

ANGEWANDTE CHEMIE

93. Jahrgang 1981

Heft 2

Seite 135–220

Giftung körperfremder Stoffe durch Konjugationsreaktionen

Von Dieter Reichert^[*]

Die Aufklärung der Stoffwechselwege von Fremdstoffen im Körper von Warmblütern trägt wesentlich zum Verständnis toxischer Wirkungen bei und ist daher elementarer Bestandteil jeder Risikoanalyse. Die Fülle der chemischen Reaktionen, die an den metabolischen Transformationen beteiligt sind, läßt vermuten, daß wir erst am Anfang einer Entwicklung stehen, die zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur, biochemischer Transformation und toxischen Effekten beitragen wird. Dies gilt insbesondere für die Konjugation von Fremdstoffen an körpereigene Moleküle. Nach früherer Ansicht führen diese Konjugationsreaktionen zu chemisch und biologisch inerten Produkten, die vom Organismus gut eliminiert werden können. Aufgrund von Ergebnissen, die mit neuen biologischen Testverfahren und empfindlichen Analysemethoden erhalten wurden, muß diese Annahme revidiert werden: Durch die chemischen Wechselwirkungen von Fremdstoffen mit körpereigenen Substraten können auch hochtoxische, mutagene und carcinogene Produkte entstehen.

1. Einleitung

Der menschliche Organismus ist einer ständig steigenden Anzahl von Fremdstoffen ausgesetzt. Dazu gehören Pestizide, Lösungsmittel, Arbeitsstoffe, Arzneimittel, Nahrungsbeimengungen wie Geruchs- und Geschmacksstoffe, Stabilisatoren, Antioxidantien und viele andere mehr. Diese Stoffe sind von äußerst unterschiedlicher chemischer Struktur. Einige werden unverändert in Harn, Faeces oder Atemluft ausgeschieden und verursachen im Körper auch häufig keine Wirkung, d. h. sie sind biologisch inaktiv. Meist werden Fremdstoffe jedoch im Organismus durch körpereigene unspezifische Enzyme, die „fremdstoffmetabolisierenden Enzyme“, chemisch verändert. Diese metabolischen Umwandlungen legen oft erst das toxikologische oder pharmakologische Profil der Fremdstoffe fest. Je nach Art der metabolischen Transformation und der chemischen Struktur des Fremdstoffes entstehen ungiftige und gut eliminierbare Produkte oder biologisch aktive (akut toxische, mutagene und/oder carcinogene) Intermediate^[1,2].

Die Risikobeurteilung von Fremdstoffen beginnt mit der Betrachtung der chemischen Reaktivität und mit Metabolismusstudien. Dabei gilt es vor allem, Reaktionswege zu erkennen und die nachgewiesenen Metaboliten auf ihre biologische Aktivität zu prüfen. Der Nachweis immer neuer Stoffwechselwege und Metaboliten verdeutlicht den raschen Fortschritt auf diesem Gebiet^[3].

Am Beispiel der Konjugationsreaktionen, bei denen körpereigene Substanzen an funktionelle Gruppen von Fremdstoffen angeheftet werden, soll die Komplexität der biochemischen Veränderungen erläutert werden, die schließlich zur Giftung oder Entgiftung von körperfremden Stoffen führen.

2. Metabolische Veränderungen von Fremdstoffen im Organismus

Die metabolischen Veränderungen oder Biotransformationen verlaufen generell in zwei Phasen (Abb. 1): In Phase I wird eine lipophile Substanz durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionalisiert. Diese Reaktionen werden durch Monooxygenasen, Reduktasen bzw. Hydrolasen katalysiert. In der anschließenden Phase II findet eine Konjuga-

[*] Priv.-Doz. Dr. D. Reichert
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Versbacher Straße 9, D-8700 Würzburg

tionsreaktion statt (bei Fremdstoffen mit funktionellen Gruppen kann Phase I übersprungen werden). Dabei wird durch eine Transferase eine körpereigene Substanz, z. B. Glucuronsäure, mit einer funktionellen Gruppe des Fremdstoffmoleküls verknüpft. Der Fremdstoff wird dadurch stärker polar, besser eliminierbar und im allgemeinen weniger toxisch. Die Reaktionsfolge ist in Abbildung 2 erläutert: Ein aromatisches oder aliphatisches Molekül wird funktionaliert (hier durch Oxidation) und mit der funktionellen Gruppe (hier OH) an eine körpereigene Substanz gehestet^[3-5].

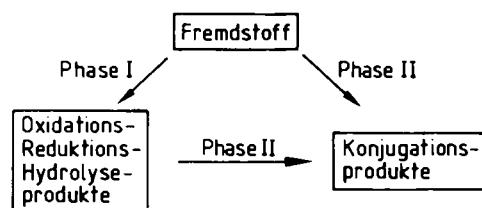


Abb. 1. Schema der Biotransformation körperfremder Stoffe.

Eine Aktivierung (Giftung) von Fremdstoffen durch metabolische Veränderung wurde zuerst an einigen Oxidationsreaktionen nachgewiesen, z. B. an Benzpyren und Dimethylnitrosamin und in den letzten Jahren an Vinylchlorid; erst die Oxidationsprodukte dieser Stoffe wirken mutagen und carcinogen^[6]. Die Oxidationsprodukte des vielfach verwendeten Analgetikums Paracetamol oder des Diureticums Furosemid

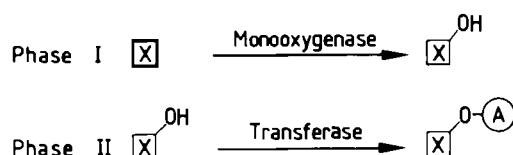


Abb. 2. Schema einer „funktionalisierenden“ Reaktion mit anschließender Konjugation.

werden als Ursache für Lebernekrosen angesehen^[7]. Die bisher bekannten Phase-II-Reaktionen vermindern jedoch oft toxische oder pharmakologische Effekte, indem sie die Konzentration des wirksamen Stoffes erniedrigen. Daraus schloß man, daß die Konjugationsreaktionen im Gegensatz zu den oxidativen Prozessen entgiftende Reaktionen sind. Diese Annahme kann heute nicht mehr ohne Einschränkung gelten, denn neuere Untersuchungen zeigen, daß die gebildeten Konjugate keineswegs immer so unschädlich sind, wie ursprünglich vermutet wurde. Vor allem die Anwendung biologischer Testverfahren hat zu neuen, unerwarteten Erkenntnissen über die Bedeutung der Konjugationsreaktionen für die Entgiftung und Giftung körperfremder Stoffe geführt.

3. Nachweis toxischer Metaboliten

Metabolismusstudien können dazu beitragen, die Ursachen der Toxizität körperfremder Stoffe aufzuklären. Eine der größten Schwierigkeiten ist dabei, die reaktiven und damit vermutlich toxischen Metaboliten zweifelsfrei nachzuweisen. Oft ist der Nachweis wegen der hohen Reaktionsbereitschaft und der kurzen Halbwertszeit der Intermediate nur indirekt möglich. In den letzten Jahren hat sich eine Reihe von in-vitro-Testverfahren etabliert, die hauptsächlich auf

dem Nachweis einer Schädigung der DNA in Bakterien oder Säugetierzellen beruhen. Nur die wesentlichen Verfahren sollen kurz charakterisiert werden.

