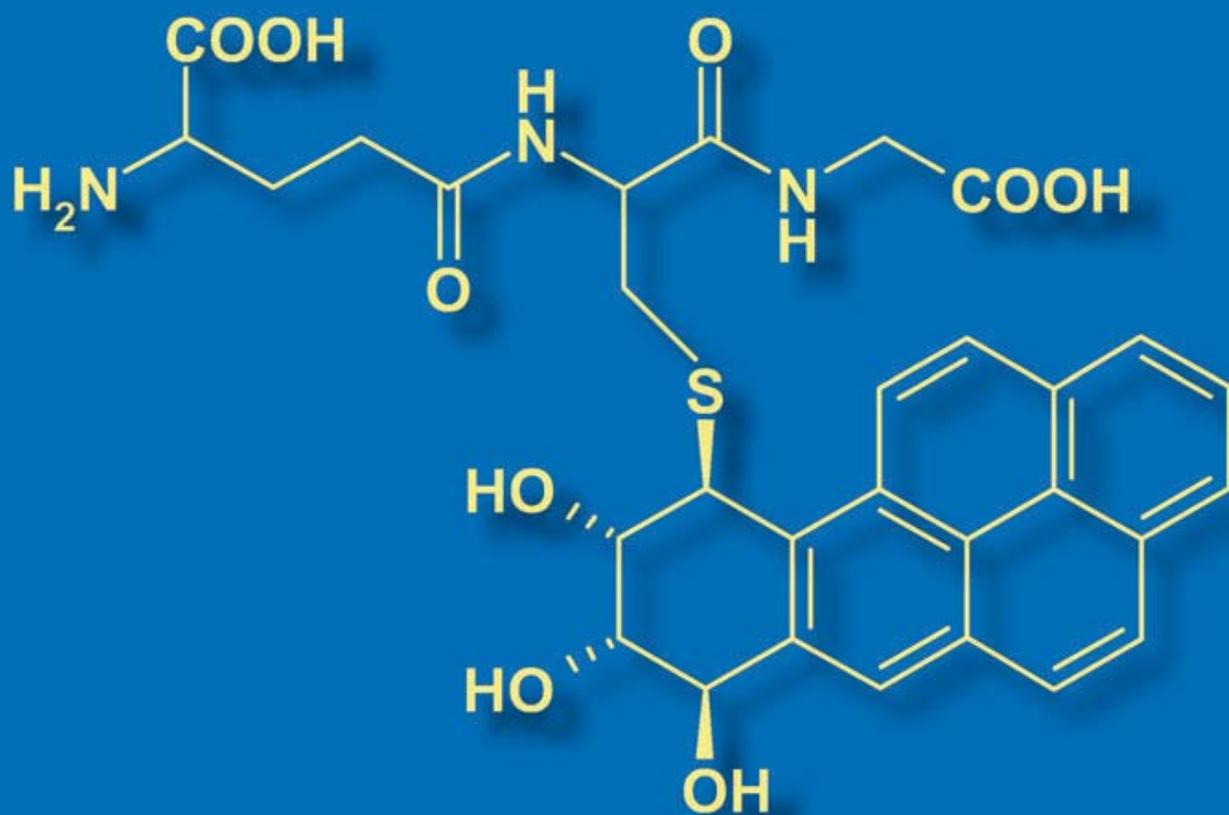


Andrea John

Biomarker lebensmittel- und umweltrelevanter Xenobiotika

Analytik von Glutathionkonjugaten
und Mercaptursäuren



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



**Biomarker lebensmittel- und umweltrelevanter Xenobiotika –
Analytik von Glutathionkonjugaten und Mercaptursäuren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Andrea John

aus Hamburg

Potsdam, Januar 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010

Zugl.: Potsdam, Univ., Diss., 2010

978-3-86955-442-6

Gutachter:

1. Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Universität Potsdam
2. Prof. Dr. Edmund Maser, Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Kiel
3. Prof. Dr. Walther Honscha, Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Universität Leipzig

Tag der Disputation am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke:

06. Juli 2010

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-442-6

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Chemische Kanzerogenese und Fremdstoffmetabolismus.....	1
1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	2
1.3 Niedermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe	6
1.4 Glutathionkonjugation und Mercaptursäurebildung	7
1.5 ABC-Transporter.....	8
1.6 Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus.....	9
1.7 Caco-2-Zellen.....	11
1.8 Massenspektrometrie.....	12
2 Zielsetzung	18
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Chemikalien	22
3.1.3 Referenzsubstanzen	23
3.1.4 Arbeitslösungen.....	23
3.2 Zellkultur.....	23
3.2.1 Kultivierung	23
3.2.2 Inkubationen von Caco-2-Zellen.....	24
3.2.3 Induktion des Fremdstoffmetabolismus.....	24
3.2.4 Inhibierung von Transportproteinen.....	25
3.3 Methodvalidierung	25
3.4 Bestimmung von BPD-SG-Konjugaten	27
3.5 Bestimmung von DBPD-SG-Konjugaten	30
3.6 Bestimmung von BcPheD-SG-Konjugaten.....	32
3.7 Bestimmung von DB[a,l]P-Metaboliten	34
3.8 Bestimmung von B[a]P-Metaboliten	36
3.9 Bestimmung von B[c]Phe-Metaboliten.....	38
3.10 Bestimmung von Mercaptursäuren	40
3.11 Statistik.....	42

