

**Mikrosomale Biotransformation von Benzo[ghi]perylen,
einem mutagenen polyaromatischen Kohlenwasserstoff
ohne das Strukturelement der Bay-Region des kanzerogenen Benzo[a]pyrens**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Stefanie Grupe
geboren in Frankfurt-Höchst

Mainz, 2005

Dekan: Prof. Dr. R. Zentel

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2005

Der Mensch muß bei dem Glauben verharren,
dass das Unbegreifliche begreiflich sei:
er würde sonst nicht forschen.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Chemische Kanzerogenese	1
1.2 Metabolismus und Mutagenität von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen	3
1.2.1 Metabolismus von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen	3
1.2.2 Mutagenität und Kanzerogenität polyaromatischer Kohlenwasserstoffe	12
1.3 Problemstellung und Arbeitsprogramm	14
1.3.1 Chemische Synthesen von Derivaten des Anthanthrens und Benzo- [ghi]perylens	15
1.3.2 Enzymatische Bildung von Metaboliten	15
1.3.3 Trennung der Enantiomeren von <i>trans</i> -Dihydrodiolen	17
1.3.4 Quantitative Untersuchung der Biotransformation von Benzo[ghi]perylen	17
1.3.5 Bestimmung der Mutagenität von Benzo[ghi]perylen und seiner mikrosomalen Metaboliten im AMES-Test	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Synthesen.....	19
2.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel	19
2.1.2 Chromatographische und Spektroskopische Methoden	19
2.1.3 Oxidation der Kohlenwasserstoffe Anthanthren und Benzo[ghi]perylen.....	20
2.1.3.1 Chinone des Anthanthrens	20
2.1.3.2 Chinone des Benzo[ghi]perylens	21
2.1.4 Reduktion der Chinone und Acetylierung der Hydrochinone	21
2.1.4.1 Reduktion der Chinone des Benzo[ghi]perylens	21
2.1.4.2 7,8-Diacetoxybenzo[ghi]perylen <u>4</u>	22
2.1.4.3 1,6-Diacetoxybenzo[a]pyren <u>5</u>	23
2.1.5 K-Region <i>trans</i> -Dihydrodirole des Benzo[ghi]perylens	23
2.1.5.1 <i>trans</i> -3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen <u>6</u>	23
2.1.5.2 <i>trans</i> -3,4- <i>trans</i> -11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo- [ghi]perylen <u>8</u>	25
2.1.6 Veresterung der K-Region <i>trans</i> -Dihydrodirole von Benzo[ghi]perylen mit (-)- α - Menthoxyessigsäure.....	26
2.1.6.1 <i>trans</i> -3,4-Bis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4-dihydrobenzo- [ghi]perylen <u>10</u>	26
2.1.6.2 <i>trans</i> -3,4- <i>trans</i> -11,12-Tetrakis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4,11,12- tetrahydrobenzo[ghi]perylen <u>11</u>	26
2.1.7 K-Region Epoxide des Benzo[ghi]perylens	26
2.1.7.1 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen <u>12</u>	26

2.1.7.2	3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen <u>13</u>	27
2.2	Charakterisierung von subzellulären Fraktionen der Rattenleber	27
2.2.1	Proteinbestimmung nach BRADFORD	27
2.2.2	Messung von 7-Alkoxyresorufin-O-dealkylasen	28
2.2.2.1	Geräte, Materialien und Lösungen.....	28
2.2.2.2	Testdurchführung.....	28
2.3	Mikrosomaler Metabolismus von Anthanthren bzw. Benzo[ghi]perylen	29
2.3.1	Geräte, Materialien und Lösungen	29
2.3.2	Inkubation mit Lebermikrosomen von Ratten	30
2.3.3	Chromatographische Trennung und Identifizierung der Metaboliten von Anthanthren und Benzo[ghi]perylen	32
2.4	Mikrosomale Inkubation mit tritiiertem Benzo[ghi]perylen	33
2.4.1	Reinigung von [G- ³ H]Benzo[ghi]perylen	33
2.4.2	Inkubation von [G- ³ H]Benzo[ghi]perylen mit Lebermikrosomen von Ratten.....	33
2.5	Mutagenitätsuntersuchungen (Salmonella Reversionstest nach B. Ames).....	35
2.5.1	Geräte, Materialien und Lösungen	35
2.5.2	Anzucht und Keimzahlbestimmung der <i>Salmonella typhimurium</i> Stämme	37
2.5.3	Testdurchführung (Platteninkorporationstest).....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Synthesen von Derivaten des Anthanthrens und Benzo[ghi]perylens.....	39
3.1.1	Chinone und Hydrochinone des Anthanthrens	39
3.1.2	Chinone und Hydrochinone des Benzo[ghi]perylens.....	43
3.1.2.1	Reduktive Acetylierung der Chinone.....	45
3.1.3	K-Region Dihydrodiole des Benzo[ghi]perylens	47
3.1.3.1	α-Menthoxyacetate der Dihydrodiole von Benzo[ghi]perylen.....	50
3.1.4	K-Region Epoxide von Benzo[ghi]perylen	51
3.2	Charakterisierung von subzellulären Fraktionen der Rattenleber	54
3.2.1	Bestimmung des Proteingehaltes und der Aktivität verschiedener 7-Alkoxyresorufin-O-dealkylasen	54
3.3	Mikrosomale Biotransformation von Anthanthren.....	56
3.3.1	Identifizierung der mikrosomalen Metaboliten von Anthanthren.....	56
3.3.2	Einfluss verschiedener Enzyminduktoren auf die Zusammensetzung und Umsatz der Metaboliten des Anthanthrens.....	59
3.3.3	Einfluss von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid auf die Biotransformation von Anthanthren mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254	60
3.4	Untersuchung des mikrosomalen Metabolismus von Benzo[ghi]perylen	63

3.4.1	Strukturaufklärung der mikrosomalen Metaboliten von Benzo[ghi]perylen nach Umsetzung mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254.....	64
3.4.1.1	Trennung der enantiomeren <i>trans</i> -Dihydrodiole des Benzo[ghi]perylens	76
3.4.1.2	Einfluss von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid auf den Metabolismus von Benzo[ghi]perylen mit Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254	78
3.5	Quantifizierung des mikrosomalen Metabolismus von Benzo[ghi]perylen	85
3.5.1	Einfluss von Enzyminduktion und Enzymhemmung auf den metabolischen Gesamtumsatz von Benzo[ghi]perylen und auf die Zusammensetzung der Metaboliten	88
3.5.2	Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Bildung der Metaboliten von Benzo[ghi]perylen in Inkubationen mit Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 und des Einflusses von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid	91
3.6	Untersuchung der Gentoxizität von Benzo[ghi]perylen und seiner Derivate	93
3.6.1	Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen in den Stämmen TA98 und TA100 von <i>Salmonella typhimurium</i> nach Aktivierung mit der postmitochondrialen Fraktion der Rattenleber.....	93
3.6.2	Untersuchung der bakteriellen Mutagenität von mikrosomalen Metaboliten des Benzo[ghi]perylens	94
3.6.2.1	Bakterielle Mutagenität der fraktionierten Ethylacetatextrakte von mikrosomalen Inkubationen von Benzo[a]pyren und Benzo[ghi]perylen im Stamm TA100 von <i>Salmonella typhimurium</i>	95
3.6.2.2	Bakterielle Mutagenität isolierter mikrosomaler Metaboliten des Benzo[ghi]perylens nach Aktivierung mit der postmitochondrialen hepatischen Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren im Stamm TA100 von <i>Salmonella typhimurium</i>	97
3.6.2.3	Direkte bakterielle Mutagenität von Arenoxiden des Benzo[ghi]perylens in den Stämmen TA98 und TA100 von <i>Salmonella typhimurium</i>	98
3.6.3	Bestimmung der kovalenten DNA-Bindung des metabolisch aktivierten Benzo[ghi]perylens sowie die seiner Arenoxide mit dem Verfahren des ³² P-Postlabelings	100
4	Diskussion	102
4.1	Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen	102
4.2	Mikrosomaler Metabolismus von Benzo[ghi]perylen	102
4.3	Einfluss von Induktionsstatus, Enzymhemmung und Inkubationszeit auf den qualitativen und quantitativen Metabolismus von Benzo[ghi]perylen und der Vergleichssubstanz Anthanthren	110
4.4	Gentoxizität von Benzo[ghi]perylen und seiner Metaboliten.....	115

5	Zusammenfassung	120
6	Literatur	122
7	Anhang	144
7.1	Spektroskopische Daten (FD-MS) der synthetischen Derivate von Benzo[<i>ghi</i>]perylene.....	144
7.2	Spektroskopische Daten zu den Metaboliten von Anthanthren.....	151
7.2.1	Vorversuch zur Strukturaufklärung der Metaboliten A2 und A3.....	151
7.3	Spektroskopische Daten zu den Metaboliten von Benzo[<i>ghi</i>]perylene.....	152
7.4	Eichgeraden der Metaboliten von Benzo[<i>ghi</i>]perylene.....	154
	Anhang zur Person	155
	Danksagung	155
	Lebenslauf	156
	Publikationen	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Metabolit des Anthanthrens
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Ant	Anthanthren
Aro	Aroclor 1254
B	Metabolit von 3,4,11,12-Tetrahydro-3,4,11,12-bisoxibenzo[ghi]perylene
BaP	Benzo[a]pyren
BghiP	Benzo[ghi]perylene
BSA	Rinderserumalbumin
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CH ₃ CN	Acetonitril
CYP	Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase
d	Dublett
D	Diastereomer
DAD	<i>Dioden Array</i> Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DDH	Dihydrodioldehydrogenase
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzochinon
DMF	Dimethylformamid
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	<i>disintegrations per minute</i> (Radioaktive Zerfälle pro Minute)
DNA	Deoxyriboucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Enantiomer
E.C.	Enzymklassifizierungsnummer
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EH	Epoxidhydrolase
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -dealkylase
7-ER	7-Ethoxyresorufin
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FD-MS	<i>Feld-Desorption</i> Massenspektrometrie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-phosphoribosyl-Transferase

Abkürzungsverzeichnis

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IS	Interner Standard
kV	Kilovolt
Iso-KCl	Isotonische Kaliumchloridlösung
M	Metabolit von Benzo[ghi]perylen
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
MBq	Megabequerel
3-MC	3-Methylcholanthren
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute
<i>m/z</i>	Massenzahl
n	Anzahl der Einzelversuche
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NAD	Nikotinamid-adenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotid-phosphat
NaH	Natriumhydrid
NaHSO ₃	Natriumhydrogensulfit
NaBH ₄	Natriumborhydrid
n. b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
OsO ₄	Osmium(VIII)-oxid
P	Metabolit von 7-Hydroxybenzo[ghi]perylen
p.a.	<i>(pro analysi)</i> analysenrein
PAK	Polyaromatischer Kohlenwasserstoff
PB	Phenobarbital
PMO	<i>Perturbation Molecular Orbital</i>
pmol	pikomol
ppm	<i>parts per million</i>
7-PR	7-Pentoxyresorufin
PROD	7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase
pt	Pseudotriplett
Q	Chinon

r	Korrelationskoeffizient
R	rechtsdrehend
R _f	Verhältnis der Wanderungsstrecke der Substanz vom Aufgabepunkt zur Wanderungsstrecke der Lösungsmittelfront
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphasen)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Metabolit von 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen
S	linksdrehend
S.	<i>Salmonella</i>
S9	postmitochondriale Leberfraktion
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TABA	(R)-(-)-2-(2,4,5,7-Tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxyl)buttersäure
TBAH-SO ₄ ⁻	Tetra- <i>n</i> -butylamminiumhydrogensulfat
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
TCPO	1,1,1-Trichlor-2-propenoxid
THF	Tetrahydrofuran
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	(<i>unit</i>) Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VIS	(<i>visible</i>) sichtbarer Wellenlängenbereich
V/V	Volumen/Volumen

1 Einleitung

1.1 Chemische Kanzerogenese

In den industriellen Ländern sind Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache (Cairns, 1975; Kunz, 1977; Prescott & Flexer, 1990). Verantwortlich für Krebserkrankungen sind Kanzerogene, die normale Zellen durch Veränderung der DNA in Tumorzellen umwandeln können. Zu den Kanzerogenen gehören physikalische (ionisierende Strahlung, z. B. γ - und Röntgenstrahlung, lokalreizende Substanzen, z. B. Asbest), chemische (alkylierende Stoffe, reaktive Sauerstoffspezies) und biologische Faktoren (onkogene Viren) (Doll & Peto, 1981; Burck *et al.*, 1988; Glover & Hames, 1989; Prescott & Flexer, 1990; Henschler, 1991).

Auf den besonderen Stellenwert der chemischen Kanzerogene weisen eine Reihe von epidemiologischen Studien hin (Wynder & Gori, 1977; Higginson, 1979; Doll & Peto, 1981). Denn schon 1775 dokumentierte Pott die chemische Kanzerogenese anhand des gehäuften Auftretens von Scrotalkrebs bei Schornsteinfegern, was später von Pitot, 1990, bestätigt werden konnte. Außerdem beschrieb schon Hill 1761 den Zusammenhang zwischen häufigem Tabakschnupfen und dem Auftreten von Nasenkrebs, der auch von Redmont, 1970, belegt wurde.

Die chemischen Kanzerogene werden unterteilt in nicht-gentoxische (epigenetische) (Clayson *et al.*, 1994) und gentoxische Substanzen. Nicht-gentoxische Kanzerogene beeinflussen die Genexpression, Wachstumsreaktionen und Überlebensfähigkeit der Zellen. Zu ihnen gehören Hormone (Östrogene, Androgene), Immunsuppressiva (Cyclosporin, Azathioprin), Peroxisomenproliferatoren (Clofibrat, Phthalate) sowie Festkörper (Asbest) (Forth *et al.*, 1990). Die gentoxischen Kanzerogenen gliedern sich in direkt und indirekt wirksame Agentien. Direkt wirksame Kanzerogene wie Dimethylsulfat, Ethylenimin, Stickstofflost oder Cisplatin sind bereits als solche mutagen (Forth *et al.*, 1990). Indirekt wirksame Kanzerogene benötigen hingegen zur Entfaltung ihrer Gentoxizität eine Aktivierung durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme. Zu dieser Gruppe zählen insbesondere polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) (Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,l]pyren, 3-Methylcholanthren), aromatische Amine (Benzidin), (IARC, 1987; Tomatis *et al.*, 1989; Cooper & Grover, 1990) sowie Aflatoxin B₁ als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen und Aristolochiasäure als Inhaltsstoff von Vertretern höherer Pflanzenfamilien (Forth *et al.*, 1990; Groopman & Cain, 1990).

Die genaue Anzahl der Ereignisse, die zur Bildung eines malignen Tumors erforderlich sind, ist noch ungeklärt. Die Untergliederung der Kanzerogenese in Initiation, Promotion und Progression hat sich bewährt, da diese Schritte experimentell gut belegt sind (Marks, 1989). Das

Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese wurde Anfang der 40er Jahre entwickelt (Berenblum, 1947).

Die Initiation beruht auf einer irreversiblen Schädigung des genetischen Materials der Zelle (Farber, 1984). Karzinogene, die elektrophile Spezies bilden, reagieren mit biologischen Makromolekülen der Zelle, wie der DNA zu DNA-Addukten. (Harris, 1991; Hemminki, 1983). Bleibt die DNA-Reparatur durch verschiedene DNA-Reparaturenzyme (Barnes, 1993; Bootsma, 1993) aus bzw. ist sie fehlerhaft, so entsteht ein DNA-Schaden (Transversionen und Transitionen von DNA-Basen, Chromosomen Brüche sowie Inversionen) (Budillon 1995, Cairns, 1981), der an die Tochterzellen weitergegeben werden kann, die dann eine Mutation aufweisen.

Mutationen können dazu führen, dass Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden (Land *et al.*, 1983; Bishop, 1985, Reynolds *et al.*, 1986), oder dass es zum Funktionsausfall von Tumorsuppressorgenen kommt, der die Wachstumsregulationsprozesse der Zelle beeinflusst. Die genetisch veränderte Zelle kann entweder durch Apoptose zugrunde gehen, als stumme Mutation im Zellverband mit normaler Wachstumsregulation weiterexistieren oder aber durch Promotion in eine neoplastische Zelle umgewandelt werden (Schulte-Hermann *et al.*, 1995).

Während der Promotion werden die genetisch veränderten Zellen durch sogenannte Tumorpromotoren (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat, TPA oder Phenobarbital) transformiert wodurch präneoplastische Zellpopulationen mit identischen Mutationen resultieren (Deml, 1996). Dieser Prozess kann Wochen, Monate oder Jahre dauern. Als Wirkmechanismus der Promotion wird Stimulierung der Zellproliferation, Induktion bestimmter Enzyme, Aktivierung von Protoonkogenen oder eine Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kommunikation angesehen (Weinberg, 1989).

Für die nachfolgende, experimentell abgrenzbare Stufe der Progression sind irreversible aneuploide bösartige Neoplasien charakteristisch (Schulte-Hermann 1985, Pitot 1989). Die neoplastischen Zellen zeigen eine gesteigerte Wachstumsrate, Invasionsfähigkeit und Metastasenbildung (Foulds, 1969). Dabei besitzen chemische Kanzerogene, die als Initiatoren wirken, in dieser Phase auch als Progressoren eine wichtige Bedeutung (Hennings, 1993).

1.2 Metabolismus und Mutagenität von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen

1.2.1 Metabolismus von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen

Kennaway konnte im Jahre 1930 mit Dibenz[*a,h*]anthracen epitheliale Tumore auf der Mäusohaut erzeugen. Nach dem die tumorinitierende Wirkung des Steinkohlenteers von Yamagawa & Ichikawa schon 1915 belegt worden war. Schließlich wurde als weiterer PAK Benzo[*a*]pyren im Jahre 1933 von Cook *et al.* aus Kohlenteer isoliert.

PAKs entstehen durch unvollständige Verbrennung organischer Materialien (Kohle, Erdöl zu Heizzwecken und in Verbrennungsmotoren von Kraftfahrzeugen) sowie bei der Pyrolyse von Aminosäuren, Fetten und Kohlenhydraten (Räucherung und Zubereitung von Lebensmitteln) (Zimmermeyer *et al.*, 1991; IARC, 1986; Hoffmann & Hecht, 1990; Hemminki, 1990; Liroy *et al.*, 1988; Dipple & Bigger, 1991). Auch der Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten enthält PAKs, so dass diese vom Raucher inhalierte Substanzgruppe als wichtige Faktoren für die Entstehung von Tumoren, insbesondere des Lungenkrebses und Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes, gelten. Ein Raucher, der 40 Jahre lang 40 Zigaretten pro Tag raucht, inhaliert etwa 12 mg Benzo[*a*]pyren (Hoffmann *et al.*, 1994).

Eine wichtige Schlüsselsubstanz bei der pyrogenen Bildung von PAKs ist das Acetylen. Aus zwei C-2-Einheiten kann ein Butadienmolekül entstehen, das durch Anknüpfung einer weiteren C-2-Einheit Benzol bildet (Tebbens *et al.*, 1956a, 1956b; Badger *et al.*, 1966) Die weiteren Aufbauschritte der pyrolytischen Bildung von Benzo[*a*]pyren sind in Abb. 1.1 verdeutlicht.

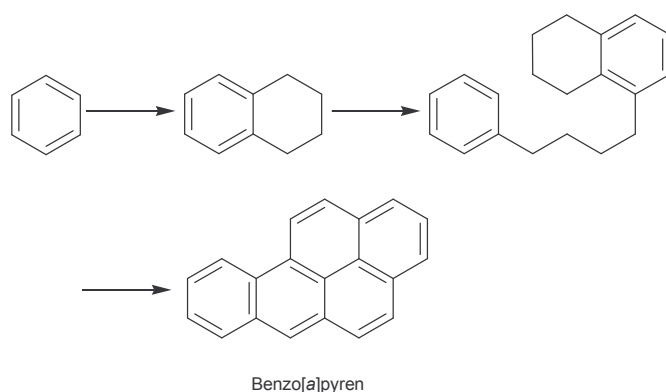


Abbildung 1.1: Mögliche Aufbauschritte bei der pyrolytischen Bildung von Benzo[*a*]pyren.

Wie viele in der Umwelt vorkommenden Fremdstoffe werden PAK über intestinale, dermale oder pulmonale Resorption gut aufgenommen, können aber aufgrund ihrer Lipophilie nur schlecht wieder ausgeschieden werden. Um die Polarität zu erhöhen, müssen sie daher durch Phase I-Reaktionen der Biotransformation über Arenoxide in Phenole funktionalisiert

werden (Platt, 1986; Guengerich & Shimada, 1991; Guengerich, 1992; Phillips & Grover, 1994).

Die so derivatisierten Moleküle werden in der Phase II-Reaktion (Hall & Grover, 1990) mit aktivierter Glukuronsäure (Mulder *et al.*, 1990), aktivierter Schwefelsäure (Mulder & Jacob, 1990) oder im Fall der Epoxide Glutathion (Coles & Kletterer, 1990; Armstrong, 1991) konjugiert und in dieser Form renal oder biliär ausgeschieden. Die aus der Phase I-Reaktion hervorgehenden hochreaktiven Intermediate (Arenoxide, Dihydrodiolepoide) können jedoch auch mit Makromolekülen der Zellen, z. B. Proteine (Skipper *et al.*, 1994) oder Nukleinsäuren (Harvey & Geacintov, 1988) reagieren und diese dadurch verändern (Brookes & Lawley, 1964; Pelkonen & Nebert, 1982; Beach & Gupta, 1992; Jernström & Graslund, 1994; Phillips & Grover, 1994), was Mutationen und schließlich auch einen veränderten Genexpressionsstatus bzw. Phänotyp der betroffenen Zelle zur Folge haben kann.

Die wichtigsten Enzyme der Phase I-Reaktion sind die Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen, die im endoplasmatischen Retikulum verschiedenster Organe (Leber, Lunge, Niere, Haut, Darm) lokalisiert sind (Stohs *et al.*, 1977; Kao & Carver, 1990; Gonzalez & Gelboin, 1994). Das Cytochrom P-450 System besteht aus zwei Enzymen, dem Häm enthaltenden Cytochrom P-450 und der NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, ein Flavoprotein, das die Übertragung von Elektronen vom Kofaktor NADPH zur Monooxygenase ermöglicht. Diese überträgt dann ein Atom eines Sauerstoffmoleküls auf das gebundene Substrat, während das zweite nach Zuführung von zwei Reduktionsäquivalenten und zwei Protonen zu Wasser reduziert wird („mischfunktionelle Oxygenasen“, Nebert *et al.*, 1981; Guengerich & McDonald, 1984). Diese enzymatische Reaktion aktiviert reaktionsträge Substrate durch Einführung elektrophiler Gruppen (Epoxidierung).

Von den Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen existieren weit über 100 Familien (z.B. CYP1, CYP2, etc.), die in Subfamilien unterteilt werden (z.B. CYP1A, CYP2A, etc.), die sich schließlich in Isoenzyme gliedern (CYP1A1, CYP2A1 etc.). Diese Isoenzyme sind durch eine enge jedoch überlappende Substratspezifität charakterisiert (Nelson *et al.*, 1993).

Die Subfamilie 1A ist für den PAK-Metabolismus von Bedeutung. Ihre Expression kann mit verschiedenen Induktoren (polychlorierte Biphenyle, 3-Methylcholanthren oder PAKs) gesteigert werden (Ioannides & Parker, 1993). Dieser Vorgang wird über ein cytoplasmatisches Protein, den Ah-Rezeptor (*aromatic hydrocarbon receptor*; Nebert *et al.*, 1993) vermittelt, der nach Bindung des Induktors als Rezeptor-Ligand-Komplex in den Zellkern wandert und dort nach Wechselwirkung mit den entsprechenden DNA-Sequenzen (*Ah-Locus*) die Transkription der Cytochrom P450 1A-Gene stimuliert und so deren Expressionsniveau in der Zelle erhöht (Nebert, 1989; Ioannides & Parker, 1990; Parke *et al.*, 1991). Die erhöhte Aktivität der

fremdstoffmetabolisierenden Enzyme macht man sich z.B. für die Untersuchung der Bio-
transformation von PAKs in *in-vitro* Systemen zu nutze.

Außer durch die eben erwähnten Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen können
Epoxidierungen durch Peroxylradikale katalysiert werden. Diese entstehen bei der Lipidper-
oxidation, bei der mehrfach ungesättigte Fettsäuren enzymatisch oxidiert werden sowie bei
Peroxidase-abhängigen Reaktionen in größerer Menge (Marnett, 1987).

Die im ersten Monooxygenierungsschritt gebildeten Arenoxide werden durch die mikrosoma-
le Epoxidhydrolase im endoplasmatischen Retikulum zu den reaktionsträgen *trans*-
Dihydrodiolen hydrolysiert (Oesch, 1973; Guengerich, 1992; Phillips & Grover, 1994). Es
kann jedoch auch eine nicht-enzymatische Isomerisierung zu einem Phenol stattfinden, wo-
bei der so genannte NIH-Shift beobachtet wird (Daly *et al.*, 1972). Neben der mikrosomalen
Form der Epoxidhydrolase existiert noch eine cytosolische Variante, die aber für die metabo-
lische Umsetzung der Arenoxide weniger relevant ist (Gill *et al.*, 1974).

Die metabolisch gebildeten Dihydrodiolen oder Phenole können entweder durch Phase II-
Enzyme konjugiert oder erneut durch Cytochrom P-450 monooxygeniert werden. Befindet
sich die Dihydrodiolstruktur an einem *ortho*-kondensierten Benzoring, entstehen vicinale Di-
hydrodirolepoxide, bei denen sich der Oxiranyling an der sterisch gehinderten Molekülbucht
befinden kann (Thakker *et al.*, 1976, 1986). Diese Derivate werden als Bay- bzw. Fjord-
Region-Dihydrodirolepoxide bezeichnet. An der Modellsubstanz Benzo[*a*]pyren (BaP) soll der
Metabolismus eines PAKs gezeigt werden (Abb. 1.2).

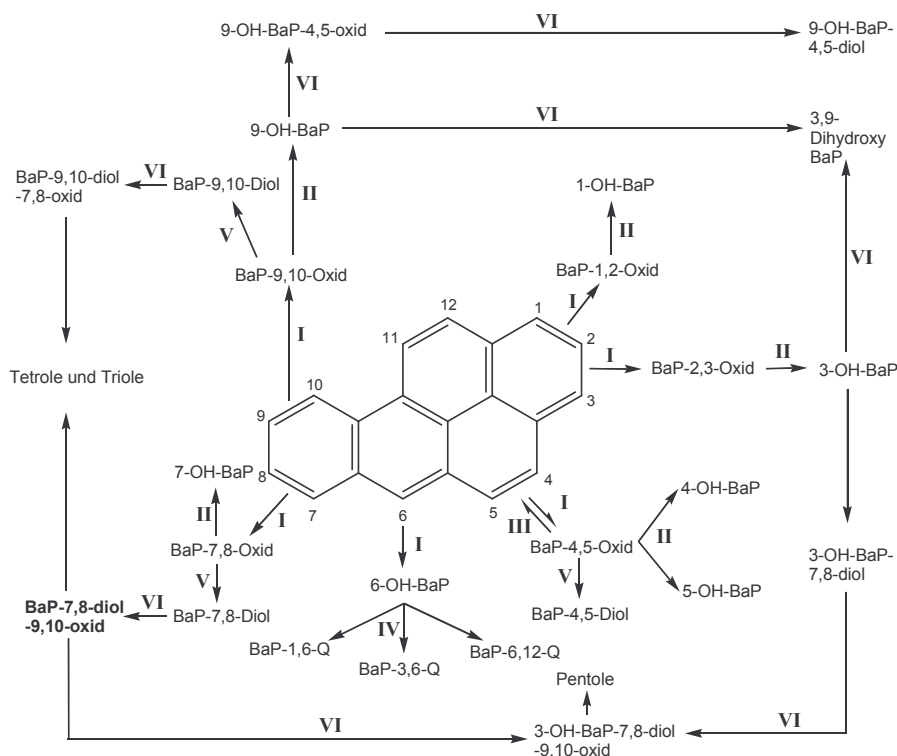


Abbildung 1.2: Phase I-Biotransformation von Benzo[*a*]pyren (nach Phillips & Grover, 1994).

Zunächst wird in Schritt I durch Cytochrom P-450 ein Sauerstoffatom an verschiedene Positionen, außer der 11,12-Position, addiert, dabei entstehen außer am C-Atom 6 (direkte Hydroxylierung) das 4,5-Oxid, 7,8-Oxid und 9,10-Oxid (Selkirk *et al.*, 1975; Jerina & Daly, 1974; Sims & Grover, 1974). Für die Bildung des 7,8-Oxides in der Leber des Nagers und des Menschen wird CYP1A1 verantwortlich gemacht (Conney, 1982; McMagnus *et al.*, 1990), während für die Katalyse der Epoxidierung der K-Region (4,5-Position) hauptsächlich CYP2B in Frage kommt (Hall *et al.*, 1989). Das 1,2-Oxid und 2,3-Oxid (Yang *et al.*, 1977) sind hypothetische Intermediate.

In Schritt II isomerisieren die Arenoxide zu Phenolen (Jerina & Daly, 1976). Das BaP-3- und -9-Phenol sind Hauptmetaboliten, während BaP-1- und -7-Phenol (Croy *et al.*, 1976) sowie BaP-4- und -5-Phenol nur im untergeordneten Maß gebildet werden. Die exklusive Bildung von 1-, 3-, 7- und -9-Phenol kann zudem gut durch MO-Berechnungen vorausgesagt werden (Fu *et al.*, 1978). Die direkte Hydroxylierung der 3-Position von BaP wird hauptsächlich durch CYP3A4 und CYP2C8 katalysiert (Yun *et al.*, 1992). Wie es beim 3-Phenol dokumentiert ist, können die Phenole mit Glucuronsäure (Nemoto & Gelboin, 1976) oder Sulfat (Nemoto *et al.*, 1977) konjugiert werden.

BaP-4,5-Oxid kann in Schritt III wieder zum Mutterkohlenwasserstoff reduziert werden (Booth *et al.*, 1975; Kato *et al.*, 1976). In Schritt IV wird das BaP-6-Phenol über ein Semichinonradikal in das 1,6-, 3,6- und 6,12-Chinon überführt (Sims, 1967; Lesko *et al.*, 1975; Lorentzen *et al.*, 1975).

Die 4,5-, 7,8- und 9,10-Oxide werden in Schritt V durch die mikrosomale Epoxidhydrolase zu den entsprechenden *trans*-Dihydrodiolen hydrolisiert (Holder *et al.*, 1974; Oesch 1979), die somit indirekt die Existenz der Arenoxide belegen.

Durch Monooxygenasen können Phenole und Dihydrodirole weitermetabolisieren (Schritt VI), wobei andere Positionen des Moleküls erneut oxidiert werden (Sims *et al.*, 1974b; Wiebel, 1975). Nach der Hydrolyse des Arenoxides zum Prä-Bay-Region-*trans*-Dihydrodiol führen CYP3A4 (Shimada *et al.*, 1989) und CYP1B1 (Shimada *et al.*, 1996, 1999) zur Bildung des Bay-Region-Dihydrodirolepoxids. Ebenso ist CYP1A2 fähig, BaP auf dem Dihydrodirolepoxid-Weg umzusetzen (Bauer *et al.*, 1995). Nachgewiesen werden diese Metabolite hauptsächlich anhand der durch Isomerisierung entstehenden Tetrole.

Da das BaP-7,8-Dihydrodiol enzymatisch als *trans*-Isomer gebildet wird, sind vier Stereoisomere des 7,8-Dihydrodiol-9,10-epoxides möglich (Abb. 1.3).

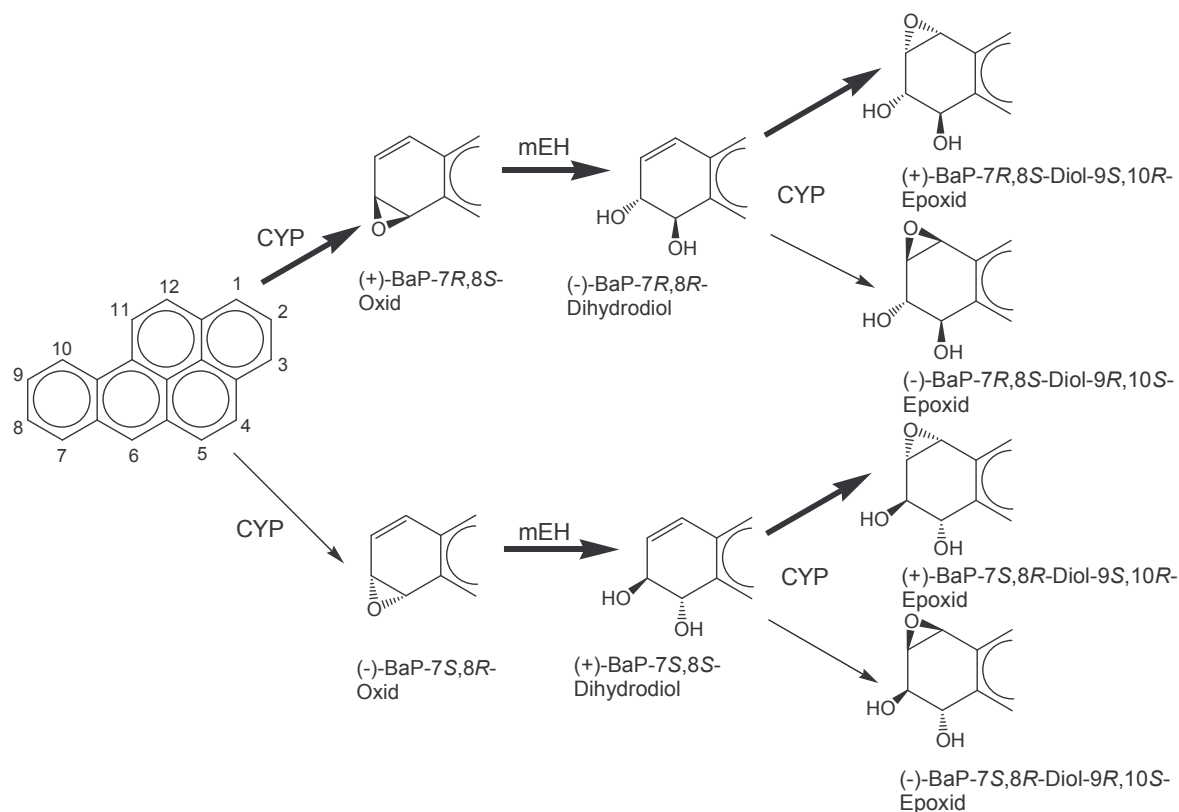


Abbildung 1.3: Entstehung und absolute Konfiguration der stereoisomeren Arenoxi, Dihydrodiole und Dihydrodiolepoxide des Benzo[a]pyrens (BaP) (nach: Levin *et al.*, 1980). Dicke Pfeile zeigen den Hauptweg des Metabolismus an, CYP, Cytochrom P-450-abhängige Monoxygenasen, mEH, mikrosomale Epoxidhydrolase

Das [7R,8S,9S,10R] konfigurierte (+)-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid stellt mit 82% das Hauptprodukt der vier stereoisomeren Dihydrodiolepoxide dar (Hall & Grover, 1990) und besitzt zugleich die höchste Mutagenität bzw. Kanzerogenität (Newbold *et al.*, 1976; Wood *et al.*, 1976).

Die anfänglich herrschende Meinung, dass die K-Region (Abb. 1.4) eines PAKs für seine mutagene bzw. kanzerogene Wirkung verantwortlich ist (Pullman & Pullman, 1955) wich der Erkenntnis, dass elektrophile Metaboliten wie das Dihydrodiolepoxid an der chemischen Kanzerogenese beteiligt sein müssen (Grover & Sims, 1968, Sims & Grover, 1974a; Baird *et al.*, 1975). Daraus ergaben sich zwei wichtige Fragen: 1. Repräsentieren Dihydrodiolepoxide eine generelle Gruppe von ultimalen kanzerogenen Metaboliten der PAKs und wenn ja 2. können diese strukturellen Merkmale auf Strukturen der reaktiven und kanzerogenen Metaboliten anderer PAKs übertragen werden? Diese Fragen führten zu der Annahme, dass das kritische Strukturmerkmal des BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxids die Anwesenheit einer Epoxidgruppe an einem gesättigten angulären Benzoring in der Molekülbucht von BaP ist. Daraus entwickelten Jerina & Lehr (1977) die Bay-Region-Theorie.

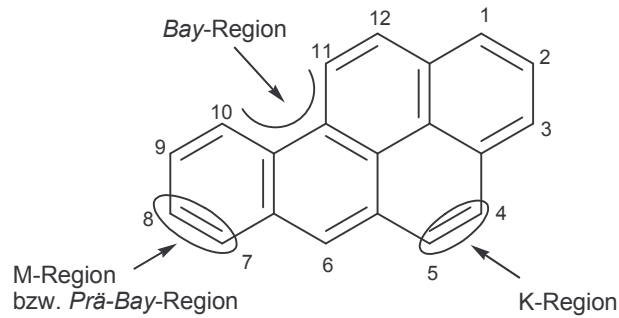


Abbildung 1.4: Bezeichnung typischer Molekülregionen am Beispiel von Benzo[a]pyren nach Pullman & Pullman (1955) und Jerina & Lehr (1977); M steht für Metabolismus, K für Krebs.

Diese Theorie wurde durch ein weiteres Postulat von Jerina *et al.*, im Jahr 1986 erweitert, nach dem eine quasi-diäquatoriale Lage der Hydroxylgruppen in Dihydrodiolepiden am angulären Benzolring als konformative Voraussetzung für dessen hohes mutagenes bzw. kanzerogenes Potential gilt (Abb. 1.5).

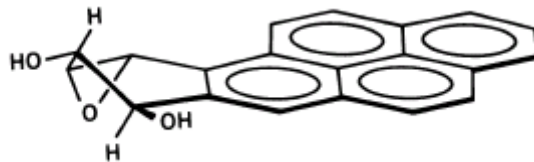


Abbildung 1.5: (+)-BaP-7R,8S-dihydrodiol-9S,10R-epoxid mit diäquatorialer Anordnung der OH-Gruppen an den Positionen 7 und 8 (entnommen aus: Chang *et al.*, 1987).

Diese Voraussetzung wird nur von der *anti*-Konfiguration des Oxiranringes in Bezug zur benzyli-schen Hydroxylgruppe erfüllt (Harvey, 1989), das *anti*-Dihydrodiolepid zeigt auch tatsächlich ein stärkeres mutagenes und tumorinitiierendes Potential als das entsprechende *syn*-Isomer (Wood *et al.*, 1977; Buening *et al.* 1978, Slaga *et al.*, 1979).

Dihydrodiolepidoxide binden aufgrund ihrer Elektrophilie kovalent an nukleophile Positionen von DNA (King *et al.*, 1976; Nakanishi *et al.*, 1977). Daher werden sie als ultimale Mutagene und Kanzerogene bezeichnet, während der metabolische Vorläufer, das Dihydrodiol, als proximal eingestuft wird (Miller, 1978; Doerjer *et al.*, 1984).

Im Falle des BaPs besteht die primäre DNA-Läsion sowohl *in-vitro* (Meehan & Straub, 1979) als auch *in-vivo* (Koreeda *et al.*, 1978) hauptsächlich aus einem Aralkylierungsprodukt, das durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der exozyklischen Aminogruppe an Position 2 des Desoxyguanosins und dem benzyli-schen Teil des *trans* geöffneten Oxiranylringes vom 7R,8S,9S,10R konfigurierten (+)-Isomer des Dihydrodiolepidoxides entsteht (Abb. 1.6)

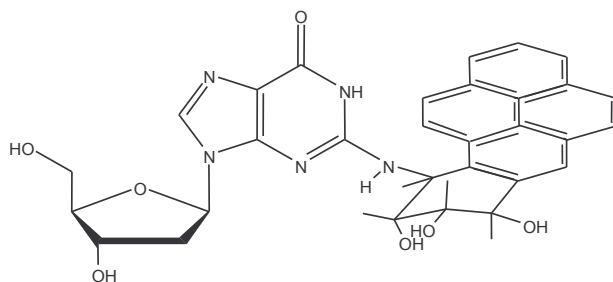


Abbildung 1.6: Desoxyguanosin-Addukt des Benzo[a]pyren-7R,8S-dihydrodiol-9S,10R-epoxids nach Inkubation des Mutterkohlenwasserstoffes mit DNA in Anwesenheit eines fremdstoffmetabolisierenden Systems

Neben der Bay-Region Theorie, die die Aktivierung von PAKs zu mutagenen bzw. kanzerogenen Dihydrodiolepiden, wird für PAKs mit niedrigem Ionisationspotential die Bildung von Radikalkationen über eine Cytochrom-P450 oder Peroxidase-katalysierte Einelektronoxidation (Cavalieri *et al.*, 1983; Cavalieri & Rogan, 1984 und 1990; Cavalieri & Rogan, 1995) postuliert. Die elektrophil reaktiven Radikalkationen können dann an Nucleobasen binden (Kodama & Nagata, 1977; Devanesan *et al.*, 1992). (Abb. 1.7). Redox-Cycling der gebildeten Chinone wirkt aufgrund der damit verbundenen Depletion an intrazellulärem NADH und Glutathion zytotoxisch (Chesis *et al.*, 1984; Lesko & Lorentzen, 1985; Monks *et al.*, 1992) und führten zusätzlich zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies („oxidativer Stress“), die zelluläre und genetische Schäden verursachen (Lorentzen & Ts'o, 1977).

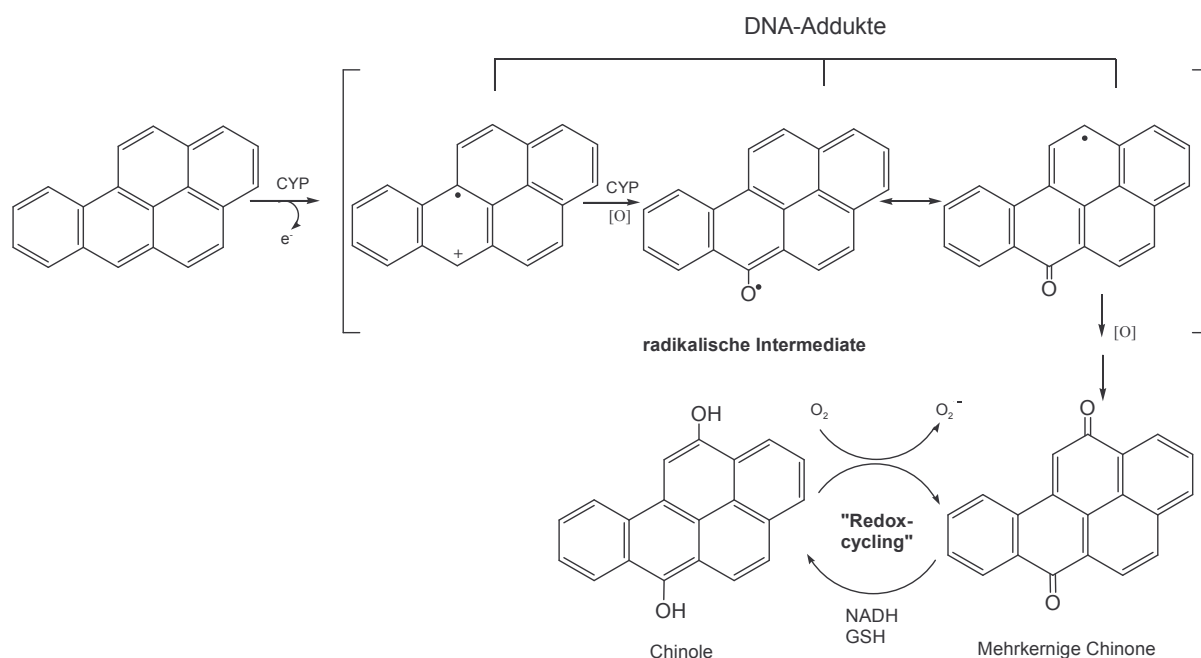


Abbildung 1.7: Einelektronoxidation von Benzo[a]pyren zu Radikalkationen unter Beteiligung von Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen. CYP, Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen; NADPH, reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotidphosphat

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung von PAKs besteht in der Biomethylierung und der Bildung reaktiver Sulfatester (Abb. 1.8). Hierzu wird eine Methylgruppe durch eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase in die elektronenreiche L-(*meso*-)-Region des PAKs eingeführt (Flesher *et al.*, 1983, 1986, 1990; Grimmer *et al.*, 1985; Myers *et al.*, 1988). Bei einigen PAKs wie 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen ist diese Methylgruppe bereits vorhanden. Die Methylgruppe wird nun durch Cytochrom P-450 in einen benzylichen Alkohol überführt (Chou *et al.*, 1981), der wiederum ein Substrat für Sulfotransferasen darstellt (Watabe *et al.*, 1982, 1986; Surh *et al.*, 1989; Ogura *et al.*, 1990) oder in Anwesenheit von ATP nicht-enzymatisch mit Phosphat verestert wird (Rogan *et al.*, 1980). Die nach spontaner Eliminierung der Abgangsgruppen Sulfat oder Phosphat entstehenden Carbokationen reagieren kovalent mit den nukleophilen Basen der DNA (Watabe *et al.*, 1987; Stansbury *et al.*, 1994).

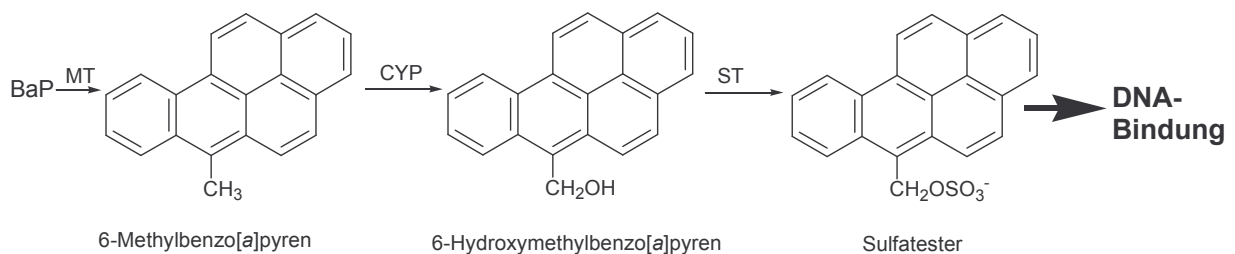


Abbildung 1.8: Bioalkylierung von Benzo[*a*]pyren (BaP) und die Bildung reaktiver Sulfatester.
CYP, Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen, ST, Sulfotransferasen, MT, Methyltransferase

Die Bildung von *o*-Chinonen von PAKs aus den *trans*-Dihydrodiolen wird als weiterer Aktivierungsweg von PAKs angesehen (Penning *et al.*, 1999) (Abb. 1.9). Dabei werden die Dihydrodirole zunächst durch die Dihydrodioldehydrogenase (Glatt *et al.*, 1979) in Katechole überführt und diese zu *o*-Chinonen oxidiert, was am Beispiel der Umsetzung des Benzo[*a*]pyrens-7,8-dihydrodiol zum 7,8-Chinon bereits gezeigt wurde (Smithgall *et al.*, 1988; Shou *et al.*, 1992; Flowers-Geary *et al.*, 1995; Burczynski *et al.*, 1998). Das gebildete Katechol unterliegt einer Autoxidation, wodurch reaktive und redoxaktive *o*-Chinone über ein intermediäres *o*-Semichinonradikalanion gebildet werden.

Dieser Metabolismusweg kann zu verschiedenen DNA-Schäden führen. Zum einen entstehen durch MICHAEL-Addition stabile Benzo[*a*]pyren-*o*-chinon Addukte an der N²-Position von Desoxyguanosin in Kalbsthymus- und Plasmid-DNA oder depurinierte DNA-Addukte durch Bindung an die N7-Position von Desoxyguanosin. Außerdem werden durch Redox-cycling reaktive Sauerstoffspezies (Superoxidradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal) gebildet, die zu oxidativen DNA-Schäden (8-Hydroxy-Desoxyguanosin) oder zu Hydroxylradikal-vermittelten DNA-Strangbrüchen führen (Breen & Murphy, 1995; Flowers *et al.*, 1996, 1997).

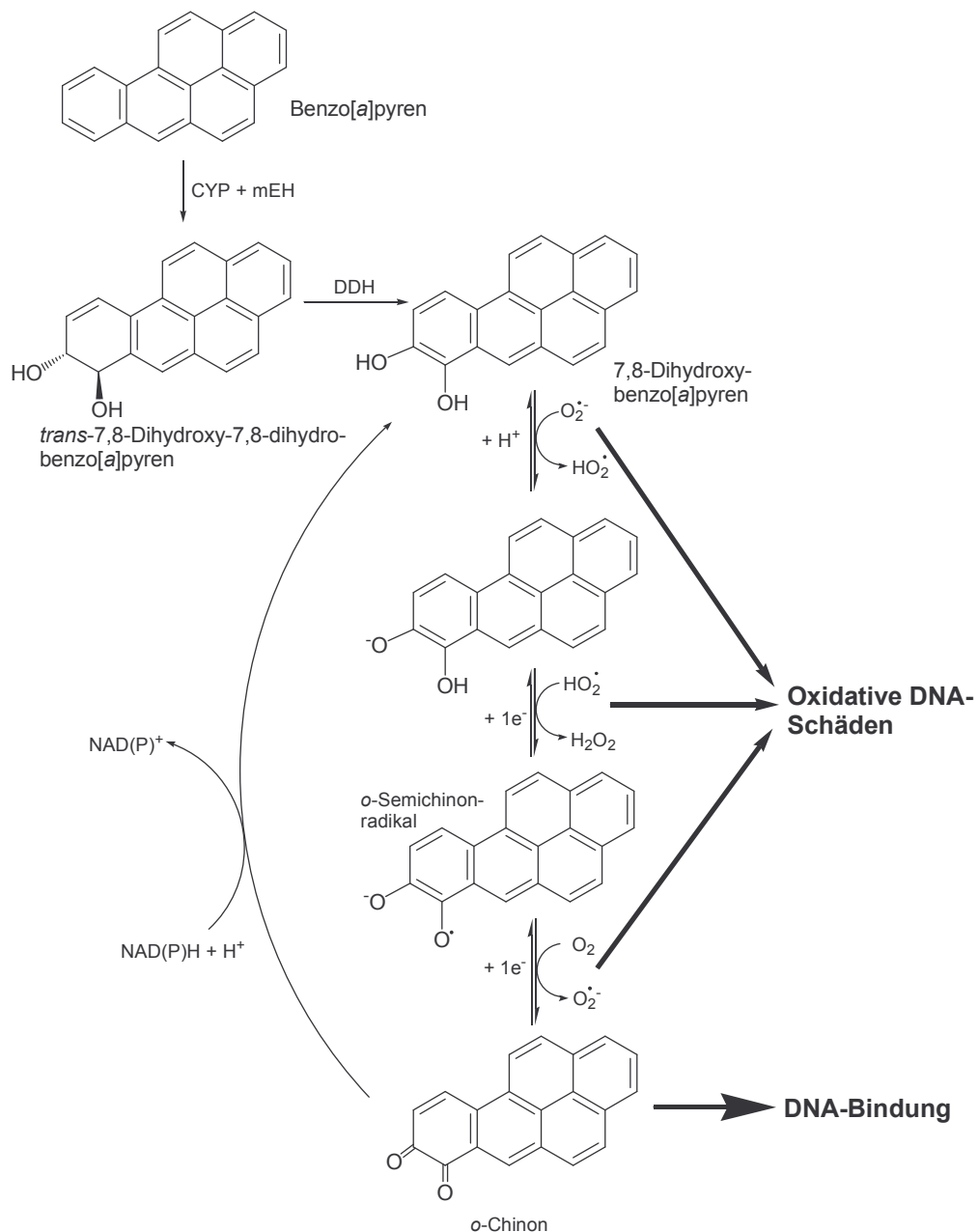


Abbildung 1.9: Bildung von reaktiven *ortho*-Chinonen am angulären Benzoring von Benzo[a]pyren nach enzymatischer Umsetzung des 7,8-Dihydrodiols mit Dihydrodioldehydrogenasen (DDH). CYP, Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen, mEH, mikrosomale Epoxidhydrolase; NADPH, NADPH, reduziertem Nikotinamid-adenin dinucleotidphosphat

Nach neuesten Erkenntnissen kann BaP auch zu einem elektrophil reaktiven Dialdehyd (Stansbury *et al.*, 2000) bzw. einem Säureanhydrid (Yang *et al.*, 2000), die durch Öffnung des aromatischen Ringsystems entstehen, metabolisch aktiviert werden. Die Bildung von Dicarbonsäuren durch Ringöffnung von Dibenz[*a,h*]anthracen in der Maus wurde allerdings schon vor 50 Jahren beschrieben (Heidelberger & West, 1951).

1.2.2 Mutagenität und Kanzerogenität polyaromatischer Kohlenwasserstoffe

Durch Reaktion einer mutagenen Substanz mit dem Erbmateriale der Zelle entstehen kovalente DNA-Addukte, die entweder durch zelluläre Reparatursysteme wieder entfernt werden können, womit der Schaden behoben wird (Friedberg, 1990; Kaina, 1993), oder es kommt durch Deletion oder Basenfehlpaarungen zu einer Mutation (You *et al.*, 1989; Jernström & Gräslund, 1994).

Sogenannte Indikatortests stellen den entstandenen DNA-Schaden fest, z.B. DNA-Bindung (³²P-Postlabeling, Randerath *et al.*, 1981; Beach & Gupta, 1992; Darnell *et al.*, 1994), DNA-Strangbrüche (Komet-Test, Kohn, 1991) und DNA-Reparatursynthese (UDS (*unscheduled DNA synthesis*) Westendorf, 1993).

In Mutationstests wird bestimmt, ob der DNA-Schaden tatsächlich zu einem gentoxischen Effekt führt. Es werden also spezifische, genetisch vererbare Ereignisse auf Gen-, Chromosomen- oder Genomebene erfasst.

Zur Bestimmung der Gentoxizität werden zahlreiche Verfahren angewendet: AMES-Test, HPRT-Test, Chromosomenaberrationstest (Swieringa *et al.*, 1991), Schwesterchromatid-Austauschtest (Swieringa *et al.*, 1991) oder Mikrokerntest (Mikronukleus-Test, Romagna, 1993).

In dem von Ames *et al.*, 1975 entwickelten Test, wird die Mutagenität durch Reversion von Histidin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium* nach Einwirkung von mutagenen Substanzen zur Histidin-Prototrophie bestimmt. Je nach Art der DNA-Schädigung, die zur Mutation führt, existieren verschiedene Stämme, z.B. solche, die sensitiv auf Mutagene reagieren, die Basenpaarsubstitutionen auslösen (TA1535, TA100) oder solche, die auf Rasterschub-Mutationen ansprechen (TA98, TA2637, TA97). Weiterhin werden Stämme verwendet, die sensitiv auf oxidativ wirkende Mutagene (z. B. reaktive Sauerstoffspezies) reagieren (TA102 und TA104) (Hakura *et al.*, 1994). Die verwendeten Stämme besitzen ein in unterschiedlichen Abschnitten mutiertes Histidinoperon (Maron & Ames, 1983), das durch Deletion im Excisionsreparatursystem (*uvrB*-Gen) sehr empfindlich auf mutagene Einflüsse reagiert. Zusätzlich wird die Sensitivität der Bakterienstämme einerseits durch eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran durch *rfa*-Mutation und andererseits durch ein pkm101-Plasmid mit einem fehleranfälligen SOS-Reparatursystem noch erheblich gesteigert (McCann *et al.*, 1975)

Zur Bestimmung der Gentoxizität in eukaryotischen Zellen wird häufig der HPRT-Test verwendet. Dieser beruht auf einer Vorwärtsmutation im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-(HPRT)-Gen in V79-Zellen des chinesischen Hamsters (Glatt, 1993). In einer neueren Variante des HPRT-Tests exprimieren die immortalen Säugerzellen stabil z.B. CYP1A1 und mikrosomale Epoxidhydrolase, so dass kein externes metabolisierendes Sys-

tem hinzugegeben werden muss. Während im AMES-Test die auxotrophen Prokaryoten durch Rückwärtsmutation wieder ihre dem Wildtyp entsprechende Prototrophie erlangen, verlieren die kultivierten Fibroblasten des chinesischen Hamsters ihre funktionsfähige Transferase und erlangen so eine Resistenz gegenüber Guanin-Analogen, z.B. 6-Thioguanin. Diese Verbindungen, die normalerweise durch das Enzym zu toxischen Metaboliten metabolisiert werden, können zur Selektion der mutierten Zellen dem Medium zugesetzt werden.

Zur Untersuchung des Endpunktes der Kanzerogenese (Entstehung eines Tumors) werden in der Regel zwei verschiedene Testsysteme verwendet. Zum einen dient der Initiations-Promotions-Test (Berenblum & Shubik, 1947) zur Erzeugung von benignen neoplastischen Läsionen der Mäusehaut, um eine qualitative und semiquantitative Einschätzung der kanzerogenen Wirksamkeit der Prüfsubstanz zu erhalten. Außerdem kann eine Unterscheidung in Initiator und Promotor vorgenommen werden, indem die Substanz, die als Tumorigen identifiziert werden soll, zunächst in einem biologisch inerten Lösungsmittel einmalig auf die rasierte Rückenhaut aufgebracht wird und anschließend über mehrere Wochen eine Behandlung mit dem Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) erfolgt.

Der zweite Test arbeitet mit neugeborenen Mäusen (*New born mouse tumorigenesis assay*), denen intraperitoneal die zu prüfende Substanz verabreicht wird (Buening *et al.*, 1978; Wislocki *et al.*, 1986). Dieses Verfahren wird außerdem dazu verwendet, die kanzerogenen Wirkungen auch auf andere innere Organe (Lunge, Leber, Milz, Darm etc.) zu erfassen, wobei die Adenome der Lunge zu den charakteristischen Erscheinungen nach Behandlung mit PAKs gehören. Durch potentere Kanzerogene werden auch vermehrt Leberadenome gebildet (Platt *et al.*, 2004).