3.1. Nachweis durch kovalente Bindung an Makromoleküle

Reaktive Intermediate können durch kovalente Bindung an Makromoleküle wie Proteine, DNA oder RNA nachgewiesen werden^[1,8]. Die Bindung eines radioaktiv markierten Fremdstoffes an derartige Makromoleküle in einem in-vitro-Ansatz ist ein Haupttest zum Nachweis reaktiver Intermediate. Durch Positionsvariation der Markierung im Fremdstoffmolekül lässt sich herausfinden, welcher Teil kovalent gebunden wird. Inkubation des Ansatzes mit entsprechenden Transferasen und Cosubstrat geben zusätzlich Hinweise auf Strukturmerkmale des vermuteten genotoxischen Metaboliten.

3.2. Mutagenitätstests

Bei der Prüfung des mutagenen Potentials von Fremdstoffen (oder deren Metaboliten) untersucht man, ob sie Mutationen von Genen oder Chromosomen auslösen. Genmutationstests werden an mikrobiellen Systemen durchgeführt; chromosomal Schädigungen können auch an Kulturen menschlicher Zellen oder Zellen anderer Säugetiere studiert werden^[9-11].

3.2.1. Mikrobielle Tests

Das derzeit am meisten angewendete mikrobielle Testsystem zum Nachweis von Mutagenen und/oder Carcinogenen ist von Ames et al.^[12] entwickelt worden. Dabei werden Bakterienstämme von *Salmonella typhimurium* benutzt, die durch eine Punktmutation die Fähigkeit zur Synthese von Histidin verloren haben. Bei Zugabe einer mutagenen Substanz entstehen Rückmutanten, die wieder Histidin produzieren. Sie sind dann imstande, auf histidinfreien Nährböden Kolonien zu bilden. Diese Kolonien sind makroskopisch sichtbar; ihre Anzahl ist ein Hinweis auf die Anzahl der Rückmutanten und läßt Rückschlüsse auf die Intensität eines mutagenen Effektes zu. Der Ames-Test hat den Vorteil, daß unterschieden werden kann, ob ein Fremdstoff Basenpaar-Substitutions-Mutationen oder Frame-shift-Mutationen^[1] induziert. Im ersten Falle sind es meist alkylierende Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht, im zweiten Falle meist aromatische Stoffe mit zwei oder mehr Ringen. Ein weiteres Merkmal dieses Tests ist, daß die mutagenen Eigenschaften eines Fremdstoffes mit Enzymen unterschiedlicher Spezies und Gewebe geprüft werden können. Transferasen und Cosubstrat werden mit dem Fremdstoff den *Salmonella*-Stämmen zugesetzt und inkubiert. Auf diese Weise wurden viele reaktive, potentiell carcinogene Metaboliten von Fremdstoffen identifiziert^[13].

3.2.2. Zelltransformationstests

Zum Nachweis chemischer Carcinogene haben sich neben dem Ames-Test insbesondere Zelltransformationstests bewährt. Dabei werden Säugetierzellen (z. B. menschliche Fi-

[*] Bei Frame-shift-Mutationen findet Deletion oder Insertion eines Nucleotids in der DNA statt. Dadurch ergeben alle folgenden Triplets einen falschen Sinn.

broblasten, Leberzellen, Lymphocyten oder Hamsterembryozellen) isoliert und in einem Kulturmedium mit den Testsubstanzen zusammengebracht. Die Zellen können dann entweder für cytogenetische Studien fixiert und mikroskopisch untersucht werden (Chromosomen- und Genom-Mutationen), oder sie werden in ein Kulturmedium gebracht, in dem nur transformierte Zellen weiterwachsen können^[9, 10]. Die Anzahl der Kolonien ist dann ein Maß für den mutagenen Effekt. Wie beim Ames-Test können mit den Testsubstanzen auch mikrosomale Enzyme oder Transferasen zugegeben werden, um auch metabolische reaktive Produkte zu erfassen.

Als wesentliche Bereicherung hat sich der „Host-Mediated Assay“ erwiesen: Bakterien oder Säugetierzellen werden in ein Tier (meist intraperitoneal) implantiert, die Tiere werden mit der Testsubstanz behandelt, und die applizierten Zellen und deren Mutanten werden zurückgewonnen und gezählt. Der Vorteil liegt vor allem darin, daß Bildung und Transformation der reaktiven Intermediate im Wirtsorganismus selbst stattfinden^[14].

4. Wichtige Konjugationsreaktionen

Die beim Menschen wichtigen Konjugationsreaktionen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Quantitativ am bedeutendsten ist die Übertragung von Glucuronsäure auf körperfremde Stoffe. Diese „Glucuronidierung“ wird durch Glucuronyl-Transferasen vermittelt. Andere Transferasen übertragen Sulfat-, Acetyl-, Glutathion-, Glycin- oder Methylgruppen. Diese Enzyme sind entweder membrangebunden oder im Cytosol der Zelle gelöst (Tabelle 1). Konjugationsreaktionen erfordern im allgemeinen die Aufwendung von Stoffwechselenergie. Eine Ausnahme ist die Konjugation an Glu-

tathion: Diese Verbindung kann sowohl durch Vermittlung der Glutathion-Transferasen an Substrate gebunden werden als auch direkt mit genügend elektrophilen Partnern reagieren. Erniedrigung des Glutathiongehaltes und das Auftreten von Mercaptursäuren (*S*-substituierten *N*-Acetyl-Derivaten des Cysteins) im Harn beweisen eine Glutathionkonjugation und sind zugleich ein starker Hinweis auf elektrophile toxische Stoffwechselprodukte^[15].

Die Cyanid-Thiocyanat-Entgiftung ist in Tabelle 1 nicht eigens aufgeführt. Dabei wird das toxische Cyanid durch das Enzym Rhodanese in Thiocyanat umgewandelt. Als Schwefeldonor fungiert Thiosulfat. Diese Reaktion wird durch Gabe von Thiosulfat bei Blausäure-Vergiftungen schon lange therapeutisch genutzt.

Eine neue Konjugationsreaktion, die jetzt bei Mensch und Tier nachgewiesen wurde, ist die Bindung an Colamin (2-Aminoethanol). Stark elektrophile Intermediate können mit Phosphatidylethanolamin unter enzymatischer Abspaltung des Phosphatidylrestes reagieren. *N*-substituiertes Colamin ist als Metabolit von Halothan (2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan) und 1,1-Dichlorethylen sowohl im Blut als auch im Harn nachgewiesen worden^[16, 17]. Diese Reaktion ist als Inaktivierungsschritt anzusehen. Da Phosphatidylethanolamin im Organismus hauptsächlich als Bestandteil von Zellmembranen gebunden vorliegt, führt diese Reaktion jedoch

Tabelle 1. Wichtige Konjugationsreaktionen beim Menschen.