4	Ergebnisse	43
4.1	Glutathion-Analytik mittels LC-MS/MS	43
4.2	Benzo[<i>a</i>]pyren	45
4.2.1	BPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	45
4.2.1.1	Qualitativer Nachweis von BPD-SG	46
4.2.1.2	Quantitative Bestimmung von BPD-SG	47
4.2.1.3	Bildung der BPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	54
4.2.1.4	Induktion des Transportes der BPD-SG-Konjugate	57
4.2.1.5	Inhibition des Transportes der BPD-SG-Konjugate	59
4.2.1.6	Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BPDE	60
4.2.2	Bestimmung von B[<i>a</i>]P-Metaboliten mittels HPLC-FL	62
4.2.2.1	Bildung der B[<i>a</i>]P-Metaboliten und Transport ins Medium	62
4.2.2.2	Induktion des Transportes der B[<i>a</i>]P-Metaboliten	64
4.2.2.3	Qualitativer Nachweis von BPD-SG-Konjugaten	66
4.3	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyren	66
4.3.1	DBPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	66
4.3.1.1	Qualitativer Nachweis von DBPD-SG	66
4.3.1.2	Quantitative Bestimmung von DBPD-SG	67
4.3.1.3	DBPD-SG-Bildung aus <i>syn</i> -DBPDE	68
4.3.1.4	Bildung der DBPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	69
4.3.1.5	Transport der DBPD-SG-Konjugate im Transwell TM -System	71
4.3.2	Bestimmung von DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten mittels HPLC-UV	73
4.3.2.1	Konjugationsformen der vorliegenden Metaboliten	74
4.3.2.2	Bildung der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	75
4.3.2.3	Induktion des Transportes der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	76
4.3.2.4	Inhibition des Transportes der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	77
4.3.2.5	Qualitativer Nachweis von DBPD-SG-Konjugaten	78
4.4	Benzo[<i>c</i>]phenanthren	79
4.4.1	BcPheD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	79
4.4.1.1	Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG	79
4.4.1.2	Quantitative Bestimmung von BcPheD-SG	86
4.4.1.3	Bildung der BcPheD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	88
4.4.1.4	Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BcPheDE	89
4.4.2	Bestimmung von B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten mittels HPLC-UV	91
4.4.2.1	Bildung der B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten und Transport ins Medium	91
4.4.2.2	Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG-Konjugaten	93
4.5	Mercaptursäure-Analytik im Urin mittels LC-MS/MS	94
4.5.1	Bestimmung von Mercaptursäuren in Nichtraucher- und Raucher-Urinen	98

5	Diskussion	101
5.1	LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der GSH-Konjugate	101
5.2	LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der Mercaptursäuren	116
6	Zusammenfassung/Summary	120
7	Literaturverzeichnis	124
8	Abbildungsverzeichnis	135
9	Tabellenverzeichnis	137
10	Anhang	138

Abkürzungsverzeichnis

(-)- <i>anti</i> -BcPheDE	(-)- <i>anti</i> -3,4-Dihydroxy-1,2-epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(-)- <i>anti</i> -BPDE	(-)- <i>anti</i> -7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(-)- <i>anti</i> -DBPDE	(-)- <i>anti</i> -11,12-Dihydroxy-13,14-epoxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(+)- <i>anti</i> -BcPheDE	(+)- <i>anti</i> -3,4-Dihydroxy-1,2-epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(+)- <i>anti</i> -BPDE	(+)- <i>anti</i> -7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(+)- <i>anti</i> -DBPDE	(+)- <i>anti</i> -11,12-Dihydroxy-13,14-epoxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-DBPD-SG	14 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> -trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-DBPD-SG	14 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> -trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-BcPheD-SG	(+)-1 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-BcPheD-SG	(-)-1 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-BPD-SG	(-)-10 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-BPD-SG	(+)-10 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
[M - H] ⁻	Molekül-Ion - Wasserstoffatom
[M + H] ⁺	Molekül-Ion + Wasserstoffatom
11,12-Diol-DB[<i>a,l</i>]P	<i>trans</i> -11,12-Dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
1-MP-SG	1-Methylpyrenylglutathion
1-OH-B[<i>a</i>]P	1-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
1-OH-B[<i>c</i>]Phe	1-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
2-OH-B[<i>c</i>]Phe	2-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
3,4-Diol-B[<i>c</i>]Phe	<i>trans</i> -3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
3-OH-B[<i>a</i>]P	3-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
3-OH-B[<i>c</i>]Phe	3-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
4,5-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren
4-OH-B[<i>c</i>]Phe	4-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
5,6-Diol-B[<i>c</i>]Phe	<i>trans</i> -5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
7,8-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren
7-OH-B[<i>a</i>]P	7-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
7-OH-DB[<i>a,l</i>]P	7-Hydroxydibenzo[<i>a,l</i>]pyren
8,9-Diol-DB[<i>a,l</i>]P	<i>trans</i> -8,9-Dihydroxy-8,9-dihydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
9,10-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -9,10-Dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren

9-OH-B[a]P	9-Hydroxybenzo[a]pyren
AhR	<i>Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor</i>
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]Phe	Benzo[c]phenanthren
B[k]F	Benzo[k]fluoranthren
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BHT	Butylhydroxytoluol
BIU	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
C18	<i>Octadecyl-</i>
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i> (Kollisions-induzierte Dissoziation)
CNL	<i>Constant Neutral Loss-Modus</i>
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DAU	<i>Daughter Scan-Modus</i>
DB[a,l]P	Dibenzo[a,l]pyren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI-/ESI+	<i>Electrospray Ionisation</i> , negativer beziehungsweise positiver Modus
GSH	Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin)
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-FL	HPLC mit Fluoreszenz-Detektion
HPLC-UV	HPLC mit Ultraviolett-Detektion
ISTD	Interner Standard
kV	kVolt
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
M	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MA	Mercaptursäure
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MeOH	Methanol
MK571	(<i>E</i>)-3-[[[3-[2-(7-Chloro-2-quinolinyl)ethenyl]phenyl]-[[3-dimethylamino)-3-oxopropyl]thio]methyl]thio]-propansäure, Natrium Salz
MRP	<i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze
Nrf2	<i>NF-E2 related factor 2</i> (Transkriptionsfaktor)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAR	<i>Parent Scan</i> -Modus
PER	Perylen
ppb	<i>parts per billion</i>
psi	<i>pound per square inch</i>
Q0, Q1, Q2, Q3	Quadrupole des Massenspektrometers
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
S/N	<i>signal to noise ratio</i> (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
S-BMA	<i>S-Benzylmercaptursäure</i>
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> -Modus
SG	<i>S-Glutathionyl-Rest</i>
S-NMA	<i>S-Naphthylmercaptursäure</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion)
S-PMA	<i>S-Phenylmercaptursäure</i>
S-PMA-d ₅	<i>S-Phenylmercaptursäure-d₅</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> -Modus
Tetrol-B[a]P	7,10/8,9-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren
Tetrol-B[c]Phe	1,4/2,3-Tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[c]phenanthren
Tetrol-DB[a,l]P	11,13,14/12-Tetrahydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[a,l]pyren
TSQ	<i>Triple Stage</i> Quadrupol
V	Volt
v/v	Volumenprozent zu Volumenprozent
VK	Variationskoeffizient
VOC	<i>volatile organic compounds</i> (flüchtige organische Verbindungen)

1 Einleitung

1.1 Chemische Kanzerogenese und Fremdstoffmetabolismus

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der sich in Initiation, Promotion und Progression unterteilt. Sowohl genetische Faktoren als auch krebserregende Einflüsse chemischer, physikalischer oder biologischer Natur gelten als Risikofaktoren für diesen Prozess. Neben den bekannten chemischen Kanzerogenen wie Bestandteilen des Tabakrauches können selbst Medikamente oder Lebensmittel kanzerogen wirkende Substanzen enthalten. Aus physikalischer Sicht ist beispielsweise UV-Licht als potentielle Gefahrenquelle anzuführen, während Onkoviren zu den biologischen Risikofaktoren für eine Krebsentstehung zählen. Eine Schädigung der DNA stellt den ersten Schritt der Kanzerogenese dar, deren weitere Schritte zur Bildung von Tumoren führen können.

Die genotoxische Wirkung kanzerogener Substanzen wie polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) beruht auf ihrer Fähigkeit, mit der DNA zu reagieren und hierbei DNA-Schädigungen auszulösen. Diese Fähigkeit erhalten die meisten Kanzerogene jedoch erst nach einer metabolischen Aktivierung während des sogenannten Fremdstoffmetabolismus. Dieser Prozess beinhaltet eine Abfolge chemischer Reaktionen im Körper, die lipophile Fremdstoffe in hydrophilere Metaboliten umwandeln und auf diesem Wege eine Ausscheidung der Fremdstoffe ermöglichen. Hierbei lassen sich zwei Phasen unterscheiden: Der Phase-I-Metabolismus wandelt apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe um und führt dabei funktionelle Gruppen ein oder aber demaskiert vorhandene Gruppen. Anschließend können Enzyme des Phase-II-Metabolismus Konjugationsreaktionen des vor- oder umfunktionalisierten Fremdstoffes mit endogenen, hydrophilen Molekülen katalysieren. Dieser Schritt erhöht die Wasserlöslichkeit des Fremdstoffes und fördert seine Exkretion über Leber und Niere. Verantwortlich für die Phase-I-Reaktionen sind die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs), welche membrangebundene Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellen. Es sind mehr als 1000 unterschiedliche CYP-Enzyme bekannt (Anzenbacher und Anzenbacherova 2001), was auf deren große Bedeutung im Zellstoffwechsel bei Eukaryoten und auch Prokaryoten hindeutet.

Die Aminosäurezusammensetzung der CYPs bestimmt deren Nomenklatur, wobei eine Identität der Aminosäuren von mehr als 40 Prozent die Enzyme in dieselbe Familie (zum Beispiel 1, 2, 3) und von größer als 50 Prozent in dieselbe Subfamilie (zum Beispiel A, B, C) einteilt. Eukaryotische Formen werden mit Familiennummern kleiner als 100 gekennzeichnet, prokaryotische Formen besitzen Familiennummern größer als 100. Das humane Genom umfasst 18 Familien, die sich in 43 Subfamilien mit 57 aktiven Genen klassifizieren (Guengerich 2004; Nelson 2009). Die CYPs verfügen über eine sehr breite Substratspezifität, die teilweise zusätzlich überlappend ist. Darüber hinaus sind die CYPs auch durch eine Vielzahl von Substraten induzierbar. Planare, lipophile Substanzen wie PAK induzieren zum Beispiel CYP1A1, 1A2 und 1B1.

Der Begriff „Monooxygenase“ basiert auf der Einführung eines Sauerstoffatoms in das Substratmolekül. Bei dieser von den CYPs katalysierten Reaktion wird das zweite Sauerstoffatom des Sauerstoffmoleküls zu Wasser reduziert.

Das Vorkommen der CYPs verteilt sich auf den Gastrointestinaltrakt (Ösophagus, Magen, Duodenum und Kolon), den Respirationstrakt (nasale Mukosa, Lunge), die Leber als wichtigstes Entgiftungsorgan sowie die Nebennieren, die Ovarien und die Plazenta. Nach Lin *et al.* (1999) verfügt die Leber über die höchsten CYP-Gehalte. Andere Organe wie zum Beispiel der Dünndarm sind jedoch auch an der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt.