Die oben beschriebenen „alternativen“ Aktivierungswege wurden bisher nur bei PAKs untersucht, die eine Bay-Region besitzen und damit auch zur metabolischen Aktivierung über vicinale Dihydrodiolepoxide befähigt sind. Für PAKs, die gentoxisch sind, aber aus strukturellen Gründen kein vicinales Dihydrodiolepoxid bilden können, sollten diese alternativen Aktivierungswege eine besondere Bedeutung haben. Dies ist bei den PAKs Benzo[*b*]fluoren (LaVoie *et al.*, 1979), Benzo[*ghi*]perylene (BghiP) (LaVoie *et al.*, 1979) und Anthanthren (Andrews *et al.*, 1978; La Voie *et al.*, 1979; Hermann, 1981; Platt *et al.*, 2002) der Fall, die alle mutagene Wirkungen im AMES-Test zeigen und fähig sind, die Stämme TA98 und TA100 von *S. typhimurium* zur Histidinprototrophie zu revertieren. Bei BghiP konnte mit dem Verfahren des ³²P-Postlabeling DNA-Addukte *in-vivo* und *in-vitro* nachgewiesen werden (Hughes *et al.*, 1993; Hughes & Phillips, 1993; Segerbäck & Vodicka, 1993; Randerath *et al.*, 1985). Für BghiP liegen nach Einschätzung der IARC (IARC, 1983) aufgrund der bisher durchgeführten *in vivo*-Tests (Hoffmann & Wynder, 1966; Deutsch-Wenzel *et al.*, 1983) keine ausreichenden Belege für eine Einstufung als Kanzerogen vor. Im Falle des Anthanthrens erfolgte nach Durchführung von *in-vivo*-Tests mit Mäusen und Ratten eine Einstufung sowohl als schwa-

ches Kanzerogen (Scribner, 1973; Cavalieri *et al.*, 1977; Deutsch-Wenzel *et al.*, 1983) als auch als Nichtkanzerogen (Hoffmann & Wynder, 1966; Van Duuren *et al.*, 1968; Lijinski & Garcia, 1972; LaVoie *et al.*, 1979; Cavalieri *et al.*, 1989), so dass eine widersprüchliche Aussage zur Kanzerogenität vorliegt, was sich auch in der Einschätzung der IARC widerspiegelt: „*There is limited evidence that anthanthrene is carcinogenic to experimental animals*“ (IARC, 1983).

1.3 Problemstellung und Arbeitsprogramm

Die Kanzerogenität vieler PAKs hängt von der Bildung elektrophil reaktiver Dihydrodiolepiden in einer Bay- oder Fjord-Region ab. Da jedoch auch PAKs ohne diese Strukturelemente genotoxische Eigenschaften besitzen, sollten neben dem klassischen Aktivierungsweg alternative Wege existieren, die zu mutagenen und kanzerogenen Metaboliten führen.

In dieser Arbeit sollen in vergleichenden Untersuchungen die Gründe für die Genotoxizität der hexazyklischen Kohlenwasserstoffe Anthanthren, das keine Bay- oder Fjord-Region enthält und BghiP, dessen Bay-Region keinen monokondensierten Benzolring besitzt, im Vergleich zu BaP ermittelt werden (Abb. 1.10). Anthanthren und BghiP sind in der Umwelt weit verbreitet, so kommt Anthanthren in Steinkohlenteer (Lang & Eigen, 1967), Ruß (Falk & Steiner, 1952), Autoabgasen (Grimmer & Böhnke, 1972) und Zigarettenrauch vor (Grimmer *et al.*, 1977b), während BghiP in Zigarettenrauch (Cooper & Lindsey, 1955), Autoabgasen (Grimmer *et al.*, 1977b) und Emissionen der Kohleverbrennung (Brockhaus & Tomingas, 1979) zu finden ist.

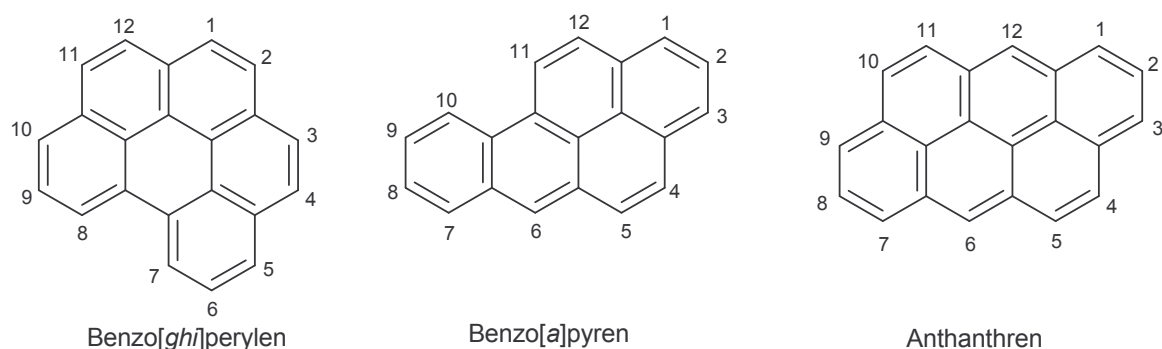


Abbildung 1.10: Zu untersuchende polyaromatische Kohlenwasserstoffe

Zur Bearbeitung der Fragestellung sollte von den PAKs zunächst der mikrosomale Metabolismus unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Zur Identifizierung der Metaboliten müssen diese mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) getrennt, isoliert und spektroskopisch (UV, MS, NMR) analysiert werden. Aus der Struktur der Metaboliten lassen sich Hinweise auf ihre genotoxische Aktivität ableiten. Zur Quantifizierung der Metaboliten sollte der Mutterkohlenwasserstoff radioaktiv markiert sein. Da eine Voraussetzung für die

Gentoxizität von chemischen Stoffen ihre kovalente Bindung an die DNA ist, soll diese in Kooperation mit einem Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe untersucht werden. Schließlich soll als Maß für die Gentoxizität der Metaboliten ihre Mutagenität in Bakterien (AMES-Test) bestimmt werden.

1.3.1 Chemische Synthesen von Derivaten des Anthanthrens und Bezo[ghi]perylens

Die Identifizierung von Metaboliten der PAKs wird durch die entsprechenden Vergleichssubstanzen erleichtert (Platt & Reischmann, 1987; Platt & Schollmeier, 1994; Platt *et al.*, 2002).

Chinone werden durch Oxidation der PAKs mit Natriumdichromat zu Chinonen (Cho & Harvey, 1976) gewonnen, die sich mit Natriumborhydrid zu Diphenolen reduzieren lassen (Cho & Harvey, 1976).

Weiterhin können K-Region-Derivate von PAKs relativ einfach durch direkten Umsatz des Mutterkohlenwasserstoffs gewonnen werden. Dazu wird der Angriff von Osmium(VIII)-oxid an die elektronenreiche K-Region ausgenutzt. Der gebildete Osmatester lässt sich reduktiv zum *cis*-Dihydrodiol spalten. Dehydrierung mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon führt zum *o*-Chinon, das sich mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Sauerstoff zum *trans*-Dihydrodiol reduzieren lässt (Platt & Oesch, 1982).

Das entsprechende Arenoxid ist sowohl aus dem *cis*-Dihydrodiol (Dansette & Jerina, 1974) als auch aus dem *trans*-Dihydrodiol (Harvey *et al.*, 1975; Oesch *et al.*, 1980) zugänglich. In dieser Arbeit wurde die Herstellung der Arenoxide zum einen durch rein enzymatische Synthese (mikrosomale Inkubation) realisiert und zum anderen halbsynthetisch, in dem ein mikrosomaler Metabolit mit *trans*-Dihydrodiol-Struktur mit Natriumhydrid und *N*-Tosylimidazol in ein Arenoxid überführt wurde (Hicks & Frasler, 1974; Ferrier & Tyler, 1985). Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Epoxidierung durch Kaliumperoxymonosulfat (Murray & Jeyaraman, 1984, 1985).

1.3.2 Enzymatische Bildung von Metaboliten

Zur Gewinnung der Phase I-Metaboliten der zu untersuchenden PAKs sollten diese mit Mikrosomenpräparationen der Rattenleber in physiologischem Puffer bei 37°C umgesetzt werden. Mikrosomen sind Fragmente des endoplasmatischen Retikulums, das die für den Phase I-Metabolismus benötigten Enzyme, im wesentlichen Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und Epoxidhydrolase enthält. Das NADPH-

regenerierende Gemisch, bestehend aus NADP⁺, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase muss noch hinzugefügt werden.

Zur Erhöhung der Aktivität der am Stoffwechsel von PAKs beteiligten P450-Isoenzymen und damit des Ausmaßes der metabolischen Umsetzung der Substrate wurden Lebermikrosomen von Ratten verwendet, die zuvor mit Aroclor 1254, 3-Methylcholanthren oder Phenobarbital behandelt worden waren. Die Behandlung der Versuchstiere mit dem zu untersuchenden PAK würde der *in-vivo* Situation am nächsten kommen, da schon geringe Mengen der Vertreter dieser Verbindungsklasse selbst den Enzymgehalt des hepatischen endoplasmatischen Retikulums, besonders an Cytochrom P-450 der 1A-Subfamilie und damit ihren eigenen Stoffwechsel erhöhen (Ioannides & Parke, 1993). Diese Methode kann jedoch aus Kostengründen nicht angewendet werden.

3-Methylcholanthren induziert v.a. Cytochrome P4501A1 und 1A2 (Guengerich & Shimada, 1991; Ioannides & Parke, 1993), während Phenobarbital vorwiegend die Isoformen 2B1 und 2B2 induziert (Ioannides & Parke, 1990; Koymans *et al.*, 1993). Da die durch Aroclor 1254 induzierte Expression der P450-abhängigen Monooxygenasen annähernd eines Gemisches von Phenobarbital und 3-Methylcholanthren entspricht (Ryan *et al.*, 1979, 1982, 1984), wurde ein Großteil der mikrosomalen Inkubationen mit Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 durchgeführt, um das breite Spektrum unterschiedlicher Cytochrom P450-Isoenzyme zu nutzen.

Durch eine Hemmung der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) mit 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid (TCPO) kann die enzymatische Hydrolyse der elektrophil reaktiven Arenoxide gehemmt werden (Oesch *et al.*, 1980), so dass diese detektiert und identifiziert werden können. Metaboliten, die in Gegenwart von TCPO nicht entstehen, besitzen mindestens eine Dihydrodiol-Struktur, während es sich bei Metaboliten, deren Bildung unter diesen Bedingungen verstärkt wird, um Arenoxide oder um deren Isomerisierungsprodukte, den Phenolen, handelt.

Für die Auftrennung der Metabolitengemische sollte die Methode der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen (RP-18; *reversed phase*) eingesetzt werden, da sie sich aufgrund institutseigener Erfahrungen bewährt hat (Platt, 1986; Schollmeier, 1989; Degenhardt, 1997).

Zur Detektion und teilweise auch zur Identifizierung der Metaboliten von BghiP dienen in erster Linie UV-Spektren, die ein Diodenarraydetektor während der HPLC von jedem Metabolitenpeak aufnimmt und speichert. Anhand dieser UV-Spektren können durch Chromophorenvergleiche wichtige Hinweise auf die vorliegende Molekülstruktur erhalten werden. Zur Bestätigung bzw. Untermauerung der Struktur wird die Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie genutzt.

1.3.3 Trennung der Enantiomeren von *trans*-Dihydrodiolen

Da die nach dem Angriff von Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen entstehenden Arenoxide durch anschließende Hydrolyse mit m-EH in *R,R*- bzw. *S,S*-Enantiomere der *trans*-Dihydrodirole überführt werden, sollen diese durch HPLC getrennt werden. Dies kann entweder durch die Umsetzung zu Diastereomeren (Schollmeier *et al.*, 1986) und deren Trennung an einer Normalphase oder durch Trennung der Enantiomerenmischung an einer chiralen stationären Phase erreicht werden. So haben sich zur Trennung der Enantiomeren von *trans*-Dihydrodiolen eine mit (-)-(*R*)-2-(2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenylidenoxy)-carbonsäure (Funk *et al.*, 1994) oder eine mit Cellulose-tris-(*N*-3,5-dimethylphenylcarbammat) modifizierte Kieselgelphase bewährt (Landsiedel *et al.*, 1998).

1.3.4 Quantitative Untersuchung der Biotransformation von Benzo[*ghi*]perylen

Zur quantitativen Bestimmung des metabolischen Umsatzes muss das Substrat in radioaktiv markierter Form (^3H oder ^{14}C) vorliegen. Während die Gewinnung von ^{14}C -PAKs aufwändige Radiosynthesen voraussetzt, lässt sich der Kohlenwasserstoff direkt durch Tritiumaustausch markieren, was durch eine kommerzielle radioaktive Markierung von BghiP realisiert werden soll. Durch das Sammeln von Eluaten während der HPLC, Messung der Aktivitäten der Fraktionen und Erstellen eines Radiochromatogramms, kann unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des eingesetzten Substrates sowohl der Gesamtumsatz als auch die Mengen der einzelnen Metaboliten bestimmt werden. Daraus lassen sich Eichkurven erstellen, bei denen die Menge der Metaboliten mit den Peakflächen im Chromatogramm in Beziehung gesetzt werden. An den erhaltenen Regressionsgeraden können die Mengen derjenigen Metaboliten berechnet werden, die in mikrosomalen Inkubationen mit unmarkiertem Substrat entstanden sind.

1.3.5 Bestimmung der Mutagenität von Benzo[*ghi*]perylen und seiner mikrosomalen Metaboliten im AMES-Test

Zur Untersuchung der Mutagenität des Mutterkohlenwasserstoffes bzw. dessen mutmaßlich gentoxischen Metaboliten dient der AMES-Test, der relativ wenig aufwändig ist. Hierbei sollen die Stämme TA98 und TA100 eingesetzt werden, die gegenüber Mutagenen mit alkylirender Wirkung empfindlich sind und durch Basensubstitution bzw. Rasterschub zur Histidinprototrophie rückmutiert werden. Weiterhin können durch Enzymmodulation auch Erkenntnisse über die Aktivierungswege zu ultimal mutagenen Stoffwechselprodukten gewonnen werden. So kann die Bedeutung der Epoxidhydrolase bei der metabolischen Aktivierung

zu Mutagenen durch Einsatz des selektiven Hemmstoffs TCPO im Stamm TA98 erkannt werden.

PAKs zeigen keine direkte mutagene Aktivität, sondern müssen im AMES-Test durch Zugabe von Enzympräparationen mit den entsprechenden Ko-Faktoren zu gentoxischen Metaboliten umgesetzt werden, da den verwendeten *S. typhimurium* Teststämmen die zur Metabolisierung der PAK notwendigen Enzyme fehlen. Als metabolisch aktivierendes System werden in erster Linie die postmitochondriale hepatische Fraktion männlicher Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren eingesetzt, da sich dieser Induktor hinsichtlich der Aktivierung von BghiP zu mutagenen Metaboliten am effektivsten erwiesen hat (Fickler, 2004).

Zur Bestimmung der möglichen mutagenen Metaboliten im AMES-Test sollte zunächst in ersten orientierenden Versuchen ein Gesamtbild der Mutagenität des Metabolitengemisches aus mikrosomaler Inkubation des BghiP gewonnen werden. Dies wird durch Verwendung einer Methode realisiert, die zur routinemäßigen Bestimmung der Mutagenität gesammelter Luftstäube dient, um den Grad der Umweltverschmutzung mit z.B. PAKs festzustellen (Lewtas *et al.*, 1990; Arey *et al.*, 1992; Erdinger *et al.*, 1997). Dabei werden die Luftproben mit HPLC in Fraktionen unterteilt und diese dann im AMES-Test auf Mutagenität geprüft. Die Revertanzahl jedes Eluats wird gegen die Elutionszeit aufgetragen, woraus ein „Mutagramm“ resultiert, in dem Fraktionen mit erhöhter mutagene Aktivität mit entsprechenden Peaks im Chromatogramm korreliert werden können.

Diese Vorgehensweise soll auf das durch mikrosomale Inkubation von BghiP erhaltene Metabolitengemisch angewendet werden, indem die Revertanzahl einzelner Fraktionen einer HPLC eines entsprechenden Extraktes gegen die Elutionszeit aufgetragen wird. Eine erhöhte Aktivität bestimmter Eluate sollen dann anhand des Chromatogramms auf einen möglichen mutagenen Metaboliten von BghiP hinweisen. Dieser Metabolit wird dann chromatographisch isoliert und in der Dosis-Wirkungskurve die spezifischen Mutagenität festgestellt.

Metaboliten, die ausschließlich in mikrosomalen Inkubationen in Anwesenheit von TCPO entstehen und als Arenoxide identifiziert werden, sollen nach deren chromatographischer Isolierung oder synthetischer Herstellung auf direkte Mutagenität in den Stämmen TA98 und TA100 untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Synthesen

2.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Anthanthren (Dibenzo[*def,mno*]chrysen, CRM 091 *certified*; Promochem, Wesel)
Acetanhydrid (Merck, Darmstadt)
Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral (Aktivitätsstufe I), Korngröße 0,063-0,200 mm (Merck, Darmstadt)
Benzo[*ghi*]perylene (RAH-009 Promochem, Wesel)
Benzol (Merck, Darmstadt)
Calciumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Chloroform (Roth, Karlsruhe)
2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon (Merck, Darmstadt)
N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)
1,4-Dioxan (Roth, Karlsruhe)
Ethanol (Roth, Karlsruhe)
Ethylacetat (Roth, Karlsruhe)
n-Hexan (Roth, Karlsruhe)
Kaliumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
Kaliumperoxymonosulfat (Aldrich, Taufkirchen)
Kieselgel 60 (Fluka, Taufkirchen)
Magnesiumsulfat (Merck, Darmstadt)
(-)- α -Menthoxyessigsäurechlorid (Aldrich, Taufkirchen)
Methanol (Baker, Griesheim)
Natriumborhydrid (Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt)
Natriumdichromat (Merck, Darmstadt)
Natriumhydrid (Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (Roth, Karlsruhe)
Natriumhydrogensulfit (Riedel de Haën, Seelze)
Natriumsulfat (Merck, Darmstadt)
4-(4-Nitrobenzyl)pyridin (Merck, Darmstadt)
Osmium(VIII)-oxid (Fluka, Taufkirchen)
Pyridin (Merck, Darmstadt)
Tetra-*n*-butylammoniumhydrogensulfat (Merck, Darmstadt)
N-Tosylimidazol (Fluka, Taufkirchen)
Triethylamin (Merck, Darmstadt)

2.1.2 Chromatographische und Spektroskopische Methoden

Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) diente eine HPLC-Anlage, bestehend aus Spectra Physics SP 8700 *solvent delivery system* (Kontrolleinheit und Pumpe; Spectra Physics, Darmstadt) und einem Agilent 1100 Series Dioden Array-Detektor [Software: LC 3D ChemStation Rev. A. 08.03 [847] (Agilent Technologies, Karlsruhe)]. Die Elutionsmittel wurden durch Millipore-Filter (0,45 μm ; HVLP 04700) filtriert und während der Chromatographie unter einem Heliumüberdruck von 1,5 bar gasarm gehalten. Die Proben wurden aus Kapillarschleifen über ein Hochdruckinjektionssystem (C6U, Valco, Schenk, Schweiz) auf die

Säule gegeben. Die Trennung erfolgte mit C18 Umkehrphasen (Knauer (Berlin), LiChrospher RP18e bzw. Spherisorb S ODS2, 5 μm , 4 x 250 mm). Zur analytischen Trennung der diastereomeren α -Menthoxyacetate wurde eine Säule mit underivatisiertem Kieselgel verwendet [Knauer (Berlin), LiChrospher 60 Si, 5 μm , 4 x 250 mm]. Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F254 von Merck benutzt.

UV-Vis-Spektren wurden mit einem Dioden Array Detektor (s. oben) bei 254 nm aufgenommen. EI- und FD-Massenspektren wurden mit einem Varian MAT CH 7A (Ionisationsspannung: 70 eV) bzw. Finnigan MAT 95 (Emitterheizrate: 100 mA/min, Saugspannung: 5 kV, Beschleunigungsspannung: 5 kV) Massenspektrometer gemessen.

Protonen-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AM 300 oder AM 400 Spektrometer bei 300 bzw. 400 MHz mit dem jeweils angegebenen Lösungsmittel aufgenommen. Bezugssubstanz war Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm).

2.1.3 Oxidation der Kohlenwasserstoffe Anthanthren und Benzo[ghi]perylen

2.1.3.1 Chinone des Anthanthrens

100 mg (0,36 mmol) Anthanthren wurden in 10 ml Acetanhydrid suspendiert, 0,38 g (1,26 mmol) Natriumdichromat in 5 ml Eisessig zugegeben und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Fällung in Wasser und Trocknung wurde das Chinongemisch in 500 ml Chloroform gelöst und über 30 g Aluminiumoxid (Aktivität I, 70-230 mesh) filtriert und zur Trockne gebracht. Die Masse der braun-roten Substanz betrug 59,8 mg (0,2 mmol, Ausbeute: 56%). HPLC-Analyse mit LiChrospher RP18e (Methanol/Wasser 80:20, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) ergab drei Substanzen im Mengenverhältnis (Integration der erhaltenen Peakflächen): 1a: 25%, 1b: 15%, 1c: 60%. Da eine Spektrenbibliothek von synthetischen Referenzsubstanzen des Anthanthrens zur Verfügung steht (Platt *et al.*, 2002), konnten 1a, 1b und 1c durch Vergleich mit den UV-Spektren identifiziert werden: bei 1a handelt es sich um Anthanthren-1,6-chinon, bei 1b um Anthanthren-3,6-chinon und bei 1c um Anthanthren-6,12-chinon (s. Abb. 3.3, Abschn. 3.1.1). Durch semipräparative Dünnschichtchromatographie (Chloroform/Acetonitril, 95:5, V/V) wurden Anthanthren-1,6-chinon 1a und Anthanthren-3,6-chinon 1b (R_f -Wert = 0,42) gemeinsam von Anthanthren-6,12-chinon 1c (R_f -Wert = 0,64) abgetrennt. Eine Trennung des Anthanthren-1,6-chinons 1a von Anthanthren-3,6-chinon 1b konnte durch HPLC (Spherisorb S ODS2, 5 μm , 4x250 mm, Methanol/Wasser, 90/10, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) erreicht werden (t_R von Anthanthren-1,6-chinon 1a = 13,5 min, t_R von Anthanthren-3,6-chinon 1b = 14,2 min, $\alpha = 1,06$), (s. Abb. 3.2 B, Abschn. 3.1.1).

2.1.3.2 Chinone des Benzo[*ghi*]perylens

20 mg (72,4 μ mol) BghiP wurden analog zu Anthanthren (Abschn. 2.1.3.1) mit 175 mg (0,6 mmol) Natriumdichromat in Acetanhydrid oxidiert. Die Masse der dunkelbraunen Substanz betrug nach Trocknung 17,5 mg (57 μ mol, Ausbeute: 79%). In der HPLC-Analyse mit LiChrospher RP18e (Methanol/Wasser 90/10, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) eluierten drei Substanzen im folgenden Mengenverhältnis (Integration der erhaltenen Peakflächen): 2a: $t_R = 7,7$ min, 84%, 2b: $t_R = 9,0$ min, 4% und 2c: $t_R = 10,8$ min, 11% (s. Abb. 3.7, Abschn. 3.1.2).

2a und 2c wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 voneinander getrennt. Mit Toluol/Dichlormethan/Ethylacetat, 80/20/2, V/V wurde zunächst ein Gemisch von 2b und 2c eluiert und mit Dichlormethan/Ethylacetat, 90/10, V/V schließlich 2a, 2b und 2c liessen sich durch HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 90/10, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) voneinander trennen (t_R von 2b: 5,9 min, t_R von 2c: 7,6 min, $\alpha = 1,4$).

2a (MG: 306,31 g/mol)

FD-MS: m/z 306 (M^+) (s. Abb. 7.1, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 248, 290, 300, 310, 326, 340, 432 (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

2b (MG: 306,31 g/mol)

FD-MS: m/z 306 (M^+) (s. Abb. 7.1, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 256, 274, 284, 324, 340, 354, 482 (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

2c (MG: 306,31 g/mol)

FD-MS: m/z 306 (M^+) (s. Abb. 7.1, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 240, 304, 308, 340, 394, 490, 552 (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

2.1.4 Reduktion der Chinone und Acetylierung der Hydrochinone

2.1.4.1 Reduktion der Chinone des Benzo[*ghi*]perylens

4,68 mg (15 μ mol) des Chinongemisches 2 (Abschn. 2.1.3.2) wurden in 1 ml trockenem DMF mit 9,5 mg (0,25 mmol) Natriumborhydrid unter Stickstoff und Feuchtigkeitsausschluß umgesetzt. Nach einer Stunde Rührzeit wurde auf Eis gegossen und die alkalische Lösung mit 4%iger Salzsäure auf pH~4 eingestellt. Mit Ethylacetat wurde dreimal extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Wasserstrahlpumpenvakuum entfernt. Durch HPLC des Rückstandes an Umkehrphasen (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 90/10, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) wurden die Reduktionsprodukte 3 voneinander getrennt und eluierten im folgenden Mengenverhältnis (Integration der Peakflächen): 3a: $t_R = 4,8$ min, 3%, 3b: $t_R = 5,1$ min, 80% und 3c: $t_R = 6,0$ min, 16% (s. Abb. 3.7, Abschn. 3.1.2).

3a (MG: 310,35)

FD-MS: m/z 310 (M^+) (s. Abb. 7.2, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 242, 260, 272, 284, 294, 308, 322, (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

3b (MG: 308,33)

FD-MS: m/z 308 (M^+) (s. Abb. 7.2, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 262, 280, 296, 308, 344, 400, 424 (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz), Aceton d_6 , δ (ppm) 7,56 (d, 2H, H_6, H_9 , $J_{5,6} = J_{9,10} = 9,8$ Hz), 8,12 (d, 2H, H_3, H_{12} , $J_{3,4} = J_{11,12} = 9,8$ Hz), 8,37 (s, 2H, H_1, H_2), 8,45 (d, 2H, H_4, H_{11} , $J_{3,4} = J_{11,12} = 9,8$ Hz), 8,82 (d, 2H, H_5, H_{10} , $J_{5,6} = J_{9,10} = 9,8$ Hz), 9,36 (s, 2H, C-OH,) (s. Abb. 7.2, Anhang)

3c (MG: 308,33)

FD-MS: m/z 308 (M^+) (s. Abb. 7.2, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 260, 294, 348, 380, 400, 424 (s. Abb. 3.9, Abschn. 3.1.2)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz), Aceton d_6 , δ (ppm) 6,84 (d, 2H, H_{12} , $J_{11,12} = 8,4$ Hz), 7,01 (d, 2H, H_9 , $J_{8,9} = 8,4$ Hz), 7,32 (m, H_3, H_4, H_{11}), 7,42 (d, 2H, H_6 , $J_{5,6} = 8,8$ Hz), 7,63 (s, 2H, H_1, H_2), 7,79 (d, 2H, H_5 , $J_{5,6} = 8,8$ Hz), 9,27 (d, 2H, H_8 , $J_{8,9} = 8,4$ Hz) (s. Abb. 7.2, Anhang)

2.1.4.2 7,8-Diacetoxybenzo[ghi]perylene 4

4,3 mg (14 μmol) des Chinongemisches 2 wurden in 1 ml DMF mit 9 mg Natriumborhydrid (0,24 mmol) unter Stickstoffbegasung und Feuchtigkeitsausschluß umgesetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde das Acetylierungsgemisch bestehend aus 250 μl (2,64 mmol) Acetanhydrid und 30 μl (0,38 mmol) Pyridin hinzugegeben und 24 Stunden gerührt. Es wurde mit eiskaltem Wasser 30 min hydrolysiert, mit 1N Salzsäure auf pH 3 angesäuert, und der dunkelbraune Niederschlag abgenutscht, dessen Gewicht nach Trocknen 3,6 mg (11,3 μmol) betrug. Vom gewünschten acetylierten Produkt 4 wurden mittels HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol, Fluß: 0,8 ml/min) 4: $t_R = 8,3$ min, 900 μg (2,3 μmol) isoliert.

4 (MG = 392,40)

FD-MS: m/z 392 (M^+) (s. Abb. 7.3, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 252, 276, 290, 300, 332, 370, 390 (s. Abb. 3.10 B, Abschn. 3.1.2.1)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz), CDCl_3 , δ (ppm) 2,57 (s, 6H, $-\text{OCOCH}_3$), 7,81 (d, 2H, H_6, H_9 , $J_{5,6} = J_{9,10} = 8,6$ Hz), 8,11 (d, 2H, H_3, H_{12} oder H_4, H_{11} , $J_{3,4} = J_{11,12} = 9,0$ Hz), 8,17 (d, 2H, H_3, H_{12} oder H_4, H_{12} , $J_{3,4} = J_{11,12} = 9,0$ Hz), 8,37 (s, 2H, H_1, H_2), 8,96 (d, 2H, H_5, H_{10} , $J_{5,6} = J_{9,10} = 8,6$ Hz) (s. Abb. 7.3, Anhang)

2.1.4.3 1,6-Diacetoxybenzo[*a*]pyren 5

1,5 mg (5,3 μ mol) Benzo[*a*]pyren-1,6-chinon (Synthese durch Dr. H. Frank, Institut für Toxikologie, Universität Mainz) wurden in 1 ml trockenem DMF mit 3 mg (79,3 μ mol) Natriumborhydrid unter Stickstoffbegasung und Feuchtigkeitsausschluß umgesetzt. Nach einer Stunde wurden 1,8 ml (19 mmol) Acetanhydrid und 0,2 ml (2,5 mmol) Pyridin hinzugegeben und weitere 4 Stunden gerührt. Nach 30 minütiger Hydrolyse mit Wasser wurde mit 1N Salzsäure auf pH 3 angesäuert, dreimal mit 10 ml Chloroform extrahiert und die vereinten organischen Phasen nach Trocknung über Magnesiumsulfat eingeengt. Mit TLC (Chloroform/Acetonitril 95:5, V/V), R_f -Wert = 0,6) und HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser 80:20, V/V Fluß: 0,8 ml/min, t_R = 10,0 min, Reinheit: 96%) wurde eine vollständige Umsetzung zu 5 nachgewiesen.

5 (MG = 368,38)

FD-MS: m/z 368 (M^+) (Abb. 7.10, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 256, 266, 286, 296, 356, 374, 394, 410 (Abb. 7.10, Anhang)

2.1.5 K-Region *trans*-Dihydrodirole des Benzo[*ghi*]perylens

(Reaktionsschemata, Abschn. 3.1.3, Abb. 3.11 und Abb. 3.12)

2.1.5.1 *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen 6

In einem Bördelrandgefäß wurde eine Lösung von 20 mg (0,072 mmol) BghiP in 4,0 ml Benzol und 1,2 ml Pyridin mit 20 mg (0,08 mmol, 1,1 Äquivalente) Osmium(VIII)-oxid in 300 μ l Benzol versetzt. Nach 14 Tagen Reaktionszeit unter Lichtausschluß (Kontrolle des Reaktionsverlaufs mit TLC: Chloroform/Methanol 99:1, V/V) wurde der unlösliche Anteil des Reaktionsgemisches durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit 6 ml wässriger 6%iger Natriumhydrogensulfatlösung eine Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt, auf 10 ml Eiswasser gegossen, dreimal mit 10 ml Ethylacetat extrahiert und nach Trocknen der vereinten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat das Lösungsmittel im Wasserstrahlpumpenvakuum entfernt. HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, in 40 min auf 100%, Fluß: 0,8 ml/min) zeigte ein stark polares Nebenprodukt (t_R = 5,6 min, 13%), als Hauptprodukt das *cis*-3,4-Dihydrodiol 6a (t_R = 29,0 min, 48%), ein weiteres Nebenprodukt (t_R = 36,6 min, 5%) und das Edukt BghiP (t_R = 53,8 min, 34%).

6a (MG = 310,35)

FD-MS: m/z 310 (M^+) (s. Abb. 7.5, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 242, 260, 272, 284, 294, 310, 322, 336 (s. Abb. 3.11, Abschn. 3.1.3).

Das Rohprodukt wurde im ungereinigten Zustand in 2 ml 1,4-Dioxan aufgenommen und mit 150 mg (0,66 mmol) 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon (DDQ) 3,5 Stunden bei Raum-

temperatur umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen. Mit 10 ml gesättigter wässriger Natriumcarbonatlösung wurde überschüssiges DDQ entfernt und die wässrige Phase nochmals dreimal mit 10 ml Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 trennte zunächst unumgesetztes BghiP mit Chloroform ab, während mit Chloroform/Ethanol (70:30, V/V) das 3,4-Chinon 7 eluierte (2,7 mg; 8,8 μ mol, Gesamtausbeute: 12%).

7 (MG = 306,31)

FD-MS: m/z 306 (M^+) (s. Abb. 7.5, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 256, 274, 284, 324, 340, 352, 462 (s. Abb. 3.11, Abschn. 3.1.3)

^1H NMR (300 MHz) (CD_2Cl_2) δ 7,86 (pt, 1H, H_6 oder H_9 , $J_{5,6}$ oder $J_{9,10} = 7,9$ Hz), 8,04 (d, 1H, H_{12} , $J_{11,12} = 8,8$ Hz), 8,12-8,17 (m, 4H, H_1 , H_2 , H_6 , H_9), 8,23 (d, 1H, H_{11} , $J_{11,12} = 8,8$ Hz), 8,31 (d, 1H, H_5 , $J_{5,6} = 7,9$ Hz), 8,46 (d, 1H, H_1 oder H_2 , $J_{1,2} = 8,4$ Hz), 8,61 (d, 1H, H_{10} , $J_{9,10} = 7,9$ Hz), 8,90 (d, 1H, H_7 oder H_8 , $J = 8,0$ Hz), 9,01 (d, 1H, H_7 oder H_8 , $J = 8,0$ Hz) (s. Abb. 7.5, Anhang).

1 mg (3,3 μ mol) 7 wurden in 10 ml Ethanol/Wasser (13/2, V/V) suspendiert und mit 3 mg (80 μ mol) Natriumborhydrid 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Luftzutritt zu 6 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 10 ml Eiswasser gegossen, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, in 40 min auf 100%, Fluß: 0,8 ml/min) zeigte ein Hauptprodukt 6 ($t_R = 28$ min), das flüssigkeitschromatographisch (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 80/20, V/V, Fluß: 0,8 ml/min, $t_R = 8,6$ min) gereinigt wurde.

6 (MG = 310,35)

FD-MS: m/z 310 (M^+) (s. Abb. 7.5, Anhang)

UV λ_{\max} (nm): 242, 260, 272, 284, 294, 308, 322, 336 (s. Abb. 3.11, Abschn. 3.1.3)

^1H NMR (300 MHz), Aceton d_6 , δ (ppm) 5,14 (d, 1H, H_3 oder H_4 , $J_{3,4} = 9,8$ Hz), 5,23 (d, 1H, H_3 oder H_4 , $J_{3,4} = 9,8$ Hz), 7,78 (pt, 2H, H_6 , $J_{6,5} = 7,4$ Hz, $J_{6,7} = 7,8$ Hz), 7,99 (d, 1H, H_5 , $J_{5,6} = 7,4$ Hz), 8,04-8,08 (pt, H_9), 8,09 (s, 2H, H_1, H_2), 8,23-8,26 (m, 2H, $\text{H}_{11,12}$), 8,3 (d, 1H, H_{10} , $J_{10,9} = 7,8$ Hz), 8,83 (d, 1H, H_7 , $J_{7,6} = 8,0$ Hz), 8,99 (d, 1H, H_8 , $J_{8,9} = 8,0$ Hz) (s. Abb. 7.5, Anhang).

2.1.5.2 *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*gh*]perylene 8

In einem Bördelrandgefäß wurde eine Lösung von 47,5 mg (0,172 mmol) BghiP in 10 ml Benzol und 2 ml Pyridin mit 192 mg (0,76 mmol, 4,4 Äquivalente) Osmium(VIII)-oxid in 112 µl Benzol versetzt. Nach 14 Tagen Reaktionszeit unter Lichtausschluß (Kontrolle des Reaktionsverlaufs mit TLC: Chloroform/Methanol 99:1, V/V) wurde der unlösliche Anteil abzentrifugiert und dieser mit 10 ml wässriger 6%iger Natriumhydrogensulfidlösung umgesetzt. Nach Aufarbeitung analog 2.1.5.1 zeigte die HPLC-Analyse des Rohproduktes (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V in 40 min auf 100%, Fluß: 0,8 ml/min) als stark polares Hauptprodukt *cis*-3,4-*cis*-11,12-Bisdihydrodiol 8a ($t_R = 5,5$ min, 64%) neben verschiedenen Nebenprodukten: ($t_R = 14,8$ min, 18%; $t_R = 26$ min, 3,5%; $t_R = 32,4$ min, 14%) (s. Abb. 3.13, Abschn. 3.1.3).

8a. (MG = 344,36)

FD-MS: m/z 344 (9%, M^+), 308 (100%, $M^+ - 2x H_2O$) (s. Abb. 7.6, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 258, 266, 292 (s. Abb. 3.12, Abschn. 3.1.3)

Das Rohprodukt 8a (16,4 mg) wurde mit 230 mg (1,0 mmol) DDQ in 15 ml 1,4-Dioxan unter Rückfluß umgesetzt und nach 5 Stunden analog Abschn. 2.1.5.1 aufgearbeitet. HPLC des Reaktionsproduktes, (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser 50/50, V/V in 40 min auf 100%, Fluß: 0,8 ml/min) zeigte das Hauptprodukt 3,4,11,12-Bischinon 9 (66,2%).

9 (MG = 336,30)

FD-MS: m/z 336 (M^+) (s. Abb. 7.6, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 250, 288, 348, 422 (s. Abb. 3.12, Abschn. 3.1.3)

9 wurde analog zu Abschn. 2.1.5.1 mit 80 mg (2,1 mmol) Natriumborhydrid in 10 ml Ethanol/Wasser zu 8 umgesetzt. HPLC-Analyse (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser 50/50, V/V in 40 min auf 100%, Fluß: 0,8 ml/min) zeigte zwei Hauptprodukte 8-D₁ $t_R = 5,9$ min, 38% und 8-D₂ $t_R = 6,9$ min, 40% neben verschiedenen Nebenprodukten (22%) die flüssigkeitschromatographisch (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, Fluß: 0,8 ml/min, $t_R = 8,6$ min) abgetrennt wurden (s. Abb. 3.13, Abschn. 3.1.3).

8 (MG = 344,36)

8-D₁ und 8-D₂

FD-MS: m/z 344 (M^+) (s. Abb. 7.6, Anhang)

UV λ_{max} (nm): 258, 266, 292 (s. Abb. 3.12, Abschn. 3.1.3)

¹H NMR (300 MHz), Aceton d₆, δ (ppm) 4,98-5,06 (m, 4H, H_{3,4,11,12}), 7,7 (pt, 2H, H_{6,9}, $J_{6,5} = J_{9,10} = 7,4$ Hz, $J_{6,7} = J_{9,8} = 7,8$ Hz), 7,90 (s, 2H, H_{1,2}), 7,93 (d, 2H, H_{5,10}, $J_{5,6} = J_{10,9} = 7,4$ Hz), 8,6 (d, 2H, H_{7,8}, $J_{7,6} = J_{8,9} = 7,8$ Hz) (s. Abb. 7.6, Anhang)

2.1.6 Veresterung der K-Region *trans*-Dihydrodirole von Benzo[*ghi*]perylen mit (-)- α -Menthoxyessigsäure

2.1.6.1 *trans*-3,4-Bis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen 10

Zu einer Lösung von 190 μg (0,61 μmol) *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen 6 in getrocknetem Pyridin wurden 10 mg (0,16 mmol) (-)- α -Menthoxyessigsäurechlorid zugegeben und bei 4°C unter Schutzgas und Wasserausschluß gerührt. Nach 24 Stunden wurde auf eiskalte gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegossen, mit Dichlormethan (4 x 5 ml) extrahiert, die organische Phase mit Wasser (5 ml) gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlpumpen-Vakuum das Lösungsmittel entfernt. 33,5 μg (0,05 μmol) des Produktes 10 wurden hochdruckflüssigkeitschromatographisch gereinigt (LiChrospher RP18e, 100% Methanol, 1,0 ml/min, $t_{\text{R}} = 12$ min).

10 UV λ_{max} (nm): 242, 258, 284, 294, 324, 338 (s. Abb. 7.7, Anhang)

2.1.6.2 *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrakis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylen 11

trans-3,4-*trans*-11,12-tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylen 8 wurde mit HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, 0,8 ml/min) in die Diastereomeren getrennt: 8-D₁: $t_{\text{R}} = 6,4$ min und 8-D₂: $t_{\text{R}} = 7,4$ min, $\alpha = 1,2$. Anschließend wurden 65 μg (0,19 μmol) 8-D₁ bzw. 63 μg (0,18 μmol) 8-D₂ mit jeweils 20 mg (0,17 mmol) (-)- α -Menthoxyessigsäurechlorid analog Abschn. 2.1.6.1 umgesetzt.

17 μg (0,02 μmol) des Reaktionsproduktes 11-D₁ von 8-D₁ und 22 μg (0,02 μmol) des Reaktionsproduktes 11-D₂ von 8-D₂ wurden hochdruckflüssigkeitschromatographisch gereinigt (LiChrospher RP18e, 100% Methanol, 1,2 ml/min, 11-D₁, $t_{\text{R}} = 18,0$ min; 11-D₂, $t_{\text{R}} = 16,7$ min).

11-D₁ UV λ_{max} (nm): 256, 266, 290 (s. Abb. 7.7, Anhang)

11-D₂ UV λ_{max} (nm): 256, 266, 290 (s. Abb. 7.7, Anhang)

2.1.7 K-Region Epoxide des Benzo[*ghi*]perylens

2.1.7.1 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen 12

20 mg (72,4 μmol) BghiP und 10 mg Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wurden in 5,4 ml Aceton, 2,0 ml Dichlormethan und 1,1 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) (Zusammensetzung s. Abschn. 2.3.1) gelöst. 1,6 g (2,6 mmol) Kaliumperoxymonosulfat (Oxon) in 8 ml Wasser wurden bei ca. 0°C in 15 min hinzugetropft und dabei kräftig gerührt. Der pH-Wert wurde mit 2,5 %iger Kaliumhydroxidlösung zwischen 7,5 und 8,5 konstant gehalten.

Nach vollständiger Zugabe der Oxon-Lösung wurde noch 30 min bei 0°C weitergerührt und anschließend mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Hexan/Ethyl-

acetat/Triethylamin, 97,1/2,5/0,4, V/V extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurden die vereinten organischen Phasen eingeengt und 73 µg (0,25 µmol) 12 durch HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Triethylamin, 99,9/0,1, V/V, Fluß: 0,8 ml/min) isoliert, $t_R = 5,6$ min, (s. Abb. 3.16 A, Abschn. 3.1.4).

12 (MG = 292,33)

UV λ_{max} (nm): 244, 260, 272, 284, 296, 326, 340 (s. Abb. 3.16 B, Abschn. 3.1.4)

2.1.7.2 3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene 13

400 µg (1,2 µmol) *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene isoliert aus mikrosomaler Inkubation von BghiP wurde mit ~2mg (0,08 mmol) Natriumhydrid in 1 ml trockenem DMF für 15 min und nach Zugabe von ~2 mg (9 µmol) *N*-Tosylimidazol für weitere 30 min umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis gegossen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nochmals mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt.

TLC (Chloroform/Methanol, 99/1, V/V): R_F -Wert = 0,48, der Substanzfleck ließ sich mit 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin und Diethylentriamin als Nachweisreagenzien auf Epoxide anfärben (Jerina *et al.*, 1976).

61,8 µg 13 wurden mit HPLC (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser (50/50, V/V) in 40 min auf 100% Methanol, Fluß: 0,8ml/min) gereinigt (12-D₁: $t_R = 22,7$ min; 12-D₂: $t_R = 23,8$ min) (s. Abb. 3.18 A, Abschn. 3.1.4).

13 (MW = 308,33)

FD-MS: m/z 308 (M^+) (s. Abb. 7.8, Anhang)

13-D₁ UV λ_{max} (nm): 260, 270, 296 (s. Abb. 3.18 B, Abschn. 3.1.4)

13-D₂ UV λ_{max} (nm): 260, 270, 296 (s. Abb. 3.18 B, Abschn. 3.1.4)

2.2 Charakterisierung von subzellulären Fraktionen der Rattenleber

2.2.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Nach der Methode von Bradford (1976) wurde mit Rinderserumalbumin (BSA reinst, ~67 kDa, Serva, Heidelberg) als Standard die Proteinkonzentration der subzellulären Leberfraktionen (Herstellung s. Platt *et al.*, 2002) bestimmt.

Aus einer BSA-Stammlösung von 1 mg/ml in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) wurde nach zehnfacher Verdünnung definierte Volumina (0-100 µl entsprechend 0-10 µg BSA) entnommen, mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl unverdünnter Roti-Quant Fertiglösung (Roth, K0105) versetzt. Nach sofortigem kräftigem Vortexen kann nun die Extinktion des ent-

standenen blauen Farbkomplexes (anionischer Zustand nach Bindung an basische Aminosäuren) bei 595 nm photometrisch (Photometer Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotec) bestimmt werden.

Mit den Proben der subzellulären Leberfraktionen der Ratten wurde analog der Methode zur Erstellung der Standarddeichgerade verfahren. Je Probe wurden zwei verschiedene Verdünnungen in Doppelbestimmungen vermessen.

2.2.2 Messung von 7-Alkoxyresorufin-O-dealkylasen

2.2.2.1 Geräte, Materialien und Lösungen

Spektralfluorometer

FP-750 (Jasco, Groß-Umstadt)

Dicumarol-Lösung

76 mg Dicumarol (Aldrich, Taufkirchen) und 400 mg NaOH (Roth, Karlsruhe) *ad* 100,0 ml ddH₂O lösen, am Versuchstag frisch ansetzen

7-Ethoxyresorufin-Lösung (0,2 mM)

1,205 mg 7-Ethoxyresorufin (7-ER) (Boehringer Mannheim) in 25,0 ml Ethanol (Roth, Karlsruhe) lösen, Lagerung bei -20°C

7-Pentoxyresorufin-Lösung (1,33 mM)

3,769 mg 7-Pentoxyresorufin (7-PR) (Boehringer Mannheim) in 10,0 ml Ethanol lösen, Lagerung bei -20°C

NADPH-Lösung

7 mg NADPH (Dihydronikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat Tetranatriumsalz) (Roche, Mannheim) in 0,16 ml Tris-MgCl₂-Puffer lösen, am Versuchstag frisch ansetzen, Lagerung auf Eis

Resorufin-Lösung (0,1 mM)

1,176 mg Resorufin (Aldrich, Taufkirchen) in 50,0 ml Ethanol lösen, Lagerung bei -20°C

Tris-MgCl₂-Puffer

6 g Tris (Roth, Karlsruhe), 1 g MgCl₂ x 6H₂O (Roth, Karlsruhe), 2 g NAD (Sigma, Taufkirchen), 2,5 ml Dicoumarol-Lösung *ad* 500 ml ddH₂O lösen, pH-Wert 7,6, am Versuchstag frisch ansetzen, Lagerung bei Raumtemperatur

2.2.2.2 Testdurchführung

Diese Methode geht auf Burke & Mayer (1974) und Lubet *et al.* (1985) zurück und beruht auf dem Prinzip der oxidativen Dealkylierung der Substrate 7-Ethoxyresorufin bevorzugt durch

CYP Isoenzyme der 1A-Familie und 7-Pentoxyresorufin primär durch CYP Isoenzyme der 2B Familie zu Resorufin.

Zur Messung der 7-Alkoxyresorufin-O-dealkylase wurden im Versuchsansatz 1950 µl Tris-MgCl₂-Puffer, 50 µl der zu messenden Proteinprobe und 15 µl ethanolische 7-ER oder 7-PR Lösung pipettiert. Zur Bestimmung eines Basiswertes, der später von dem gemessenen Wert abgezogen wird, wurde zu diesem Zeitpunkt ein zweiminütiger Vorlauf durchgeführt. Mit 10 µl NADPH-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Das sich bildende Resorufin wird fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 522 nm und einer Emissionswellenlänge von 586 nm über einen Inkubationszeitraum von 5 min bestimmt. Nach jeder Messung erfolgte eine zweimalige Eichung (interne Standardisierung) des Fluorimeters durch Zugabe von jeweils 10 µl Resorufin-Lösung zu der Inkubationslösung. Die spezifische Aktivität der induzierten CYP Isoenzyme wird in pmol gebildetes Resorufin/min/mg Protein angegeben.

2.3 Mikrosomaler Metabolismus von Anthanthren bzw. Benzo-[ghi]perylen

2.3.1 Geräte, Materialien und Lösungen

Schüttelwasserbad und Heizelemente

Typ 850212 (Braun, Melsungen)

Thermomix 1460, Thermoplus 1450 (Braun, Melsungen)

Vortexgerät

Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)

Zentrifuge

Sigma 4K10 (Braun, Melsungen)

Sorvall RC2-B (DuPont, Bad Nauheim)

Abdampfgerät

Metallblockthermostat, Typ 5000 6101, Nr. 11461 und Multiplex Ventildepot 3 (Liebisch, Bielefeld)

Acetylierungsmischung

Acetanhydrid/Pyridin, 2:1, V/V (beide Merck, Darmstadt), frisch ansetzen

Ammoniumbicarbonatpuffer, 10 mM

0,8 g Ammoniumbicarbonat (Baker, Griesheim) ad 1000 ml ddH₂O, pH-Wert messen (Lagerung unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur)

Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt)

Ethylacetat (Roth, Karlsruhe)

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Lösung

D-Glucose-6-phosphat: NADP 1-oxidoreduktase, E.C. 1.1.1.49 (Roche, Mannheim), Reinheitsgrad II, aus Hefe, mit einem Gehalt von 700 U/ml suspendiert in Ammoniumsulfatlösung, 3,2 M (Lagerung bei 4°C)

Hexan (Roth, Karlsruhe)/**Ethylacetat/Triethylamin** (Merck, Darmstadt) 97,1/2,5/0,4, V/V
KCl-Lösung (isotonisch, phosphatgepuffert)

56 g KCl (150 mM; Roth, Karlsruhe) in 4900 ml ddH₂O und 100 ml Phosphatpuffer (0,5 M, pH-Wert 7,4) lösen, pH-Wert überprüfen (Lagerung bei 4°C)

Magnesiumsulfat (Monohydrat, extra pur, Merck, Darmstadt)

Methanol (HPLC-Qualität, Baker, Griesheim)

MgCl₂-Lösung

20,33 g MgCl₂ x 6 H₂O in 1000 ml H₂O lösen (Lagerung bei 4°C)

NADPH-regenerierendes System

48,7 mg Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz (Roche, Mannheim) und 9,44 mg Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, Dinatriumsalz (NADP-Na₂, Merck, Darmstadt) wurden in 5 ml KCl, isotonisch, pH-Wert 7,4 gelöst. Kurz vor der Inkubation erfolgte die Zugabe von 20 µl Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Lösung, am Versuchstag frisch ansetzen (Lagerung auf Eis)

Phosphatpuffer (0,5 M, pH-Wert 7,4)

Eine Lösung mit 0,5 M Na₂HPO₄ x 12 H₂O (179,07 g *ad* 1000 ml mit ddH₂O) wurde mit 0,5 M NaH₂PO₄ x H₂O-Lösung (69 g *ad* 1000 ml ddH₂O) gemischt und auf den pH-Wert 7,4 eingestellt (Lagerung bei Raumtemperatur)

TCPO-Lösung

31,9 mg TCPO (EGA-Chemie, Steinheim/Albuch) in 1 ml DMSO (Merck) lösen, am Versuchstag frisch ansetzen (Lagerung bei Raumtemperatur)

2.3.2 Inkubation mit Lebermikrosomen von Ratten

Der Inkubationsansatz für Anthanthren, BghiP, *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylene und 7-Hydroxybenzo[ghi]perylene bestehend aus 200 µl Natriumphosphatpuffer, 100 µl Magnesiumchlorid-Lösung, 500 µl NADPH-regenerierendem System, einem Mikrosomen-Aliquot entsprechend 1 mg Protein/ml Inkubationsansatz, wurde mit isotonischer gepufferter KCl auf ein Gesamtvolumen von 1950 µl gebracht. Zur Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von 3,4,11,12-Bisoxo-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene wurde das NADPH-regenerierende System durch isotonische gepufferte KCl ersetzt. Sollte die mikrosomale Epoxidhydrolase gehemmt werden, wurden 10 µl TCPO-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration: 1 mM im Inkubationsansatz). Als Reaktionsgefäße dienten Zylinderröhrchen (20 x 100 mm) mit Schliff (NS-19). Das Inkubationsgemisch wurde in einem Schüttelwasserbad bei 37°C 2 min vorinkubiert und die metabolische Umsetzung durch Zugabe der

Substratlösung in DMSO (50 µl) gestartet. Vorinkubation und Inkubation fanden unter Luftzutritt und unter Ausschluß von direktem Tageslicht statt. Mit 2 ml eiskaltem Ethylacetat wurde die Inkubation gestoppt und das Inkubationsgemisch dreimal mit 2 ml Ethylacetat extrahiert. Bei TCPO-haltigen Ansätzen wurde Hexan/Ethylacetat/Triethylamin, 97,1/2,5/0,4, V/V als Extraktionsmittel verwendet. Bei jedem Extraktionsschritt wurde 1 min kräftig gemischt und 5 min zur Phasentrennung bei 2500 Upm zentrifugiert. Die organische Phase wurde jeweils mit einer Pasteurpipette in ein Schnappdeckelgläschen überführt, die vereinten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet und durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette in ein Spitzbodenreagenzglas (Kühn & Bayer) filtriert. Nach dem Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff bei 37°C und zweimaligem Abspülen der Reagenzglaswände mit 0,5 ml Aceton, wurde der Rückstand bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert.

Zur präparativen Gewinnung der Metaboliten von BghiP ist die Größe des Ansatzes um das 50-fache erhöht worden, als Gefäß diente ein 250 ml Erlenmeyerkolben. Das Inkubationsgemisch (100 ml) wurde in einem Schüttelwasserbad (Aqua Shaker, Adolf Kühner AG, Schweiz) bei 37°C 10 min vorinkubiert und die metabolische Umsetzung durch Zugabe der Substratlösung in DMSO (2,5 ml) gestartet. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50 ml eiskaltem Aceton beendet, der Hauptteil des mikrosomalen Proteins durch Zentrifugation in Sorvallröhrchen bei 9000 Upm entfernt und die Proteinsedimente noch zweimal mit 5 ml Aceton/Wasser (1:1, V/V) gewaschen. Nach Zugabe von 40 g Natriumchlorid zu den vereinten wässrigen Phasen wurde fünfmal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Entfernung von Wasserresten durch Gefriertrocknung (WKF L 05) wurde der Rückstand bei -20°C gelagert.

Für die Biosynthese von Metaboliten mit Epoxid-Struktur ist der Inkubationsansatz um das Fünffache (auf 10 ml) gesteigert worden. Zwölf Inkubationsansätze wurden nach Beendigung des metabolischen Umsatzes vereint und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Zur Überführung von Metaboliten mit phenolischer Struktur in die stabileren Acetate wurde die Aufarbeitung nach einer Methode von Coutts *et al.* (1979, 1980) modifiziert: Nach Entfernung des Ethylacetates aus den Inkubationsextrakten wurden 4 ml Acetylierungsmischung hinzugefügt, resuspendiert und in verschlossenen Spitzbodenreagenzgläsern 16 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktionsmischung wurde dann im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht und der Rückstand bei -20°C bis zur HPLC-Analyse gelagert.

2.3.3 Chromatographische Trennung und Identifizierung der Metaboliten von Anthanthren und Benzo[ghi]perylen

Für die hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung der Metabolitengemische diente die in Abschn. 2.1.2 beschriebene HPLC-Anlage.

Zur präparativen Trennung von Metaboliten des BghiPs wurde eine weitere HPLC-Apparatur verwendet, die aus einer Hochdruckpumpe (*Solvent delivery system* SP8700, Spectra Physics, Darmstadt), einem UV-Detektor mit einer Detektionswellenlänge von 254 nm (SPD-6AV, Shimadzu, Duisburg) und einem Analogschreiber (L6522, Linseis, Selb) bestand. Das Schleifenvolumen betrug hier 100 µl, das über ein Ventil (C6U, Valco, Schenk, Schweiz) mit einer Vertex-Säule (LiChrospher RP18e, 5 µm, 4x250 mm) verbunden war.

Als Elutionsmittel dienten: Methanol, Methanol/ddH₂O (1:1, V/V) bzw. bei pH-empfindlichen Substanzen statt Wasser wässriger Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM, pH-Wert 7,9. Alle Elutionsmittel für die HPLC wurden, wie bereits in Abschn. 2.1.2 beschrieben, vor der Verwendung über einen Filter (0,45 µm; HVLP 04700, Millipore, Schwalbach) filtriert und während der HPLC unter leichtem Heliumüberdruck gehalten.

Mit zwei Elutionsmittelgradienten wurde eine Trennung der Metabolitengemische des Anthanthrens und BghiPs mit LiChrospher RP18e (5 µm, 4 x 250 mm) als stationäre Phase erreicht: Metaboliten des Anthanthrens sind durch einen linearen Anstieg von Methanol/Wasser (65/35, V/V) in 50 min auf 100% Methanol getrennt worden und die des BghiPs durch einen lineareren Anstieg von Methanol/Wasser (50/50, V/V) in 40 min auf 100% Methanol. In beiden Fällen wurde am Ende des Gradienten für 20 min mit Methanol eluiert. Der Fluß betrug 0,8 ml/min.

Für bestimmte Metaboliten des BghiPs sind je nach Trennproblem spezielle Bedingungen gewählt worden. Zur Trennung von Phenolen des BghiPs mit LiChrospher RP18e diente ein ternärer Eluent (Methanol/Acetonitril/Wasser, 48/30,8/21,2, V/V, 0,8 ml/min). Für optisch aktive Metaboliten stand die chirale stationäre Phase [TABA (R)-(-)-2-(2,4,5,7-Tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxy) buttersäure, 5 µm, Patronensäule, 4 x 250 mm (CH₂Cl₂/Methanol 50/50, V/V, 2,0 ml/min)] zur Verfügung. Menthoxyacetate wurden mit LiChrospher Si 60, 5 µm, 4 x 250 mm, Hexan/Ether, 95/5, V/V, 1,0 ml/min in die entsprechenden Diastereomere getrennt. Anthanthrenmetaboliten wurden anhand der bereits existierenden Spektrenbibliothek der Referenzsubstanzen (Platt et al., 2002) identifiziert.

2.4 Mikrosomale Inkubation mit tritiiertem Benzo[*ghi*]perylen

2.4.1 Reinigung von [G-³H]Benzo[*ghi*]perylen

Die radiochemische Reinheit des durch Auftragsynthese (Hartmann Analytik, Braunschweig) hergestellten [G-³H]BghiP (Aktivität: 18,5 MBq) war im Gegensatz zur chemischen Reinheit sehr gering und machte daher eine HPLC-Reinigung des Substrates unmittelbar vor einer metabolischen Umsetzung erforderlich. Dazu wurden jeweils 20 µl der Originallösung in Toluol nach Einengen (37°C, Stickstoff) in 20 µl Aceton aufgenommen und 15 µl auf die Säule gegeben (LiChrospher RP18e, 100% Methanol, 0,8 ml/min). Das nach 14 min eluierende [G-³H]Benzo[*ghi*]perylen wurde isoliert und nach Entfernung des Elutionsmittels mit Stickstoff bei 37°C bei -20°C gelagert. Nach jedem Reinigungsvorgang war ein fast 12stündiges Spülen der HPLC-Säule zur Entfernung der radioaktiven Kontamination notwendig.