Konjugation	Enzyme	Subzelluläre Lokalisation	Funktionelle Gruppen
Glucuronidierung	Glucuronyl-Transferasen	Endoplasmatisches Reticulum	-OH, COOH, NH ₂ , NH, -SH
Sulfatierung	Sulfo-Transferasen	Cytosol	-OH, Aryl-NH ₂
Acetylierung	Acetyl-Transferasen	Cytosol	-NH ₂
Glutathion-Konjugation	Glutathion-Transferasen	Cytosol	- Halogen, Epoxide, NO ₂
Glycin-Konjugation	Acyl-Transferasen	Mitochondrien	-COOH
	Glycin-Transferasen	Mitochondrien + Cytosol	- COOH
Methylierung	Methyl-Transferasen	Endoplasmatisches Reticulum + Cytosol	Aryl-OH, -NH ₂ , NH, -N, SH

tendsten ist die Übertragung von Glucuronsäure auf körperfremde Stoffe. Diese „Glucuronidierung“ wird durch Glucuronyl-Transferasen vermittelt. Andere Transferasen übertragen Sulfat-, Acetyl-, Glutathion-, Glycin- oder Methylgruppen. Diese Enzyme sind entweder membrangebunden oder im Cytosol der Zelle gelöst (Tabelle 1). Konjugationsreaktionen erfordern im allgemeinen die Aufwendung von Stoffwechselenergie. Eine Ausnahme ist die Konjugation an Glu-

zu Membranschädigungen, durch die der hepatotoxische Effekt von 1,1-Dichlorethylen (1) erklärt werden kann^[17]. Der Stoffwechsel dieser carcinogenen Verbindung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die genannten Konjugationsreaktionen laufen auch im Organismus der meisten Säugetiere ab. Von einigen Tierspezies sind jedoch bemerkenswerte qualitative und quantitative Unterschiede^[18, 19] bekannt. So ist z. B. bei der Katze die Fä-

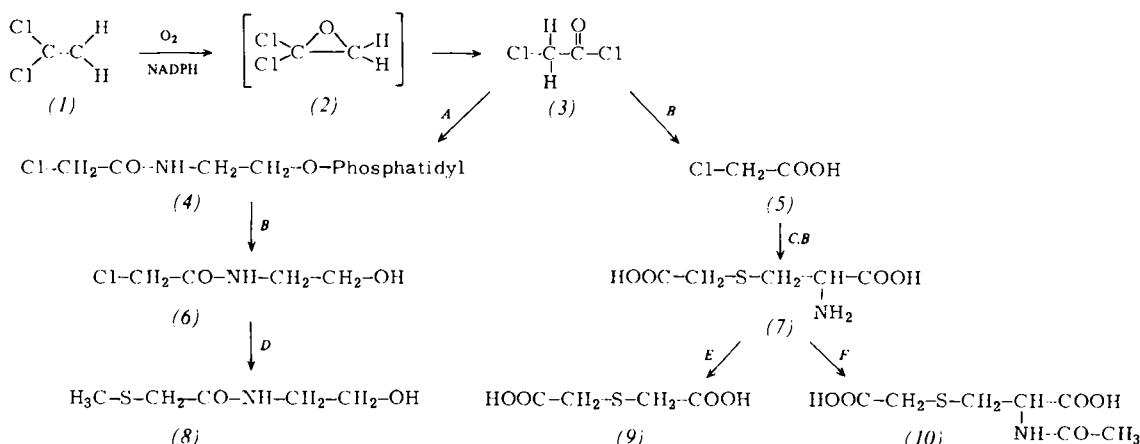


Abb. 3. Metabolismus von 1,1-Dichlorethylen (1). Identifiziert wurden die Metaboliten (5) sowie (8)–(10). A: Reaktion mit Phosphatidylethanolamin, B: Hydrolyse, C: Reaktion mit Glutathion, D: Reaktion mit Methionin, E: Desaminierung und Decarboxylierung, F: Acetylierung.

higkeit, Fremdstoffe zu glucuronidieren, stark eingeschränkt. Meerschweinchen bilden keine Mercaptursäuren, da das *S*-substituierte Cystein nicht *N*-acetyliert werden kann. Hunde können aromatische Amine und Hydrazine nicht acetylieren. Dem Menschen am nächsten in der Enzymausstattung kommen nichtmenschliche Primaten.

4.1. Aktivierung durch Glucuronidierung und Sulfatierung

Im menschlichen Organismus werden Glucuronidierungen sowohl an körpereigenen Stoffen (Steroiden, Thyroxin, Bilirubin, Serotonin und einigen Aminosäuren) als auch an körperfremden Stoffen durchgeführt. Glucuronsäure kann demnach an viele chemisch unterschiedliche Verbindungen enzymatisch konjugiert werden (Tabelle 1).

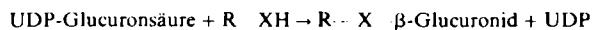
Die Bildungswege von Glucuronyl- und Sulfatverbindungen sind gut bekannt^[4]. Der erste Schritt der Biosynthese „aktivierter“ Glucuronsäure wird durch das Enzym UDPG-Pyrophosphorylase katalysiert (UDP = Uridin-5'-diphosphat, PP = Diphosphat):



Durch Dehydrogenierung von UDP-Glucose entsteht UDP-Glucuronsäure:



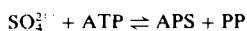
Die UDP-Glucuronsäure wird durch die UDP-Glucuronyltransferasen auf funktionelle Gruppen – XH übertragen:



Sulfo-Transferasen übertragen die Sulfatgruppe auf Hydroxy- und Aminogruppen (Tabelle 1). Die Sulfatierung von Fremdstoffen ist mit beträchtlichem Energieaufwand verbunden. Die folgenden Reaktionen verdeutlichen das: Sulfatdonor ist 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), das aus Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) entsteht:



APS wiederum wird aus Sulfat-Ionen und ATP gebildet:



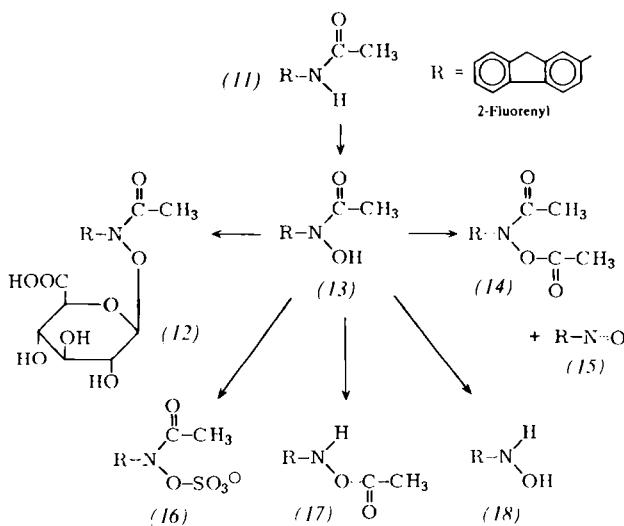
Schließlich übertragen die Sulfo-Transferasen die energiereiche Sulfatgruppe auf eine funktionelle Gruppe (meist OH) eines Fremdstoffes:



Die Tatsache, daß Konjugationsreaktionen auch zur Gifitung der aufgenommenen Substanz führen können, wurde zuerst am Beispiel der Glucuronidierung und Sulfatierung nachgewiesen^[6, 20, 21]. Als Modellsubstanz diente *N*-(2-Fluorenyl)acetamid (2-(*N*-Acetylamo)fluoren, AAF) (11). Diese Substanz ist für einige Tierspezies carcinogen, für andere nicht. Es gab nun Hinweise darauf, daß weder AAF (11) noch das Oxidationsprodukt *N*-Hydroxy-AAF (13) die carcinogen wirksamen Verbindungen sind; beide binden sich z. B. in entsprechenden Testsystemen nicht an DNA. Inkubiert

man ein solches System jedoch mit Sulfo-Transferase und Glucuronyl-Transferase, dann entstehen reaktive Produkte, die an DNA angeheftet werden^[23]. Ein Intermediat dieser Reaktionen, das *N*-gebundene Sulfat (16), wird heute als ultimales Carcinogen in dieser Reaktionsfolge angesehen. Diese Hypothese wird gestützt durch die hohe Elektrophilie dieses Esters, eine direkte Korrelation der Sulfotransferase-Aktivität mit der Bildung von Lebertumoren in verschiedenen Rattenstämmen und eine erniedrigte Tumorhäufigkeit, wenn der Sulfatgehalt in der Ratte gesenkt wird^[24]. Die mutagene Potenz dieser Verbindung ist ebenfalls sehr hoch^[25].

Neben dem Schwefelsäureester (16), der bei der Entstehung von Lebertumoren eine Schlüsselrolle spielt, konnten weitere Reaktionswege von *N*-Hydroxy-AAF (13) zu elektrophilen Produkten nachgewiesen werden. Durch Konjugation an Glucuronsäure entsteht in der Leber AAF-*O*-Glucuronid (12), ein Hauptmetabolit von *N*-Hydroxy-AAF (13). Über die Blutbahn kann (12) leicht in andere Gewebe gelangen. Es wird als ultimales Carcinogen für die Bildung von extrahepatischen Tumoren angesehen, z. B. der Brustdrüse und des Gehörganges. Ebenso werden *N*-Acetoxy-AAF (17) und *N*-Acetoxy-AAF (14) als ultimale Carcinogene diskutiert, vor allem für die genannten extrahepatischen Gewebe, in denen keine messbaren Sulfotransferase-Aktivitäten festgestellt worden sind. Es wird angenommen, daß die Ester (14), (16) und (17) Vorstufen für ein reaktives Nitrenium-Ion sind, das letztlich die kovalente Bindung an Protein, RNA oder DNA bewirkt.



Dieses Beispiel aus der experimentellen Krebsforschung zeigt, wie schwierig es sein kann, das ultimale Carcinogen oder das eigentliche toxische Agens herauszufinden, insbesondere wenn in Metabolismusstudien mehrere reaktionsfähige Produkte nachgewiesen wurden.

Andere Verbindungen mit einer Hydroxylamin-Gruppierung haben ähnliche Eigenschaften: In vivo und in vitro bilden sie ebenfalls reaktive, an Stickstoff gebundene Glucuronide oder Sulfate. Die Konjugationsprodukte von *N*-(*p*-Biphenyl)-hydroxylamin, Benzidin, 1- und 2-Naphthylamin insbesondere die Glucuronide – werden als Ursachen für Harnblasencarcinome angesehen^[20, 22]. Die Glucuronsäure kann dabei als 1-Desoxy-Derivat oder als Glucuronid an den Stickstoff gebunden sein (Abb. 4).

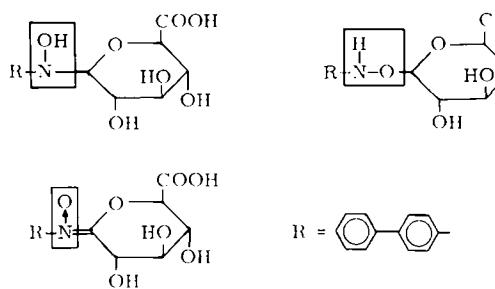
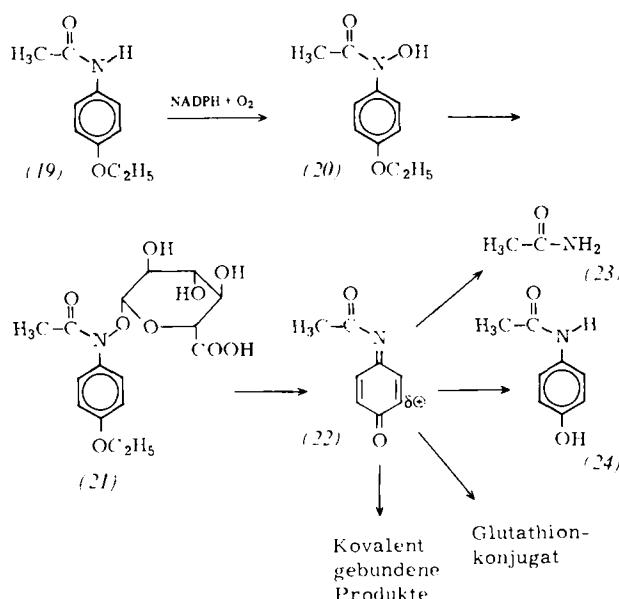


Abb. 4. Carcinogene Glucuronsäure-Konjugationsprodukte von *N*-(*p*-Biphenyl)hydroxylamin.

Eine *N*-Hydroxylierung mit anschließender Glucuronidierung wurde auch bei dem als Schmerzmittel bekannten Phenacetin (19) beobachtet: (19) wird zu (20) *N*-hydroxyliert und anschließend zu (21) glucuronidiert^[26]. Daraus oder aus



dem entsprechenden Sulfat entsteht das reaktive Zwischenprodukt *N*-Acetyl-imidochinon (22), das sich an Proteine kovalent binden kann. Die Bildung von Paracetamol (24) über das Glucuronid (21) gilt als gesichert, auch wenn zusätzlich noch andere Wege denkbar sind. (21) entsteht in der Leber, kann aber in andere Organe transportiert werden, z. B. in die Niere, wo es in den Sammelrohren konzentriert wird. Auch dort ist eine Bildung des reaktiven Intermediats denkbar, die möglicherweise durch den niedrigen pH-Wert beschleunigt wird. Dies könnte die Papillennekrosen bei Phenacetin-Abusus erklären^[26], als dessen Folge auch Nierenbeckentumoren in hoher Incidenz beschrieben werden^[27, 28]. Als Inaktivierungsschritt – d. h. als Entgiftung – ist hier die Konjugation an Glutathion anzusehen.

Diese Beispiele zeigen, daß *N*-Hydroxy-Verbindungen wie die Hydroxylamine leicht reaktive *N*-gebundene Sulfate oder Glucuronide bilden^[29]. Beide Arten Konjugationsprodukte können sich besser an Nucleinsäuren binden als die entsprechenden Hydroxylamine, da Sulfat und Glucuronid hervorragende Abgangsgruppen sind und damit die Bildung elektrophiler Arylnitrenium-Ionen begünstigen.

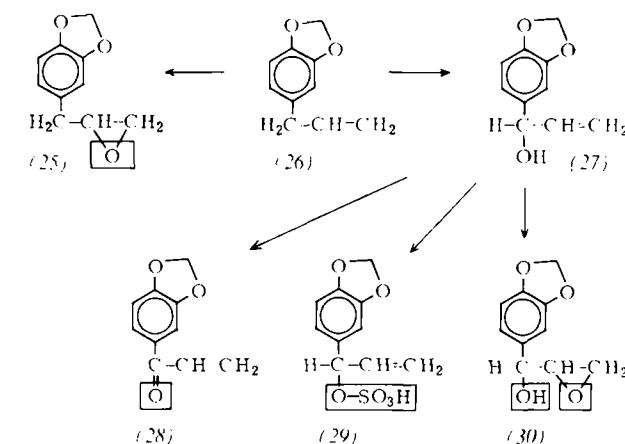
Aromatische Amine werden nicht nur als Arzneimittel verwendet, sondern sind generell in der Umwelt weit verbreitet; einige von ihnen wirken beim Menschen carcinogen.

Für Tierspezies, die Amine nicht *N*-hydroxylieren können, sind diese Verbindungen, z. B. AAF (11), erwartungsgemäß nicht carcinogen (Tabelle 2).

Tabelle 2. *N*-Hydroxylierung von *N*-(2-Fluorenyl)acetamid (AAF) (11) in verschiedenen Tierspezies in Korrelation zur carcinogenen Wirkung [30].

Spezies	<i>N</i> -Hydroxylierung [% der Dosis]	Carcinogener Effekt
Kaninchen	13-20	+
Ratte	0,3-15	+
Mensch	4-14	?
Hund	5,2	+
Hamster	5,0	+
Maus	1,8-2,3	+
Katze	1,5	+
Steppenlemming	Spuren	-
Meerschweinchen	0	-
Regenbogenforelle	0	-

Neben den *N*-Hydroxy-Derivaten gibt es noch andere Verbindungen, die durch Glucuronidierung oder Sulfatierung aktiviert werden. Safrrol (26) (4-Allyl-1,2-methylenedioxybenzol) ist ein natürlich vorkommender Bestandteil pflanzlicher Öle und Gewürze, der auch Getränken als Geschmackskorrigens zugegeben wurde. Diese Substanz ist hepatotoxisch für Mensch und Tier^[31, 32] und erzeugt Adenome und Carcinome der Leber von Maus und Ratte^[31, 33]. Seit 1960 ist Safrrol (26) daher als Nahrungsbestandteil in USA verboten. Safrrol wird im Säugetierorganismus durch zwei Stoffwechselschritte aktiviert. Erster Schritt ist die Oxidation



zum 1'-Hydroxysafrol (27)^[34]. Durch diese „Funktionalisierung“ wird die Übertragung körpereigener Substrate durch Transferasen ermöglicht. Als elektrophile Ester konnten das Sulfat (29) und das Glucuronid nachgewiesen werden, die beide als ultimale Carcinogene und damit als Verursacher der Lebercarcinome angesehen werden^[35]. Zusätzlich zu diesen Konjugationsreaktionen wird die Doppelbindung zum Epoxid oxidiert [siehe (25) und (30)]. Epoxide können sich häufig kovalent an Makromoleküle binden. – Beim Safrrol (26) sind noch nicht alle *in vivo* auftretenden Intermediates mit der Fähigkeit zur kovalenten Bindung an Makromoleküle aufgeklärt.

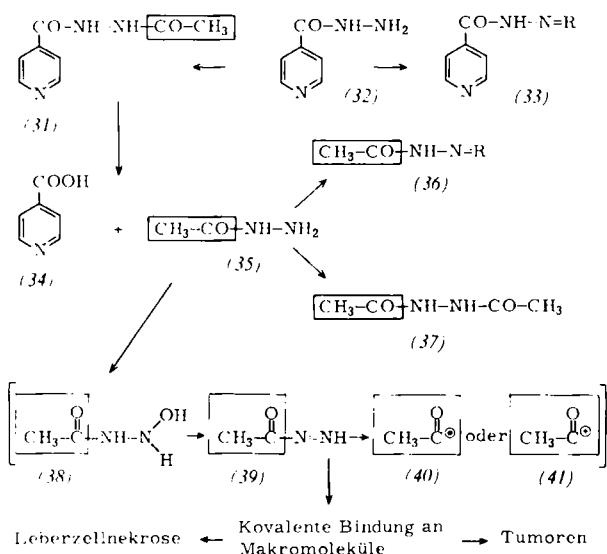
Unter zahlreichen weiteren, dem Safrrol (26) strukturell nahestehenden Inhaltsstoffen essbarer Pflanzen ist Estragol (1-allyl-4-methoxybenzol) als Zusatz zu Essig und Bestandteil vieler etherischer Öle und Gewürze (u. a. Anis, Sternanis, Fenchel und Estragon) bekannt. Dieser Stoff wirkt

schon in niedrigen Dosen bei Mäusen carcinogen^[36]. Auch hier ist der erste Schritt die Oxidation zur Hydroxyverbindung, die zu einem elektrophilen Ester umgesetzt wird.

4.2. Aktivierung durch Acetylierung

Acetylierungen finden bevorzugt an Verbindungen statt, die eine Aminogruppe enthalten. Als energiereiches Molekül fungiert hier Acetyl-Coenzym A, das bei zahlreichen Reaktionen im Intermediärstoffwechsel gebildet wird. *N*-Acetylierung ist ein Hauptweg der Inaktivierung zahlreicher Arzneimittel wie Procainamid, Hydrazin-Derivate, Sulfamethiazin und anderer Sulfonamide; sie spielt auch eine wichtige Rolle im Metabolismus von carcinogenen Arylaminen wie 2-Fluorenlyamin und 2-Naphthylamin^[4,37].

Ein Beispiel für eine Giftung durch Acetylierung ist die Umsetzung von Isonicotinsäurehydrazid (Isoniazid, INH) (32), dem derzeit potentesten Tuberculostaticum. Durch



Acetylierung der freien Aminogruppe entsteht (31), dessen hydrolytische Spaltung zu Isonicotinsäure (34) und Acetylhydrazin (35) führt. Acetylhydrazin (35) wird als Ursache einer Leberschädigung angesehen; man nimmt an, daß es am endoplasmatischen Reticulum zu einem hochreaktiven, acylierenden und alkylierenden Intermediat oxidiert wird. Mit der kovalenten Bindung an Makromoleküle gehen Zellnekrosen und eventuell die Bildung von Tumoren einher^[38]. Diese Ergebnisse erklären die hohe Incidenz von Leberschädigungen durch Isoniazid (32) und das chemisch verwandte Iproniazid [³²—NH—iPr statt —NH₂] und mahnen zugleich zur Zurückhaltung beim Umgang mit monosubstituierten Hydrazinen oder bei deren therapeutischer Anwendung. – Die Produkte (33) und (36) entstehen durch Reaktion mit α -Oxocarbonsäuren.

Neben den genannten Speziesunterschieden bei Konjugationsreaktionen spielen auch interindividuelle Differenzen eine bedeutende Rolle. Dies trifft insbesondere für Acetylierungen zu. Unterschiedliche, genetisch determinierte Aktivitäten wurden bei *N*-Acetyl-Transferasen beobachtet. Beispielsweise wird im Stoffwechsel von INH (32) bei Individuen mit der Fähigkeit zur schnellen Acetylierung mehr Acetylhydrazin (35) gebildet. Dieser genetische Polymorphismus hat pharmakologische oder toxische Konsequenzen. So kann bei üblicher Dosierung der therapeutisch wirksame

Blutspiegel rasch unterschritten werden. Die Vermutung, bei solchen „Schnellinaktivierern“ werde die Leber eher geschädigt, da vermehrt Acetylhydrazin gebildet wird, ist experimentell nicht bewiesen. Stärker gefährdet von einer parenchymatösen Schädigung scheinen eher die Menschen zu sein, bei denen die Acetylierung langsam verläuft, da INH (32) die als Inaktivierungsreaktionen zu verstehende Bildung von Diacetylhydrazin (37) hemmen kann. Dann wird durch Oxidation der Aminogruppe bevorzugt das Hydroxyamino-Derivat (38) gebildet, das weiter zu den reaktiven Intermediaten (39) und (40) oder (41) führt^[39].

Der Polymorphismus der Acetylierung wird auch bei anderen Substanzen beobachtet. Die individuell unterschiedliche Enzymsausstattung ist möglicherweise auch die Ursache der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber carcinogenen Arylaminen und deren Metaboliten. *p*-Aminobenzoësäure ist eines der wenigen Beispiele, bei denen gleiche Acetylierungsgeschwindigkeiten gemessen wurden^[40].

Acetylierte Verbindungen sind in einigen Fällen schlechter wasserlöslich als die entsprechenden Edukte; dies gilt z. B. für die Sulfonamid-Pharmaka Sulfapyrazin, Sulfathiazol, Sulfadiazin oder Sulfamethiazin. Bei Anwendung dieser Pharmaka ist mit einer Nierenschädigung zu rechnen, da sie – durch den niedrigen pH-Wert des Harns und die Konzentrierung in den Nierentubuli begünstigt – sich kristallin in der Niere ausscheiden können; sie verstopfen Nierentubuli und Nierenbecken. Bei Gabe von Sulfonamiden ist daher immer für ausreichende Flüssigkeitszufuhr zu sorgen^[4,5].

4.3. Aktivierung durch Konjugation an Glutathion

Glutathion (*L*- γ -Glutamyl-*L*-cysteinylglycin) ist im Cytosol tierischer und pflanzlicher Zellen gelöst; besonders hohe Konzentrationen werden in der Leber, in Erythrocyten und in der Augenlinse von Säugetieren gemessen. Glutathion wird in der Zelle durch sechs enzymkatalysierte Reaktionen im γ -Glutaminsäure-Cyclus synthetisiert und wieder zu den drei Aminosäuren abgebaut^[41].

Glutathion hat integrale Bedeutung für eine große Anzahl biologischer Funktionen^[41] wie a) Schutz der Zellmembranen durch Erhaltung essentieller Thiolgruppen von Proteinen und anderen Molekülen, b) Zersetzung von Peroxiden oder Radikalen, c) Transport von Aminosäuren, Aminen oder niedermolekularen Peptiden durch Zellmembranen und d) Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe und/oder deren Metaboliten durch Konjugation und anschließende Elimination des Produktes als Mercaptursäure, wobei Glutamat und Glycin abgespalten und dann die Aminogruppe acetyliert wird. Diese Reaktionsfolge wurde am Beispiel des Stoffwechsels von 1,1-Dichlorethen (1) in Abbildung 3 dargestellt. Zahlreiche Mercaptursäuren konnten isoliert werden^[42].

Glutathion ist in seiner reduzierten Form ein starkes Nucleophil. Konjugationen sind deshalb entweder durch S_N2 -Reaktion der Thiolgruppe mit genügend elektrophilen Substraten oder durch Glutathion-S-Transferasen-katalysierte Reaktion möglich. Bisher wurden sieben dieser Enzyme aus dem Cytosol der Leberzellen von Mensch und Tier isoliert und gereinigt^[43,44]. Glutathion-Transferasen sind hochspezifisch in bezug auf Glutathion, aber multifunktionell im Hinblick auf die katalysierten Reaktionen, an denen Glutathion beteiligt ist^[45].

Den Konjugationen an Glutathion wurden bisher ausschließlich entgiftende Funktionen zugeschrieben. Diese Schutzfunktion wurde an zahlreichen Beispielen wie Paracetamol (24) oder halogenierten aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen bestätigt. Bei Paracetamol konnte zuerst eine direkte Korrelation zwischen dem Glutathiongehalt der Zelle und dem Auftreten kovalenter Bindungen mit essentiellen nucleophilen Zellbestandteilen nachgewiesen werden^[7]. Sinkt der Glutathiongehalt unter etwa 30% des normalen Wertes, so reicht die Schutzfunktion nicht mehr aus; die kovalenten Bindungen nehmen exponentiell zu, was schließlich zu Zellnekrose und Parenchymuntergang führt.

Aufgrund dieser biochemischen Zusammenhänge werden Mercaptursäure-Vorläufer heute therapeutisch bei Intoxikationen genutzt; man versucht, die zelluläre Konzentration an reaktionsfähigen Thiolgruppen zu erhöhen. Dies gelingt mit Verbindungen, die besser resorbiert werden als Glutathion und die auch in die Zellen aufgenommen werden (z. B. *N*-Acetylcystein oder Cysteamin). Mit dieser spezifischen Therapie ließen sich Intoxikationen mit Paracetamol erfolgreich behandeln^[46, 47].

Vor einiger Zeit wurde jedoch auch für Glutathion eine Beteiligung an der Aktivierung körperfremder Stoffe zu mutagenen und potentiell carcinogenen Elektrophilen nachgewiesen. 1,2-Dichlorethan – mit einer Weltjahresproduktion von fast 2 Millionen Tonnen^[48] der mit Abstand in den größten Mengen produzierte chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoff – erwies sich im Ames-Test als mutagen^[49, 50].