Die Metabolisierung muss allerdings nicht in allen Fällen zu einer Detoxifizierung von giftigen Fremdstoffen führen, sondern kann auch eine chemische Aktivierung von Kanzerogenen zu reaktiven Metaboliten zur Folge haben. Solche genotoxischen Metaboliten können mit Proteinen und der DNA Addukte bilden. Die Addukte können im Anschluss über DNA-Mutationen und Aktivierung von Onkogenen mit gleichzeitiger Unterdrückung von Tumorsuppressor-Genen die Entstehung eines Tumors begünstigen (Abb. 1).

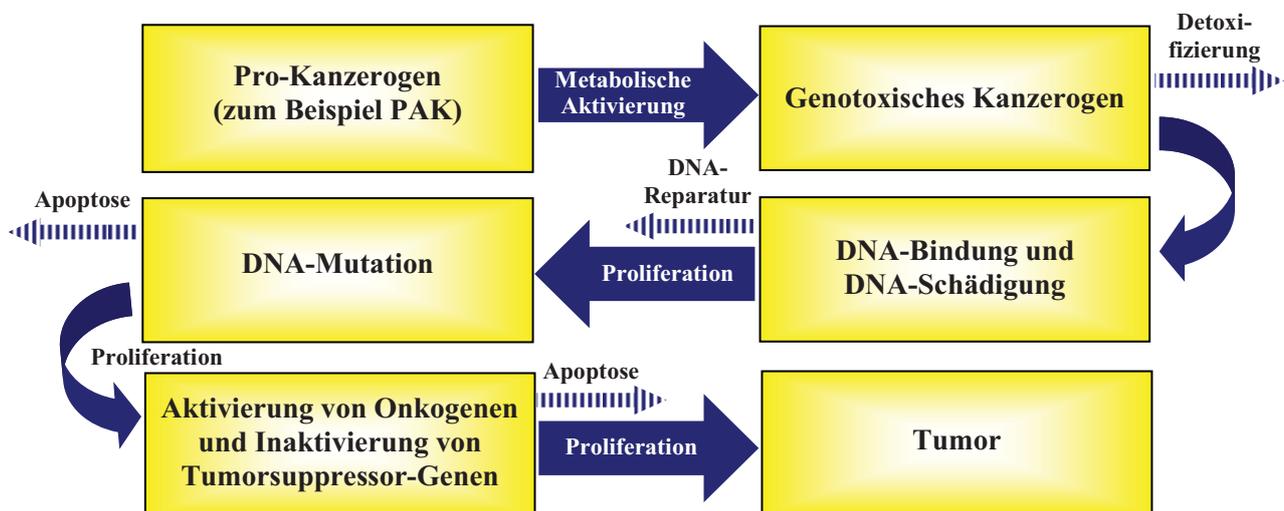


Abbildung 1: Mechanismus der chemischen Kanzerogenese (verändert nach Hengstler 2008)

Zur Bestimmung der metabolischen Prozesse werden sogenannte Biomarker im Rahmen eines Überwachungssystems (Biomonitoring) eingesetzt. Dabei repräsentieren Biomarker Indikatoren für Belastungen, die zum Beispiel aus der Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen resultieren. Die Messung dieser Biomarker gibt unter anderem Auskunft über den Grad einer Detoxifizierung, wie sie meist bei der Bildung von Glutathionkonjugaten und Mercaptursäuren einhergeht.

1.2 Polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Die PAK stellen eine mehrere Hundert Einzelsubstanzen umfassende Stoffgruppe dar, deren Mitglieder aus mindestens zwei kondensierten Benzolringen bestehen. Der einfachste Vertreter ist das zwei Benzolringe umfassende Naphthalin. Die PAK sind meist neutrale,

unpolare Feststoffe, die eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen und mit steigender Anzahl an Ringen schwerer flüchtig und weniger wasserlöslich werden. Der bekannteste Vertreter der PAK ist das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), welches eine der am längsten beschriebenen kanzerogenen Substanzen repräsentiert. Des Weiteren dient es als Leitsubstanz für die Abschätzung der in einer Matrix insgesamt enthaltenen Menge an PAK.

Die Entstehung der PAK erfolgt beim unvollständigen Verbrennen (Pyrolyse) und beim Erhitzen von organischem Material unter Luftabschluss, wobei stets PAK-Gemische gebildet werden. Die Hauptquellen für PAK stellen Tabakrauch sowie Mineralöle und deren Folgeprodukte dar. In die Atmosphäre gelangen PAK zudem durch die Emission aus Müllverbrennungsanlagen und dem Kraftfahrzeugverkehr. Dieser Vorgang hat die ubiquitäre Verbreitung der PAK in der Luft und im Boden zur Folge, wodurch es wiederum zur Aufnahme dieser Stoffe durch Nutzpflanzen kommen kann. Der Räucherungsprozess für bestimmte Lebensmittel wie Fleisch- und Fischprodukte in einem rußhaltigen Heißrauch führt zur Anreicherung der PAK in der jeweiligen Nahrung. Der in der EU-Verordnung 208/2005 angegebene aktuelle Grenzwert für die PAK-Leitsubstanz B[*a*]P beträgt für Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie für Räucherfisch jeweils 5 µg/kg Lebensmittel (EG-Verordnung 208/2005 vom 4. Februar 2005). Weitere Höchstgehalte bestehen gemäß dieser Verordnung für Öle und Fette (2 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel), Babynahrung (1 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel) und Schalentiere (10 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel). Einen zusätzlichen lebensmittelrelevanten Entstehungsprozess für PAK stellt das Grillen von Fleisch dar. Hierbei entstehen je nach Fettanteil des Grillguts sowie der verwendeten Grilltechnik unterschiedlich hohe PAK-Anteile im für den Verzehr bestimmten Fleisch. Bei Fleisch mit hohem Fettgehalt ist durch Pyrolysevorgänge vom in die Holzkohle herabtropfenden Fett eine höhere Kontamination mit PAK zu erwarten als bei magerem Fleisch.

Die Hauptaufnahmekanäle für PAK basieren gegenwärtig auf Lebensmitteln mit prozentual hohem Verzehranteil wie pflanzliche Fette und Öle, Obst und Gemüse sowie Getreideprodukte. Bei Rauchern kommt je nach Höhe des täglichen Zigarettenkonsums eine zusätzliche PAK-Aufnahmekanäle hinzu. Neben der oralen und inhalativen Aufnahme von PAK kommt auch der dermalen Aufnahme eine Bedeutung zu, da PAK aufgrund ihrer Lipophilie gut durch die Lipoproteinschichten der Haut diffundieren können.

Während die akute Toxizität der PAK gering ist, stellen die Langzeitwirkungen eine wesentlich höhere Gefahr dar. So wirken verschiedene PAK kanzerogen, mutagen und reproduktionstoxisch. Eine kanzerogene Wirkung haben vor allem PAK, die aus vier oder mehr Benzolringen aufgebaut sind. Bei nicht linearer Anellierung mehrerer Benzolringe entstehen Bay- und Fjord-Region-PAK (Abb. 2). Vicinale Dihydrodiolepoxide mit einem Oxiranring in einer Bay- oder Fjord-Region sind sehr reaktiv gegenüber DNA. Die räumliche Anordnung des Oxiranrings erschwert eine Interaktion mit detoxifizierenden Enzymen.

Es existieren Einteilungen von PAK in Klassifikationsgruppen, die als erwiesenermaßen (Gruppe 1), wahrscheinlich (Gruppe 2A) oder möglicherweise krebserregend (Gruppe 2B) für den Menschen beurteilt werden (International Agency for Research on Cancer (IARC) 2008).

In Abbildung 2 ist stellvertretend für jede Gefahrengruppe ein PAK-Molekül dargestellt: B[a]P gehört der Gruppe 1 an, während Dibenzo[*a,l*]pyren (DB[*a,l*]P) in die Gruppe 2A und Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]Phe) in die Gruppe 2B eingeordnet ist. Darüber hinaus existieren Untersuchungen, die dem DB[*a,l*]P die stärkste kanzerogene Wirkung in der Klasse der PAK zusprechen (Devanesan *et al.* 1990; Jacob *et al.* 1999; Luch 2009). Aufgrund der sterischen Hinderung der Fjord-Region-Dihydrodiolepoide gehört das 11,12-Dihydroxy-11,12-dihydro-13,14-epoxydibenzo[*a,l*]pyren (DBPDE) zu den potentesten ultimalen Kanzerogenen der PAK (Jacob *et al.* 1999).

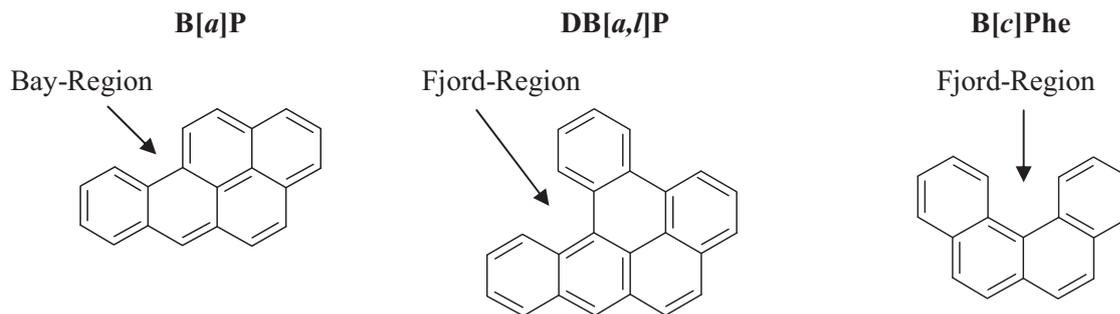


Abbildung 2: Strukturformeln der PAK B[a]P, DB[*a,l*]P und B[*c*]Phe

Bei Vorliegen der PAK in unveränderter Form besteht keine Kanzerogenität, sondern es ist eine metabolische Aktivierung zur Ausbildung der kanzerogenen Wirkung erforderlich. Folglich sind PAK pro-kanzerogen, da sie erst durch bestimmte enzymatische Reaktionen ihr kanzerogenes Potential entwickeln. Die Aktivierung des Pro-Kanzerogens B[a]P wurde schon von den Arbeitsgruppen Jerina (Thakker *et al.* 1977) und Conney (Conney 1982) beschrieben. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die im Körper durch die enzymatische Metabolisierung von B[a]P entstehenden unterschiedlichen Metaboliten wie Phenole, Dihydrodiole, sehr reaktive Dihydrodiolepoide und überwiegend detoxifizierte Konjugate (Glutathionkonjugate, Glucuronide, Sulfate) sowie Tetrole und weist außerdem auf die Bildung von DNA-Addukten hin. Bei den Konjugationsreaktionen sind nukleophile Metaboliten, wie hydroxylierte Verbindungen, potentielle Substrate für Sulfotransferasen (SULT) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT). Elektrophile Metaboliten, wie Epoxide und Chinone, können durch Glutathion-*S*-Transferasen (GST) konjugiert werden.

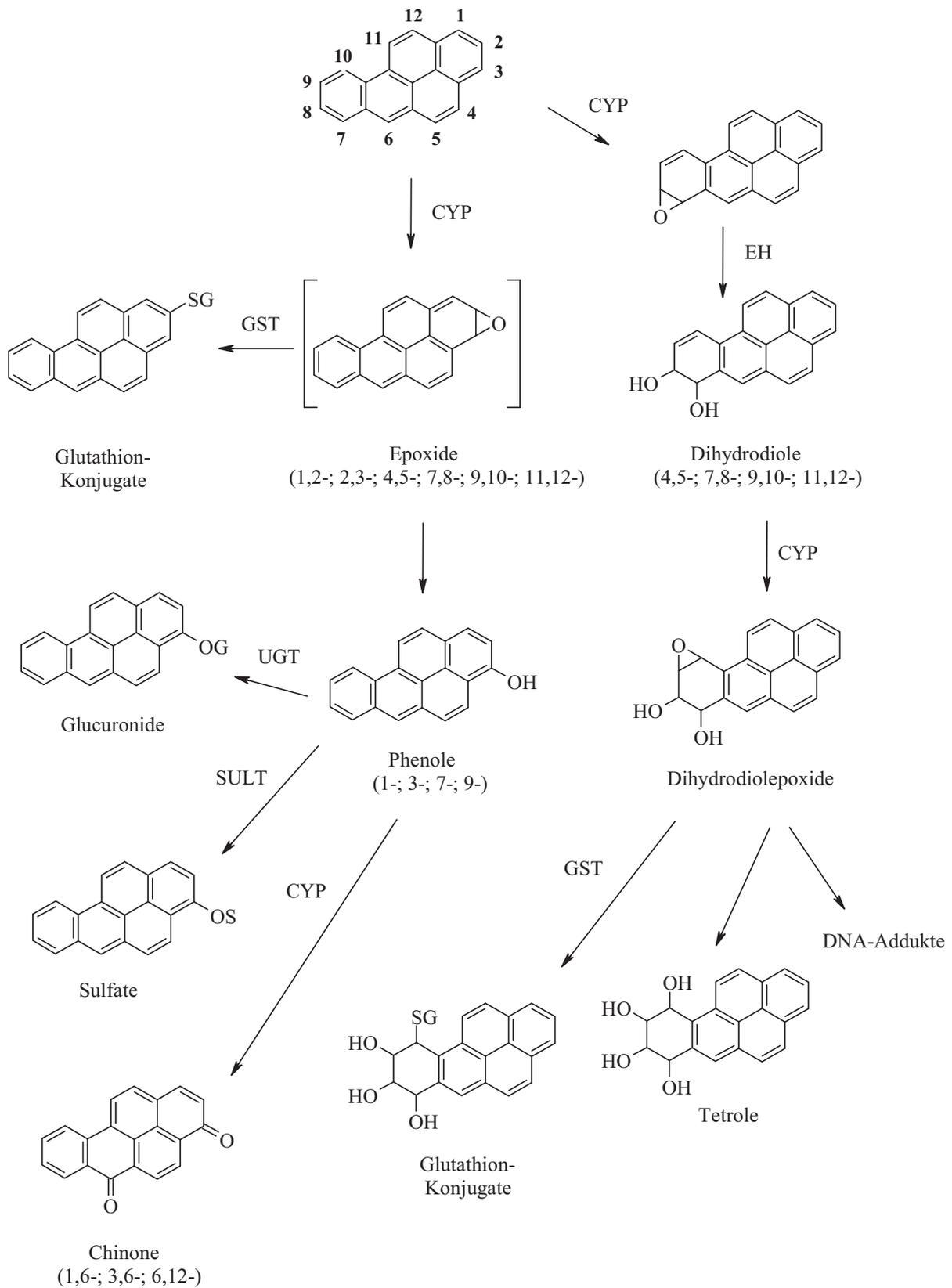


Abbildung 3: Ausgewählte Metabolisierungswege des B[a]P, verändert nach Nau, Steinberg, Kietzmann (2003). -SG: Glutathionrest, -OG: Glucuronidrest, -OS: Sulfatrest, EH: Epoxidhydrolase, GST: Glutathion-S-Transferase, SULT: Sulfotransferase, UGT: UDP-Glucuronosyltransferasen. Die absolute Stereochemie ist nicht aufgeführt.

1.3 Niedermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe

Neben der PAK-Exposition beruht ein weiteres kanzerogenes Potential auf einer Umweltbelastung mit niedermolekularen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit nur einem Ringsystem. Beispiele dieser Stoffklasse sind Benzol und Toluol, die neben Ethylbenzol und Xylol zur sogenannten BTEX-Gruppe gehören. Während Benzol ein nicht-alkylierter Vertreter der BTEX-Gruppe ist, handelt es sich bei Toluol um einen alkylierten Vertreter. Diese Substanzen werden auch zu den flüchtigen organischen Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOC) gezählt, treten ubiquitär auf und sind natürlichen oder anthropogenen Ursprungs (Cantor 1997; Churchill *et al.* 2001; Schnatter *et al.* 2005). Sie werden zum Beispiel im Straßenverkehr, über den Tabakrauch oder als Lösungsmittel freigesetzt. Toluol lässt sich in Farben, Lacken und Klebstoffen nachweisen.

Die VOC repräsentieren eine allgemeine Gesundheitsgefahr, da chronische Belastungen mit einzelnen Substanzen ein Risiko der Krebsentstehung bergen. Die IARC klassifiziert beispielsweise Benzol in die Gruppe 1 der Stoffe mit erwiesenermaßen krebserregender Wirkung beim Menschen (IARC 1987). Die Aufnahme der VOC erfolgt mittels Inhalation, über die Nahrung oder durch Hautkontakt, wobei insbesondere mit dem Zigarettenrauch hohe Mengen dieser Substanzen (im μg -Bereich pro Zigarette) eingeatmet werden (Brunnemann *et al.* 1989; Byrd *et al.* 1990; Darrall *et al.* 1998; Ding *et al.* 2009). Benzol und Toluol können im Körper im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus zu ihren korrespondierenden Mercaptursäuren umgesetzt werden (Abb. 4). Diese detoxifizierten Metaboliten werden anschließend mit dem Urin ausgeschieden.

Literaturdaten unterstreichen, dass die *S*-Phenylmercaptursäure (*S*-PMA) aufgrund ihrer Spezifität am besten als Biomarker für eine Benzolbelastung geeignet ist. Die Analytik der ebenfalls bei der Verstoffwechslung von Benzol entstehenden *trans,trans*-Muconsäure kann hingegen durch die gleichzeitige Aufnahme des Konservierungsstoffes Sorbinsäure beeinflusst werden (Boogaard und van Sittert 1995; Fustinoni *et al.* 2005). Die *S*-Benzylmercaptursäure (*S*-BMA) wurde zum ersten Mal von Takahashi *et al.* 1993 als ein Metabolit des Toluols beschrieben, der aus dem Benzylsulfat hervorgeht.

Ausgewählte Metabolisierungswege des Benzols sowie des Toluols sind in Abbildung 4 dargestellt. Neben der bereits beschriebenen Bildung der jeweiligen Mercaptursäure können ausgehend vom Benzol aus dem reaktiven Intermediat des Benzoloxids auch Phenol und über den Muconaldehyd die *trans,trans*-Muconsäure entstehen. Toluol bildet neben der *S*-BMA die Metaboliten Hippursäure (über die Zwischenstufen Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoessäure) sowie Kresol. Diese Stoffwechselprodukte sind jedoch bei geringer Toluolbelastung weniger gut als Biomarker geeignet als die *S*-BMA (Inoue *et al.* 2004).

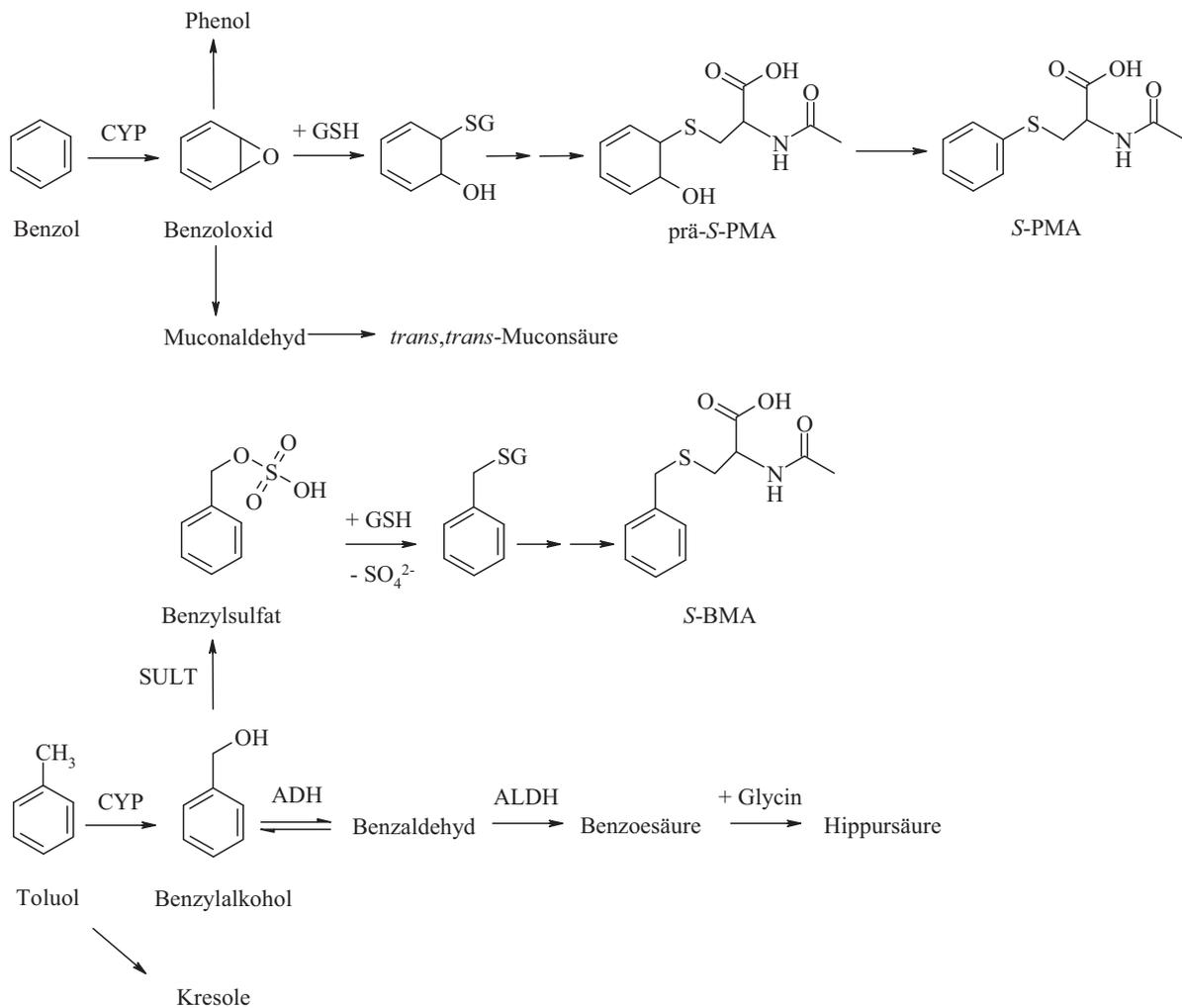


Abbildung 4: Ausgewählte Metabolisierungswege des Benzols sowie des Toluols, verändert nach Schettgen *et al.* (2008); ADH: Alkoholdehydrogenase, ALDH: Aldehyddehydrogenase

1.4 Glutathionkonjugation und Mercaptursäurebildung

Im Rahmen einer Konjugationsreaktion erfolgt eine Reaktion des Tripeptids Glutathion (GSH) mit elektrophilen Metaboliten, zu denen unter anderem PAK-Metaboliten wie Diolepoxide zählen. Dieser Schutzmechanismus der Zelle vor Elektrophilen läuft spontan ab, die Reaktion kann jedoch durch die Anwesenheit der Glutathion-S-Transferase (GST) deutlich gesteigert werden. Durch die Bildung von GSH-Konjugaten in der Zelle wird die GST-Aktivität inhibiert (Akerboom und Sies 1989), so dass der Transport, der Abbau und die Ausscheidung der Konjugate erforderlich werden. Der Transport der Glutathionkonjugate aus der Zelle geschieht über Plasmamembranproteine, zum Beispiel durch die *Multidrug Resistance-associated Proteins* (MRPs) (Zaman *et al.* 1995). Die GSH-Konjugate können in mehreren Schritten zum entsprechenden Cystein-Konjugat abgebaut werden (Abb. 5).

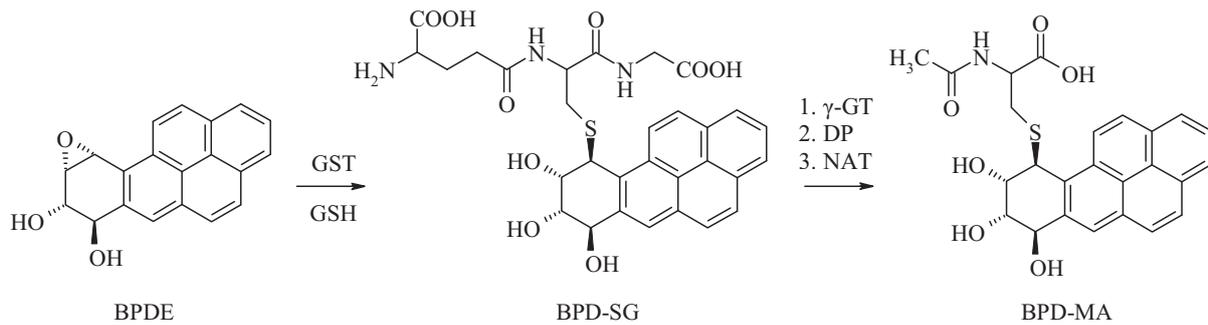


Abbildung 5: GSH-Konjugation und Mercaptursäurebildung: Ausgehend vom BPDE erfolgt durch GST-Katalyse eine GSH-Konjugation zum BPD-SG. Dieses wird durch die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und die Cysteinylglycindipeptidase (DP) zum Cysteinyl-Konjugat abgebaut und anschließend mittels Cystein-S-Konjugat *N*-Acetyltransferase (NAT) zur Mercaptursäure acetyliert (Monks *et al.* 1990; Monks und Lau 1990; Hinchman und Ballatori 1994).

Diese Reaktionen werden durch die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und die Cysteinylglycindipeptidase (DP) beziehungsweise Aminopeptidase M katalysiert. Im Anschluss daran kann das Cysteinylkonjugat durch die Cystein-S-Konjugat *N*-Acetyltransferase (NAT) zur Mercaptursäure acetyliert (Ding *et al.* 2009) oder aber durch die β -Lyase zum Sulfhydrylderivat des Fremdstoffes abgebaut werden. Beim Menschen sowie bei der Ratte erfolgt eine Ausscheidung der Glutathionkonjugate überwiegend in Form von Mercaptursäuren (Commandeur *et al.* 1995).

1.5 ABC-Transporter

Bei den *ATP-binding cassette* (ABC) Transportern handelt es sich um eine Familie von Membranproteinen, die über eine ATP-bindende Kasette verfügen und bestimmte Substrate unter ATP-Verbrauch durch eine Zellmembran transportieren können (Drewe und Krähenbühl 2000). Diese Superfamilie ist für den letzten Schritt der Detoxifizierung von PAK und weiteren Xenobiotika verantwortlich, wobei dieser Prozess gelegentlich auch als Phase-III-Metabolismus bezeichnet wird.

Während im Arzneimittelbereich ein Abtransport von Arzneistoffen vom Wirkort unerwünscht ist und durch eine Hemmung der Transporter verhindert werden soll, ist die Exkretion detoxifizierter Lebensmittelfremdstoffe ein erwünschter Metabolismusweg. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass ebenfalls in der Nahrung enthaltene Hemmstoffe den Transport von GSH-Konjugaten aus der Zelle ins Medium inhibieren. Hierbei wäre durch den Anstieg der GSH-Konjugat-Konzentration in der Zelle und einer sich anschließenden Produkthemmung der Glutathion-S-Transferase eine gesteigerte Bildung von DNA-Addukten möglich (Srivastava *et al.* 2002).

Es bestehen unterschiedliche Arten des Transportes. Beim elektrogenen Transport werden elektrische Ladungen verschoben, außerdem existieren der Transport unter ATP-Verbrauch sowie der Natrium-abhängige Transport.