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurde ein definierter Anteil HPLC-gereinigtes [G-³H]BghiP einer HPLC unterzogen (LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V in 40 min auf 100% Methanol, 20 min 100% Methanol, 0,8 ml/min). Nach Auffangen von 18-sec-Fractionen und Zumischen von Flüssigszintillator (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytik, Frankfurt a.M.) wurde deren Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivität aller [G-³H]BghiP enthaltenden Fractionen wurde in Beziehung gesetzt zur Gesamtaktivität, die während des chromatographischen Laufes eluierte. Die daraus berechnete Reinheit lag zwischen 77 und 82%.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde zunächst eine Eichgerade erstellt, in der die Peakflächen (als Maß für die UV-Absorption) bei 254 nm gegen die entsprechenden Konzentrationen von unmarkierten BghiP (36-724 nmol/ml) aufgetragen wurden: $\text{nmol BghiP/ml} = (\text{UV-Integrations-einheiten} - 26,99) / 25,08$; $r = 0,999$). Im nächsten Schritt wurde die Peakfläche eines Aliquots der acetonischen Lösung des [G-³H]BghiP ermittelt und mit der Eichgeraden die Konzentration in nmol/ml berechnet. Diese wurde in Bezug gesetzt zur direkt vermessenen Aktivität in MBq/ml desselben Anteils der Substratlösung. Die daraus errechnete spezifische Aktivität betrug 333-516 MBq/mmol.

2.4.2 Inkubation von [G-³H]Benzo[*ghi*]perylen mit Lebermikrosomen von Ratten

Die Inkubation von tritiummarkierten BghiP ist wie in Abschn. 2.4.2 beschrieben durchgeführt worden. [G-³H]BghiP wurde zuvor mit unmarkierten BghiP auf eine spezifische Aktivität von 100-113 MBq/mmol verdünnt.

Zur Bestimmung der pro mikrosomaler Inkubation eingesetzten Aktivität ist ein Aliquot der Substratlösung direkt nach Zumischen von Flüssigszintillator vermessen worden. Nach der

Inkubation wurde die Aktivität von 10% des Ethylacetatextraktes sowie 25% der wässrigen Phase der jeweiligen Inkubation bestimmt und daraus die Wiederfindungsrate berechnet, die zwischen 80 und 95% lag. Die Aktivitätsmengen in dpm der während der HPLC erhaltenen Fraktionen wurden gegen die Zeit aufgetragen, so dass ein Radiochromatogramm resultierte.

Die Berechnung des metabolischen Gesamtumsatzes in (nmol/mg Protein*min) erfolgte aus der Summe der Aktivitäten aller Peaks des Radiochromatogramms abzüglich der Aktivität des nicht umgesetzten Substrates zuzüglich der Gesamtaktivität der wässrigen Phase. Nach demselben Prinzip wurden die Umsatzraten der einzelnen Metaboliten oder Metabolitengruppen berechnet. Nach Auftragen der Aktivitätsmengen der Fraktionen mit den jeweiligen Metaboliten gegen die Peakfläche wurden Eichgeraden erstellt. Damit ist die Quantifizierung von Metaboliten sogar aus Inkubationen mit unmarkiertem Substrat möglich.

2.5 Mutagenitätsuntersuchungen (Salmonella Reversionstest nach B. Ames)

2.5.1 Geräte, Materialien und Lösungen

Agarplatten

Minimal-Glucose-Agar für den Mutagenitätstest nach AMES, 1.13496.001 (VWR International, Darmstadt)

Autoklav

Fractiomat electronic-autoklav (Gössner, Hamburg)

Bakterienanzucht und Inkubation

Brutschrank B 5090 E (Heraeus, Hanau)

Bakterienschüttler *Gyratory Shaker-Model G2* (New Brunswick Scientific Co., Edison, USA)

Brutschrank 02400070003100 (WTCbinder, Tuttlingen)

Koloniezählgerät

Artek Systems Corporation Model 982 B Counter/Analyzer (Biosys, Karben)

pH-Messgerät

Digital-pH-Meter 646, Knick (Kühn+Bayer, Nidderau)

pH-Elektrode Sen Tix 61, pH-Wert 0..14/0..100°C/3 mol/l KCl, WTW (VWR International, Darmstadt)

Nephelometrie

Photometer Modell 1101 M (Eppendorf, Hamburg)

Sterilfiltration

Einmal-Filterhalter FP 30/0,2 µm Rotrand (Schleicher & Schüll, Dassel)

Vortexgerät

Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)

Wasserbad

JB1 (Grant Instruments, Barrington Cambridge, England)

Zentrifuge

Sorvall RC2-B Kühlzentrifuge (DuPont, Bad Nauheim)

Alle verwendeten Lösungen wurden nach der Herstellung sterilfiltriert oder autoklaviert. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben über Molarität auf die jeweils angesetzte Lösung.

Ampicillin-Suspensions/-Lösung

Zur selektiven Anzucht der Bakterienstämme TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurium*; Stammlösung: 75 mg Ampicillin (D(-)-α-Aminobenzylpenicillin-Natrium, Bristol-Myers/-Grünenthal, Stolberg) wurden in 1 ml ddH₂O (201 mM) suspendiert (Lagerung bei -20°C).

Prüfung auf Ampicillinresistenz im Platteninkorporationstest: 25 mg Ampicillin, wurden in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (67 mM) gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

HBT-Lösung

350 mg L-Histidin (451 µM; Merck, Darmstadt), 625 mg Biotin (512 µM; Merck, Darmstadt) und 250 mg Tryptophan (249 µM; Sigma) wurden in 3000 ml Phosphatpuffer (250 mM, pH-Wert 7,4) gelöst, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, auf 5000 ml mit weiterem Phosphatpuffer aufgefüllt und sterilfiltriert (Lagerung bei -20°C).

HBT-Topagar

Nach Aufschmelzen des Topagars in einer Mikrowelle erfolgte die Zugabe von 10 Vol. % auf 60°C vorgewärmter HBT-Lösung, während der Testdurchführung bei 40°C im Wasserbad aufbewahren.

KCl-Lösung (histidinhaltig)

2,8 mg L-Histidin (18 mM) wurden pro ml KCl-Lösung zugesetzt und sterilfiltriert (Lagerung bei -20°C).

KCl-Lösung (isotonisch, phosphatgepuffert)

s. Abschn. 2.3.1, autoklavieren (Lagerung bei Raumtemperatur).

Kofaktor-Lösung

Lösung 1: 4,88 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (24 mM; Roth) und 7,45 g KCl (10 mM; Roth) in 1000 ml ddH₂O lösen und autoklavieren

Lösung 2: 53,7 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ (150 mM; Merck) in 1000 ml ddH₂O lösen und autoklavieren.

Lösung 1 und 2 werden bei Raumtemperatur gelagert.

60 mg Glucose-6-Phosphat- Na_2 (9,85 mM; Roche, Mannheim) und 100 mg NADP- Na_2 (6,35 mM; Merck) wurden in 20 ml einer 1:1 Mischung von Lösung 1 und 2 gelöst, unter Rühren auf pH-Wert 7,4 eingestellt und sterilfiltriert (bis zum Gebrauch auf Eis lagern).

Metabolisierendes System

Zum Einsatz kamen bei -70°C gelagerte sterile subzelluläre Leberfraktionen (S9) von *Sprague-Dawley*-Ratten nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Enzyminduktoren. Diese wurden 1:1 mit isotonischer phosphatgepuffert KCl (pH-Wert 7,4) verdünnt und dann ein Drittel zu zwei Drittel Kofaktorlösung gegeben (während der Testdurchführung auf Eis aufbewahren).

Nährbouillon zur Anzucht der Bakterien

25 g Nutrient Broth No. 2 (Oxoid CM 67; *Unipath*, Wesel) ad 1000 ml mit ddH₂O auffüllen und lösen. Nach anschließendem Autoklavieren bei Raumtemperatur aufbewahren.

Phosphatpuffer (0,5 M, pH-Wert 7,4)

s. Abschn. 2.3.1, autoklavieren (Lagerung bei Raumtemperatur).

Resuspensionsmedium

1,6 g *Bacto Nutrient Broth* (Difco, Detroit/USA) unter Zusatz von 5 g NaCl (Roth) in 1000 ml ddH₂O lösen und autoklavieren (Lagerung bei Raumtemperatur).

TCPO-Lösung

31,9 mg TCPO (EGA-Chemie, Steinheim/Albuch) in 1 ml DMSO (Merck) lösen, am Versuchstag frisch ansetzen (Lagerung bei Raumtemperatur)

Topagar

30 g *Bacto-Agar* (Difco, Detroit/USA) und 30 g NaCl (Roth) in 5000 ml kochendem ddH₂O lösen und autoklavieren (Lagerung bei Raumtemperatur).

2.5.2 Anzucht und Keimzahlbestimmung der *Salmonella typhimurium* Stämme

Am Vorabend des Mutagenitätsversuches wurden 20 ml Nährbouillon mit 13,3 µl Ampicillin Suspension versetzt (50 µg Ampicillin/ml Nährbouillon, 0,13 mM), so dass nur noch das Wachstum Ampicillin-resistenter Bakterien möglich ist. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde von der bei -70°C aufbewahrten Bakterienkultur ein kleiner Teil in die Nährbouillon überführt und ÜN bei 37°C unter Schütteln (200 U/min) angezüchtet.

Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension bei 9000 x g für 10 min zentrifugiert und das entstandene Sediment in gerade soviel Resuspensionsmedium aufgenommen, dass nephelometrisch bei $\lambda = 691$ nm ein Extinktionswert von $E = 0,70 \pm 0,05$ erhalten wurde. Dies entsprach einer Bakteriendichte von $1-2 \times 10^9$ Bakterien/ml.

Zur endgültigen Bestimmung der Keimzahl wurde die Bakteriensuspension mit Resuspensionsmedium 1:200.000 fach verdünnt, 100 µl davon mit 500 µl histidinreicher KCl und 2 ml Topagar versetzt, gründlich gemischt und ausplattiert. Zur Überprüfung auf Anwesenheit des Resistenzplasmides für Ampicillin wurde derselbe Versuch unter Zugabe von 10 µl Ampicillin-Lösung (258 µM Endkonzentration in der Topagarmischung) durchgeführt. Eine Gegenkontrolle wurde mit dem Ampicillin-sensitiven Stamm TA1537 durchgeführt.

Nach Auszählung der gewachsenen Kolonien und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die im Test eingesetzte Bakterienzahl errechnet.

Zur weiteren Kontrolle des jeweiligen Bakterienstammes wurde die Anzahl der Spontanrevertanten bestimmt. Hierzu wurden 100 µl der unverdünnten Bakteriensuspension ($1-2 \times 10^9$ Bakterien/ml), 500 µl isotonischer KCl und 2 ml Topagar vermischt und ausplattiert.

Zum Ausplattieren wird die Topagarmischung luftblasenfrei auf die Minimalagarplatten gegossen und durch kreisförmige Kippbewegungen gleichmäßig verteilt. Bis zum Erstarren des Topagars werden die Platten ca. 5 min waagrecht (Kontrolle durch Wasserwaage) gelagert.

2.5.3 Testdurchführung (Platteninkorporationstest)

Der bakterielle Mutagenitätstest wurde nach der Vorschrift von Bruce Ames (Ames *et al.*, 1975); Maron & Ames, 1983) mit den Histidin-Mangelmutanten TA1537 (keine Ampicillinresistenz), TA98 (Ampicillinresistenz) und TA100 (Ampicillinresistenz) von *Salmonella typhimurium* durchgeführt.

Zur Bestimmung der Mutagenität wurden 30 µl der DMSO-Lösung der zu untersuchenden Substanz bzw. reines DMSO (Nullwert), 500 µl des metabolisierenden Systems bzw. isotoni-scher KCl (bei direkt wirkenden Mutagenen) und 100 µl der unverdünnten Bakteriensuspension zusammen mit 2 ml Topagar gründlich gemischt und ausplattiert.

Je nach Untersuchungsziel wurden zusätzlich 10 µl TCPO-Lösung (1,0 mM Endkonzentration in der Topagarmischung) zur Inkubationsmischung vor Zugabe der Bakterien (TA98) gegeben.

Nach Erstarren des Topagars wurden die Platten mit der Agarschicht nach oben für 48 Stunden bei 37°C inkubiert und anschliessend die gewachsenen Kolonien mit einem Kolonien-zählgerät oder manuell (Platten mit < 100 oder > 800 Kolonien) ausgezählt.

Die Zahl der Spontanrevertanten wurde in der Auswertung nicht von der Kolonienzahl abgezogen. Von jeder Substanzkonzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der spezifischen Mutagenität (his^+ -Revertanten/nmol Substanz) wurde die Steigung aus dem annähernd linearen Teil der Konzentrations-Wirkungskurven bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Synthesen von Derivaten des Anthanthrens und Benzo[*gh*]perylens

3.1.1 Chinone und Hydrochinone des Anthanthrens

Für eine Umsetzung von PAKs zu Chinonen kommen verschiedene Oxidationsmittel in Betracht, z. Bsp.: Chrom(VI)-oxid (Davies & Ennis, 1959; Harvey *et al.*, 1975) zur bevorzugten Bildung von *ortho*-Chinonen in der elektronenreichen K-Region oder Natriumdichromat in Acetanhydrid (Cho & Harvey, 1976), das unselektiv reagiert und auch zur Oxidation des Anthanthrens verwendet wurde. Die Ausbeute (56%) des mit Aluminiumoxid gereinigten Rohproduktes entsprach in etwa der Literaturangabe (52%, Cho & Harvey, 1976). Eine HPLC-Analyse (Abb. 3.1 A) ergab drei Substanzen (Mengenverhältnis abgeleitet von den Peakflächen): 1a: $t_R = 23,1$ min, 14%, 1b: $t_R = 23,5$ min, 6%, 1c: $t_R = 40,2$ min, 80%. Während des Einengens des Chloroformeluates kristallisierte schwerlösliches 1c aus, was zu einer Anreicherung von 1a und 1b in der Mutterlauge führte (Abb. 3.1 B) 1a, 25%, 1b, 15%, 1c, 62%.

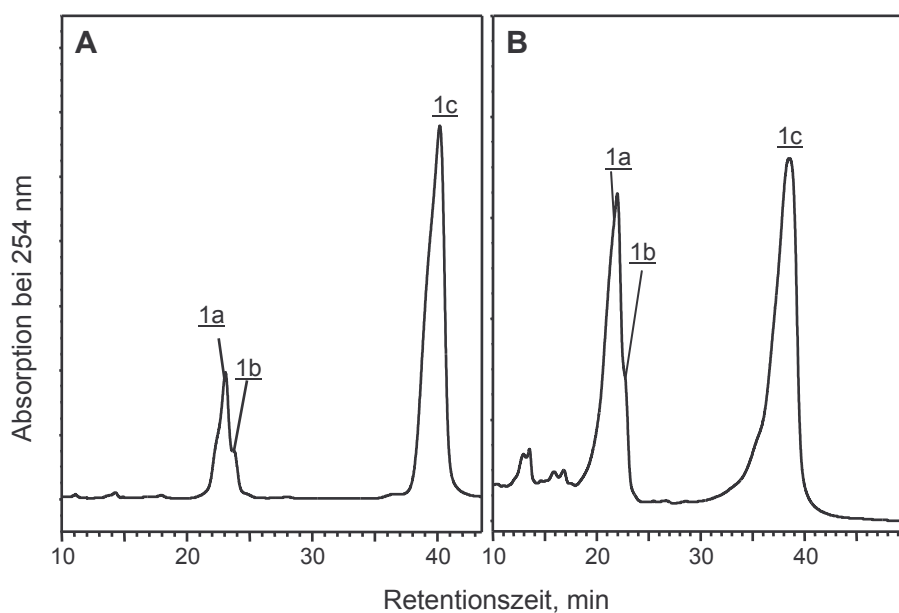


Abbildung 3.1: HPLC-Analyse der Produkte aus der Reaktion von Anthanthren mit Natriumdichromat in Acetanhydrid; Bedingungen: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Acetonitril/Wasser, 60/40, V/V, Fluß: 0,8 ml/min
A: Rohprodukt 1
B: Mutterlauge nach Auskristallisation von 1c in Chloroform

Eine weitere Anreicherung der beiden Chinone 1a und 1b war durch semipräparative Dünnschichtchromatographie möglich: nach Abkratzen der TLC-Bande mit dem R_F -Wert = 0,42 von der entwickelten Platte und Elution des Kieselgels mit Chloroform, ergab eine HPLC-Analyse folgendes Bild (Abb. 3.2 A): 1a: $t_R = 14,2$ min, 54%, 1b: $t_R = 14,5$ min, 29%, 1c: $t_R =$

22,9 min, 17%. Das im Rohprodukt der Oxidation dominierende 1c stellte nun die kleinste Fraktion gegenüber 1a und 1b dar. Eine befriedigende Trennung von 1a und 1b gelang allerdings nur über eine HPLC-Säule mit Spherisorb RP18 als stationäre Phase (Abb. 3.2 B): 1a: $t_R = 13,5$ min, 49%, 1b: $t_R = 14,2$ min, 32% und 1c: $t_R = 19,6$ min, 18% (nicht zu sehen).

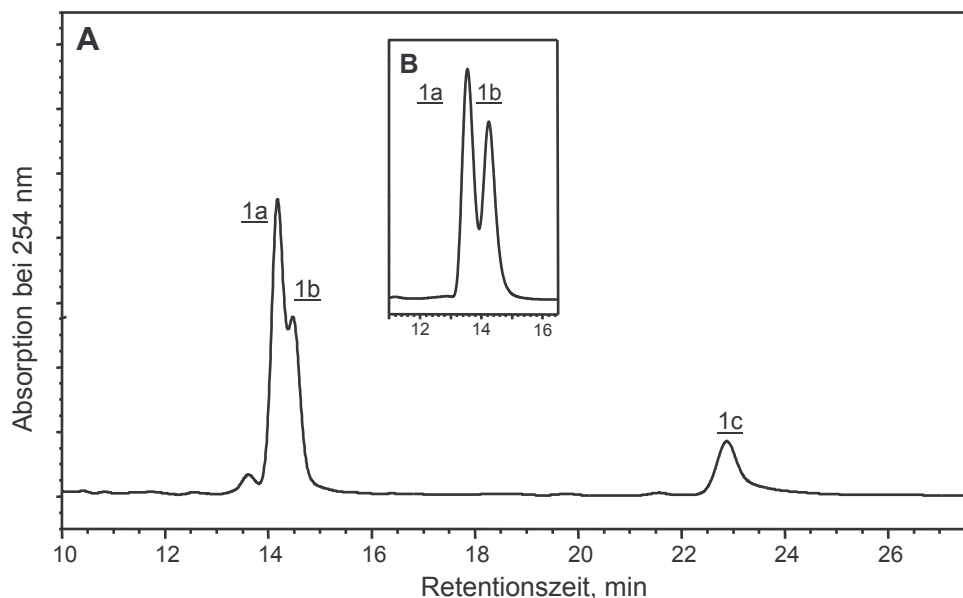


Abbildung 3.2: HPLC-Analyse der Produkte aus der Reaktion von Anthanthren mit Natriumdichromat in Acetanhydrid nach Anreicherung durch semipräparative TLC: Eluat der TLC-Bande mit dem R_f -Wert = 0,42
A: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Acetonitril/Wasser, 70/30, V/V, Fluß: 0,8 ml/min
B: Spherisorb RP18, 5 μ m, 4 x 250mm, Methanol/Wasser, 90/10, V/V, Fluß: 0,8 ml/min

Durch Vergleich der UV-Spektren der Anthanthrenderivate aus der Spektrenbibliothek (Platt *et al.*, 2002) mit denen von 1a, 1b und 1c (Abb. 3.3.) konnten diese als Anthanthren-1,6-chinon, Anthanthren-3,6-chinon bzw. Anthanthren-6,12-chinon identifiziert werden.

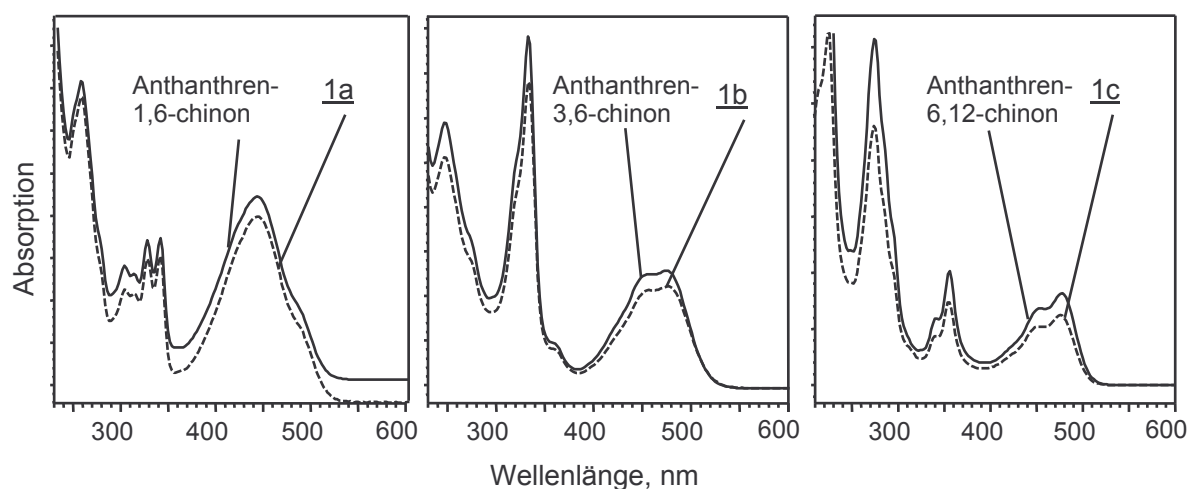


Abbildung 3.3: UV-Vis-Spektren der Oxidationsprodukte 1a, 1b und 1c des Anthanthrens im Vergleich mit denen der Chinone aus der Spektrenbibliothek (Platt *et al.*, 2002)

Nach Zuordnung der drei Oxidationsprodukte des Anthanthrens zu den entsprechenden Referenzsubstanzen kann folgender Reaktionsverlauf abgeleitet werden (Abb. 3.4).

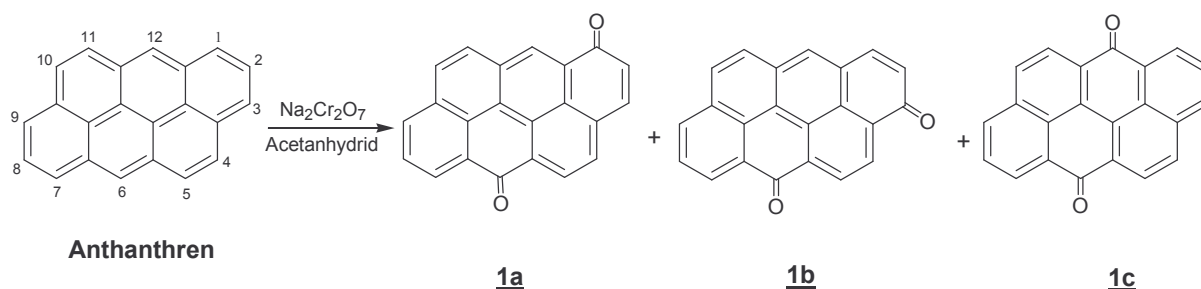


Abbildung 3.4: Synthese der Chinone des Anthanthrens durch Oxidation des Mutterkohlenwasserstoffes mit Natriumdichromat in Acetanhydrid

Hintergrund der Synthese war die noch ausstehende Strukturaufklärung von zwei polaren Hauptmetaboliten A2 und A3 des Anthanthrens, bei denen es sich um Diphenole handeln könnte. Es handelt sich bei diesen Hauptmetaboliten höchstwahrscheinlich um Dihydroxyverbindungen, bei denen eine der Hydroxylgruppen an Position 3 gebunden ist (Platt *et al.*, 2002), die Position der anderen Hydroxylgruppe ist unbekannt. In Analogie zum Benzo[*a*]pyren wäre die Position 6 (Capdevila *et al.*, 1978, Bevan & Sadler 1992) oder 9 (Capdevila *et al.*, 1978) möglich. Bei A2 und A3 könnte es sich folglich um 3,6- und 3,9-Dihydroxyanthanthren handeln. Durch Reduktion des Anthanthren-3,6-chinons müsste sich 3,6-Dihydroxyanthanthren bilden, dessen Spektrum dann mit dem von A2 oder A3 identisch sein sollte.

Als Reduktionsmittel kamen folgende Substanzen in Betracht: Natriumdithionit, (Dimmel & Shepard, 1982; Landucci & Ralph, 1982), *N,N*-Diethylhydroxylamin (Fujita & Sano, 1975), Natriumborhydrid in Dimethylformamid (NaBH_4/DMF) mit anschließender Acetylierung (Cho & Harvey, 1976) zum Schutz des vermutlich oxidationsempfindlichen Diphenols.

Mit Natriumdithionit und *N,N*-Diethylhydroxylamin fand keine Reduktion zum gewünschten Produkt statt. Ein Grund könnte die hohe Oxidationsempfindlichkeit des 3,6-Dihydroxyanthanthrens im Vergleich zum Anthanthren-3,6-chinon sein. Daher wurde eine Überführung in das stabilere Phenolacetat geplant.

Die Reduktion mit NaBH_4/DMF wurde zuerst mit Benzo[*a*]pyren-1,6-chinon als Referenzsubstanz durchgeführt (Cho & Harvey, 1976) (Abb. 3.5).

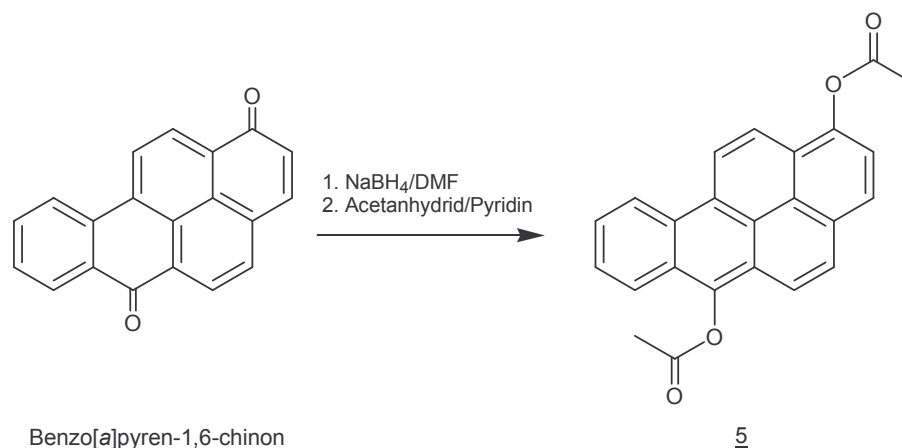


Abbildung 3.5: Synthese von 1,6-Diacetoxybenzo[a]pyren 5

Die Umsetzung verlief nahezu vollständig, was zum einen anhand eines Chromatogramms, in dem das Produkt ($t_R = 10,06$ min) ca. 1 min später als Benzo[a]pyren-1,6-chinon ($t_R = 9,4$ min) eluierte (Abb. 3.6 A) und zum anderen durch Spektrenvergleich (Abb. 3.6 B und C) erkennbar war. Das Spektrum des acetylierten Benzo[a]pyren-1,6-diphenols ähnelt dem des Benzo[a]pyrens, da beide Moleküle einen ähnlichen Chromophor besitzen.

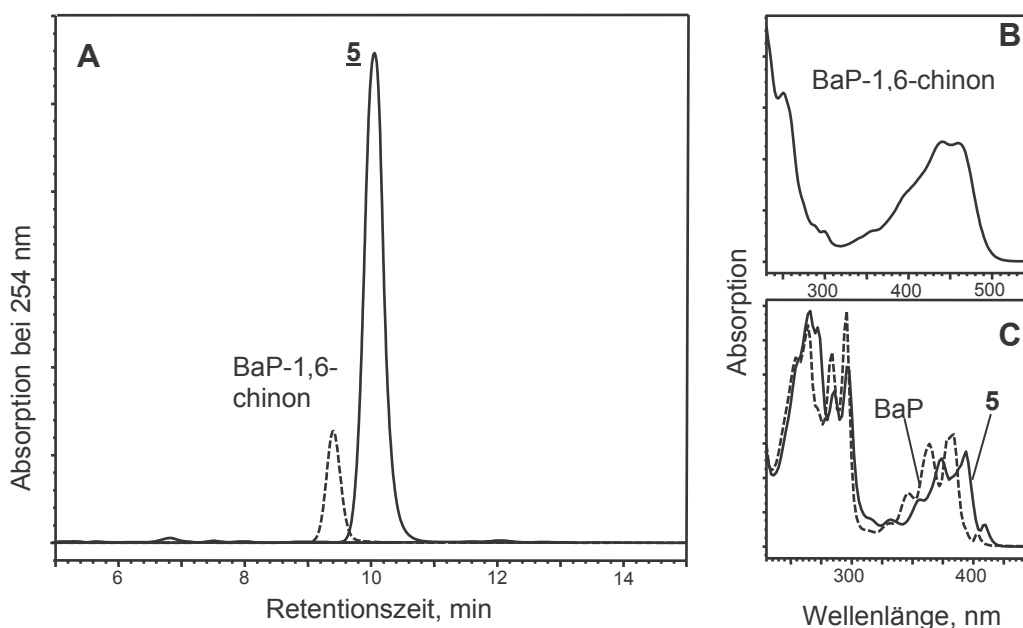


Abbildung 3.6: Reduktion und Acetylierung von Benzo[a]pyren (BaP)-1,6-chinon
A: HPLC-Analyse des Reaktionsproduktes 5 im Vergleich mit dem Edukt BaP-1,6-chinon. LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Acetonitril/Wasser, 70/30, V/V, Fluß: 0,8 ml/min
B: UV-Spektrum des Edukts BaP-1,6-chinon.
C: UV-Spektrum von 5 im Vergleich mit BaP

Die in der gleichen Weise durchgeführte Reaktion mit dem Gemisch aus Anthanthren-1,6- und -3,6-chinon, lieferte ein völlig anderes Ergebnis:

Aus den beiden Chinonen, die sowohl im Chromatogramm, als auch im UV-Spektrum eindeutig nachgewiesen werden konnten, entstand nicht wie erwartet eine Mischung der beiden Diphenoldiacetate, sondern ein Mehrkomponentengemisch unbekannter Zusammensetzung. Es ist denkbar, daß Anthanthren-1,6- und -3,6-chinon zu extrem oxidationsempfindlichen Diphenolen reduziert wurden, die mit den angewandten Methoden nicht fassbar waren bzw. sofort zu unbekanntem Folgeprodukten reagierten. Vorstellbar ist auch, daß sich zwischen dem Chinon (oxidierte Form) und dem entsprechenden Diphenol (reduzierte Form) ein Charge-Transfer-Komplex bildet, wie er von dem Paar *p*-Benzochinon und 1,4-Dihydroxybenzol bekannt ist.

3.1.2 Chinone und Hydrochinone des Benzo[ghi]perylens

BghiP wurde analog Anthanthren mit Natriumdichromat in Acetanhydrid oxidiert. Eine HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches zeigte ebenfalls drei Produkte (Mengenverhältnisse von den Peakflächen abgeleitet) (Abb. 3.7 A): 2a: $t_R = 7,9$ min, 84%, 2b: $t_R = 9,1$ min, 4%, 2c: $t_R = 10,7$ min, 11%. In der FD-MS zeigen alle drei Produkte das Molekülion $m/z = 306$. Dies legt die Bildung von Chinone nahe.

Eine Reduktion mit Natriumborhydrid in DMF (striker Feuchtigkeitsschluss und Schutzgasatmosphäre) führte zu den Folgeprodukten (Abb. 3.7 B): 3a: $t_R = 4,8$ min, 3%, 3b: $t_R = 5,1$ min, 80%, 3c: $t_R = 6,0$ min, 16%. Die Mengenverhältnisse (Integration der Peakflächen) stimmen in etwa mit denen der Edukte überein. Es ist somit möglich die Oxidationsprodukte 2a-2c den durch Reduktion entstandenen Folgeprodukten 3a-3b vorläufig zuzuordnen: 2a (84%) wird reduziert zu 3b (80%), 2c (11%) zu 3c (16%) und 2b (4%) zu 3a (3%).

Wie zu erwarten lässt das Molekülion von 3b und 3c mit $m/z = 308$ auf Dihydroxyverbindungen schließen, das Molekülion von 3a mit $m/z = 310$ (M^+) hingegen auf ein Dihydrodiol, das vermutlich durch eine Nebenreaktion in Gegenwart einer geringen Menge Sauerstoff (Platt & Oesch, 1982) entstanden ist.

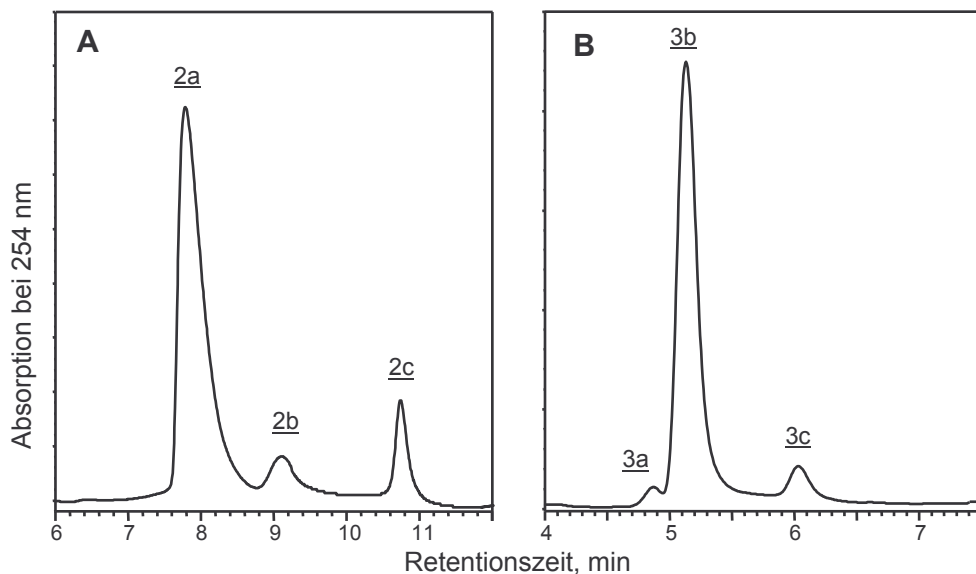


Abbildung 3.7: HPLC-Trennung der Reaktionsprodukte von Benzo[ghi]perylen (BghiP);
 Bedingungen: LiChrospher RP18e, 5µm, 4 x 250 mm, Methanol/Wasser, 90/10,
 V/V, Fluß: 0,8 ml/min
A: Oxidationsprodukte 2 von BghiP
B: Produkte der Reduktion von 2 mit NaBH₄/DMF

Die Struktur von dem Hauptprodukt 3b konnte durch ¹H-NMR Spektroskopie aufgeklärt werden. Es handelt sich um 7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen. In diesem Molekül wie auch im Mutterkohlenwasserstoff BghiP (Abb. 3.8) existiert eine Symmetrieebene, wodurch die jeweils gegenüberliegenden H-Atome eine identische chemische Verschiebung aufweisen. Es werden also nur sechs der zwölf möglichen Kernresonanzen im NMR-Spektrum detektiert (Abb. 7.2, Anhang). Eine eindeutige Zuordnung der miteinander koppelnden Protonen gelang mit 2D NMR Spektroskopie [COSY (Correlation SpectroscopY)] und Entkopplungsexperimenten unter Ausnutzung von NOE (Nuclear Overhauser Effect).

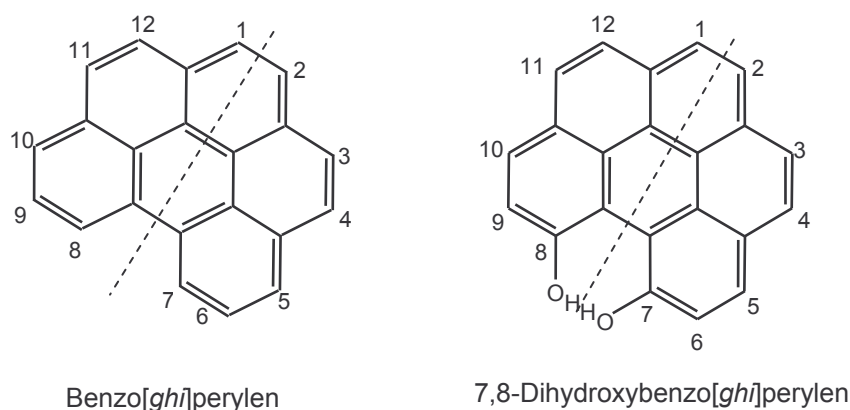


Abbildung 3.8: Strukturformeln von Benzo[ghi]perylen und 7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen mit eingezeichneter Symmetrieebene (gestrichelte Linie)

Eine Oxidation von **3b** mit Luftsauerstoff führte zu einer schwerlöslichen Substanz, die nach UV-Spektrenvergleich **2a** zugeordnet werden konnte und somit Benzo[*ghi*]perylen-7,8-chinon darstellen sollte. In der gleichen Weise wurde gezeigt, dass **2c** durch Oxidation aus **3c** entsteht. Aus diesen Untersuchungen folgt, dass **3a** aus **2b** hervorgegangen sein muss. Damit konnte die vorläufige Zuordnung durch Vergleich der Mengenverhältnisse (s. oben) bestätigt werden und wird durch die UV-Spektren der sechs Substanzen in Abb. 3.9 illustriert.

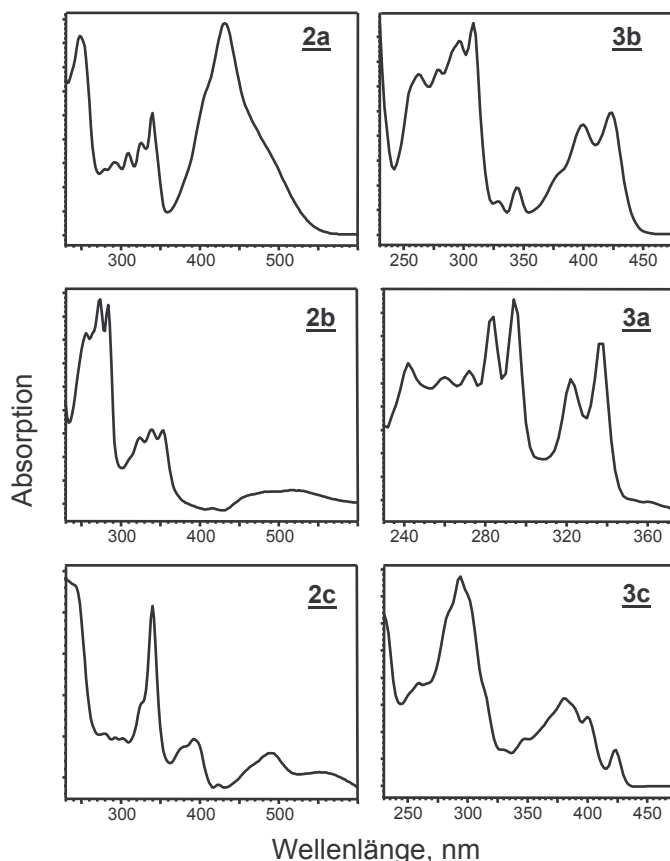


Abbildung 3.9: UV-Spektren der Produkte aus der Reaktion von Benzo[*ghi*]perylen mit Natriumdichromat/Acetanhydrid (linke Spalte) und den daraus durch Reduktion mit NaBH₄/DMF entstandenen Folgeprodukten (rechte Spalte)

3.1.2.1 Reduktive Acetylierung der Chinone

Zum Schutz der oxidationsempfindlichen Hydroxylgruppen der Reduktionsprodukte **3a**, **3b** und **3c** wurde eine Reduktion des Chinongemisches **2** mit nachfolgender Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin durchgeführt. Damit sollte auch eine Strukturaufklärung des sehr autoxidablen **2c** möglich sein. Die Reaktionsprodukte wurden mit HPLC aufgetrennt (Abb. 3.10 A): **3c(ac)**, $t_R = 5,2$ min, 35%, **3a(ac)**, $t_R = 7,9$ min, 6%, **4**, $t_R = 8,4$ min, 59%. Ein Vergleich der UV-Spektren der Reaktionsprodukte zeigt, dass eine hohe Ähnlichkeit sowohl untereinander als auch mit Benzo[*ghi*]perylen besteht, da die Chromophore aller vier Moleküle vergleichbare Absorptionseigenschaften besitzen (Abb. 3.10 B).

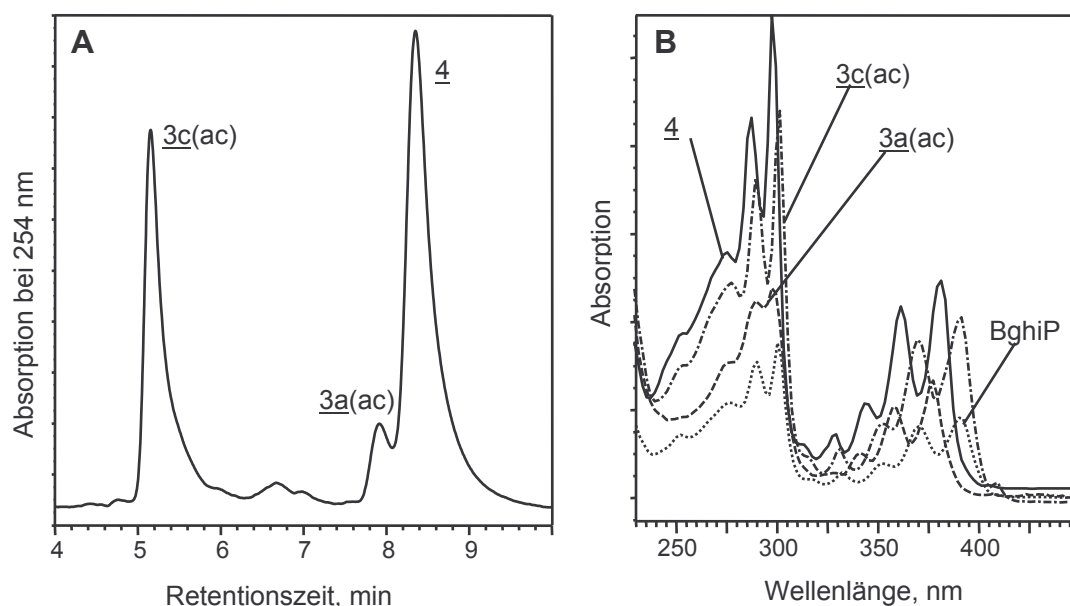


Abbildung 3.10: Reduktion und Acetylierung des Rohproduktes 2 aus der Reaktion von Benzo[ghi]perylen (BghiP) mit Natriumdichromat

A: HPLC-Analyse der acetylierten Produkte: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Methanol/Wasser, 80/20, V/V, Fluß: 0,8 ml/min

B: Vergleich der UV-Spektren aller Produkte mit dem von BghiP

Das mengenmäßig am stärksten gebildete Produkt wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie als 7,8-Diacetoxybenzo[ghi]perylen 4 identifiziert, in dem aufgrund der oben erwähnten Molekülsymmetrie fünf Resonanzen der aromatischen Protonen und ein Singulett (ppm) der sechs Methylprotonen der Acetatgruppen detektiert wurden (Abb. 7.3, Anhang).

Das Produkt mit der zweitgrößten Menge sollte gemäß den oben erwähnten Mengenverhältnissen die acetylierte Form von 3c darstellen, also ein Diacetoxybenzo[ghi]perylen. Die Masse mit $m/z = 450$ (M^+) deutete stattdessen auf ein Triacetoxyderivat ($\text{MG} = 450,44$) hin, dessen Entstehung schwer zu erklären ist. In der Literatur (Fieser & Peters, 1931) wurde die Addition von Wasser an 1,4-Benzochinon zum 1,2,4-Trihydroxychinon beschrieben. Diese Reaktion ist auch im Falle des 2c denkbar, das als mehrkerniges Chinon durch Addition von Wasser in *ortho*-Position zu einer Trihydroxyverbindung reagiert und schließlich *in-situ* acetyliert wird. Diese Vermutung ließ sich durch ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigen, in dem statt der erwarteten zehn H-Resonanzen nur neun aromatische Protonen und dafür statt zwei drei Singuletts der neun Methylprotonen der Acetatgruppen detektiert wurden. (s. Abb. 7.4, Anhang).

3.1.3 K-Region Dihydrodirole des Benzo[ghi]perylens

Derivate von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen an der K-Region lassen sich einfach durch direkten Umsatz des Mutterkohlenwasserstoffes gewinnen (Platt & Oesch, 1982). Daher wurde die regiospezifische Addition von Osmium(VIII)-oxid (Cook & Schoental, 1948) an die elektronenreiche K-Region für die Synthese des *cis*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens (Abb. 3.11) ausgenutzt.

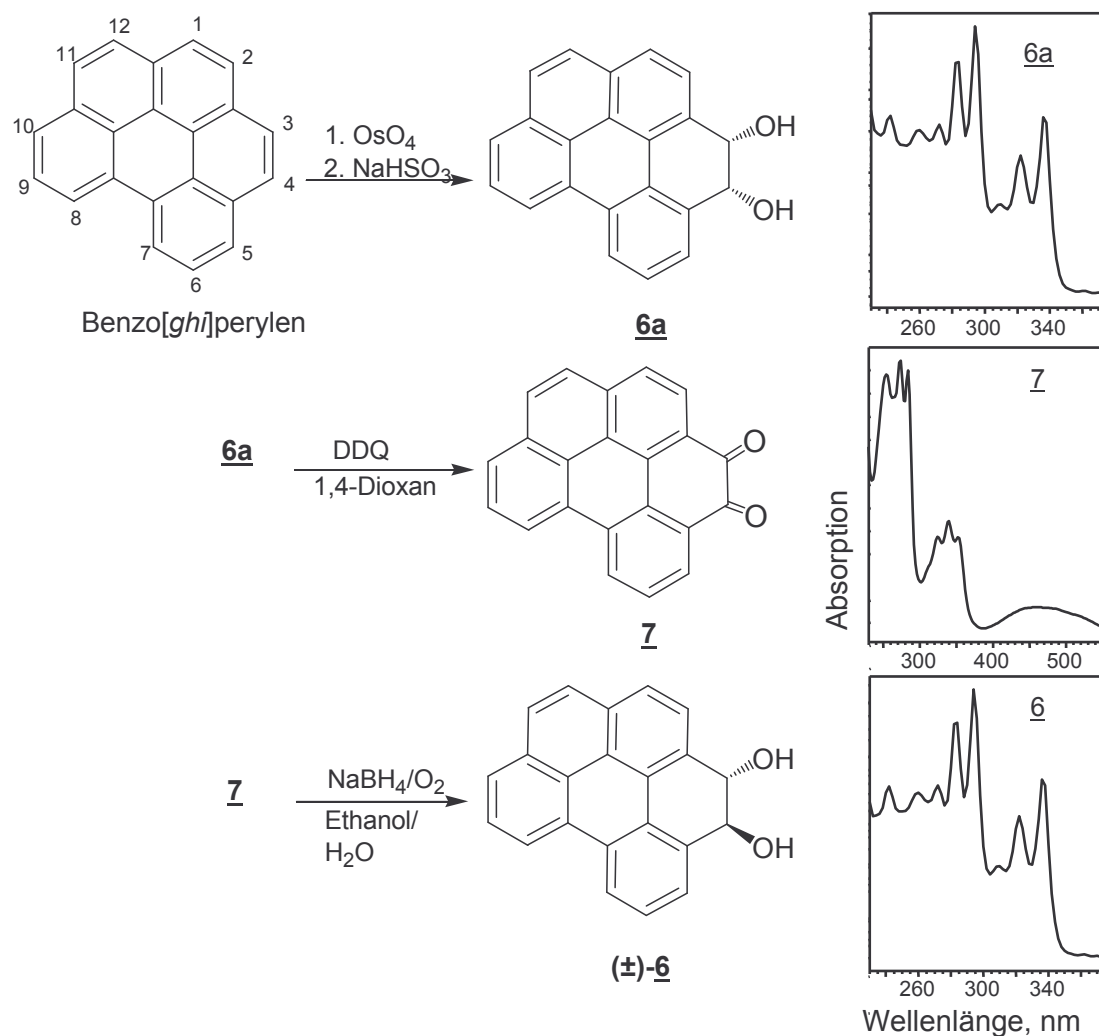


Abbildung 3.11: Synthese des *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens (\pm)-**6** mit den UV-Spektren der Zwischenprodukte, dem *cis*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen **6a** und dem Benzo[ghi]perylen-3,4-chinon **7**

Die HPLC-Analyse der am Ende der Reaktionszeit erhaltenen Suspension ergab, dass hauptsächlich Monosomat-Ester im Überstand (benzollöslicher Anteil) und geringere Mengen des Bisomat-Esters, vorwiegend im Sediment (benzolunlöslicher Anteil) zu finden waren, was eine Trennung dieser Reaktionsprodukte erleichterte. Die reduktive Hydrolyse mit Natriumhydrogensulfit führte zum *cis*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen **6a**, das in ungereinigtem Zustand mit DDQ (Boylard & Sims, 1964) in das entsprechende 3,4-Chinon **7**

überführt wurde. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie mit Kieselgel war die Ausbeute (12%) recht gering (60-70%, Harvey *et al.*, 1975), Gründe hierfür könnten die geringe Reaktivität des BghiPs bzw. die Weiterreaktion des Monoosmat-Esters zum Bisosmat-Ester sein.

Benzo[*ghi*]perylen-3,4-chinon 7 ließ sich mit NaBH₄ in Gegenwart von Sauerstoff stereoselektiv zum *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen (\pm)-6 reduzieren (Platt & Oesch, 1982), dessen UV-Spektrum sich vom *cis*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen 6a (Abb. 3.11) wegen des gleichen Chromophors nicht unterscheidet.

Die Synthese des *cis*-3,4-*cis*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens (\pm)-8 (Abb. 3.12) erforderte eine 2,2-fache Erhöhung der Menge an Osmium(VIII)-oxid. Hydrolyse des benzolunlöslichen Anteils des Reaktionsgemisches ergab mit 64% das *cis*-3,4-*cis*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylen 8a, das relativ leicht mit Luftsauerstoff zum *cis*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen-11,12-chinon reagierte (m/z = 340 (56%, M⁺), 322 (100%, M⁺ - H₂O), 306 (13%, M⁺ - H₂O - [O])).

8a wurde unter Rückfluss mit DDQ zum Benzo[*ghi*]perylen-3,4,11,12-bischinon 9 (Abb. 3.12) umgesetzt, dessen UV-Spektrum wider Erwarten untypisch für chinoiden Strukturen ist. Chinone zeigen neben dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang einen $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang (Sidman, 1956) der Carbonylgruppe, woraus ein charakteristisches UV-Absorptionmaximum im langwelligen Bereich resultiert (siehe: UV-Spektrum von 7 (Abb. 3.11) mit einem Absorptionsmaximum bei 462 nm). Da bei Benzo[*ghi*]perylen-3,4,11,12-bischinon im langwelligen Bereich über 400 nm keine ausgeprägte UV-Absorption beobachtet werden kann, deutet dies auf das Vorliegen zwei vom Rest des Moleküls isolierten Diketon-Strukturen hin, die keine chinoiden Eigenschaften zeigen.

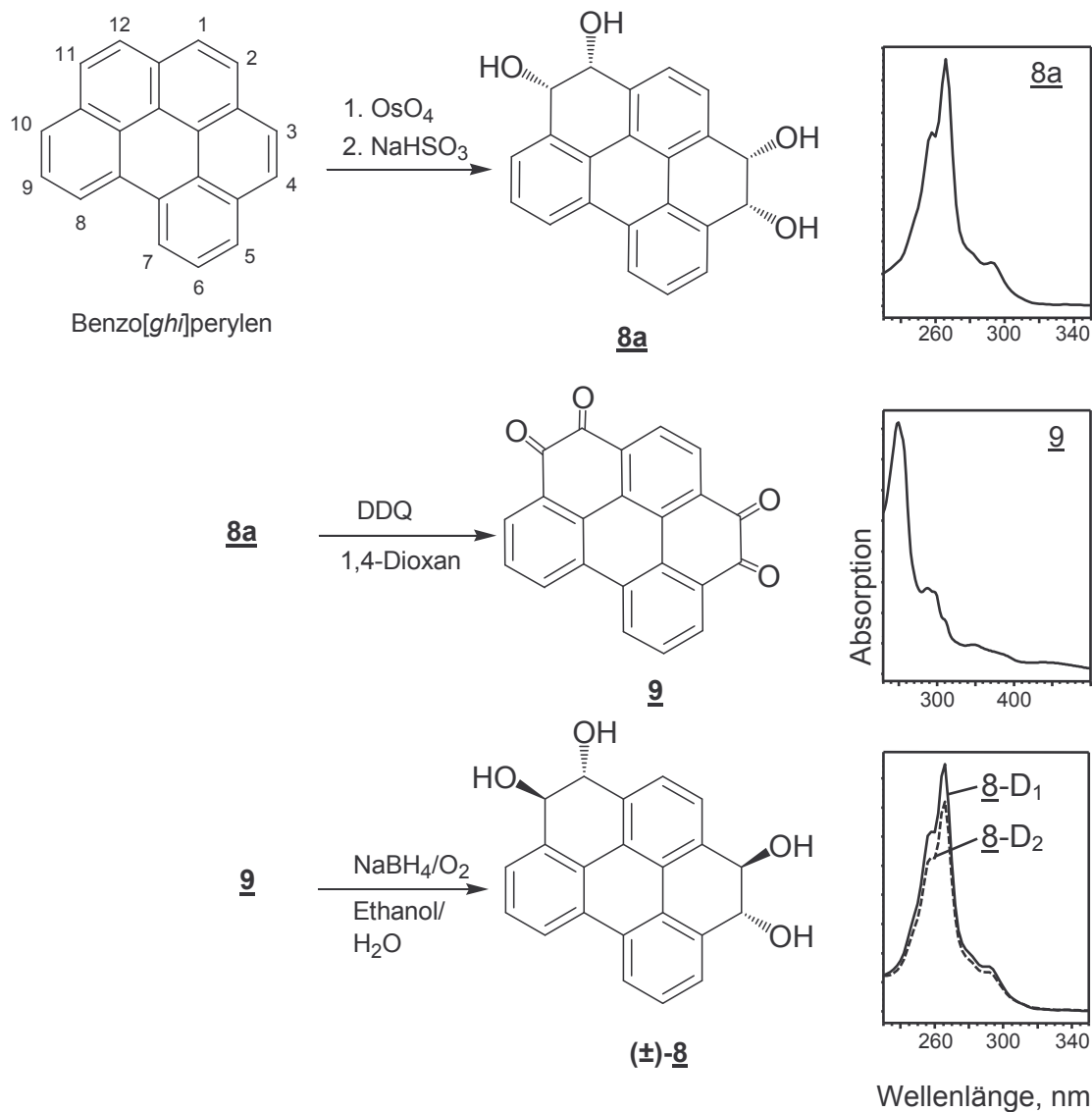


Abbildung 3.12: Synthese des *trans*-3,4-*trans*-11,12-tetrahydro-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens (\pm)-**8** mit den UV-Spektren der Zwischenprodukte *cis*-3,4-*cis*-11,12-tetrahydro-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylene **8a** und Benzo[*ghi*]perylene-3,4-chinon **9**

Mit NaBH_4 wurde **9** in Gegenwart von Sauerstoff zu *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydro-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylene **8-D₁** und **8-D₂** reduziert (Abb. 3.13 B), deren UV-Spektren (Abb. 3.12) jeweils mit dem von **8a** identisch sind. **8-D₁** und **8-D₂** sind die durch HPLC an Umkehrphasen trennbaren Diastereomere von **8**. Nur **8** und nicht **8a** mit seinen *cis*-ständigen Hydroxylgruppen (Abb. 3.13 A) wird in Diastereomere getrennt (siehe Abschn. 3.4.2).

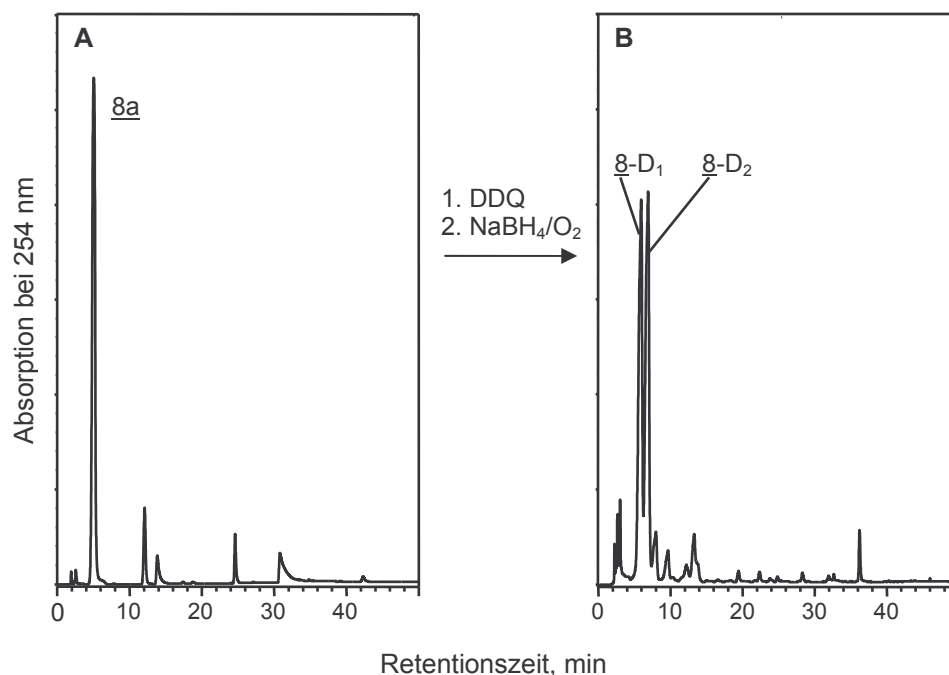


Abbildung 3.13: HPLC-Analyse des 3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylens 8a und 8-D₁ und 8-D₂ und des Zwischenproduktes 8a

Bedingungen: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Methanol/Wasser 50/50, V/V, in 40 min auf 100% Methanol, 10 min Methanol, Fluß: 0,8 ml/min

A: 8a unmittelbar nach der reduktiven Hydrolyse des Osmatesters mit Natriumhydrogensulfit

B: 8-D₁ und 8-D₂ nach Umsetzung von 8a mit DDQ und Natriumborhydrid

3.1.3.1 α -Menthoxyacetate der Dihydrodirole von Benzo[ghi]perylen

Eine Veresterung von *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen (\pm)-6 und der beiden Diastereomere von *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen 8 mit α -(-)-Menthoxyessigsäurechlorid sollte zur chromatographischen Trennung dieser optisch aktiven Moleküle (Schollmeier *et al.*, 1986) dienen und Vergleichssubstanzen für die Menthoxyester der enzymatisch gebildeten Moleküle liefern.

Die zunächst mit einer Probesubstanz (5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrodibenz[*a,h*]anthracen) unter striktem Ausschluss von Feuchtigkeit und hohem Überschuß an α -(-)-Menthoxyessigsäurechlorid durchgeführte Reaktion verlief quantitativ, da chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachzuweisen war. Die UV-Spektren der Produkte zeigen wie erwartet eine hohe Ähnlichkeit mit denen der Edukte. Nach Reinigung der Reaktionsprodukte mit HPLC wurden sie mit Normalphasen (Kieselgel 60) analysiert, siehe Abschn. 3.4.1.1.

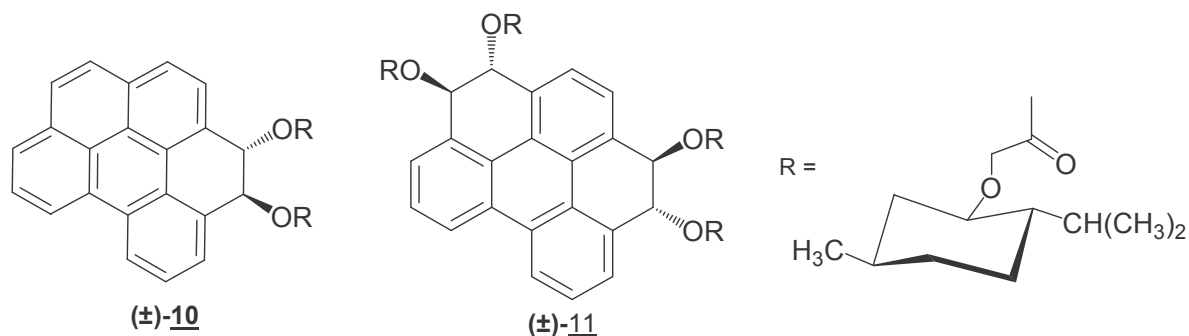


Abbildung 3.14: α -Menthooxyessigacetate der *trans*-Dihydrodirole des Benzo[ghi]perylens

3.1.4 K-Region Epoxide von Benzo[ghi]perylen

K-Region Epoxide von PAKs sind sowohl aus den *cis*-Dihydrodiolen (Dansette & Jerina, 1974) bzw. aus den *trans*-Dihydrodiolen (Harvey *et al.*, 1975; Oesch *et al.*, 1980) zugänglich als auch durch direkte Oxidation des Mutterkohlenwasserstoffes mit Natriumhypochlorit (Krishnan *et al.*, 1977) oder Kaliumperoxymonosulfat (Murray & Jeyaraman, 1985, Jeyaraman & Murray, 1984).

Die Darstellung des 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens 12 gelang hier ausschließlich durch Umsetzung von Benzo[ghi]perylen mit Kaliumperoxymonosulfat (Abb. 3.15). In dieser Reaktion wird durch das aus Aceton und Peroxymonoschwefelsäure *in situ* gebildete Dimethyldioxiran (Curci *et al.*, 1980, Montgomery, 1974) atomarer Sauerstoff in die K-Region des Aromaten addiert. Dieser Prozess findet im wässrigen Milieu durch Phasentransferkatalyse bei einer Temperatur von 0 - 10°C statt. Da einerseits ein zu tiefer pH-Wert die Bildung des Dimethyldioxiranes verhindern und andererseits ein zu hoher pH-Wert zu seiner Zerstörung führt (Adams *et al.*, 1989), wird der pH-Wert mit Phosphatpuffer und 2 - 3%iger KOH-Lösung zwischen 7,5 und 8,5 konstant gehalten (ständige Kontrolle durch eine pH-Glaselektrode).

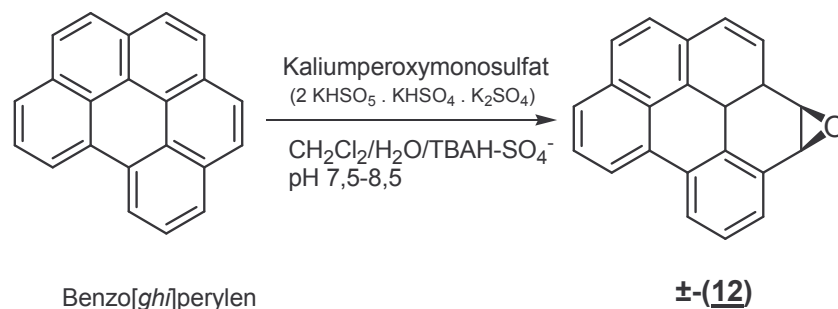


Abbildung 3.15: Synthese und UV-Spektrum des 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens ±-(12) durch Umsetzung des Mutterkohlenwasserstoffes mit Kaliumperoxymonosulfat (Oxon)

Die ursprünglich in der Vorschrift beschriebene Reaktionszeit von über vier Stunden erwies sich als zu lang und wurde bis auf 30 min verkürzt, was sich hinsichtlich Umsatz (20-30%) und Isomerisierungsgrad des Produktes zum entsprechenden Phenol, das mit dem 3,4-Epoxid koeluiert, als optimal erwies (Abb. 3.16 A). Das UV-Spektrum (Abb. 3.16 B) ähnelte wie erwartet dem des *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylene 6 (Abb. 3.11). Eine NMR-Untersuchung des Rohproduktes zeigte zwei charakteristische Dubletts der Protonen der Epoxidstruktur bei 4,99 ppm bzw. 5,06 ppm mit je einer Kopplungskonstanten von $J_{3,4} = 4,0$ Hz (Goh & Harvey, 1973). Durch Integration des NMR-Spektrums wurde der Anteil des 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylens im Rohprodukt mit 30% bestimmt (65% bei Phenanthren, Jeyaraman & Murray, 1984).

Die chromatographische Reinigung des 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylens mit HPLC führte trotz Verwendung von Triethylamin im Eluenten zu einer fast 50%igen Isomerisierung zum Phenol.

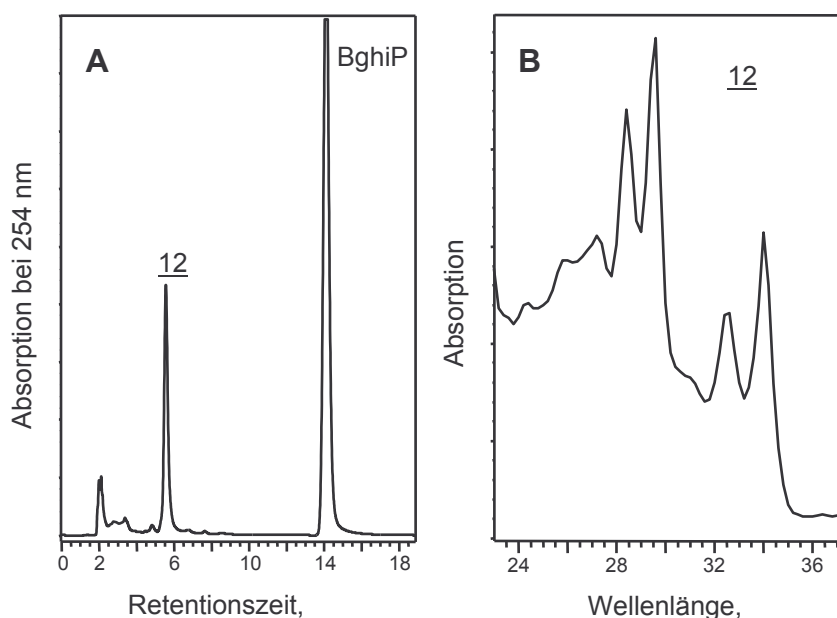


Abbildung 3.16: HPLC-Analyse des Produktes aus der Reaktion Benzo[*ghi*]perylene (BghiP) mit Kaliumperoxymonosulfat (Oxon), Reaktionszeit: 30 min
 Bedingungen: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Methanol/Triethylamin, 99,9/0,1, V/V, Fluß: 0,8 ml/min
A: Reaktionsprodukt 12 und Edukt BghiP
B: UV-Spektrum von 12

Zunächst war die Synthese des 3,4,11,12-Diepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens durch Oxidation mit Natriumhypochlorit (Krishnan *et al.*, 1977) unter Phasentransferkatalyse geplant. Die Modellreaktion mit Phenanthren (Krishnan *et al.*, 1977) ergab quantitativ (90%) das 9,10-Oxid. BghiP wurde unter den gleichen Bedingungen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (15 min – 120 min) teilweise zu einem unpolaren Nebenprodukt umgesetzt.

Da das Bisarenoxid durch direkte Oxidation des Mutterkohlenwasserstoffes nicht zugänglich zu sein scheint, wurde 3,4,11,12-Diepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylene (\pm)-13 aus

dem enzymatisch gebildeten *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylene (M1/M2, s. Abschn. 3.3.1) mit Natriumhydrid und *N*-Tosylimidazol nach dem von Hicks & Fraser-Reid 1974 beschriebenen Verfahren dargestellt (Abb. 3.17).

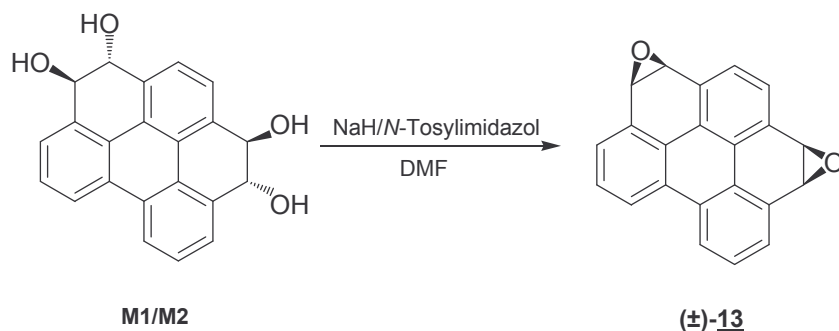


Abbildung 3.17: Synthese des 3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens (\pm)-13 aus dem enzymatisch gebildeten *trans*, *trans*-3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens (M1/M2)

Diese extrem feuchtigkeitsempfindliche Reaktion verlief nahezu quantitativ (Abb. 3.18 A) zu den Produkten 13-D₁ und 13-D₂, deren identische UV-Spektren (Abb. 3.18 B) wie erwartet eine hohe Ähnlichkeit mit dem des Eduktes M1 und M2 aufweisen (vergleiche Abb. 3.12). 13-D₁ und 13-D₂ sollten ebenfalls (siehe oben bei (\pm)-8) diastereomere Verbindungen darstellen. In einem Peak könnte das *syn*-Diastereomer und in dem anderen das *anti*-Diastereomer enthalten sein.

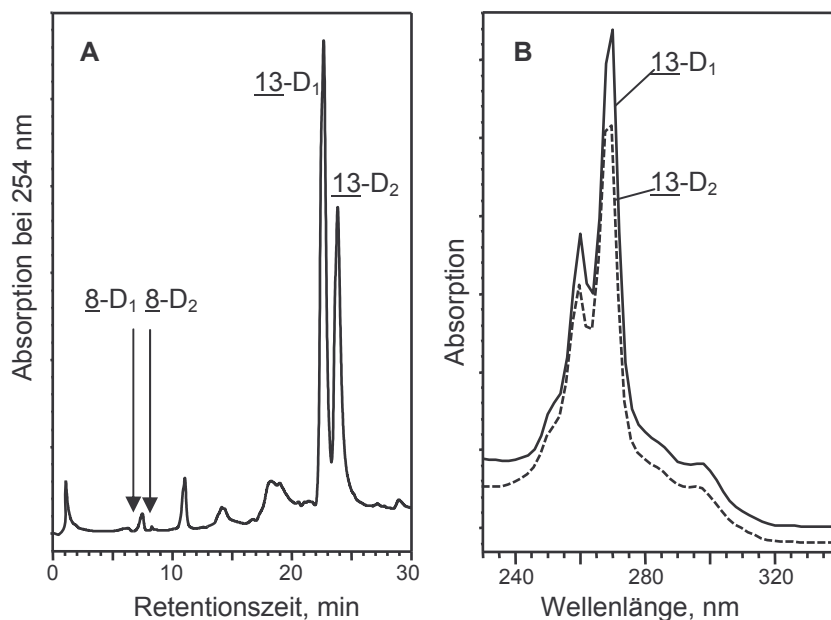


Abbildung 3.18: HPLC-Analyse und UV-Spektren der Diastereomere von 3,4,11,12-Diepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylen 13-D₁ und 13-D₂

Bedingungen: LiChrospher RP18e, 5 μ m, 4 x 250 mm, Methanol/Ammoniumhydrogencarbonatpuffer 10 mM, pH-Wert 7,9, 50/50, V/V in 40 min auf 100% Methanol, Fluß: 0,8 ml/min

A: Reaktionsprodukte 13-D₁ und 13-D₂

B: UV-Spektrum von 13-D₁ und 13-D₂

Das synthetische Bisdihydrodiol 8 ließ sich wider Erwarten nicht zum Bisarenoxid umsetzen. Ein Grund könnten noch anwesende Verunreinigungen mit geringsten Mengen an Osmium(VIII)-oxid sein, die eine Epoxidbildung verhinderten.

3.2 Charakterisierung von subzellulären Fraktionen der Rattenleber

3.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes und der Aktivität verschiedener 7-Alkoxyresorufin-O-dealkylasen

Zur Aufklärung des Metabolismus von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen leistet die Induktion der an der Biotransformation beteiligten Enzyme einen wichtigen Beitrag, da sie die Zusammensetzung der Metaboliten sowohl qualitativ als auch quantitativ beeinflusst.

Die Ermittlung des Proteingehaltes und Bestimmung der 7-Ethoxy- sowie 7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase-Aktivität gibt Aufschluss über die Art und Ausmaß der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme durch Phenobarbital, 3-Methylcholanthren und Aroclor 1254. Die postmitochondriale Fraktion (S9) setzt sich aus 1/3 der mikrosomalen Fraktion und 2/3 cytosolischer Fraktion zusammen. Daher ist die Proteinmenge von S9 gegenüber der mikrosomalen Fraktion 3-mal höher, während die enzymatische Aktivität (EROD und PROD) ca. 1/3 der mikrosomalen Fraktion beträgt.

In Tabelle 3.1 ist zu erkennen, dass sich der Gesamtproteingehalt der untersuchten Zellfraktionen gegenüber den Kontrollwerten nicht verändert hat. Eine deutliche Erhöhung ist jedoch, verglichen mit Fraktionen von unbehandelten Tieren (Kontrolle) bei den Werten aus der Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) und 7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) zu beobachten.

EROD ist selektiv für die CYP-Isoenzyme der 1A-Familie und wird vor allem durch Aroclor 1254 und 3-Methylcholanthren (3-MC) induziert. Dies zeigt sich auch an der starken Zunahme der Aktivität durch Aroclor 1254 (S9: 220-fach, Mik: 886-fach) dicht gefolgt durch 3-MC (S9: 56-fach, Mik: 331-fach). Durch Phenobarbital war hingegen nur ein geringer Anstieg der Aktivität (Mik: 15-fach) zu verzeichnen.

PROD ist selektiv für die CYP-Isoenzyme der 2B-Subklasse [2B1, 2B2] und wird vor allem durch Phenobarbital (PB) induziert. Dies wird besonders deutlich am geringeren Anstieg der Aktivität durch Aro 1254 (Mik: 72-fach) im Vergleich zu PB (Mik: 115-fach). Durch 3-Methylcholanthren war der geringste Anstieg der Aktivität (S9: 3,6-fach) zu beobachten.

Induktor	Charge	Zellfraktion	Protein- konzentration [mg/ml]	Enzymaktivität			
				EROD [pmol Resorufin/min/mg Protein]		PROD	
Kontrolle	7/99	S9	49,7 ± 2,1	5,9±	0,1	4,7±	1,7
		Mik	12,9 ± 2,7	5,2±	0,3	7,0±	0,7
PB	04/02 (Pool)	S9	30,8 ± 2,8	n. b.		n. b.	
	04/02 (1)	Mik	7,2 ± 1,3	79,2*		787 ± 320	
	04/02 (2)	Mik	5,8 ± 1,3	n. b.		825 ± 166	
	04/02 (Pool)	Mik	7,5 ± 2,6	n. b.		813 ± 10	
3-MC	10/99 (1-8)	S9	33,4 ± 6,4	332 ± 3		17,4± 4,4	
	04/02 (Pool)	S9	25,7 ± 1,8	n. b.		n. b.	
	04/02 (1)	Mik	6,2 ± 1,5	1444 ± 197		n. b.	
	04/02 (2)	Mik	6,5 ± 1,9	1614 ± 73		n. b.	
	04/02 (3)	Mik	6,7 ± 1,7	1503 ± 60		n. b.	
	04/02 (4)	Mik	7,7 ± 1,2	2153 ± 49		n. b.	
	04/02 (Pool)	Mik	6,5 ± 1,8	1892 ± 86		n. b.	
Aroclor 1254	04/02 (1)	S9	30,8 ± 1,5	n. b.		n. b.	
	10/02 (Pool)	S9	34,0 ± 3,1	1301 ± 97		122 ± 29	
	02/03 (Pool)	S9	34,5 ± 0,5	1293 ± 242		176 ± 20	
	04/02 (1)	Mik	8,9 ± 2,0	4702 ± 339		407 ± 5	
	10/02 (Pool)	Mik	10,9 ± 1,1	4042 ± 301		381 ± 91	
	02/03 (Pool)	Mik	7,7 ± 0,3	5082 ± 1083		722 ± 72	

Tabelle 3.1: Einfluss der Behandlung von *Sprague-Dawley*-Ratten mit Phenobarbital (PB), 3-Methylcholanthren (3-MC) und Aroclor 1254 auf Proteingehalt und Aktivität von Cytochrom P-450 Enzymen der postmitochondrialen (S9) und mikrosomalen Fraktionen (Mik) der Rattenleber (S9, Mik)

Mittelwerte ± SD, $n = 2-4$ (*, Einzelwert). Kontrolltiere wurden keiner Behandlung unterzogen. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde die Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin (EROD) und 7-Pentoxyresorufin (PROD) zu Resorufin gemessen, n.b., nicht bestimmt

3.3 Mikrosomale Biotransformation von Anthanthren

3.3.1 Identifizierung der mikrosomalen Metaboliten von Anthanthren

Nach Inkubation von 80 μ M Anthanthren mit Mikrosomen aus Rattenlebern nach dem unter 2.4.2 beschriebenen Verfahren wurden durch HPLC-Trennung des Ethylacetatextraktes und UV-spektroskopische Analyse 10 Metaboliten detektiert (A1-A3, A5-A11) (Abb.3.19).

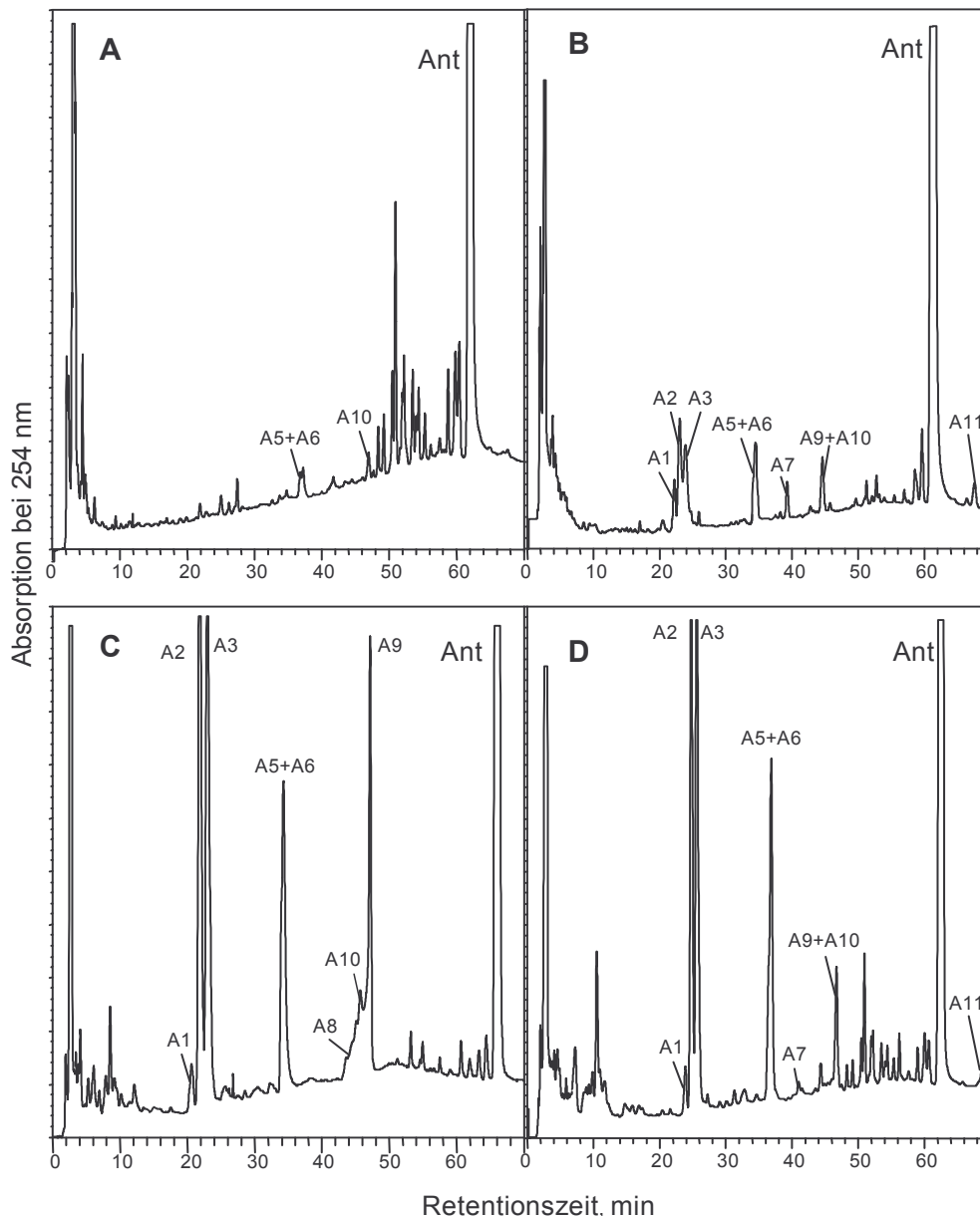


Abbildung 3.19: HPLC-Analyse der Ethylacetat-extrahierbaren Metabolite von Anthanthren (Ant) nach Inkubation mit Lebermikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten *Sprague-Dawley*-Ratten. Bedingungen: LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 65/35, V/V in 50 min auf 100% Methanol, Fluß: 0,8 ml/min
A: Kontrollinkubation ohne NADPH-regenerierendem System
B: Lebermikrosomen von Versuchstieren nach Behandlung mit: Phenobarbital
C: 3-Methylcholanthren
D: Aroclor 1254
 Erläuterung der Abkürzungen vgl. Tab. 3.2

Durch Vergleich der Retentionszeit sowie der UV-Spektren der Metaboliten und der Referenzsubstanzen (Platt *et al.*, 2002) konnten in mehreren Fällen Strukturzuordnungen getroffen werden, die zusätzlich durch Massenspektrometrie (Metaboliten A5, A6, A10 sowie A2, A3, A8 und A9 in acetylierter Form) untermauert wurden.

Metabolit ^a	Struktur	t _R , min	Identifizierung ^b		
			UV	MS	Metabolische Bildung aus 3-Hydroxy- anthanthren ^c
A1	<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-4,5-dihydroanthanthren	22,0	x		
A2	Diphenol/Chinon	22,7	x	x ^d	x
A3	Diphenol/Chinon	23,7	x	x ^d	x
A5	Anthanthren-1,6-chinon	34,2	x	x	
A6	Anthanthren-3,6-chinon	34,2	x	x	x
A7	4,5-Epoxy-4,5-dihydroanthanthren	38,5	x		
A8	1-Hydroxyanthanthren	43,1	x	x ^d	
A9	3-Hydroxyanthanthren	44,0	x	x ^d	
A10	Anthanthren-6,12-chinon	44,0	x	x	
A11	6-Methylanthanthren	68,1	x	x	

Tabelle 3.2: Strukturzuordnung der Metaboliten des Anthanthrens

^a Die Metaboliten des Anthanthrens wurden entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge auf LiChrospher RP18e (Bedingungen s. Abschn. 2.4.3) nummeriert. A5 und A6 konnten nur auf Spherisorb ODS 2 getrennt werden (Abschn. 2.4.3)

^b Die Identifizierung der Metaboliten des Anthanthrens erfolgte durch UV-Spektrenvergleich mit den Referenzsubstanzen bzw. durch Massenspektrometrie der chromatographisch isolierten Metaboliten und im Fall des Metaboliten 11 durch Cochromatographie mit synthetischem 6-Methylanthanthren

^c Platt *et al.*, 2002

^d Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte entweder nach Acetylierung der isolierten Metaboliten (A2 und A3) oder des gesamten Inkubationsansatzes und chromatographische Trennung der Acetate (A8 und A9)

Es wurden neben drei mehrkernigen Chinonen, dem Anthanthren-1,6-, -3,6- und -6,12-Chinon (A5, A6, A10), auch zwei Phenole (1- und 3-Hydroxyanthanthren, A8, A9) sowie ein Dihydrodiol (*trans*-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydroanthanthren, A1) und ein Arenoxid (4,5-Epoxy-4,5-dihydroanthanthren, A7) identifiziert.

Im Falle der polaren Hauptmetaboliten A2 und A3 gelang eine partielle Strukturaufklärung. Aufgrund früherer Untersuchungen (Platt *et al.*, 2002) werden A2 und A3 aus dem 3-Phenol von Anthanthren gebildet. Diese Beobachtung und ihre hohe Polarität legen nahe, dass es sich um Diphenole handelt. Diese Annahme wurde durch Acetylierung der isolierten Metaboliten A2 und A3 sowie des gesamten Inkubationsansatzes gestützt, denn massenspektroskopische Untersuchungen der chromatographisch isolierten Acetate ergaben in beiden Versuchen Hinweise auf eine acetylierte Dihydroxyverbindung ($m/z = 392$ (M^+)). Im Fall des acetylierten Inkubationsansatzes waren noch drei Phenolacetate ($m/z = 334$ (M^+)) nachweisbar, die sich vermutlich von den Phenolen A8 und A9 sowie einem noch unbekanntem Phenol ableiten.

Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine chinoide Struktur von A2 und A3, wofür vor allem die UV-Spektren beider Metaboliten sprechen (Abb. 3.20).

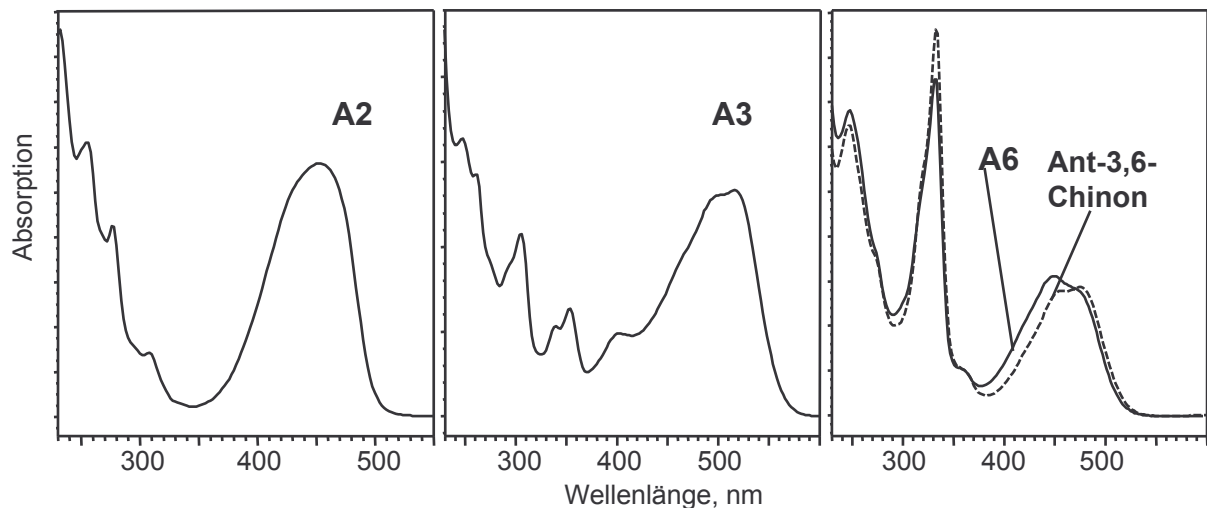


Abbildung: 3.20: UV-Spektren der Metaboliten A2, A3 und A6 (Vergleich mit synthetischem Ant-3,6-Chinon) aus einer Inkubation des Anthanthrens mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254, Abkürzungen: s. Tab. 3.2

Die Metaboliten A2 und A3 absorbieren wie das Anthanthren-3,6-chinon im langwelligen Bereich (A2: $UV_{max} \lambda = 454$ nm, A3: $UV_{max} \lambda = 516$ nm), wie er für Chinone typisch ist, da durch den neben dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang auftretenden $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang (Sidman, 1956) der Carbonylgruppe, ein charakteristisches UV-Absorptionmaximum im langwelligen Bereich resultiert. Diese Annahme wird die massenspektrometrisch bestimmte Masse der isolierten Metaboliten A2 und A3 von $m/z = 306$ (M^+) untermauert (Abb. 7.9, Anhang). Weiterhin war es nicht möglich, die vermuteten diphenolischen Metaboliten A2 und A3 mit Natriumdichromat zu den entsprechenden Chinonen zu oxidieren, stattdessen ergab eine HPLC-Analyse des Reaktionsproduktes ein Mehrkomponentengemisch unbekannter Zusammensetzung.

Da A2 und A3 Metaboliten des 3-Hydroxyanthanthrens sind (Platt *et al.* 2002), sollte sich eine der beiden Sauerstofffunktionen in Position 3 befinden, die Lage der anderen ist unbekannt, auszuschließen ist jedoch Position 6, wie ein Vergleich mit dem UV-Spektren von

Anthanthren-3,6-chinon belegt (Abb. 3.20). Außerdem wurde Metabolit A6 bereits als Anthanthren-3,6-chinon identifiziert. Weitere strukturell mögliche Chinone des Anthanthrens wären das 2,3-, 3,5-, 3,7-, 3,9- oder das 3,10-Chinon.

In Inkubationen mit Mikrosomen von Ratten, die mit Phenobarbital bzw. Aroclor 1254 behandelt wurden, eluierte hinter Anthanthren eine weitere Substanz (Metabolit A11), die in der Kontrollinkubation nicht auftrat (Abb. 3.21 A). Dieser Metabolit, dessen Menge stets unter 1% blieb, stimmt sowohl in seinem UV-Spektrum als auch in der Retentionszeit (Cochromatographie) mit dem der authentischen Referenzsubstanz 6-Methylanthanthren (Platt *et al.*, 2002) überein (Abb. 3.21 B).

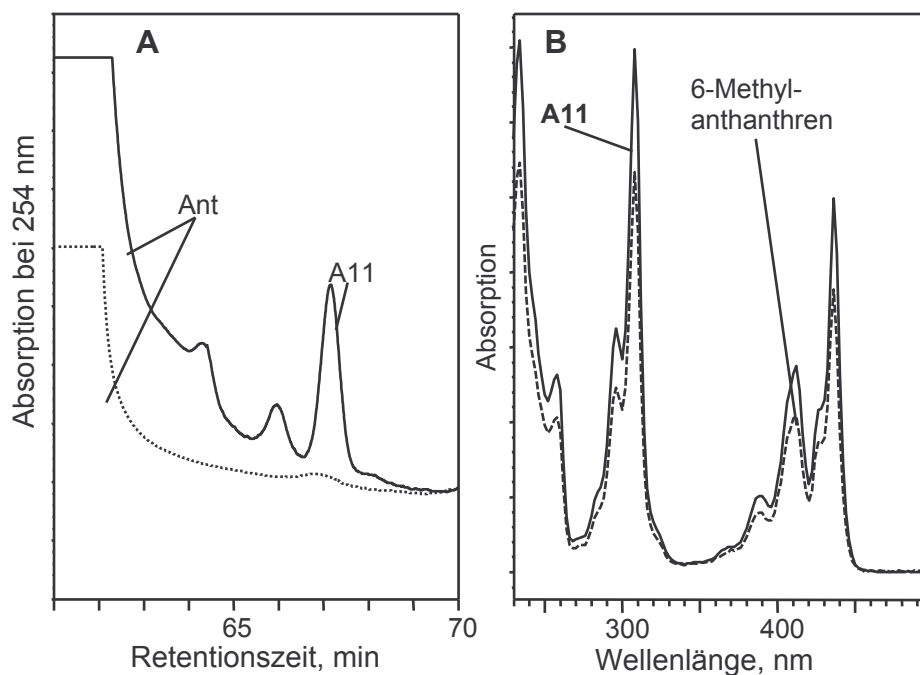


Abbildung 3.21: Ausschnitt eines Chromatogramms der Ethylacetat-extrahierbaren Metabolite von Anthanthren (Ant) und UV-Spektrum des Metaboliten A11, Bedingungen: s. Abb. 3.19

A: Inkubation von Anthanthren mit Lebermikrosomen von Aroclor 1254 behandelten Ratten mit (durchgezogene Linie) und ohne (gestrichelte Linie) NADPH-regenerierendem System

B: UV-Spektrum von Metabolit A11 im Vergleich mit synthetischem 6-Methylanthanthren

3.3.2 Einfluss verschiedener Enzyminduktoren auf die Zusammensetzung und Umsatz der Metaboliten des Anthanthrens

Nach Inkubation von Anthanthren mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 ohne NADPH-regenerierendem System (Abb. 3.19 A) waren nur mehrkernige Chinone (Ant-1,6-, -3,6- und -6,12-chinon (A5, A6 und A10)) in Spuren nachweisbar.

Der Umsatz des Anthanthrens mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Phenobarbital war im Vergleich zu Aroclor 1254 und 3-Methylcholanthren deutlich schwächer. (Abb. 3.19 B). Unter diesen Bedingungen war der Anteil von *trans*-4,5-Dihydroxy- und von 4,5-Epoxy-4,5-dihydroanthanthren relativ zu den Hauptmetaboliten am höchsten. In Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit 3-MC, konnte das Arenoxid nicht nachgewiesen werden (Abb.3.19 C).

A2 und A3 stellten in allen Fällen die Hauptmetaboliten, wobei der Anteil von A3 in Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit 3-MC am höchsten war.

Die Menge der Chinone des Anthanthrens blieb unabhängig vom Induktor im Verhältnis zu der der anderen mikrosomalen Metaboliten konstant (Abb. 3.19 B, C, D).

Eine besonders starke Bildung der Phenole wurde in Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit 3-MC zu beobachten: 3-Hydroxyanthanthren (A9) war einer der Hauptmetaboliten und das 1-Hydroxyanthanthren (A8) war hier ebenfalls verglichen mit anderen Inkubationen in auffallend hoher Menge entstanden (Abb. 3.19 C).

6-Methylanthanthren konnte nur in Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor- bzw. Phenobarbital behandelten Ratten in Spuren nachgewiesen werden.

3.3.3 Einfluss von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid auf die Biotransformation von Anthanthren mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254

Arenoxide werden durch die mEH zu *trans*-Dihydrodiolen hydrolysiert. Hemmung dieses Enzyms mit TCPO sollte daher die Bildung von Metaboliten mit vicinalen Hydroxylgruppen unterdrücken. Wie in der HPLC-Analyse der Ethylacetatextrakte von Inkubationen des Anthanthrens mit (1 mM) und ohne TCPO zu erkennen ist (Abb. 3.22 A und B), war in Anwesenheit von TCPO das Ant-4,5-Dihydrodiol (A1) wie erwartet nicht mehr nachweisbar. Stattdessen war das Ant-4,5-Oxid (A7) etwas stärker vertreten, allerdings war der Umsatz um 40-70% reduziert und 1-Hydroxy-, 3-Hydroxyanthanthren (A8 und A9) sowie 6-Methylanthanthren (A11) konnten nicht mehr detektiert werden.

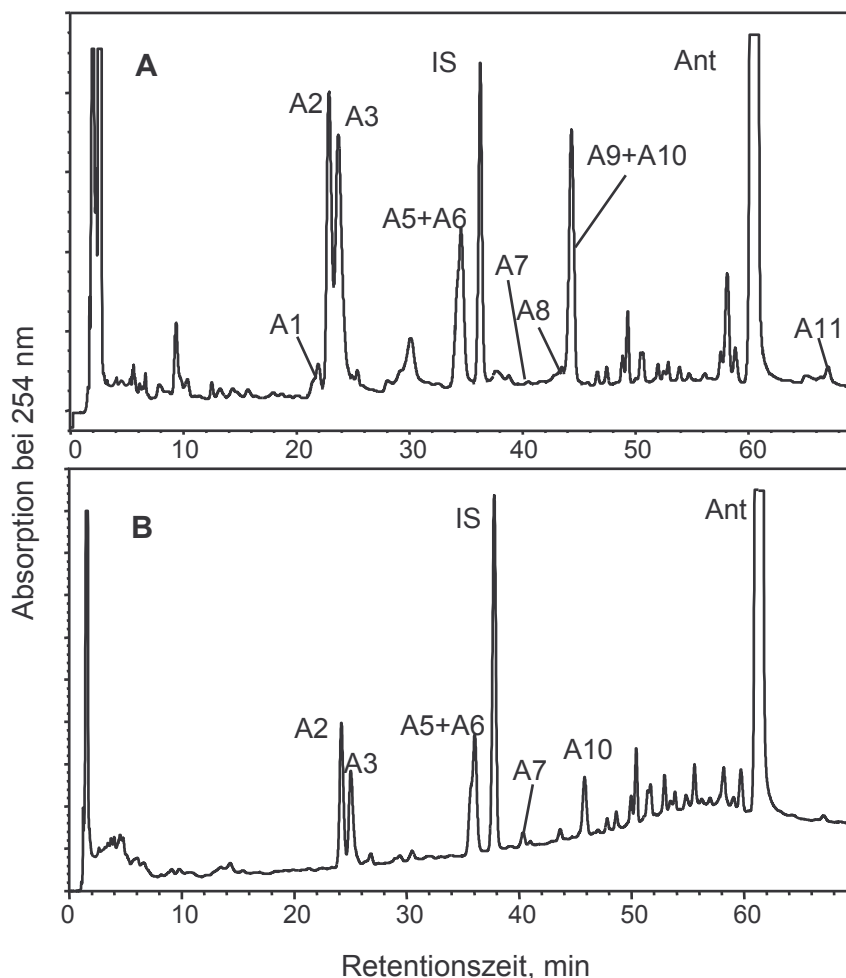


Abbildung 3.22: Einfluss von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid (TCPO) auf die Zusammensetzung der Ethylacetat-extrahierbaren Metabolite von Anthanthren (Ant) nach Inkubation mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254, Trennbedingungen: s. Abb. 3.19. IS, innerer Standard: 9,10-Dihydrobenzo[*a*]pyren-7(8*H*)-on, Abkürzungen s. Tab. 3.2
A: ohne TCPO
B: mit 1 mM TCPO

Ein Vergleich des zeitabhängigen Umsatzes (Abb. 3.23) von Anthanthren mit (1 mM) und ohne TCPO zeigt, dass der Quotient aus den Peakflächen von Metabolit und innerem Standard als Maß für die Menge des Metaboliten von Ant-4,5-Dihydrodiol (A1) effektiv um nahezu 100% reduziert wurde während die Menge seiner Vorstufe, das Ant-4,5-Epoxid, um den Faktor 1,8 zunahm.

Bei A2 war die Zunahme der Menge um den Faktor 2,4 unter dem Einfluss von TCPO von 20 min auf 60 min etwas größer als in Abwesenheit von TCPO (Faktor: 1,8) beobachtet wurde. Auf die Entstehung der mehrkernigen Chinone des Anthanthrens hatte TCPO wie erwartet nur geringe Auswirkungen. Die Bildung der Phenole sowie die des 6-Methylanthanthrens wurden dagegen drastisch unterdrückt (Abb. 3.22).

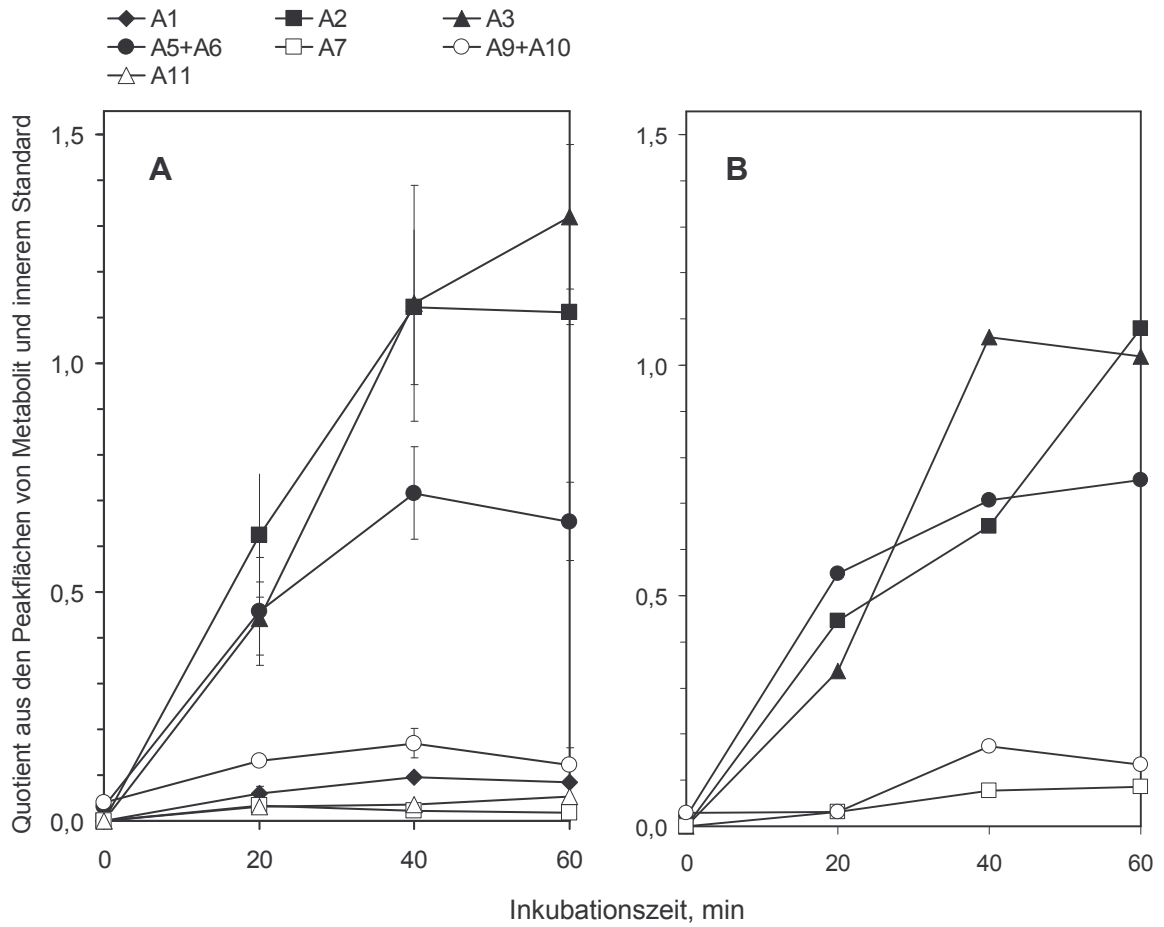


Abbildung 3.23: Zeitabhängige Entstehung der Metaboliten von Anthanthren (Ant) in Inkubationen mit Mikrosomen von Ratten nach Vorbehandlung mit Aroclor 1254, Abgebildet sind bei A Mittelwerte \pm SD, n = 3-5. Innerer Standard: 9,10-Dihydrobenzo-[a]pyren-7(8H)-on, Abkürzungen s. Tab. 3.2
A: ohne TCPO
B: mit 1 mM TCPO

3.4 Untersuchung des mikrosomalen Metabolismus von Benzo[ghi]perylen

BghiP wurde mit Lebermikrosomen von Ratten umgesetzt, die zuvor mit verschiedenen Induktoren behandelt worden waren. Nach Beendigung der enzymatischen Reaktion wurden die Metaboliten des wässrigen Inkubationsansatzes mit den in Abschn. 2.3.2 beschriebenen Verfahren mit Ethylacetat extrahiert und einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterzogen.

Das Säulenmaterial bestand aus einer unpolaren Umkehrphase, um die Retentionszeiten der polaren Metaboliten von BghiP möglichst klein zu halten. Außerdem eluiert der nicht umgesetzte Mutterkohlenwasserstoff, der den größten Anteil darstellt, zuletzt. Als Laufmittel diente ein Methanol/Wasser-Gemisch, das mittels eines Gradienten eine gute Trennung der Metaboliten in einer angemessenen Analysenzeit ermöglichte.

Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarraydetektor, der einerseits bei einer Wellenlänge von 254 nm die Metaboliten als Peaks registrierte und andererseits von jedem Peak UV-Spektren aufnahm und speicherte. Somit dienten die Retentionszeit und das UV-Spektrum der Metaboliten zur Charakterisierung eines Metaboliten.

UV-Spektren sind besonders für PAKs typisch, da das aromatische Grundgerüst durch sein konjugiertes π -Elektronensystem als Chromophor für Lage und Gestalt der Absorptionsbanden verantwortlich ist. Abhängig von der chemischen Struktur des Polyaromaten können sich Position und Aussehen der Banden ändern. Wenn z. B. ein Benzolring durch Hydrierung abgesättigt wird, verkleinert sich der Chromophor, so dass sich dadurch Absorptionsbanden hypsochrom verschieben und sich die Gestalt des UV-Spektrums ändert. Vergleicht man nun dieses UV-Spektrum mit dem eines Polyaromaten mit gleichem Chromophor, ergibt sich eine hohe Ähnlichkeit, die zur Aufklärung der Struktur eines unbekanntes Derivats eines PAKs beiträgt.

Dies soll am Beispiel von BaP verdeutlicht werden: durch Einführung einer Dihydrodiolgruppierung in der 4,5-Position wird der entsprechende Ring abgesättigt und trägt nicht mehr zur Aromatizität des Moleküls bei. Das 4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo[a]pyren besitzt nun einen kleineren Chromophor als Benzo[a]pyren, was eine hypsochrome Verschiebung und Gestaltänderung des UV-Spektrums zur Folge hat. Dasselbe Chromophor wie das 4,5-Dihydrodiol besitzt auch der PAK Chrysen, so dass die UV-Spektren beider Substanzen sehr ähnlich sind.

Daher können durch Vergleich der UV-Spektren der Metaboliten des BghiPs mit denen verschiedener PAKs mit gleichem Chromophor aussagekräftige Informationen zu der möglichen

Struktur erhalten werden. Diese Strukturhinweise wurden dann mit weiteren physikalischen Verfahren wie FD-MS untermauert sowie in einigen Fällen mit $^1\text{H-NMR}$ bestätigt.

Ein indirekter Strukturbeweis kann auch erbracht werden, wenn die Bildung bestimmter Klassen von Metaboliten durch Enzymhemmung unterdrückt wird. Dies ist bei TCPO der Fall, das durch Hemmung der mEH, die Hydrolyse von Arenoxiden und damit die Bildung vicinaler Dihydrodirole verhindert. Somit können diese Art der Metaboliten zumindest indirekt identifiziert bzw. andere aus dieser Gruppe ausgeschlossen werden. Eine weitere Methode zur Absicherung der Struktur eines chromatographisch isolierten Metaboliten ist seine nochmalige mikrosomale Umsetzung. Aus dem Sekundärmetabolismus lassen sich anhand der Art und Zusammensetzung der Biotransformationsprodukte Rückschlüsse auf die Molekülstruktur der Ausgangssubstanz und die der Folgeprodukte ziehen.

Ein weiteres Mittel zur Strukturaufklärung ist die chemische Synthese der Metaboliten, die allerdings in dieser Arbeit nur zur Bestätigung der Struktur diente und im Wesentlichen die Substanzen für weitere Untersuchungen lieferte.

Die größte Bedeutung hatten die Vergleiche der UV-Spektren, weil sie wertvolle Hinweise zur möglichen Struktur des jeweiligen Metaboliten lieferten, die durch weitere Untersuchungen immer bestätigt werden konnte.

3.4.1 Strukturaufklärung der mikrosomalen Metaboliten von Benzo[ghi]perylen nach Umsetzung mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254

Die Inkubation von 80 μM BghiP für 40 min mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254, Extraktion mit Ethylacetat und Trennung des Metabolitengemisches mit Umkehrphasen-HPLC ergab 13 Biotransformationsprodukte (M1-M6, M8, M9, M11-M16, Abb. 3.24). Diese Metaboliten wurden zunächst anhand ihrer Retentionszeiten bzw. Polarität charakterisiert. Ein weiteres wichtiges Merkmal waren ihre gespeicherten UV-Spektren, aus denen wie oben erwähnt, wichtige Strukturhinweise resultieren können. Alle Peaks, die kein für ein aromatisches System typisches UV-Spektrum zeigten oder auch in Inkubationen ohne enzymatische Aktivierung zu finden waren, wurden nicht als Metaboliten betrachtet.

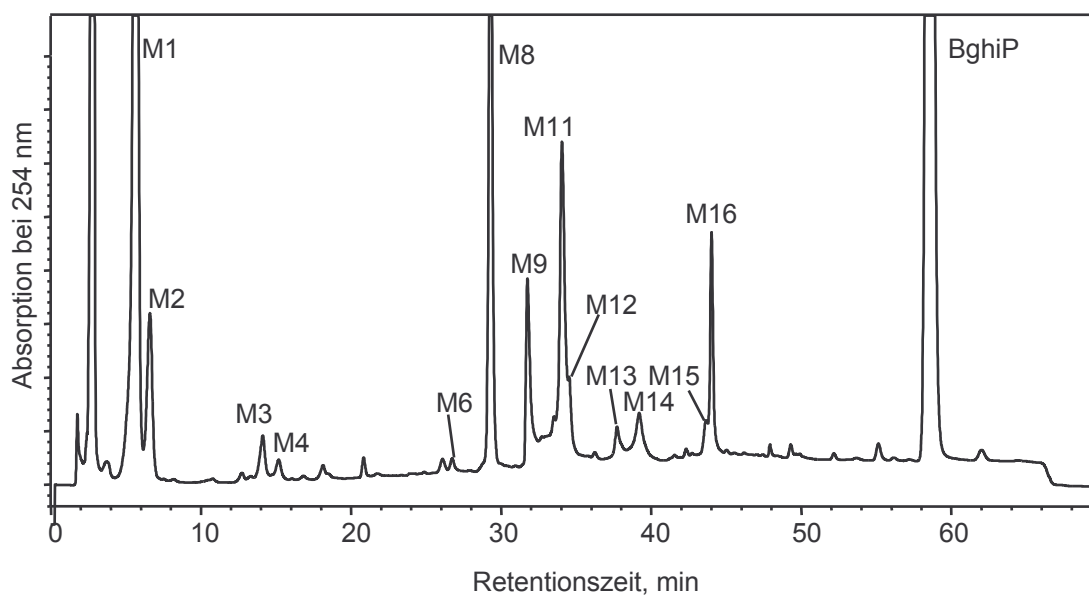


Abbildung 3.24: HPLC-Analyse des Ethylacetatextraktes einer Inkubation von Benzo[ghi]perylen (BghiP) mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254. Trennbedingungen: LiChrospher RP18e, 5 μ m, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, in 40 min auf 100% Methanol, Fluß: 0,8 ml/min

Der erste Metabolit, dessen UV-Spektrum zur Strukturaufklärung beitrug, war Metabolit M8. Das UV-Spektrum von Metabolit M8 hat große Ähnlichkeit mit dem des Benzo[e]pyrens (Abb. 3.25). Metabolit M8 ist also vermutlich ein 3,4-Dihydroderivat von BghiP.

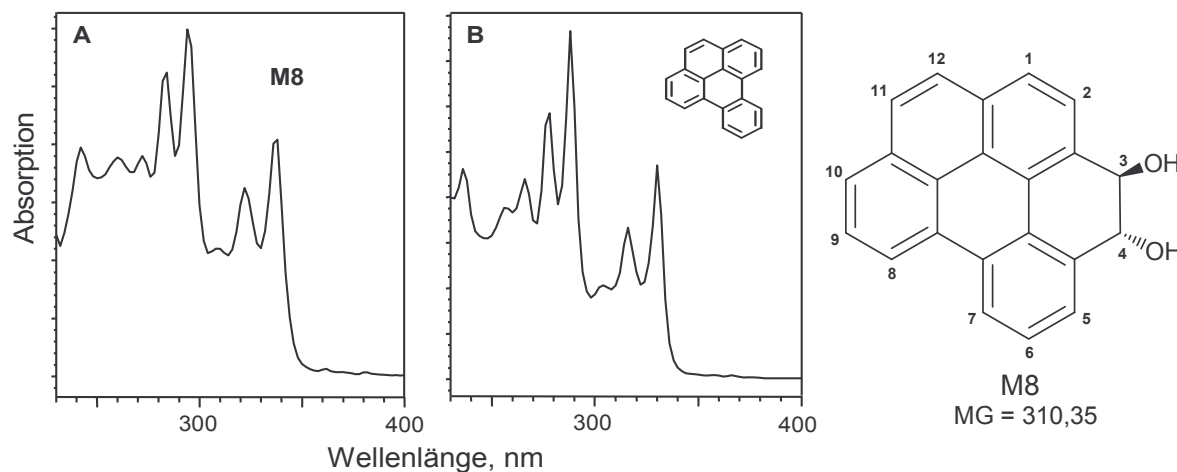


Abbildung 3.25: UV-Spektren von Metabolit M8 (A) und Benzo[e]pyren (B) und die Strukturformel von Metabolit M8 (*trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen); gezeigt ist das *R,R*-Enantiomer

Das FD-Massenspektrum von M8 mit dem Molekülion $m/z = 310$ (M^+) ließ auf eine Dihydrodiolstruktur schließen. Durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte die Identität des Metaboliten M8 als *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen bewiesen werden (Abb. 3.25, Zusammenfassung der spektroskopischen Daten von M8 siehe Abb. 3.39 und Tab. 3.7). Die Kopplungskonstante $J_{3,4} = 9,8$ Hz, die nach $^1\text{H-}^2\text{H}$ -Austausch durch Zugabe von D_2O gemessen wurde, belegt die quasi-diäquatoriale Konformation der Hydroxylgruppen an C-3 und C-4.

Ein weiterer wichtiger Strukturhinweis ist die Unterdrückung der enzymatischen Bildung von M8 durch TCPO (Abschn. 3.4.1.2), das durch Hemmung der mEH die Hydrolyse von Arenoxiden zu vicinalen Dihydrodiolverbindungen verhindert.

Eine letzte Bestätigung der Struktur konnte durch die erst später durchgeführte Synthese des *trans*-3,4-Dihydrodiols (\pm)-**6** (Abschn. 3.1.3, Tab. 3.3) erbracht werden.

Aus dem Sekundärmetabolismus eines chromatographisch isolierten Metaboliten lassen sich anhand der Art und Zusammensetzung der Biotransformationsprodukte Rückschlüsse auf die Molekülstruktur der Ausgangssubstanz und die der Folgeprodukte ziehen. So entstanden nach mikrosomaler Inkubation des Metaboliten M8 (*trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen) sechs Sekundärmetaboliten (S1-S4, S6 und S13) (Abb. 3.26 A), die in der Kontrollinkubation (ohne NADPH-regenerierendem System) bis auf S13 nicht auftraten (Abb. 3.26 B).

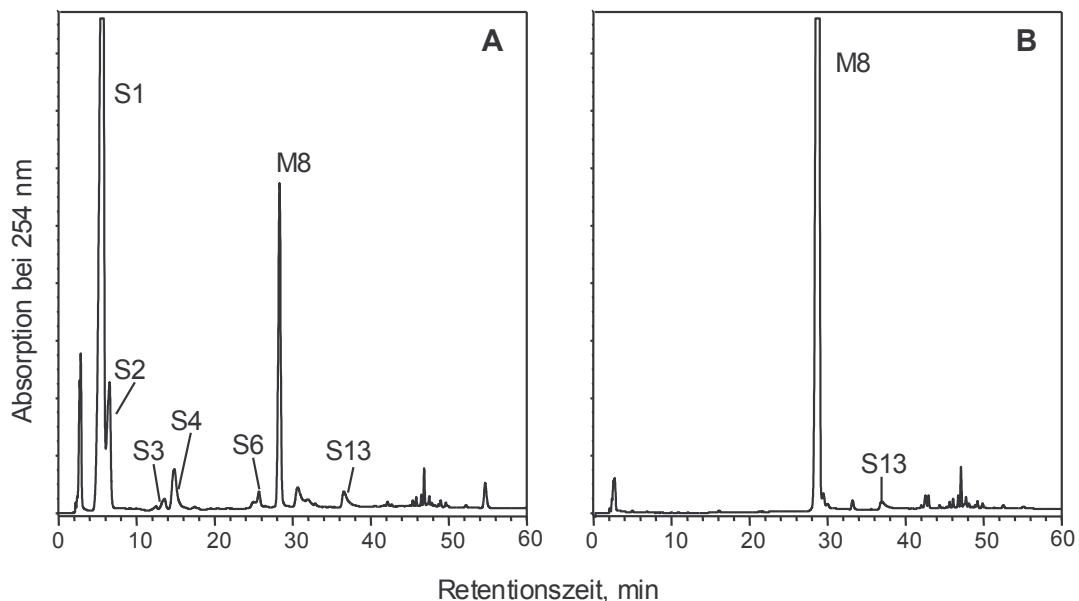


Abbildung 3.26: HPLC-Analysen der Ethylacetatextrakte der Umsetzung von Metabolit M8 des Benzo[ghi]perylens mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254, Trennbedingungen: s. Abb. 3.24.

A: mit NADPH-regenerierendem System

B: ohne NADPH-regenerierendem System (Kontrolle)

Die identischen UV-Spektren der Sekundärmetaboliten S1 und S2 (Abb. 3.27 C) stimmen mit denen der Primärmetaboliten M1 und M2 (Abb. 3.27 A) überein und weisen zudem eine hohe Ähnlichkeit mit dem des Triphenylens auf (Abb. 3.27 B). Dies spricht dafür, dass S1, S2 und M1, M2 die Struktur des 3,4,11,12-Tetrahydrobenzo[ghi]perylens besitzen.

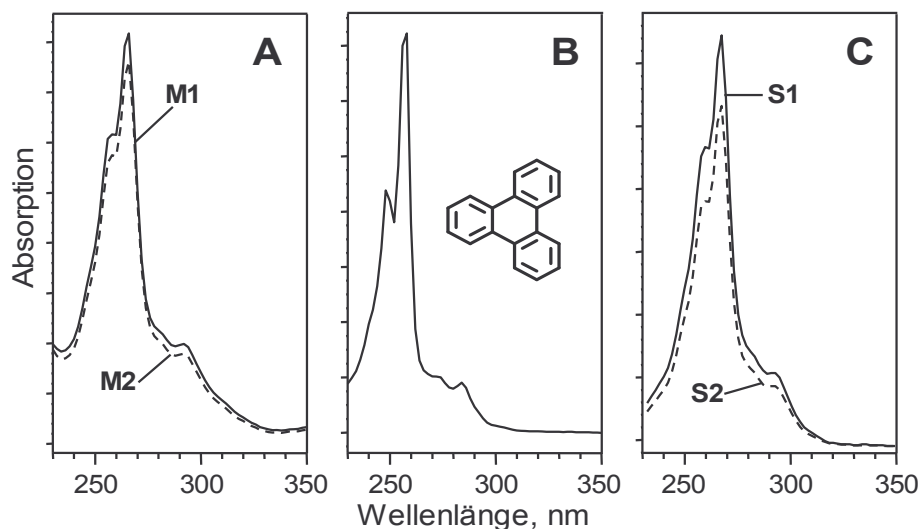


Abbildung 3.27: UV-Spektren der Metaboliten M1 und M2 von Benzo[ghi]perylen (A) sowie die der Sekundärmetaboliten S1 und S2 von Metabolit M8 (C) im Vergleich mit dem UV-Spektrum des Triphenylens (B)

Das FD-Massenspektrum der chromatographisch isolierten Metaboliten M1 und M2 zeigte ein Molekülion bei $m/z = 344$ sowie zwei Fragmentionen ($m/z = 326$ und 308) durch den sukzessiven Verlust von zwei Molekülen H_2O . Aus diesem Ergebnis lässt sich die Struktur von *trans*-3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen ableiten (Abb. 3.28), dessen Hydroxylgruppen durch den enzymatischen Angriff der mEH an dem entsprechenden Arenoxid *trans*-ständig angeordnet sind.

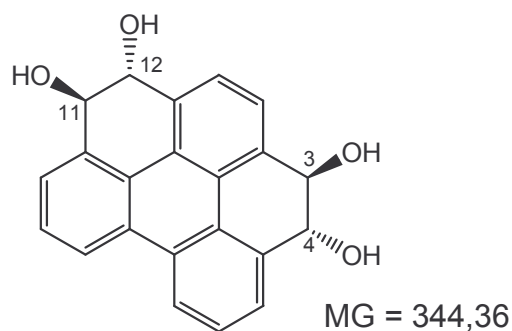


Abbildung 3.28: Strukturformel von *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen (M1 und M2); gezeigt ist das 3*R*,4*R*,11*R*,12*R*-konfigurierte Stereoisomer

Ein zusätzlicher Strukturbeweis für das *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen als M1 und M2 (= S1 und S2) ist die Hemmung der metabolischen Bildung von M1 und M2 durch TCPO (Abschn. 3.4.1.2). Ein 1H -NMR-Spektrum (Zusammenfassung der spektroskopischen Daten siehe Abb. 3.39 und Tab. 3.7) der chromatographisch isolierten Metaboliten M1 und M2 belegt schließlich eindeutig ihre Struktur, die weiterhin durch eine spätere Synthese des, *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen (\pm)-8 (Abschn. 3.1.3, Tab. 3.3) bestätigt wurde.

Durch Luftsauerstoff entsteht aus einer acetonischen Lösung von M1 und M2 eine Verbindung, die das UV-Spektrum des Primärmetaboliten M4 (Abb. 3.29 A) sowie das des Sekundärmetaboliten S4 (Abb. 3.29 C) besitzt. Außerdem ist eine hohe Ähnlichkeit der UV-Spektren mit dem von Benzo[*a*]pyren-4,5-chinon feststellbar (Abb. 3.29 B).

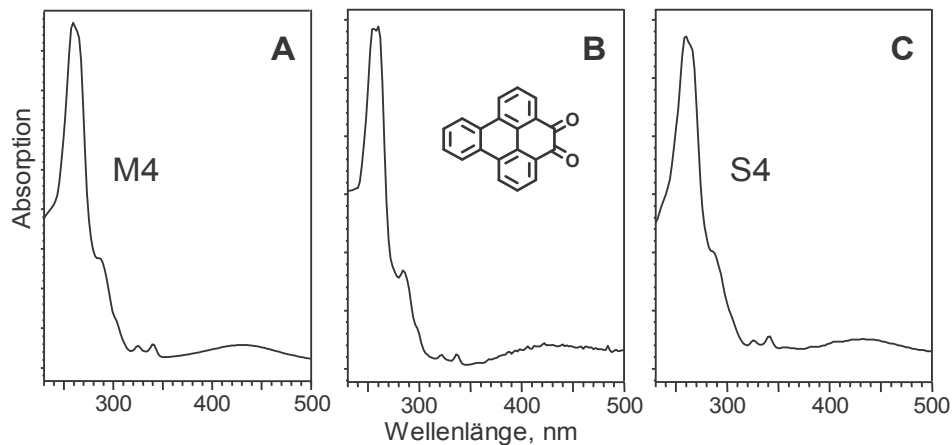


Abbildung 3.29: UV-Spektren von Metabolit M4 des Benzo[*ghi*]perylens (A) sowie des Sekundärmetaboliten S4 von Metabolit M8 (C) im Vergleich mit Benzo[*e*]pyren-4,5-chinon (B)

Da die Chromophoren dieser Substanzen identisch sind, lässt sich für M4 bzw. S4 die Struktur eines 3,4-Dihydrobenzo[*ghi*]perylen-11,12-chinons ableiten. FD-Massenspektrometrie mit $m/z = 340$ (M^+) (Abb. 7.11, Anhang) weist auf die Struktur des 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen-11,12-chinon hin (Abb. 3.30).

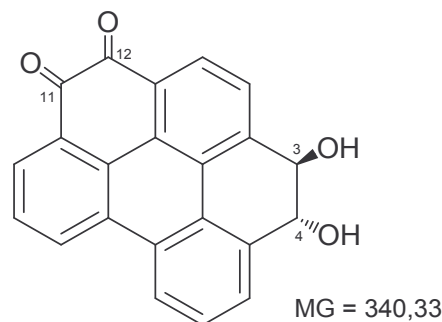


Abbildung 3.30: Strukturformel von Metabolit M4 (*trans*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*ghi*]perylen-11,12-chinon); gezeigt ist das *R,R*-Enantiomer.

Die gleiche Substanz entstand außerdem als Nebenprodukt in der Synthese des Bisdihydrodiols (Abschn. 3.1.3).

Der einzige Sekundärmetabolit von M8, der sich auch in der Kontrollinkubation nachweisen ließ, war S13. Sein UV-Spektrum stimmt mit dem des Metaboliten M13 überein, dessen FD-Massenspektrum mit $m/z = 306$ (M^+) für ein Chinon spricht. Ein Vergleich des UV-Spektrums mit dem der durch Oxidation von BghiP gebildeten Chinone (Abschn. 3.1.2) ergab eine Übereinstimmung mit Benzo[*ghi*]perylen-3,4-chinon 2b (Abb. 3.31), (Tab. 3.3).

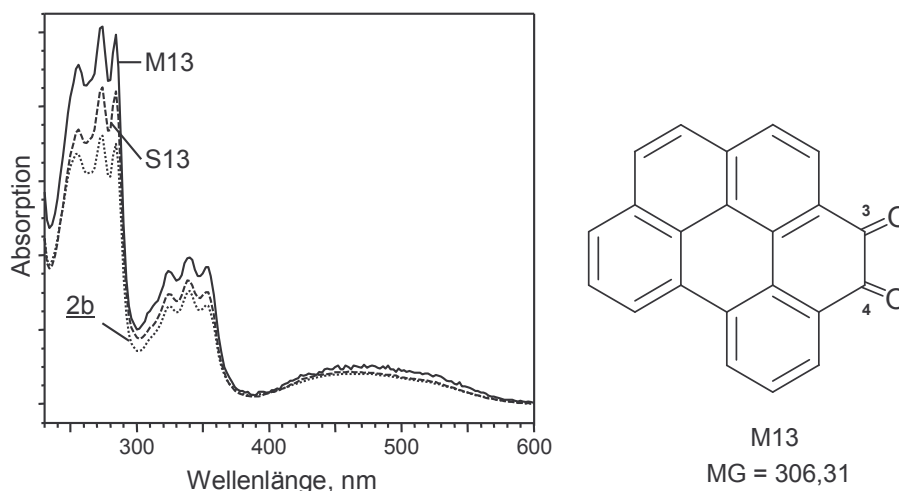


Abbildung 3.31: UV-Spektren von Metabolit M13, Sekundärmetabolit S13 von Metabolit M8 und Benzo[ghi]perylen-3,4-chinon (2b) sowie die Strukturformel von M13 (Benzo[ghi]perylen-3,4-chinon)

Aus der Reduktion des Chinons 2b mit Natriumborhydrid resultiert 3a (Abschn. 3.1.2), das aufgrund seines UV-Spektrums und chromatographischen Verhaltens mit M8 (3,4-Dihydrodiol) identisch ist. Außerdem wurde das 3,4-Chinon durch Oxidation des synthetischen *trans*-3,4-Dihydrodiols ±6 mit DDQ (Abschn. 3.1.3) in größeren Mengen produziert, so dass durch Aufnahme eines NMR-Spektrums (Abschn. 2.1.5.1) die Struktur eines Benzo[ghi]perylen-3,4-chinons bestätigt werden konnte.

Neben den bereits identifizierten Sekundärmetaboliten S1 (= M1), S2 (= M2), S4 (= M4) und S13 (= M13) (Tab. 3.3) des Metaboliten M8 verbleiben noch S3 und S6, die in ihren UV-Spektren und Retentionszeiten mit denen der Primärmetaboliten M3 (Abb. 3.32 A) und M6 (Abb. 3.32 B) übereinstimmen. FD-Massenspektrometrie von M3 ergab $m/z = 326$ (M^+), 308 ($M^+ - H_2O$), was auf ein Dihydrodiolphenol hindeutet, während bei M6 Signale bei $m/z = 324$ (M^+) und 308 ($M^+ - [O]$) detektiert wurden (Abb. 7.11, Anhang).

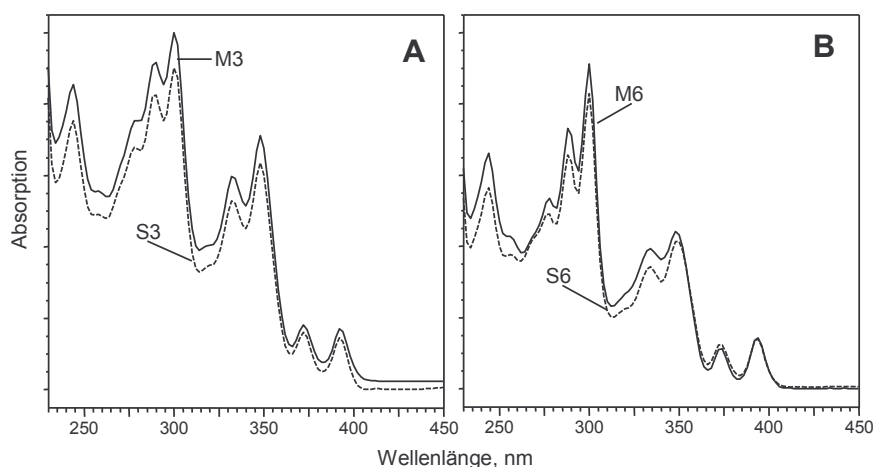


Abbildung 3.32: UV-Spektren der Metabolite M3 und M6 des Benzo[ghi]perylens im Vergleich mit den Sekundärmetaboliten S3 und S6 von Metabolit 8.

Der Sekundärmetabolismus des Metaboliten M8 trug zusammen mit chromatographischen und spektroskopischen Methoden zur Strukturaufklärung der Metaboliten M1, M2, M13 und M4 bei.

Struktur	Primärmetabolit	Sekundärmetabolit	Syntheseprodukt
3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylene	M8	-	<u>3a</u> , <u>±6</u>
3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene	M1/M2	S1/S2	<u>±8</u>
Benzo[ghi]perylene-3,4-chinon	M13	S13	<u>2b</u>
3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylene-11,12-chinon	M4	S4	-
Dihydrodiolphenol	M3	S3	-
nicht bekannt	M6	S6	-

Tabelle 3.3: Verwendete Bezeichnungen der Derivate des Benzo[ghi]perylens aus der Untersuchung des Sekundärmetabolismus von M8

Ein weiterer Metabolit von BghiP ist M16, bei dem es sich nach chromatographischer Isolierung und Aufnahme eines FD-Massenspektrums mit $m/z = 292$ (M^+) (Zusammenfassung der chromatographischen Daten Abb. 3.39 und Tab. 3.7) um ein Phenol handeln sollte. Nach mikrosomaler Umsetzung des Metaboliten M16 entstanden die Sekundärmetaboliten P9, P11, P12 und P14 (Abb. 3.33 A), die in der Kontrollinkubation, die ohne NADPH-regenerierendem System durchgeführt wurde, fehlten (Abb. 3.33 B).

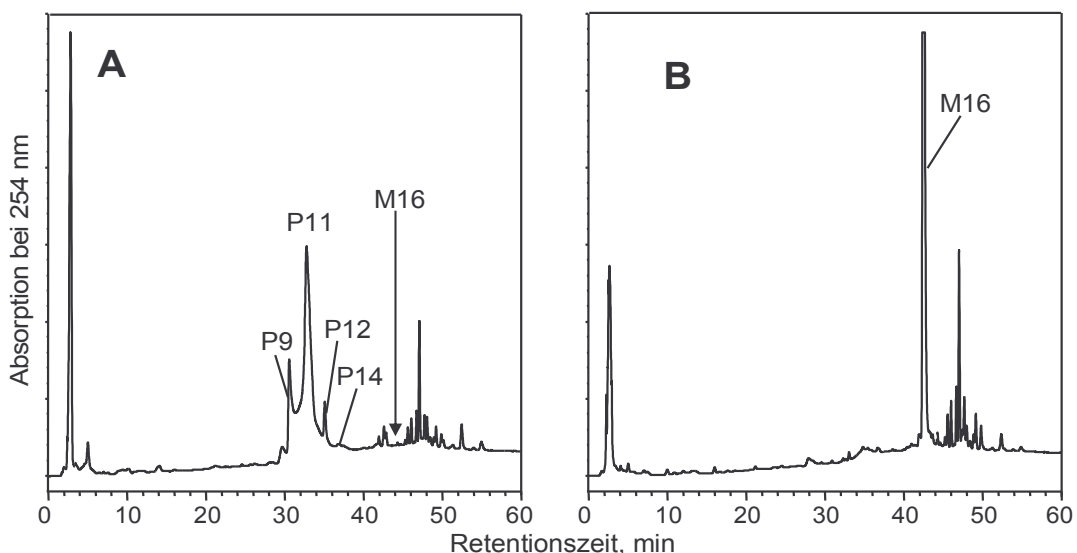


Abbildung 3.33: HPLC-Analyse der Ethylacetatextrakte der Umsetzung von Metabolit M16 des Benzo[ghi]perylens mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254, Trennbedingungen: s. Abb. 3.24
A: mit NADPH-regenerierendem System
B: ohne NADPH-regenerierendem System

Durch den Vergleich der UV-Spektren der Sekundärmetaboliten mit denen der Primärmetaboliten können P9 zu M9, P11 zu M11, P12 zu M12 und P14 zu M14 zugeordnet werden (Tab. 3.4). FD-Massenspektren von M11 und M14 mit $m/z = 306$ (M^+) deuten auf Chinone hin, die der Metaboliten M9 und M12 mit $m/z = 308$ (M^+) auf Diphenole.

Struktur	Primärmetabolit	Sekundärmetabolit	Syntheseprodukt
7-Hydroxybenzo[ghi]perylen	M16	-	-
Benzo[ghi]perylen-7,8-chinon	M11	P11	<u>2a</u>
7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen	M9	P9	<u>3b</u>
Benzo[ghi]perylen-7,10-chinon	M14	P14	<u>2c</u>
7,10-Dihydroxybenzo[ghi]perylen	M12	P12	<u>3c</u>

Tabelle 3.4: Verwendete Bezeichnungen der Derivate des Benzo[ghi]perylens aus der Untersuchung des Sekundärmetabolismus von M16

Ein Vergleich des UV-Spektrums von M11 (= P11) mit denen der durch Oxidation des Mutterkohlenwasserstoffes mit Natriumdichromat (Abschn. 3.1.2) entstandenen Chinone zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem des Benzo[ghi]perylen-7,8-chinons 2a (Abb. 3.34 A, Tab. 3.4). Das Chinon 2a lässt sich mit Natriumborhydrid zu 7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen 3b reduzieren (Abschn. 3.1.2, Tab. 3.4), dessen UV-Spektrum und Retentionszeit mit denen des Primärmetaboliten M9 (= P9) übereinstimmen (Abb. 3.34 B, Tab. 3.4).

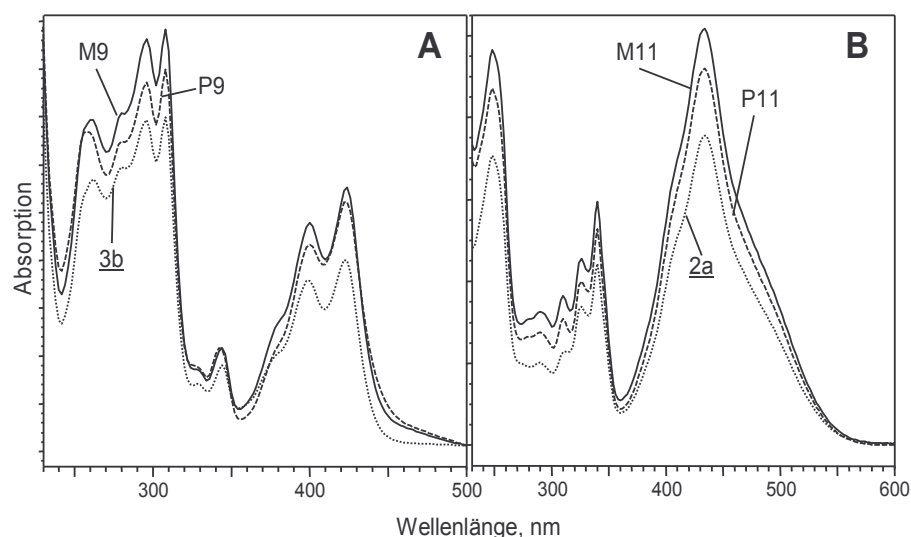


Abbildung 3.34: Vergleich der UV-Spektren der Metaboliten M9, P9 und 7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen, 3b (A) sowie M11, P11 und Benzo[ghi]perylen-7,8-chinon, 2a (B), Bezeichnungen der Derivate des Benzo[ghi]perylens s. Tab. 3.4

Bei den Metaboliten M9 (= P9) und M11 (= P11) handelt es sich also um 7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen bzw. dessen Oxidationsprodukt, das Benzo[ghi]perylen-7,8-chinon (Abb. 3.35, Tab. 3.4).

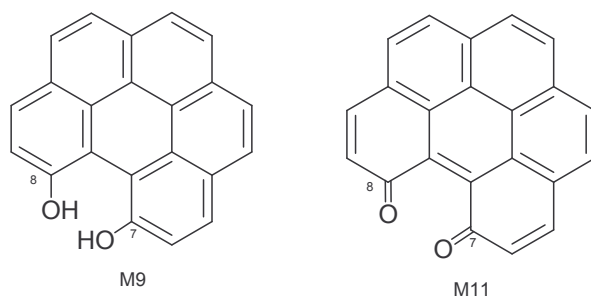


Abbildung 3.35: Strukturformeln der Metaboliten M9 (7,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylene) und M11 (Benzo[ghi]perylene-7,8-chinon)

Da M9 und M11 enzymatisch aus dem Phenol M16 hervorgegangen sind, sollte sich dessen Hydroxylgruppe aufgrund der Molekülsymmetrie von BghiP in Position C-7 befinden (Abb. 3.36). Durch ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte die Struktur des 7-Phenols bestätigt werden (Zusammenfassung der spektroskopischen Daten siehe Abb. 3.39 und Tab. 3.7).

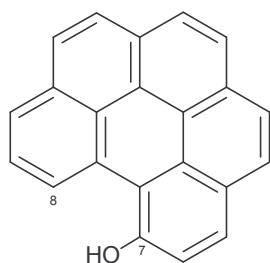


Abbildung 3.36: Strukturformel von M16 (7-Hydroxybenzo[ghi]perylene)

Der chinoide Metabolit M14 (= P14) stimmt mit dem Chinon 2c des Benzo[ghi]perylens (Abschn. 3.1.2, Tab. 3.4) bezüglich der UV-Spektren überein (Abb. 3.37 B). Durch Reduktion von 2c mit Natriumborhydrid (Abschn. 3.1.2) entsteht das Diphenol 3c, das hinsichtlich UV-Spektrum und Retentionszeit mit M12 (= P12) identisch ist (Abb. 3.37 A, Tab.3.4).

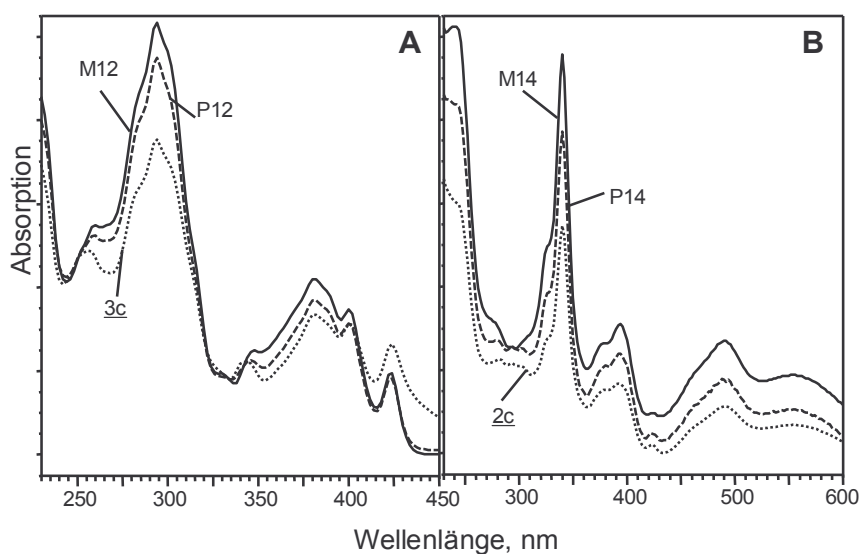


Abbildung 3.37: UV-Spektren der Metaboliten M12, P12 und von 7,10-Dihydroxybenzo[ghi]perylene, 3c (A) sowie der Metaboliten M14, P14 und von Benzo[ghi]perylene-7,10-chinon, 2c (B), Bezeichnungen der Derivate des Benzo[ghi]perylens s. Tab. 3.4

In dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 7.2, Anhang) von 3c (= P12, M12), fehlen die für H6 bzw. H7 typischen, durch Kopplung mit H7/H5 bzw. H8/H10 resultierenden Triplets. Dies spricht für die Substitution eines Nachbarprotons von H6 bzw. H9. Da sich M12 und M14 metabolisch aus dem 7-Phenol (M16) ableiten, spricht dies dafür, dass es sich bei M12 (= P12, 3c, Tab. 3.4) um das 7,10-Dihydroxybenzo[ghi]perylene* sowie bei M14 (= P14, 2c, Tab. 3.4) um das Benzo[ghi]perylene-7,10-chinon* handelt (Abb. 3.38).

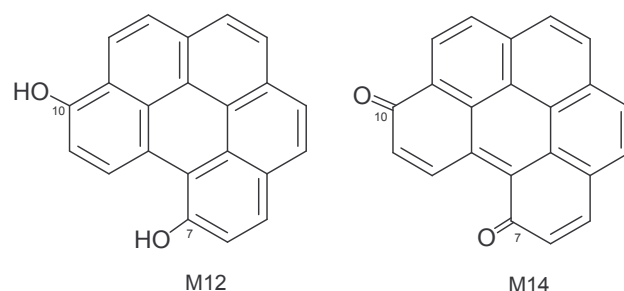


Abbildung 3.38: Strukturformeln der Metaboliten M12 (7,10-Dihydroxybenzo[ghi]perylene*) und M14 (Benzo[ghi]perylene-7,10-chinon*)

Die spektroskopischen Ergebnisse, die zur Identifizierung der Metaboliten M1, M2, M8 und M16 geführt haben, sind in der Abb. 3.39 zusammengefasst. Die NMR-Daten zu den Metaboliten M1, M2, M8 und M16 finden sich in Tabelle 3.5

Da Metaboliten, mit UV-Spektren von Benzo[c]phenanthren oder Perylen nicht detektiert wurden, kann die Bildung von 1,2-Dihydro oder 5,6,7,7a-tetrahydroderivaten des BghiPs weitgehend ausgeschlossen werden.

* Die korrekte chemische Bezeichnung nach der IUPAC-Nomenklatur lautet: Benzo[ghi]perylene-5,8-chinon bzw. 5,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylene. Aus Verständnisgründen wurde der von 7-Hydroxybenzo[ghi]perylene abgeleitete Name verwendet.

Metabolit	NMR Daten
M8	4,99 (d, 1H, -OH, $J = 5,1$ Hz), 5,04 (d, 1H, -OH, $J = 5,1$ Hz), 5,14-5,19 (m, 1H, H ₃ oder H ₄), 5,23-5,28 (m, 1H, H ₃ oder H ₄), 7,80 (pt, 1H, H ₆ , $J_{6,5} = 7,4$ Hz, $J_{6,7} = 8,2$ Hz), 8,02 (d, 1H, H ₅ , $J_{5,6} = 7,4$ Hz), 8,06-8,13 (m, 3H, H _{9,11,12}), 8,26-8,30 (m, 2H, H _{1,2}), 8,34 (d, 1H, H ₁₀ , $J_{10,9} = 7,8$ Hz), 8,86 (d, 1H, H ₇ , $J_{7,6} = 8,2$ Hz), 9,04 (d, 1H, H ₈ , $J_{8,9} = 8,2$ Hz) nach ¹ H- ² H Austausch mit D ₂ O: 5,14 (d, 1H, H ₃ oder H ₄ , $J_{3,4} = 9,8$ Hz), 5,23 (d, 1H, H ₃ oder H ₄ , $J_{3,4} = 9,8$ Hz)
M1/M2	4,77-4,87 (m, 4H, -OH), 4,98-5,08 (m, 4H, H _{3,4,11,12}), 7,70 (pt, 2H, H _{6,9} , $J_{6,5} = J_{9,10} = 7,4$ Hz, $J_{6,7} = J_{9,8} = 7,8$ Hz), 7,90 (s, 2H, H _{1,2}), 7,91 (d, 2H, H _{5,10} , $J_{5,6} = J_{10,9} = 7,4$ Hz), 8,66 (d, 2H, H _{7,8} , $J_{7,6} = J_{8,9} = 7,8$ Hz)
M16	7,65 (d, 1H, H ₆ , $J_{6,5} = 8,0$ Hz), 8,01 (pt, 1H, H ₉ , $J_{9,8} = 8,0$ Hz, $J_{9,10} = 8,4$ Hz), 8,13-8,22 (m, 4H, H _{3,4,11,12}), 8,42-8,45 (m, 2H, H _{1,2}), 8,51 (d, 1H, H ₁₀ , $J_{10,9} = 8,4$ Hz), 9,00 (d, 1H, H ₅ , $J_{5,6} = 8,0$ Hz), 9,03 (d, 1H, H ₈ , $J_{8,9} = 8,0$ Hz), 9,67 (s, 1H, -OH)

Tabelle 3.5: ¹H-NMR Daten von hydroxylierten Metaboliten des Benzo[ghi]perylens^a
400 MHz ¹H-NMR Spektren wurden in Aceton-d₆ aufgenommen; gezeigt sind die chemischen Verschiebungen in ppm, Multiplizität, Anzahl der Protonen und ihre Position

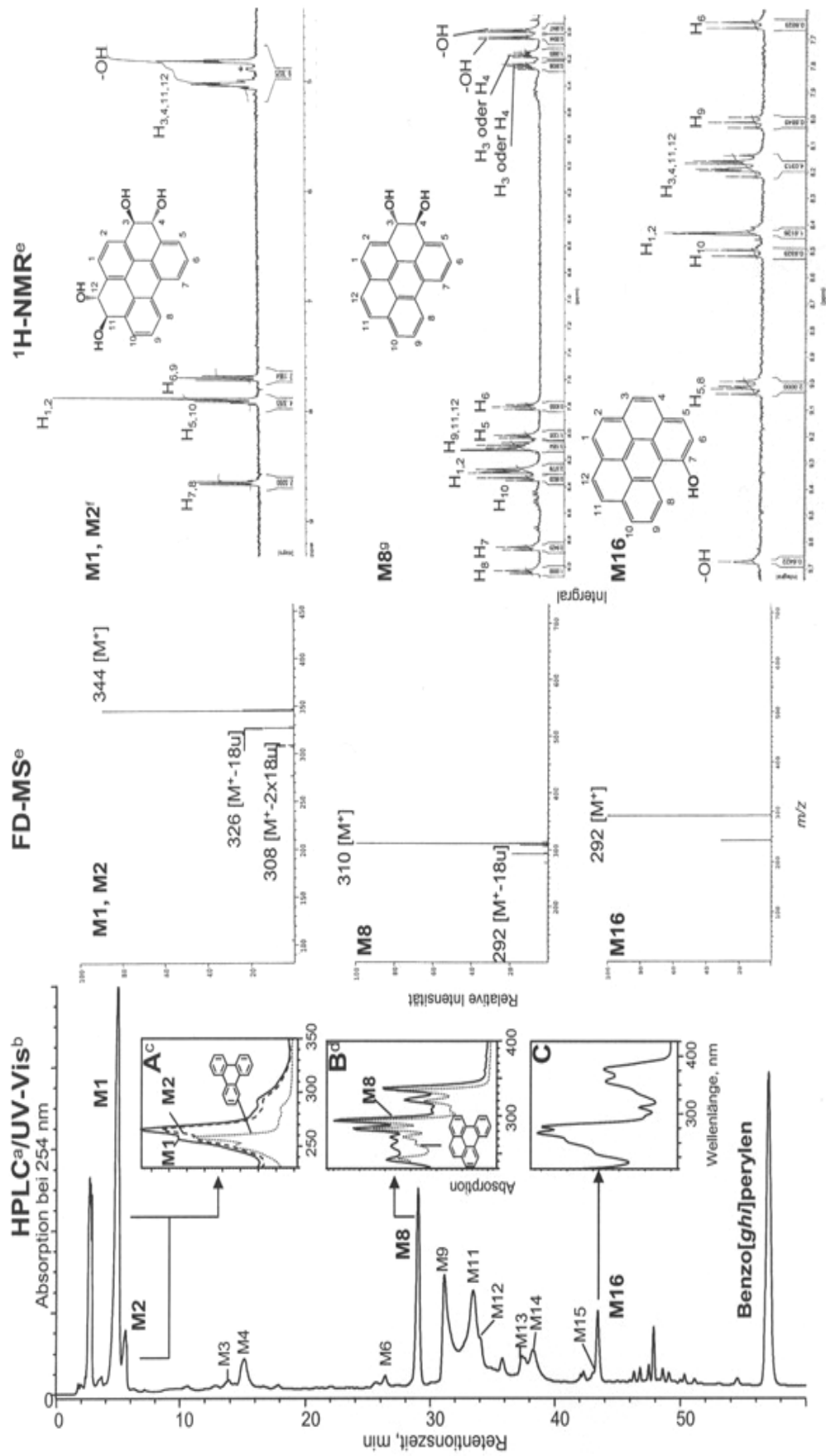


Abb. 3.39: Zusammenstellung der spektroskopischen Untersuchungen, die zur Identifizierung der Metaboliten M1, M2, M8 und M16 geführt haben^a Bedingungen s. Abb. 3.24^b UV-Spektren wurden während der HPLC aufgenommen und gespeichert, UV-Spektren-Vergleiche zwischen^c M1, M2 und Triphenylen und zwischen^d M8 und Benzo[e]pyren, ^e Aufnahme der Massenspektren bzw. NMR-Spektren der chromatographisch isolierten Metaboliten, ^f Gezeigt ist das *R,R,R,R*-Enantiomer des 3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen, ^g Gezeigt ist das *R,R*-Enantiomer des 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens

3.4.1.1 Trennung der enantiomeren *trans*-Dihydrodirole des Benzo[ghi]perylens

Die chromatographische Trennung der Enantiomeren des enzymatisch bzw. synthetisch hergestellten Benzo[ghi]perylens-3,4-Dihydrodiols (M8 und (\pm) -**6**) wurde auf zwei Wegen versucht.

Die erste Methode beruhte auf der Trennung der underivatisierten chiralen Moleküle an einer chiralen stationären Phase, die auf (*R*)-(-)-2-(2,4,5,7-Tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxy)buttersäure (TABA) basiert, die kovalent über einen Aminopropylspacer an LiChrosorb Si100 gebunden ist. Das Racemat des synthetischen Dihydrodiols (\pm) -**6** wurde in zwei erwartungsgemäß gleichgroße Peaks getrennt, während die Chromatographie des enzymatisch gebildeten Dihydrodiols M8 unter denselben Bedingungen zwei Peaks im Verhältnis 3:1 ergab (Abb. 3.40 A).

Dieses Ergebnis wurde auch mit der zweiten Methode erzielt, die zunächst eine Derivatisierung der Enantiomere mit α -Menthoxycessigsäure notwendig machte. Die resultierenden Menthoxyacetate werden schließlich an Kieselgel (LiChrospher Si100) chromatographiert (Abb. 3.40 B).

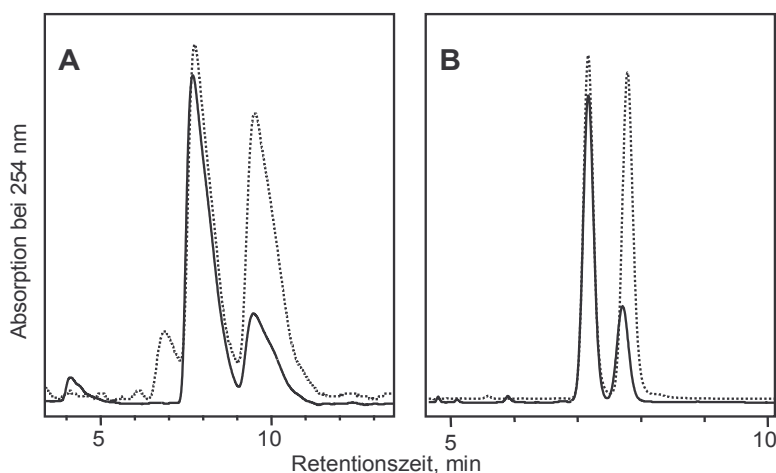


Abbildung 3.40: HPLC-Trennungen der Enantiomere des *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens

- A:** (\pm) -**6** (gestrichelte Linie) und (\pm) -M8 (durchgezogene Linie), Trennbedingungen: chirale stationäre Phase: (*R*)-(-)-2-(2,4,5,7-tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxy)-buttersäure kovalent über einen Aminopropylspacer an LiChrosorb Si100 gebunden, Dichlormethan/Methanol, 50/50, V/V, Fluß: 2,0 ml/min
- B:** (\pm) -**10** (gestrichelte Linie) und Menthoxyacetate von (\pm) -M8 (durchgezogene Linie) Trennbedingungen: LiChrospher Si60, n-Hexan/Diethylether, 95/5, V/V, Fluss: 1,0 ml/min

Dagegen wurde die Trennung der Enantiomeren des underivatisierten *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylens mit verschiedenen chiralen stationären Phasen nicht erreicht. Mit Säulen, deren chirale stationäre Phase auf TABA bzw. dessen Derivate, wie ((*R*)-(-)-2-(2,4,5,7-Tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxy)propionsäure) oder ((*R*)-

(-)-2-(2,4,5,7-tetranitrofluoren-9-ylidenaminoxy)valeriansäure) basieren, war eine Trennung nicht möglich. Ebenso verhielt es sich mit der chiralen stationären Phase nach Pirkle, bei der (*R*)-*N*-(3,5-Dinitrobenzoyl)phenylglycin kovalent an γ -aminopropylsilanisierter Kieselgel gebunden ist sowie mit einer chiralen Polyacrylamid-Festphase (Chiraspher®).

Erst nach Veresterung des *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylens mit α -Menthoxyessigsäure zu den diastereomeren Tetrakis(α -Menthoxyacetaten) war eine Trennung an Kieselgel Si100 möglich. Die chromatographische Trennung des Tetrakis(α -Menthoxyacetats) \pm -11-D₁ des synthetischen 3,4,11,12-Bisdihydrodiols zeigte zwei gleich große Peaks, während das enzymatisch gebildete derivatisierte 3,4,11,12-Bisdihydrodiol M1 in zwei Peaks im Verhältnis 98:2 aufgetrennt wurde (Abb. 3.41 A). Das synthetische 11-D₂ und das Tetrakis(α -Menthoxyacetat) des Metaboliten M2 ergaben nach Chromatographie an Kieselgel unter denselben Bedingungen nur einen Peak (Abb. 3.41 B).

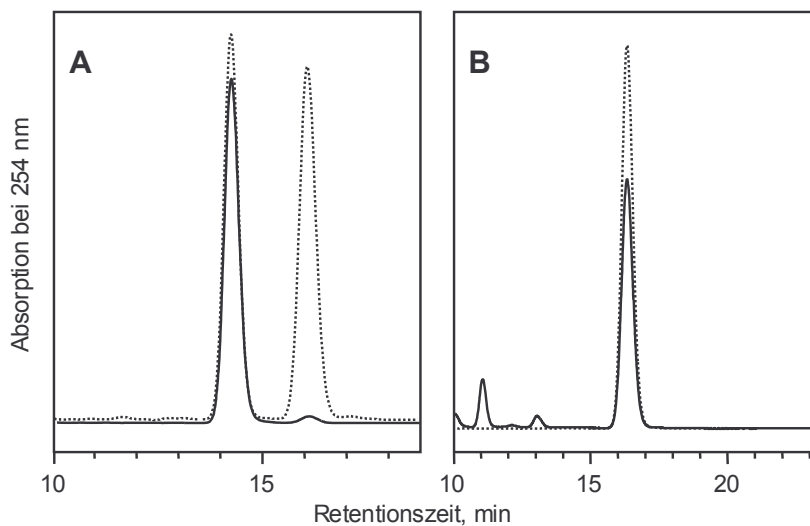


Abbildung 3.41: HPLC-Trennung der Tetrakis(α -Menthoxyacetate) von *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[*ghi*]perylen. Trennbedingungen: s. Abb. 3.40 B

A: 11-D₁ (gestrichelte Linie) und Tetrakis(α -Menthoxyacetat) von Metabolit M1 (durchgezogene Linie).

B: 11-D₂ (gestrichelte Linie) und Tetrakis(α -Menthoxyacetat) von Metabolit M2 (durchgezogene Linie).

3.4.1.2 Einfluss von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid auf den Metabolismus von Benzo[ghi]perylen mit Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254

Nach mikrosomalem Metabolismus von BghiP in Anwesenheit von 1 mM TCPO waren die Metaboliten M1-M6 und M8-M13 nicht mehr nachweisbar, während drei Metaboliten M7a und M7b sowie in geringen Mengen M14a gebildet wurden (Abb. 3.42).

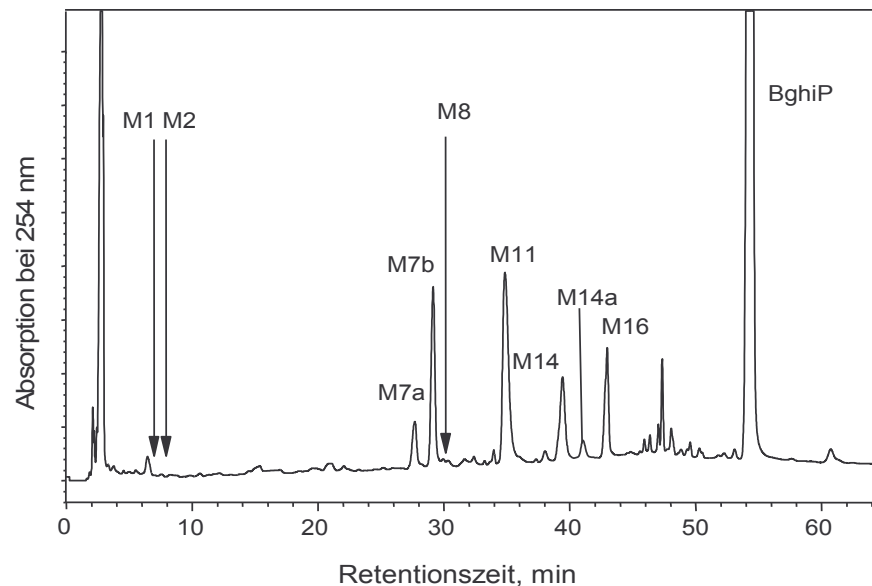


Abbildung 3.42: HPLC-Analyse des Ethylacetatextraktes der Umsetzung von Benzo[ghi]perylen (BghiP) in Anwesenheit von TCPO mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254. Trennbedingungen: LiChrospher RP18e, 5 µm, Methanol/wässriges Ammoniumhydrogencarbonat (10 mM), pH 7,9, 50/50, V/V, in 40 min auf 100 % Methanol, Fluss: 0,8 ml/min

Ein Vergleich der UV-Spektren von M7a und M7b (Abb. 3.43 A) mit denen von M1 und M2 (Abb. 3.43 B) zeigt eine hohe Ähnlichkeit.

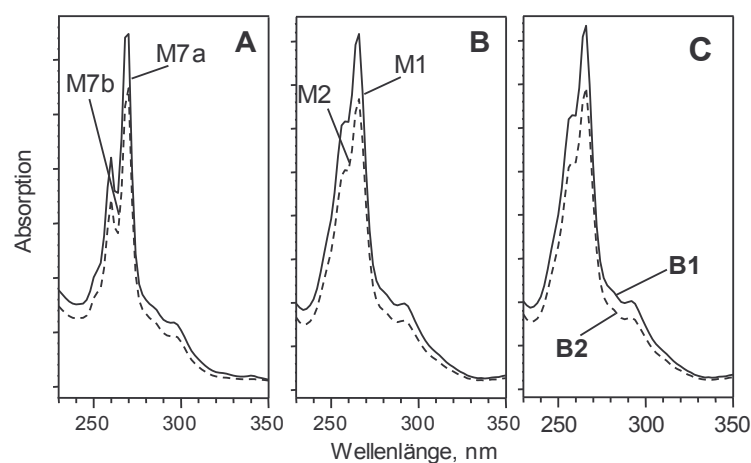


Abbildung 3.43: Vergleich der UV-Spektren der Metaboliten M7a und M7b (A) mit denen der Metaboliten M1 und M2 (B) und denen der Sekundärmetaboliten B1 und B2 (C) aus mikrosomalen Inkubationen von Benzo[ghi]perylen mit (A) und ohne (B) 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid sowie von M7a und M7b ohne NADPH-regenerierendem System (C).

Nach mikrosomaler Inkubation der chromatographisch isolierten Metaboliten M7a und M7b ohne NADPH-regenerierendem System mit TCPO (Abb. 3.44 B) und ohne TCPO entstanden ausschließlich die polaren Sekundärmetaboliten B1 und B2 (Abb. 3.44 A).

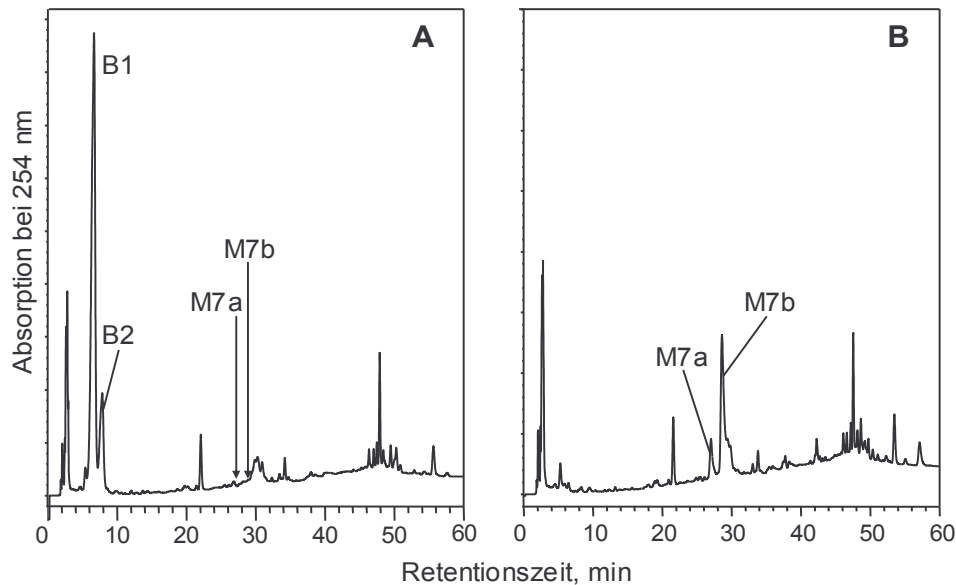
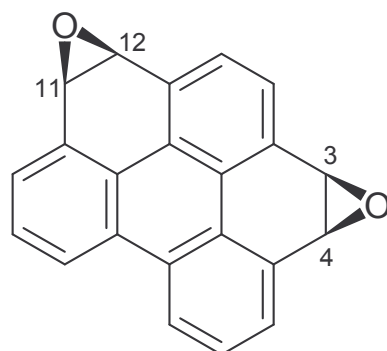


Abbildung 3.44: HPLC-Analyse der Ethylacetatextrakte der Umsetzung der Metaboliten M7a und M7b mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 ohne NADPH-regenerierendem System, Trennbedingungen: s. Abb. 3.42
A: ohne 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid (TCPO)
B: mit 1 mM TCPO (Kontrolle).

Die UV-Spektren von B1 und B2 (Abb. 3.43 C, Tab. 3.6) sind mit denen von M1 und M2 (Abb. 3.43 B) identisch und weisen auch hier eine hohe Ähnlichkeit mit denen von M7a und M7b (Abb. 3.43 A) auf. Daher müssen die 3,4- und 11,12-Bindungen in den Metaboliten M7a und M7b gesättigt sein.

Da es sich bei M1/M2 bzw. B1/B2 um 3,4,11,12-Bisdihydrodiole von BghiP handelt, die durch enzymatische Hydrolyse aus M7a und M7b hervorgehen, muss es sich bei diesen Metaboliten um die 3,4,11,12-Bisarenoxide (Abb. 3.45) handeln. Diese Annahme konnte durch das FD-Massenspektrum mit dem Molekülion von $m/z = 308$ zusätzlich unterstützt werden (Abb. 7.13, Anhang).



MW = 308,33

Abbildung 3.45: Strukturformeln von Metabolit M7a und M7b, gezeigt ist das *syn*-Diastereomer.

Ein weiterer Strukturbeweis ist die erfolgreiche Umsetzung der chromatographisch isolierten Metabolite M1 und M2 (3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen) mit Natriumhydrid und N-Tosylimidazol zum 3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen (\pm)-13 (Abschn. 3.1.4, Tab. 3.6).

Nach Hemmung der mEH mit TCPO wurde wie oben erwähnt, ein weiterer Metabolit M14a detektiert, der nur in geringer Menge entstand. Die hohe Ähnlichkeit seines UV-Spektrums mit dem des Metaboliten M8 (Abb. 3.46) weist zusammen mit seiner relativ niedrigen Polarität auf das 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen hin (Abb. 3.46).

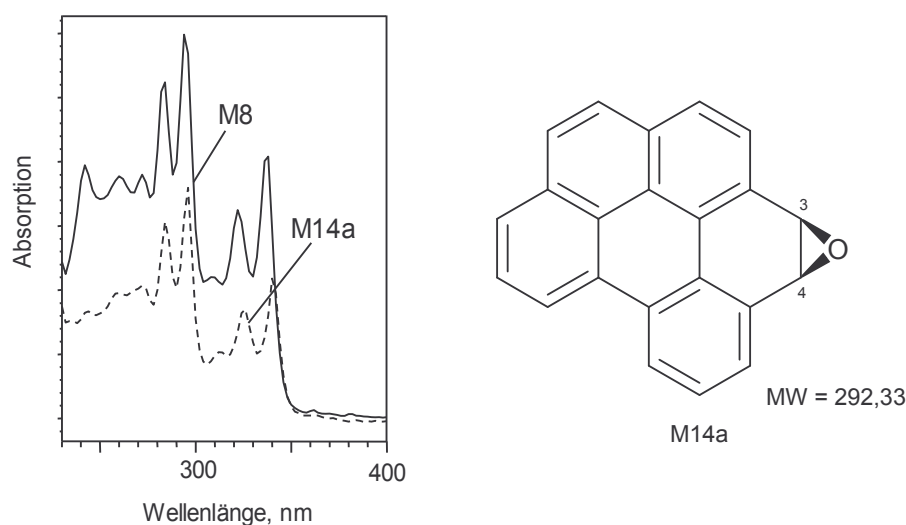


Abbildung 3.46: UV-Spektren der Metaboliten M8 und M14a des Benzo[ghi]perylens und die Strukturformel von Metabolit 14a (3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen), gezeigt ist das 3R, 4S-Enantiomer.

Die Struktur des 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylens konnte zudem durch Umsetzen von BghiP mit Kaliumperoxymonosulfat zum 3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen \pm -12 (Abschn. 3.1.4, Tab. 3.6) bestätigt werden.

Unter dem Einfluss von TCPO entstanden drei neue Metabolite, von denen zwei identisch sind (M7a und M7b) und durch Sekundärmetabolismus in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Die Struktur des dritten Metaboliten M14a ließ sich nur UV-spektroskopisch ableiten. (Tab. 3.6).

Struktur	Primärmetabolit	Sekundärmetabolit	Syntheseprodukt
3,4,11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen	M1, M2	-	-
3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylen	M7a, M7b	B1, B2 (aus M7a, M7b)	\pm - <u>13</u>
3,4-Epoxy-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylen	M14a	-	\pm -12

Tabelle 3.6: Verwendete Bezeichnungen der gebildeten Derivate des Benzo[ghi]perylens nach Hemmung der mikrosomalen Epoxidhydrolase

3.4.1.2.1 Identifizierung der durch Isomerisierung aus dem 3,4-Arenoxid entstehenden 3- und/oder 4-Phenol

Da Arenoxide leicht zu Phenolen isomerisieren, sollte auch aus dem 3,4-Arenoxid von BghiP das entsprechende ein 3- und/oder 4-Phenol entstehen und im Inkubationsextrakt nachzuweisen sein. Da das chromatographische Verhalten der Phenole von PAKs sehr ähnlich ist, könnte das 3- bzw. 4-Phenol gleichzeitig mit einem anderen Phenol, z. B. mit dem 7-Phenol (M16) eluieren und sich so einer direkten Detektion entziehen.

Eine Trennung von Phenolgemischen von PAKs, die mit binären Systemen nicht möglich ist, kann mit ternären Lösungsmittelsystemen erreicht werden (Stewart & Williams; 1980, Platt & Oesch, 1982). Dabei wird die Polarität der mobilen Phase besser an die der zu trennenden Substanzen angepasst und damit eine feinere Selektivitätseinstellung erreicht.

Den üblichen Eluenten Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser wird meistens Tetrahydrofuran als dritte Komponente zugesetzt. Da es sehr aufwändig wäre, mit empirischen Tests das optimale Mischungsverhältnis von drei Lösungsmitteln herauszufinden, ist es nach Stewart & Williams (1980) möglich, durch Kombination von gemessenen Elutionsdaten (HPLC) und Berechnungen das optimale Eluentengemisch zu finden.

Zunächst wird die Lösungsmittelstärke der binären mobile Phase so gewählt, dass die Komponenten in einer angemessenen Retentionszeit (zwischen 20 und 30 min) eluieren. Durch Zumischen eines dritten Lösungsmittels kann dann die Selektivität optimiert werden, ohne die Lösungsmittelstärke zu beeinflussen.

Das verwendete Testgemisch bestand zu gleichen Teilen aus dem durch Isomerisierung des synthetischen 3,4-Arenoxides 12 gebildete 3- und/oder 4-Phenols** (Abschn. 3.1.4) und dem aus mikrosomalen Inkubationen des Benzo[ghi]perylens isolierten 7-Phenols (= M16).

Mit dem Mischungsverhältnis des binären Systems I Acetonitril/Wasser von 64/36, (V/V) betrug die Retentionszeit der Phenole 22,9 min. Die Gesamtlösungsmittelstärke P des ausgewählten Eluenten kann nach Stewart und Williams (1980) aus den Einzellösungsmittelstärken P_i (Snyder, 1974) unter Berücksichtigung des jeweiligen Volumenanteils x_i berechnet werden (Gl. 1).

$$(Gl. 1) P = \sum_i x_i \cdot P_i$$

$$\text{Mit } P_{\text{CH}_3\text{CN}} = 6,2 \quad \text{und} \quad x_{\text{CH}_3\text{CN}} = 0,64$$

$$P_{\text{H}_2\text{O}} = 9 \quad \text{und} \quad x_{\text{H}_2\text{O}} = 0,36$$

** Das 3- und/oder 4-Phenol entstand außerdem durch saure Dehydratation (Bedingungen: Yang et al., 1977) von M8 (3,4-Dihydrodiol) mit 1N HCl/THF (86/14) V/V.

errechnet sich die Gesamtlösungsmittelstärke der binären Mischung I zu $P_I = 7,2$. Mit $P_{\text{THF}} = 4,2$ und den Gleichungen (2) und (3):

$$\text{(Gl. 2)} \quad x_{\text{THF}} + x_{\text{H}_2\text{O}} = 1$$

$$\text{(Gl. 3)} \quad x_{\text{THF}} \cdot P_{\text{THF}} + x_{\text{H}_2\text{O}} \cdot P_{\text{H}_2\text{O}} = 7,2$$

errechnet sich die Zusammensetzung des binären Systems II (THF/H₂O), das die gleiche Lösungsmittelstärke wie das Gemisch I (CH₃CN/H₂O) besitzt ($P_I = P_{II}$) zu 38/62, V/V. Da die Mischungen I und II die gleiche Lösungsmittelstärke besitzen, können I und II beliebig gemischt werden, ohne dass sich die Lösungsmittelstärke ändert.

Trotz Verwendung verschiedener Mischungsverhältnisse von I und II, war jedoch mit dem vorliegenden Eluenten eine Trennung der beiden Phenole nicht möglich (Abb. 3.47 A). Da offenbar die Selektivität des Gemisches aus THF/CH₃CN/H₂O für das Trennproblem nicht geeignet war, wurde für eine Verbesserung der Trenneigenschaften des ternären Systems THF gegen MeOH ausgetauscht.

Mit dem binären System III aus MeOH/H₂O (80/20) V/V wurde durch Mischen mit I CH₃CN/H₂O (64/36) V/V im Verhältnis 60% III zu 40% I (Lösungsmittelzusammensetzung: Methanol/Acetonitril/Wasser (27,2/48/24,8; V/V) tatsächlich eine Trennung ($\alpha = 1,03$) erreicht. Wider Erwarten verlängerte sich die Retentionszeit jedoch um ca. 10 min auf 39,8 bzw. 40,9 min (Abb. 3.47 B). Die Ursache für die Erhöhung der Retentionszeit, ist auf eine Veränderung der Lösungsmittelstärke des ternären Systems zurückzuführen. Seine Zusammensetzung beruht auf den Einzellösungsmittelstärken, dessen Werte in der Literatur variieren. So folgte aus den Angaben von Mayer (1999) ($P_{\text{MeOH}} = 3,0$, $P_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ und $P_{\text{CH}_3\text{CN}} = 3,1$) eine Erhöhung des Acetonitril-Anteils im ternären Gemisch auf 30,8%. Dies bewirkte eine Absenkung der Retentionszeit auf < 30 min mit gleich bleibender Selektivität des ternären Eluenten (Abb. 3.47 C).

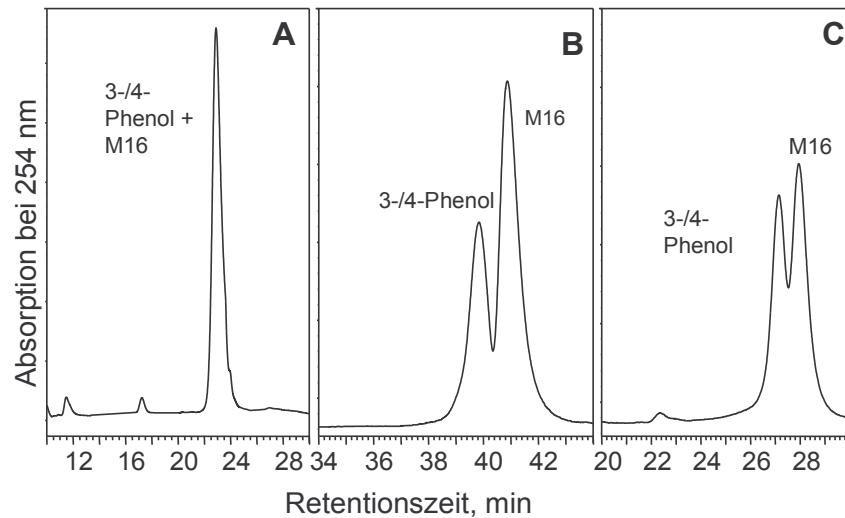


Abbildung 3.47: HPLC-Trennung (A-C) des 3-/4-Hydroxybenzo[ghi]perylens (3-/4-Phenol) von M16 (7-Hydroxybenzo[ghi]perylen), Stationäre Phase: LiChrospher RP18e, Fluss: 1,0 ml/min
A: Tetrahydrofuran/Acetonitril/Wasser, 15,2/38,4/46,4, V/V
B: Methanol/Acetonitril/Wasser, 27,2/48/24,8, V/V
C: Methanol/Acetonitril/Wasser, 30,8/48/21,2, V/V

Mit diesen Bedingungen konnte schließlich das 3- und/oder 4-Phenol (M15a) verdeckt unter dem Metaboliten M16 gefunden werden. Wurde M16 aus mikrosomalen Inkubationen von BghiP in Gegenwart von TCPO isoliert und an einer C18-Umkehrphase isokratisch mit Methanol/Acetonitril/Wasser (48,0/30,8/21,2, V/V) rechromatographiert, erfolgte eine Trennung in zwei Peaks M15a (24,1 min) und M16 (24,8 min) mit $\alpha = 1,03$ (Abb. 3.48). Cochromatographie von M15a mit dem synthetischen 3- und/oder 4-Phenol bestätigt zusätzlich seine Identität.

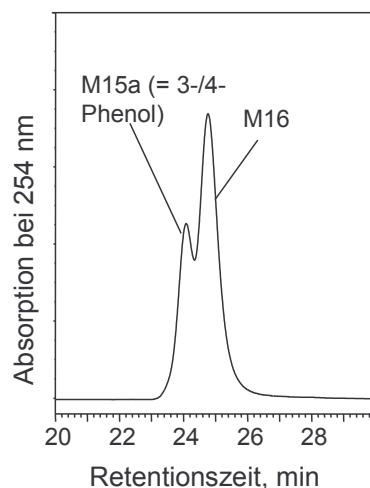


Abbildung 3.48: HPLC-Trennung des Metaboliten M15a (3-/4-Phenol von Benzo[ghi]perylen) von Metabolit M16 (7-Hydroxybenzo[ghi]perylen), Bedingungen: s. Abb. 3.47 C

Zusammenfassend sind in Tabelle 3.7 die Ergebnisse, die zur Strukturaufklärung der Metaboliten von BghiP geführt haben, dargestellt.

Metabolit ^a	Struktur	t _R , min	FD-MS, m/z	UV-Charakterisierung		Sekundärmetabolismus von ^d		
				Chromophor von	UV-Spektren identische mit ^c	M8	M16	M7a/ M7b
M1	3,4,11,12-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[gh]perylene	5,9	344, 326, 308	Triphenylen	± <u>8</u>	S1		B1 ^e
M2	3,4,11,12-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[gh]perylene	6,9	344, 326, 308	Triphenylen	± <u>8</u>	S2		B2 ^e
M3	Dihydrodiolphenol	14,2	326, 308			S3		
M4	3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[gh]perylene-11,12-chinon	15,7	340, 322	Benzo[e]pyren-4,5-chinon		S4		
M6		26,5	324, 308			S6		
M7a ^f	3,4,11,12-Tetrahydro-3,4,11,12-bisepoxybenzo[gh]perylene	27,5	308	Triphenylen	± <u>12</u>			
M7b ^f	3,4,11,12-Tetrahydro-3,4,11,12-bisepoxybenzo[gh]perylene	29,0	308	Triphenylen	± <u>12</u>			
M8	3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[gh]perylene	29,1	310, 292	Benzo[e]pyren	± <u>6</u>			
M9	7,8-Dihydroxybenzo[gh]perylene	31,5	308; [392] ^g		<u>3b</u>			P9
M11	Benzo[gh]perylene-7,8-chinon	33,8	306		<u>2a</u>			P11
M12	7,10-Dihydroxybenzo[gh]perylene	34,5	308; [308,279,250] ^h		<u>3c</u>			P12
M13	Benzo[gh]perylene-3,4-chinon	37,9	306		<u>2b</u>	S13		
M14	Benzo[gh]perylene-7,10-chinon	38,6	306		<u>2c</u>			P14
M14a ^f	3,4-Dihydro-3,4-epoxybenzo[gh]perylene	41,1		Benzo[e]pyren	<u>11</u>			
M15	Phenol unbekannter Struktur	43,0	292					
M15a ^f	3-/4-Hydroxybenzo[gh]perylene	43,4 ⁱ						
M16	7-Hydroxybenzo[gh]perylene	43,4 ⁱ	292					

Tabelle 3.7: Strukturzuordnung der Metaboliten von Benzo[gh]perylen und die jeweils verwendete Charakterisierung

^a Nummern wie in Abbildung 3.24; ^b Retentionszeiten basieren auf Chromatographie an Umkehrphasen (C18), Bedingungen s. Abschn. 3.4.1; ^c Bezeichnung der synthetischen Derivate (s. Abschn. 3.1); ^d Bezeichnung der Sekundärmetabolite s. Abschn. 3.4.1 und 3.4.1.2; ^e Entstehung aus einer Mischung von 7a und 7b^f Entstehung ausschließlich unter dem Einfluss von 1,1,1-Trichlorpropenoxid; ^g Acetylierungsprodukt von 3b; ^h EIMS; ⁱ Chromatographische Trennung mit Acetonitril/Methanol/Wasser (Abschn. 3.4.1.2.1)

3.5 Quantifizierung des mikrosomalen Metabolismus von Benzo[ghi]perylen

Neben der Aufklärung der Struktur der Metaboliten in Abschn. 3.4.1 liefert die Bestimmung sowohl der gebildeten Mengen als auch des metabolischen Gesamtumsatzes einen weiteren wichtigen Beitrag zur Aufklärung des mikrosomalen Metabolismus von BghiP. Zur Quantifizierung der Biotransformation von BghiP diene radioaktiv markiertes Substrat.

Das durch Auftragssynthese kommerziell erhaltene $[G-^3H]BghiP$ besaß die angegebene Gesamtaktivität von 0,5 mCi. Die HPLC-Trennung und Fraktionierung des markierten Produktes ergab eine chemische Reinheit von 98%, während die radiochemische Reinheit nur knapp 17% betrug (Abb. 3.49).

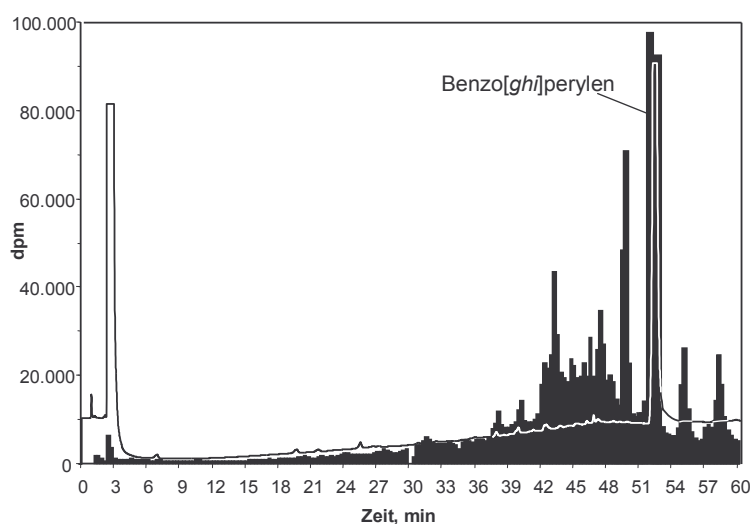


Abbildung 3.49: Radiochromatogramm (Histogramm) des ungereinigten $[G-^3H]Benzo[ghi]perylens$ im Vergleich mit dem durch Messung der UV-Absorption erhaltenen Chromatogramm (durchgezogene Linie)

Dies machte eine chromatographische Reinigung des für die mikrosomale Umsetzung benötigten Substrates erforderlich. Die chemische Reinheit des gereinigten Substrates betrug danach 99%, während bei der radiochemischen Reinheit nur 94% erreicht wurden (Abb. 3.50). Verantwortlich dafür war eine Verunreinigung, die kurz hinter Benzo[ghi]perylen eluierte und sich auch nicht durch wiederholte Chromatographie nicht entfernen ließ.

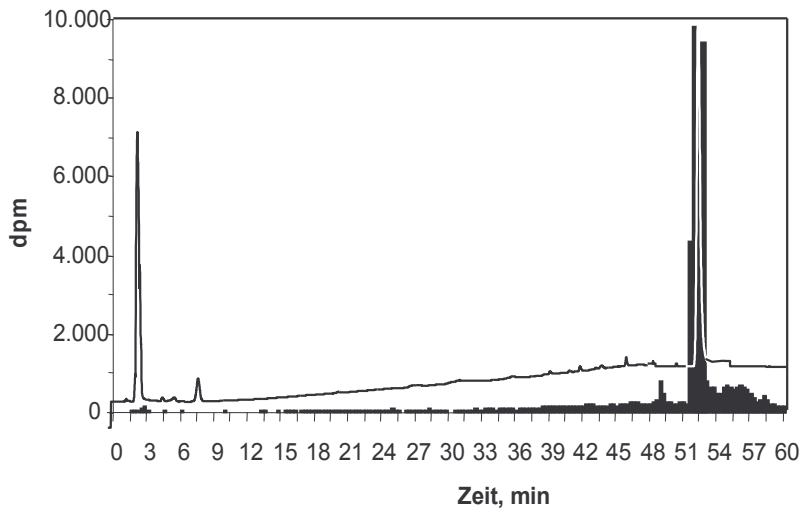


Abbildung 3.50: Radiochromatogramm (Histogramm) des gereinigten [G-³H]Benzo[ghi]perylens im Vergleich mit dem durch Messung der UV-Absorption erhaltenen Chromatogramm (durchgezogene Linie)

Das gereinigte radioaktive Substrat wurde unmittelbar vor der mikrosomalen Inkubation mit unmarkiertem Substrat auf eine spezifische Aktivität von 100-113 MBq/mmol verdünnt. Mit der spezifischen Aktivität wurden die gemessenen Aktivitäten der verschiedenen Fraktionen in nmol umgerechnet.

Nach der Inkubation wurde der wässrige Inkubationsansatz mit Ethylacetat extrahiert. Die Summe der Aktivitäten in der organischen und der wässrigen Phase sollte eine Wiederfindungsrate von mindestens 80% ergeben. Inkubationen, deren Wiederfindungsrate deutlich niedriger war sowie diejenigen, deren wässrige Phase eine auffallend hohe Aktivität aufwies, wurden nicht berücksichtigt.

Die Ethylacetatphase wurde während der HPLC in 18 sec Fraktionen aufgeteilt, deren Aktivitäten in dpm gegen die Zeit aufgetragen wurden, so dass ein Radiochromatogramm resultierte (Abb. 3.51).

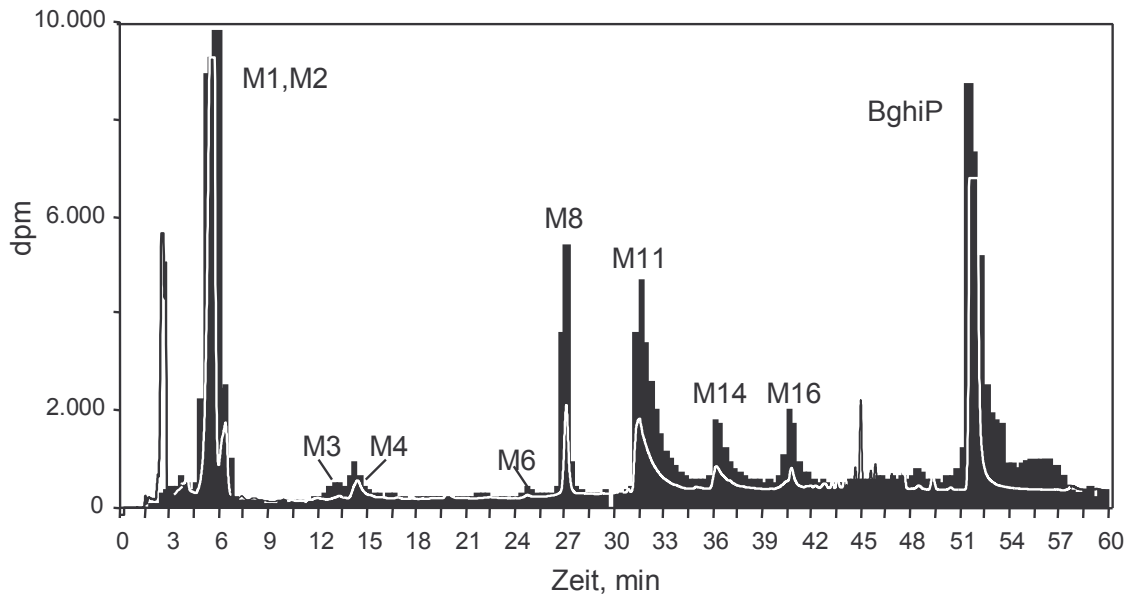


Abbildung 3.51: Typisches Radiochromatogramm (Histogramm) einer Inkubation von $[G\text{-}^3\text{H}]\text{Benzo}[gh]\text{perylen}$ mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 im Vergleich mit dem simultan durch Messung der UV-Absorption erhaltenen Chromatogramm (durchgezogene Linie)

Die Summe aller Aktivitäten in dpm der Metaboliten und des nicht umgesetzten Substrates abzüglich der Hintergrundaktivität stellte den Ethylacetat-extrahierbaren Anteil des Inkubationsansatzes dar, der hauptsächlich zum Gesamtumsatz der Inkubation beiträgt.

Die Summe der Mengen der Metaboliten in nmol außer der des nicht umgesetzten Substrates zuzüglich der nmol der wässrigen Phase ergaben zusammen den metabolischen Gesamtumsatz in nmol/2ml Inkubationsvolumen.

Aus der Beziehung zwischen den nmol-Mengen der Metaboliten aus den Radioaktivinkubationen und den dazugehörigen Peakflächen im UV-Chromatogramm können die nmol der Metaboliten in Inkubationen bestimmt werden, die ohne radioaktiv markiertes Substrat durchgeführt wurden. Dazu wurden die Mengen der Metaboliten M1/M2, M8, M11, M14, M16, M7a, M7b aus den radioaktiven Inkubationen gegen die jeweiligen Peakflächen aus dem UV-Chromatogramm aufgetragen, und durch die Messwerte eine Regressionsgerade gelegt (Abb. 7.15, Anhang). Mit dieser Eichgerade konnten die Peakflächen der Metaboliten aus Inkubationen ohne radioaktiv markiertes Substrat in nmol umgerechnet werden.

3.5.1 Einfluss von Enzyminduktion und Enzymhemmung auf den metabolischen Gesamtumsatz von Benzo[*ghi*]perylen und auf die Zusammensetzung der Metaboliten

[G-³H]BghiP wurde mit Lebermikrosomen aus Ratten inkubiert, die entweder mit den Enzyminduktoren Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, Aroclor 1254 behandelt worden waren (Abb. 3.52), weiterhin wurde der Einfluss von TCPO untersucht.

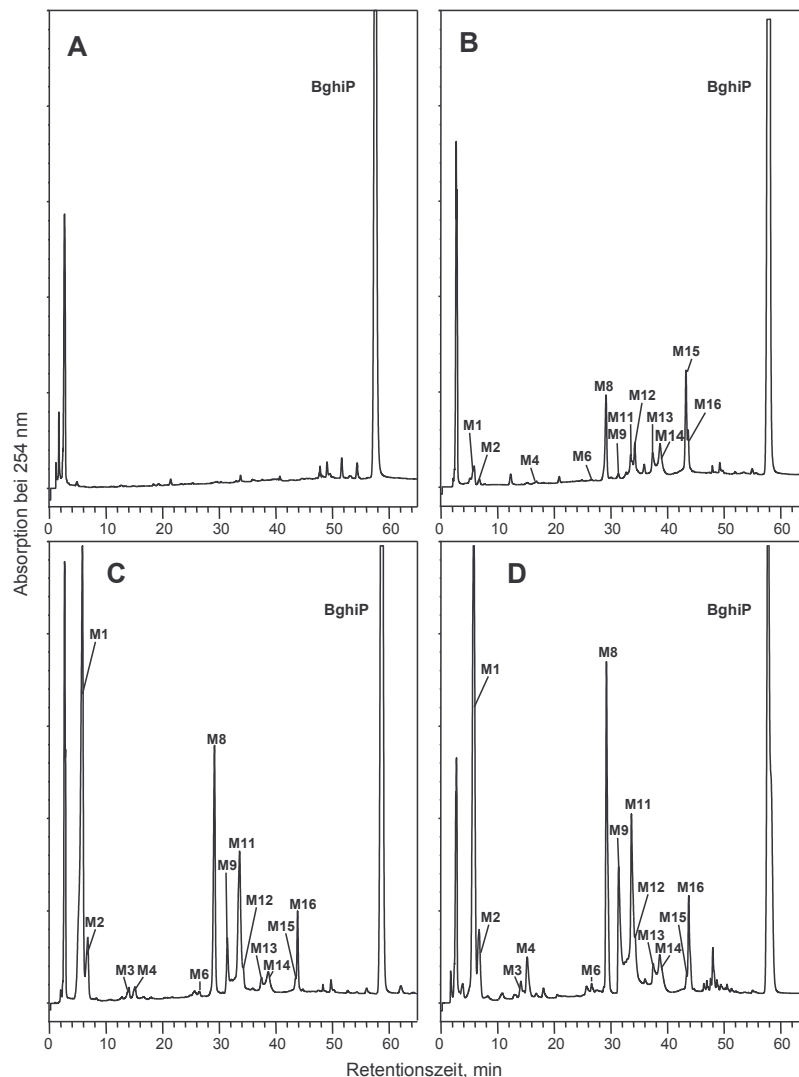


Abbildung 3.52: HPLC-Analyse der Ethylacetat-extrahierbaren Metabolite von Benzo[*ghi*]perylen (BghiP) nach Inkubation mit Lebermikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten *Sprague-Dawley*-Ratten. Bedingungen: LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser, 50/50, V/V, in 40 min auf 100% Methanol, Fluss: 0,8 ml/min, Erläuterung der Abkürzungen vgl. Tab. 3.7

A: Kontrollinkubation ohne NADPH-regenerierendem System

Verwendung von Lebermikrosomen nach Behandlung der Versuchstiere mit:

B: Phenobarbital

C: 3-Methylcholanthren

D: Aroclor 1254

Aus der Summe der Aktivitäten der Ethylacetat-extrahierbaren Metaboliten und der Metaboliten in der wässrigen Phase wurde der metabolische Gesamtumsatz berechnet (Tab. 3.8).

Induktor/Inhibitor	Aroclor 1254	3-Methylcholanthren	Aroclor 1254/TCPO ^b
	nmol ^c (% des metabolischen Gesamtumsatzes)		
Gesamter metabolischer Umsatz	33,8 ± 8,1 (100)	32,0 ± 10,2 (100)	22,0 ± 1,8 (100)
EtOAc extrahierbare Metaboliten	24,1 ± 6,2 (71,3)	21,4 ± 4,7 (66,7)	13,6 ± 0,5 (61,8)
Metaboliten in der wässrigen Phase ^d	9,7 ± 2,0 (28,7)	10,7 ± 5,4 (33,3)	8,4 ± 1,3 (38,2)
Metaboliten:			
3,4,11,12-Bisdihydrodirole (M1 + M2)	6,9 ± 1,5 (20,4)	5,3 ± 1,1 (16,5)	< 0,05
3,4,11,12-Bisoxide (M7a + M7b)	< 0,05	< 0,05	2,5 ± 0,1 (11,4)
3,4-Dihydrodiol (M8)	5,5 ± 2,4 (16,3)	3,2 ± 0,9 (10,0)	< 0,05
7,8-Chinon (M11)	3,7 ± 1,3 (11,0)	2,3 ± 0,9 (7,2)	2,4 ± 0,1 (10,9)
7,10-Chinon (M14)	1,9 ± 0,7 (5,6)	0,8 ± 0,1 (2,5)	1,1 ± 0,4 (5,0)
3,4-Oxid (M14a)	< 0,05	< 0,05	0,6 ± 0,1 (2,7)
7-Phenol (M16)	2,4 ± 0,9 (7,1)	1,4 ± 0,2 (4,4)	1,8 ± 0,3 (8,2)
Andere Metaboliten	3,7 ± 1,6 (10,9)	8,5 ± 3,2 (26,5)	5,2 ± 0,5 (23,6)

Tabelle 3.8: Metabolischer Umsatz von Benzo[ghi]perylen mit Lebermikrosomen von Ratten, Inkubationsbedingungen: Substratkonzentration, 78-83 µM; Inkubationvolumen, 2 ml; gesamtes mikrosomales Protein, 2 mg; Inkubationszeit, 40 min; ^b Inkubation wurde durchgeführt in Gegenwart von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid (TCPO) (1 mM); ^c Mittelwerte ± SD, n = 3-10; ^d beinhaltet proteingebundene Metaboliten. Abkürzungen: Tabelle 3.7.

Die aus den Aktivitäten der radioaktiven Metaboliten erstellten Eichgeraden wurden wie oben erwähnt zur Berechnung der nmol-Mengen der Metaboliten aus Inkubationen mit nicht markiertem Substrat verwendet. Die Angaben über die Mengen der Metaboliten in nmol setzen sich daher sowohl aus Werten der Radioaktivinkubationen als auch aus denen der Inkubationen mit nicht markiertem Substrat zusammen. Die Verteilung der Metaboliten aus Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Phenobarbital, 3-MC oder Aroclor 1254 zeigte einen deutlichen Einfluss des Induktionsstatus (Abb. 3.53).

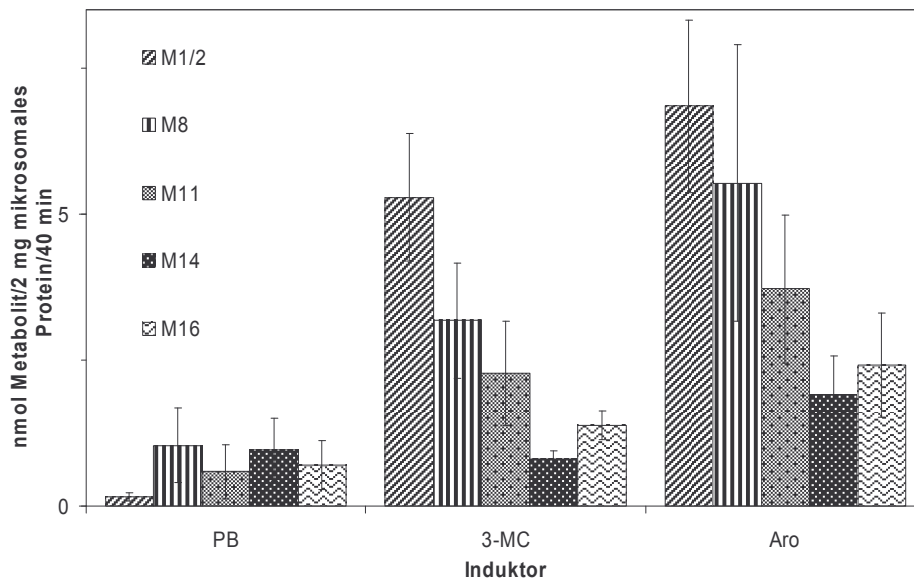


Abbildung 3.53: Vergleich der Zusammensetzungen der Metaboliten aus Inkubationen von Benzo[ghi]perylen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Phenobarbital (PB), 3-Methylcholanthren (3-MC) und Aroclor 1254 (Aro); Abgebildet sind Mittelwerte \pm SD, $n = 3-10$. Abkürzungen siehe Tab. 3.7

Der metabolische Gesamtumsatz war mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Phenobarbital am geringsten. Die Zusammensetzung der Metaboliten war verglichen mit der anderer Inkubationen mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren oder Aroclor 1254 ebenfalls verändert. Dies betraf besonders das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol, dessen Menge mit 0,2 nmol deutlich unter der des 3,4-Dihydrodiol mit 1,0 nmol lag. Außerdem fiel auf, dass das 7,10-Chinon (M14) mit 0,9 nmol neben dem 3,4-Dihydrodiol (M8) einen der Hauptmetaboliten war, gefolgt von dem 7-Phenol (M16) mit 0,7 nmol und dem 7,8-Chinon (M11) mit 0,6 nmol. Bei genauerer Betrachtung des Chromatogramms (Abb. 3.52 B) wird deutlich, dass das bisher nicht identifizierte und in normalerweise sehr geringen Mengen vorkommende Phenol M15 nach Phenobarbitalbehandlung in größerer Menge gebildet wurde als das 7-Phenol (M16).

Der metabolische Gesamtumsatz sowie das Metabolitenmuster unterschieden sich zwischen den Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor (33,8%) bzw. 3-Methylcholanthren (32,0%) nicht signifikant. Die Hauptmetaboliten stellen in den In-

kubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol (M1,M2) mit 16,5% des Gesamtumsatzes und das 3,4-Dihydrodiol (M8) mit 10% dar. Das 7,8-Chinon (M11) ist mit 7,1% und das 7-Phenol (M16) mit 4,3%, das 7,10-Chinon (M14) mit 2,5% dem geringsten Anteil vertreten.

Die Hauptmetaboliten in den Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 waren auch hier das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol (M1,M2) mit 20% und das 3,4-Dihydrodiol (M8) mit 16,4%. Gefolgt von dem 7,8-Chinon (M11) mit 11,0% und dem 7-Phenol (M16) mit 7,1%. In geringster Menge wurde das 7,10-Chinon (M14) mit 5,6% gebildet.

Unter dem Einfluss von TCPO in Inkubationen mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 reduzierte sich der metabolische Gesamtumsatz um 33%. Die Metaboliten M1, M2 und M8 waren erwartungsgemäß nicht mehr nachweisbar, stattdessen stellten nun M7a, M7b mit 12,0% vom Gesamtumsatz sowie M11 mit 10,9% die Hauptmetaboliten dar. Das 7-Phenol (M16) entstand mit 8,3% in drittgrößter Menge gefolgt von dem 7,10-Chinon (M14) mit 5% und das instabile 3,4-Oxid (M14a) mit 2,7% in geringster Menge.

3.5.2 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Bildung der Metaboliten von Benzo[ghi]perylen in Inkubationen mit Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 und des Einflusses von 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Aufklärung der Biotransformationswege von BghiP ist die zeitabhängige Entstehung der Metaboliten mit und ohne TCPO. Dazu wurden Inkubationen mit radioaktiv und ohne radioaktiv markiertem Substrat mit Hilfe der oben beschriebenen Eichgeraden ausgewertet (Abb. 3.54).

Die Menge der Bisdihydrodiole M1, M2 steigt kontinuierlich an, während die des Metaboliten M8 bis ca. 20 min zunimmt um dann bis 60 min nahezu konstant zu bleiben. Eine deutliche Zunahme der Mengen bis 60 min ist auch bei M11 sowie M14 zu beobachten, während die von M16 zwar bis 30 min ansteigt, um dann jedoch bis 60 min unverändert bleibt oder sogar abfällt.

Unter dem Einfluss von TCPO stieg die Menge der Metaboliten M7a und M7b bis 20 min an, um sich dann bis 60 min nicht mehr zu verändern. Das 7,8-Chinon (M11) sowie das 7,10-Chinon (M14) stiegen bis 60 min kontinuierlich an. Das 7-Phenol (M16) hingegen stieg bis 20 min an und fiel dann deutlich bis 60 min ab.

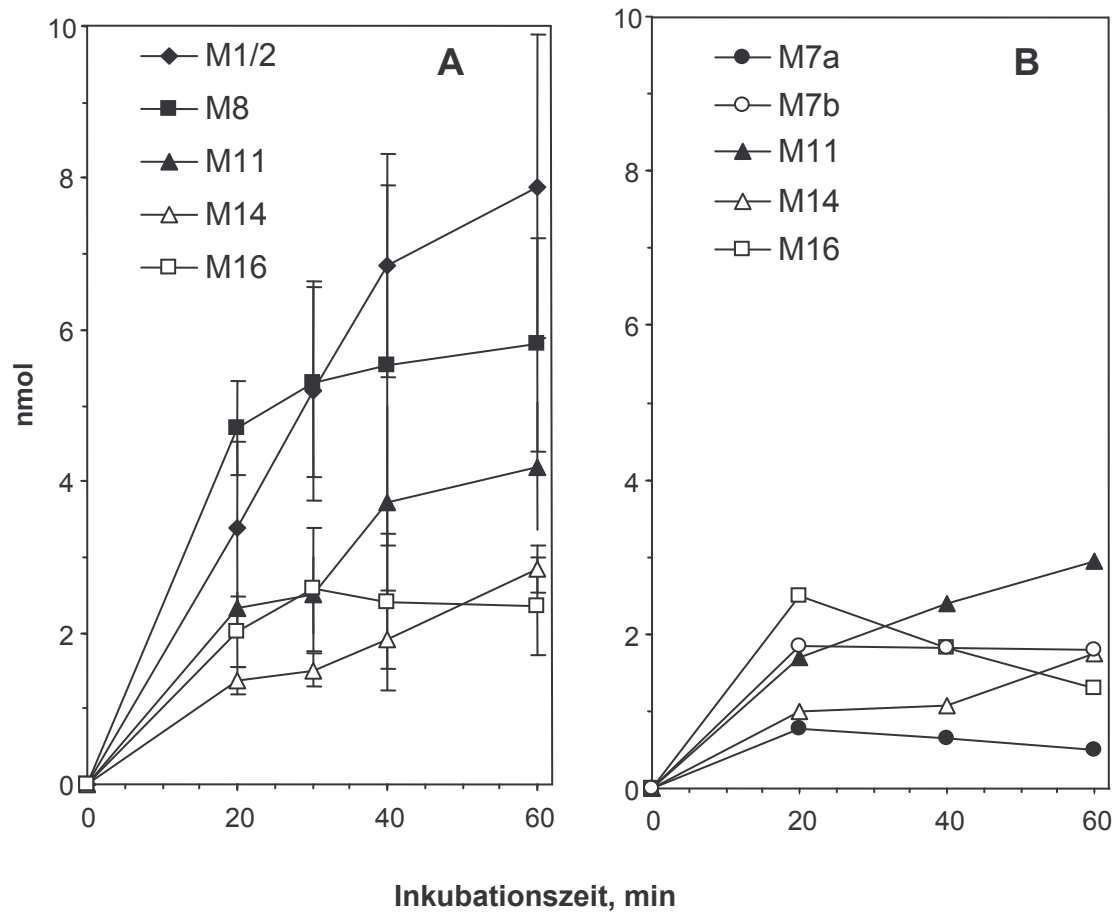


Abbildung 3.54: Zeitabhängige Entstehung der Metaboliten von Benzo[*gh*]perylen in Inkubationen mit Mikrosomen von Ratten nach Vorbehandlung mit Aroclor 1254, Abgebildet sind bei A Mittelwerte \pm SD aus Mehrfachbestimmungen. Abkürzungen s. Tab. 3.7

A: ohne TCPO
B: mit 1 mM TCPO

3.6 Untersuchung der Gentoxizität von Benzo[ghi]perylen und seiner Derivate

3.6.1 Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen in den Stämmen TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurium* nach Aktivierung mit der postmitochondrialen Fraktion der Rattenleber

Die bisher untersuchten PAKs zeigen erst nach metabolischer Aktivierung gentoxische Eigenschaften. Auch BghiP revertierte in Abwesenheit der postmitochondrialen, hepatischen Fraktion die histidinabhängigen *Salmonella typhimurium* Stämme TA100 und TA98 nicht zur Histidinprototrophie.

Die postmitochondriale hepatische Fraktion stammte von Ratten, die zuvor mit 3-MC zur verstärkten Expression fremstoffmetabolisierender Enzyme behandelt worden waren. Dieser Induktor stellte sich im Vergleich mit Phenobarbital und Aroclor 1254 als am effektivsten in Bezug auf die spezifische Mutagenität von BghiP in den beiden Teststämmen TA100 und TA98 heraus (Daten nicht gezeigt). Die metabolische Aktivierung des BghiP ergab einen mutagenen Effekt von 4,3 his⁺-Revertanten im Stamm TA100 pro nmol (Abb. 3.55), während unter den gleichen Bedingungen im Stamm TA98 lediglich eine spezifische Mutagenität von 1,3 his⁺-Revertanten pro nmol erreicht wurde (Abb. 3.55).

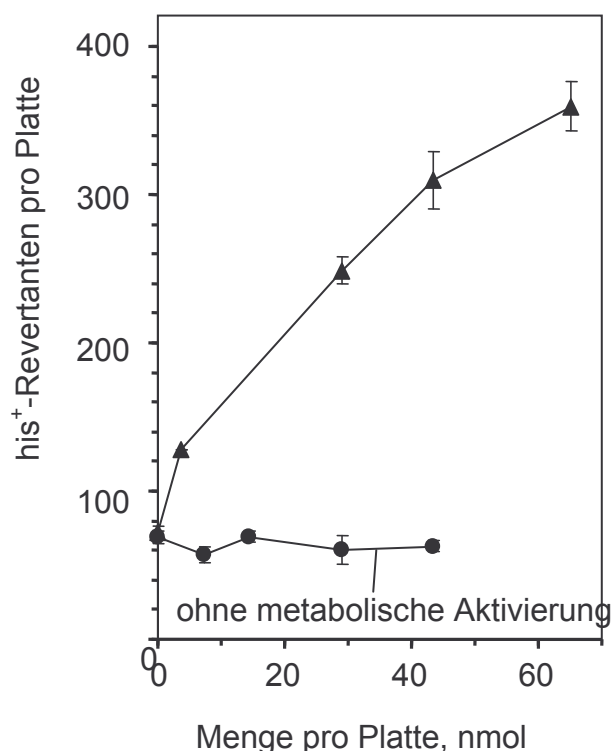


Abbildung 3.55: Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen im Stamm TA100 von *Salmonella typhimurium* mit und ohne metabolische Aktivierung durch die postmitochondriale hepatische Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren; Mittelwerte \pm SD, $n = 3$

Wurde im Mutagenitätstest mit dem Stamm TA98 hingegen die mEH der postmitochondrialen hepatischen Fraktion mit 1 mM TCPO gehemmt, erhöhte sich der mutagene Effekt von BghiP um das 4-5-fache auf 5,0 his⁺-Revertanten pro nmol (Abb. 3.56).

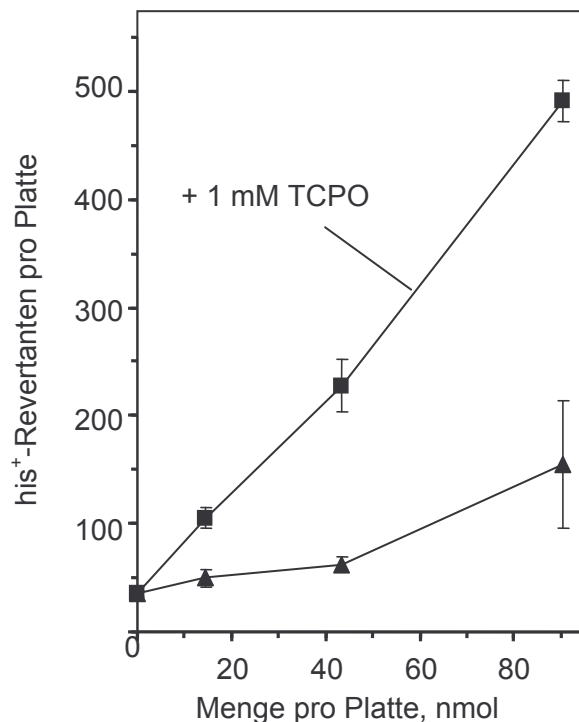


Abbildung 3.56: Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen im Stamm TA98 von *Salmonella typhimurium* nach metabolischer Aktivierung durch die postmitochondriale hepatische Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren; TCPO, 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$.

3.6.2 Untersuchung der bakteriellen Mutagenität von mikrosomalen Metaboliten des Benzo[ghi]perylens

Die Mutagenität von BghiP in den Teststämmen TA98 und TA100 in Anwesenheit eines metabolisierenden Systems spricht für die Bildung gentoxischer Metaboliten. Zur Charakterisierung dieser gentoxischen Substanzen innerhalb eines Inkubationsansatzes wurde zunächst eine Methode angewendet, die zur Untersuchung von Staubproben der Außenluft dient, um die bakterielle Mutagenität von den darin enthaltenen PAKs zu bestimmen (Lewtas *et al.*, 1990; Arey *et al.*, 1992; Erdinger *et al.*, 1997). Die Extrakte der Luftproben werden mit HPLC in Fraktionen von 1-2 min Dauer aufgetrennt und diese einzeln im bakteriellen Mutagenitätstest untersucht. Die erhaltenen his⁺-Revertanten jeder Fraktion werden gegen die Zeit aufgetragen und ergeben ein sogenanntes Mutagramm, in dem die Mutagenität jeder Fraktion mit dem jeweiligen Peak eines PAKs korreliert werden kann.

Auf ähnliche Weise wurde der Ethylacetatextrakt einer mikrosomalen Inkubation von BaP bzw. BghiP untersucht. Während der HPLC-Analyse wurden Fraktionen von 10 min (8 ml)

gesammelt und deren bakterielle Mutagenität bestimmt. Die his⁺-Revertanten jeder Fraktion wurden gegen die Zeit aufgetragen und das Mutagramm mit dem Chromatogramm verglichen, so dass mutagene Metaboliten durch eine erhöhte Revertierungsrate erkannt werden konnten.

Außerdem wurden Hauptmetaboliten von BghiP chromatographisch isoliert und aus Dosis-Wirkungskurven deren spezifische Mutagenität bestimmt.

3.6.2.1 Bakterielle Mutagenität der fraktionierten Ethylacetatextrakte von mikrosomalen Inkubationen von Benzo[a]pyren und Benzo[ghi]perylen im Stamm TA100 von *Salmonella typhimurium*

Der Inkubationsansatz wurde bei beiden PAKs auf 100ml vergrößert, wie in Abschn. 2.3.2 beschrieben aufgearbeitet und der erhaltene Ethylacetatextrakt mit HPLC über einen Zeitraum von 70 min chromatographiert (Abb. 3.57). Dabei wurden Fraktionen von je 10 min Dauer (8 ml) gesammelt. Bei beiden PAKs diente zur Kontrolle reines DMSO, das jeweils unter denselben Bedingungen chromatographiert und fraktioniert wurde.

Nach der HPLC wurden 7 Proben von jedem PAK zuzüglich je sieben DMSO-Kontrollen erhalten, die in einem Doppelansatz auf ihre Mutagenität im Stamm TA100 mit metabolischer Aktivierung (postmitochondriale hepatische Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-MC) untersucht wurden.

Im Mutagramm von BaP zeigten fast alle Fraktionen eine hohe mutagene Aktivität (Abb. 3.57). Neben der erwartungsgemäß sehr hohen Reversionsrate in der Fraktion mit BaP, war diese auch besonders ausgeprägt in der Fraktion von 10-20 min. Hier befanden sich nach Vergleich mit dem Chromatogramm hauptsächlich Metaboliten mit Dihydrodiolstruktur. Ein ebenfalls deutlicher, wenn auch schwächerer Anstieg war in der 30-40 min Fraktion zu verzeichnen, in der die unpolaren phenolischen Derivate des BaPs vorkamen.

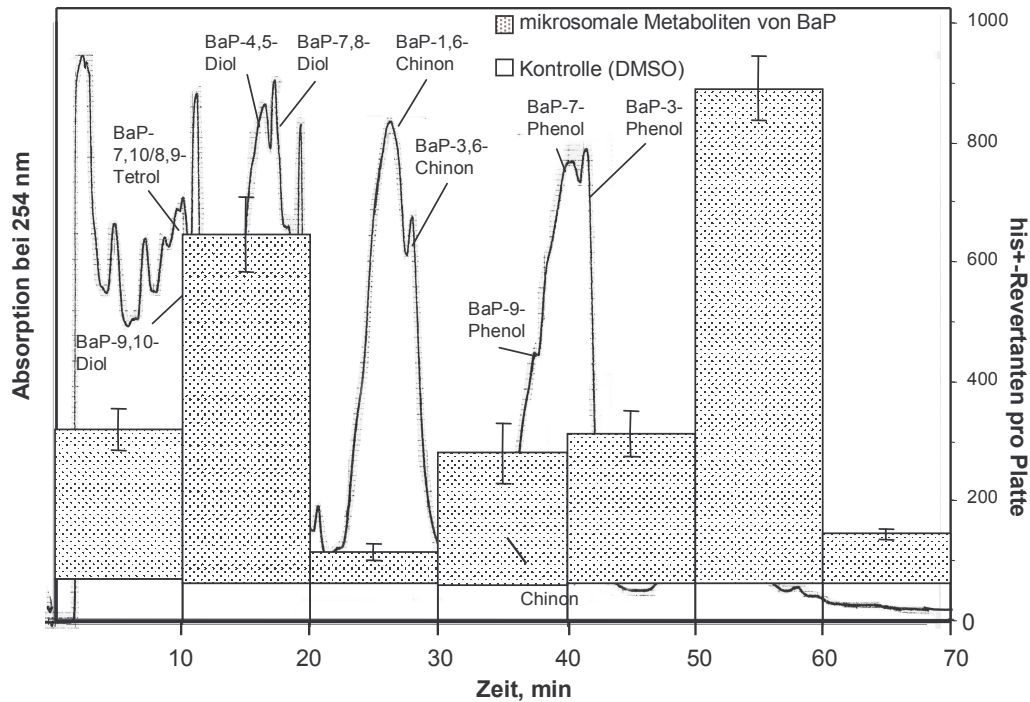


Abbildung 3.57: Chromatogramm und bakterielle Mutagenität von HPLC-Fractionen des Ethylacetatextraktes einer mikrosomalen Inkubation von Benzo[a]pyren (BaP) mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 in TA 100 nach metabolischer Aktivierung mit der postmitochondrialen hepatischen Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren, Bedingungen: LiChrospher RP18e, MeOH/H₂O 55/45, V/V, in 10 min auf MeOH/H₂O 75/25, V/V bis 25 min isokratisch, in 3 min auf MeOH/H₂O 80/20, V/V in 12 min auf MeOH/H₂O 83/17, V/V in 2 min auf 100% Methanol, bis 70 min isokratisch, 0,8 ml/min

Im Mutagramm von BghiP (Abb. 3.58) ist nur in den BghiP-enthaltenen Fraktionen (50-60 und 60-70 min) eine wesentliche Erhöhung der his⁺-Revertanten zu beobachten. In den Fraktionen, die von 10-20 min, 20-30 min sowie 40-50 min gesammelt worden waren, ist eine leichte Erhöhung der Reversionsrate im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. In diesen Fraktionen sind nach Vergleich mit dem Chromatogramm zum einen polarere Metabolite (M3, M4 und M6), 3,4-Dihydrodiol (M8) bzw. das unpolare 7-Phenol (M16) vertreten. Die geringste Zunahme der Mutagenität zeigte die erste Fraktion von 0-10 min, in der der Hauptmetabolit, das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol, enthalten ist.

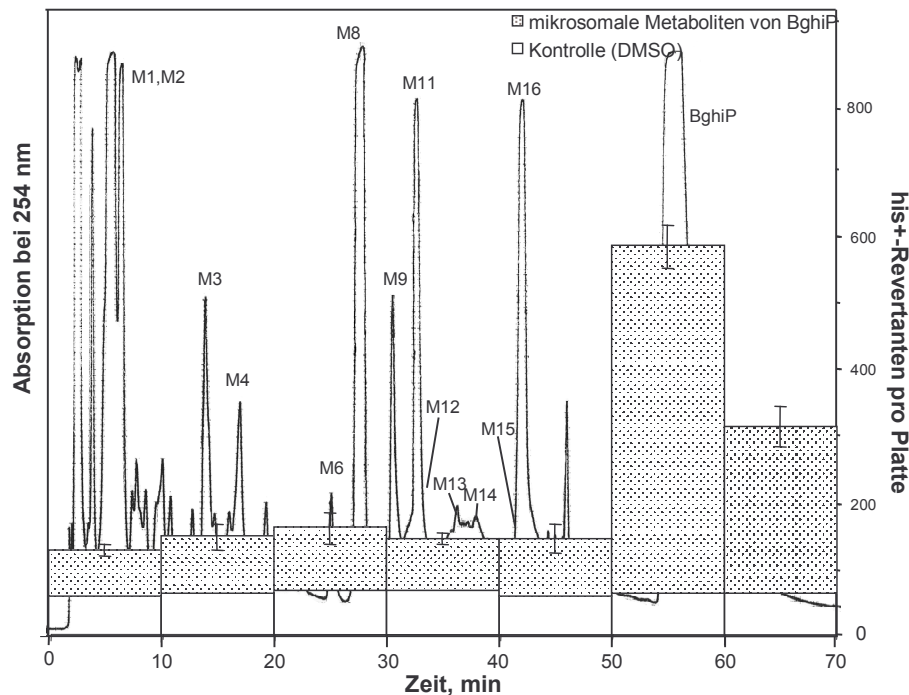


Abbildung 3.58: Chromatogramm und bakterielle Mutagenität von HPLC-Fractionen des Ethylacetatextraktes einer Inkubation von Benzo[ghi]perylen (BghiP) mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 im Stamm TA100 nach metabolischer Aktivierung mit der postmitochondrialen hepatischen Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren. Bedingungen: LiChrospher RP18e, Methanol/Wasser 50/50, V/V, in 40 min auf 100% Methanol, bis 70 min isokratisch, 0,8 ml/min

3.6.2.2 Bakterielle Mutagenität isolierter mikrosomaler Metaboliten des Benzo[ghi]perylens nach Aktivierung mit der postmitochondrialen hepatischen Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren im Stamm TA100 von *Salmonella typhimurium*

Durch das Mutagramm konnten Hinweise darauf erhalten werden, dass die Hauptmetaboliten 3,4-Dihydrodiol (M8) und 7-Phenol (M16) von BghiP mutagene Aktivität besitzen. Zur Bestimmung der spezifischen Mutagenität wurden diese Metaboliten sowie das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol (M1/M2) chromatographisch isoliert und ihr gentoxisches Potential im Stamm TA100 nach metabolischer Aktivierung bestimmt. Die isolierten Mengen wurden mit der in Abschn. 3.5 beschriebenen Eichgeraden bestimmt und so verdünnt, dass bei M1/M2 und M8 jeweils 10, 20, 40 und 80 μg sowie bei M16 10, 25 und 50 μg pro Platte eingesetzt werden konnten.

Die 3,4,11,12-Bisdihydrodirole (M1/M2) wurden wie aus dem Mutagramm in Abb. 3.58 zu erwarten durch die postmitochondriale hepatische Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-MC nicht zu gentoxischen Metaboliten aktiviert (Abb. 3.59). Aus dem 3,4-Dihydrodiol (M8)

und dem 7-Phenol (M16) entstanden dagegen unter denselben Bedingungen mutagene Metaboliten (Abb. 3.59).

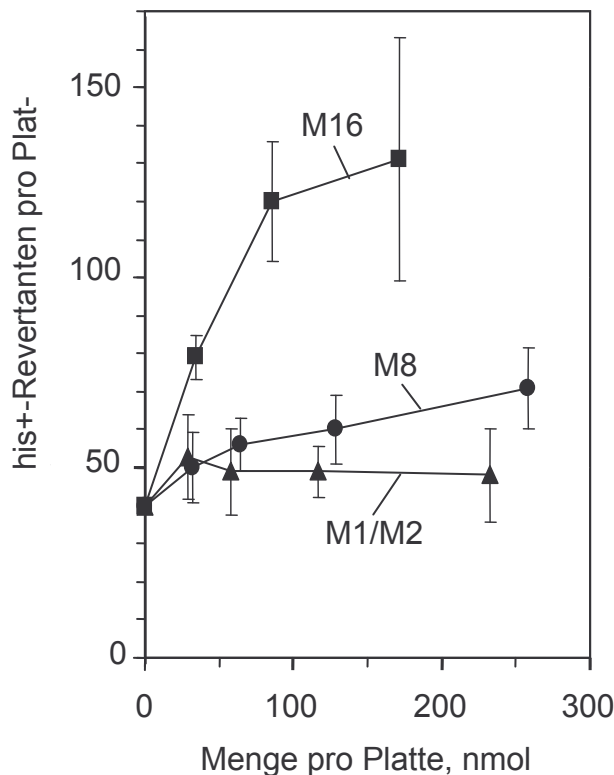


Abbildung 3.59: Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen-3,4,11,12-Bisdihydrodiol (M1/M2), 3,4-Dihydrodiol (M8) und 7-Phenol (M16) im Stamm TA100 von *Salmonella typhimurium* nach metabolischer Aktivierung durch die postmitochondriale hepatische Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren; Mittelwerte \pm SD, $n = 3$

Da die Steigung der Dosis-Wirkungskurve bei der höchsten Dosis abzuflachen beginnt, wurde eine Regressionsgerade jeweils durch die ersten vier (M8) bzw. drei (M16) Werte gelegt. Daraus ergab sich eine spezifische Mutagenität des 3,4-Dihydrodiols von 0,15 his⁺-Revertanten/ nmol und die des 7-Phenols von 0,9 his⁺-Revertanten/nmol.

3.6.2.3 Direkte bakterielle Mutagenität von Arenoxiden des Benzo[ghi]perylens in den Stämmen TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurium*

Da in Anwesenheit von 1 mM TCPO der mutagene Effekt von BghiP um das 4-5-fache angestiegen war (Abb. 3.54), sollten Metaboliten mit Epoxidstruktur für die mutagenen Effekte verantwortlich sein. Zu diesen Metaboliten zählen die 3,4,11,12-Bisoxide M7a und M7b, die als Hauptmetaboliten in mikrosomalen Inkubationen in Anwesenheit von TCPO auftreten. Unter den gleichen Bedingungen wird, allerdings in sehr kleiner, kaum nachweisbarer Menge, das 3,4-Oxid M14a gebildet.

Diese Biotransformationsprodukte sollten auf direkte Mutagenität, d. h. ohne metabolische Aktivierung im bakteriellen Mutagenitätstest untersucht werden. Dafür wurde M7a und M7b aus mikrosomalen Inkubationen mit TCPO isoliert (Abschn. 2.4.2) und die Mutagenität im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung getestet. Die aus der Dosis-Wirkungskurve berechnete spezifische Mutagenität betrug 1,5 his⁺-Revertanten/ nmol. (Abb 3.60).

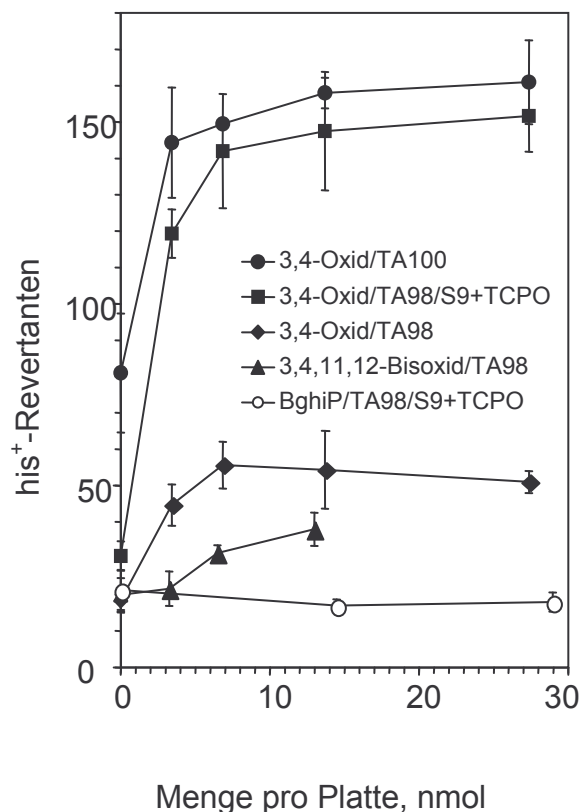


Abbildung 3.60: Direkte bakterielle Mutagenität von Benzo[*gh*]perylen-3,4,11,12-bisoxid (M7a/M7b), BghiP-3,4-Oxid (M14a) und BghiP in den Stämmen TA100 und TA98 von *Salmonella typhimurium*; S9, postmitochondriale hepatische Fraktion aus Ratten nach Behandlung mit 3-MC; TCPO, 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid; Mittelwerte \pm SD, $n = 3$.

Da die Menge des in mikrosomalen Inkubationen gebildeten M14a für eine Isolierung zu gering war, wurde das synthetische 3,4-Oxid verwendet (Abschn. 3.1.4). Wie in Abschn. 3.1.4 gezeigt, führte die chromatographische Reinigung der Reaktionsprodukte aus dem 3,4-Oxid und dessen Edukt BghiP zu Isomerisierung von 3,4-Oxid zu den entsprechenden Phenolen. Daher wurde das Reaktionsgemisch auf direkte bakterielle Mutagenität in den Stämmen TA98 und TA100 untersucht und reines BghiP als Kontrolle unter denselben Bedingungen mitgeführt.

Im Stamm TA100 war der steilste Anstieg der Revertanzahl stets zwischen dem Nullwert und niedrigster Dosis zu beobachten, so dass zur Berechnung der spezifischen Mutagenität die Regressionsgerade aus den ersten drei Werten berechnet wurde und sich so ein Wert von 10,0 his⁺-Revertanten/nmol errechnete (Abb. 3.60).

Im Stamm TA98 betrug die spezifische Mutagenität des 3,4-Oxids 5,5 his⁺-Revertanten. Um die geringe Stabilität des 3,4-Oxides durch physikalische Wechselwirkung an Proteine und Lipide zu erhöhen, wurde der Mutagenitätstest im Stamm TA98 in Gegenwart der postmitochondrialer hepatischer Fraktion von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 durchgeführt. Dabei musste allerdings das 3,4-Oxid vor der enzymatischen Hydrolyse durch Zugabe von TCPO geschützt werden. Die Dosis-Wirkungskurve ergab ein ähnliches Bild wie die im Stamm TA98, jedoch erhöhte sich die spezifische Mutagenität auf 16,3 his⁺-Revertanten/nmol (Abb. 3.60) und stieg demnach in Gegenwart postmitochondrialer Leberfraktion um das Dreifache an.

BghiP zeigte unter den gleichen Bedingungen erwartungsgemäß keine direkte Mutagenität.

3.6.3 Bestimmung der kovalenten DNA-Bindung des metabolisch aktivierten Benzo[ghi]perylens sowie die seiner Arenoxide mit dem Verfahren des ³²P-Postlabelings

Die bakterielle spezifische Mutagenität von BghiP nimmt signifikant durch Hemmung der mEH mit TCPO zu (s. Abb. 3.56). Dies wird vermutlich durch die beträchtliche direkte Mutagenität des Metaboliten 3,4-Oxid (M14a) verursacht.

Die Mutagenität beruht auf einer DNA-Läsion und wird in vielen Fällen durch kovalente DNA-Bindung verursacht und wird mit der sehr effizienten und hochempfindlichen Methode des ³²P-Postlabelings bestimmt. Daher wurde die DNA-Bindung von metabolisch aktivierten BghiP und seiner Derivate mit Epoxidstruktur geprüft. Dafür stand das 3,4-Oxid synthetisch (Abschn. 3.1.4), das 3,4,11,12-Bisoxid halbsynthetisch zur Verfügung (Abschn.3.1.4). Die Untersuchungen zur DNA-Bindung wurden von Dr. Michael Fickler am Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, durchgeführt.

Wird Kalbsthymus-DNA mit BghiP nach mikrosomaler Umsetzung in Anwesenheit von TCPO behandelt, bilden die aktiven Metaboliten drei DNA-Addukte 1, 2 und 3 (Abb. 3.61 A), von denen nur Addukt 1 in abgeschwächter Form auftritt, wenn bei der mikrosomalen Umsetzung TCPO fehlte (Abb. 3.61 A.a).

Zur Identifizierung dieser Addukte 1, 2, 3 wurden das 3,4,11,12-Bisoxid und das 3,4-Oxid von BghiP ohne vorhergehende enzymatische Umsetzung demselben Verfahren unterzogen. Die erhaltenen Addukte wurden hinsichtlich ihrer chromatographischen Eigenschaften bzw. durch Mischchromatographie mit denen der aktiven Metabolite des BghiPs verglichen.

Das BghiP-3,4-Oxid zeigte fünf Addukte: 1E, 2E, 3E, 4E und 5E (Abb. 3.61 B), von denen das Addukt 1E mit 75% der Gesamtadduktmenge am stärksten ausgeprägt war. Bei BghiP betrug nach metabolischer Aktivierung der Anteil von Addukt 1 62%.

Mischchromatographie beider Ansätze (Abb. 3.61 B+A) ergab sieben unterschiedliche Addukte, wobei die Addukte 1E und 1 identische chromatographische Eigenschaften besaßen. Die übrigen Addukte 2E, 3E, 4E und 5E stammten ausschließlich vom 3,4-Oxid, während Herkunft und Struktur der DNA-Addukte 2 und 3 nicht zu klären waren.

Nach Umsetzung des 3,4,11,12-Oxids mit Kalbsthymus-DNA wurden zwei Addukte 1B und 2B nachgewiesen (Abb. 3.61 C), die sich in ihren chromatographischen Eigenschaften sehr von denen der Addukte 1, 2 und 3 des mikrosomal aktivierten BghiPs unterschieden. Dies wurde durch Mischchromatographie beider Ansätze bestätigt (Abb. 3.61 C+A), aus der fünf verschiedene Addukte resultierten, so dass keine chromatographische Übereinstimmung der DNA-Addukte von metabolisch aktivierten BghiP und des 3,4,11,12-Bisoxides beobachtet werden konnte.

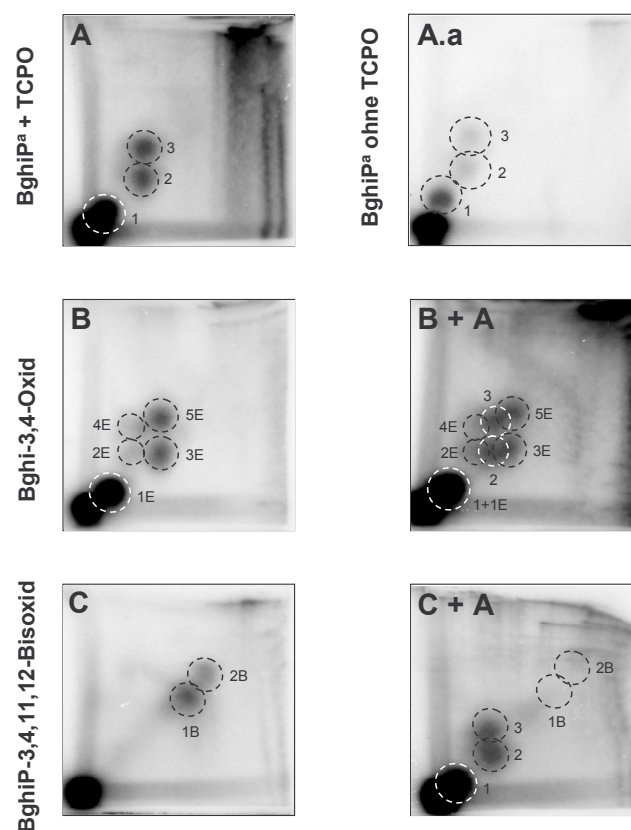


Abbildung 3.61: Dünnschichtchromatogramm der ^{32}P -markierten Addukte an Kalbsthymus-DNA des metabolisch aktivierten Benzo[*ghi*]perylens mit TCPO (A) und ohne TCPO (A.a), seines 3,4-Oxides (B) und seines 3,4,11,12-Bisoxides (C), die Chromatogramme B+A und C+A repräsentieren Adduktgemische, die umrandeten und nummerierten Flecke wurden in Kontrollinkubationen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) nicht beobachtet, ^a metabolische Aktivierung durch hepatische mikrosomale Fraktionen der Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254

4 Diskussion

BghiP gehört zu den PAKs, die keine klassische Bay-Region wie BaP besitzen und trotzdem genotoxisch sind. Da diese Eigenschaft nicht auf die Bildung genotoxischer vicinaler Dihydrodi-olepoxide beruhen kann, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob alternative Aktivierungswege existieren, die zu mutagenen und kanzerogenen Metaboliten führen. Im Mittelpunkt dieses Vorhabens standen Untersuchungen zur mikrosomalen Metabolisierung und bakteriellen Mutagenität, um die Gründe für die Genotoxizität des hexazyklischen Kohlenwasserstoffes BghiP aufzuklären. Anthanthren diente hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Biotransformation als Vergleichssubstanz.

4.1 Bakterielle Mutagenität von Benzo[ghi]perylen

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, benötigt BghiP wie andere PAKs eine externe enzymatische Aktivierung, um in Bakterien einen mutagenen Effekt zu erzeugen (Sakai *et al.*, 1985). Da Enzyme der Subfamilie 1A der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen BghiP am effektivsten zu mutagenen Metaboliten umsetzt (Andrews *et al.*, 1978), wurde die zur enzymatischen Aktivierung verwendete postmitochondriale Fraktion aus Ratten hergestellt, die zuvor mit 3-Methylcholanthren behandelt worden waren. Unter diesen Bedingungen zeigte BghiP einen mutagenen Effekt im Stamm TA100, der durch Basenpaarsubstitutionen revertiert wird. Die spezifische Mutagenität ist mit 4,3 his⁺-Revertanten/nmol mehr als doppelt so hoch, als in der Literatur angegeben (1,5-2,2 his⁺-Revertanten/nmol; La Voie *et al.*, 1979; Andrews *et al.*, 1978; Sakai *et al.*, 1985). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass in der vorliegenden Arbeit statt Aroclor 1254 3-Methylcholanthren als Induktor verwendet worden war. Wurde die Mutagenität von BghiP im Stamm TA98 untersucht, der vor allem durch Mutagene revertiert wird, die Rasterverschiebungen verursachen, zeigte sich eine wesentlich geringere spezifische Mutagenität mit 1,3 his⁺-Revertanten/nmol gegenüber 1,9 his⁺-Revertanten/nmol wie aus den Ergebnissen von Sakai *et al.*, 1985 berechnet. Nach Hemmung der mEH durch TCPO stieg die Mutagenität von BghiP in TA98 um fast das Vierfache auf 5,0 his⁺-Revertanten/nmol an. Diese Beobachtung deutet auf eine wichtige Rolle hochreaktiver Arenoxide (Glatt *et al.*, 1975) bei der Mutagenität dieses PAKs hin.

4.2 Mikrosomaler Metabolismus von Benzo[ghi]perylen

Über den mikrosomalen Metabolismus von BghiP ist nur sehr wenig bekannt (Van Gulp & Hankinson, 1983; Hughes & Phillips, 1993), so dass die Aufklärung der Struktur seiner Me-

taboliten und ihre Bedeutung für die Gentoxizität dieses PAKs, den Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten.

BghiP wird mikrosomal zu 17 Metaboliten umgesetzt, von denen 12 durch eine Kombination von chromatographischen, spektroskopischen und biochemischen Methoden identifiziert werden konnten. Basierend auf der strukturellen Aufklärung der Metaboliten, verläuft die mikrosomale Biotransformation auf zwei Wegen (Abb. 4.1). Weg I beginnt mit einer enzymatischen Hydroxylierung an Position 7 und der Bildung des 7-Phenols (M16). Außer durch direkte Hydroxylierung könnte 7-Phenol auch durch Isomerisierung des 6,7-Arenoxides entstehen (Noor Mohammad, 1986). Dies ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da kein *trans*-6,7-Dihydrodiol als Metabolit detektiert wurde. Allerdings ist denkbar, dass das 6,7-Oxid über einen NIH-Shift (Daly *et al.*, 1972; Yagi *et al.*, 1972) sehr schnell in das 7-Phenol überführt wird, bevor eine enzymatische Hydrolyse stattfinden kann. Ein vergleichbarer Vorgang wurde bei der Entstehung des 3-Phenols aus dem 2,3-Oxid des Benzo[a]pyrens beschrieben (Yang *et al.*, 1977a). Das 7-Phenol wird durch erneuten oxidativen Angriff an Position 8 in das 7,8-Diphenol (M9) überführt und anschließend 7,8-Chinon (M11) oxidiert. Zum gegenwärtigen Stand dieser Arbeit ist kein Metabolit eines PAKs bekannt, der an beiden Kohlenstoffatomen, die eine *Bay*-Region flankieren, oxidiert ist. Eine Hydroxylierung an Position 10 des 7-Phenols ergibt das 7,10-Diphenol (M12) und sein Oxidationsprodukt das 7,10-Chinon (M14). Weg II der mikrosomalen Biotransformation von BghiP beginnt mit dem Angriff einer Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenase an der 3,4-Position, woraus das 3,4-Oxid (M14a) resultiert. Dieses Arenoxid konnte nur nach Hemmung der mEH nachgewiesen werden. Seine Identifizierung stützte sich auf UV-Spektroskopie und der Polarität, da aufgrund der Instabilität dieses Epoxides weitere spektroskopische Untersuchungen nicht möglich waren. Nach effektiver Hydrolyse des 3,4-Arenoxides durch die mEH bildet sich das 3,4-Dihydrodiol (M8), einer der Hauptmetaboliten von BghiP. Das 3,4-Dihydrodiol wird schließlich zum 3,4-Chinon (M13) oxidiert. Da diese Reaktion auch spontan in Gegenwart von Sauerstoff abläuft, beruht sie nicht hauptsächlich auf einem enzymatischen Mechanismus. Ein weiterer Hinweis auf die Bildung des 3,4-Arenoxides ist der Nachweis seines Isomerisierungsproduktes, des Phenols 15a, das durch einen ternären Eluenten vom 7-Phenol (M16) getrennt werden konnte. Weiterhin wurde dieses Phenol bei der sauren Dehydratation (Yang *et al.*, 1977b) des 3,4-Dihydrodiols (M8) gefunden.

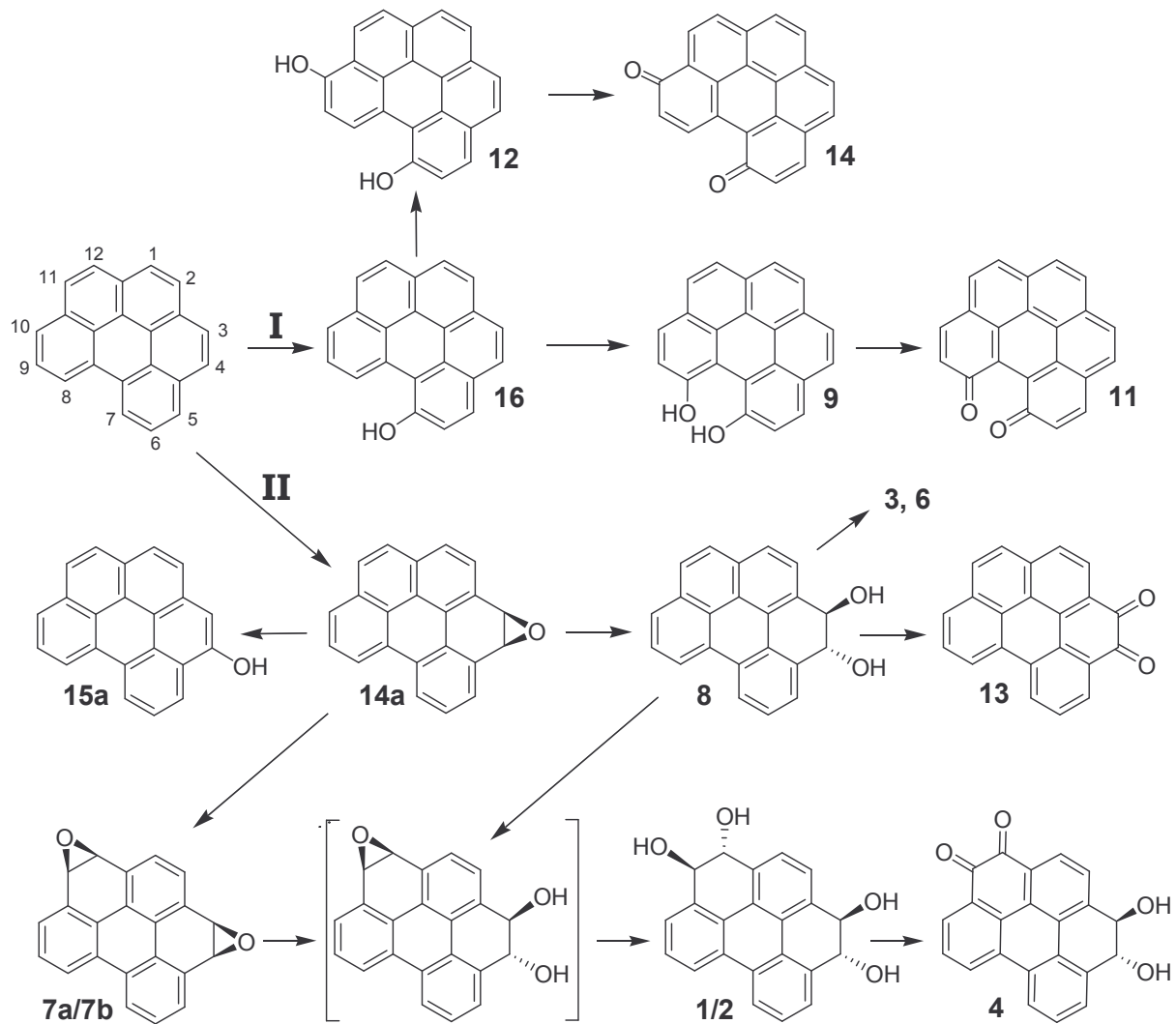


Abbildung 4.1: Wege des mikrosomalen Metabolismus von BghiP, im Fall der chiralen Metaboliten ist nur einer der möglichen Stereoisomere gezeigt. Abkürzungen, siehe Tabelle 3.8 in Abschn. 3.4.1.1

Das Verhältnis der beiden aus einem Arenoxid entstehenden isomeren Phenole soll sich durch vereinfachte Molekülorbitalberechnungen nach DEWAR vorhersagen lassen (Fu *et al.*, 1978). Dazu wird die Reaktivitätszahl, N_t , bestimmt, deren Wert für das dem vorwiegend gebildeten Phenol entsprechende Carbokation möglichst klein sein soll. N_t wird abgeleitet aus den Koeffizienten der nicht-bindenden Molekülorbitale (NBMO) der beiden dem Kohlenstoffatom mit der phenolischen Hydroxylgruppe benachbarten C-Atome nach

$$N_t = 2(a_r + a_s)$$

wobei a_r und a_s die NBMO-Koeffizienten (Dewar & Dougherty, 1975) der benachbarten C-Atome sind (z.B. C-3 und C-4a im Falle des 3-Phenols). Da N_t für das Zwischenprodukt mit der positiven Ladung an der 3-Position (Sauerstoff ist an der 4-Position) 1,64 beträgt, verglichen mit dem N_t -Wert von 1,79 des Zwischenproduktes mit der positiven Ladung an der 4-

Position, sollte das 4-Phenol bevorzugt durch Isomerisierung des 3,4-Arenoxides entstehen (Abb. 4.2).

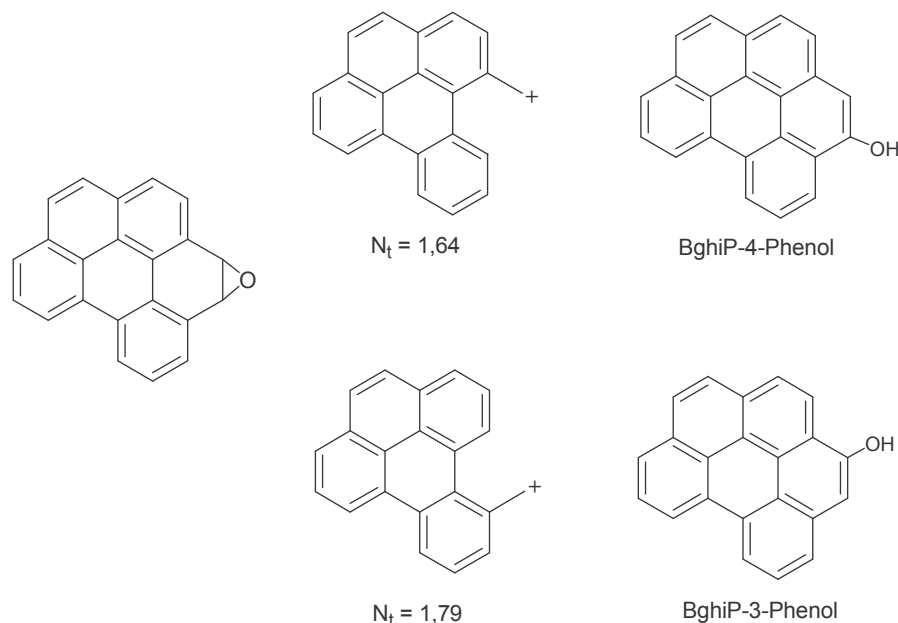


Abbildung 4.2: Struktur des 3,4-Oxides von BghiP und der durch nicht-enzymatische Isomerisierung daraus entstehenden Phenole sowie der Carbokationen nach Entfernung des den Sauerstoff tragenden Kohlenstoffatoms, N_t , Reaktivitätszahl.

Aus dem 3,4-Dihydrodiol leiten sich außerdem die Metaboliten M3 und M6 ab, deren Struktur insofern aufgeklärt ist, dass es sich um Dihydrodirole mit phenolischen Gruppen handelt.

Die Hauptmetaboliten von BghiP, die 3,4,11,12-Bisdihydrodirole M1 und M2 entstehen aus dem 3,4-Oxid über zwei verschiedene Routen:

1. über das 3,4-Dihydrodiol M8 oder
2. durch einen zweiten Angriff von P-450 abhängigen Monooxygenasen an der 11,12-Position von 14a, der zunächst zu den Bisoxiden M7a und M7b führt. Diese beiden Bisoxide können in mikrosomalen Inkubationen sowie das Arenoxid M14a nur in Anwesenheit von TCPO nachgewiesen werden.

Das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol wird schließlich zum 3,4-Dihydrodiol 11,12-Chinon M4 oxidiert. Dies kann durch enzymatische oder autoxidative Reaktion geschehen, denn das Bisdihydrodiol reagiert auch spontan in Anwesenheit von Sauerstoff zum Dihydrodiol-Chinon.

Die beiden Biotransformationswege der metabolischen Umsetzung von BghiP spiegeln sich auch in der zeitabhängigen Entstehung der Metaboliten M1, M2, M8, M11, M14 und M16 in An- oder Abwesenheit von TCPO wider. Die Menge der Endprodukte von Weg I, das 7,8-Chinon (M11) und das 7,10-Chinon (M14), nehmen von 20 bis 60 min kontinuierlich zu, während die Menge des 7-Phenols (M16) nach 20 min nicht mehr ansteigt und in Gegenwart von TCPO sogar dramatisch abnimmt. Das gleiche Verhalten ist auch bei den Bisdihydrodiolen M1 und M2 und ihrem Vorläufer, dem 3,4-Dihydrodiol (M8), von Weg II zu beobachten: wäh-

rend die Menge der 3,4,11,12-Bisdihydrodirole kontinuierlich zunimmt, bleibt die Menge des 3,4-Dihydrodiols nahezu konstant. In Anwesenheit von TCPO treten an Stelle der Dihydrodirole von Weg II die 3,4,11,12-Bisoxide, deren Menge bis 20 min ansteigt, um bis 60 min nahezu konstant zu bleiben.

Die Hydroxylgruppen in Dihydrodiolen von PAKs sind aufgrund der Stereoselektivität der enzymatischen Hydrolyse der Arenoxide immer *trans*-ständig angeordnet und besitzen entweder *R,R*- oder *S,S*-Konfiguration (Yang, 1988). Zu diesen Metaboliten gehören das *trans*-3,4-Dihydrodiol und das *trans, trans*-3,4,11,12-Bisdihydrodiol. Zur Untersuchung der Stereoselektivität des mikrosomalen Metabolismus von BghiP wurden die Enantiomere dieser Metaboliten chromatographisch getrennt.

Das 3,4-Dihydrodiol konnte einerseits im underivatisierten Zustand an chiralen stationären Phasen (Funk *et al.*, 1994) in seine Enantiomere getrennt werden und andererseits nach Überführung mit α -(-)-Menthoxycarbonsäurechlorid in die diastereomeren Ester an Kieselgel (Schollmeier *et al.*, 1986). Das Verhältnis der beiden Enantiomere betrug bei beiden Methoden 75:25.

Im Falle der α -Menthoxyacetate der *trans*-Dihydrodirole von PAKs, die bisher untersucht worden sind [Benz[*a*]anthracen (Yagi *et al.*, 1982; Vyas *et al.*, 1983), Benzo[*c*]phenanthren (Yagi *et al.*, 1983; Balani *et al.*, 1986), Benzo[*a*]pyren (Kedzierski *et al.*, 1981), Dibenz[*a,h*]anthracen (Schollmeier *et al.*, 1986)] zeigte sich, dass das Diastereomer, das auf der Kieselgelsäule zuerst eluiert, stets *R,R*-Konfiguration besaß. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass das zuerst eluierende Diastereomer des *trans*-3,4-Dihydrodiols das *R,R*-Enantiomer dieses Moleküls repräsentiert. Aus dem Verhältnis von *R,R*-Enantiomer (75%) und *S,S*-Enantiomer (25%) errechnet sich mit der Formel

$$\% ee = \frac{([E_1] - [E_2])}{([E_1] + [E_2])} \cdot 100 \text{ mit } E_1 = 75 \text{ und } E_2 = 25$$

ein enantiomerer Überschuss, ee, des *R,R*-Enantiomers von 50%, während die anderen 50% als Racemat aus gleichen Teilen *R,R*-Enantiomer und *S,S*-Enantiomer vorliegen. Dieses Ergebnis gleicht bezüglich der stereoselektiven Bildung von K-Region *trans*-Dihydrodiolen dem anderer PAKs (Chiu *et al.*, 1983; Platt & Reischmann, 1987; Thakker *et al.*, 1985; Mushtaq *et al.*, 1989).

Von dem 3,4,11,12-Bisdihydrodiol M1 und M2 sind vier verschiedene stereoisomere Formen A-D vorstellbar, d.h. die *R,R,R,R*, *S,S,S,S*, *S,S,R,R* und *R,R,S,S* konfigurierten Isomere (Abb. 4.3).

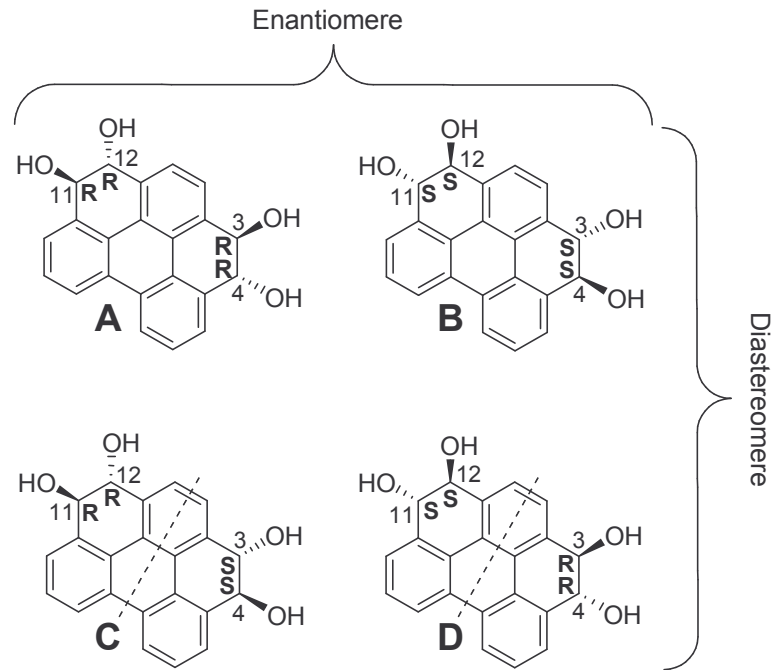


Abbildung 4.3: Stereoisomere des *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrahydroxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylens
A: 3*R*,4*R*,11*R*,12*R*
B: 3*S*,4*S*,11*S*,12*S*
C: 3*S*,4*S*,11*R*,12*R*
D: 3*R*,4*R*,11*S*,12*S*
 gestrichelte Linie, Symmetrieebene der Verbindungen C und D

Diese Gruppe von Stereoisomeren besteht aus zwei Enantiomerenpaaren (A/B, C/D) und zwei Diastereomerenpaaren (A/C, B/D). Da durch die Molekülsymmetrie die 3,4-Position äquivalent zur 11,12-Position ist, sind die 3*S*,4*S*,11*R*,12*R* und 3*R*,4*R*,11*S*,12*S* konfigurierten Isomere identisch und repräsentieren die optisch inaktive *meso*-Form (C = D, Abb.4.3). Das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol wird durch Umkehrphasen-HPLC in zwei direkt benachbarte Peaks M1 und M2 getrennt (Abschn. 3.4.1.1, Abb. 3.23). Einer der Peaks sollte also das Enantiomerenpaar (A/B) und der andere die *meso*-Form C enthalten. Dies ist auch bei dem symmetrischen *trans*, *trans*-3,4,9,10-Tetrahydroxy-3,4,9,10-tetrahydrobenzo[rsf]pentaphen beschrieben (Zhang *et al.*, 2000). Die chromatographische Trennung der Stereoisomere des Bisdihydrodiols gelang an einer Kieselgelphase nach vorangehender Derivatisierung mit α -(-)-Menthoxyessigsäurechlorid. Das Tetrakismenthoxyacetat von Metabolit M1 wurde in zwei Peaks getrennt (Abschn. 3.4.1.1.1, Abb. 3.40 A), die das *R,R,R,R* und *S,S,S,S* Enantiomer repräsentieren, während bei dem Tetrakismenthoxyacetat von Metabolit M2 keine Trennung beobachtet wurde (Abschn. 3.4.1.1.1, Abb. 3.40 B), so dass es sich bei M2 um die *meso*-Form handelt. Das Verhältnis der Enantiomere von M1 betrug 98:2, was einem enantiomeren Überschuss von 96% entspricht. Analog der Stereoselektivität bei der Bildung des 3,4-Dihydrodiols M8 besitzt das vorwiegend gebildete Enantiomer von M1 *R,R,R,R*-Konfiguration.

Arenoxide von PAKs liegen ebenfalls als Stereoisomere vor, die durch chirale stationäre Phasen in die Enantiomere (*R,S* bzw. *S,R*) getrennt werden können (Weems *et al.*, 1985).

Doch aufgrund der geringen Stabilität des 3,4-Oxides M14a, konnten keine Versuche zur Trennung der *3R,4S* und *3S,4R* konfigurierten Isomere durchgeführt werden.

Von anderen PAKs ist jedoch bekannt, dass diese an der K-Region durch Mikrosomen von 3-MC bzw. PB behandelte Ratten stereoselektiv in das *S,R*-konfigurierte Isomer überführt werden [Benz[*a*]anthracen, BaP (Yang *et al.*, 1985; Yang & Chiu, 1985), Chrysen (Weems *et al.*, 1986; Yang & Bao, 1987), 12-Methylbenz[*a*]anthracen (Yang *et al.*, 1987)]. Die mEH hydrolysiert dann enantioselektiv das *S,R*-Arenoxid, indem sie das *S*-konfigurierte C-Atom des Oxiranylrings angreift. Daraus resultiert das *R,R*-konfigurierte *trans*-Dihydrodiol, das besonders bei planaren PAKs gegenüber dem *S,S*-Isomer (entsteht durch Angriff der mEH am *R*-konfigurierten C-Atom) überwiegt (Yang, 1988). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass auch beim BghiP das *3S,4R*-Oxid bevorzugt gebildet wird, aus dem wie oben beschrieben, überwiegend das *trans-3R,4R*-Dihydrodiol hervorgeht.

Im 3,4,11,12-Bisarenoxid können die Epoxidringe in *anti*- oder *syn*-Stellung zueinander stehen. Die resultierenden *anti*- bzw. *syn*-Bisarenoxide bilden ein Diastereomerenpaar. Das *anti*-Bisarenoxid existiert in zwei enantiomeren Formen (A, B), während es sich bei dem *syn*-Bisarenoxid nur um die spiegelsymmetrische *meso*-Form C handelt. An Umkehrphasen wird das Bisarenoxid in zwei eng benachbarte Peaks im Verhältnis 33:66 getrennt. In einem der Peaks sollte sich folglich die Enantiomere des *anti*-Diastereomers und in dem anderen das *syn*-Diastereomer befinden (Abb. 4.4).

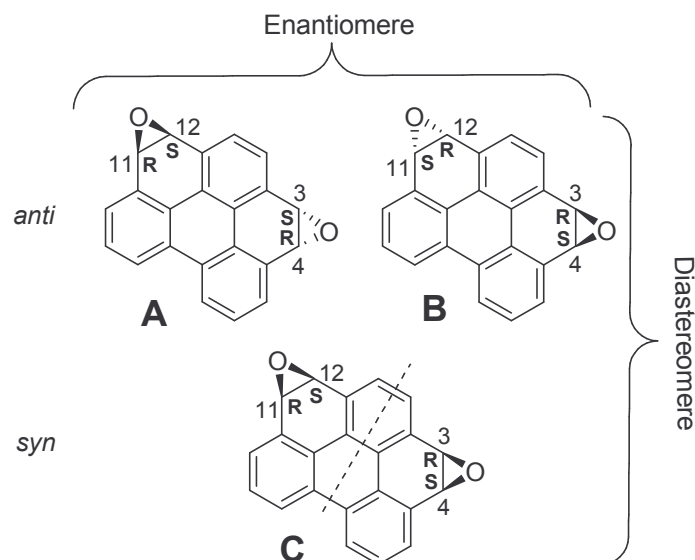


Abbildung 4.4: Stereoisomere des 3,4,11,12-Bisarenoxides von Benzo[*gh*]perylen

A: 3*S*,4*R*,11*R*,12*S*

B: 3*R*,4*S*,11*S*,12*R*

C: 3*R*,4*S*,11*R*,12*S* (=3*S*,4*R*,11*S*,12*R*)

gestrichelte Linie, Symmetrieebene der Verbindung C.

Aufgrund vorhergehender Überlegungen sollte auch hier die 3*S*,4*R*,11*S*,12*R*-Konfiguration und damit *syn*-Stellung der beiden Oxiranringe des Bisarenoxides bevorzugt sein.

Erfolgt der Angriff der mEH nur am *S*-konfigurierten C-Atom des Oxiranringes, sollte aus allen drei möglichen Stereoisomeren ausschließlich das *R,R,R,R*-konfigurierte Bisdihydrodiol resultieren. Dies wird durch die 98%ige Bildung des 3*R*,4*R*,11*R*,12*R*-Bisdihydrodiols des BghiPs untermauert. Findet der Angriff der mEH dagegen am *R*-konfigurierten C-Atom statt, resultiert die *S*-Konfiguration der *trans*-Dihydrodiol-Gruppe. Diese Reaktion erfolgt zum kleinen Teil an einer der beiden K-Regionen, woraus die *meso*-Form hervorgeht und zu einem verschwindend geringen Teil an beiden K-Regionen, was an der nur 2%igen Bildung des *S,S,S,S*-konfigurierten Bisdihydrodiols deutlich wird.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zum Teil die Vorhersagen von Noor Mohammed (1986), dass BghiP durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen an der 3,4- und 11,12-Position, d.h. an beiden K-Regionen, angegriffen wird. Die Bildung eines Metaboliten durch Angriff an der 1,2-Position kann jedoch nicht bestätigt werden. Ebenso kann die Bildung eines Dihydrodiolepoxids an dem *peri* fusionierten Benzoring (5,6,7,7*a*-Position), die von Hughes & Phillips (1993) postuliert wurde, ausgeschlossen werden.

Die wichtige Bedeutung der Arenoxide in der Bioaktivierung von PAKs wurde schon vor mehr als 30 Jahren erkannt (Sims & Grover, 1974; Jerina & Daly, 1974). Von allen PAKs, die bis jetzt untersucht wurden, konnten im Falle von Phenanthren (Grover *et al.*, 1971, 1972), Pyren (Grover *et al.*, 1972) und Anthanthren (Platt *et al.*, 2002) K-Region-Epoxide als mikrosomale Metaboliten detektiert und bei Chrysen (Yang & Bao, 1974), Benzo[*a*]pyren (Selkirk *et al.*, 1975) und Dibenz[*a,h*]anthracen (Selkirk *et al.*, 1971; Platt & Reischmann, 1987; Mush-taq *et al.*, 1989) isoliert werden.

Im Falle der Bisarenoxide von PAKs gibt es in der Literatur einige Vorschriften zur Synthese an den K-Regionen [Pyren-1,2,6,7-Bisepoxid (Moriarty *et al.*, 1975), Benzo[*a*]pyren-4,5,11,12-Bisepoxid (Agarwal & Van Duuren, 1977)] bzw. auch an anderen Positionen [Benzo[*g*]chrysen, Benz[*a*]anthracen, Chrysen, Benzo[*c*]phenanthren (Agarwal *et al.*, 1985, 1990). Die Isolierung des 3,4,11,12-Bisarenoxides von BghiP in dieser Arbeit ist das erste Beispiel für ein Bisarenoxid als mikrosomaler Metabolit eines PAKs.

Die Hydrolyse der Bisarenoxide durch die mEH führt zu Bisdihydrodiolen. In der Literatur existieren einige wenige Berichte zur möglichen Entstehung von Bisdihydrodiolen von PAKs über die entsprechenden postulierten Bisarenoxide [Pyrene-1,2,6,7-Bisdihydrodiol (Jacob *et al.*, 1982), Benzo[*e*]pyren-4,5,9,10-Bisdihydrodiol, (Jacob *et al.*, 1983), Dibenz[*a,e*]fluoranthren-3,4,12,13-Bisdihydrodiol (Saguem *et al.*, 1983, Perin-Roussel *et al.*, 1987), Dibenz[*a,h*]anthracen-3,4,10,11-Bisdihydrodiol (Platt & Reischmann, 1987, Lecoq *et al.*, 1991), Dibenz[*a,c*]anthracen-3,4,12,13-bzw.-1,2,12,13-Bisdihydrodiol, Dibenz[*a,j*]antra-

cen-3,4,8,9-Bisdihydrodiol (Lecoq *et al.*, 1991), Dibenzo[*a,h*]pyren-1,2,8,9-Bisdihydrodiol (Marsch *et al.*, 1992)].

Zur enzymatischen Bildung eines Bisdihydrodiols aus einem Dihydrodiol sind ebenfalls mehrere Beispiele in der Literatur zu finden: Benzo[*e*]pyren-*trans*-9,10-Dihydrodiol wird umgesetzt zum 4,5,9,10-Bisdihydrodiol (Wood *et al.*, 1979), aus dem *trans*-3,4-Dihydrodiol von Benz[*a*]anthracen entstehen das 3,4,5,6-, 3,4,8,9- und 3,4,10,11-Bisdihydrodiol (Thakker *et al.*, 1982), das *trans*-1,2-Dihydrodiol des gleichen PAKs reagiert zum 1,2,5,6-, 1,2,8,9- und 1,2,10,11-Bisdihydrodiol (Vyas *et al.*, 1983), das *trans*-3,4-Dihydrodiol von Benzo[*c*]phenanthren wird umgesetzt zum 3,4,9,10- und 3,4,7,8-Bisdihydrodiol (Thakker *et al.*, 1986), aus *trans*-3,4-Dihydrodiol von Dibenz[*a,h*]anthracen entsteht das 3,4,8,9-, 3,4,10,11- und 3,4,12,13-Bisdihydrodiol (Platt & Schollmeier, 1994), das *trans*-8,9-Dihydrodiol von Dibenz[*a,l*]pyren reagiert zum 8,9,11,12- und 8,9,13,14-Bisdihydrodiol (Nesnow *et al.*, 1998) und das *trans*-4,5-Dihydrodiol von Benzo[*a*]pyren wird umgesetzt zum 4,5,9,10-, 4,5,7,8- und 1,2,4,5-Bisdihydrodiol (Padgett *et al.*, 2000).

4.3 Einfluss von Induktionsstatus, Enzymhemmung und Inkubationszeit auf den qualitativen und quantitativen Metabolismus von Benzo[*ghi*]perylen und der Vergleichssubstanz Anthanthren

Nach Tritiierung von BghiP gelang es, durch eine Kombination von Inkubationen mit radioaktiv und nicht-radioaktiv markiertem Kohlenwasserstoff, die mikrosomale Umsetzung von BghiP quantitativ zu bestimmen. Dieser hängt ab vom Induktionsstatus, der Enzymhemmung sowie der Inkubationszeit.

Verschiedene Induktoren (PB, 3-MC, Aroclor 1254) beeinflussen gezielt die Zusammensetzung der Isoenzyme der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen, die in der Lage sind, BghiP qualitativ und quantitativ unterschiedlich zu metabolisieren.

Die Art und das Ausmaß der Induktion werden durch Ermittlung des Proteingehaltes und der Aktivität der 7-Ethoxy- sowie 7-Pentoxyresorufin-O-Dealkylase bestimmt. Die PROD-Aktivität wurde von PB erwartungsgemäß um das 115-fache gesteigert, dies entspricht den Ergebnissen von Lubet *et al.*, 1985, die eine 95-140-fache Steigerung beschrieben. Die EROD-Aktivität, die charakteristisch für die CYP-Isoenzyme der 1A-Subfamilie ist, stieg nur schwach an. Durch 3-MC war eine Steigerung der EROD-Aktivität um das 300-fache zu beobachten, die den Wert von Burke *et al.* (1985) mit nur 51-fach bei weitem übertrifft. Die nur 3-fache Erhöhung der PROD-Aktivität stimmt mit dem Ergebnis von Lubet *et al.* (1985) überein (2-fach). Aroclor 1254 bewirkte eine Steigerung um das 800-fache, auch dieser Wert ist verglichen mit dem von Burke *et al.*, (1985) mit 61 um ein Vielfaches höher. Die Erhöhung

der PROD-Aktivität um das 72-fache stimmt wiederum mit dem von Lubet *et al.*, (1985) überein. Es ist außerdem problematisch diese Ergebnisse mit denen der Literatur zu vergleichen, da die sehr geringe basale Aktivität nicht mehr sicher gemessen werden kann und somit große Schwankungen auftreten können. Außerdem differieren die Meßwerte je nach verwendeten Puffer-Typ, Resorufin-Charge, Substratkonzentration und Fluorimeter (Rutten *et al.*, 1992).

Die Relationen der Enzymaktivitäten der Induktoren untereinander sind mit denen der Literatur jedoch sehr ähnlich. PB, das die Enzyme der CYP 2B-Familie induziert (Ioannides & Parke, 1990; Koymans *et al.*, 1993), bewirkte folglich die stärkste Zunahme der PROD-Aktivität. 3-MC bewirkt eine Induktion der CYP-Isoenzyme der 1A-Familie (Guengerich & Shimada, 1991; Ioannides & Parke, 1993), was sich durch die hohe EROD-Aktivität bestätigt hat. Aroclor 1254 schließlich bewirkte die stärkste Erhöhung der EROD-Aktivität und hinter PB der PROD-Aktivität, da dieses Gemisch polychlorierter Biphenyle die induzierenden Eigenschaften von PB und 3-MC vereint (Ryan *et al.*, 1979, 1982, 1984).

Die Ergebnisse der Enzymaktivitäten der verschiedenen induzierten Mikrosomen spiegeln sich im qualitativen und quantitativen Umsatz von BghiP wider: dieser war durch Aroclor 1254 nur geringfügig höher als bei 3-MC (Abb. 4.5), so dass kein signifikanter Unterschied bestand. Da der Umsatz verglichen mit dem von Dibenz[*a,h*]anthracen (Platt & Reischmann, 1987) nur halb so groß ist, gehört BghiP zu den PAK, die keine guten Substrate für Monooxygenasen der P450 1A Subfamilie sind.

Durch die von Aroclor 1254 und 3-MC induzierten Cytochrom P450 Isoenzyme ist der Biotransformationsweg II bevorzugt und es bildeten sich fast doppelt so viel K-Region-Metaboliten (36,7% bzw. 23,7%) als die über den Biotransformationsweg I gebildeten nicht-K-Region Metaboliten (26,5% bzw. 14,1%; Phenole, Chinone; Abb. 4.5).

Der durch PB hervorgerufenen Enzymstatus bewirkte einen sehr schwachen Umsatz von BghiP.

Eine Ursache könnte die relativ schwache Induktion der Cytochrom P450 2B-Subfamilie sein, die BghiP offensichtlich schlecht umsetzen. Dies wird auch bei 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (Yang *et al.*, 1978), Triphenylen (Thakker *et al.*, 1988) Chrysen und Phenanthren (Nordqvist *et al.*, 1981) beobachtet.

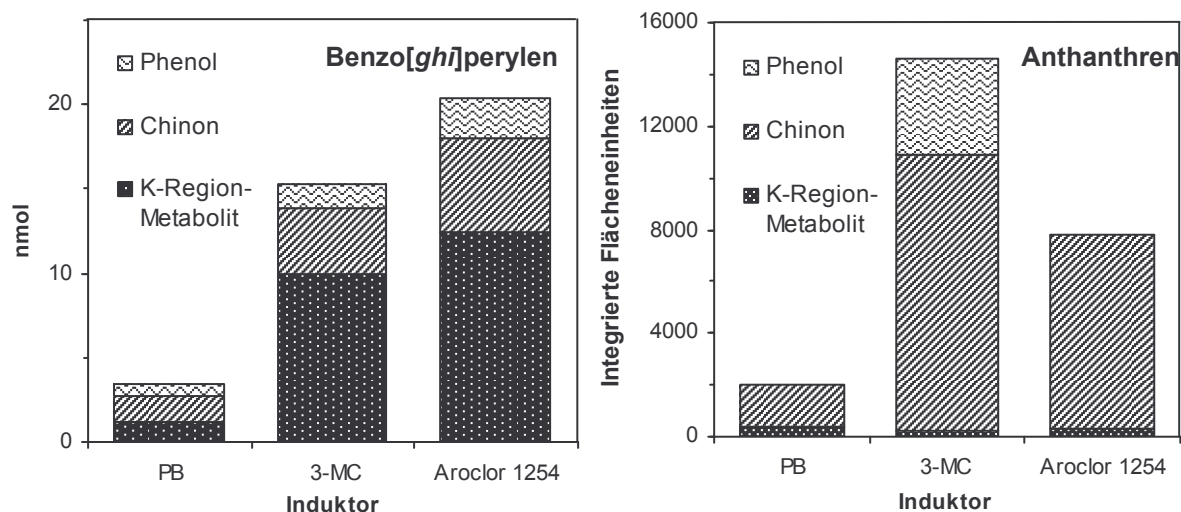


Abbildung 4.5: Verhältnis der Metabolisierungswege in Abhängigkeit von der Induktionsform der zur Umsetzung von Benzo[ghi]perylen bzw. Anthanthren verwendeten Lebermikrosomen. Bedingungen: 80 μ M PAK, 2mg Protein/2ml Inkubationsvolumen, 40 min
PB, Phenobarbital; 3-MC, 3-Methylcholanthren

Nach Behandlung mit Phenobarbital war neben dem stark verringerten Umsatz auch eine deutliche Veränderung des Metabolitenprofils (Abb. 4.5; Abschn. 3.5.1, Abb. 3.52) festzustellen.

Die Cytochrom P-450 Isoenzyme der 2B-Subfamilie greifen bevorzugt die elektronenreiche K-Region von PAKs an (Wilson *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1989), so daß bei BghiP die Bildung des 3,4-Dihydrodiols bzw. der 3,4,11,12-Bisdihydrodiol zunehmen sollte. Stattdessen war die Menge dieser Metaboliten erheblich vermindert und die der nicht-K-Region-Metaboliten aus Biotransformationsweg I erhöht. Dies betraf besonders das 7,10-Chinon (M14) und den normalerweise nur in Spuren vorkommenden phenolischen Metaboliten M15.

Es ist nun naheliegend, dass es sich bei M15 um das 10-Phenol[‡] handelt, als Vorläufer zu dem ebenfalls in auffallend großer Menge gebildeten 7,10-Chinon^{*}. Damit würde sich der Biotransformationsweg I teilen, da die primäre Hydroxylierung an zwei verschiedenen Positionen (C-7- und/oder C-10) stattfinden kann. Daraus resultiert das 7-Phenol und/oder 10-Phenol^{*}, die enzymatisch zu den entsprechenden Folgeprodukten (7,8- bzw. 7,10-Phenol^{*}) und den mehrkernigen Chinonen umgesetzt werden.

Ein Grund für die stark verringerte Bildung des K-Region-Derivats 3,4,11,12-Bisdihydrodiol könnte eine geringere Affinität der Isoenzyme der Cytochrom P-450 Subfamilie 2B zum 3,4-Dihydrodiol sein, das dann nur noch schwach weitermetabolisiert wird. Eine deutliche Zunahme der Metaboliten mit phenolischen Gruppen wird auch bei anderen PAKs nach Induk-

[‡] Die korrekte chemische Bezeichnung nach der IUPAC-Nomenklatur lautet: 5-Hydroxybenzo[ghi]perylen bzw. 5,8-Dihydroxybenzo[ghi]perylen. Aus Verständnisgründen wurde der von 7-Hydroxybenzo[ghi]perylen (7-Phenol) abgeleitete Name verwendet.

tion durch PB beobachtet (Triphenylen, Thakker *et al.*, 1988; Chrysen, Nordqvist *et al.* 1981). Phenole von PAKs können außerdem den metabolischen Umsatz verringern, da sie die Aktivität von Cytochrom P450 hemmen (Fahl *et al.*, 1978; Thakker *et al.*, 1979; Shen *et al.*, 1979; Vyas *et al.*, 1982; Thakker *et al.*, 1988).

Bei Anthanthren hingegen traten qualitative Unterschiede hinsichtlich des Metabolitenprofils zwischen Aroclor 1254 und 3-MC auf (Abb. 4.5). 3-MC bewirkte eine deutlich verstärkte Bildung des Metaboliten A3 (einem Chinon) und besonders der Phenole, die bei den Induktoren Aroclor 1254 und Phenobarbital stets unter der Nachweisgrenze lagen. Das verstärkte Auftreten von phenolischen Metaboliten wird auch beim Metabolismus von BaP mit Mikrosomen von 3-MC behandelten Ratten beschrieben (Estabrook *et al.*, 1978).

Auffällig ist, dass bei BghiP im Vergleich zu Anthanthren nach Umsatz mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 bzw. 3-MC die Entstehung der K-Region-Metaboliten deutlich überwiegt. Anthanthren hingegen reagiert bevorzugt zu Nicht-K-Region-Metaboliten mit chinoider bzw. phenolischer Struktur. Cytochrom P450 scheint also Anthanthren nur schlecht an der K-Region umzusetzen. Dies widerspricht allerdings der von Jerina (1982) vorgeschlagenen hypothetischen Struktur und Minimalfläche des katalytischen Zentrums vom Cytochrom P450-Isoenzym 1A1. Das Anthanthrenmolekül würde ähnlich wie BaP die Bedingungen für dieses Modell erfüllen und sollte daher ähnlich gut umgesetzt werden.

Anthanthren besitzt ein sehr niedriges Ionisationspotential (6,96 eV, Cavalierie & Rogan, 1995a) was eine Einelektronenoxidation und damit die Bildung von Chinonen begünstigt. Dies konnte von Degenhardt (1997) bestätigt werden, der eine größere Menge der Chinone im Vergleich zu den K-Region-Metaboliten fand.

Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei der zeitabhängigen Biotransformation von Anthanthren mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 unabhängig von der Anwesenheit von TCPO gezeigt werden (Abschn. 3.3.3, Abb. 3.22). Während die Metaboliten mit chinoider Struktur (A2, A3, 1,6- und 3,6-Chinon) bis 40 min deutlich zunehmen, ist während dieses Zeitraumes nur eine schwache Zunahme des 4,5-Dihydrodioles bzw. 4,5-Epoxides zu verzeichnen.

Untersuchungen von Flesher *et al.*, 1983 deuten auf eine cytosolische Methyltransferase hin, die mit S-Adenosylmethionin als Kofaktor in der Lage ist, die elektronenreiche L-Region von PAKs zu methylieren. So ließen sich bei BaP und Benz[a]anthracen an der 6- bzw. 7-Position methylierte Produkte nachweisen (Flesher *et al.*, 1990). Die methylierten Aromaten können dann durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen in Hydroxymethylverbindungen überführt werden. In Anbetracht der von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführten Untersuchungen zur metabolischen Konjugation von benzyllischen Alkoholen der PAK zu reaktiven Sulfateestern (Watabe *et al.*, 1986; Surh *et al.*, 1989; Ogura *et al.*, 1990) und zur Bindung von 6-Methylbenzo[a]pyren an die DNA nach Einelektronenoxidation (Todorovic *et*

al., 1993; Lehner *et al.*, 2004) stellt die metabolische Aktivierung auch im Fall des Anthanthrens einen wichtigen möglichen Schritt zur Aktivierung des Mutterkohlenwasserstoffes zu gentoxischen Produkten dar.

Sehr bemerkenswert ist das nach Induktion mit Aroclor 1254 oder Phenobarbital auftretende 6-Methylanthanthren. Es wurde in sehr geringen, aber eindeutig nachweisbaren Mengen gebildet und war in Kontrollinkubationen ohne metabolisierendes System nicht detektierbar. Unklar ist der mögliche Mechanismus der Entstehung des 6-Methylanthanthrens mit reinem mikrosomalen Protein, in dem weder cytosolische Methyltransferase noch der Kofaktor S-Adenosylmethionin nachweisbar sind.

Um diesen Sachverhalt zu klären, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die die Entstehung des 6-Methylanthanthrens endgültig absichern. Als metabolisierendes System sollte Cytosol, mit dem Kofaktor S-Adenosylmethionin eingesetzt werden, da hierbei wie oben erwähnt optimale Bedingungen für eine Bildung des methylierten Metaboliten herrschen. In der Arbeit von Degenhardt (1997) konnte allerdings mit diesem Inkubationssystem kein 6-Methylanthanthren nachgewiesen werden, dies gelang dort jedoch auch nicht bei den Positivkontrollen BaP bzw. Benz[a]anthracen.

Phenobarbital verursachte bei Anthanthren durch die Induktion der Cytochrom P450 2B Subfamilie eine Zunahme der K-Region-Metaboliten 4,5-Dihydrodiol und 4,5-Oxid. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da es auch von Degenhardt (1997) und bei anderen PAKs beschrieben wurde (Nordqvist *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1989).

Nach Hemmung der mEH mit TCPO wurde der Umsatz von BghiP mit Mikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 um fast 33% gehemmt. Dies beruht besonders auf der geringen Bildungsrate der K-Region Metaboliten (14%), während die quantitative Entstehung der an Position 7 und 8 substituierten Metaboliten kaum abnimmt. Dieses unerwartete Ergebnis könnte durch die folgenden Feststellungen erklärt werden:

1. Der Angriff an der K-Region von PAKs wird in der Rattenleber vorwiegend durch die Monooxygenase der Subfamilie 2B katalysiert (Wilson *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1989).
2. Aroclor 1254 induziert in der Rattenleber neben P450 1A, wie 3-MC, auch P450 2B (Thomas *et al.*, 1983).
3. Die TCPO-Konzentration von 1 mM, die in dieser Arbeit verwendet wurde, hemmt nicht nur die mEH (Oesch *et al.*, 1973), sondern auch Monooxygenasen der P450 2B-Subfamilie, während die Aktivität von P450 1A unverändert bleibt (Shimada & Sato, 1979; Ivanetich *et al.*, 1982).

Diese Argumente werden jedoch durch die Beobachtung abgeschwächt, dass der enzymatische Angriff an der K-Region (Weg II) bei Aroclor 1254 im Gegensatz zu 3-MC nicht bevorzugt ist. Vorstellbar wäre auch, dass die verstärkte Bildung der phenolischen Metaboliten durch den Biotransformationsweg I zur Hemmung der Aktivität der Cytochrom P450-

abhängigen Monoxygenasen führen (s.o.), was einen schwächeren Umsatz von BghiP zur Folge haben kann.

4.4 Gentoxizität von Benzo[ghi]perylen und seiner Metaboliten

In einem Vorversuch wurde zunächst ein Überblick über die Mutagenität des Metabolitengemisches von BghiP erhalten. Dazu wurden einzelne HPLC-Fractionen eines Inkubationsextraktes in Anwesenheit eines metabolisierenden Systems auf bakterielle Mutagenität untersucht. Als Positivkontrolle diente Benzo[a]pyren, dessen Metabolitenfraktionen fast alle eine hohe mutagene Aktivität im Stamm TA100 von *S. typhimurium* zeigen. Die das BaP-7,8-Dihydrodiol enthaltende Fraktion besaß neben BaP die höchste Mutagenität, was auf die Umsetzung zum hochmutagenen BaP-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxid (Jerina *et al.*, 1986) zurückzuführen ist. Ebenso war eine Erhöhung der mutagenen Aktivität der das 3- bzw. 7-Phenol enthaltene Fraktionen zu beobachten (Wislocki *et al.*, 1976).

Diese Ergebnisse zeigten, dass diese Methode geeignet ist und auch bei BghiP angewendet werden konnte. Eine deutliche Erhöhung der bakteriellen Mutagenität war nur in der BghiP enthaltenden Fraktion festzustellen und eine leichte Zunahme in den Fraktionen mit dem 3,4-Dihydrodiol und dem 7-Phenol. Deren spezifische Mutagenität sowie die des Hauptmetaboliten 3,4,11,12-Bisdihydrodiols wurde nach ihrer chromatographischen Isolierung bestimmt. Diese Untersuchungen machten deutlich, dass beide Biotransformationswege I und II von BghiP zur bakteriellen Mutagenität beitragen. Das 7-Phenol, das im Biotransformationsweg I entsteht, ist ein proximales Mutagen, was auch von Phenolen anderer PAKs bekannt ist (BaP, Owens *et al.*, 1979; Anthanthren, Platt *et al.*, 2002). Das 3,4,11,12-Bisdihydrodiol, das im Biotransformationsweg II gebildet wird, ist ein Inaktivierungsprodukt, im Gegensatz zu anderen PAKs, bei denen Bisdihydrodiol Vorläufer für ultimal mutagene Metaboliten sein können (z.B. Dibenz[a,h]anthracen, Carmichael *et al.*, 1993). Das 3,4-Dihydrodiol wird so schwach zu Mutagenen aktiviert, dass das vermutlich gebildete 3,4-Dihydrodiol-11,12-oxid keine große Bedeutung als ultimales Mutagen von BghiP hat.

Die einzigen isolierbaren und ausreichend stabilen Metaboliten von BghiP, die bakterielle Mutagenität ohne metabolische Aktivierung entfalten, sind die 3,4,11,12-Bisoxide M7a und M7b. Diese Metaboliten sind ultimale Mutagene von BghiP. Doch da die gentoxische Aktivität des 3,4,11,12-Bisoxides recht gering ist, kann sie den starken Anstieg der bakteriellen Mutagenität von BghiP nach Hemmung der mEH kaum erklären.

Die Untersuchung der bakteriellen Mutagenität des synthetischen 3,4-Oxides ergab ein anderes Bild: im Stamm TA98 von *S. typhimurium* war die bakterielle Mutagenität des 3,4-Oxides fast fünfmal höher als die des 3,4,11,12-Bisoxides. Durch Verwendung postmitochondrialer hepatischer Fraktion, nach Hemmung der mEH, konnte die bakterielle Mutagenität

tät im Stamm TA98 um das 5-fache gesteigert werden. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich auf die Stabilisierung des 3,4-Oxides durch die Proteine und Lipide in der postmitochondrialen Fraktion zurückzuführen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch von Buonarati & Felton beobachtet (1990), die die Mutagenität des *N*-Hydroxyderivates von 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin durch Zugabe von mikrosomalem Protein und Rinderserumalbumin in TA98 deutlich erhöhen konnten.

Die hohe mutagene Aktivität des Arenoxides im Stamm TA98 deutet einerseits darauf hin, dass diese Substanz wie das BaP-4,5-Oxid (Wood *et al.*, 1976, Wislocki *et al.*, 1976) durch Rasterverschiebungen gentoxisch wirkt. Andererseits war im Stamm TA100 die bakterielle Mutagenität unter vergleichbaren Bedingungen wie im Stamm TA98 doppelt so hoch, so dass das 3,4-Arenoxid sehr wahrscheinlich wie das K-Region-Oxid Dibenz[*a,h*]anthracen (Glatt *et al.*, 1975; Platt *et al.*, 1982; Platt, 1986) verstärkt Basenpaarsubstitutionen verursacht.

Von BaP ist außerdem bekannt, dass die Enantiomere des 4,5-Oxides unterschiedlich starke mutagene Eigenschaften besitzen (Chang *et al.*, 1979). So ist die bakterielle Mutagenität des (-)-4,5-Oxids von BaP in den Stämmen TA98 und TA100 höher als die des (+)-4,5-Oxides. In V79-Zellen hingegen zeigen die separaten Enantiomere keinen ausgeprägten mutagenen Effekt, während eine äquimolaren Mischung einen deutlichen Anstieg der mutagenen Aktivität bewirkt. Dieser offensichtlich synergistische Mechanismus ist noch ungeklärt.

Inwiefern diese Eigenschaft auch auf die Enantiomere des 3,4-Oxids von BghiP zutrifft, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Auffällig ist, dass die Dosis-Wirkungskurve stets den steilsten Anstieg im niedrigen Dosisbereich zeigt, um dann bei höheren Substanzmengen in ein Plateau überzugehen. Dies wurde auch bei dem Dibenz[*a,h*]anthracen-5,6-oxid beobachtet (Platt, 1986). Folgende Gründe könnten hierfür verantwortlich sein:

1. Höhere Konzentrationen einer mutagenen Substanz können cytotoxisch wirken und zu einem Absterben der Zellen führen (Wood *et al.*, 1975).
2. Durch die leichte Isomerisierung der Arenoxide zu dem Phenol kann keine höhere gentoxische Aktivität erzielt werden. (Wood *et al.*, 1975; Glatt *et al.*, 1994)
3. Durch kovalente Bindung von Arenoxiden an Proteine oder Lipide der postmitochondrialen hepatischen Fraktion kann ein gewisser Teil der Reaktion mit der bakteriellen DNA entzogen werden. Kuroki *et al.* (1972) konnte die Bindung von K-Region-Oxiden des Benz[*a*]anthracens und des Dibenz[*a,h*]anthracens an Proteine zeigen. Somit haben Proteine nicht nur einen schützenden, sondern auf die mutagenen Aktivität hemmenden Effekt
4. Schlechte Löslichkeit des Arenoxides (Glatt *et al.*, 1985). Dadurch steigt die Mutagenität nur bis zur Sättigungsgrenze des Oxides.

5. Schwächere intrinsische Aktivität des 3,4-Oxides von BghiP gegenüber der des 4,5-Oxides von BaP.

Da Mutagenität hauptsächlich durch DNA-Bindung der genotoxischen Substanz ausgelöst wird, wurde diese mit der Methode des ^{32}P -Postlabelings des mikrosomal aktivierten BghiPs untersucht. Nach Inkubation von BghiP mit Kalbsthymus-DNA (Durchführung der Untersuchung von Dr. Fickler, Institut für Toxikologie, Mainz) resultierten drei DNA-Addukte. Das unpolare Addukt Nr. I war das Hauptaddukt, das in Gegenwart von TCPO um 29% verstärkt wurde. Auf die schwächeren Addukte II und III hatte TCPO dagegen keinen Einfluss, was das Auftreten von Arenoxiden bei ihrer Entstehung ausschließt. In der Literatur dagegen wurden in Abwesenheit von TCPO von einem prominenten und einem zweiten, polarerem jedoch wesentlich schwächeren Fleck berichtet (Reddy *et al.*, 1984; Randerath *et al.*, 1985; Segerbäck & Vodicka, 1993; Hughes & Phillips, 1993). Hughes *et al.* (1993) berichten von einem Hauptaddukt des BghiP, das sowohl *in vitro* (nach Aktivierung durch Lebermikrosomen aus Ratten nach Behandlung mit 3-MC) als auch *in vivo* (Mäusehaut) gefunden wurde. Die Zunahme von Addukt Nr. I in Anwesenheit von TCPO wurde von Hughes & Phillips (1993) nicht beobachtet. Sie berichten sogar von einer Abnahme um ca. 20% und schliessen daraus, dass kein einfaches Epoxid für die DNA-Bindung verantwortlich sein kann. Die Ergebnisse von Fickler (2004) deuten jedoch mit hoher Sicherheit auf Arenoxide als DNA-bindende Metaboliten hin. Nach Inkubation des 3,4-Oxides ohne ein aktivierendes System mit Kalbsthymus-DNA wurden fünf Addukte beobachtet, von denen Nr. I das Hauptaddukt war. Unter denselben Bedingungen wurden beim 3,4,11,12-Bisoxid zwei schwache, polare Addukte detektiert. Nach Mischchromatographie zeigte die additive Zusammensetzung der DNA-Addukte, dass das unpolare Hauptaddukt Nr. I von BghiP durch kovalente Bindung des BghiP-3,4-Oxides an Basen der Kalbsthymus-DNA entstanden ist. Die polarerem BghiP-Addukte Nr. II und III sind nicht mit den Addukten Nr. IV, V, VI, VII des 3,4-Oxides identisch und können also nicht von diesem Metaboliten abgeleitet werden. Ebenso stimmten nach Mischchromatographie die stark polaren Addukte Nr. VIII und IX des 3,4,11,12-Bisoxides nicht mit den Addukten Nr. II und III des BghiPs überein. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der relativ geringen bakteriellen Mutagenität des 3,4,11,12-Bisoxides. Die zusätzlichen vier DNA-Addukte des 3,4-Oxides könnten durch DNA-Bindung der beiden Enantiomere und/oder durch Interaktion mit verschiedenen DNA-Basen entstehen. Das Fehlen der Addukte IV-VII in mikrosomalen Inkubationen des Mutterkohlenwasserstoffes könnte durch folgende Annahmen erklärt werden: Die gebildeten Mengen dieser Addukte bleiben unter der Nachweisgrenze oder für die Entstehung der Addukte IV-VII ist ein Enantiomer des 3,4-Oxids verantwortlich, das in Inkubationen von BghiP mit der mikrosomalen Leberfraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-MC nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Wie

oben erläutert ist die stereoselektive enzymatische Bildung eines Enantiomers, meist des *S,R*-Arenoxides, bei vielen PAKs bevorzugt (Shou *et al.*, 1996).

Cherng *et al.* (2001) konnte keine durch BghiP erzeugte DNA-Bindung in metabolisch kompetenten HepG2-Zellen nachweisen. Es stellte sich stattdessen heraus, dass Mischungen aus BaP und BghiP zu einer verstärkten DNA-Bindung von BaP führten. Es wird vermutet, dass BghiP von CYP1A1 bevorzugt metabolisiert (Van Gorp & Hankinson, 1983) wird, so dass BaP vermehrt an den *Ah*-Rezeptoren bindet. Dies führt zu einer erhöhten Expression von CYP1A1 und damit zu einem Anstieg der Menge der DNA-Addukte von BaP. Ebenso besitzt BghiP kokarzinogene Aktivität, wenn es in Kombination mit BaP auf die Mäusehaut appliziert wird (Van Duuren *et al.*, 1973, 1976), was im Einklang mit der vorhergehenden Beobachtung steht.

Wie Fickler (2004) zeigen konnte, besitzt BghiP auch nach metabolischer Aktivierung in Säugerzellen (V79-Hamsterfibroblasten) keine Mutagenität. Doch wie nach mikrosomaler Inkubation mit Kalbsthymus-DNA werden auch in V79-Zellen in Anwesenheit der postmitochondrialen Fraktion der Rattenleber drei stabile DNA-Addukte (Nr. I, II und III) detektiert. Das Hauptaddukt Nr. I (BghiP-3,4-Oxid) trat hier ebenfalls sehr dominant auf. Diese scheinbare Diskrepanz zwischen fehlender Mutagenität von BghiP in Säugerzellen und eindeutigen Nachweis der DNA-Bindung in V79-Zellen kann so erklärt werden: Einerseits müssen nicht alle detektierten DNA-Addukte zwangsläufig zu Mutationen führen und andererseits können die durch BghiP erzeugten DNA-Schäden durchaus im Laufe des Mutagenitäts-Tests repariert worden sein. So konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf des HPRT-Tests nach der Isolierung der DNA zu einer 20%igen Reduktion der nachzuweisenden Addukte aufgrund von DNA-Reparaturprozessen kommen kann (MacLeod *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Cellotti *et al.*, 1993).

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Gentoxizität des BghiP durch das 3,4-Oxid hervorgerufen wird. Dies wurde sowohl durch die Untersuchung der bakteriellen Mutagenität als auch der DNA-Bindung (mit Kalbsthymus-DNA und der DNA aus V79-Zellen) gezeigt. Ein ähnliches Resultat wird auch bei Cyclopenta[*cd*]pyren beschrieben, bei dem ebenfalls das 3,4-Oxid für die hohe bakterielle Mutagenität des Mutterkohlenwasserstoffes verantwortlich ist (Eisenstadt & Gold 1978; Beach & Gupta, 1994).

Allerdings muss festgestellt werden, dass die Mutagenität des K-Region 3,4-Oxides von BghiP wesentlich niedriger als die der Bay-Region Dihydrodiolepoide anderer PAKs ist [10 his⁺-Revertanten/nmol BghiP-3,4-Oxid im Stamm TA100 gegenüber 9500 his⁺-Revertanten/nmol BaP-7*R*,8*S*-Dihydrodiol-9*R*,10*S*-Epoxid (Conney, 1982)]. Eine Bay-Region mit einem *ortho*-kondensierten Benzoring scheint also die Voraussetzung für eine hohe gentoxische Wirkung des entsprechenden PAKs zu sein.

Bei BghiP wurden keine Hinweise auf die zentrale Bedeutung alternativer Aktivierungswege zu gentoxischen Metaboliten gefunden. Trotzdem soll die starke Phototoxizität dieses PAK im Stamm TA102 nach UV-Bestrahlung erwähnt werden [11300 Revertanten/nmol (Yan *et al.*, 2004)], die mit der von BaP und Pyren vergleichbar ist. Zurückgeführt werden diese Eigenschaften auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die während oxidativer Prozesse auftreten können (Yu *et al.*, 2002). Diese aggressiven Intermediate können DNA-Strangbrüche verursachen, die zu Mutationen und nachfolgender neoplastischer Entartung der Zelle führen können. Dies zeigt, dass BghiP offensichtlich auch über einen anderen Mechanismus als der enzymatischen Aktivierung eine bemerkenswerte Gentoxizität verursachen kann.

5 Zusammenfassung

Kanzerogene polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), wie Benzo[a]pyren, besitzen eine Bay-Region mit *ortho*-kondensiertem Benzoring. Dadurch ist die enzymatische Bildung von Bay-Region-Dihydrodiolepiden (Oxiranylring in der sterisch abgeschirmten Molekülbucht) möglich, die als ultimale kanzerogene Metaboliten der PAKs gelten. Diese lösen durch DNA-Modifikation Primärläsionen aus, die, sofern sie nicht enzymatisch repariert werden, bei der DNA-Replikation Fehler verursachen (Mutationen). Der Mehrstufenprozeß der Kanzerogenese (Promotion und Progression) führt schließlich zur neoplastischen Entartung der Zelle.

Benzo[ghi]perylen (BghiP) repräsentiert eine Gruppe von PAKs, die keine „klassische“ Bay-Region besitzen und daher keine vicinalen Dihydrodiolepiden bilden können. Trotzdem ist BghiP mutagen, z. B. in den Stämmen TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurium* (1,3- bzw. 4,3 his⁺-Revertanten/nmol) nach metabolischer Aktivierung mit der postmitochondrialen Fraktion von Ratten nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren. Hemmung der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) mit 1,1,1-Trichlor-2-propenoxid (TCPO) steigert die bakterielle Mutagenität von BghiP im Stamm TA98 um das 4-fache, was Arenoxide als ultimale Mutagene wahrscheinlich macht. Dieses Ergebnis wird außerdem durch Untersuchung der DNA-Bindung mit dem Verfahren des ³²P-Postlabelings bestätigt (Dr. Fickler, Institut für Toxikologie, Universität Mainz). Danach bildete mikrosomal aktiviertes BghiP drei Addukte (ein Hauptaddukt, zwei Nebenaddukte), die durch Hemmung der mEH mit TCPO verstärkt wurden (das Hauptaddukt um 29%).

Um den für die bakterielle Mutagenität von BghiP verantwortlichen Metaboliten zu identifizieren, wurde die mikrosomale Biotransformation von BghiP aufgeklärt. Umsetzung von BghiP mit Lebermikrosomen von Ratten nach Behandlung mit Aroclor 1254 lieferte 17 mit Ethylacetat extrahierbare Metaboliten. Zwölf dieser Metaboliten konnten durch eine Kombination von chromatographischen, spektroskopischen und biochemischen Methoden identifiziert werden. Daraus ergeben sich zwei Biotransformationswege: Weg I beginnt mit einem Angriff von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen an Position 7 und der Bildung des 7-Phenols. Dieses wird dann in das 7,8- bzw. 7,10-Diphenol überführt, die schließlich zu den mehrkernigen Chinonen an der 7,8- bzw. 7,10-Position oxidiert werden. Im Biotransformationsweg II werden die K-Regionen von BghiP durch Cytochrom P450 funktionalisiert. Zunächst entstehen das auf indirektem Weg identifizierte 3,4-Oxid und das 3,4,11,12-Bisoxid, die in mikrosomalen Umsetzungen von BghiP nur nach Hemmung der mEH gebildet werden. Enzymatische Hydrolyse des 3,4-Oxides ergibt das *trans*-3,4-Dihydrodiol, das zum 3,4-Chinon oxidiert wird. Ebenso entsteht aus dem 3,4,11,12-Bisoxid das *trans*-3,4-*trans*-11,12-Bisdihydrodiol, aus dem durch Oxidation das *trans*-3,4-Dihydrodiol-11,12-Chinon hervorgeht. Untersuchung

der stereoselektiven enzymatischen Bildung der K-Region-*trans*-Dihydrodirole ergaben eine präferentielle Entstehung der 3*R*,4*R*- bzw. 3*R*,4*R*,11*R*,12*R*-Enantiomere.

Die durch verschiedene Induktoren (Phenobarbital, 3-Methylcholanthren und Aroclor 1254) veränderte Zusammensetzung der Isoenzyme von Cytochrom P-450 hatte einen unterschiedlichen Einfluss auf den Umsatz und das Metabolitenprofil von BghiP. Durch Phenobarbital (Induktor von CYP2B1, 2B2) war der mikrosomale Umsatz sehr gering und Biotransformationsweg I bevorzugt (nicht-K-Region-Metaboliten). Bei 3-Methylcholanthren (Induktor von CYP1A1) und Aroclor 1254 (Induktor von CYP1A1 und CYP2B1, 2B2) war die quantitative und qualitative mikrosomale Umsetzung ähnlich. Neben der deutlichen Zunahme des Umsatzes trat hier der Weg II in den Vordergrund (K-Region-Metaboliten). Im Vergleich mit dem Umsatz anderer PAKs, z. B. Benzo[*a*]pyren ist BghiP allerdings ein schwaches Substrat.

Untersuchungen der bakteriellen Mutagenität der Hauptmetaboliten 3,4-Dihydrodiol und dem 7-Phenol machte deutlich, dass beide Biotransformationswege I und II von BghiP zur bakteriellen Mutagenität beitragen. Das 7-Phenol aus Weg I ist ein proximales Mutagen, was auch von Phenolen anderer PAKs bekannt ist. Das 3,4-Dihydrodiol aus Weg II wird so schwach zu Mutagenen aktiviert, dass dem vermutlich gebildete 3,4-Dihydrodiol-11,12-oxid keine große Bedeutung als ultimates Mutagen von BghiP zukommt. Die Bestimmung der direkten mutagenen Aktivität (ohne metabolische Aktivierung) der mutmaßlich ultimal mutagenen Arenoxide von BghiP ergab, dass die des 3,4,11,12-Bisarenoxides sehr gering war (1,3 his⁺-Revertanten/nmol im Stamm TA98). Das 3,4-Oxid hingegen bewirkte einen deutlichen genotoxischen Effekt in den Stämmen TA98 und TA100 (5,5 bzw. 10 his⁺-Revertanten/nmol). Dies wurde durch die Bestimmung der DNA-Bindung mit dem ³²P-Postlabeling, in dem das 3,4-Oxid für das Hauptaddukt von BghiP verantwortlich gemacht werden konnte, bestätigt. Daher kommt dem 3,4-Oxid als ultimates Mutagen die größte Bedeutung für die Gentoxizität von BghiP zu.

Die metabolische Aktivierung von PAKs durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen zu Bay-Region-Dihydrodirolepoxiden oder zu Arenoxiden ist also eine notwendige Voraussetzung für DNA-Bindung und Mutagenität. Eine wichtige Rolle alternative Aktivierungswege im Metabolismus von BghiP zu genotoxischen Metaboliten kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

6 Literatur

- Adam, W., Curci, R., Edwards, J.O.: Dioxiranes: a new class of powerful oxidants. *Acc. Chem. Res.*, 22, 205-211 1989.
- Agarwal, S.C., and Van Duuren, B.L.: Synthesis of 4,5:11,12-diepoxy-4,5,11,12-tetrahydrobenzo[a]pyrene and related compounds. *J. Org. Chem.* 42, 2730-2734, 1977.
- Agarwal, S.K., Boyd, D.R., and Jennings, W.B.: Synthesis of benzo[g]chrysene, benzo[g]chrysene-9,10-oxide and benzo[g]chrysene-1,2:9,10-dioxide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 857-860, 1985.
- Agarwal, S.K., Boyd, D.R., McGuckin, M.R., Jennings, W.B., and Howarth, O.W.: Synthesis of diarene oxides of benz[a]anthracene, chrysene and benzo[c]phenanthrene. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 3073-3080, 1990.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31, 347-364, 1975.
- Maron, D.M., Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215, 1983.
- Andrews, A.W., Thibault, L.H., Lijinski, W.: The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of some polynuclear hydrocarbons. *Mutation Res.* 51, 311-318, 1978.
- Arey, J., Harger, W.P., Helmig, D., Atkinson, R.: Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts. *Mutation Res.* 281, 67-76, 1992.
- Armstrong, R.N.: Glutathion S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 131-140, 1991.
- Badger, G.M., Donnelly, J.K., Spotswood, T.M.: Formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. XXVII. The pyrolysis of isoprene. *Austr. J. Chem.* 19, 1023-1043, 1966.
- Baird, W.M., Harvey, R.G., Brookes, P.: Comparison of the cellular DNA-bound products of Benzo(a)pyrene with the products formed by reaction of benz(a)pyrene -4,5-oxide with DNA. *Cancer Res.* 35, 54-57, 1975.
- Balani, S.K., van Bladeren, P.J., Shirai, N., Jerina, D.M.: Resolution and absolute configuration of K-region trans-dihydrodiols from polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Org. Chem.* 51, 1773-1778, 1986.
- Barnes, D.E., Lindahl, T., and Sedgwick, B. DNA-Repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 424-433, 1993.
- Bauer, E., Guo, Z., Ueng, Y-F., Bell, L.C., Zeldin, D., Guengerich, F.P.: Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 136-142, 1995.
- Beach, A.C., Gupta, R.C.: Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13, 1053-1074, 1992.

- Beach, A.C., and Gupta, R.C.: DNA adducts of the ubiquitous environmental contaminant cyclopenta[*cd*]pyrene. *Carcinogenesis* 15, 1065-1072, 1994.
- Berenblum, I., Shubik, P.: A new quantitative approach to the study of the stage of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Brit. J. Cancer* 1, 383-391, 1947.
- Bevan, D.R., Sadler, V.M.: Quinol diglucuronides are predominant conjugated metabolites found in bile of rats following intratracheal instillation of benzo[*a*]pyrene. *Carcinogenesis* 13, 403-407, 1992.
- Bishop, J.M.: Viral oncogenes. *Cell*, 42, 23-38, 1985.
- Booth, J., Hewer, A., Keysell, G.R., Sims, P.: Enzymic reduction of aromatic hydrocarbon epoxides by the microsomal fraction of rat liver. *Xenobiotica*, 5, 197-203, 1975.
- Bootsma, D. The genetic defect in DNA repair deficiency syndromes. *Eur. J. Cancer*, 29A, 1482-1488, 1993.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- Brockhaus, A., Tomingas, R.: Emission of polycyclic hydrocarbons during burning processes in small heating installations and their concentration in the atmosphere. *Staub-Reinhalt. Luft* 36, 96-101, 1976.
- Breen, A.P., Murphy, J.A.: Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol. Med.* 18, 1033-1077, 1995.
- Brookes, P., Lawley, P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acid of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202, 781-784, 1964.
- Budillon, A.: Molecular genetics of cancer-oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer* 76, 1869-1873, 1995.
- Buening, M.K., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D.R., Akagi, H., Koreeda, M., Jerina, D.M., Conney, A.H.: Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric Benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: Exceptional activity of (+)-7 β , 8 α -dihydroxy-9 α , 10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5358-5361, 1987.
- Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M.: Expression and characterisation of four recombinant human dihydrodiol dehydrogenase isoforms: oxidation of *trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene to the activated o-quinone metabolite benzo[*a*]pyrene-7,8-dione. *Biochem* 37, 6781-6790, 1998.
- Burke, M.D., Mayer, R.T.: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos.* 2, 583-8, 1974.
- Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T.: Ethoxypentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol.* 34, 3337-45, 1985

- Canter, D.A., Zeiger, E., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelsmans, K., and Speck, W.: Comparative mutagenicity of aliphatic epoxides in Salmonella. *Mutat. Res.* 172, 105-138, 1986.
- Cairns, J.: The origins of human cancer. *Nature*, 289, 353-357, 1981.
- Cairns, J.: The cancer problem. *Sci. Am.* 11, 64-78, 1975.
- Capdevilla, J., Estabrook, R.W., Prough, R.A.: The microsomal metabolism of benzo(a)pyrene phenols. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 82, 518-525, 1978.
- Carmichael, P.L., Platt, K.L., Shé, M.N., Lecoq, S., Oesch, F., Phillips, D.H., and Grover, P.L.: Evidence for the involvement of a bis-diol-epoxide in the metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene to DNA-binding species in mouse skin. *Cancer Res.* 53, 944-948, 1993.
- Cavalieri, E.L., Mailander, P., Pelfrene, A.: Carcinogenic activity of anthanthrene in mouse skin. *Z. Krebsforsch.* 89, 113-118, 1977.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Roth, R.W., Saugier, R.K., Hakam, A.: The relationship between ionization potential and horseradish peroxidase/hydrogen peroxidase-catalyzed binding of aromatic hydrocarbons to DNA. *Chem.-Biol. Interactions* 47, 87-109, 1983.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G.: Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 64, 69-84, 1985a.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G.: Metabolic activation by one-electron and two-electron oxidation in aromatic hydrocarbon carcinogenesis., vol. III [Woo, Y.T., Lai, D.Y., Arcos, J.C., Argus, M.F. (eds.)] pp. 533-569, Academic Press, New York, 1985b.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Higginbotham, S., Cremonesi, P., Salmasi, S.: Tumorigenic activity in mouse skin and carcinogenicity in rat mammary gland of dibenzo[a]pyrenes: the very potent environmental carcinogen dibenz[a,i]pyrene. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115, 67-72, 1989.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G.: Radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Free Rad. Res. Commun.* 11, 77-87, 1990.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G.: Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 25, 677-688, 1995.
- Celotti, L., Ferraro, P., Fulan, D., Zanesi, N., Ravello, S.: DNA repair in human lymphocytes treated with (±)-anti and (±)-syn benzo[a]pyrene di-epoxides. *Mutation Res.* 294, 117-126, 1993.
- Chang, R.L., Wood, A.W., Levin, W., Mah, H.D., Thakker, D.R., Jerina, D.M., and Conney, A.H.: Differences in mutagenicity and cytotoxicity of (+)- and (-)-benzo(a)pyrene 4,5-oxide: a synergistic interaction of enantiomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4280-4284, 1979.
- Chang, R.L., Wood, A.W., Conney, A.H., Yagi, H., Sayer, J.M., Thakker, D.R., Jerina, D.M., and Levin, W.: Role of diaxial versus diequatorial hydroxyl groups in the tumorigenic activity of a benzo[a]pyrene bay-region diol epoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8633-8636, 1987.
- Cherng, S.-H., Lin, P., Yang, J.-L., Hsu, S.-L., and Lee, H.: Benzo[g,h,i]perylene Synergistically transactivates benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, 63-68, 2001.

- Chen, R.-H., Veronica, M.M., Brouwer, J., van de Putte, P., McCormick, J.J.: Preferential repair and strand-specific repair of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 89, 5413-5417, 1992.
- Chesis, P.L., Levin, D.E., Smith, M.T., Ernster, L., Ames, B.N.: Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1696-1700, 1984.
- Cho, H., Harvey, R.G.: Synthesis of hydroquinone diacetates from polycyclic aromatic quinines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 836-839, 1976.
- Clayson, D.B., Mehta, R., Iverson, F.: Oxidative DNA-Damage – the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutation Res.* 317, 25-42, 1994.
- Coles, B., Kletterer, B.: The role of glutathione und glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Biochem. Mol. Biol.* 25, 47-70, 1970.
- Conney, A.H.: Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 42, 4875-4917, 1982.
- Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, I.: The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II and III. *J. Chem. Soc.* 395-405, 1933.
- Cooper, R.L., Lindsey, A.J.: 3,4-Benzpyren and other polycyclic hydrocarbons in cigarette smoke. *Br. J. Cancer* 9, 304-309, 1955.
- Cooper C.S. & Grover, P.L.: *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I + II.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Coutts, R.T., Hargesheimer, E.E., Pasutto, F.M.: Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. *J. Chem.* 179, 291, 1979.
- Coutts, R.T., Hargesheimer, E.E., Pasutto, F.M.: Application of a direct aqueous acetylation technique to the gas chromatographic quantitation of nitrophenols and 1-naphthol in environmental water samples. *J. Chromatogr.* 195, 105-12, 1980.
- Croy, J.W., Selkirk, J.K., Harvey, R.G., Engel, J.F., Gelboin, H.: Separation of ten Benzo[a]pyren phenols by recycle high pressure liquid chromatography and identification of four phenols as metabolites. *Biochem. Pharmacol.* 25, 227, 1976.
- Curci, R., Fiorentino, M., Troisi, L., Edwards, J.O., Pater, R.H.: Epoxidation of alkenes by dioxirane intermediates generated in the reaction of potassium caroate with ketones. *J. Org. Chem.* 45, 4758-4760, 1980.
- Daly, J.W., Jerina, D.W., Witkop, B.: Arene oxides and the NIH-Shift: the metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds. *Experientia* 28, 1129-1264, 1972.
- Dansette, P., Jerina, D.M.: A facile synthesis of arene oxides at the K-region of polycyclic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 1224-1225, 1974.
- Davies, W., Ennis, B.C.: The synthesis of polycyclic aromatic compounds. Part III. Picene-5:6- and -13:14-quinone and picene-5:6:7:8-diquinone. *J. Chem. Soc.*, 915-918, 1959.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.: *Molekulare Zellbiologie* Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1994.

- Degenhardt, C.: Biotransformation des hexazyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Anthanthren und seine Aktivierung zu bakteriellen Mutagenen. Dissertation, Universität Mainz, 1997.
- Deml, E., Oesterle, D.: Chemische Kanzerogenese aus: Toxikologie. Hrsg: Greim, H., Deml, E., VCH, Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1996, 135-160.
- Deutsch-Wenzel, R.P., Brune, H., Grimmer, G., Dettbarn, G., Misfeld, J.: Experimental studies on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 539-544, 1983.
- Devaneson, P.D., RamaKrishna, N.V.S., Todorovic, R., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G.J.: Identification and quantification of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 302-309, 1992.
- Dewar, M.J.S., Dougherty, R.C.: The PMO-theory of organic chemistry, pp. 78-80, 104-106; Plenum Press, New York, 1975.
- Dimmel, D.R., Shepard, D.: Regioselective alkylation of anthrahydroquinone and anthrone in water with quinonemethides and other alkylating agents. *J. Org. Chem.* 47, 22-29, 1982.
- Dipple, A. & Bigger, C.A.H.: Mechanisms of action of food-associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mutation Res.* 259, 263-276, 1991.
- Doerjer, G., Bedell, M.A., Oesch, F.: DNA-Adducts and their biological relevance. In: *Mutations in Man* [Obe, G. (ed.)] Springer Verlag, Berlin, pp. 20-34, 1984.
- Doll, R. & Peto, R.: The causes of cancer. Oxford University Press, New York, 1981a.
- Doll, R. & Peto, R.: The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191-1309, 1981b.
- Eisenstadt, E., Gold, A.: Cyclopenta[c,d]pyrene: a highly mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1667-1669, 1978.
- Erdinger, L., Höpker, K.-A., Dörr, I., Fried, M., Dürr, M.: Analyse der Luftstaubextrakte. In: *Gentoxische organische Verbindungen in der Außenluft* [Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Hrsg.)] Karlsruhe, pp. 95-146, 1997.
- Estabrook, R.W., Werringloer, F., Capedevila, J., and Prough, R.A.: The role of P-450 and microsomal electron transport system: The oxidative metabolism of benzo[a]pyren. [(Gelboin, H.V., Ts'o, P.O. (eds.))] pp. 285-319. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.
- Fahl, W.E., Shen, A.L., and Jefcoate, C.R.: UDP-Glucuronosyltransferase and the conjugation of benzo(a)pyrene metabolites to DNA. *Biophys. Res. Commun.* 85, 891-899, 1985.
- Falk, H.L., Steiner, P.E.: The identification of aromatic polycyclic hydrocarbons in carbon blacks. *Cancer Res.* 12, 30-39, 1952.
- Farber, E.: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 44, 4217-4223, 1984.
- Ferrier, R.J., Tyler, P.C.: Functionalised carbocycles from carbohydrates. Part 7. A route to carbacyclin from a D-glucose derivative. X-Ray crystal structure of 3-endo-benzoyloxy-2-exo-(1,3-diphenyl-1,3,2-diazaphospholan-2-yloxymethyl)-6-oxobicyclo[3.3.0]octane. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* 295-300, 1985.

- Fickler, 2004: Mutagenität und DNA-Interaktion von Anthanthren und Benzo[*ghi*]perylene, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ohne das Strukturelement der Bay-Region des kanzerogenen Benzo[*a*]pyrens. Dissertation, Universität Mainz, 2004.
- Fieser, L.F., Peters, M.A.: The potentials and the decomposition reactions of ortho quinones in acid solution. *J. Am. Chem. Soc.* 53, 793-805, 1931.
- Flesher, J.W., Kadry, A.M., Chien, M., Stansbury, K.H., Gairola, C., Sydnor, K.L.: Metabolic activation of carcinogenic hydrocarbons in mesoposition (L-region). In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Formation, Metabolism and Measurement*. [Cooke, M., Dennis, A.J., (eds.)], Batelle Press, Columbus, pp. 505-515, 1983.
- Flesher, J.W., Myers, S.R., Bergo, C.H., Blake, J.W.: Bioalkylation of dibenz[*a,h*]anthracene in rat liver cytosol. *Chem.-Biol. Interact.* 57, 223-233, 1986.
- Flesher, J.W., Myers, S.R., Stansbury, K.H.: The site of substitution of the methylgroup in the bioalkylation of benzo[*a*]pyrene, *Carcinogenesis* 11, 493-496, 1990.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R.G., Penning, T.M.: Identification of benzo[*a*]pyrene 7,8-dione as an authentic metabolite of \pm -trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 16, 2707-2715, 1995.
- Flowers, L., Blecinski, W.F., Burczinski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M.: Disposition and biological activity of benzo[*a*]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* 36, 13664-13672, 1996.
- Flowers, L., Ohnishi, S.T., Penning, T.M.: DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbons o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals. *Biochemistry* 36, 8640-8648, 1997.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Bibliographisches Institut, Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich, 1990.
- Foulds, L.: *Neoplastic development*. Academic press, Inc., New York, 1969.
- Friedberg, E.C.: The enzymology of DNA repair. *Mutation Res.* 236, 145-314, 1990.
- Fu, P.P., Harvey, R.G., Beland, F.A.: Molecular orbital theoretical prediction of the isomeric products formed from the reactions of arene oxides and related metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tetrahedron* 34, 857-866, 1978.
- Fujita, S., and Sano, K.: N,N-diethylhydroxylamine. A versatile reagent for reducing quinines to quinols. *Tetrahedron Lett.*, 21, 1695-1696, 1975.
- Funk, M., Frank, H., Oesch, F., Platt, K.L.: Development of chiral stationary phases for the enantiomeric resolution of dihydrodiols of polycyclic aromatic hydrocarbons by π -donor-acceptor interactions. *J. Chromatogr. A* 659, 57-68, 1994.
- Gill, S.S., Hammock, B.D., Casida, J.E.: Mammalian metabolism and environmental degradation of the juvenoid 1-(4'-ethylphenoxy)-3,7-dimethyl-6,7-epoxy-trans-2-octene and related compounds. *J. Agr. Food Chem.* 22, 386-395, 1974.
- Glatt, H.R., Oesch, F., Frigerio, A., and Garattini, S.: Epoxides metabolically produced from some known carcinogens and from some clinically used drugs. I. Differences in mutagenicity. *Int. J. Cancer* 16, 787-797, 1975.

- Glatt, H.R., Vogel, K., Bentley, P., Oesch, F.: Reduction of benzo[a]pyrene mutagenicity by dihydrodiol dehydrogenase. *Nature* 277, 319-320, 1979.
- Glatt, H.R., Ludewig, G., Platt, K.L., Waechter, F., Yona, I., Ben-Shoshan, S., Jerushalmy, P., Blum, J., Oesch, F.: Arene imines, a new class of exceptionally potent mutagens in bacterial and mammalian cells. *Cancer Res.* 45, 2600-2607, 1985.
- Glatt, H.R.: HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des chinesischen Hamsters. In: *Mutationsforschung und Genetische Toxikologie* [Fahrig, R. (Hrsg.)] Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 243-262, 1993.
- Glatt, H.R., Abu-Shqara, E., Martine, U., Beridossi, W., Harvey, R.G., Blum, J.: K-Region oxides and imines derived from alkylated benz[a]anthracene congeners: synthesis, stability in aqueous media and mutagenicity. *Mutagenesis* 2, 83-92, 1994.
- Glover, D.M. & Hames, B.D.: *Oncogenes*. Oxford University Press, Oxford/New York/Tokyo, 1989.
- Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V.: Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev.* 26, 165-183, 1994.
- Groopman, J.D. & Cain, L.G.: Interactions of fungal and plant toxins with DNA: aflatoxins, sterigmatocystin, safrole, cycasin, and pyrrolizidine alkaloids. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I* [Cooper, C.S., Grover, P.L. (eds.)], Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 373-407, 1990.
- Grover, P.L., Sims, P.: Enzyme-catalyzed reactions of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro. *Biochem. J.* 110, 159-160, 1968.
- Grover, P.L., Hewer, A., and Sims, P.: Epoxides as microsomal metabolites of polycyclic hydrocarbons. *FEBS Lett*, 18, 76-80, 1971.
- Grover, P.L., Hewer, A., and Sims, P.: Formation of K-region epoxides as microsomal metabolites of pyrene and benzo[a]pyrene. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2713-2726, 1972.
- Grimmer, G., Böhnke, H.: Bestimmung des Gesamtgehaltes aller polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in Luftstaub und Kraftfahrzeugabgas mit der Capillar-Gas-Chromatographie. *Z. Anal. Chem.* 261, 310-314, 1972.
- Grimmer, G., Böhnke, H., Glaser, A.: Investigation on the carcinogenic burden air pollution in man. XV. Polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust gas – an inventory, *Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt., Orig.* B164, 281-234, 1977a.
- Grimmer, G., Böhnke, H., Harke, H.-P.: Passive smoking: measuring the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in rooms after machine smoking of cigarettes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 40, 83-92, 1977b.
- Guengerich, F.P., Mc Donald, T.L.: Chemical mechanism of catalysis by cytochromes P450: a unified view. *Acc. Chem. Res.* 17, 9-16, 1984.
- Guengerich, F.P., Shimada, T.: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 391-407, 1991.
- Guengerich, F.P.: Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.* 54, 17-61, 1992.

- Hakura, A., Mochida, H., Tsutsui, Y., Yamatsu, K.: Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames Salmonella tester strains. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 559-567, 1994.
- Hall, M., Forrester, L.M., Parker, D.K., Grover, P.L., Wolf, C.R.: Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of Benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 10, 1815-1821, 1989.
- Hall, M., Grover, P.L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumour initiation. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I* [Cooper, C.S., Grover, P.L. (eds.)] Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 327-372, 1990.
- Harris, C.C.: Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for 1990s. *Cancer Res. Suppl.* 51, 5023s-5044s, 1991.
- Harvey, R.G., Goh, S.H., Cortez, C.: "K-region" oxides and related oxidized metabolites of carcinogenic aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 3468-3479, 1975.
- Harvey R.G., Geacintov, N.E.: Intercalation and binding of carcinogenic hydrocarbon metabolites to nucleic acids. *Acc. Chem. Res.* 21, 66-73, 1988.
- Harvey R.G.: Conformational analysis of hydroaromatic metabolites of carcinogenic hydrocarbons and the relation of conformation to biological activity. In: *The Conformational Analysis of Cyclohexenes, Cyclohexadienes, and Related Hydroaromatic Compounds*. [Rabideau, P.W. (ed.)], VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 267-298, 1989.
- Heidelberger, C., Wiest, W.G.: The metabolic degradation in the mouse of 1,2,5,6-dibenzanthracene-9,10-C₁₄. II. 5-Hydroxy-1,2-naphthalic acid, a new metabolite. *Cancer Res.* 11, 511-518, 1951.
- Hemminki, K.: Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Arch Toxicol.* 52: 249-285, 1983.
- Hemminki, K.: Environmental carcinogens. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I* [Cooper, C.S., Grover, P.L. (eds.)], Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 33-61, 1990.
- Hennings, H., Shores, R., Wenk, M.L., Spangler, E.F., Tarone, R., Yuspa, S.H.: Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumorigenic initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 304, 67-69, 1993.
- Henschler, D.: Genetische Schäden durch Strahlen und andere Umweltgifte. *Akt. Radiol.* 1, 116-119, 1991.
- Hermann, M.: Synergistic effect of individual polycyclic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. *Mutation Res.* 90, 399-409, 1981.
- Hicks, D.R., Frasler-Reid, B.: Selective Sulphonylation with N-Tosylimidazol. A One-Step Preparation of Methyl 2,3-Anhydro-4,6-O-benzylidene- α -D-mannopyranoside. *Synthesis*, 203, 1974.
- Higginson, J.: Environmental carcinogenesis: a global perspective. In: *Environmental Carcinogenesis. Occurrence, Risk, Evaluation and Mechanism*. [Emmelot, P., Kriek, E. (eds.)]. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, pp. 9-24, 1979.
- Hill, J.: Caution Agents the immoderate Use of Snuff. Founded on the known Qualities of Tobacco Plant; And the Effects it must produce when this Way taken into the Body: And

- Enforced by Instances of Persons who have perished miserably of Diseases, occasioned, or rendered incurable by its Use. Baldwin, London, 1761.
- Hoffmann, D., Wynder, E.L.: Beitrag zur carcinogenen Wirkung von Dibenzpyrenen. Z. Krebsforschung. 68, 137-149, 1966.
- Hoffmann, D. & Hecht, S.S.: Advances in tobacco carcinogenesis. In: Chemical carcinogenesis and Mutagenesis I [Cooper, C.S., Grocer, P.L. (eds.)], Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 63-102, 1990.
- Hofmann, D., Wynder, E.I., Valhalla, N.Y.: Aktives und passives Rauchen, aus: Lehrbuch der Toxikologie, BI-Wiss.-Verl. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 1994, p. 589-605.
- Holder, G., Yagi, H., Dansette, P., Jerina, D.M., Levin, W., Lu, A.Y.H., Conney, A.H.: Effects of inducers and epoxide hydrase on the metabolism of Benzo[a]pyren by liver microsomes and a reconstituted system: analysis by high pressure liquid chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4356-4360, 1974.
- Hughes, N.C., Phillips, D.H.: 32P-Postlabeling analysis of the covalent binding of benzo[ghi]perylene to DNA in vivo and in vitro. Carcinogenesis 14, 127-133, 1993.
- Hughes, N.C., Pfau, W., Hewer, A., Jakob, J., Grimmer, G., Phillips, D.H.: Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin. Carcinogenesis 14, 135-144, 1993.
- IARC, 1983: International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. Volume 32, IARC, Lyon.
- IARC, 1986: International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogens risks to humans. Tobacco smoking. Volume 38, IARC, Lyon.
- IARC, 1987: International Agency of Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Suppl. 7, IARC, Lyon.
- Ioannides, C., Parke, D.V.: The cytochrom P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. Drug Metab. Rev. 22, 1-85, 1990.
- Ioannides, C., Parke, D.V.: Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. Drug Metab. Rev. 25, 485-501, 1993.
- Ivanetich, K.M., Ziman, M.R., and Bradshaw, J.J.: 1,1,1-Trichloropropene-2,3-oxide: An alternate mechanism for its inhibition of cytochrome P-450. Res. Commun. Chem. Path. 35, 111-120, 1982.
- Jacob, J., Grimmer, G., Raab, G., and Schmoldt, A.: The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. Xenobiotica 12, 45-53, 1982.
- Jacob, J., Schmoldt, A., and Grimmer, G.: Benzo[e]pyrene metabolism in rat liver microsomes: dependence of the metabolite profile on the pre-treatment of rats with various monooxygenase inducers. Carcinogenesis 4, 905-910, 1983.

- Landucci, L.L., Ralph, J.: Adducts of anthrahydroquinone and anthranol with lignin model quinone methides. 1. Synthesis and characterization. *J. Org. Chem.*, 47, 3486-3495, 1982.
- Jerina D.M, Daly, J.W.: Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. *Science* 185, 573-582, 1974.
- Jerina, D. M., Selander, H., Yagi, H., Martha Wells, C., Davey, J. F., Mahadevan, V., Gibson, D. T.: Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5988-5996, 1976.
- Jerina D.M, Daly, J.W.: from microbe to man. In: *Drug metabolism*, ed.by Parke, D.W., Smith, R.L., Taylor, Francis, London, pp. 13-22, 1976.
- Jerina D.M, Lehr, R.E.: The bay-region theory: a quantum mechanical approach to aromatic hydrocarbon-induced carcinogenicity. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. [Ullrich, V., Roots, I., Hildebrandt, A., Estabrook, R.W., Conney, A.H. (eds.)], Pergamon Press, Oxford, pp. 709-720, 1977.
- Jerina, D.M., Michaud, D.P., Feldmann, R.J., Armstrong, R.N., Vyas, K.P., Thakker, D.R., Yagi, H., Thomas, P.E., Ryan, P.E., and Levin, W.: Stereochemical modeling of the catalytic site of cytochrome P-450c. In: *Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity* [Sato, R., Kato, R. (eds.)] Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1982, pp 195-201, Wiley-Interscience, New York 1982.
- Jerina D.M., Sayer, J.M., Agarwal, S.K., Yagi, H., Levin, W., Wood, A.W., Conney, A.H., Preuss-Schwartz, D., Baird, W.M., Pigott, M.A., Dipple, A.: Reactivity and tumorigenicity of bay-region diol epoxides derived from polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Biological Reactive Intermediates III, Mechanisms of Actions in Animal Models and Human Diseases*. [Kocsis, J.J., Jollow, D.J., Witmer, C.M., Nelson, J.O., Snyder, R. (eds.)], Plenum Press, New York, pp. 11-30, 1986.
- Jernström, B., Gräslund, A.: Covalent binding of Benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys. Chem.* 49, 185-199, 1994.
- Jeyaraman, R., Murray, R.W.: Production of arene oxides by the caroate-acetone system (dimethyloxirane). *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2462-2463, 1984.
- Murray, R.W., Jeyaraman, R.: dioxiranes 3. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reaction with dimethyldioxirane, In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Tenth International Symposium on a Decade of Progress*. [Cooke, M.W., Dennis, A.J. (eds.)] Battele Press, Columbus, OH, pp. 595-607, 1985.
- Kaina, B.: Mechanismen der DNA-Reparatur und der Mutagenese. In: *Mutationsforschung und Genetische Toxikologie* [Fahrig, R. (Hrsg.)] Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 65-86, 1993.
- Kao, J., Carver, M.P.: Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 22, 363-410, 1990.
- Kato, R., Iwasaki, K., Shiraga, T., Noguchi, H.: Evidence for the involvement of cytochrom P-450 in reduction of benzo[a]pyren by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Commun.* 70, 681, 1976.

- Kedzierski, B., Thakker, D.R., Armstrong, R.N., Jerina, D.M.: Absolute configuration of the K-region 4,5-dihydrodiols and 4,5-oxide of benz[a]pyrene. *Tetrahedron Lett.* 22, 405-408, 1981.
- Kennaway, E.L.: Further experiments on cancer-producing substances. *Biochem.J.*, 24, 497-504, 1930.
- King, H.W., Osborne, M.R., Beland, F.A., Harvey, R.G., and Brookes, P.: (\pm)7 α ,8 β -Dihydroxy-9 β ,-10 β -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene is an intermediate in the metabolism and binding to DNA of benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2679-2681, 1976.
- Kodoma, M., Nagata, C.: Binding of 6-oxybenzo[a]pyrene radical with DNA and polynucleotides. *Gann* 68, 125-126, 1977.
- Kohn, K.W.: Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol. Ther.* 49, 55-77, 1991.
- Koreeda, M., Moore, P.D., Wislocki, P.G., Levin, W., Conney, A.H., Yagi, H., Jerina, D.M.: Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA, and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science* 199, 778-781, 1978.
- Koymans, L., Donné-Op Den Kelder, G.M., Koppelaar J.M., Vermeulen, N.P.E.: Cytochromes P450: their active site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab. Rev.* 25, 325-387, 1993.
- Krishnan, K., Hamilton: Direct oxidation in high yield of some polycyclic aromatic compounds to arene oxides using hypochlorite and phase transfer catalysts. *J. Americ. Chem. Soc.*, 99, 8121, 1977.
- Kunz, W.: Krebsauslösung durch chemische Substanzen. *Attempo* 59/60, 52-60, 1977.
- Kuroki, T., Hubermann, E., Marquardt, H., Selkirk, J.K., Heidelberger, C., Grover, P.L., Sims, P.: Binding of K-region epoxides and other derivatives of benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene to DNA, RNA, and proteins of transformable cells. *Chem.-Biol. Interact.* 4, 389-397, 1972.
- Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A.: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222, 771-778, 1983.
- Landsiedel, R., Frank, H., Glatt, H., Seidel, A.: Direct optical resolution of trans dihydrodiol enantiomers of fjord-region aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography on a modified cellulose phase. *J. Chromatogr. A* 822, 29-35, 1998.
- Lang, K.F., Eigen, I.: Organische Verbindungen im Steinkohlenteer. In: Fortschritte der chemischen Forschung [Heilbronner, E., Hofmann, U., Schäfer, K., Wittig, G. (eds.)] Springer-Verlag Berlin, pp. 91-170, 1967.
- LaVoie, E.J., Bedenko, V., Hirota, N., Hecht, S.S., and Hoffmann, D.: A comparison of the mutagenicity, tumor-iniating activity and complete carcinogenicity of polynuclear aromatic hydrocarbons. In: Polynuclear aromatic hydrocarbons: chemical and biological effects [(Jones, P.W., Leber, P. (eds.))] pp. 705-721. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1979.
- Lecoq, S., Chalvet, O., Strapelias, H., Grover, P.L., Phillips, D.H., and Duquesne, M.: Microsomal metabolism of dibenz[a,c]anthracene, dibenz[a,h]anthracene and

- dibenz[*a,j*]anthracene to bis-dihydrodiols and polyhydroxylated products. *Chem.-Biol. Interact.* 80, 261-279, 1991.
- Lehner, A.F., Horn, J., Flesher, J.W.: Formation of radical cations in a model for the metabolism of aromatic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Commun.* 322, 1018-1023, 2004.
- Lesko, S., Caspary, W., Lorentzen, R., Ts'o, P.O.P.: Enzymatic formation of 6-oxobenzo[*a*]pyrene radical in rat liver homogenates from carcinogenic benzo[*a*]pyrene. *Biochemistry* 14, 3978, 1975.
- Lesko, S.A., Lorentzen, R.J.: Benzo[*a*]pyrene dione-benzo[*a*]pyrene diol oxidation-reduction couples; involvement in DNA-damage, cellular toxicity, and carcinogenesis. *J. Toxicol. Environm. Health* 16, 679-691, 1985.
- Levin, W., Buening, M.K., Wood, A.W., Chang, R.L., Kedzierrski, B., Thakker, D.R., Boyd, D.R., Gadaginamath, G.S., Armstrong, R.N., Yagi, H., Karle, J.M., Slaga, T.J., Jerina, D.M., and Conney, A.H.: An enantiomeric interaction in the metabolism and tumorigenicity of (+)- and (-)-benzo[*a*]pyrene 7,8-oxide. *J. Biol. Chem.* 225, 9067-9074, 1980.
- Lewtas, J., King, L.C., Williams, K., Ball, L.M., DeMarini, D.M.: Bioassay-directed fractionation of 1-nitropyrene metabolites: Generation of mutagram by coupling reverse-phase HPLC with microsuspension assays. *Mutagenesis* 5, 481-489, 1990.
- Lijinski, W., Garcia, H.: Skin carcinogenicity test of hydrogenated derivatives of anthanthrene and other polynuclear hydrocarbons. *Z. Krebsforsch.* 77, 226-230, 1972.
- Lioy, P.L., Waldman, J.M., Greenberg, A., Harkov, R., Pietarinen, C.: The total human environmental exposure study (THEES) to Benzo[*a*]pyren: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch. Env. Health* 43, 304-312, 1988.
- Lorentzen, R.J., Caspary, W.J., Lesko, S.A., and Ts'o, P.O.P.: The autooxidation of 6-hydroxybenzo[*a*]pyrene and 5-oxobenzo[*a*]pyrene radical, reactive metabolites of benzo[*a*]pyrene. *Biochemistry* 14, 3970-3977, 1975.
- Lorentzen, R.J., Ts'o, P.O.P.: Benzo[*a*]pyrenedione/benzo[*a*]pyrenediol oxidation-reduction couples and the generation of reactive molecular oxygen. *Biochemistry* 16, 1467-1473, 1977.
- Lubet, R. A., Mayer, R.T., Cameron, J.W., Nims, R.W., Burke, M.D., Wolff, T., Guengerich, F.P.: Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 1985, 238, 43-8.
- MacLeod, M.C., Adair, G., Daylong, A., Lew, L., Humphrey, R.M.: Low absolute mutagenic efficiency but high cytotoxicity of a non-bay region diol epoxide derived from Benzo[*a*]pyrene. *Mutation Res.* 261, 281-293, 1991.
- Marks, F.: Chemical carcinogenesis – the multistep approach. *Interdiscipl. Sci. Rev.* 14, 233-240, 1989.
- Marnett, L.J.: Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8, 1365-1373, 1987.
- Maron, D.M., Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, 173-215, 1983.

- Marsch, G.A., Jankowiak, R., Small, G.J., Hughes, N.C., and Phillips, D.H.: Evidence of involvement of multiple sites of metabolism in the *in vivo* covalent binding of dibenzo[*a,h*]pyrene to DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 765-722, 1992.
- Mc Cann, J., Spingarn, N.E., Kabori, J., Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strain with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 979-983, 1975.
- McManus, M.E., Burgess W.M., Veronese, M.E., Hugget, A., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H.: Metabolism of 2-acetylaminofluorene and Benzo[*a*]pyren and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. *Cancer Res.* 50, 3367-3376, 1990.
- Meehan, T., Straub, K.: Double-stranded DNA stereoselectively binds benzo(*a*)pyren diol epoxides. *Nature* 277, 410-412, 1979.
- Meyer, V.R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*, Otto Salle Verlag, Frankfurt, 1986.
- Miller, E.C.: Some current perspectives on the chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. *Cancer Res.* 38, 1479-1496, 1978.
- Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D., Graham, D.G.: Quinone chemistry and toxicity. *Tox. Appl. Pharmacol.* 112, 2-16, 1992.
- Montgomery, R.E.: Catalysis of peroxymonosulfate reactions by ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 7820-7821, 1974.
- Moriarty, R.M., Dansette, P., and Jerina, D.M.: Pyrene derivatives oxygenated at both K-regions. Synthesis of a bis-arene oxide. *Tetrahedron Lett.*, 2557-2560, 1975.
- Mulder, G.J., Jakoby, W.B.: Sulfation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism*. [Mulder, G.J. (ed.)] Taylor & Francis, London, pp. 107-162, 1990.
- Mulder, G.J., Coughtrie, M.W.H., Burchell, B.: Glucuronidation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism*. [Mulder, G.J. (ed.)] Taylor & Francis, London, pp. 51-106, 1990.
- Murray, R.W., Jeyaraman, R.: Dioxiranes: Synthesis and Reactions of Methyl dioxiranes. *J. Org. Chem.* 50, 2847-2853, 1985.
- Mushtaq, M., Weems, H.B., and Yang, S.K.: Stereoselektive formations of enantiomeric K-region epoxide and trans-dihydrodiols in dibenz[*a,h*]anthracene metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 2, 84-93, 1989.
- Nakanishi, K., Kasai, H., Cho, H., Harvey, R.G., Jenette, K.W., and Weinstein, I.B.: Absolute configuration of a ribonucleic acid adduct formed *in vivo* by metabolism of benzo[*a*]pyren. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 258-260, 1977.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.W.: The P450 superfamily: updated on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12, 1-51, 1993.
- Nebert, D.W., Eisen, H.J., Negishi, N., Lang, M.A., Hjelmeland, L.M.: Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 431-462, 1981.

- Nebert, D.W., Tukey, R.H., Mackenzie, P.I., Negishi, M., Eisen, H.J.: Several P-450 genes regulated by the Ah receptor. In: *Extrahepatic Drug Metabolism and Chemical Carcinogenesis*. [Rydström, J., Montelius, J., Bengtsson, M. (eds.)] Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 379-388, 1983.
- Nebert, D.W.: The Ah Locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 153-174, 1989.
- Nemoto, N., Gelboin, H.V.: Enzymatic conjugation of Benzo[a]pyren oxides, phenols and dihydrodiols with UDP-glucuronic acid. *Biochem. Pharmacol.* 25, 1221-1226, 1976.
- Nemoto, N., Takayama, S., Gelboin, H.V.: Enzymatic conversion of benzo[a]pyrene phenols, dihydrodiols and quinones to sulphate conjugates. *Biochem. Pharmacol.* 26, 1825 (1977).
- Nesnow, S., Davis, C., Padgett, W., George, M., Lambert, G., Meyers, F., Allison, J., Adams, L., and King, L.C.: Metabolic activation of racemic and enantiomeric trans-8,9-dihydroxy-8,9-dihydrodibenzo[a,l]pyrene (dibenzo[def,p]chrysene) to dibenzo[a,l]pyrene-bis-dihydrodiols by induced rat liver microsomes and a recombinant human P450 1A1 system: The role of the K-region-derived metabolic intermediates in the formation of dibenzo[a,l]pyrene-DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1596-1607, 1998.
- Newbold, R.F., Brookes, P.: Exceptional mutagenicity of a Benzo[a]pyrene diol epoxide in cultured mammalian cells. *Nature London* 261, 52-54, 1976.
- Nordqvist, M., Thakker, D.R., Vyas, K.P., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D.E., Thomas, A.H., Conney, A.H., and Jerina, D.M.: Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.* 19, 168-178, 1981.
- Oesch, F.: Mammalian epoxide hydrases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 3, 305-340, 1973a.
- Oesch, F., Jerina, D.M., Daly, J.W., and Rice, J.M.: Induction, activation and inhibition of epoxide hydrase: An anomalous prevention of chlorobenzene-induced hepatotoxicity by an inhibitor of epoxide hydrase. *Chem.-Biol. Interact.* 6, 189-202, 1973.
- Oesch, F.: Epoxid hydratase. In: *Progress in Drug Metabolism*. [Bridges, J.W., Chasseaud (eds.)] Wiley, Chichester, vol. 3, pp. 253-301, 1979.
- Oesch, F., Sparrow, A.J., Platt, K.L.: Radioactively labelled epoxides. II. Tritium labelled cyclohexene oxide, trans-stilbene oxide and phenanthrene oxide. *J. Lab. Com. Radiopharm.* 17, 93-102, 1980.
- Ogura, K., Sohtome, T., Sugiyama, A., Okuda, H., Hiratsuka, A., Watabe, T.: Rat liver cytosolic hydroxysteroid sulfotransferase (sulfotransferase a) catalyzing the formation of reactive sulphate ester from carcinogenic polycyclic hydroxymethylarenes. *Mol. Pharmacol.* 37, 848.854, 1990.
- Owens, I.S., Koteen, G.M., and Legraverend, C.: Mutagenesis of certain benzo[a]pyrene phenols in vitro following further metabolism by mouse liver. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1615-1622, 1979.
- Padgett, W.T., Davis, C., Lambert, G., Nelson, G.B., Ross, J.A., Yacopucci, M., and Nesnow, S.: Biotransformation of trans-4,5-dihydroxy-4,5-dihydrobenzo[a]pyrene to benzo[a]pyrene bis-diols and DNA adducts by induced rat liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1125-1134, 2000.

- Parke, D.V., Ioannides, C., Lewis, D.F.V.: The role of cytochromes P450 in the detoxification and activation of drugs and other chemicals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 537-549, 1991.
- Pelkonen, O., Nebert, D.W.: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34, 189-222, 1982.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.-F., McCoull, K.D., Palackal, N.T., Tsuruda, L.S.: Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Chinones. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1-18, 1999.
- Perin-Roussel, O., Barat, N., and Zajdela, F.: Formation and persistence of DNA-protein cross-links induced in mouse fibroblasts by dibenzo[*a,e*]fluoranthene, and modulation by stimulators and inhibitors of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolism. *Cancer Lett.* 36, 169-180, 1987.
- Phillips, D.H., Grover, P.L.: Polycyclic hydrocarbon activation: bay-region and beyond. *Drug Metab. Rev.* 26, 443-467, 1994.
- Pitot, H.C.: Progression: the terminal stage in carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 599
- Pitot, H.C.: Mechanisms of chemical carcinogenesis: theoretical and experimental bases. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I* [Cooper, C.S., Grover, P.L. (eds)], Springer-Verlag, Heidelberg, 2nd ed., pp. 3-29, 1990.
- Platt, K.L., Oesch, F.: K-Region trans-dihydrodiols of polycyclic arenes; an efficient and convenient preparation from o-quinones or o-diphenols by reduction with sodium borohydride in the presence of oxygen, *Synthesis* 459-461, 1982.
- Platt, K.L.: *Metabolismus und biologische Aktivität von Dibenz[*a,h*]anthracen*. Habilitationsschrift, Universität Mainz, 1986.
- Platt, K.L., and Reischmann, I.: Regio- and stereoselective metabolism of dibenz[*a,h*]anthracene: Identification of 12 new microsomal metabolites. *Mol. Pharmacol.* 32, 710-722, 1987.
- Platt, K.L., and Schollmeier, M.: Bisdihydrodiols, rather than dihydrodiol oxides, are the principal microsomal metabolites of tumorigenic trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrodibenz[*a,h*]anthracene. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 89-97, 1994.
- Platt, K.L., Degenhardt, C., Grupe, S., Frank, H., Seidel, A.: Microsomal activation of dibenzo[*def,mno*]chrysene (anthanthrene), a hexacyclic aromatic hydrocarbon without a bay-region, to mutagenic metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 332-342, 2002.
- Platt, K.L., Dienes, H.P., Tommasone, M., Luch, A.: Tumor formation in the neonatal mouse bioassay indicates that the potent carcinogen dibenzo[*def,p*]chrysene (dibenzo[*a,l*]pyrene) is activated in vivo via its *trans*-11,12-dihydrodiol. *Chem-Biol. Interactions* 148, 27-36, 2004.
- Pott, P.: *Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet.* Hawes, Clarke, and Collins, London, 1775 (Neudruck: *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 10, 7-13, 1963.)
- Prescott, D.M. & Flexer, A.S.: *Krebs – Fehlsteuerung von Zellen; Ursachen und Konsequenzen.* Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1990.

- Pullmann, A., Pullmann, B.: Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules. New developments. *Adv. Cancer Res.* 3, 117-167, 1955.
- Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C.: ³²P-Labeling test for DNA-damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6126-6129, 1981.
- Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H.P., Gupta, R.C., Schurdak, M.E., Reddy, M.V.: Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environm. Health Perspec.* 62, 57-65, 1985.
- Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C.: ³²P-Labeling test for DNA-damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6126-6129, 1981.
- Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H.P., Gupta, R.C., Schurdak, M.E., Reddy, M.V.: Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environm. Health Perspec.* 62, 57-65, 1985.
- Reddy, M.V., Gupta, R.C., Randerath, E., Randerath, K.: ³²P-Postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo: application to a variety of aromatic carcinogenic and methylating agents. *Carcinogenesis* 5, 231-243, 1984.
- Redmont, D.E.: Jr.: Tobacco and Cancer: the first clinical report, 1761. *New Engl. J. Med.* 282, 18-23, 1970.
- Reynolds, S.H., Stowers, S.J., Maronpot, R.R., Anderson, M.W., and Aaronson, S.A.: Detection and identification of activated oncogenes in spontaneously occurring benign and malignant hepatocellular tumors of the B6C3F1 mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 83, 33-37, 1986.
- Romagna, F.: Mikrokerntestsysteime. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* [Fahrig, R. (ed.)] Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 290-298, 1993.
- Rogan, E.G., Roth, R.W., Katoski-Beck, P.A., Laubscher, J.R., Cavalieri, E.L.: Nonenzymatic ATP-mediated binding of hydroxymethyl derivatives of aromatic hydrocarbons to DNA, *Chem.-Biol. Interact.* 31, 51-63, 1980.
- Rutten, A.A., Falke, H.E., Catsburg, J.F., Wortelboer, H.M., Blaauboer, B.J., Doorn, L., van Leeuwen, F.X., Theelen, R., Rietjens, I.M.: Interlaboratory comparison of microsomal ethoxyresorufin and pentoxyresorufin O-dealkylation determinations: standardization of assay conditions.. *Arch Toxicol.* 66, 237-44, 1992
- Ryan D.E., Thomas, P.E., Korzeniowski, D., Levin, W.: Separation and characterisation of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 254, 1365-1374, 1979.
- Ryan D.E., Thomas, P.E., Levin, W.: purification and characterisation of a minor form of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls. *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 272-288, 1982.
- Ryan D.E., Thomas, P.E., Parkinson, A., Reik, L.M., Wood, A.W., Levin, W.: Characterisation and regulation of rat hepatic microsomal cytochrom P-450 isozymes. *Ann. New York Acad. Sci.* 435, 73-85, 1984.

- Saguem, S., Mispelter, J., Perin-Roussel, O., Lhoste, J.M., and Zajdela, F.: Multistep metabolism of the carcinogen dibenzo[*a,e*]fluoranthene. I. Identification of the metabolites from rat microsomes. *Carcinogenesis* 4, 827-836, 1983.
- Sakai, M., Yoshida, D., and Mizusaki, S.: Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinines on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutation Res.* 156, 61-67, 1985.
- Schollmeier, M., Frank, H., Oesch, F., and Platt, K.L.: Assignment of absolute configuration to metabolically formed trans-dihydrodiols of dibenz[*a,h*]anthracene by two distinct spectroscopic method. *J. Org. Chem.* 51, 5368-5372, 1986.
- Schollmeier, M.: Die Regio- und Enantioselektivität im mikrosomalen Metabolismus von Dibenz[*a,h*]anthracene unter besonderer Berücksichtigung des Sekundärmetabolismus. Dissertation, Universität Mainz, 1989.
- Scribner, J.D.: Tumor initiation by apparently noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 1717-1719, 1973.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Graslkraupp, B., Mullauer, L., Ruttkaynedecky, B.: Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutation Res.* 333, 81-87, 1995.
- Segerbäck, D., Vodicka, P.: Recoveries of DNA adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ³²P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 14, 2463-2469, 1993.
- Selkirk, J.K., Huberman, E., and Heidelberger, C.: An epoxide is an intermediate in the microsomal metabolism of the chemical carcinogen dibenz[*a,h*]anthracene. *Biophys. Res. Commun.* 43, 1010-1016, 1971.
- Selkirk, J.K., Croy, R.G., and Gelboin, H.V.: Isolation and characterization of benzo[*a*]pyrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 322-326, 1975a.
- Selkirk, J.K., Croy, R.G., and Gelboin, H.V.: Isolation by high pressure liquid chromatography and characterisation of benzo(a)pyrene-4,5-epoxide as a metabolite of benzo(a)pyrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 322-326, 1975b.
- Shen, A.L., Fahl, W.E., Wrighton, S.A., and Jefcoate, C.R.: Inhibition of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol metabolism of benzo(a)pyrene quinines. *Cancer Res.* 39, 4123-4129, 1979.
- Shimada, T., and Sato, R.: Inhibition of mono-oxygenase activities by 1,1,1-trichloropropene 2,3-oxide, an inhibitor of epoxide hydrolase, in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1777-1781, 1979.
- Shimada, T., Martin, M.V., Pruess-Schwartz, D., Marnett, L.J., Guengerich, F.P.: Roles of individual human cytochrom P-450 enzymes in the bioactivation of benzo[*a*]pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 49, 6304-6312, 1989.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R.: Activation of chemically diverse procarcinogenes by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 56, 2979-2984, 1996.
- Shimada T, Gillam EM, