
Tris	Applichem (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)

*N*-Acetyl-Sulfamathazin wurde von PD Dr. Albrecht Seidel (BIU, Grossharnsdorf) synthetisiert. Die derivatisierten Aminophenole wurden der Wella AG (Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden entweder von Applichem (Darmstadt) oder von Sigma (Taufkirchen) in p.a.-Qualität bezogen. Es wurde stets Reinstwasser (18,2 MΩ<sup>cm</sup>) verwendet. Außerdem wurden die gängigen Laborgegenstände und Verbrauchsmaterialien benutzt.

#### 4. Enzyme, Antikörper und biologische Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>Polymerasen</b>		
- Taq-DNA-Polymerase	Quiagen (Hilden)	Screening
- PfuTurbo-DNA-Polymerase	Stratagene (La Jola, CA, USA)	<i>Site-Directed-Mutagenesis</i>
- Clontech Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, CA, USA)	PCR zur Klonierung mit Überhängen für Restriktionsenzymen
<b>Restriktionsenzyme und Ligasen</b>		
Alle Restriktionsenzyme und Ligasen	NewEnglandBiolabs (Schwalbach/Taunus)	Klonierung von DNA-Fragmenten
<b>Antikörper</b>		
Anti-hCYP1A2, polyklonales Anti-Körperserum aus Kaninchen	Chemicon (Freiburg)	<i>In situ</i> -Immunfluoreszenz
FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus Ziege	Dianova (Hamburg)	<i>In situ</i> -Immunfluoreszenz

**Cytosole, Mikrosomen, S9-Mix**

Humanes Lebercytosol (Pool)	NatuTec (Frankfurt)	NAT-Aktivitätsbestimmung
hNAT1-Cytosol (rekombinant)	NatuTec (Frankfurt)	NAT-Aktivitätsbestimmung
hNAT2-Cytosol (rekombinant)	NatuTec (Frankfurt)	NAT-Aktivitätsbestimmung
Ratten-S9-Mix	RCC (Rossdorf)	NAT-Aktivitätsbestimmung
Humane Lebermikrosomen (Pool)	NatuTec (Frankfurt)	hCYP1A2-Aktivitätsbestimmung

**5. Mikrobiologisches Material und Methoden****5.1 Bakterienstämme**

Vor Durchführung der Restriktion wurden die Plasmide in den *E. coli*-Stämmen DH5 $\alpha$  und TOP10F' (Invitrogen) propagiert.

**TOP10F'(Invitrogen):** Dieser Stamm überexprimiert den Lac-Repressor (*lacI<sup>q</sup>*-Gen) und kann daher unter Zugabe von IPTG einem Blau/Weiss-Screening unterzogen werden.

F' *lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>) mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG.*

**DH5 $\alpha$  :** Zur näheren Beschreibung von DH5 $\alpha$  sei auf Sambrook *et al.* (1989) verwiesen.

**5.2 Stammhaltung**

Die oben erwähnten *E. coli*-Stämme wurden für einige Tage als LB-Flüssigkultur (2,5 % (w/v) LB in Wasser), oder auf LB-Kulturplatten (1,5 % (m/v) Agar-Agar in LB-Flüssigmedium) über mehrere Wochen bei + 4°C gelagert. Trugen die *E. coli* ein Plasmid mit  $\beta$ -Lactamasegen, wurden Medien mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin zur Selektion verwendet.

Zur langfristigen Lagerung über Jahre hinweg wurde von einzelnen Klonen eine Glycerol-Stammkultur angelegt: 1 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden flüssigen Bakterienkultur wurde mit 1 ml eiskaltem 100 %igem Glycerin versetzt und bei - 80 °C eingefroren.

### 5.3 Übernachtskultur

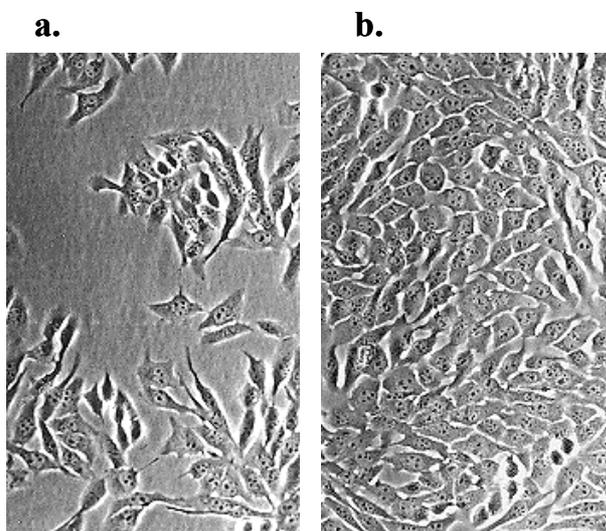
Einige ml LB-Flüssigmedium wurden mit *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 upm inkubiert. Wenn die *E. coli* ein Plasmid mit  $\beta$ -Lactamasegen trugen, wurde das Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin zur Selektion versetzt.

## 6. Zellbiologische Materialien und Methoden

### 6.1 Die Zelllinie V79MZ

Die Zelllinie V79 wurde in den 50er Jahren aus morphologisch und neoplastisch transformierten Lungenfibroblasten eines adulten männlichen Chinesischen Hamsters etabliert (Ford und Yerganian, 1958). Sie hat seitdem breite Anwendung in Toxizitäts- und Mutagenitätsstudien gefunden (Bradley *et al.*, 1981; Chu und Malling, 1968; Doehmer, 1993; Sawada und Kamataki, 1998; Swierenga *et al.*, 1991).

Die Verdopplungszeit von V79-Zellen ist mit durchschnittlich 10- 12 Std. im Vergleich zu allen anderen Zelllinien die bislang kürzeste. Sie wachsen adhärent in Einzelschichten. Bei 100 %iger Konfluenz beträgt die Zelldichte etwa  $5 \times 10^7$  Zellen pro  $150 \text{ cm}^2$  (Abb. 5), entsprechend einer Gesamtproteinmenge von 5 mg bzw. 1,5 mg mikrosomalem Protein. Darüber hinaus zeichnen sich V79-Zellen durch eine hohe Klonierungseffizienz und einen außergewöhnlich stabilen pseudodiploiden Karyotyp mit  $2n = 22$  Chromosomen aus (Simi *et al.*, 1999).



**Abb. 5 :** Lichtmikroskopische Aufnahme parentaler V79MZ-Zellen im Phasenkontrast bei 200facher Vergrößerung bei 50 %iger (a) und 100 %iger (b) Konfluenz. Die Zellen wachsen während der G- und S- Phase flach am Boden angeheftet und besitzen zahlreiche Nukleoli. Mitotische Zellen, idealerweise etwa 3 % aller Zellen, runden sich vorübergehend ab. Nach Durchlaufen der Mitose breiten sich die Tochterzellen im Medium aus, heften sich wieder an und bilden einen immer dichteren Zellrasen.

V79-Zellen besitzen keine meßbare endogene Cytochrom P450-Aktivität. Der in dieser Arbeit verwendete Mainzer Subklon V79MZ wurde hinsichtlich seiner endogenen Enzymausstattung eingehend charakterisiert (Glatt *et al.*, 1987; Glatt *et al.*, 1990). Im Gegensatz zum Neuherberger Subklon V79NH enthält er keine nennenswerte *N*-Acetyltransferaseaktivität.

## 6.2 Verwendete Zelllinien

Folgende bereits etablierte Zelllinien wurden eingesetzt: V79MZ parental (Glatt *et al.*, 1987) und V79NH parental (Wiebel *et al.*, 1992).

## 6.3 Kultivieren von V79MZ-Zellen

V79MZ-Zellen wurden bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit in speziell beschichteten Gewebekulturgefäßen (94/16 mm- oder 145/20 mm-Gewebekulturschalen und 50 ml- oder 250 ml-Gewebekulturflaschen von der Greiner GmbH (Frickenhausen); 24er- und 96er-Gewebekulturmikrotiterplatten von Nunc Inc. (Naperville, IL)) in DMEM-Kulturmedium mit erhöhtem Glukosegehalt (4,5 g/l) kultiviert. Zusätzlich wurde das DMEM-Kulturmedium mit 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert ("Komplettmedium"). Nach Transfektion wurden Geneticin 418- oder Hygromycin B-resistente V79MZ-Zellklone mit 1 mg Geneticin 418/ml-Komplettmedium bzw. 0,4 mg Hygromycin B/ml-Komplettmedium kultiviert.

## 6.4 Ablösen von V79MZ-Zellen mittels Trypsin/EDTA

Das Medium wurde abgesaugt, zweimal mit 5 ml PBS nachgespült und die Zellen durch 5minütige Inkubation in 2 ml 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA bei 37 °C vom Substrat abgelöst und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pipette sorgfältig vereinzelt. Das Trypsin wurde nach erneuter Zugabe von Komplettmedium durch die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren wieder inaktiviert.

### **6.5 Passagieren von V79MZ-Zellen**

Um die Konfluenz stets unter 100 % zu halten, wurden die Zelllinien regelmäßig passagiert. Dazu wurde ein Großteil der trypsinierten Zellen verworfen, oder in neue Kulturgefäße umgesetzt.

### **6.6 Einfrieren von V79MZ-Zellen**

Die trypsinierten Zellen wurden in 10 ml Kompletmedium durch 10minütige Zentrifugation bei 800 x rpm und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in eisgekühltem Kompletmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und aliquotiert in 1,8 ml-Kryoröhrchen (Nunc Inc., Naperville, IL) bei - 80 °C eingefroren. Nach 24 – 168 Std. wurden die so vorbehandelten Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **6.7 Auftauen von V79MZ-Zellen**

Gefrorene Aliquots wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in mindestens 10 ml Kompletmedium aufgenommen und 10 min. bei 800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets mit 13 ml Kompletmedium. Nach 2 – 4 Std. wurden die Zellen hinsichtlich Vitalität und Morphologie kontrolliert. Die Vitalität der aufgetauten Zellen war dabei stets größer als 90 %.

### **6.8 Herstellen von Zellhomogenat**

V79MZ-Zellen in drei 250 ml-Gewebekulturflaschen wurden bis zu 80 – 100 %iger Konfluenz kultiviert. Die trypsinierten Zellen wurden vereinigt, gleichmäßig auf je drei 145/20 mm-Gewebekulturschalen pro 250 ml-Gewebekulturflasche verteilt und in 20 ml Kompletmedium ohne G418 oder Hygromycin B bis zu 90 %iger Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde verworfen und zweimal mit 5 ml eisgekühltem Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) nachgespült. Die Zellen wurden in 3 ml eisgekühltem Puffer mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst, vereinigt und durch 10minütige Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 ml Puffer pro 145/20 mm-Gewebekulturschalen sorgfältig resuspendiert. Zur Bestimmung des Proteingehaltes und der enzymatischen Aktivität wurden die Suspensionen

umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Zellen aufzubrechen. Anschliessend wurden die so hergestellten Homogenate bis zum Gebrauch bei - 80 °C aufbewahrt.

## 7. Gentechnologische Methoden

### 7.1 Vektoren

Vektorbezeichnung	Hersteller	Verwendung
pcDNA3.1(+) <i>Hygro</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	Überexpression von hNAT2 in V79 Zellen
pcDNA3.1(+) <i>Neo</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	Überexpression von hCYP1A2 in V79 Zellen
pCR2.1-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)	Zwischenklonierung der <i>hCYP1A2</i> -cDNA

**Tab. 5: Klonierungs-Vektoren und deren Verwendung**

Die in Tab. 5 aufgeführten Vektoren wurden aus Original-Chargen entnommen und zur Transformation von kompetenten DH5 $\alpha$ -Zellen verwendet, woraus anschließend die Arbeitsvektoren isoliert wurden. Der mittels Topoisomerase „aktivierte“ Vektor pCR 2.1 TOPO wurde ausschließlich zur Zwischenklonierung des hCYP1A2-PCR-Fragmentes verwendet. Das System basiert auf dem Prinzip der sogenannten TA-Klonierung und ersetzt dadurch die ansonsten übliche T4-Ligase-Reaktion.

### 7.2 Generierung von cDNAs mittels PCR

<u>Generierte cDNA</u>	<u>Ausgangsmaterial</u>	<u>Primer/ PCR-Programm</u>
hNAT2-cDNA	Genomische DNA eines humanen Donors, homozygot für NAT2*4 (Zur Verfügung gestellt von Prof. I. Cascorbi, Greifswald)	88 und 89/ PCR 1
hCYP1A2-cDNA	Genomische DNA aus hCYP1A2 exprimierenden V79MZ-Zellen (Wölfel <i>et al.</i> , 1992)	133 und 134/ PCR 1

**Tab. 6 : Generierung von modifizierten cDNAs mittels PCR zur späteren Klonierung in die entsprechenden Zielvektoren.**

Die gemäss Tab. 6 generierten cDNAs wurden im Falle der hNAT2\*4-cDNA einer konventionellen Klonierung in den Vektor pcDNA3.1Hygro(+) mittels Hind III- und Xho I-Restriktionsverdau unterzogen, während die hCYP1A2-cDNA als Ausgangsmaterial für die sogenannte TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1-TOPO diente.

### 7.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Martinsried) synthetisiert. Die relativen Positionen und Orientierungen der Primer an den pcDNA3.1Hygro(+)hNAT2\*4- und pcDNA3.1Neo(+)hCYP1A2-Konstrukten sind in Abb. 6 dargestellt.

<b>Nr.</b>	<b>Sequenz (5' -&gt; 3')</b>	<b>Verwendung</b>
36 :	5'- CAC TGC TTA CTG GCT TAT CG - 3'	<i>Screening</i> von positiven Klonen in <i>E. coli</i> (Fwd)
37 :	5'- ACT AGA AGG CAC AGT CGA GG - 3'	<i>Screening</i> von positiven Klonen in <i>E. coli</i> (Rev)
88 :	5'- GCA TGC TGG ATC CTC GAG CTA AAT AGT AAG GGA TCC - 3'	Klonierung von hNAT2 über Xho I- Schnittstelle (Rev)
89 :	5'- TAT GCT TAA GCT TGC CGC CAC CAT GGA CAT TGA AGC - 3'	Klonierung von hNAT2 über Hind III- Schnittstelle (Fwd)
107 :	5'- CGC TTG AAC CTC AAA CAA TTG AAG ATT TTG AGT CTA TGA ATA C - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis</i> (Fwd) Pos. 590 G -> A
108 :	5'-GTA TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GTT TGA GGT TCA AGC G - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis</i> (Rev) Pos. 590 G -> A
114 :	5'- CTC CTG CAG GTG ACC ACT GAC GGC AGG AAT TAC - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis</i> (Fwd) Pos. 341 T -> C
115 :	5'- GTA ATT CCT GCC GTC AGT GGT CAC CTG CAG GAG - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis</i> (Rev) Pos. 341 T -> C

117 :	5'- GAG AGG AAT CTG GTA CTT GGA CCA AAT CAG GAG - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Fwd)</i> Pos. 481 C -> T
118 :	5'- CTC CTG ATT TGG TCC AAG TAC CAG ATT CCT CTC - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Rev)</i> Pos. 481 C -> T
119 :	5'- GAA GAA GTG CTG AGA AAT ATA TTT AAG ATT TCC - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Fwd)</i> Pos. 803 A -> G
120 :	5'- GGA AAT CTT AAA TAT ATT TCT CAG CAC TTC TTC - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Rev)</i> Pos. 803 A -> G
133 :	5'- GCC GCC ACC ATG GCA TTG TCC CAG TCT GTT CCC -3'	TOPO-TA-Klonierung hCYP1A2 (Fwd)
134 :	5'- GAA TGA TGC TCA GTT GAT GGA GAA GCG CAG CCG- 3'	TOPO-TA-Klonierung hCYP1A2 (Rev)
137 :	5'- GGA GGG TAT TTT TAT ATC CCT CCA GTT AAC AAA TAC AGC ACT GGC- 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Fwd)</i> Pos. 282 C -> T
138 :	5'-GCC AGT GCT GTA TTT GTT AAC TGG AGG GAT ATA AAA ATA CCC TCC - 3'	<i>Site-Directed Mutagenesis (Rev)</i> Pos. 282 C -> T
141 :	5'- CCC AGT CTG TTC CCT TCT CGG CCA CAG AGC - 3'	RT-PCR an hCYP1A2 (Fwd)
142 :	5'- GGT AGC AGG AGG ATG AGG AAG CTG GGT CAG - 3'	RT-PCR an hCYP1A2 (Rev)
149 :	5'- GCA TAT TTT GAA AGA ATT GGC TAT AAG AAC - 3'	RT-PCR an hNAT2 (Fwd)
150 :	5'- GAT GTT GGA GAC GTC TGC AGG TAT GTA TTC - 3'	RT-PCR an hNAT2 (Rev)

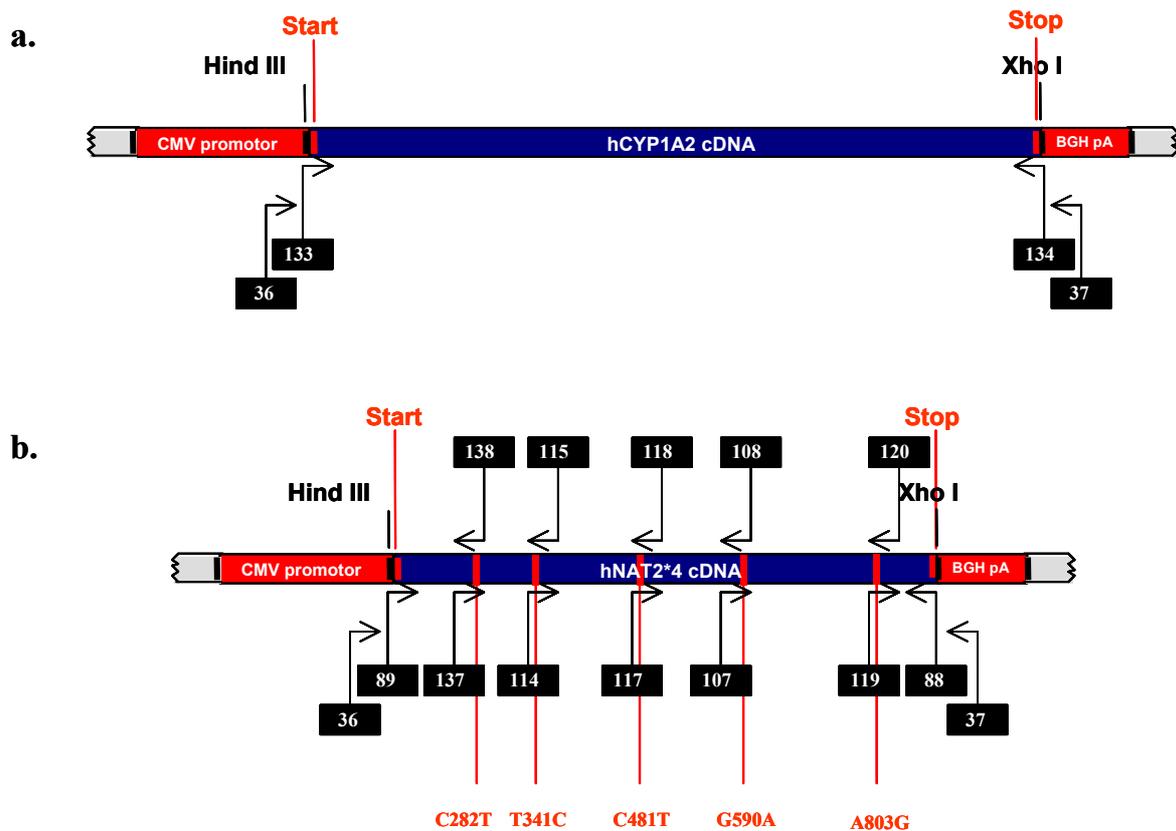


Abb. 6 : Relative Positionen und Orientierung von Primern an den pcDNA3.1Neo(+)*hCYP1A2*- (a.) und pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2\*4*-Konstrukten (b.). Die für die RT-PCR verwendeten Primer sind übersichtlichkeithalber nicht dargestellt (näheres hierzu s. Text). Die in der *hNAT2\*4*-cDNA eingeführten Punktmutationen sind rot gekennzeichnet.

Die zueinander komplementären Primer 107/108, 114/115, 117-120 und 137/138 wurden für die punktgerichtete Mutagenese an pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2\*4* verwendet und dienen zur Einführung einzelner Basenpaar-Substitutionen (Abb 6 b). Die Primer 36/37 binden cirka 50 Basenpaare stromaufwärts des Start-Codons spezifisch an eine Sequenz im CMV-Promotorbereich und cirka 30 Basenpaare stromabwärts des Stop-Codons an die BGH-Polyadenylierungssequenz (Abb 6 a. und b.). Sie dienen zum schnellen Screenen von positiven *E. coli* Transformanten. Die Primerpaare 133/134 (Abb. 6 a.) und 88/89 (Abb. 6 b.) wurden sowohl zur Amplifikation der jeweiligen cDNA aus genomischer DNA, als auch zum Nachweis ihrer genomischen Integration eingesetzt. Über RT-PCR wurde mit Hilfe der an die Positionen 13 und 643 des *hNAT2*-Gens bindenden Primer 149 und 150 ein 631 Basenpaare langes Fragment für alle polymorphen Formen von *hNAT2* nachgewiesen. Für *hCYP1A2*

erfolgte der Nachweis eines 461 Basenpaar langen Fragmentes analog mit den Primern 141 und 142, welche an Position 11 und 471 des *hCYPIA2*-Gens binden.

#### **7.4 Plasmidisolierung aus *E. coli***

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde mit den Plasmid Mini- und Midi-Kits (QIAGEN, Hilden) anhand der Herstellerprotokolle durchgeführt.

#### **7.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Doppelsträngige DNA wird von TypII-Restriktionsendonukleasen innerhalb spezifischer palindromer Erkennungssequenzen gespalten. Dazu wurden DNA-Template, 10 – 40 U Restriktionsenzym (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) pro  $\mu\text{g}$  DNA und spezifischer 10fach-Puffer mit Wasser auf das gewünschte Gesamtvolumen von 15 – 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 2 – 6 Stunden bei 37 °C inkubiert.

#### **7.6. DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Trennung doppelsträngiger DNA-Moleküle nach ihrem Molekulargewicht (Sharp *et al.*, 1973) wurden die Proben mit 1/5 Volumen DNA-Auftragpuffer (30 % (m/v) Glycerin, 25 mM EDTA, 0,2 % (m/v) Bromphenolblau, pH 7,5) versetzt und auf ein Agarosegel (1 % (m/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer (25 mM Tris, 25 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA, pH 8,0), 0,1 % Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Flachbett-Agarosegelkammern (Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) mit TBE-Puffer (0,5 x) für 10 – 60 min bei circa 200 V durchgeführt. Als DNA-Größenstandard wurden 5  $\mu\text{l}$  100 bp-Extended-DNA-Leiter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe ) aufgetragen. Die Konzentration des DNA-Standards betrug dabei 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### **7.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Interessierende DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) anhand des Herstellerprotokolls aus dem Agarosegel extrahiert.

## 7.8 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen. Es wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3, 400 U T<sub>4</sub> DNA Ligase (NewEnglandBiolabs, Schwalbach/Taunus) und 2 µl Ligationspuffer (10x) mit sterilem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach 10 bis 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz direkt zur Transformation von cirka 100 µl kompetenter *E. coli* eingesetzt.

## 7.9 Herstellung kompetenter *E. coli*

50 ml LB-Flüssigmedium wurden 1:100 mit Übernachtskulturen von *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD<sup>600 nm</sup> von etwa 0,6 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (10 min; 800 x g; 4 °C), daraufhin in 2 ml TSS-Lösung (10 % (m/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM Magnesiumchlorid in LB-Medium) resuspendiert und in Aliquots bis zum Gebrauch bei - 80 °C aufbewahrt.

## 7.10 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot (cirka 100 µl) kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und das Plasmid bzw. der Ligationansatz zupipettiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis zur Anlagerung der Plasmide an die Zelloberfläche, wurde zur Aufnahme der Vektoren in die Zellen für 50-55 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, daraufhin mit 1,8 ml LB-Flüssigmedium und 36 µl 20 %iger (m/v) steriler Glukoselösung versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, um die Ausbildung der Ampicillin-Resistenz zu erreichen. Die Zellen wurden dann bei 800 x g pelletiert, in cirka 100 µl LB-Medium resuspendiert und zur Identifizierung und Isolierung einzelner transformierter Zellen mittels der als Selektionsmarker auf dem Plasmid enthaltenen β-Lactamase auf Ampicillin-haltigen LB-Kulturplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

## 7.11 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt.

## 7.12 Stabile Transfektion von V79MZ-Zellen

V79-Zellen wurden durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation mit den entsprechenden rekombinanten Expressionsvektoren transfiziert (Graham und Van der Eb, 1973; Parker und Stark, 1979).

Folgende Transfektionen wurden durchgeführt:

### **Konstruktion der Zelllinie V79MZhCYP1A2**

Parentale V79MZ-Zellen wurden mit 3 µg Ssp I-linearisiertem pcDNA3.1Neo(+)hCYP1A2-Konstrukt transfiziert.

### **Konstruktion der Zelllinien V79MZhNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13**

Parentale V79MZ-Zellen wurden mit jeweils 3 µg Ssp I-linearisierten pcDNA3.1Hygro(+)hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13-Konstrukten transfiziert.

### **Konstruktion der Zelllinien V79MZhCYP1A2/hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13**

Analog zu den oben angeführten Transfektionen wurden V79MZhCYP1A2-Zellen mit jeweils 3 µg Ssp I-linearisierten pcDNA3.1Hygro(+)hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13-Konstrukten transfiziert.

Zu den angegebenen linearisierten Konstrukten wurden jeweils 500 µl HEPES-gepufferte Salzlösung (137 mM Natriumchlorid, 6 mM Dextrose, 5 mM Kaliumchlorid, 0,7 mM Natriumhydrogenphosphat, 20 mM HEPES, pH 7,0) pipettiert. Durch Zugabe von 26 µl 2,5 M Kalziumchloridlösung und 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA an Kalziumphosphat kopräzipitiert. Das Präzipitat wurde tropfenweise zu einer Kultur von  $1,5 - 2 \times 10^6$  parental V79MZ-Zellen in einer 145/20 mm-Gewebekulturschale gegeben. Nach sorgfältigem Mischen und 4stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für 2 min mit 15 % (v/v) Glycerin in Kompletmedium inkubiert, um die Effizienz der DNA-

Aufnahme zu steigern. Anschließend wurde das Glycerin durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit je 7 ml Kompletmedium entfernt. Da die Zellen zur stabilen Integration der Fremd-DNA in ihr Genom den Zellzyklus durchlaufen müssen, wurden sie zunächst für etwa 36 h in Kompletmedium ohne G418 oder Hygromycin B kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig trypsiniert, in 1 mg G418/ml-Kompletmedium bzw. 0,4 mg Hygromycin B/ml-Kompletmedium aufgenommen und auf drei 96er-Gewebekulturmikrotiterplatten verteilt. Nur Zellen, die bei der Transfektion mit den Vektoren ein Resistenzgen gegen G418 bzw. Hygromycin B aufgenommen hatten, konnten überleben (Mulligan und Berg, 1981). Nach 8 – 12 Tagen waren resistente Zellklone erkennbar. Einzelne Klone wurden direkt in der Kammer trypsiniert und auf 24-Well-Platten übertragen. Dort wurden diese auf Integrität von Wachstum und Morphologie überprüft und nach einem positiven Resultat zur *In situ*-Immunfluoreszenz oder enzymatischen Aktivitätstests verwendet. Bezüglich Morphologie und/oder Wachstum anormale Klone wurden an dieser Stelle verworfen.

### **7.13 Isolierung genomischer DNA aus V79MZ-Zellen**

Rekombinante V79MZ-Zellen wurden auf 94/16 mm-Gewebekulturschalen bis zu circa 90 %iger Konfluenz kultiviert, das Medium abgenommen und zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem *Rubber Policeman* abgeschabt, in 3 ml PBS aufgenommen und die genomische DNA mit dem QIAamp Blood Midi Kit der Firma QIAGEN (Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert.

### **7.14. Isolierung der Gesamt-RNA aus V79MZ-Zellen**

Es wurden rekombinante V79MZ-Zellen auf 94/16 mm-Gewebekulturschalen bis zu etwa 90 %iger Konfluenz kultiviert, das Medium abgenommen und zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Gesamt-RNA mit 3 ml peqGOLD TriFast<sup>TM</sup>-Lösung (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert.

## 7.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Bedingungen für die Amplifizierung eines DNA-Abschnittes mittels PCR nach Saiki *et al.* (1988) wurden für die jeweiligen Primer und Templates optimiert:

### PCR #1 : Amplifikation von hCYP1A2 und hNAT2\*4 aus genomischer DNA mittels *touch down-PCR*

Wie eingangs bereits erwähnt diente für diese PCR genomische DNA als Template zur Amplifikation der entsprechenden cDNAs :

PCR-Reaktionsansatz	Stammlösung	Finallösung	Volumen (µl)
PCR-Puffer (Clontech, Advantage 2)	10 x	1 x	5,0
dNTP	10 mM	20 µM	1,0
Primer 133/89	50 µM	0,5 µM	1,0
Primer 134/88	50 µM	0,5 µM	1,0
Template	--	0,1 µg/µl	1,0
Clontech-Advantage 2-Polymerase	--	--	1,0
Aqua bidest, steril ad 50 µl	--	--	40,0
<b>Gesamtvolumen</b>			<b>50,0</b>

Temperatur	Zeit	
T = 95°C	1 min	
T = 95°C	45 sec	10 Zyklen (- 1°C/Zyklus)
T = 62°C	1 min	
T = 68°C	2 min	
T = 95°C	45 sec	30 Zyklen
T = 68°C	10 min	
T = 68°C	10 min	

## PCR #2 : Kontroll-PCR für die erfolgreiche Ligation der hCYP1A2- und hNAT2-cDNAs

Zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation der hCYP1A2- und hNAT2-cDNAs in pcDNA3.1(+) Vektoren wurden nach der Transformation in *E. coli* einzelne Klone mit Pipettenspitzen gepickt, in 15 µl sterilem Wasser resuspendiert und folgender PCR unterzogen :

PCR-Reaktionsansatz	Stammlösung	Finallösung	Volumen (µl)
PCR-Puffer (Clontech, Advantage 2)	10 x	1 x	5,0
dNTP	10 mM	20 µM	1,0
Primer 36	50 µM	0,5 µM	1,0
Primer 37	50 µM	0,5 µM	1,0
Template ( <i>E. coli</i> -Suspension)	--	--	2,0
Taq-Polymerase (5 U/µl)	--	--	0,5
Aqua bidest, steril ad 50 µl	--	--	39,5
<b>Gesamtvolumen</b>			<b>50,0</b>

### PCR-Programm :

Temperatur	Zeit	
T = 94°C	3 min	
T = 94°C	30 sec	30 Zyklen
T = 56°C	1 min	
T = 72°C	2 min	
T = 72°C	10 min	

Enthalten die Vektoren pcDNA3.1Hygro/Neo(+) kein Insert, werden 203 bp lange Fragmente amplifiziert. Ist ein Insert in den Vektor ligiert, wird im Falle von hCYP1A2 ein circa 1770 bp langes Fragment und für hNAT2\*4 ein Fragment von ungefähr 1070 bp Länge amplifiziert.

**PCR #3 : *Site-directed Mutagenesis* am pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2\*4*-Konstrukt**

Mittels modifizierter Primer (s. Kap. II.7.3) wurden über *Site-directed Mutagenesis* unter Verwendung von “*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) gezielte Punktmutationen in *hNAT2\*4* eingeführt. Statt der mitgelieferten kompetenten Zellen wurden eigene chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen verwendet.

PCR-Reaktionsansatz	Stammlösung	Finallösung	Volumen ( $\mu$ l)
PCR-Puffer	10 x	1 x	5,0
dNTP	10 mM	20 $\mu$ M	1,0
Primer 107/114/117/119/137	1 $\mu$ M	125 ng	x
Primer 108/115/118/120/138	1 $\mu$ M	125 ng	x
Template (Plasmid-DNA)	--	50 ng	x
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase (2,5U/ $\mu$ l)	--	--	0,5
Aqua bidest, steril ad 50 $\mu$ l	--	--	x
Gesamtvolumen			50,0

**PCR-Programm :**

Temperatur	Zeit	
T = 95°C	30 sec	
T = 95°C	30 sec	} 12 Zyklen
T = 55°C	1 min	
T = 68°C	14 min	

### 7.16 Reverse Transkription und Amplifikation der heterolog exprimierten hCYP1A2 und hNAT2-mRNAs

Es wurde mit dem Access RT-PCR System (Promega Corp., Madison, WI, USA) gearbeitet.

	Stammlösung	Finallösung	Volumen (µl)
AMV/Tfl 5X Puffer	10 x	1 x	10,0
dNTP	10 mM	20 µM	1,0
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1 mM	2,0
Primer 141/149	100 µM	1 µM	1,0
Primer 142/150	100 µM	1 µM	1,0
Gesamt-RNA	--	1 µg/µl	x
AMV Reverse Transkriptase (5 u/µl)			1,0
Tfl DNA Polymerase (5 u/ml)	--	--	1,0
Aqua bidest, steril, DEPC ad 50 µl	--	--	x
<b>Gesamtvolumen</b>			<b>50,0</b>

#### PCR-Programm :

Temperatur	Zeit	
T = 48°C	50 min	
T = 94°C	2 min	
T = 94°C	1 min	} 40 Zyklen
T = 60°C	1 min	
T = 70°C	2 min	
T = 70°C	10 min	

## 8. Proteinanalytische Methoden

### 8.1 *In situ*-Immunfluoreszenz

Die Expression von hCYP1A2 wurde mittels *In situ*-Immunfluoreszenz überprüft. Jeweils 10000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinie wurden am Vortag auf Mikrokavitäten-Objektträger (16-Well-Format) ausgesät und über Nacht kultiviert. In die Mikrokavitäten wurden jeweils 200 µl Medium ohne selektiven Zusatz vorgelegt und die trypsinierte Zellsuspension nachträglich hinzugefügt und intensiv miteinander vermischt. Um die Homogenität der Zelllinien zu verifizieren, mussten Kontrollmischungen angefertigt werden (5000 parentale + 5000 V79MZhCYP1A2-Zellen). Nach der ÜN-Inkubation wurden die Plastikkammern vom Objektträger abgelöst und die auf dem Objektträger adhärierenden Zellen 2 mal 5 min mit kaltem PBS gewaschen, zur Fixierung mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für circa 7 min inkubiert und anschließend schräggestellt an der Luft getrocknet. Die fixierten Zellen wurden daraufhin mit 150 µl primärer Antikörperlösung (polyklonales anti-hCYP1A2 Antiserum aus Kaninchen, 1:1000 verdünnt, Chemikon;) überschichtet, mit Polyethylenfolie abgedeckt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde 3 mal 10 min mit PBS gewaschen, 150 µl sekundäre Antikörperlösung (FITC-gekoppelter anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Ziege, 1,5 mg/ml, 1:125 verdünnt in Kompletmedium, Dianova, Hamburg) aufgetragen, mit Polyethylenfolie abgedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden 250 µl "*Antifading*"-Reagenz (100 mg p-Phenylendiammoniumdichlorid in 10 ml PBS und 80 ml Glycerin) aufgetragen und blasenfrei eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen) mit einem Standardfiltersatz im Anregungsbereich von 450-490 nm. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und die Emission bei 515- 565 nm detektiert. Die exprimierten hCYP1A2-Proteine waren entsprechend grün gefärbt.

### 8.2 Proteingehaltsbestimmung

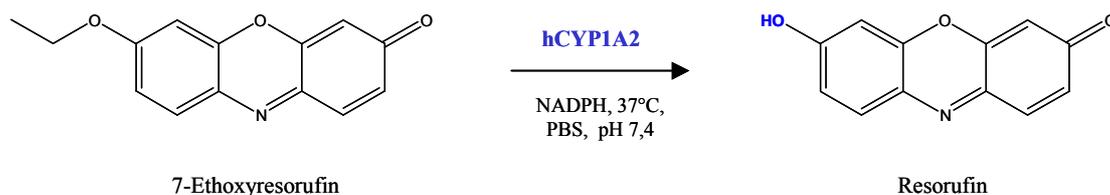
Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte mittels BCA-Test (Smith *et al.*, 1985). Dieser Test basiert darauf, dass Protein mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung einen violett-farbenen

Komplex bildet. Zunächst wurden die zu bestimmenden Proteinproben gegebenenfalls verdünnt, um in den linearen Bereich der BSA-Eichgerade zu gelangen. Anschliessend erfolgte die Zugabe einer wässrigen Reagenzlösung bestehend aus Bicinchonin-Säure und  $\text{Cu(II)SO}_4$  und Inkubation für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Schliesslich wurde die Absorption des  $\text{Cu}^{2+}$ -BCA-Komplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem *96-Wellplate* kompatiblen *Reader* photometrisch bestimmt. Für detailliertere Angaben sei auf das Herstellerprotokoll der Fa. Uptima (Montlucon Cedex, Frankreich) verwiesen.

## 9. Biokatalytische Methoden

### 9.1 Ethoxyresorufin-*O*-deethylierung (EROD)

Zum Nachweis der hCYP1A2-Aktivität wurde ein modifiziertes EROD-Testverfahren (Burke und Mayer, 1974, Schulz-Schalge *et al.* 1991) angewendet. Dieses Verfahren beruht auf der fluorometrischen Bestimmbarkeit von Resorufin, welches infolge der durch hCYP1A2 katalysierten *O*-Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin entsteht (Abb. 7). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Homogenaten oder Mikrosomen zum Reaktionsansatz (Tab. 7) gestartet und nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation mit 84 µl Triton X (10% v/v in 1 N NaOH) gestoppt.



**Abb. 7 : Reaktionsprinzip der hCYP1A2 vermittelten *O*-Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin.**

Daraufhin wurden die präzipitierten Proteine bei 5000 g und 4°C 5 min lang sedimentiert. Der Resorufin-haltige Überstand wurde daraufhin abgenommen, in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt und das Resorufin bei einer Exzitation von 550 nm und einer Emission von 585 nm spektralfluorometrisch mittels Fluorocan Ascent CF vermessen. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Resorufin-Eichkurve. Deren Linearitätsbereich lag zwischen 0,01 und 1 µM. Im Falle von V79MZhCYP1A2-Homogenaten war die Bildung des Resorufins bei einer Gesamtproteinkonzentration von 0,5 mg/ml für 30 min linear. Setzte man 1 mg/ml Gesamtprotein ein, erweiterte sich der lineare Bereich auf 60 min. Für Supersomen hCYP1A2 musste die eingesetzte Proteingesamtkonzentration auf 0,02 mg/ml verringert werden, um sich bei 60-minütiger Inkubationsdauer im linearen Bereich zu befinden.

	c Stammlösung	c finale Lösung	Volumen (µl)
Ethoxyresorufin in MeOH	400 µM	2 µM	3,5
NADPH in H <sub>2</sub> O	100 mM	2 mM	14,0
Dicumarol in PBS pH 7,4	380 µM	9,88 µM	18,2
MgSO <sub>4</sub> in PBS pH 7,4	125 mM	5 mM	28,0
Homogenat in PBS, pH = 7,4	X	0,5/1 mg/ml	636,3
Gesamtvolumen			700,0

Tab. 7 : Reaktionsansatz zur Ethoxyresorufin-*O*-Deethylierung. Die finale Homogenatkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 30-minütiger Inkubation auf 0,5 mg/ml und bei einer Dauer von 60 min auf 1 mg/ml iustiert. Alle Inkubationen wurden bei 37°C und 300 rpm in 1,5 ml Eppendorf-Cups in einem Thermoschüttelinkubator (Eppendorf, Modell Comfort) durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 84 µl Triton X (10 % v/v 1 N NaOH). Unmittelbar darauf wurden die Ansätze bei 4°C und 5000 g 5 min lang zentrifugiert und der Überstand in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt.

## 9.2 *N*-Acetylierung von Sulfamethazin

Sulfamethazin wurde in der Vergangenheit als Markersubstrat zur Bestimmung des Acetyliererstatus verwendet (Evans, 1989). Der Nachweis von *N*-acetyliertem Sulfamethazin erfolgte über HPLC-UV-Detektion bei 254 nm. Die Standardinkubationen wurden nach folgendem Schema durchgeführt (Tab. 8) :

	c Stammlösung	c finale Lösung	Volumen (µl)
Sulfamethazin in DMSO	40 mM	400 µM	1
AcetylCoA in H <sub>2</sub> O	20 mM	4mM	20
Homogenat in PBS, pH = 7,4	X	0,5/1 mg/ml	79
Gesamtvolumen			100

Tab. 8 : Reaktionsansatz zur *N*-Acetylierung von Sulfamethazin. Die finale Homogenatkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 30-minütiger Inkubation auf 0,5 mg/ml und bei einer Dauer von 60 min auf 1 mg/ml iustiert. Alle Inkubationen wurden bei 37°C und 300 rpm in 1,5 ml Eppendorf-Cups in einem Thermoschüttelinkubator (Eppendorf, Modell Comfort) durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Acetonitril. Unmittelbar darauf wurden die Ansätze bei 4°C und 5000 g 5 min lang zentrifugiert und der Überstand in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt.

Die Verwendung von Proteaseinhibitoren wie PMSF und EDTA erwies sich als überflüssig, da nach Durchführung der Inkubationen ohne diese Substanzen keine signifikanten Einbussen auf die Enzymaktivität der *N*-Acetyltransferase zu verzeichnen waren. Zur Auftrennung wurden LC-18-Säulen der Firma Sulpelcosil™ vom Format 5µm x 100 mm x 4 mm (Korngrösse x Länge x Innendurchmesser) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichgerade des *N*-Acetylsulfamethazin-Standards in der Stopp-/Inkubationsmatrix (ACN : PBS = 1:1). Routinemässig wurden jeweils 10 µl der Proben injiziert. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min und es wurde bei 30 °C über 7 min ein Gradient von 10-80% (Laufmittel B, s.u.) gefahren. Die verwendeten Laufmittel setzten sich wie folgt zusammen (Abb. 8):

**Laufmittel A :**

75 % Wasser 18,2 MΩ<sup>cm</sup>, 1500 ml  
25 % Acetonitril, 500 ml  
0,375 % Ortho-Phosphorsäure (85%ig) 8,8 ml

**Laufmittel B :**

40 % Methanol 800 ml  
30 % Acetonitril, 600 ml  
30 % Wasser 18,3 MΩ<sup>cm</sup>, 600 ml  
Perchlorsäure (60%ig) 4,32 ml

**Abb. 8 : Laufmittelzusammensetzung der chromatografischen Auftrennung von Aminofluoren und *N*-Acetylamino fluoren.**

### 9.3 Metabolismus von 2-Aminofluoren

Das weithin als indirektes Modell-Kanzerogen verwendete 2-Aminofluoren wurde zur Messung von hNAT1-, hNAT2- und hCYP1A2-Aktivitäten verwendet.

#### ***N*-Acetylierung (HPLC-UV-Detektion)**

Der Nachweis von *N*-Acetyl-Aminofluoren erfolgte über HPLC-UV-Detektion bei 282 nm. Die Inkubationen und Analytik wurden ansonsten analog zur *N*-Acetylierung von Sulfamethazin durchgeführt.

#### ***N*-Hydroxylierung, *N*-Acetylierung (LC-MS-Detektion)**

Da die Sensitivität bezüglich der HPLC-UV-Detektion des *N*-OH-Aminofluorens zu gering war, wurde dieses über LC-MS bestimmt. Die Inkubationen wurden gemäss Tab. 9 durchgeführt. Falls ausschliesslich die *N*-Hydroxylierung des 2-Aminofluorens bestimmt werden sollte, wurde lediglich das Acetyl-CoA durch 20 µl PBS substituiert.

	c Stammlösung	c finale Lösung	Volumen (µl)
2-Aminofluoren	40 mM	400µM	1
NADPH in H <sub>2</sub> O	100 mM	2 mM	4
Acetyl-CoA	20 mM	4 mM	20
MgSO <sub>4</sub> in PBS pH 7,4	125 mM	5 mM	4
Homogenat in PBS, pH = 7,4	X	0,5/1 mg/ml	71
Gesamtvolumen			100

Tab. 9 : Reaktionsansatz zur *N*-Hydroxylierung und *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren. Die finale Homogenatkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 30-minütiger Inkubation auf 0,5 mg/ml und bei einer Dauer von 60 min auf 1 mg/ml iustiert. Alle Inkubationen wurden bei 37°C und 300 rpm in 1,5 ml Eppendorf-Cups in einem Thermoschüttelinkubator (Eppendorf, Modell Comfort) durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Acetonitril. Unmittelbar darauf wurden die Ansätze bei 4°C und 5000 g 5 min lang zentrifugiert und der Überstand in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt.

Die chromatografische Auftrennung wurde, wie bereits für die *N*-Acetylierung von Sulfamethazin beschrieben, allerdings unter Zugabe eines das *N*-OH-Aminofluoren stabilisierenden Antioxidans (Desferrioxamin-Mesylat, final : 0,02 % m/v) durchgeführt. Anders als für Sulfamethazin beschrieben, erfolgte die Auftrennung unter isokratischen Bedingungen (Laufmittel A und B : 1:1) bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und 30 °C. Über die für die Massendetektion mit Massenspektrometer Micro Quattro (Micromass, Eschborn) relevanten Verfahrenskenndaten gibt Abb. 9 Auskunft.

Funktionsmodus : MRM (*Multiple reaction monitoring*)  
 Kollisions-Gas: Argon  
 Ionisations-Modus: ESI+ (*Elektorspray ionisation -> positively charged*)  
 Kapillarspannung (kV): 3,3  
 Retentions-Fenster (min): Start 0 Ende 7.0

Analyt	Muttermolekül	Tochtermolekül	Messzeit (sec.)	Spannung (V)	Kollisionsenergie (eV)
2-Aminofluoren	182,1	164,0	0,2	32	22
<i>N</i> -OH-Aminofluoren	198,0	152,9	0,2	33	24
<i>N</i> -Acetyl-Aminofluoren	224,0	182,1	0,2	34	22

Abb. 9 : Messparameter zur MS-Analyse von 2-Aminofluoren-Metaboliten.

## 10. Toxikologische Methoden

### 10.1 MTT-Test zur Erfassung cytotoxischer Effekte

Der MTT-Test wurde zur Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in lebenden V79-Zellen angewendet. Das Testprinzip beruht darauf, dass das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) in Zellen eindringt, der Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen wird und schliesslich das alkohollösliche dunkelblaue Formazan entsteht, welches spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm nachgewiesen werden kann.

Zur Messung der Cytotoxizität von 2-Aminofluoren wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 30.000 V79-Zellen pro einzelne Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in 100 µl DMEM-Komplettmedium ausgesät und 24 h bebrütet. Nach dem Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen in vier Parallelansätzen mit 9 verschiedenen Konzentrationen des 2-Aminofluoren in 100 µl DMEM (1, 10, 100 nM; 1, 3, 5, 10, 20, 100 µM) 24 h inkubiert. Die finale DMSO-Konzentration betrug in sämtlichen Inkubationsansätzen 1 %. Als Positivkontrolle diente NaF, welches in einer finalen Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt wurde. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 1 % DMSO inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der verschiedenen Inkubationsansätze auf mögliche Präzipitatbildungen bei 200-facher Vergrösserung. Anschliessend wurde das Inkubationsmedium unter wiederholtem Abschlagen aus den 96-Loch-Mikrotiterplatten möglichst weitgehend entfernt, mit PBS gewaschen und 100 µl MTT-Lösung in jede Einzelkavität pipettiert. Nach circa 3-stündiger Inkubationsdauer bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> wurde die überständige MTT-Lösung wie eben beschrieben abgeschlagen, pro Kavität 100 µl Extraktions-Puffer (10 % SDS, w/v, 74,5 % H<sub>2</sub>O v/v, 25 % N,N-Dimethylformamid, v/v und 0,5 % Eisessig, v/v) auf die Zellen gegeben. Die durch SDS eingeleitete Lyse der Zellen führte zur Freisetzung des durch metabolische Umsetzung gebildete Formazan. Schliesslich erfolgte wie oben bereits erwähnt, die spektralphotometrische Vermessung der Formazanlösung bei 570 nm mittels Multiscan Ascent.

Für die pro 2-Aminofluoren-Konzentration erhaltenen OD<sub>570</sub>-Werten, wurden deren Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler bestimmt. Eine Normierung aller OD<sub>570</sub>-Werte erfolgte über die Ermittlung des prozentualen Anteils der Mittelwerte der 2-Aminofluoren-Inkubationen, im Verhältnis zu denjenigen der mitgeführten Negativkontrollen.

## 10.2 HPRT-Test zur Erfassung genotoxischer Effekte

Der HPRT-Locus repräsentiert eine Genregion, die einer besonders erhöhten Mutationsfrequenz unterliegt. Aus diesem Grund wird der HPRT-(Hypoxanthinphosphoribosyltransferase)-Test zur Feststellung chemisch induzierter Genmutationen angewendet und ist zum Nachweis von Basenpaarmutationen, Frameshiftmutationen und kleineren Deletionen geeignet. Für jede Konzentration des 2-Aminofluoren (0,5, 2, 8  $\mu\text{M}$ ) wurden zwei Gewebekulturschalen mit 600.000 Zellen in DMEM angesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde DMBA (5 $\mu\text{g/ml}$ ) mit 1,2 ml S9-Mix, 10,4 ml PBS-HEPES und 0,4 ml Kofaktorlösung in parentalen V79-Zellen inkubiert. Mit 1% DMSO in Kompletmedium inkubierte V79-Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Bei der Festlegung des Konzentrationsbereiches des zu testenden 2-Aminofluoren war zu beachten, dass bis zu der höchsten Konzentration keine signifikanten Cytotoxizitäten auftreten sollten. Folglich wurden auf der Basis des zuvor durchgeführten MTT-Tests 8  $\mu\text{M}$  2-Aminofluoren als höchste Konzentration festgesetzt, da alle hier getesteten V79-Zellen noch mindestens 80 % Vitalität aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Nach 24 h Inkubation wurde das 2-Aminofluoren in den oben angeführten Konzentrationen auf die Platten gegeben und nach 3 h zusammen mit dem Kompletmedium abgesaugt. Daraufhin wurden die Platten mit PBS gespült und 48 h bebrütet. Danach erfolgte eine Zellzahlbestimmung, woraufhin pro Ansatz  $1,25 \times 10^6$  Zellen weiterkultiviert wurden. Zur Selektion der Mutanten wurden die Zellen nach 72 h nochmals ausgezählt, pro Ansatz drei Platten mit 400.000 Zellen beimpft und in Thioguanin-haltigem Medium weiter kultiviert. Parallel wurden pro Ansatz weitere drei 90 mm Gewebekulturschalen zur Kontrolle der *Plating Efficiency* mit 250 Zellen in 12 ml Kompletmedium beschickt. Sobald die Zellkolonien auf den *Plating Efficiency*- bzw. Selektionsplatten eine Grösse von ca. 0,2- 2 mm im Durchmesser erreicht hatten, wurden diese fixiert, gefärbt und ausgezählt. Die Fixierung der Zellkolonien erfolgte nachdem das Medium entfernt wurde, über Spülung der Gewebekulturschalen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung und darauf folgender 10minütiger Inkubation mit Methanol. Anschliessend wurden die so behandelten Zellen mit Giemsa-Lösung gefärbt, mit Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Die Auszählung der Zellkolonien erfolgte entweder per Hand oder mittels eines automatischen Kolonienzählgerätes. Bei weniger als 25 Kolonien wurde per Hand ausgezählt. Bei mehr als 25 Kolonien und einem optisch einwandfreien Zustand der Platten erfolgte die Auszählung mit Hilfe des automatischen Kolonienzählgerätes. Zur Bestimmung der Mutantenhäufigkeit pro  $10^6$  Zellen wurden zunächst die Mittelwerte aus den

Kolonienzahlen der Selektionsplatten berechnet und die so ermittelte Anzahl an Mutanten mit dem entsprechendem Korrekturfaktor aus den *Plating Efficiency*-Platten multipliziert. Anschliessend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den beiden voneinander unabhängigen Ansätzen für die jeweilige Konzentration des eingesetzten 2-Aminofluorens ermittelt.

### **PBS-HEPES :**

Lösung I:

9,52 g HEPES  
auf 1000 ml PBS lösen

Lösung II:

0,265 g  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$   
+ 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
auf 1000 ml PBS

**PBS-HEPES besteht aus je 1 Volumenanteil Lösung I. und 1 Volumenanteil Lösung II. die erst kurz vor Gebrauch gemischt werden, da es sonst zu Ausfällungen kommen kann**

### **Kofaktorlösung :**

67,0 mg Glucose-6-Phosphat- $\text{Na}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
22,9 mg  $\text{NADP-Na}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
23,6 mg  $\text{NADH-Na}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$   
10,1 mg  $\text{NADPH-Na}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

**Kofaktorlösung in 1 ml gekühltem PBS-HEPES-Puffer lösen und auf pH 7,4 (mit 0,1 M NaOH, bzw. 0,1 M HCl) einstellen, anschliessend sterilfiltrieren. Erst kurz vor Gebrauch herstellen und auf Eis lagern.**

### **Thioguanin-Lösung :**

250 mg 6-Thioguanin

**250 mg 6-Thioguanin werden in 50 ml aqua dest., welches mit 1 ml 0,5 M NaOH-Lösung versetzt wurde, gelöst und sterilfiltriert.**

### **Thioguanin-haltiges Medium :**

700  $\mu\text{l}$  Thioguanin-Lösung

**Auf 500 ml Komplett-Medium werden 700  $\mu\text{l}$  sterile Thioguanin-Lösung (s.o.) gegeben.**

**Abb. 10 : Herstellung von Lösungen für den HPRT-Test.**

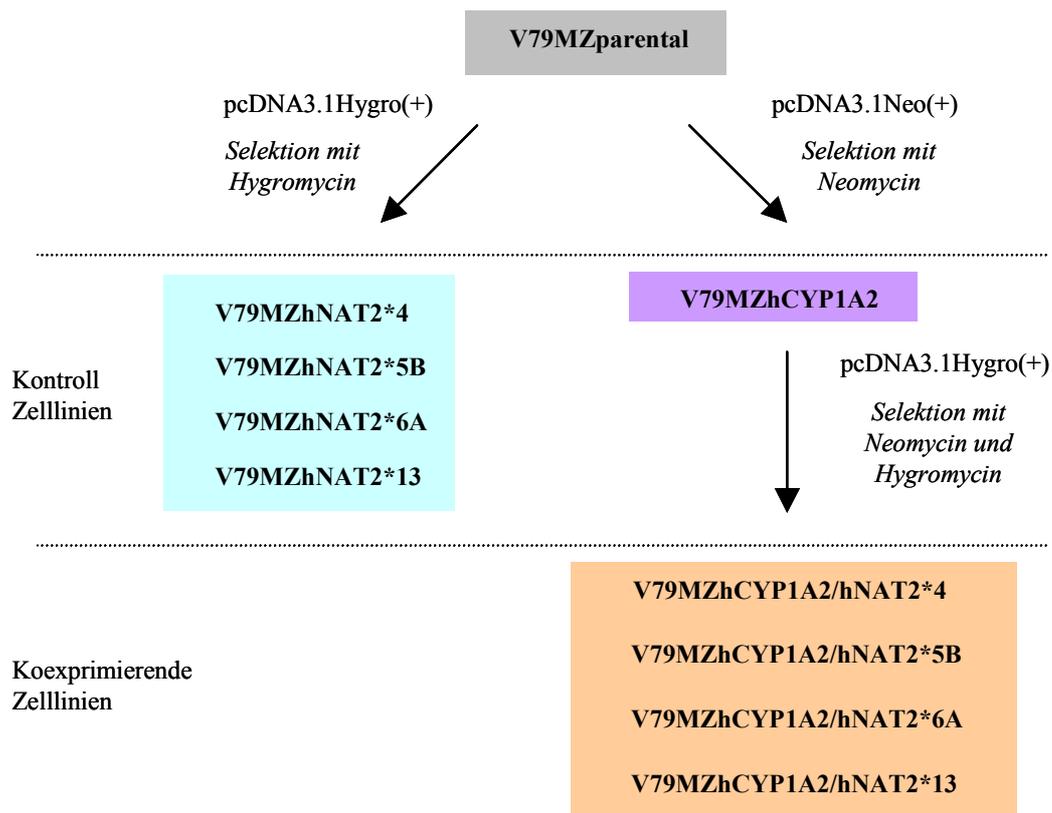
## III. Ergebnisse

### 1. Konstruktion der Zelllinien und Auswahl repräsentativer Klone

Zur stabilen Transfektion von V79 Chinesischen Hamsterzellen wurde in der Vergangenheit häufig der Expressionsvektor pSV450 eingesetzt. Da dieser Vektor allerdings kein Resistenzgen enthält, musste bei der Konstruktion von neuen Zelllinien stets mit einem Resistenzvektor kotransfiziert werden, um eine anschließende Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum zu ermöglichen. Mit dem Ziel eine derartige Kotransfektion zu vermeiden, welche die damit verbundenen Nachteile eines erhöhten Risikos für Mutationen und einer verringerten Transfektionseffizienz implizieren würde, fiel die Entscheidung auf ein Vektorsystem, welches folgenden Anforderungen genügen sollte :

1. Integrierte Expression von Resistenzgen und *Gene of Interest* auf einem Vektor
2. Sequenzielle Selektion mit Hilfe zweier unterschiedlicher Antibiotika

Demzufolge wurde zur Konstruktion der hCYP1A2 und hNAT2 exprimierenden V79-Zelllinien ein Vektorsystem von Invitrogen (pcDNA 3.1(+)) gewählt. Dieses System, bestehend aus 2 Shuttle-Expressionsvektoren, ermöglicht eine integrierte Expression von Resistenzgen und *Gene of Interest* und unterscheidet sich lediglich hinsichtlich der Resistenzmarker Neomycin (pcDNA 3.1 Neo (+)) und Hygromycin (pcDNA 3.1 Hygro (+)), wodurch eine Selektion auf koexprimierende Zellen ermöglicht wird. Abb. 11 gibt einen schematischen Überblick über die Transfektionsstrategie und fasst die neu konstruierten Zelllinien zusammen :



**Abb. 11 : Schematische Darstellung der Transfektionsstrategie und Übersicht der konstruierten Zelllinien**

### 1.1 Kontroll Zelllinien : V79MZhCYP1A2 und hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13

Um bewerten zu können, ob die zu beobachtenden biologischen Effekte auf die Koexpression von hNAT2 und hCYP1A2 zurückzuführen sind, mussten zunächst Kontroll Zelllinien für die jeweiligen Enzyme konstruiert werden (Abb. 11).

#### pcDNA3.1Neo(+)hCYP1A2-Konstrukt

Da die cDNA des 1570 bp langen hCYP1A2-Gens nicht als Vektor-Konstrukt vorlag, musste diese in einem ersten Schritt über PCR an genomischer DNA aus hCYP1A2 überexprimierenden V79MZ-Zellen generiert werden. Zunächst war es allerdings nicht möglich, das aus der PCR erhaltene hCYP1A2-Amplifikat in pcDNA3.1Neo(+) zu klonieren. Deswegen war ein Zwischen-Klonierungsschritt erforderlich. Diesbezüglich wurde als

Methode die sogenannte TOPO TA-Klonierung von Invitrogen gewählt. Anstatt der sonst üblichen Ligase-Reaktion wurde ein mit Topoisomerase I aktivierter T-Vektor verwendet, in welchen die mit Taq-Polymerase amplifizierte und A-Überhang versehene hCYP1A2-cDNA zwischenkloniert werden konnte (Abb. 12 a und b).

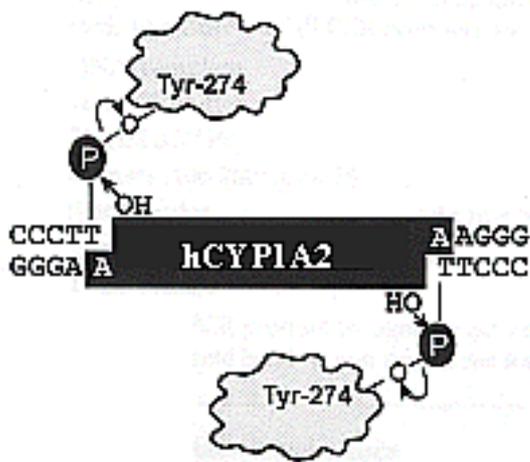


Abb. 12 a : Prinzip der TOPO TA-Klonierung am Beispiel des hCYP1A2. In einem ersten Schritt bindet Topoisomerase I spezifisch an doppelsträngige Vektor-DNA. Daraufhin wird die Phosphodiesterbindung nach einer 5'-CCCTT-Sequenz gespalten und die freiwerdende Energie in Form einer kovalenten Bindung zwischen der 3'-Phosphat-Gruppe der DNA und dem Tyrosylrest der Topoisomerase konserviert. Nach vorangegangener Produktion eines einzelnen Desoxyadenosin-Überhangs an dem 3'-Ende des PCR-Produktes durch die Taq-Polymerase, erfolgt eine gegenseitige Anlagerung von A und T-Überhängen. Schließlich greift die 5'-OH-Gruppe des Amplifikats nukleophil an das Phosphoratom an und setzt dadurch Topoisomerase I wieder frei. Verändert nach (Shuman, 1994).

Stop

TGAGCA

Abb. 12 b : Detailansicht der Insertionsumgebung der hCYP1A2-cDNA in pCR2.1-TOPO. Angegeben sind prominente Restriktionsregionen, die zur optimalen Translation erforderliche Kozak-Sequenz, sowie die Positionen der T- und A-Überhänge von Vektor und Insert (blau). Das Startcodon ist grün, das Stopcodon rot markiert. Die Strukturen der Lac- und T7-Promotoren sind lediglich schematisch dargestellt und kennzeichnen Lage und Orientierung des Inserts.

Um zudem eine optimale Translation der heterologen mRNA zu gewährleisten, wurde im Rahmen der oben erwähnten PCR mittels speziell konstruierter Primer unmittelbar vor dem Startcodon die sogenannte Kozak-Sequenz (Kozak, 1987; Kozak, 1990) in die hCYP1A2-cDNA eingefügt (Abb. 12 b).

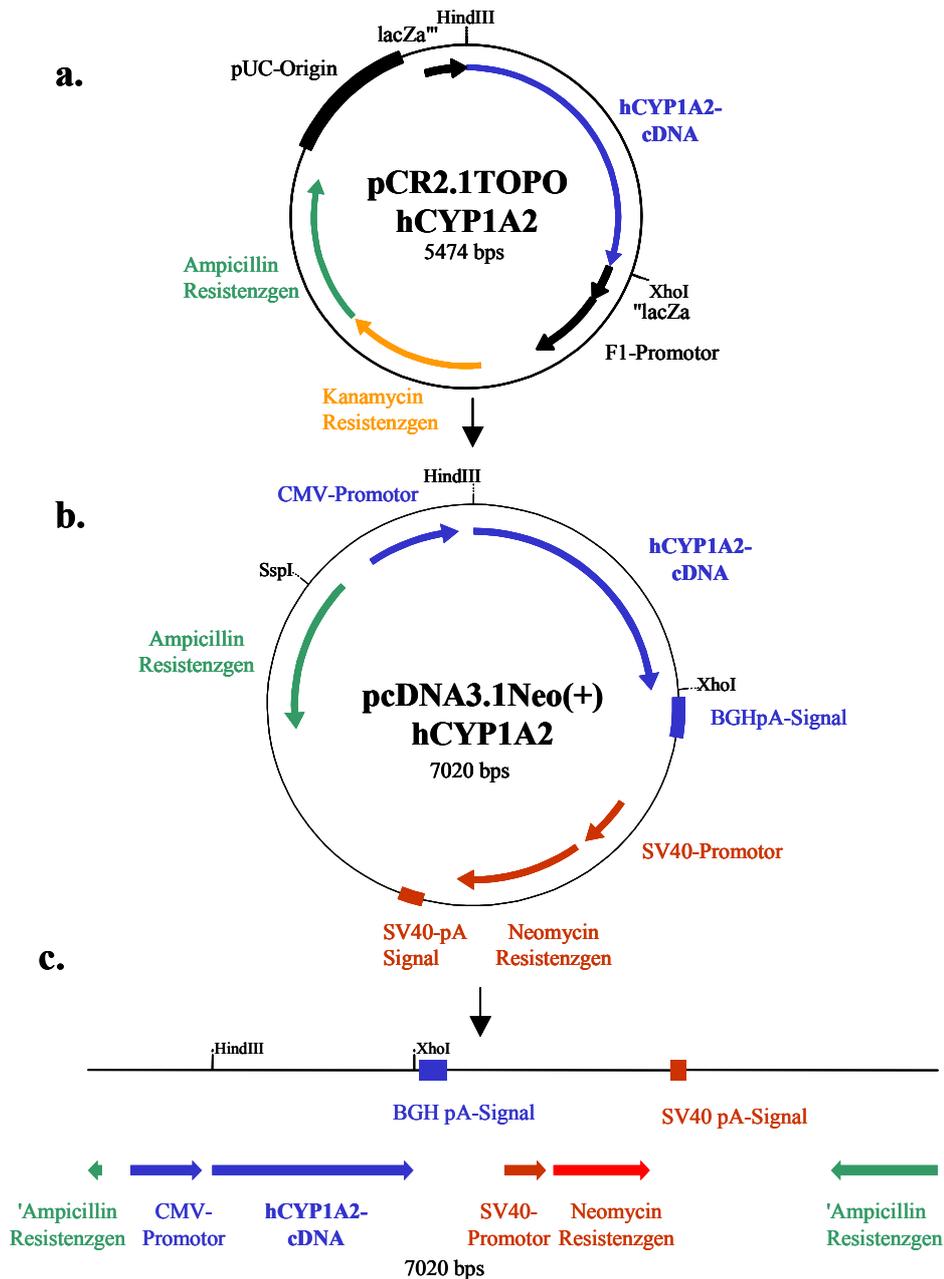


Abbildung 13 : Konstruktion von pCDNA3.1Neo(+)hCYP1A2.

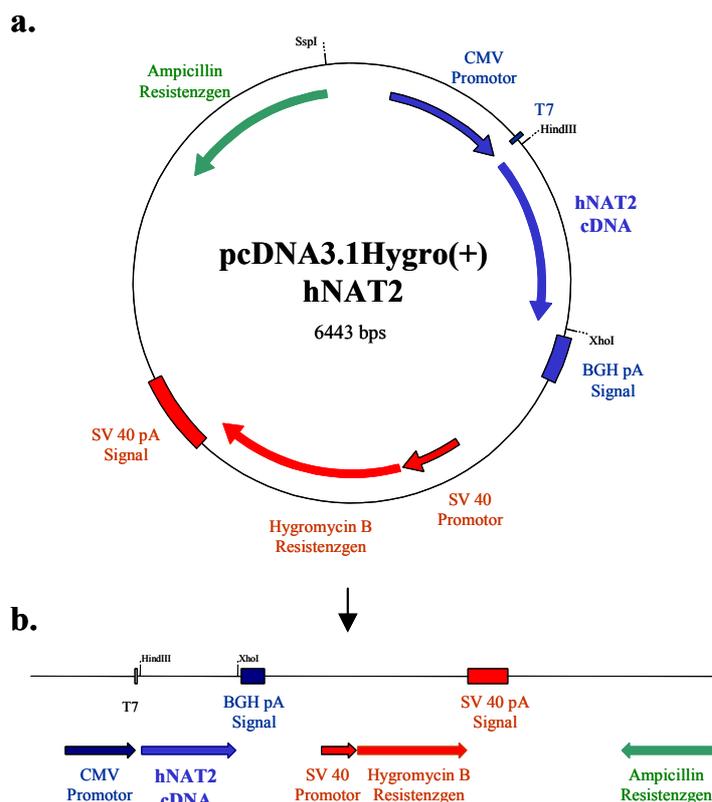
a. Zwischenklonierung der hCYP1A2-cDNA in den durch Topoisomerase aktivierten Vektor pCR2.1TOPO b. Umklonierung der hCYP1A2-cDNA in einen mit Hind III und Xho I geschnittenen pcDNA3.1Neo(+)-Vektor c. Linearisierung des pcDNA3.1Neo(+)hCYP1A2-Konstruktes mittels Ssp I-Restriktionsverdau

Im Anschluss an die TOPO-TA-Klonierung erfolgte die Umklonierung der hCYP1A2-cDNA in pcDNA3.1Neo(+). Dazu wurden sowohl das pCR2.1TOPOhCYP1A2-Konstrukt als auch pcDNA3.1Neo(+) mit Hind III und Xho I geschnitten und das freigesetzte Insert in den Zielvektor ligiert (Abb 13 a + b). Zur Transfektion wurde das pcDNA3.1(+hCYP1A2-Konstrukt schließlich mit Ssp I im Ampicillin Resistenzgen linearisiert (Abb. 13 c).

### pcDNA3.1Hygro(+hNAT2-Konstrukte :

### pcDNA3.1Hygro(+hNAT2\*4-Konstrukt

Die mit überhängenden Erkennungssequenzen für Hind III und Xho I versehene cDNA von hNAT2\*4 wurde mittels PCR an humaner genomischer DNA gewonnen. Der Donor derselben war homozygot für hNAT2\*4.



**Abb. 14 : Konstruktion von pcDNA3.1Hygro(+hNAT2\*4**

**a. Ligation von hNAT2\*4 in einen mit HindIII und XhoI geschnittenen pcDNA3.1Hygro(+)-Vektor**

**b. Ssp I-Linearisierung von pcDNA3.1Hygro(+hNAT2\*4**

Das hieraus erhaltene Amplifikat wurde direkt in den mit Hind III und Xho I geschnittenen pcDNA3.1Hygro(+)-Vektor ligiert (Abb. 14 a) und zur Transfektion von V79-Zellen mit Ssp I linearisiert (Abb. 14 b).

### pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2*\*5B, \*6A, \*13-Konstrukte

Die übrigen pcDNA3.1Hygro(+)-Konstrukte *hNAT2*\*5B, \*6A, und \*13 wurden über Site-Directed Mutagenesis an dem pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2*\*4-Konstrukt gewonnen (Abb. 15). Dazu wurden über modifizierte Primer die entsprechenden Punktmutationen während der PCR eingeführt und das mutierte Konstrukt zur Ligation und weiteren Amplifikation in *E. coli* transformiert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden ebenfalls mittels Ssp I linearisiert und zur Transfektion von V79-Zellen verwendet.

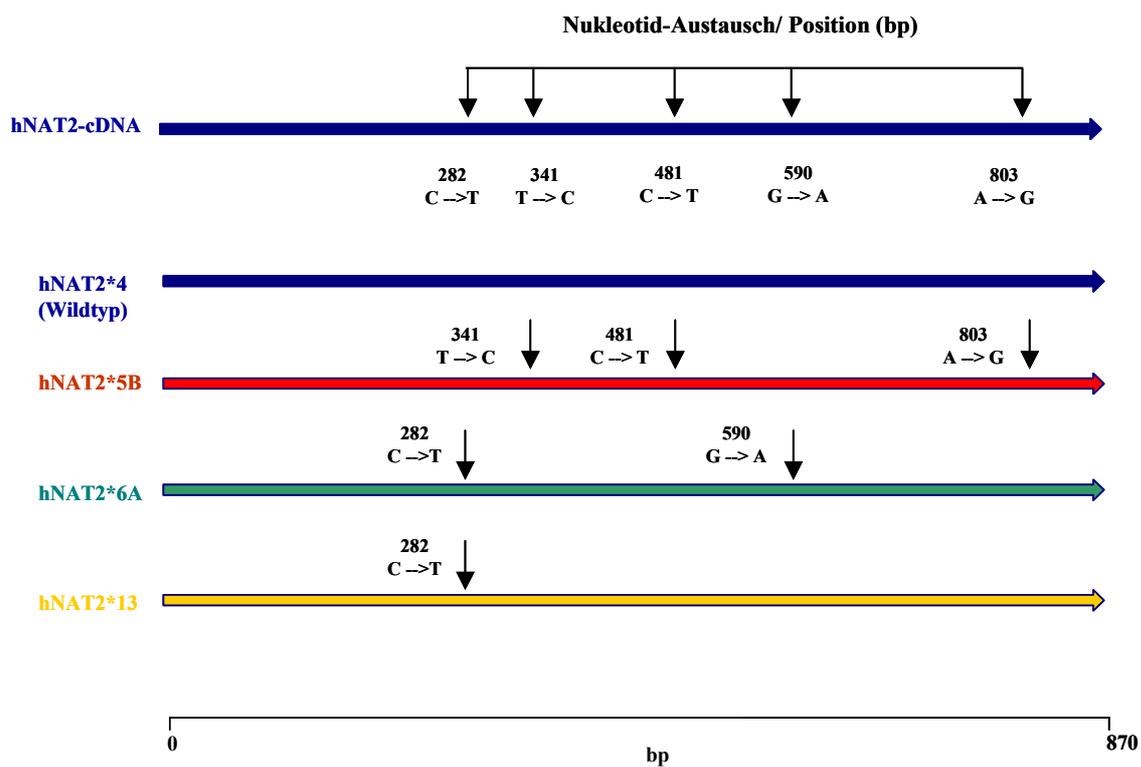


Abb. 15 : Site-Directed Mutagenesis an pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2*\*4-Konstrukt

Dargestellt sind die ausgehend von der 870 bp langen *hNAT2*\*4-cDNA eingefügten allelspezifischen Mutationen, die bei den verschiedenen Allelen auftretenden Nucleotidaustausche, sowie deren relative Lage auf der *hNAT2*-cDNA

## 1.2 Koexprimierende Zelllinien : V79MZhCYP1A2/hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13

Zur Herstellung der koexprimierenden Zelllinien konnte auf die bereits für die Kontroll-Zelllinien angefertigten Konstrukte zurückgegriffen werden.

## 2. Transfektion und Auswahl positiver Klone

Die rekombinanten Zelllinien wurden gemäß den Transfektionsansätzen T1-T9 (Tab. 10) generiert. Gegenüber den früher mit pSV450-Vektoren durchgeführten Transfektionen konnte unter Verwendung der pcDNA3.1(+)-Vektoren die Menge an eingesetzter DNA um Faktor 10 von 30 auf 3 µg je Ansatz reduziert werden. Dies hat den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit der transfektionsbedingter chromosomaler Schädigungen minimiert wird. Bei den so durchgeführten Transfektionen lag die Klonausbeute zwischen 40 bis 50 Klonen. Dabei waren bei circa 2 % der transgenen Klone mikroskopisch wahrnehmbare Veränderungen der Morphologie und/oder Wachstumsanomalien festzustellen. Diese Klone wurden von allen weiteren Charakterisierungen ausgeschlossen und verworfen.

Die Klonalität und Stabilität der restlichen Klone wurde durch Subklonieren und Passagieren der neuen Zelllinien, sowie durch *In situ*-Immunfluoreszenz und wiederholte Bestimmung der enzymatischen Aktivität sichergestellt.

### Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1Neo(+)-hCYP1A2

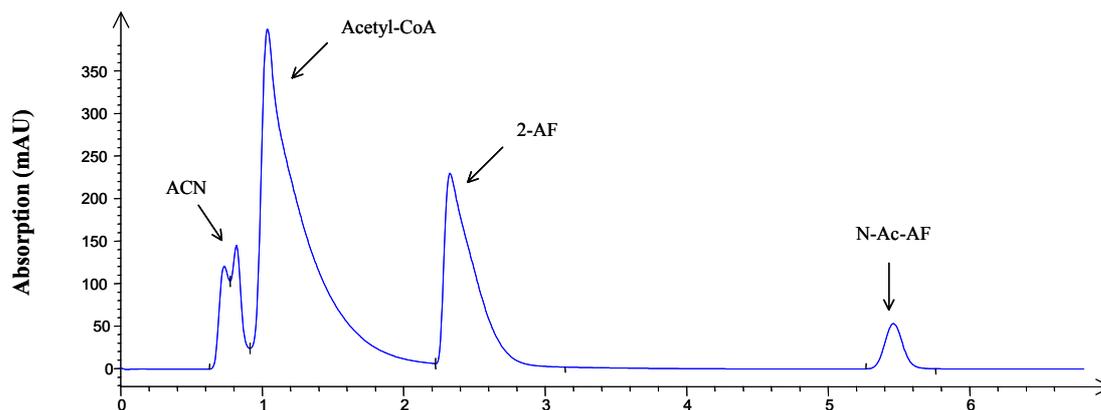
Um zunächst die Kontrollzelllinie V79MZhCYP1A2 zu generieren, wurden parentale V79MZ-Zellen mit dem pcDNA 3.1Neo(+)-hCYP1A2-Konstrukt transfiziert, mit 1 mg/ml Geneticin 418 selektiert, lichtmikroskopisch auf morphologische Integrität hin überprüft, sowie mittels *In situ*-Immunfluoreszenz ihre Klonalität verifiziert. Daraufhin wurden fluorometrisch Enzymaktivitäten gemessen und das mittlere Expressionsniveau bestimmt. Auf der Basis dessen wurden Klone ausgewählt deren Aktivitäten am nächsten an bei diesem Mittelwert lagen. Nach Subklonierung und wiederholter Enzymaktivitätsmessung fiel die Entscheidung auf Klon 14 der V79MZhCYP1A2-Klone, welcher für die weiteren Transfektionen mit den polymorphen Formen von hNAT2 verwendet werden konnte (T6-T9; Tab. 10).

Ansatz	Zelllinie	Heterologe Expression	Resistenz	Expressions-Vektoren
T1	V79MZhNAT2*4	hNAT2*4	Hyg B	pcDNA3.1Hygro(+)
T2	V79MZhNAT2*5B	hNAT2*5B	Hyg B	pcDNA3.1Hygro(+)
T3	V79MZhNAT2*6A	hNAT2*6A	Hyg B	pcDNA3.1Hygro(+)
T4	V79MZhNAT2*13	hNAT2*13	Hyg B	pcDNA3.1Hygro(+)
T5	V79MZhCYP1A2	hCYP1A2	G418	pcDNA3.1 Neo (+)
T6	V79MZhCYP1A2hNAT2*4	hCYP1A2hNAT2*4	G418 & Hyg B	pcDNA3.1 Neo (+) pcDNA3.1Hygro (+)
T7	V79MZhCYP1A2hNAT2*5B	hCYP1A2hNAT2*5B	G418 & Hyg B	pcDNA3.1 Neo (+) pcDNA3.1Hygro (+)
T8	V79MZhCYP1A2hNAT2*6A	h hCYP1A2NAT2*6A	G418 & Hyg B	pcDNA3.1 Neo (+) pcDNA3.1Hygro (+)
T9	V79MZhCYP1A2hNAT2*13	hCYP1A2hNAT2*13	G418 & Hyg B	pcDNA3.1 Neo (+) pcDNA3.1Hygro (+)

**Tab. 10 : Übersicht über die Transfektionsansätze T1-T9. Zur Transfektion wurden jeweils 3 µg des linearisierten Konstruktes eingesetzt. Die Selektion wurde für die hNAT2-Zelllinien mit Hygromycin (0,4 mg/ml) und im Falle der hCYP1A2-Zelllinie mit Neomycin (1 mg/ml) durchgeführt. Die koexprimierenden Zelllinien wurden simultan mit beiden Resistenz-Antibiotika selektioniert.**

### Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1Hygro(+)*hNAT2*

Zur Herstellung der *hNAT2* exprimierenden Zelllinien musste auf eine vorhergehende Klonalitätsüberprüfung mittels *In situ*-Immunfluoreszenz verzichtet werden, da hierfür kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand. Deswegen wurden alle nach der Transfektion mit pcDNA 3.1Hygro(+)*hNAT2*-Konstrukten erhaltenen Klone nach vorausgegangener Selektion mit 0,4 mg/ml Hygromycin und lichtmikroskopischer Verifikation ihrer morphologischen Integrität, einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC/UV-Screening auf Enzymaktivität unterzogen und das mittlere Aktivitätsniveau der transgenen *hNAT2*-Klone bestimmt. Abb. 16 zeigt ein typisches Chromatogramm eines Inkubationsansatzes am Beispiel von V79MZh*NAT2*\*4 bei der Umsetzung von 2-Aminofluoren zu *N*-Acetylaminofluoren.



Zur Berechnung der *hNAT2*-Aktivität wurde jeweils die integrierte Fläche der relativen Absorptionseinheiten des *N*-Acetylaminofluorens-Peaks mit den entsprechenden Werten aus der *N*-Acetylaminofluorens-Eichgerade korreliert und so die Menge an gebildetem *N*-Acetylaminofluoren bestimmt. Um die verschiedenen Allele der *hNAT2* untereinander vergleichen zu können, war es vorab erforderlich, bezüglich der Klonauswahl Akzeptanzkriterien festzulegen. Somit wurden für die anschließende Subklonierung nur diejenigen Klone akzeptiert, deren Aktivitäten innerhalb einer Schwankungsbreite von  $\pm 10\%$  lagen (Abb. 17).

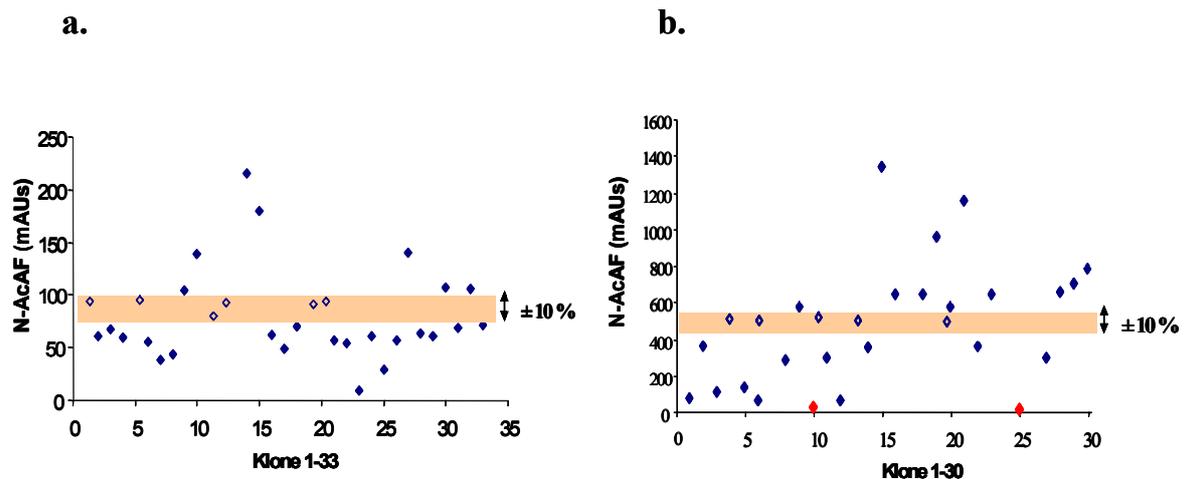


Abb. 17 : HPLC-UV-Screening auf hNAT2-Aktivität anhand der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren und Auswahl repräsentativer Klone. Dargestellt ist die Verteilung von hNAT2-Aktivitäten am Beispiel von V79MZhNAT2\*5B (a.) und V79MZhNAT2\*13-Klonen (b.) über einen bestimmten UV-Absorptionsbereich. Durch Festlegung eines standardisierten Auswahlverfahrens wurden im Falle von V79MZhNAT2\*5B 6 repräsentative Klone und für V79MZhNAT2\*13 5 Klone erhalten (offene blaue Rauten), welche Aktivitäten innerhalb einer Schwankungsbreite von  $\pm 10\%$  um das mittlere Aktivitätsniveau aufwiesen. Die geschlossenen roten Rauten kennzeichnen Klone welche von der Mittelwertbildung ausgeschlossen wurden, da ihre Aktivitäten unter der zuvor festgelegten Ausschlussgrenze lagen. Gezeigt sind die Werte aus Einzelmessungen.

Nach der Subklonierung und wiederholter Enzymaktivitätsbestimmung wurde jeweils ein homogener Klon der entsprechenden Kontroll-Zelllinie V79MZhNAT2 ausgewählt. Die Festlegung auf jeweils einen homogenen Klon der koexprimierenden Zelllinien V79MZhCYP1A2/hNAT2 orientierte sich an dem Aktivitätswert der korrespondierenden Kontroll-Zelllinie. Schließlich wurde für den betreffenden Klon die Enzymaktivität von hCYP1A2 erneut bestimmt, um eine mögliche Inaktivierung dieses Enzyms infolge der nachgeschalteten hNAT2-Transfektion auszuschließen.

### 3. Charakterisierung der neuen Zelllinien

#### 3.1 Nachweis der genomisch integrierten cDNAs

Zum Nachweis der genomischen Integration der transfizierten cDNAs wurde zunächst aus den rekombinanten Zelllinien und Kontroll-Zelllinien genomische DNA isoliert. Daraufhin erfolgte gemäss PCR 1 im Falle von hNAT2 der spezifische Nachweis über die Amplifikation eines 907 bp langen Fragments (Abb. 18 a). Die genomische Integration von hCYP1A2 wurde über ein 1570 bp langes Fragment nachgewiesen (Abb. 18 b).

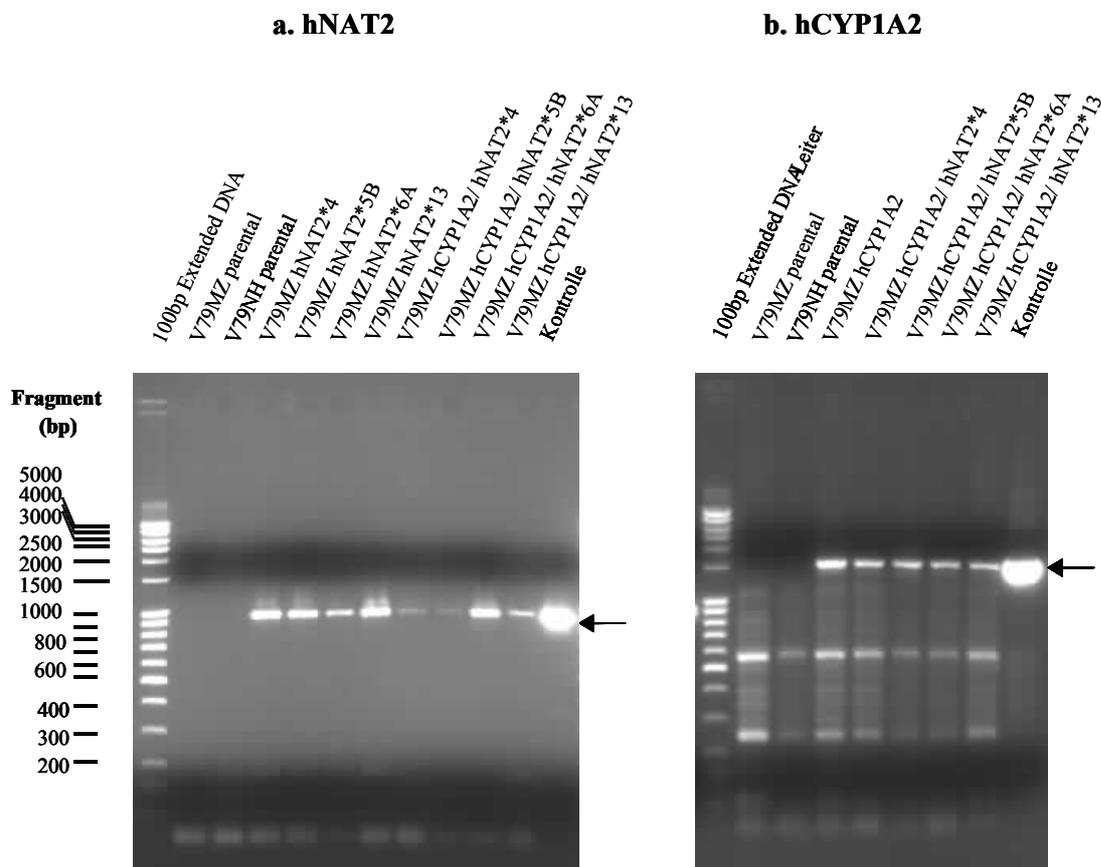


Abb. 18 : PCR-Nachweis der Integration der polymorphen hNAT2 und hCYP1A2-cDNAs in das V79MZ-Genom. a. Amplifikation eines 907 bp langen Fragmentes (hNAT2) mittels Primern 01 und 02. Zur Kontrolle der Identität der Amplifikate wurde das Vektorkonstrukt pcDNA3.1Hygro(+)/hNAT2\*4 eingesetzt b. Amplifikation eines 1570 bp langen Fragmentes (hCYP1A2) mittels Primern 03 und 04. Zur Kontrolle der Identität der Amplifikate wurde das Vektorkonstrukt pcDNA3.1Neo(+)/hCYP1A2 in den PCR-Ansatz miteinbezogen.

### 3.2 Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene : RT-PCR

Die Expression der stabil ins V79-Zellgenom integrierten cDNAs wurde mittels RT-PCR verifiziert. Der gelelektrophoretische Nachweis der hCYP1A2-mRNA erfolgte über ein 461 bp langes Fragment (Abb. 19 a), während die mRNA der polymorphen hNAT2-Formen über ein Fragment von 631 bp Länge nachgewiesen wurden (Abb. 19 b).

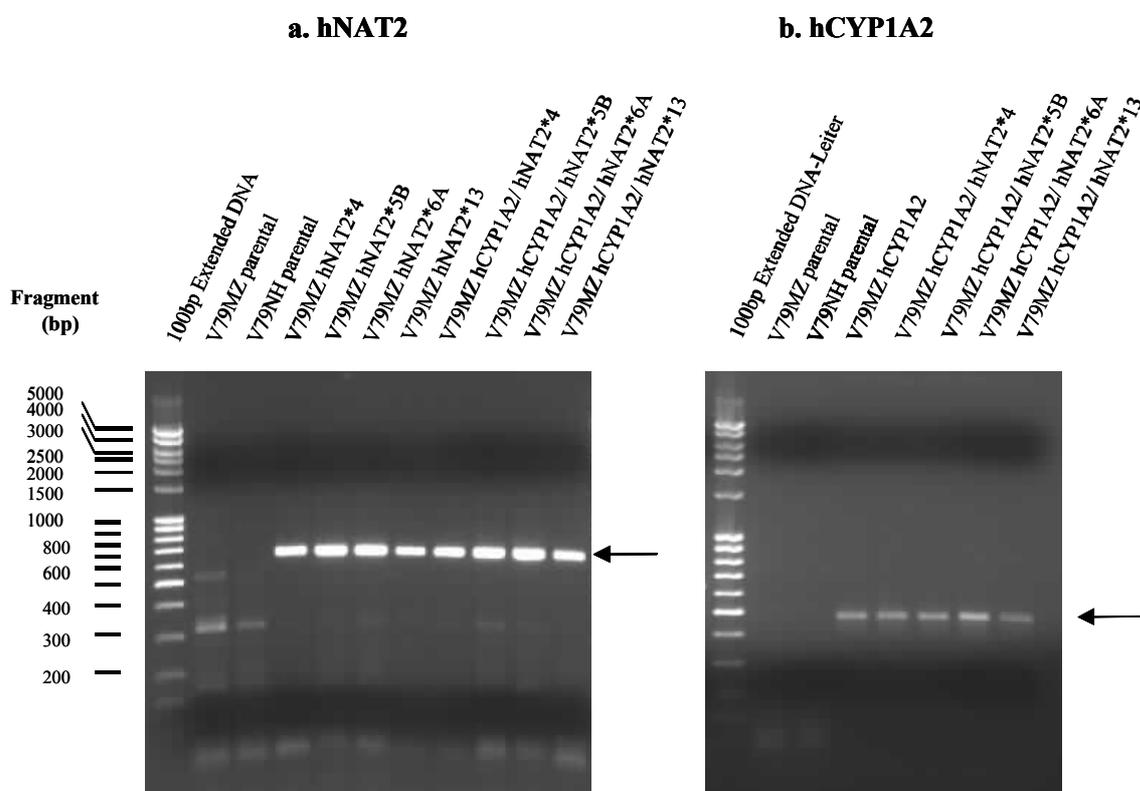


Abb. 19 : RT-PCR zum Nachweis der mRNA der polymorphen hNAT2-Formen und hCYP1A2. Amplifikation eines 631 bp langen hNAT2-Fragmentes mittels Primern 01 und 02. Zur Kontrolle der Identität der Amplifikate wurde das Vektorkonstrukt pcDNA3.1Hygro(+)/hNAT2\*4 eingesetzt (a.). Amplifikation eines 461 bp langen hCYP1A2-Fragmentes mittels Primern 03 und 04. Zur Kontrolle der Identität der Amplifikate wurde das Vektorkonstrukt pcDNA3.1Neo(+)/hCYP1A2 in den PCR-Ansatz miteinbezogen (b.).

### 3.3 *In situ*-Immunfluoreszenz

Nachdem gemäss Kap. 3.2 die durchschnittliche hCYP1A2-Aktivität bestimmt wurde und die Homogenität der Klone über Subklonierung sowie erneute Aktivitätsbestimmung sichergestellt werden konnte, erfolgte eine zusätzliche Charakterisierung mittels *In situ*-Immunfluoreszenz. Nach Inkubation mit einem polyklonalem Antiserum gegen hCYP1A2 konnte das Enzym über einen FITC-konjugierten Antikörper durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt werden (Abb. 20).

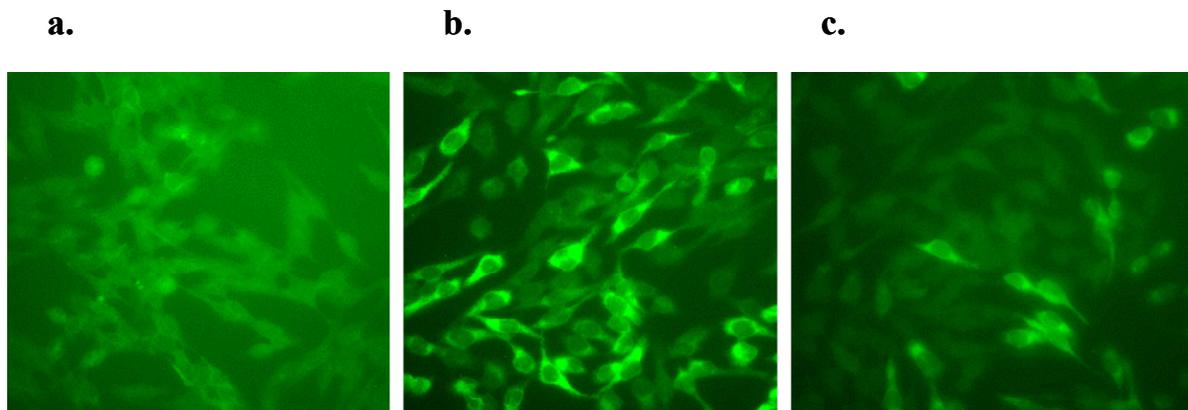


Abb. 20 : *In situ*-Immunfluoreszenz. Parentale V79MZ Zellen (a.). Rekombinante V79MZhCYP1A2 Zellen (b.) Kontroll-Mischung von parentalen V79MZ und rekombinanten V79MZhCYP1A2 Zellen (c.).

## 4. Biokatalytische Validierung

Zum Nachweis der Funktionalität der heterolog exprimierten Enzyme und Validierung der neuen Zelllinien war die Durchführung und Etablierung verschiedener biokatalytischer Assays erforderlich.

### 4.1 7-Ethoxyresorufin *O*-Deethylierung (EROD)

Um die Funktionalität des heterolog exprimierten hCYP1A2 nachzuweisen, wurde dessen hCYP1A-spezifische Ethoxyresorufin-*O*-deethylase-Aktivität bestimmt. Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz erfolgte ein Vergleich mit gepoolten humanen Lebermikrosomen. Zudem wurden mit hCYP1A2 Baculovirus transfizierte Insektenzellen-Mikrosomen in diese Testreihe miteinbezogen, um einen direkten Vergleich mit einem weiteren heterologen Expressionssystem aufstellen zu können. Der EROD-Test basiert auf einer enzymkatalysierten Dealkylierung von Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin (vgl. Kap. II., 9.1 Abb. 7). Substrat und Metabolit besitzen unterschiedliche Absorptionsmaxima. Daher konnte das Resorufin ohne vorhergehende Aufreinigung im Reaktionsansatz fluorometrisch vermessen werden. Da Reduktaseaktivitäten im Zellhomogenat die Fluoreszenzwerte deutlich verringern können, wurde Dicumarol als Schutzreagenz eingesetzt. Die Verbindung inhibiert spezifisch die Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase) und unterdrückt damit die Umsetzung des Resorufin zu einer nicht-fluoreszenten Hydrochinon-Spezies (Lubet *et al.*, 1985; Mian *et al.*, 1991).

	$V_{\max}$ <i>pmol Resorufin/mg/min</i>	$K_M$ $\mu M$
<b>V79MZhCYP1A2</b>	1,10 ± 0,03	5,90 ± 0,71
<b>Humane Hepatozyten</b>	4,10 ± 0,14	3,10 ± 0,53
<b>Supersomen hCYP1A2</b>	59,50 ± 1,65	1,84 ± 0,25

**Tab. 11 : Kinetische Parameter der Ethoxyresorufin-*O*-Deethylierung (EROD). Angegeben sind die aus einer nicht linearen Regression gemäss Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte  $V_{\max}$  und  $K_M$ -Werte. Die aus dem Berechnungsmodus resultierenden Unsicherheiten sind mit „±“ angegeben. Den Werten humaner Lebermikrosomen und Supersomen liegen 2 voneinander unabhängige Messungen zugrunde. Für V79MZhCYP1A2 wurden 3 voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten parentale V79MZ-Zellen. Abkürzungen :  $V_{\max}$  : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms.  $K_M$  : Michaelis-Menten-Konstante.**

Die Bildung von Resorufin war bei einer Substratkonzentration von 2  $\mu\text{M}$ , 37 °C und 0,5 mg/ml eingesetztem Gesamtprotein über eine Inkubationsdauer von 30 min linear. Bei der Inkubation mit hCYP1A2-Supersomen musste die Konzentration an Gesamtprotein aufgrund der deutlich höheren Aktivität auf 0,05 mg/ml reduziert werden. Als Negativkontrolle dienten parentale V79MZ-Zellen. Aufgrund der Erkenntnisse aus früheren Untersuchungen wurde nur das Homogenat von Zellen entnommen, die nicht länger als 5 Tage unter Inkubation standen. Da überwachsene Kulturen mit einer Dichte von 100 % und mehr bis zu 50 % herabgesetzte Enzymaktivitäten aufwiesen, erfolgte das Pelletieren ausschliesslich bei Konfluenzen von 85 – 90 %. Zum Aufschluss der Zellen wurden die resuspendierten Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  1-2 Wochen gelagert. Die Überprüfung der Enzymaktivität nach einer Lagerungsdauer von 2 Wochen ergab, verglichen mit unmittelbar nach der Präparation durchgeführten Aktivitätsbestimmungen, keine signifikanten Unterschiede.

Gemessen an  $V_{\text{max}}$  ist aus den so durchgeführten Untersuchungen ersichtlich, dass die EROD-Aktivität der V79MZhCYP1A2-Zelllinie mit 3 pmol/mg/min Differenz wesentlich näher an den physiologisch relevanten Bedingungen in humanen Lebermikrosomen liegt, als die um 55,4 pmol/mg/min höheren Werte aus den Inkubationen mit Supersomen (Tab. 11). Berücksichtigt man zudem den generell zu erwartenden Anreicherungseffekt der Cytochrom P450-Aktivitäten bei der Herstellung mikrosomaler Fraktionen aus Zell-Homogenaten, läge der putative Wert aus V79MZhCYP1A2-Mikrosomen noch deutlicher im physiologischen Bereich. Verglichen mit  $V_{\text{max}}$  verhalten sich die  $K_{\text{M}}$ -Werte gegenläufig, das heisst, von rekombinanten V79MZ-Zellen bis hin zu den Supersomen ist ein absteigender  $K_{\text{M}}$ -Wert zu verzeichnen. Je geringer der  $K_{\text{M}}$ -Wert, desto höher ist die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, welcher ein direktes Maß für die Affinität des hCYP1A2 zu Ethoxyresorufin darstellt. Die aus den beiden heterologen Expressionssystem ermittelten  $K_{\text{M}}$ -Werte liegen in etwa an dem für humane Lebermikrosomen ermittelten Wert. Die hCYP1A2-Enzyme aus den verschiedenen biologischen Systemen weisen damit vergleichbare Affinitäten zum Ethoxyresorufin auf.

## 4.2 *N*-Acetylierung

Um die Funktionalität der heterolog exprimierten polymorphen hNAT2 nachzuweisen und den Wert der hierbei ermittelten Aktivitäten zugleich im wissenschaftlichen Gesamtzusammenhang einordnen zu können, waren umfangreiche Vorarbeiten erforderlich.

Diese bezogen sich einerseits auf die Etablierung einer sensitiven und zugleich robusten Analytik und andererseits auf die Optimierung von Inkubationsbedingungen sowie Stabilitätsuntersuchungen.

Die Wahl der Substrate wurde im Hinblick auf die sich überschneidenden Substratspektren von hNAT1 und hNAT2 getroffen. Zum einen wurde Sulfamethazin als Markersubstrat für hNAT2 verwendet und zum anderen das Modellkarzinogen 2-Aminofluoren gewählt, welches sowohl für hNAT1 als auch für hNAT2 ein sehr gutes Substrat darstellt.

Schliesslich sollten die Aussagekraft der ermittelten Aktivitätswerte unter Verwendung entsprechender biologischer Referenzmaterialien auf ihre physiologischen Relevanz hin überprüft werden und damit gleichzeitig die Eignung des verwendeten Expressionssystems unter Beweis stellen.

### **Etablierung der Analytik für *N*-Acetyl-Aminofluoren**

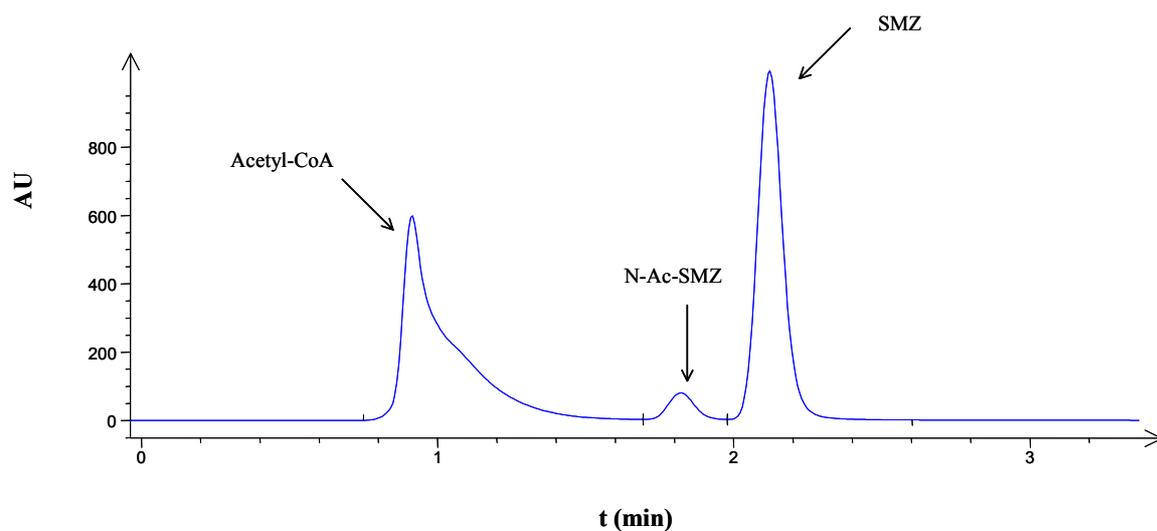
In einem ersten Schritt wurde die Analytik zur Messung der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren entwickelt. Dazu wurde ein HPLC-UV basiertes Verfahren entwickelt, welches zum sensitiven und spezifischen Nachweis von 2-Aminofluoren geeignet war. Die optimale Detektionswellenlänge lag für *N*-Acetylaminofluoren bei 282 nm. Zur Auftrennung von Substrat und Metabolit über eine C-18 Säule wurde ein Gradient eines Wasser-Methanol-Acetonitril-Gemisches gefahren. Näheres hierzu ist aus Kap. II. 9.3, Material und Methoden ersichtlich.

Das untere Quantifizierungslimit, welches auf eine Peakhöhe von 1 mAU festgelegt wurde, lag für ein Injektionsvolumen von 50 µl bei 5 nmol, wenn nur 10 µl injiziert wurden bei 25 nmol *N*-Acetylaminofluoren. Ein repräsentatives Chromatogramm für die Auftrennung und den Nachweis eines typischen Inkubationsansatzes mit 2-Aminofluoren wurde bereits in Kap. III.2 (Abb. 16) gezeigt.

### Etablierung der Analytik für *N*-Acetyl-Sulfamethazin

Um hNAT2-spezifische, mit der Literatur vergleichbare Daten erheben zu können, wurde in einem zweiten Schritt ein analytisches HPLC-UV-Verfahren zur Bestimmung von *N*-Acetyl-Sulfamethazin etabliert. Die Auftrennung des Inkubationsansatzes in Substrat und Metabolit erfolgte wie bei den Ansätzen mit 2-Aminofluoren über eine C18-Säule unter Verwendung eines Wasser-, Methanol-, Acetonitril-Gradienten. Die maximale UV-Absorption des *N*-Acetyl-Sulfamethazin lag bei 254 nm. Folglich wurde es bei dieser Wellenlänge quantifiziert um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen (Abb. 21).

Die Festlegung des Quantifizierungslimits für *N*-Acetyl-Sulfamethazin erfolgte, wie bereits für *N*-Acetyl-Aminofluoren beschrieben. Bei einer 10 µl-Injektion konnten hierbei noch 6,3 nmol *N*-Acetylsulfamethazin quantifiziert werden.



**Abb. 21 : HPLC-UV-Nachweis von *N*-Acetyl-Sulfamethazin. Der hier gezeigte Inkubationsansatz mit V79MZhNAT2\*4-Zellhomogenat wurde über einen Wasser-, Methanol-, Acetonitril-Gradienten auf einer LC18-Säule von Sulpelcosil<sup>TM</sup> aufgetrennt und das acetylierte Sulfamethazin bei einer Retentionszeit von 1,8 min bei 254 nm Wellenlänge bestimmt.**

Aufgrund der aus der Literatur ersichtlichen hNAT2-Aktivitäten mutierter Allele um circa 100 pmol/mgProtein/min war es zunächst fraglich, ob die Sensitivität des HPLC-UV-Verfahrens ausreichend wäre, um für jedes Allel enzymkinetische Parameter bestimmen zu können. Durch die im Anschluss gezeigten Daten zur hNAT2-Aktivität wird diese Problematik weiter verdeutlicht.

### **Optimierung der Inkubationsbedingungen**

Aus den bereits angeführten Gründen war es von besonderer Bedeutung die Inkubationsbedingen insbesondere unter dem Aspekt der Sensitivitätserhöhung zu optimieren. Dazu mussten zunächst die Verfahrenskenndaten für die verschiedenen Inkubationssysteme ermittelt werden. Für humanes Lebercytosol und V79MZ-Zellhomogenate mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml war die Bildung des Metaboliten bei einer Substratkonzentration von 200  $\mu$ M über eine Inkubationszeit von 1 h linear. Nach der Reduzierung der Proteinkonzentration auf 0,01 mg/ml ergaben sich für die BIT-Cytosole dieselben Kenndaten. Unter den angeführten Bedingungen wurde bei einer Substratkonzentration von 400  $\mu$ M für alle verwendeten Systeme der Sättigungsbereich erreicht.

### **Untersuchungen zur Stabilität von hNAT2**

Für die Stabilität von hNAT2 gehen die aus der Literatur erhaltenen Angaben weit auseinander und es werden Inaktivierungshalbwertszeiten zwischen 36 Minuten und 61 Stunden aufgeführt (Hein *et al.* 1981; Grant *et al.* 1990; Grant *et al.* 1991; Blum *et al.* 1991; Ferguson *et al.* 1994b). Um zu überprüfen, ob diese hohe Schwankungsbreite unter anderem auf allelspezifische Stabilitätsunterschiede zurückzuführen ist, wurden die in V79MZ-Zellen exprimierten hNAT2-Allele über einen Zeitraum von 4 h auf ihre relative Enzymaktivität hin untersucht. Desweiteren war die Untersuchung des Zusammenhangs von Inkubationszeit und Acetylierung im Hinblick auf die bereits erwähnte Sensitivitätsoptimierung ein wesentlicher Teil der Fragestellung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zweierlei : Zum einen ist über einen Inkubationszeitraum von 4 h kein relevanter Aktivitätsverlust zu verzeichnen, da die Aktivitäten selbst nach 4 h noch zwischen 60 und 80 % liegen. Der mit circa 25 % deutliche Aktivitätsverlust von 0 auf 1 h Vorinkubation ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die aus den Standardabweichungen ersichtlichen hohen Messungenauigkeiten zu Beginn der Versuchsreihe zurückzuführen und damit als Artefakt zu werten, zumal auch in der Folge kein weiterer Aktivitätsverlust zu verzeichnen ist. Zum anderen zeichnen sich beim Vergleich der verschiedenen Allele keine signifikanten Aktivitätsunterschiede ab, so dass man für die festgelegte Inkubationszeit von 1 h von einheitlichen Stabilitätsbedingungen ausgehen kann.

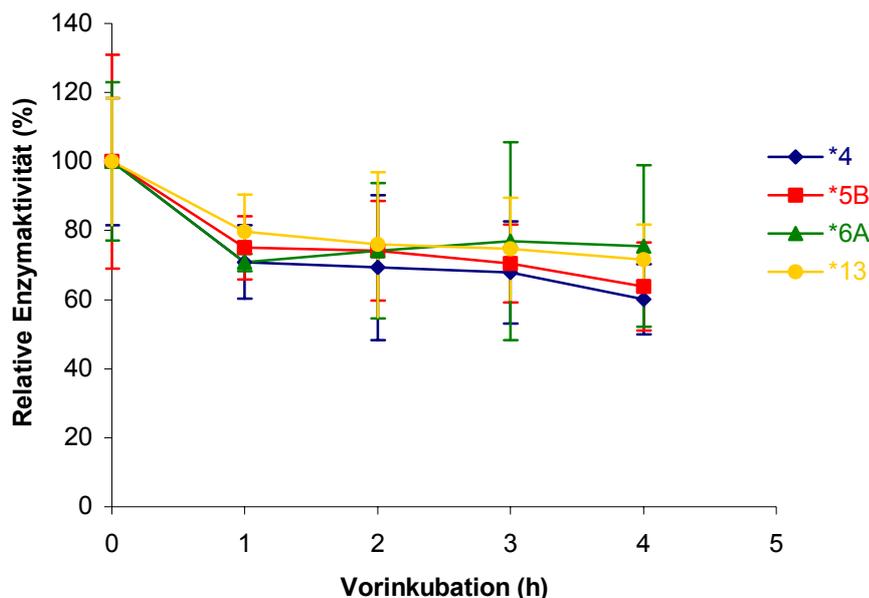


Abb. 22 : Untersuchung der Enzymstabilitäten der polymorphen hNAT2. Homogenate der V79MZhNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13-Zelllinien wurden über 1-4 Stunden bei 37°C vorinkubiert. Unter Zugabe von 400  $\mu$ M 2-Aminofluoren wurde daraufhin deren relative Enzymaktivität über 1h im Vergleich zum Ausgangswert gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Messungen.

#### 4.2.1 N-Acetylierung von Sulfamethazin

Zur Validierung der heterolog exprimierten hNAT2 wurde Sulfamethazin verwendet, da es in der Vergangenheit bei metabolischen Phänotypisierungstests bisher am häufigsten zum Einsatz kam (Evans, 1989). Um die aus den Enzymaktivitätstests ermittelten enzymkinetischen Parameter mit Werten aus der Literatur besser vergleichen zu können, wurde der Metabolismus von Sulfamethazin zunächst anhand von biologischem Referenzmaterial untersucht. Tab. 12 fasst die hieraus erhaltenen Ergebnisse zusammen.

	$V_{\max}$ nmol N-AcSMZ/mg/min	$K_M$ $\mu$ M
Humanes Lebercytosol	0,35 $\pm$ 0,05	275,51 $\pm$ 64,84
BTI-Cytosol (hNAT1)	109,78 $\pm$ 12,88	859,64 $\pm$ 153,41
BTI-Cytosol (hNAT2)	619,22 $\pm$ 10,07	210,58 $\pm$ 8,99

Tab. 12 : Kinetische Parameter der N-Acetylierung von SMZ ermittelt anhand von biologischem Referenzmaterial. Angegeben sind die aus einer nicht linearen Regression gemäss Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte  $V_{\max}$  und  $K_M$ -Werte. Die aus dem Berechnungsmodus resultierenden Unsicherheiten sind mit „ $\pm$ “ angegeben. Den Werten liegen jeweils 2 voneinander unabhängige Messungen zugrunde. Abkürzungen :  $V_{\max}$  : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms.  $K_M$  : Michaelis-Menten-Konstante.

Der durchschnittliche  $V_{\max}$ -Wert des gepoolte humanen Lebercytosols stimmt von der Größenordnung her sowohl mit den auf den Analysenzertifikaten des Herstellers angegebenen Werten von durchschnittlich 0,092 gebildeten nmol *N*-Ac-SMZ pro mg Protein pro min, als auch mit den in Kap. IV diskutierten Literatur-Werten überein. Die im Vergleich hierzu um den Faktor 300 bis 1800 deutlich höheren  $V_{\max}$ -Werte aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen (BTI-Cytosole) sind auf in der Biologie dieses speziellen Systems begründete Ursachen zurückzuführen und stimmen ansonsten wiederum ungefähr mit den in den Analysenzertifikaten angegebenen Werten überein. Anhand der gezeigten  $K_M$ -Werte lässt sich in der Reihenfolge hNAT2 > humanes Lebercytosol > hNAT1 eine abnehmende Affinität zu Sulfamethazin feststellen. Aufgrund der Verwendung von Sulfamethazin als Markersubstrat für hNAT2 war dieses Ergebnis allerdings bereits *a priori* zu erwarten.

Im Anschluss an diese Vorversuche erfolgte die Bestimmung enzymkinetischer Parameter für die verschiedenen in V79MZ-Zellen exprimierten hNAT2-Allele. Verglichen mit dem Wildtyp-Allel hNAT2\*4 führen bestimmte Aminosäureaustausche in rekombinanter humaner NAT2 nach bisherigem Erkenntnisstand zu einer reduzierten Substrataffinität, katalytischen Aktivität und/oder Proteininstabilität (Hein *et al.*, 2000). Deswegen sollte der Einfluss der verschiedenen Nukleotidsubstitutionen auf die katalytischen Aktivitäten der hNAT2-Enzymvarianten geklärt werden.

#### **hNAT2\*5B (Aminosäuren-Austausche : Ile<sub>114</sub>Thr, Lys<sub>268</sub>Arg) und hNAT2\*6A (Stille Mutation C<sub>282</sub>T, Aminosäuren-Austausch : Arg<sub>197</sub>Gln)**

Rekombinante hNAT2\*5B und hNAT2\*6A wiesen im Vergleich zum Wildtyp hNAT2\*4 einen um Faktor 6,7 bzw. 7,9 deutlich verringerten  $V_{\max}$ -Wert bezüglich der Umsetzung von Sulfamethazin zu *N*-Acetylsulfamethazin auf. Gleichzeitig nahmen der für hNAT2\*5B ermittelte  $K_M$ -Wert um Faktor 1,8 und der für hNAT2\*6A bestimmte Wert um Faktor 1,6 zu (Tab 13). Folglich sind die Mutationen Ile<sub>114</sub>Thr, Lys<sub>268</sub>Arg und Arg<sub>197</sub>Gln für den Verlust an katalytischer Aktivität verantwortlich. Dieser Befund stimmt mit den aus der Literatur ersichtlichen Ergebnissen überein, welche besagen, dass das Auftreten der eben genannten Mutationen mit einem langsamen Acetyliererphänotyp korreliert ist.

#### **hNAT2\*13 (Stille Mutation C<sub>282</sub>T)**

Das Allel hNAT2\*13, mit der stillen Mutation C<sub>282</sub>T, wurde als interne Kontrolle verwendet, da es sich bezüglich der enzymkinetischen Parameter nicht vom Wildtyp-Allel unterscheidet (Hein *et al.*, 1995) und somit eine identische Umsatzrate, sowie einen gleich hohen  $K_M$ -Wert

liefern sollte. Der in Tab. 13 gezeigte  $V_{\max}$ -Wert liegt zwar um Faktor 1,3 höher als der des Wildtyp-Alleles hNAT2\*4, allerdings ist dieser Wert nicht als signifikanter Aktivitätszuwachs zu bewerten, sondern ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf systembedingte Unsicherheiten im Screeningverfahren zurückzuführen.

Rekombinante V79MZ-Zellen	$V_{\max}$ nmol N-AcSMZ/mg/min	$K_M$ $\mu M$
hNAT2*4	0,87 ± 0,03	142,75 ± 13,06
hNAT2*5B	0,13 ± 0,05	255,56 ± 25,41
hNAT2*6A	0,11 ± 0,05	221,31 ± 29,19
hNAT2*13	1,14 ± 0,06	163,02 ± 24,83

Tab. 13 : Kinetische Parameter der *N*-Acetylierung von Sulfamethazin aus den rekombinanten V79MZ-Zelllinien hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13. Angegeben sind die aus einer nicht linearen Regression gemäss Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte  $V_{\max}$  und  $K_M$ -Werte. Die aus dem Berechnungsmodus resultierenden Unsicherheiten sind mit „±“ angegeben. Den Werten liegen jeweils 3 voneinander unabhängige Messungen zugrunde. Abkürzungen :  $V_{\max}$  : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms.  $K_M$  : Michaelis-Menten-Konstante.

Vergleicht man die aus den rekombinanten V79MZ-Zellen erhaltenen  $V_{\max}$ -Werte mit dem  $V_{\max}$ -Wert des zu 98 % aus Kaukasiern gepooltem Lebercytosols erkennt man, dass dieser zwischen den Paar-Werten von hNAT2\*4/hNAT2\*13 und hNAT2\*5B/hNAT2\*6A liegt. Unter der Annahme eines etwa gleichen zahlenmässigen Verhältnisses zwischen schnellen und langsamen Acetylierern in der kaukasischen Bevölkerung erscheint dieses Ergebnis plausibel. Der  $K_M$ -Wert des gepoolten Lebercytosols befindet sich zwar nicht zwischen denjenigen der rekombinanten *N*-Acetyltransferasen, dennoch weist auch er näherungsweise dieselbe Grössenordnung auf.

#### 4.2.2 *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren

Bei 2-Aminofluoren handelt es sich um ein Arylamin, welches ähnlich wie Sulfamethazin polymorph acetyliert wird. Allerdings ist die hNAT2-Spezifität des 2-Aminofluoren geringer, da es auch ein sehr gutes Substrat für hNAT1 darstellt. Unabhängig davon gibt es zur genotoxikologische Relevanz von 2-Aminofluoren sehr viele Untersuchungen, welche sich in diesem Zusammenhang mit der Interaktion zwischen hNAT2 und hCYP1A2 beschäftigen. Daher ist die Wahl dieses Substrates gerade im Hinblick auf die toxikologische Validierung der Zelllinien gerechtfertigt. Hinzu kommt, dass die aus rekombinanten V79MZ-Zellen

erhaltenen Daten mit bereits aus verschiedenen heterologen Expressionssystemen gewonnenen Daten in Relation gesetzt werden können. Analog zu den Untersuchungen mit Sulfamethazin wurden zunächst kinetische Parameter anhand von biologischem Referenzmaterial ermittelt, um die physiologische Relevanz der generierten Daten zu verifizieren (Tab. 14).

	$V_{\max}$ nmol N-Ac-AF/mg/min	$K_M$ $\mu M$
Humanes Lebercytosol	14,67 ± 1,29	70,78 ± 24,91
Ratten-S9	31,35 ± 3,63	213,72 ± 38,45
BTI-Cytosol (hNAT1)	481,12 ± 19,26	233,33 ± 23,9
BTI-Cytosol (hNAT2)	215,07 ± 27,01	110,72 ± 43,36

**Tab. 14 : Kinetische Parameter der *N*-Acetylierung von 2-AF ermittelt anhand von biologischem Referenzmaterial. Angegeben sind die aus einer nicht linearen Regression gemäss Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte  $V_{\max}$  und  $K_M$ -Werte. Die aus dem Berechnungsmodus resultierenden Unsicherheiten sind mit „±“ angegeben. Den Werten liegen jeweils 2 voneinander unabhängige Messungen zugrunde. Abkürzungen :  $V_{\max}$  : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms.  $K_M$  : Michaelis-Menten-Konstante.**

Die  $V_{\max}$ -Werte von humanem Lebercytosol und Ratten-S9 unterscheiden sich um Faktor 2,1 wobei bei diesem Vergleich die unterschiedlichen Herstellungsprotokolle zu berücksichtigen sind. Allerdings könnten auch speziesbedingte Unterschiede für den höheren Wert bei der Ratte verantwortlich sein. Wie an der Stelle der *N*-Acetylierung von Sulfamethazin bereits erwähnt, sind die deutlich höheren  $V_{\max}$ -Werte der BTI-Cytosole, nämlich hNAT1, Faktor 32,8 und hNAT2, Faktor 14,7 auf die Biologie des Systems zurückzuführen. Bei Betrachtung der  $K_M$ -Werte zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen hNAT1-BIT-Cytosol und Ratten-S9. Die  $K_M$ -Werte des hNAT2-BIT-Cytosols und des humanen Lebercytosols sind hingegen deutlich niedriger.

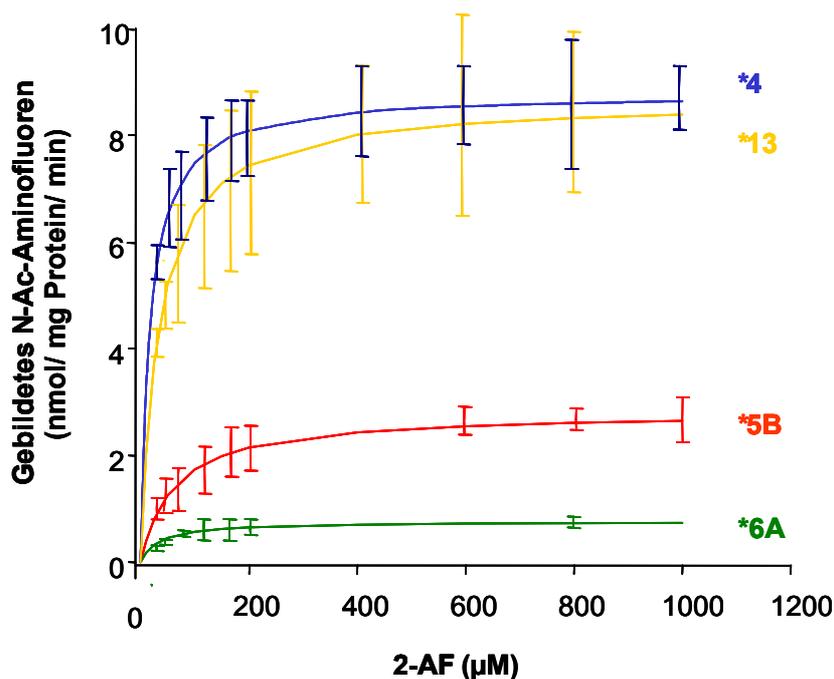


Abb. 23 : Kinetik der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren, gemessen mit Homogenat der Zelllinien V79MZ hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13.

Rekombinante V79MZ-Zellen	$V_{max}$ nmol <i>N</i> -Ac-AF/mg/min	$K_M$ $\mu M$
hNAT2*4	$8,80 \pm 0,14$	$17,54 \pm 1,72$
hNAT2*5B	$2,81 \pm 0,01$	$62,51 \pm 9,14$
hNAT2*6A	$0,76 \pm 0,09$	$34,05 \pm 15,12$
hNAT2*13	$8,70 \pm 0,23$	$33,10 \pm 4,35$

Tab. 15 : Kinetische Parameter der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren aus den rekombinanten V79MZ-Zelllinien hNAT2\*4, \*5B, \*6A, \*13. Angegeben sind die aus einer nicht linearen Regression gemäss Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte  $V_{max}$  und  $K_M$ -Werte. Die aus dem Berechnungsmodus resultierenden Unsicherheiten sind mit „ $\pm$ “ angegeben. Den Werten liegen jeweils 3 voneinander unabhängige Messungen zugrunde. Abkürzungen :  $V_{max}$  : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms.  $K_M$  : Michaelis-Menten-Konstante.

Die spezifischen Aktivitäten der hier untersuchten rekombinanten *N*-Acetyltransferase Enzyme wurden für die Umsetzung von 2-Aminofluorene zu *N*-Acetyl-Aminofluoren bereits aus *E. coli* bestimmt (Hein *et al.*, 1995). Im Vergleich hierzu stimmen die hier gezeigten Ergebnisse tendenziell gut mit den publizierten Daten überein (Abb. 23, Tab. 15). Jedoch anders als bei Hein *et al.* (1995) führt der Aminosäuren-Austausch Arg<sub>197</sub>Gln bei hNAT2\*6A zu einem deutlicheren Aktivitätsverlust als die Aminosäurenaustausche Ile<sub>114</sub>Thr, Lys<sub>268</sub>Arg in hNAT2\*5B. Im Rahmen von Phänotypisierungsstudien wurde allerdings das hier

vorliegende Ergebnis durch den gleichen Befund unterstützt (Cascorbi, persönliche Mitteilung). Die  $V_{\max}$ -Werte von hNAT2\*4 und hNAT2\*13 weisen bezüglich der Umsetzung von 2-Aminofluoren lediglich eine Abweichung von 1,1 % auf und bestätigen damit das Ergebnis aus der *N*-Acetylierung von Sulfamethazin. Die sich bereits bei der *N*-Acetylierung von Sulfamethazin abzeichnenden spezifischen Auswirkungen der einzelnen Punktmutationen auf die hNAT2-Aktivität konnten somit für die Umsetzung von 2-Aminofluoren tendenziell bestätigt werden. Nimmt man die  $V_{\max}$ -Werte rekombinanter hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13 zusammen, ergibt sich eine durchschnittliche Umsatzrate 5,26 nmol *N*-Acetylamino fluoren/min/mg Protein. Verglichen mit dem eingangs gezeigten  $V_{\max}$ -Wert aus humanem Lebercytosol ist dieser also 2,7-fach niedriger. Berücksichtigt man allerdings mögliche Anreicherungseffekte bei der Cytosol- und S9-Präparation, so liegen die für die Umsetzung von 2-Aminofluoren rekombinanten V79MZ-Zellen gezeigten Werte dennoch im physiologisch relevanten Bereich. Der Wert des gemittelten  $K_M$  von 36,8  $\mu$ M ist gegenüber dem Referenzwert aus humanem Lebercytosol um Faktor 1,9 erniedrigt. Fraglich ist ob dieser Wert statistisch signifikant ist, oder aber auf Messunsicherheiten zurückzuführen ist, zumal nicht ersichtlich ist warum sich die Substrataffinität heterolog exprimierter *N*-Acetyltransferase ändern sollte.

## 5. Toxikologische Untersuchungen

### 5.1-Aminofluoren

#### 5.1.1 Metabolismus

2-Aminofluoren ist ein aromatisches Amin, dessen metabolische Aktivierung unter anderem durch eine initiale *N*-Hydroxylierung über das an Mikrosomen gebundene humane CYP1A2 erfolgt. Die weitere Aktivierung zum ultimal toxischen Nitrenium-Ion kann über *O*-Acetylierung durch hNAT2 erfolgen, welche jedoch typischerweise die als Schutzreaktion interpretierbare *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren katalysiert (Abb. 24). Unter toxikologischen Aspekten stellt sich somit die Frage, in welchem Verhältnis in den hCYP1A2 und hNAT2 koexprimierenden V79-Zellen Hydroxylierungen und *N*-Acetylierungen stattfinden. Dazu wurden Kontroll-Zellen und koexprimierende Zellen mit 400  $\mu$ M 2-Aminofluoren inkubiert und anschliessend einer LC-MS-Analyse unterzogen. Tab. 16 zeigt die für *N*-OH-Aminofluoren und *N*-Acetyl-Aminofluoren spezifischen Massen-

Flächeneinheiten. Während in dem hCYP1A2-Homogenat noch signifikante Level an *N*-OH-AF gemessen werden konnten war in den Homogenaten der koexprimierenden Zelllinien kein *N*-OH-AF detektierbar. Dieses Ergebnis könnte man auf die mit bis zu Faktor 180 wesentlich höheren Umsatzraten der NATs gegenüber CYP1A2 zurückführen. Desweiteren wäre in den koexprimierenden Zelllinien über intramolekularen *N,O*-Acetylgruppentransfer auch eine direkte Umwandlung des *N*-OH-AF in *O*-Ac-AF denkbar. Allerdings spricht der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte HPRT-Test eher für die zuerst genannte Vorstellung.

	hCYP1A2		hCYP1A2		
	—	hNAT2*4	hNAT2*5B	hNAT2*6A	hNAT2*13
<b>N-OH-AF (MU)</b>	319 ± 79	0	0	0	0
<b>N-Ac-AF (MU)</b>	0	31367 ± 284	6510 ± 373	5121 ± 91	58330 ± 4745

**Tab. 16 : Relative Massenflächeneinheiten (MU) aus der LC-MS-Analyse von *N*-OH-AF und *N*-Ac-AF. Homogenate aus rekombinanten V79MZ-Zellen wurden für 1 h mit 400 µM Aminofluoren inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.**

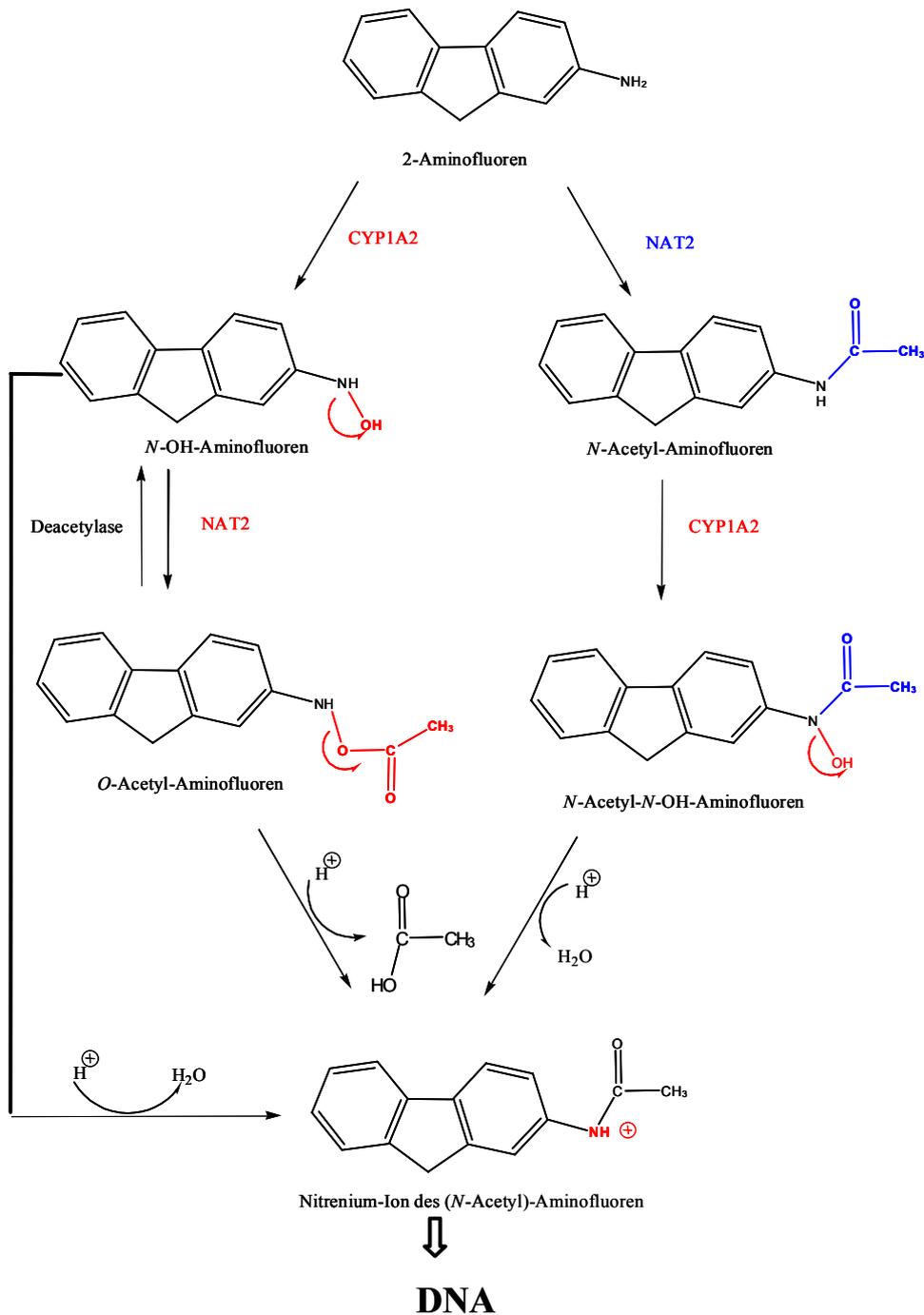
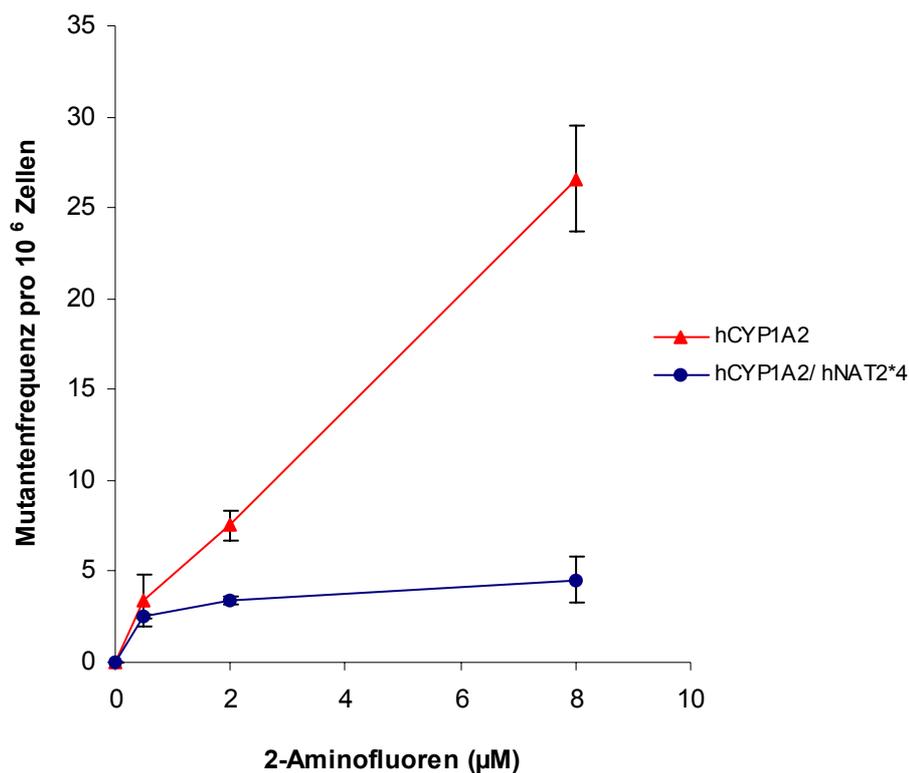


Abb. 24 : Metabolismus des 2-Aminofluorens. Die zur Bildung des reaktiven Nitrenium-Ions führenden Reaktionen sind rot, die N-Acetylierung ist blau gekennzeichnet. Nicht alle möglichen Reaktionen sind dargestellt.

### 5.1.2 Genotoxizität

V79MZ-Zellen wurden in der Vergangenheit häufig zur Feststellung chemisch induzierter Genmutationen verwendet. Dabei wurde die genverändernde Potenz der getesteten Substanzen anhand von in bestimmten Genregionen besonders häufig ausgelösten Mutationen bewertet. Mit Hilfe des HPRT-Tests lassen sich so zum Beispiel Basenpaarmutationen, Frameshiftmutationen und kleinere Deletionen am Hypoxanthinphosphoribosyltransferase-Locus des V79MZ-Genoms nachweisen und ermöglichen so eine Abschätzung des genotoxischen Potentials einer Substanz. In der vorliegenden Arbeit sollte die genverändernde Potenz von 2-Aminofluoren in hCYP1A2- und hNAT2-exprimierenden V79MZ-Zellen bestimmt werden.



**Abb. 25 : Mutagener Effekt des 2-Aminofluorens in V79MZhCYP1A2 und V79MZhCYP1A2/hNAT2\*4- Zellen. Die Zellen wurden 3h lang mit 2-Aminofluoren inkubiert. Zur Kontrolle wurde mit 1% DMSO inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 voneinander unabhängigen Messungen.**

Zur Bestimmung der Mutantenfrequenz wurden jeweils zwei Inkubationen pro Konzentration angesetzt. Der Konzentrationsbereich wurde durch einen zuvor durchgeführten MTT-Cytotoxizität-Test festgelegt. Aus diesem geht hervor, dass signifikante cytotoxische Effekte erst ab einer Konzentration von ungefähr 30  $\mu\text{M}$  2-Aminofluoren auftreten. Für diese Beobachtungen konnte allerdings kein Zusammenhang mit einer metabolischen Aktivierung durch hNAT2 und/oder hCYP1A2 hergestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass es sich hier um Cytotoxizität handelt, welche direkt auf die chemische Wirkung des 2-Aminofluorens zurückzuführen sind. Möglicherweise werden hierdurch auf metabolischer Aktivierung beruhende Effekte maskiert. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse des im Anschluss durchgeführten HPRT-Tests unterstützt (Abb. 25). Hieraus ist ersichtlich, dass 2-Aminofluoren in hCYP1A2 exprimierenden V79MZ-Zellen deutlich aktiviert wird. Dabei liegt der Aktivierung über einen Konzentrationsbereich von 0,5 bis 8  $\mu\text{M}$  eine annähernd lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zugrunde. Durch Koexpression von hCYP1A2 und hNAT2\*4 wird der mutationsinduzierende Beitrag des hCYP1A2, gemessen am 8  $\mu\text{M}$ -Wert des 2-Aminofluorens, auf cirka ein Fünftel reduziert. Die in dieser Testreihe mitgeführten Kontroll-Zelllinien V79MZ parental und V79MZhNAT2\*4 zeigten dagegen mit steigender 2-Aminofluoren-Konzentration keine signifikante Zunahme an Mutationen (Daten nicht gezeigt).

## 5.2 Cytotoxizität oxidativer Haarfarben-Vorstufen

Die hier untersuchten oxidativen Haarfarben-Vorstufen werden der chemischen Stoffklasse aromatischer Amine zugerechnet. Aromatische Amine stellen typische Substrate für CYP1A2 und NAT2 dar und für die toxikologische Relevanz der Kooperation beider Enzyme gibt es mehrere Beispiele (Probst *et al.*, 1992; Constable *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 2001). Unter Einbeziehung der Zelllinien V79MZhCYP1A2, V79MZhNAT2\*4 und V79MZhCYP1A2/hNAT2\*4 sollte daher die Rolle von hCYP1A2 und hNAT2\*4 bei der Toxifizierung verschiedener aromatischer Amine untersucht werden. Zur Messung von Vitalität und Wachstum der Zellen wurde der sogenannte MTT-Test verwendet. Dieser Test misst die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen. Oxidative Haarfarben werden häufig über Azokupplung zwischen Phenylendiaminen und Aminophenolen dargestellt. Diese Komponenten werden sowohl im Zusammenhang mit

Sensibilisierungsreaktionen als auch in Verbindung mit einer möglichen kanzerogenen Wirkung diskutiert.

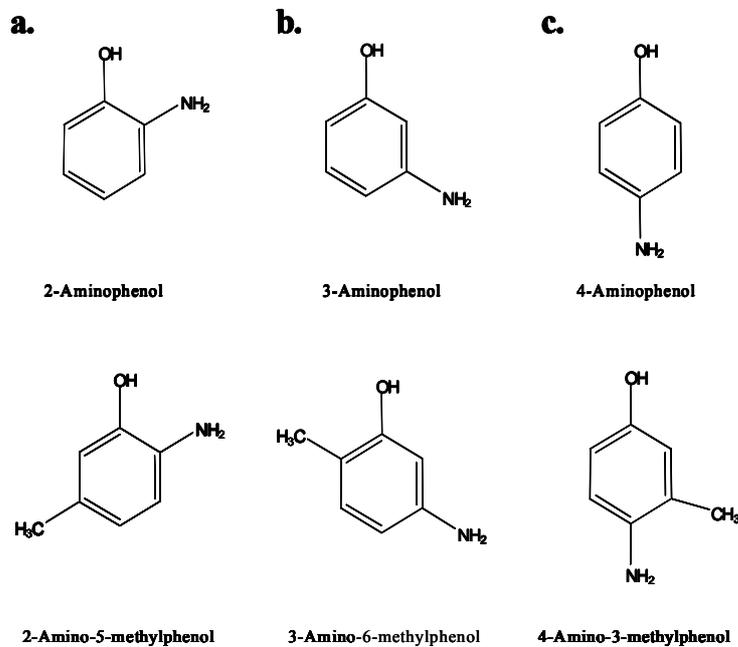


Abb. 26 : Strukturformeln von *o*-, *m*- und *p*-substituierten Aminophenolen.

a. Phenol und 5-Methylphenol mit *o*-ständiger Aminogruppe  
 b. Phenol und 6-Methylphenol mit *m*-ständiger Aminogruppe  
 c. Phenol und 3-Methylphenol mit *p*-ständiger Aminogruppe

Letztlich liegt die Vermutung nahe, dass diese Beobachtungen mit metabolismusabhängigen Mechanismen zusammenhängen. Daraufhin sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aminophenole und deren methylierten Derivate untersucht werden (Abb. 26 a-c).

Insgesamt betrachtet lassen sich die hier mittels MTT-Test detektierten Cytotoxizitäten jedoch nicht oder nur marginal auf eine metabolische Aktivierung durch hCYP1A2 und/oder hNAT2 zurückführen (Abb. 27 a-c). Allenfalls für 2-Aminophenol könnte eine Aktivierung durch das hCYP1A2 angenommen werden, da sich aus diesem Ansatz ein IC<sub>50</sub>-Wert von circa 80 µM für das rekombinante hCYP1A2 und die Kombination desselben mit hNAT2\*4 ergibt (Abb. 27 a oben). Dagegen ist die von der Stellung des Aminogruppen-Substituenten im aromatischen Ringsystem abhängige Cytotoxizität der untersuchten Aminophenole ein interessanter Nebenbefund. Besonders niedrige, zwischen 20 und 60 µM liegende IC<sub>50</sub>-Werte weisen dabei die *p*-substituierten Aminophenole auf. Dagegen sind die IC<sub>50</sub>-Werte der *o*-substituierten Aminophenole mit circa 80 µM etwas höher.

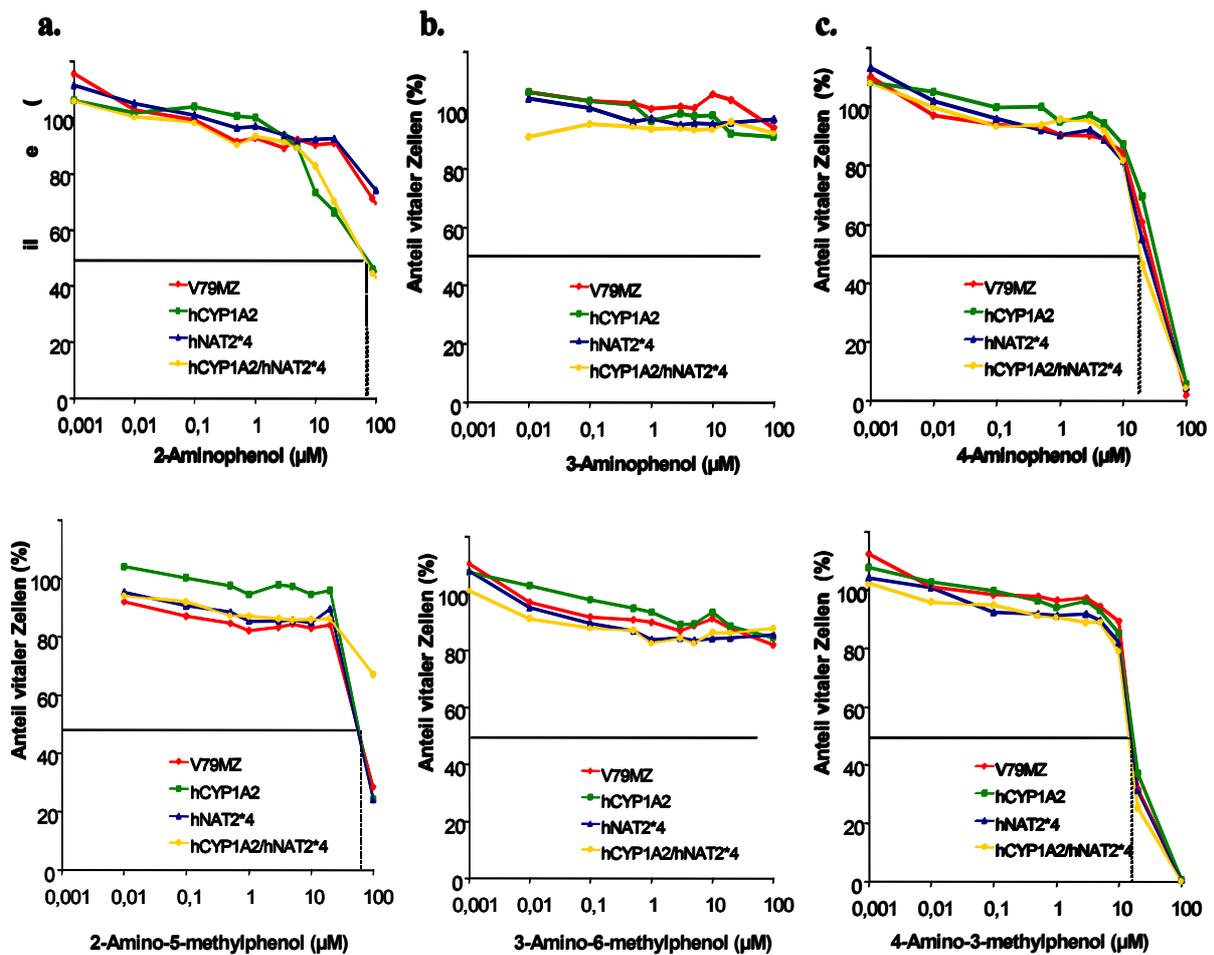


Abb. 27 : Cytotoxizität von Aminophenolen und deren Derivaten in rekombinanten V79MZ-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit dem entsprechenden Aminophenol inkubiert und anschliessend einem MTT-Test auf Vitalität und Wachstum unterzogen. Angegeben ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen, im Vergleich zur mit DMSO versehenen Kontrolle. Parentale V79MZ-Zellen wurden zur Bewertung von möglichen Effekten einer metabolischer Aktivierung als Kontrolle verwendet.

Die Derivatisierung der Aminophenole durch verschieden konstituierte Methylgruppen hatte demgegenüber keinen nennenswerten Einfluss auf die Vitalität der rekombinanten V79MZ-Zellen. Denn weder bei der Exposition von Zellen mit 2-Amino-5-methylphenol, 3-Amino-6-methylphenol noch 4-Amino-3-methylphenol, war im Vergleich zu den nicht-derivatisierten Analoga eine deutlich veränderte Cytotoxizität erkennbar.

## IV. Diskussion

Xenobiotika werden über komplex regulierte Enzymsysteme metabolisiert. Die Erforschung dieser Prozesse führte zur Identifizierung von sogenannten Schlüsselenzymen. Im Zusammenhang mit dem Metabolismus aromatischer Aryl-Amine gibt es viele Hinweise für die toxikologische Relevanz einer Interaktion zwischen NAT und CYP1A2 (Probst *et al.*, 1992, Constable *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 2001, Dominguez *et al.*, 2003). Eine isolierte Betrachtung nur eines der beide Enzyme würde zu einer sehr unvollständigen Wiedergabe der Realität führen, da die biologischen Effekte gerade von dem jeweils individuellen Beitrag dieser Enzyme abhängen. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit beide Enzyme in einem integrierten System koexprimiert, in welchem nun sowohl Metabolismus als auch Toxizität verschiedenster NAT2 und CYP1A2-Substrate untersucht werden können. Eine noch genauere Widerspiegelung der realen Situation gelang durch die zusätzlichen Koexpression mit polymorphen Formen der humanen NAT2. Denn hiermit werden erstmals die für die kaukasische Bevölkerung typischen metabolismus-abhängigen interindividuellen Unterschiede mit einer Abdeckung von mindestens 90 % in einem *in vitro*-System abgebildet.

### 1. Charakterisierung und Auswahlverfahren

Die umfassende molekulare und biokatalytische Charakterisierung der neuen Zelllinien belegt die stabile Expression und Funktionalität von hCYP1A2, hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13. Durch die Verwendung zweier bis auf die Antibiotika-Resistenzen identischen pcDNA3.1(+) Vektoren konnte das Transfektionsverfahren sowohl für hCYP1A2- als auch für die hNAT2-Konstrukte standardisiert werden. Gleichzeitig konnte die Menge an transfizierter DNA gegenüber dem früher verwendeten pSV450-Vektor um Faktor 10 deutlich verringert und damit das Risiko rekombinationsbedingter Störungen der chromosomalen Integrität der Empfängerzelle minimiert werden (Bradwell, 1989). Desweiteren sind auch expressionsbedingte Artefakte auszuschliessen, da beide Gene unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehen. Eine Verfälschung der Aktivitätsmessungen durch seltene Transfektionsereignisse wie zum Beispiel Doppelintegrationen von Expressionskassetten oder chromosomale Positionierungseffekte, wurde durch umfangreiche Screening-Kollektive und Ausschluss von Klonen, welche deutlich ausserhalb des standardmässig akzeptierten

Streubereichs lagen, umgangen. Für das Screening und die Auswahl von hNAT2-Klonen wurde ein HPLC-UV-basiertes Standardverfahren zur Bestimmung von *N*-Acetylaminofluoren entwickelt. Indem hierbei nur Klone akzeptiert wurden, deren Aktivität innerhalb eines Streubereichs von 10 % um das mittlere Aktivitätsniveau lag, war eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen polymorphen Formen von hNAT2 im Bezug auf die Enzymaktivitäten möglich. Gegenüber einem Screening-/Auswahl-Verfahrens welches auf der Abschätzung des Expressionsniveaus mittels Western-Blot basiert, ist die hier verwendete Methode von Vorteil. Insbesondere deswegen, weil vermutet wird, dass die Menge an immunologisch detektierbarem Protein, aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten der verwendeten Antikörper zu den mutierten hNAT2-Varianten, in früheren Studien oftmals falsch eingeschätzt wurde (Wormhoudt *et al.*, 1999).

## 2. Molekulare Mechanismen

Generell finden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben darüber, auf welchen molekularen Mechanismen die verringerten Enzymaktivitäten der mutierten hNAT2-Allele beruhen (Butcher *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der verschiedenen NAT2-Allele auf mRNA- und funktionaler Ebene untersucht. Somit ist es prinzipiell möglich, eine konkrete Ebene der Genexpression als Ursache Allel-spezifischer Aktivitätsunterschiede zu identifizieren.

Nach den in Kap. III. 3.2 dargestellten RT-PCR-Ergebnissen führen die Mutationen in den Allelen NAT2\*5B, \*6A und \*13 gegenüber dem Wildtyp NAT2\*4 nicht zu einer verringerten Transkriptionsrate. Dieser Befund steht bezüglich hNAT2\*6A einerseits im Einklang mit Northern-Blot-Ergebnissen aus *ex vivo*-Untersuchungen an Lebercytosol eines für hNAT2\*6A homozygoten Donors und andererseits zeigt sich auch Übereinstimmung mit heterolog exprimierter hNAT2\*6A aus COS-1 Zellen (Blum *et al.*, 1991). Für unveränderte mRNA-Level von hNAT2\*5B (T341C, C481T, A803G) spricht indirekt das Ergebnis von Blum *et al.* (1991), wo für hNAT2\*5A (T341C, C481T) keine reduzierten mRNA-Mengen gefunden wurden. Dies kann man annehmen, weil die A803G-Substitution keinen funktionalen Einfluss auf die Aktivität von NAT2\*5B hat (s. Kap. I, Tab. 3). Gleiches gilt für hNAT2\*13 (C282T) bei dem die Basenpaarsubstitution zu keiner verringerten NAT-Aktivität bezüglich der Umsetzung von Sulfamethazin führt (s. Kap. 1, Tab. 3).

Die in Kap 3.4.2 durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität der Enzymaktivitäten von hNAT2 wurden durchgeführt, da es in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben über Inaktivierungshalbwertszeiten vorzufinden waren (Hein *et al.*, 1981; Grant *et al.*, 1990; Grant *et al.*, 1991; Blum *et al.*, 1991; Ferguson *et al.*, 1994b). Es ist wahrscheinlich, dass diese unterschiedlichen Angaben auf spezifische Mutationen oder Mutationskombinationen der hNAT2-Allele zurückzuführen sind. So wird zum Beispiel berichtet, dass die Mutationen C190T und G857A zu besonders instabilen hNAT2-Enzymvarianten bei der heterologen Expression in *E. coli* führen (Hein *et al.*, 1994). Desweiteren könnten aber auch unterschiedliche Inkubationsansätze wie zum Beispiel insbesondere die Zugabe oder das Fehlen von Protease-Inhibitoren für diese hohe Schwankungsbreite verantwortlich sein. Sondierende Experimente der hier vorliegenden Arbeit zeigten allerdings, dass die Zugabe von Proteaseinhibitoren wie PMSF und EDTA keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilisierung der Enzymaktivitäten hatten, so dass diese im folgenden nicht mehr verwendet wurden. Bei den demnach lediglich in PBS (pH = 7,4) durchgeführten Versuchen war selbst nach 4-stündiger Vorinkubation bei 37°C bei keiner der mutierten hNAT2-Varianten gegenüber dem Wildtyp ein deutlicher Aktivitätsverlust hinsichtlich der *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren zu verzeichnen. Dieses vorliegende Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der heterologen Expression der Mutationen T341C und G590A in *E. coli*, wonach nach Vorinkubation bei 37°C signifikant abnehmende intrinsische Aktivitäten der durch die mutierten NAT2-Allele kodierten Proteine festgestellt wurden (Hein *et al.*, 1994b, Ferguson *et al.*, 1994b). Es muss jedoch an dieser Stelle kritisch angemerkt werden, dass die artifizielle Umgebung eines bakteriellen Expressionssystems die reale Situation in der Säugetierzelle nur sehr unvollständig wiedergibt.

Ungeachtet des geschilderten Dissenses wurde nach Abklärung der Thermostabilitätsbedingungen mit der Ermittlung von kinetischen Parametern für die hNAT2-Varianten begonnen. Die Enzymvariante hNAT2\*13 wies dabei gemäss den Ergebnissen aus Kap. III. 4.2 gegenüber dem Wildtyp hNAT2\*4 stets sehr ähnliche  $V_{\max}$ -Werte auf. Dies stimmt vollkommen mit den hierzu publizierten Ergebnissen überein, welche von einem unveränderten schnellen Acetylierer-Phänotyp für hNAT2\*13 berichten (s. Kap. I, Tab. 3). Die Enzymvarianten hNAT2\*5B und hNAT2\*6A hingegen zeigten im Vergleich zu hNAT2\*4 deutlich niedrigere  $V_{\max}$ -Werte. Dies stimmt wiederum gut mit den hierzu publizierten Daten überein (s. Kap. I, Tab. 3).

Als Antwort auf die gestellte Ausgangsfrage, auf welche Ebene der Genexpression die Allel-spezifisch unterschiedlichen Acetylierungskapazitäten kausal zurückgeführt werden könnten, kommen nach den Erkenntnissen dieser Arbeit für die betrachteten Allele und die Substrate Sulfamethazin und 2-Aminofluoren lediglich veränderte enzymkinetische Parameter in Frage. Wahrscheinlich ist, dass die hier getesteten Mutationen bei den Enzymvarianten hNAT2\*5B und hNAT2\*6A aufgrund struktureller Veränderungen in der Nähe der aktiven Zentren, sowohl zu verringerten Substrataffinitäten, als auch zu reduzierten Umsatzgeschwindigkeiten führen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass bei bestimmten Mutationskonstellationen auch andere Mechanismen den Acetyliererstatus beeinflussen können. So wird zum Beispiel für hNAT2\*5A postuliert, dass dessen verminderte *N*-Acetylierungskapazität dadurch bedingt ist, dass die Translation der mutierten mRNA fehlerhaft abläuft. Dies hätte ein mutiertes Protein zur Folge, welches anschliessend schneller abgebaut würde (Blum *et al.*, 1991).

### 3. Physiologische Relevanz und Vergleich mit anderen Expressions-Systemen

Um die physiologische Relevanz der mit rekombinanten V79MZhNAT2-Zelllinien generierten Daten zu überprüfen, wurde gepooltes humanes Lebercytosol in die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen miteinbezogen. Das hNAT2-spezifische Sulfamethazin wurde in der Vergangenheit sehr oft als Markersubstrat bei Phänotypisierungstests verwendet (Evans, 1989). Daher machte es Sinn, dieses zur Ermittlung enzymkinetischer Parameter heranzuziehen, um die hieraus resultierenden Ergebnisse mit den Literaturdaten vergleichen zu können.

Vergleicht man die  $V_{\max}$ -Werte der in V79MZ-Zellen exprimierten Allele von hNAT2\*4 und hNAT2\*6A mit den Werten aus gepooltem humanem Lebercytosol (*BD Gentest*) und den Werten aus Lebern deren Donoren homozygot für hNAT2\*4 und hNAT2\*6A waren (Blum *et al.*, 1991) findet man insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung (Tab. 17). Nach Angaben des Herstellers *BD Gentest* sollte die hNAT2-Aktivität 0,92 nmol/mg/min betragen. Da der hier über HPLC-UV-Analytik gemessene Wert bei 0,35 nmol/mg/min liegt, spricht dies für eine relativ hohe Richtigkeit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen, zumal man bedenken muss, dass aufgrund von Transport, Lagerung, Auftau- und Einfrierzyklen gewöhnlich die Enzymaktivität abgenommen haben sollte. Bei einem Vergleich der  $K_M$ -Werte rekombinanter hNATs aus V79MZ-Zellhomogenat mit gepooltem humanen Lebercytosol fällt auf, dass der  $K_M$ -Wert des hNAT2\*6A mit 221,31  $\mu$ M deutlich

näher an dem physiologisch relevanten Wert des gepoolten humanen Lebercytosols von 275,51  $\mu\text{M}$  liegt als der Wert des hNAT2\*4 mit 142,75  $\mu\text{M}$ . Dies wäre dadurch zu erklären, dass in der kaukasischen Population der Anteil an langsamen Acetylierer-Phänotypen mit cirka 60 % deutlich überwiegt (Wourmhoudt *et al.*, 1999).

Expressionssystem/exprimiertes Allel	Aufarbeitung	$V_{\max}$ nmol/mg/min	$K_M$ $\mu\text{M}$
<b>V79MZ-Zellen</b>			
hNAT2*4	Homogenat	0,87 $\pm$ 0,03	142,75 $\pm$ 13,06
hNAT2*6A	Homogenat	0,11 $\pm$ 0,05	221,31 $\pm$ 29,19
<b>COS-1-Zellen *)</b>			
hNAT2*4	Cytosol	22,5	-
hNAT2*6A	Cytosol	5	-
<b>Baculovirus-transfizierte Insektenzellen **)</b>			
hNAT2*4	Cytosol	619,22 $\pm$ 10,07	210,58 $\pm$ 9,0
<b>Humane Leber *)</b>			
hNAT2*4	Cytosol	0,46	-
hNAT2*6A	Cytosol	0,03	-
<b>Humane Leber **)</b>			
Mischung von hNAT2-Allelen aus Kaukasierern	Cytosol	0,35 $\pm$ 0,05	275,51 $\pm$ 64,84

\*) Daten nach Blum *et al.* (1991)

\*\*) Material bezogen von *BD Gentest*

**Tab. 17 : Vergleich der kinetischen Parameter der hNAT2-katalysierten *N*-Acetylierung des Markersubstrats Sulfamethazin aus verschiedenen Expressionssystemen. Das Lebercytosol \*\*) stammt aus einem Lebercytosol-Pool aus 22 verschiedenen Donoren kaukasischer Herkunft und soll repräsentativ für die hNAT2-Allel-Verteilung unter Kaukasierern sein. Nach Angaben des Herstellers *BD Gentest* beträgt die hNAT2-Aktivität 0,92 nmol/min/mg.**

Beim Vergleich von rekombinanten V79MZ-Zellen mit den beiden anderen hier gezeigten heterologen Expressionssystemen ist festzuhalten, dass dort exprimierten hNAT2-Enzyme wesentlich höhere Aktivitäten aufweisen. In Baculovirus-transfizierten Insektenzellen wird gegenüber V79MZhNAT2\*4 gar ein 711-fach höherer Wert gemessen. Generell wäre ein hohes Expressionsniveau für heterologe Expressionssysteme zwar aus Gründen der Sensitivität wünschenswert, kann aber auch zu einer Verzerrung der realen kinetischen Verhältnisse führen. In der vorliegenden Arbeit ist es besonders wichtig, dass sowohl das Expressionsniveau von hNAT2 als auch das von hCYP1A2 in V79MZ-Zellen im physiologisch relevanten Bereich liegt, da das relative Verhältnis der Aktivitätsniveaus beider Enzyme für die toxikologischen Konsequenzen dieser Interaktion entscheidend sein kann.

#### 4. Metabolische Aktivierung von 2-Aminofluoren

CYP1A2 und NAT2 sind entscheidend am Metabolismus von aromatischen Aminen beteiligt. CYP1A2 katalysiert die toxisierende Hydroxylaminbildung, während NAT2 die detoxifizierende *N*-Acetylierung des aromatischen Amins verantwortlich ist. Die *N*-Acetylierung stellt in diesem Zusammenhang primär eine Schutzreaktion dar, da der Toxifizierungsschritt der *N*-Hydroxylierung wesentlich besser für aromatische Amine als für deren *N*-acetylierten Produkte abläuft (Marquardt und Schäfer, 1997). Wenn hingegen bereits Hydroxylamine gebildet wurden, erfolgt durch die ebenfalls von Acetyltransferasen katalysierte *O*-Acetylierung eine Toxifizierung über die Bildung eines sehr instabilen Acetoxy-Arylamins. Infolge seiner hohen Instabilität zerfällt dieses leicht unter heterolytischer Abspaltung des Acetats zu einem Nitrenium-Ion, welches als starkes Elektrophil an molekulare Ziele wie zum Beispiel Proteine und DNA binden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels HPRT-Test innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 0,5 bis 8  $\mu\text{M}$  eine annähernd lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der metabolischen Aktivierung des 2-Aminofluorens durch hCYP1A2 gezeigt werden. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die mittels LC-MS-Analyse festgestellte Bildung von *N*-OH-Aminofluoren. Dieses kann aufgrund von Protonierung und daran anschließender Hydrolyse zu einem reaktiven Nitrenium-Ion zerfallen, welches daraufhin über elektrophile Addition an die DNA bindet (s. Abb. 24, Kap. III.5.1). Desweiteren ist aus den LC-MS-Analysen ersichtlich, dass bei der Koexpression von hCYP1A2 und hNAT2\*4 kein *N*-OH-Aminofluoren mehr entstehen kann, was auf die Konkurrenzreaktion um 2-Aminofluoren zurückzuführen ist. Die hohe Effizienz der durch hNAT2\*4 katalysierten Schutzreaktion ist schliesslich durch die gegenüber der *N*-Hydroxylierung cirka 400-fach höhere *N*-Acetylierungsrate von 2-Aminofluoren erklärbar. Im HPRT-Test findet dieser Befund tendenziell seine Entsprechung dadurch, dass die Mutationsfrequenz durch die Koexpression von hCYP1A2 und hNAT2\*4 über einen Konzentrationsbereich von 0,5 bis 8  $\mu\text{M}$  annähernd konstant unter einem Wert von cirka 5 mutierten Zellen/ $10^6$  Zellen gesenkt wird. Bei Betrachtung des 8  $\mu\text{M}$ -Wertes bedeutet dies eine Verringerung der Mutationsfrequenz um cirka 80 %.

Für die hier gefunden Schutzfunktion von hNAT2\*4 sprechen indirekt Ergebnisse aus epidemiologischen Untersuchungen, welche eine signifikante Häufung von Blasenkarzinomen unter gegenüber Arylaminen exponierten langsamen Acetylierern zeigten (Ladero et al., 1985, Risch et al., 1995). Verglichen mit der metabolischen Aktivierung von heterozyklischen Aminen erscheint dieses Ergebnis allerdings zunächst paradox, da beispielsweise im Falle von

IQ erst die Koexpression von CYP1A2 und NAT2 zu einer deutlichen Steigerung der Rate von DNA-Addukten führt (Probst et al., 1992). Die Auflösung des vermeintlichen Widerspruchs liegt darin, dass heterozyklische Amine schlechte oder gar keine originären Substrate von hNAT2 darstellen und erst nach vorhergehender metabolischer Aktivierung zu heterozyklischen Hydroxylaminen in signifikantem Umfang *O*-acetyliert werden können (Marquardt und Schäfer, 1997). Somit wandelt sich die ursprüngliche Detoxifizierungsreaktion von hNAT2 in eine Toxifizierungsreaktion um.

## 5. Toxizität oxidativer Haarfarben-Vorstufen

Oxidative Haarfarben werden ausgehend von Arylaminen wie zum Beispiel *p*-Phenylendiamin unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Katalyse mit einer aromatischen meta-Verbindung, wie beispielsweise *m*-Aminophenol chemisch kondensiert bzw. gekuppelt. Erst vor wenigen Jahren wurden diese Verbindungen als signifikante Risikofaktoren im Zusammenhang mit Blasenkrebs bei US-Amerikanerinnen eingestuft (Gago-Dominguez et al., 2001a). Ausserdem stellte man fest, dass das Risiko an Blasenkrebs zu erkranken für langsame Acetylierer am grössten war (Gago-Dominguez et al., 2001b). Seit langer Zeit ist allerdings schon bekannt, dass die *N*-Oxidation von karzinogenen Arylaminen zur Bildung von *N*-Hydroxyarylaminen führt, was als notwendiger Schritt zur metabolischen Aktivierung zu proximal kanzerogenen Verbindungen angesehen wird. Im Gegensatz dazu wird die Ringoxidation von Arylaminen als Detoxifizierungsreaktion eingestuft. Beide Reaktionen finden in der Leber gewöhnlich unter Beteiligung von CYP1A2 statt (Kadlubar et al., 1990, Hammons et al., 1985, Butler, M. A. et al., 1989, Turesky et al., 1995). Als Detoxifizierungsschritt wird weiter die in der Leber vorwiegend durch hNAT2 katalysierte *N*-Acetylierung der Arylamine betrachtet (Hein et al., 2000). In der Blase findet hingegen über die *O*-Acetylierung von *N*-OH-Arylaminen, welche hauptsächlich durch hNAT1 katalysiert wird, eine Toxifizierung statt, indem das hochreaktive elektrophile *N*-Acetoxyderivat kovalent an urotheliale DNA bindet (Kadlubar und Badiwi, 1995).

Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen waren Ergebnisse aus Metabolismusstudien von Aminophenolderivaten in Hepatozyten aus verschiedenen Spezies. Darunter waren Hepatozyten aus *Sprague Dawley*-Ratten, welche als schnelle Acetylierer eingestuft werden. Paradoxiereise zeigten sich jedoch hauptsächlich glukoronidierte und sulfatierte Metabolite und es wurde vermutet, dass die Acetylierungsreaktion kinetisch durch Glukoronidierung und/oder Sulfatierung blockiert wäre. Da V79MZ-Zellen weder

Glukoronidasen noch Sulfotransferasen exprimieren, lag der Schluss nahe, diese These in hNAT2-exprimierenden V79MZ-Zellen zu verifizieren. Da aufgrund epidemiologischer Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass bei Exposition gegenüber oxidativen Haarfarbstoffen sowohl CYP1A2 als auch hNAT2 das Risiko an Blasenkrebs zu erkranken beeinflussen (Gago-Dominguez *et al.*, 2003) wurden zusätzlich die Zelllinien V79MZhCYP1A2 und V79MZhCYP1A2/NAT2\*4 in die Versuchsreihe miteinbezogen, um etwaige kooperative Effekte aufzuklären. Obwohl der MTT-Cytotoxizitäts-Test prinzipiell dazu geeignet ist, metabolismus-abhängige Toxizitäten zu detektieren, waren mit Ausnahme von 2-Aminophenol keine derartigen Cytotoxizitäten erkennbar. Dieses Ergebnis wirft zunächst die Frage auf, ob die getesteten Aminophenolderivate generell Substrate für hNAT2 und hCYP1A2 darstellen. Diese Frage konnte allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt weder aus der zugänglichen Literatur noch experimentell beantwortet werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die zu beobachtenden Cytotoxizitäten nur vermeintlich vom Metabolismus unabhängig sind und aufgrund einer zu geringen Sensitivität des MTT-Test nicht erfasst werden können, zumal sich genotoxische Effekte nicht zwingend in signifikanten Cytotoxizitäten manifestieren müssen. Zur Klärung dieser noch offenen Fragen wären zum einen der Einsatz des HPRT-Test zur Klärung der Sensitivitäts-These und zum anderen unabhängige Metabolismus-Untersuchungen mit rekombinanter NAT1 und NAT2, sowie CYP1A2 zur Abklärung der Substratspezifitäten denkbar.

Auch die molekularen Ursachen des Nebenbefunds, dass *o*- und *p*-substituierte Aminophenole im MTT-Test stärker cytotoxisch sind als *m*-substituierte Aminophenole, bleibt zunächst ungeklärt. Es kann jedoch spekuliert werden, dass die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Mesomeriestabilisierung von Hydroxyl- oder Nitrinium-Ionen ausschlaggebend für die unterschiedlichen Cytotoxizitäten sind.

## V. Zusammenfassung und Ausblick

Die im Menschen stattfindende metabolische Aktivierung von Arylaminen ist ein komplexer Prozess, dessen toxikologischen Konsequenzen von vielen Variablen abhängen. Die Phase I- und II-Enzyme hCYP1A2 und hNAT2, dessen ausgeprägter Polymorphismus die Symmetrie und somit die aus der Interaktion beider Enzyme resultierende Toxizität beeinflussen kann, stellen Schlüsselenzyme in diesem Prozess dar. Eine isolierte Betrachtung nur eines dieser beiden Schlüsselenzyme würde folglich die realen Verhältnisse des Arylamin-Stoffwechsels nur sehr reduziert widerspiegeln.

Mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten stabilen Koexpression von hCYP1A2 und hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13 in V79MZ Chinesischen Hamsterzellen werden sowohl das komplexe Zusammenspiel von Phase I und Phase II-Enzymen als auch der kaukasische hNAT2-Polymorphismus umfassend *in vitro* dargestellt. Die stabile Integration der cDNAs von hCYP1A2 und hNAT2\*4, \*5B, \*6A und \*13 ins V79MZ Genom und deren Expression wurde sowohl auf molekularbiologischer Ebene, als auch biokatalytisch eingehend charakterisiert. Unter Verwendung des pcDNA3.1(+)-Vektorsystems gelang es für hCYP1A2 und die polymorphen Formen der hNAT2 ein vergleichbares Expressionsniveau sicherzustellen. Die Verifikation der Substratspezifität rekombinanter hNAT2 aus V79MZ-Zellen bei Umsetzung des Markersubstrates Sulfamethazin gelang über einen Vergleich mit enzymkinetischen Parametern heterolog exprimierter hNAT1 und hNAT2 aus Baculovirus-transfizierten Insektenzellen. Um die Enzymaktivitäten der verschiedenen Allele des *hNAT2*-Gens miteinander vergleichen zu können, wurde ein standardisiertes, HPLC-UV basiertes Auswahlverfahren für hNAT2-Klone bezüglich der Umsetzung von 2-Aminofluoren zu *N*-Acetylamino fluoren entwickelt. Die Validität dieses Verfahrens konnte über einen Vergleich des Wildtyps hNAT2\*4 mit der allelischen Variante hNAT\*13 bestätigt werden, da diese Enzymvariante gemäss *in vivo*-Ergebnissen aufgrund ihrer gegenüber dem Wildtyp unveränderten Aktivität, als interne Kontrolle fungierte. Desweiteren lagen die für die *N*-Acetylierung von 2-Aminofluoren und Sulfamethazin ermittelten kinetischen Parameter im physiologischen Bereich und spiegeln damit die für die kaukasische Population typische bimodale Verteilung von langsamen und schnellen Acetylierer-Phänotypen wider. Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung mit *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnissen gezeigt werden, dass die Aminosäuren-Substitutionen Ile114Tyr, Lys268Arg und Arg197Gln mit einem Verlust an enzymatischer Aktivität verbunden sind, welche allerdings nicht auf Proteininstabilitäten

sondern auf verringerte Substrataffinitäten zurückzuführen sind. Aufgrund der genotoxikologischen Untersuchungen ist für hNAT2 auf eine Schutzfunktion bei der Umsetzung des 2-Aminofluorens zu schliessen, da es in der Interaktion mit hCYP1A2 die Mutationsfrequenz deutlich senkt. Als Nebenbefund konnte für eine Reihe von unterschiedlich substituierten Aminophenolen gezeigt werden, dass deren Cytotoxizität von der relativen Ringposition ihrer Amino- und Hydroxylgruppe abhängig ist.

Insgesamt gelang es also die V79 Cell Battery<sup>TM</sup> formell um das Phase II-Enzym hNAT2 zu erweitern, enzymkinetische Unterschiede für die in der kaukasischen Population am häufigsten vorkommenden NAT2-Varianten *in vitro* zu verifizieren, sowie die toxikologische Relevanz der Interaktion von CYP1A2 und NAT2 zu demonstrieren. Aufgrund der Berücksichtigung mechanistischer und pharmakogenetischer Aspekte, könnte der Einsatz der nunmehr erweiterten V79 Cell Battery<sup>TM</sup>, sowohl bei der Neuausrichtung der europäischen Chemikalienpolitik (REACH) als auch im Zusammenhang mit der präklinischen Arzneimittelentwicklung einen wichtigen Beitrag liefern.

## VI. Literatur

- Abe, M., Deguchi, T., and 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.
- Agundez, J.A.G., Olivera, M., Ladero, J.M., Lescure-Rodriguez, A., Ledesma, M.C., Diaz-Rubio, M. Meyer, U.A., and Benitez, J. (1996a) Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and CYP2D6-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics* **6**: 501-512.
- Agundez, J.A.G., Olivera, M., Martinez, C., Ladero, J.M., and Benitez, J. (1996b) Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics* **6**: 423-428.
- Agundez, J.A., Martinez, C., Olivera, M., Ledesma, M.C., Ladero, J.M., and Benitez, J. (1994) Molecular analysis of the arylamine *N*-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. *Clin. Pharmacol. Ther.* **56**: 202-209.
- Andres, H. H., Klem, A. J., Schopfer, L. M., Harrison, J. K., Weber, W. W. On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine-*N*-acetyltransferase from rapid acetylator rabbits (III/J). *J. Biol. Chem.* **263**: 7521-7527.
- Anitha, A., and Banerjee, M. (2003) Arylamine *N*-acetyltransferase 2 polymorphism in the ethnic populations of South India. *Int. J. Mol. Med.* **11**: 125-131.
- Arias, T. D., Jorge, L. F., Griese, E-U., Inaba, T. and Eichelbaum, M. (1993) Polymorphic *N*-Acetyltransferase (NAT2) in Amerindian populations of Panama and Columbia, high frequencies of point mutation 857A as found in allele S3/M3. *Pharmacogenetics* **3**, 328.
- Asseffa, A., Smith, S. J., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. (1989) Novel exogenous heme-dependent expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 481-490.
- Badawi, A. F., Hirvonen, A., Bell, D. A. and Kadlubar, F. F. (1995) Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2 in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res.* **55**: 5230-5237.
- Barnes, H. J., Jenkins, C. M., Waterman, M. R. (1994) Baculovirus expression of bovine cytochrome P450c17 in Sf9 cells and comparison with expression in yeast, mammalian cells and *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 489-494.
- Bauer, E., Guo, Z., Ueng, Y. F., Bell, L. C., Zeldin, D., Guengerich, F. P. (1995) Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **8(1)**: 136-142.
- Bell, D.A., Taylor, J.A., Butler, M.A., Stephens, E.A., Wiest, J., Brubaker, L.H., Kadlubar, F.F., and 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.

- Bertilson, L., Carrilo, J. A., Dahl, M.-L., Lierena, A., Alm, C., Bondesson, U., Lindstrom, L., Rodriguez de la Rubia, I., Ramos, S. and Benitez, J. (1994) Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br. J. Clin. Pharm.* **39**: 471-473.
- Blum, M. Grant, D.M., McBride, W., Heim, M. and Meyer, U.A. (1990) Human arylamine *N*-acetyltransferase genes : isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell. Biol.* **9**: 193, 1990.
- Blum, M., Demierre, A., Grant, D.M., Heim, M. and Meyer, U.A. (1991) Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5237-5241.
- Bradley, M. O.; Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A., Huberman, E. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **87**: 81-142.
- Brockton, N., Little, J. Sharp, L., Cotton, S. C. (2000) *N*-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer : a Huge review. *Am. J. Epidemiol.* **151**: 846-861.
- Burke, M. D., and Mayer, R. T. (1974) Ethoxyresorufin : direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* **2(6)**: 583-588.
- Buters, J. T. M., Korzekwa, K. R.; Kunze, K. L., Omata, Y., Hardwick, J. P., Gonzalez, F. J. (1994) cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metab. Dispos.* **22(5)**: 688-692.
- Butler, M. A., Guengerich, F. P., and Kadlubar, F. F. (1989) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloro-aniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P450 monooxygenases. *Cancer Res.* **49**: 25-31.
- Butler, M. A., Lang, N. P., Young, J. F., Caporaso, N. E., Vineis, P., Hayes, R. B., Teitel, C. H., Massengill, J. P., Lawsen, M. F. and Kadlubar, F. F. (1992). Determination of CYP1a2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* **2**: 116-127.
- Carlson, T. J., Jones, J. P., Peterson, L., Castagnoli, N., Iyer, K. R. and Trager, W. F. (1995) Stereoselectivity and isotope effects associated with cytochrome P450-catalysed oxidation of (S)-nicotin. *Drug Metab. Dispos.* **23**: 749-756.
- Cascorbi, I., Brockmoller, J., Bauer, S., Reum, T., and Roots, I. (1996) NAT2\*12A (803A-G) codes for rapid arylamine *N*-acetylation in humans. *Pharmacogenetics* **6**: 257-259.
- Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmoller, J., Mauer, A. Sperling, K., and Roots, I. (1995) Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 581-592.

- Chen, J., Stampfer, M. J., Hough, H. L., Garcia-Closas, M., Willett, W. C., Hennekens, C. H. *et al.* (1998) A prospective study of *N*-acetyltransferase genotype, red meat intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**: 3307-3311.
- Ching, M. S., Lennard, M. S., Tucker, G. T., Woods, H. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L. (1991) The expression of human cytochrome P4501A1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Pharmacol.* **42(4)**: 753-758.
- Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968) Mammalian cell genetics II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**: 1306-1312.
- Chung, I. And Bresnick, E. (1995) Regulation of the constitutive expression of the human CYP1A2 gene : cis elements and their interaction with proteins. *Mol. Pharm.* **47**: 677-685.
- Constable, A., Varga, N. Josephy, PD., Guy, P., Turesky, RJ. (1999) Evaluation of Escherichia coli DJ4309 expressing human P4501A2 in mutagenicity testing of complex food mixtures. *Mutat. Res. Jun.* **25**: 442(2): 79-87.
- Danielson PB. (2002) The cytochrome P450 superfamily : biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* **3(6)**: 561-97.
- Deguchi, T. (1992) Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase of human liver. *J. Biol. Chem.* **267**: 18140-18147.
- Deguchi, T., Mashimo, M. and Suzuki, T. (1990) Correlations between acetylator phenotype and genotypes of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. *J. Biol. Chem.* **265**: 127-57.
- Delomenie, C., Goodfellow, G. H., Krishnamoorthy, R., Grant, D. M., 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.
- Delomenie, C., Sica, L, Grant, D.M., Krishnamoorthy, R., and Dupret, J.-M. (1996) Genotyping of the polymorphic *N*-acetyltransferase (NAT2\*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics* **6**: 177-185.
- Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H., Oesch, F. (1988) Stable expression of rat cytochrome P450IIB1-cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5769-5773.
- Doehmer, J. (1993) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology* **82**: 105-118.
- Doepker, C. L., Livingston, G. K., Schumann, B. L., Srivastava, A. K. (1998) Structural and numerical chromosomal aberrations in a metabolically competent human lymphoblast cell line (MCL-5). *Mutagenesis* **13(3)**: 275-280.
- Doll, M.A., Zang, Y., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S. and Hein, D.W. (2003) Homo sapiens *N*-acetyltransferase (NAT2) gene, NAT2\*5I allele, complete cds. *GenBank AY23052*.

- Doll, M.A., Zang, Y., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S. and Hein, D.W. (2003) Homo sapiens *N*-acetyltransferase (NAT2) gene, NAT2\*12D allele, complete cds. *GenBank AY23051*.
- Dupret, M.-J. and Grant, D. M. (1992) Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine *N*-Acetyltransferase expressed in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 7381-7385.
- Eaton, D. L., Gallagher, E. P., Bammler, T. K. and Kunze, K. L. (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis : implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* **5**: 259-274.
- Ebisawa, T. and Deguchi, T. (1991) Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine *N*-acetyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**: 1252.
- Eugster, H. P., Sengstag, C., Meyer, U. A., Hinnen, A., Wurgler, F. E. (1990) Constitutive and inducible expression of human cytochrome P4501A1 in yeast *Saccharomyces cerevisiae* : an alternative enzyme source for in vitro studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172(2)**: 737-744.
- Evans, D. A. (1989) *N*-acetyltransferase. *Pharmacol. Therapeut.* **42**: 157-234.
- Ford, D. K. and Jordan, V. C., (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **21**: 393-425.
- Evans, D.A.P. (1989) *N*-Acetyltransferase. *Pharmac. Ther.* **42**: 157-234
- Ferguson R. J, Doll M. A., Rustan T. D., Baumstark B. R., Hein D. W. (1994a) Syrian hamster monomorphic *N*-acetyltransferase (NAT1) alleles: amplification, cloning, sequencing, and expression in *E. coli*. *Pharmacogenetics* **4(2)**: 82-90.
- Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K. and 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.
- Franke, S., Klawitz, I., Schnakenberg, E., Rommel, B. (1994) Isolation and mapping of a cosmid clone containing the human NAT2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 52-55.
- Fretland, A. J., Leff, M. A., Doll, M. A., Hein, D. W. (2001) Functional characterization of human *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotid polymorphisms. *Pharmacogenetics* **11**: 207-215.
- Fuhr, U. and Kummert, A. L. (1995) The fate of naringin in humans : a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **58**: 365-373.
- Gago-Dominguez, M., Castelao, J. E., Yuan, J.-M., Yu, M. C., and Ross, R. K. (2001a) Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. *Int. J. Cancer* **91**: 575-579.

- Gago-Dominguez, M., Chan, K. K., Ross, R. K. And Yu, M. C. (2001b) Permanent hair dyes and bladder cancer risk. *Int. J. Cancer* **94**: 905-906.
- Gago-Dominguez, M., Bell, D. A., Watson, M. A., Yuan, J.-M., Castelao, J. E., Hein, D. W., Chan, K. K., Coetzee, G. A., Ross, R. K. and Yu, M. C. (2003) Permanent hair dyes and bladder cancer : risk modification by cytochrome P4501A2 and *N*-Acetyltransferases 1 and 2. *Carcinogenesis* **24(3)**: 483-489.
- Garfinkel, D. (1958) Isolation and properties of cytochrome b5 from pig liver. *Arch.Biochem.Biophys.* **77**: 111-120.
- Garner, R. C., Martin, C. N. Clayson, D. B. (1984) Carcinogenic aromatic amines and related compounds. In: Searle, C.E., ed, Chemical Carcinogens. *Washington, American Chemical Society, Monograph No.182, 2<sup>nd</sup> Edition, Vol.1*, 175-276.
- Gillam, E. M. J., Guo, Z., Martin, M. V. M., Jenkins, C. M., Guengerich, F. P. (1995) Expression of cytochrome P450 2D6 in *Escherichia coli*, purification and spectral and catalytic characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 540-550.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., Oesch, F. (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* **1**: 313-334.
- Glatt, H. R., Gemperlein, I., Setiabudi, F., Platt, K. L., Oesch, F. (1990) Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in propagable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* **5**: 241-249.
- Goldstein JA, Faletto MB (1993) Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* **100**: 169-176.
- Graham, F. L. and Van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- Grant, D. M., Blum, M., Demierre, A., and Meyer, U.A. (1989) Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine *N*-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3978.
- Grant, D. M., Blum, M., Beer, M. and Meyer, U.A. (1991) Monomorphic and polymorphic human *N*-acetyltransferases : a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol. Pharmacol.* **39**: 184-191.
- Grant, D. M., Hughes, N. C., Janezic, S. A., Goodfellow, G. H., Chen, H. J., Gaedigk, A. *et al.* (1997) Human acetyltransferase polymorphisms *Mutat. Res.* **376**: 61-70.
- Grant, D.M., Mörike K., Eichelbaum, M. and 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.
- Greim, H. und Deml, E. H. (Hrsg.) (1996) Toxikologie Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. Weinheim: VCH.

- Guengerich, F. P. and McDonald, T. L. (1984) Chemical mechanisms of catalysis by cytochromes P450 a unified view. *Acc. Chem. Res.* **17**: 9-16.
- Hammons, G. J., Guengerich, F. P., Weis, C. C., Beland, F. A. and Kadlubar, F. F. (1985) Metabolic activation of carcinogenic arylamines by rat, dog and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Cancer Res.* **45(8)**: 3578-85.
- Hein, D.W., Hirata M. and Weber W.W. (1981) An enzyme marker to ensure reliable determinations of human isoniazid acetylator phenotype *in vitro*. *Pharmacol.* **23**, 203-210.
- Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A. Webb, S. J., Xiao, G. H., Devanaboyina, U.S., Nangju, N.A. and Feng, Y. (2000) Molecular Genetics and Epidemiology of the NAT1 and NAT2 Acetylation Polymorphism. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **9**: 29-42.
- Hein, D. W., Doll, M. A., Rustan, T. D., *et al.* (1993). Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* **14**: 1633-1638.
- Hein, D. W., Doll, M. A., Rustan, T. D., and 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.
- Hein, D. W., Ferguson, R. J., Doll, M. A., Rustan, T. D., Gray, K. (1994b) Molecular genetics of human polymorphic *N*-acetyltransferase : enzymatic analysis of 15 recombinant wild type, mutant and chimeric NAT2 allozymes. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 729-734.
- Hickman, D., Pope, J., Patil, S. D., *et al.* (1998) Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. *Gut* **42**: 402-409.
- Hickman, D., Risch, A., Camilleri, J. P., and Sim, E. (1992) Genotyping human polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase: identification of new slow allotypic variants. *Pharmacogenetics* **2**: 217-226.
- Hickman, D., and Sim, E. N. (1992) Acetyltransferase polymorphism: Comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1007-1014.
- Honkakoski, P. and Negishi, M. (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal* **347**, 321-337.
- Ilett, K. F., David, B. M., Detchon, P., Castleden, W. M., Kwa, R. (1987) Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **47**:1466-1469.
- Jenne, J. W. (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.
- Kaderlik, K. R., Minchin, R. F., Mulder, G. J., Ilett, K. F., Daugaard-Jenson, M., Teitel, C. H. and Kadlubar, F. F. (1994). Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts

of the carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) in rat extrahepatic tissues. *Carcinogenesis* **15**: 1703-1709.

Kadlubar, F. F. (1994) Biochemical individuality and its implications for drug and carcinogen metabolism. Recent insights from acetyltransferase and cytochrome P450A2 phenotyping and genotyping in humans. *Drug Metab. Dispos.* **26**: 37-46.

Kadlubar, F. F. and Badawi, A. F. (1995) Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **82-83**: 627-632.

Kadlubar, F. F., Dooley, K. L., Teitel, C. H., Roberts, D. W., Benson, R. W., Butler, M. A., Bailey, J. R., Young, J. F., Skipper, P. W. and Tannenbaum, S. R. (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood haemoglobin adduct formation and liver and urinary DNA bladder adduct levels in beagle dogs given the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Res.* **51**: 4371-4377.

Kadlubar, F. F., Fu, P. P., Jung, H., Shaikh, A. U. and Beland, F. A. (1990) The metabolic *N*-oxidation of carcinogenic arylamines in relation to nitrogen charge density and oxidation potential. *Environ. Health Perspect.* **87**, 233-236.

Kadlubar, F. F., and Hammons, G. J. (1987) The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens. In: Guengerich, F. P., ed, *Mammalian Cytochromes P-450*, Vol II Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., pp. 81-130.

Kato, R. (1986). Metabolic activation of mutagenic heterocyclic amines from protein pyrolysates. *Crit. Rev. Toxicol.* **16(4)**:307-48.

Kattner, E., Dubbels, R., Schloot, W. (1981) Acetylation of procainamide and isoniazid by a rat liver-*N*-acetyl-transferase. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **6**: 81-84.

Kawajiri, K. and Hayashi, S.-I. (1996) The CYP1 family, in : *Cytochromes P450 : Metabolic and Toxicological Aspects* (C. Ioannides, ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, Chapter 4, 77-97.

Kiefer, F. and Wiebel, F. J. (1989) V79 Chinese hamster cells express cytochrome P450-activity after simultaneous exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and aminophylline. *Toxicol. Letters* **48**: 265-273.

Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**:376-386.

Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**: 947-950.

Kozak, M. (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**87**): 8301-8305.

Krebsfänger, N., Mürdter, T. E., Zanger, U. M., Eichelbaum, M. F., Döhmer, J. (2003) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans. *ALTEX* **20**: 3:143-154.

- Kunze, K. L., und Trager, W. F. (1993) Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem. Res. Toxicol.* **6**: 649-656.
- Landi, M. T., Sinha, R., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. (1999) Chapter 16. Human cytochrome P4501A2. *IARC Scientific Publications* **148**: 173-195.
- Lang, N. P., Butler, M. A., Massengill, J., Lawson, M., Stotts, R. C., Hauer-Jansen, M. and Kadlubar, F. F. (1994). Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **3(8)**: 675-82.
- Lang, N. P., Chu, D. Z. Hunter, C. F., Kendal, D. C., Flammang, T. J., Kadlubar, F. F. (1986) Role of aromatic amine transferase in human colorectal cancer. *Arch. Surg.* **121**: 1259-1261.
- Laredo, J. M., Kwok, C. K., Jara, C. Fernandez, L., Silmi, A. M., Tapia, D. and Uson, A. C. (1985) : Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients. *Ann. Clin. Res.* **17**: 96-99.
- Lee, Soo-youn (Email: lsy117@hanmail.net) and Kim, Jong-Won (Email: jwong@smc.samsung.co.kr), personal communication.
- Lee, S.Y, Lee, K.A, Ki, C.S., Kwon, O.J., Kim, H.J., Chung, M.P., Suh, G.Y., and Kim, J.W. (2002) Complete sequencing of a genetic polymorphism in NAT2 in the Korean population. *Clin. Chem.* **48**: 775-777.
- Leff, M.A., Fretland, A.J., Doll, M.A., and Hein, D.W. (1999) Novel human *N*-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. *J. Biol. Chem.* **274**: 34519-34522.
- Lemoine, L., Gautier, J. C., Azoulay, D., Kiffel, L., Belloc, C., Guengerich, F. P., Maurel, P., Beaune, P. and Leroux, J. P. (1993) Major pathway of imipramine metabolism is catalysed by cytochromes P450 1A2 and P450 3A4 in human liver. *Mol. Pharmacol.* **43**: 827-832.
- Lewis D. F. V. (2001) Guide to cytochromes P450 structure and function, (London : Taylor & Francis).
- Lin, J.J., Han, C-Y., Link B.K., and 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. Human Genet.* **52**: 827-834.
- Lin, H.J., Han, C.-Y., Lin, B.K., and Hardy, S. (1994) Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic *N*-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* **4**: 125-134.
- Lubet, R. Nims, R. W.; Mayer, R. T.; Cameron, J. W.; Schechtman, L. M. (1985) Measurement of cytochrome P450 dependent dealkylation of alkoxyphenazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates : effects of dicumarol. *Mutat. Res.* **142 (3)**: 127-131.
- Lynch, A. M., Murray, S., Gooderham, N. J. and Boobis, A. R. (1995) Exposure to and activation of dietary heterocyclic amines in humans. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **21**: 19-31.

- Martinez, C., Agundez, J.A.G., Olivera M., Martin, R., Ladero, J.M., and Benitez, J. Lung (1995) Cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics* **5**, 207-214.
- Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (Hrsg.) (1997) Lehrbuch der Toxikologie. 1. Ausgabe. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag.
- Matas, N., Thygesen, P., Stacey, M., Risch, A., Sim, E. (1997). Mapping *AAC1*, *AAC2* and *AACP*, the genes for arylamine *N*-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumors. *Cytogenet. Cell Genet.* **77**: 290-295.
- McManus, M. E., Burgess, W. M., Veronese, M. E., Huggett, A., Quattrochi, L. C., Tukey, R. H. (1990) Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo[a]pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P450. *Cancer Res.* **50(11)**: 3367-3376.
- Mian, M., Fratta, D., Rainaldi, G., Simi, S., Mariani, T., Benetti, D., Gervasi, P. G. (1991) Superoxide anion production and toxicity in V79 cells of six hydroxy-anthraquinones. *Anticancer Res.* **11**: 1071-1076.
- Minchin, R. F. (1995) Acetylation of p-aminobenzoylglutamate, a folate catabolite, by recombinant human NAT and U937 cells. *Biochem. J.* **307**: 1-3.
- Minchin, R. F., Reeves, P. T., Teitel, C. H., *et al.* (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. Commun.* **185**: 839-844.
- Monier, S., Van Luc, P., Adesnik, M. (1988) Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmatic reticulum membrane. *J. Cell. Biol.* **107**: 457-570.
- Mulligan, R. C. and Berg, P. (1981) Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2972-2976.
- Muntané-Relat, J., Ourlin, J-C., Domergue, J. and Maurel, P. (1995) Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **22**, 1143-1153.
- Nebert, D. W., Tukey, R. H., Mackenzie, P. I., Negishi, M., Eisen, H. J. (1983). Several P450 genes regulated by the Ah-receptor. In : Extrahepatic Drug Metabolism and Chemical Carcinogenesis. [Rydstroem, J.; Montelius, J.; Bengtsson, M. (eds.)] Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 379-388.
- Nebert, D.W. Adesnik, M. Coon, M. J. *et al.* (1987) The P450 gene superfamily : Recommended nomenclature. *DNA* **6**: 1-11.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M. J., Eastabrook, R.W., Gunsalus, I.C., and Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily, update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.

- Oda, Y., Aryal, P., Terashita, T., Gillam, EM., Guengerich, FP., Shimada, T. (2001) Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella typhimurium* umu tester strains expressing human cytochrome P4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1 and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial *O*-acetyltransferase. *Mutat. Res.* **492(1-2)**: 81-90.
- Ohasko, S., Deguchi, T. (1990) Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine *N*-acetyltransferases from human liver. *J. Biol. Chem.* **265**: 4630-4634.
- Ohsako, S., Ohtomi, M., Sakamoto, Y., Uyemura, K., Deguchi, T. (1988) Arylamine *N*-Acetyltransferase from chicken liver II. Cloning of cDNA and expression in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 7534-7538.
- Omura, T. and Sato, R. (1964a) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**:2370-2385.
- Omura, T. and Sato R. (1964b) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization purification and properties. *J. Biol. Chem.* **239**: 2379-2385.
- Onderwater, R. C. A., Goepfert, A. R., Levering, P. R., Vos, R. M. E., Konings, P. N. M., Doehmer, J., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. (1996) The use of macroporous microcarriers for the large-scale growth of V79 cells genetically designed to express single human cytochrome P450 isoenzymes and for the characterization of the expressed cytochrome P450. *Prot. Expr. Pur.* **8**: 439-446.
- Pacifici, G. M., Bencini, C., Rane, A. (1986) Acetyltransferase in humans : development and tissue distribution. *Pharmacology* **32**: 283-291.
- Paine, M. J. I., Gilham, D., Roberts, G. C. K., Wolf, C. R. (1996) Functional high level expression of cytochrome P450 CYP2D6 using baculovirus expression systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**: 143-150.
- Parker, B. A. and Stark, F. R. (1979) Regulation of simian virus 40 transcription. *J. Virol.* **31**: 360.
- Pompeo, F., Brooke, E., Kawamura, Mushtaq, A., Sim, E. (2002) The pharmacogenetics of NAT structural aspects. *Pharmacogenomics* **3(1)**: 19-30.
- Probst M.R., Blum, M., Fasshauer, I., D'Orazio D., Meyer, U.A. and 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.
- Raza, H., King, R. S., Squires, R. B., Guengerich, F. P. Miller, D. W., Freeman, J. P. and Kadlubar, F. F. (1996) Metabolism of 2-Amino- $\alpha$ -carboline, a food-borne heterocyclic amine mutagen and carcinogen, by human and rodent liver microsomes and by human cytochrome P4501A2. *Drug Metab. Dispos.* **24**: 395-400.

- Rendic, S. and DiCarlo, F. J. (1997) Human cytochrome P450 enzymes : a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* **29**: 413-580.
- Riddle, B., Jencks, W. (1971) Acetyl-coenzyme A : arylamine *N*-acetyltransferase. Role of the acetyl-enzyme intermediate and the effects of substituents on the rate. *J. Biol. Chem.* **246**: 3250-3258.
- Risch, A., Wallace, D. M. A., Bathers, S., and Sim, E. (1995) Slow *N*-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 231-236.
- Rogers, L. E., Levy, G. N. and Weber, W. W. (1998) Substrate selectivity of mouse *N*-acetyltransferases 1, 2 and 3 expressed in COS-1 cells. *Drug Metabolism and Disposition* **26**: 502-505.
- Ruckpaul and Rein (1984) Cytochrome P450, Akademie-Verlag, Berlin.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada, M. and Kamataki, T. (1998) Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutation Research* **411**: 19-43.
- Schenkman, J. B. und Greim, H. (1993). Cytochrome P450, 105. Berlin: Springer.
- Schenkman, J. B. Tamburini, P. P., Jansson, I., Epstein, P. M. (1989). Functional aspects of protein-protein interactions of cytochrome b<sub>5</sub>, cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450. In Book of abstracts and lecture notes. NATO Advanced Study Institute on Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds.
- Schneider, A., Schmalix, W. A., Siruguri, V., de Groene, E. M., Horbach, G. J., Kleingeist, B., Lang, D., Böcker, R., Belloc, C., Beaune, P., Greim, H., Doehmer, J. (1996) Stable expression of human cytochrome P450 3A4 in conjunction with human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in V79 hamster cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**: 295-304.
- Schulz-Schalge T, Heger W, Webb J, Kastner M, Neubert D. (1991) Ontogeny of monooxygenase activities in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Med. Primatol.* **20**(7): 325-33.
- Sekine, A., Saito, S., Iida, A., Mitsunobu, Y., Higuchi, S., Harigae, S. and Nakamura Y. (2001) Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human *N*-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1, and L1CAM in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* **46**: 314-319.

- Sengstag, C., Eugster, H. P., Wurgler, F. E. (1994) High promutagen activating capacity of yeast microsomes containing human cytochrome P450 1A and human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* **15**: 837-843.
- Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-3063.
- Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F. P. and Sutter, T. R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* **56**: 2979-2984.
- Sinclair, J. C., Sandy, J., Delgoda, R., Sim, E., Noble, M. E. : Structure of arylamine *N*-Acetyltransferase reveals a catalytic triade. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 560-564 (2000).
- Shishikura, K., Hohjoh, H., and Tokunaga, K. (2000) Novel allele containing 190C>T nonsynonymous substitution in the *N*-acetyltransferase (NAT2) gene. *Hum. Mut.* **15**: 581.
- Shou, M., Korzekwa, K. R., Crespi, C. L., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V. (1994a) The role of 12 cDNA-expressed human, rodent and rabbit cytochromes P450 in the metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrenetrans-7,8-dihydrodiol. *Mol. Carcinog.* **10(3)**: 159-168.
- Shou, M., Korzekwa, K. R., Krausz, K. W., Crespi, C. L., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V. (1994b) Regio- and stereo-selective metabolism of phenanthrene by twelve cDNA-expressed human, rodent and rabbit cytochromes P450. *Cancer Lett.* **83(1-2)**: 305-313.
- Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerases. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684.
- Sim, E., Payton, M. Noble, M., Minchin, R. (2000) An update on genetic, structural and functional studies of arylamine *N*-acetyltransferases in eukaryotes and prokaryotes. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2435-2441.
- Sharer, J. E. and Wrighton, S. A. (1996) Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the *in vitro* oxidation of antipyrine. *Drug Metab. Dispos.* **24**: 487-494.
- Simi, S., Xiao, Y., Campagna, M., Doehmer, J., Darroudi, F. (1999) Dual-colour FISH analysis to characterize a marker chromosome in cytochrome P450 2B1 recombinant V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis* **14**: 101-105.
- 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. and Kadlubar, F. F. (1994) PaN-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Res.* **54**: 6154-6159.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150(1)**: 76-85.

- Spaldin, V., Madden, S., Adams, D. A., Edwards, R. J., Davies, D. S. and Park, B. K. (1995) Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity *in vitro* use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab. Dispos.* **23**: 929-934.
- Stanley, L. A., Coroneos, E., Cuff, R., Hickman, D., Ward, A., Sim, E. (1996) Immunochemical detection of arylamine *N*-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 1059-1067.
- Stier A. (1976) Lipid structures and drug metabolising enzymes. *Biochemical Pharmacology* **25**: 109-113.
- Sugimura T., and Sato, S. (1983) Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.* **43**: 2415-2421.
- Sugimura, T., Sato, S. and Wakabayashi, K. (1988) Mutagens/carcinogens in pyrolysate of amino acids and proteins and in cooked foods : heterocyclic aromatic amine. In : Woo, Y. T., Lai, D. Y. Arcos, J. C. and Argus, M. F., eds, Chemical induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms. *New York, Academic Press, Inc.* 681-710.
- Swierenga, S. H., Heddle, J. A., Sigal, E. A., Gilman, J. P., Brillinger, R. L., Douglas, G. R., Nestmann, E. R. (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **246**: 301-322.
- Tanira, M.O.M., Simsek, M., Al Balushi, K., Al Lawatia, K., Al Barawani, H., and Bayoumi, R.A. (in press) Distribution of arylamine *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes among Omani Arabs. *S.Q.U. Journal for Scientific Research: Medical Sciences.*
- Thompson, P. A., Seyedi, F., Lang, N. P., MacLeod, S. L., Wogan, G. N., Anderson, K. E., Tang, Y.-M., Coles, B. and Kadlubar, F. F. (1999) Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreas in relation to metabolic genotype. *Mutat. Res.* **424**: 263-274.
- Trepanier, L. A., Ray, K., Winand, N. J., Spielberg, S. P., Cribb, A. E. (1997) Cytosolic arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of *NAT* genes. *Biochem. Pharmacol.* **54**: 73-80.
- Turesky, R. J., Fay, L. B. and Welti, D. H. (1995) Metabolism of heterocyclic aromatic amines and strategies of human biomonitoring. *Princess Takamatsu Symp.* **23**: 59-68.
- Turesky, R. J., Lang, N. P., Butler, M. A., Teitel, C. H., Kadlubar, F. F. (1991) Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* **12**: 1839-1845.
- Vatsis, K. P., Weber, W. W., Bell, D. A. *et al.* (1995) Nomenclature for *N*-Acetyltransferases. *Pharmacogenetics* **5**: 1-17.
- Vatsis, K.P., Martell, K.J., and Weber, W.W. (1991) Diverse point mutations in the human gene for polymorphic *N*-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6333-6337.

- Vatsis, K. P., Weber, W. W., Bell, D. A., Dupret, J.-M., Evans, D. A. P., Grant, D. M., Hein, D. W., Lin, H. J., Meyer, U. A., Relling, M. V., Sim, E., Suzuki, T. and Yamazoe, Y. (1995) Nomenclature for *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* **5**: 1-17.
- Weber W. W., Hein, D. W. (1985) *N*-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.* **37**: 25-79.
- Welfare, M. R., Aitkin, M., Bassendine, M. F. and Daly, A. K. (1999) Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene : lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* **9**: 367-375.
- Welfare, M. R., Cooper, J. Bassedine, M. F., Daly, A. K. (1997) Relationship between acetylator status, smoking and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis* **18**: 1351-1354
- Wibel, F. J., Kiefer, F., Cumpelik, O., (1992) Expression of monomorphic and polymorphic acetyltransferase in V79 cells differing in sensitivity to 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP). Proceedings of the 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association Cancer Research, 20-23 March 1992. San Diego, CA. Vol 33
- Williams, J. A., Stone, E. M., Fakis, G. *et al.*. (2001) *N*-Acetyltransferases, sulfotransferases and heterocyclic amine activation in the breast. *Pharmacogenetics* **11**: 373-388.
- Windmill, K. F., Gaedigk, A., Hall, P. M., Samaratunga, H., Grant, D. M., McManus, M. E. (2000) Localization of *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol. Sci.* **54**: 19-29.
- Wölfel, C., Heinrich-Hirsch, B., Schulz-Schalge, T., Seidel, A., Frank, H., Ramp, U., Wächter, F., Wibel, F. J., Gonzalez, F., Greim, H. and Doehmer, J. (1992) Genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of human cytochrome P4501A2. *European Journal of Pharmacology – Environmental Toxicology and Pharmacology Section* **228**: 95-102.
- Wölfel, C., Platt, K.-W., Dogra, S., Glatt, H., Wächter, F., Döhmer, J. (1992) Stable Expression of Rat Cytochrome P4501A2 cDNA and Hydroxylation of 17 $\beta$ -Estradiol and 2-Aminofluorene in V79 Chinese Hamster Cells. *Molecular Carcinogenesis* **4**: 489-498.
- Wohlleb, J. C., Hunter, C. F., Blass, B., Kadlubar, F. F., Chu, D. Z., Lang, N. P. (1990) Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer : environmental and demographic associations. *Int. J. Cancer* **46**: 22-30.
- Woolhouse, N.M., Qureshi, M.M., and Bayoumi, R.A. (1997) A new mutation C759T in the polymorphic *N*-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* **7**: 83-84.
- Yamamura, E., Sayama, M., Kakikawa, M. Mori, M., Taketo, A., Kodaira K. (2000) Purification and biochemical properties of an *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**: 10-16.
- Yamazaki, H., Inui, Y., Wrighton, S. A., Guengerich, F. P., Shimada, T. (1995) Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes. *Carcinogenesis* **16(9)**: 2167-2170.

---

Zhu, Y., Doll, M.A. and Hein, D.W. (2002) Functional genomics of C190T single nucleotide polymorphism in human *N*-acetyltransferase 2. *Biol. Chem.* **383**: 983-987.