Die Aktivierung zu einem Mutagen wird beobachtet, wenn den Bakterien eine postmitochondriale Leberzellfraktion^[1] zugegeben wird, nicht hingegen bei Zugabe einer reinen Mikrosomenfraktion. Es muß also ein anderer Aktivierungsweg beschritten werden als die Oxidation durch mikrosomale mischfunktionelle Oxygenasen. Weitere Untersuchungen mit reinen Enzympräparationen und dem System der isoliert perfundierten Leber bestätigten, daß die mutaghenen Effekte von 1,2-Dichlorethan nur in Gegenwart von Glutathion und der Glutathion-Transferasen zunehmen^[50, 51]. Voraussetzung ist also die enzymatische Konjugation an Glutathion. Bei dieser Reaktion wird ein Chloratom durch die *S*-Glutathionylgruppe ersetzt, was zum β -Halogenthioether (42) führt, der den mutagenen^[50] und carcinogenen^[52] Effekt von 1,2-Dichlorethan hervorruft. Verbindungen wie (42) sind äußerst reaktionsfähig und längst für mutagene und carcinogene Wirkungen bekannt, wie das Beispiel des Kampfstoffes Lost (Gelbkreuz) (43) zeigt, der die gleiche Abgangsgruppe enthält (Abb. 5). Die analogen Stickstofflost-Derivate dienen zur Chemotherapie von Carcinomen; auch diese Verbindungen (z. B. *N*-Oxid-Lost oder Cyclophosphamid) sind im Tierversuch carcinogen.

In gleicher Weise wie 1,2-Dichlorethan wird das als Schädlingsbekämpfungsmittel und Benzinzusatz häufig verwendete 1,2-Dibromethan durch Konjugation an Glutathion aktiviert. Das Konjugationsprodukt hat ebenfalls stark alkylierende Eigenschaften, so daß sich die ausgeprägten mutagenen und carcinogenen Wirkungen^[52, 53] von 1,2-Dibromethan auf molekularer Ebene erklären lassen. Die β -Halogenthioether (44) und (42) erfahren in vivo und in vitro weitere metabolische Veränderungen: 1. oxidative Enthalogenierung zu *S*-(2-Hydroxyethyl)-L-cystein bzw. *S*-(2-Hydroxy-

ethyl)-L-glutathion und 2. Konjugation mit einem weiteren Glutathionmolekül zu einem Dithioether. Beide Arten von Stoffwechselprodukten sind biologisch inaktiv. Glutathion-Konjugation führt also im Stoffwechsel solcher Verbindungen zunächst zur Giftung und trägt anschließend zur Entgiftung bei.

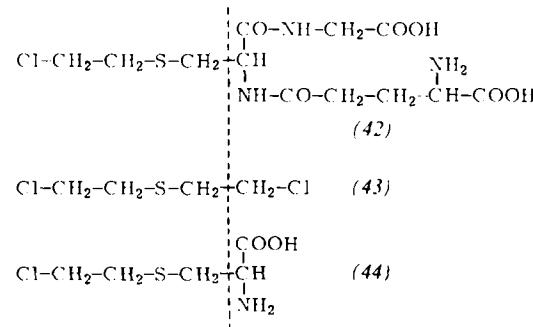
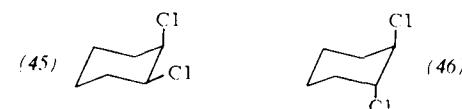


Abb. 5. Mutagene und carcinogene β -Halogenthioether mit der gleichen Abgangsgruppe: Konjugationsprodukt von 1,2-Dichlorethan mit Glutathion (42); Lost (Gelbkreuz) (43); *S*-(2-Chlorethyl)-L-cystein (44).

Generell werden Verbindungen mit guten Abgangsgruppen an vicinalen Kohlenstoffatomen durch Glutathion-Konjugation in potentielle Mutagene umgewandelt^[54]. Die Stärke des mutagenen Effektes hängt dabei von der Art und der Position des Substituenten ab. Je stärker elektrophil der Substituent ist, um so größer ist die mutagene Wirkung. Weiterhin beeinflußt die sterische Anordnung der Substituenten die biologische Wirksamkeit^[50]. So ist das Konjugationsprodukt von *cis*-1,2-Dichlorcyclohexan (45) an Glutathion mutagen, während das *trans*-Isomer (46) ein nicht mutagenes Glutathion-Konjugationsprodukt bildet.



Es ist überraschend, daß derartige Struktur-Wirkungs-Beziehungen schon vor 20 Jahren geprüft wurden: Chlorethylcystein (44) (Abb. 5) ist als hochreaktive alkylierende Verbindung schon 1960 erkannt und als Modellsubstanz für ein starkes Mutagen eingehend untersucht worden^[55]. Diese Tatsache sollte zu einem Umdenken bei der Erstellung einer Risikoanalyse körperfremder Stoffe führen. Zu Beginn der Risikoanalyse muß die chemische Reaktivität des Fremdstoffes geklärt werden; diese wird dann in Beziehung zur Reaktivität von Modellsubstanzen gesetzt, deren toxisches Potential und Metabolitenmuster bekannt sind. Erst dann werden mikrobielle Tests und Metabolismusstudien durchgeführt. Mit diesem Vorgehen wären Fremdstoffe, die zum Teil schon Jahrzehntelang in großer Menge produziert werden (wie 1,2-Dichlorethan oder Vinylchlorid), schon früher als potentielle Carcinogene erkannt worden.

5. Ausblick

Die dargelegten Beispiele über Giftung körperfremder Stoffe durch Konjugation an endogene Stoffe machen die duale Funktion der Transferasen deutlich. In den meisten Fällen wird durch die Konjugation die pharmakologische

[*] Darunter versteht man den 9000 g-Überstand (S-9) eines Leberhomogenates.

Wirksamkeit aufgehoben; meistens sind die Konjugationsprodukte auch weniger toxisch als die Fremdstoffe. Es konnte jedoch an einigen Beispielen gezeigt werden, daß die Übertragung endogener Substrate auch mit einer Aktivierung, d. h. mit einer Gifftung des Fremdstoffes verbunden sein kann. Die Risikoanalyse körperfremder Stoffe wird dadurch wesentlich erschwert. Zum einen können viele metabolische Zwischen- und Endprodukte als ultimal schädigende Agentien angesehen werden. Zum anderen treten bei Konjugationsreaktionen enorme qualitative und quantitative Speziesunterschiede auf. Da der Fremdstoffmetabolismus bei keiner Tierspezies genauso wie beim Menschen verläuft, muß von Fall zu Fall eine geeignete Tierspezies ausgewählt werden, die in bezug auf die zu prüfende Verbindung den Verhältnissen beim Menschen nahe kommt.

Bevor ein Gesamtkonzept der biologischen Aktivität körperfremder Stoffe entwickelt werden kann, müssen alle Strukturänderungen der Fremdstoffe im Organismus untersucht werden. Jeder neue Fremdstoffmetabolit oder Biotransformationsweg, der nachgewiesen wird, kann toxikologisch relevant sein. Die erneute Untersuchung selbst lange bekannter und toxikologisch für unbedenklich geltender Reaktionen zeigte nun, daß die metabolische Transformation sehr kompliziert verlaufen und zu unerwarteten, hochtoxischen Produkten führen kann. Die Fülle der endogenen Moleküle, mit denen Fremdstoffe reagieren können, läßt eine Vielzahl neuer Produkte erwarten und macht die Konjugationsreaktionen besonders interessant.

Die Einführung neuer in-vitro-Testsysteme und empfindlicher analytischer Verfahren in die Risikobeurteilung von Fremdstoffen markiert den Anfang einer Entwicklung, deren Fernziel es ist, die volle Bedeutung der Konjugationsreaktionen für die Gifftung und Entgiftung körperfremder Stoffe zu erkennen. Die Ansicht, Konjugationsreaktionen seien immer entgiftende Reaktionen, ist heute endgültig überholt.

Eingegangen am 22. Oktober 1980 [A 349]

- [1] J. R. Gillette, *Biochem. Pharmacol.* 23, 2785 (1974).
- [2] S. Heidelberger, *Annu. Rev. Biochem.* 44, 79 (1975).
- [3] P. Jenner, B. Testa, *Xenobiotica* 8, 1 (1978).
- [4] W. H. Fishman: *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*. Vol. 2. Academic Press, New York 1970.
- [5] J. W. Gorrod, A. H. Beckett: *Drug Metabolism in Man*. Taylor & Francis, London 1978.
- [6] J. A. Miller, E. C. Miller in H. H. Hiatt, J. D. Watson, J. A. Winston: *Origins in Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory 1977, S. 605.
- [7] J. R. Mitchell, D. J. Jollow, *Gastroenterology* 68, 392 (1975).
- [8] R. R. Hewitt, J. Harless, R. S. Lloyd, J. Love, D. L. Robberson in A. C. Griffin, C. R. Shaw: *Carcinogens: Identification and Mechanisms of Action*. Raven Press, New York 1979, S. 107.
- [9] I. F. H. Purchase, E. Longstaff, J. Ashby, J. A. Styles, D. Anderson, P. A. Lejeune, F. R. Westwood, *Nature* 264, 624 (1976).

- [10] B. A. Bridges, *Nature* 261, 195 (1976).
- [11] E. Gebhart: *Chemische Mutagenese*. Gustav Fischer, Stuttgart 1977.
- [12] B. N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Res.* 31, 347 (1975).
- [13] J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 5135 (1975).
- [14] V. F. Simmon, H. S. Rosenkranz, E. Zeiger, L. A. Poirier, *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 911 (1979).
- [15] J. M. Arias, W. B. Jakoby: *Glutathione: Metabolism and Function*. Raven Press, New York 1976.
- [16] E. N. Cohen, J. R. Trudell, H. N. Edmunds, E. Watson, *Anesthesiology* 43, 392 (1975).
- [17] D. Reichert, H. W. Werner, M. Metzler, D. Henschler, *Arch. Toxicol.* 42, 159 (1979).
- [18] a) A. Aitio: *Conjugation Reactions in Drug Biotransformation*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1978; b) J. Caldwell in [18a], S. 477.
- [19] R. T. Williams, *Biochem. Soc. Trans.* 2, 359 (1974).
- [20] E. C. Miller, J. A. Miller, *Pharmacol. Rev.* 18, 805 (1966).
- [21] J. L. Radomski, W. L. Hearn, T. Radomski, H. Moreno, W. E. Scott, *Cancer Res.* 37, 1757 (1977).
- [22] F. Kadlubar, T. Flammang, L. Unruh in [18a], S. 443.
- [23] J. R. De Baun, E. C. Miller, J. A. Miller, *Cancer Res.* 30, 577 (1970).
- [24] J. R. De Baun, R. Smith, E. C. Miller, J. A. Miller, *Science* 167, 184 (1970).
- [25] V. M. Maher, E. C. Miller, W. Szybalski, *Mol. Pharmacol.* 4, 411 (1968).
- [26] G. J. Mulder, J. A. Hinson, J. R. Gillette, *Biochem. Pharmacol.* 27, 1641 (1978).
- [27] T. Liu, G. W. Smith, J. T. Rankin, *Can. Med. Assoc. J.* 107, 768 (1972).
- [28] T. Murray, M. Goldberg, *Annu. Rev. Med.* 26, 537 (1975).
- [29] C. C. Irving, *Xenobiotica* 1, 387 (1971).
- [30] J. H. Weisburger, E. K. Weisburger, *Pharmacol. Rev.* 25, 1 (1973).
- [31] D. D. Abbott, E. W. Packman, B. M. Wagner, J. W. E. Harrisson, *Pharmacologist* 3, 62 (1961).
- [32] S. S. Epstein, K. Fujii, J. Andrea, N. Mantel, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 321 (1970).
- [33] E. L. Long, A. A. Nelson, O. M. Fitzhugh, W. H. Liver, *Arch. Pathol.* 75, 595 (1963).
- [34] P. Borchert, P. G. Wislocki, J. A. Miller, E. C. Miller, *Cancer Res.* 33, 575 (1973).
- [35] P. G. Wislocki, P. Borchert, J. A. Miller, E. C. Miller, *Cancer Res.* 36, 1686 (1976).
- [36] N. R. Drinkwater, E. C. Miller, J. A. Miller, H. C. Pitot, *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1323 (1976).
- [37] J. B. Glowinski, H. E. Radtke, W. W. Weber, *Mol. Pharmacol.* 14, 940 (1978).
- [38] S. D. Nelson, J. R. Mitchell, J. A. Timbrell, W. R. Snodgrass, G. B. Corcoran III, *Science* 193, 901 (1976).
- [39] J. A. Timbrell, J. M. Wright, *Drug Metab. Dispos.* 7, 237 (1979).
- [40] W. W. Weber, D. W. Hein, M. Hirata, E. Patterson in [18a], S. 145.
- [41] A. Meister, S. S. Tate, *Annu. Rev. Biochem.* 45, 559 (1976).
- [42] L. F. Chasseaud in [15], S. 77.
- [43] W. B. Jakoby, W. H. Habig, J. H. Keen, J. N. Ketley, M. J. Pabst in [15], S. 189.
- [44] K. Kamisaka, W. H. Habig, J. N. Ketley, I. M. Arias, W. B. Jakoby, *Eur. J. Biochem.* 60, 153 (1975).
- [45] W. B. Jakoby, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46, 381 (1977).
- [46] R. G. Peterson, B. H. Rumack, *J. Am. Med. Assoc.* 237, 2406 (1977).
- [47] L. F. Prescott, R. N. Illingworth, J. A. J. H. Critchley, A. T. M. J. Stewart, R. D. Adam, *Br. Med. J.* 2, 1097 (1979).
- [48] G. McConnell, D. M. Ferguson, C. R. Pearson, *Endeavour* 34, 13 (1975).
- [49] H. Brem, A. B. Stein, H. S. Rosenkranz, *Cancer Res.* 34, 2576 (1974).
- [50] U. Rannug, A. Sundvall, C. Ramel, *Chem. Biol. Interact.* 20, 1 (1978).
- [51] U. Rannug, B. Beije, *Chem. Biol. Interact.* 24, 265 (1979).
- [52] W. A. Olson, R. T. Habermann, E. K. Weisburger, J. M. Ward, J. H. Weisburger, *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1993 (1973).
- [53] E. K. Weisburger, *Environ. Health Perspect.* 21, 7 (1977).
- [54] P. J. van Bladeren, A. van der Gen, D. D. Breimer, G. R. Mohn, *Biochem. Pharmacol.* 28, 2521 (1979).
- [55] O. G. Fahmy, M. J. Fahmy, *Genetics* 45, 1191 (1960).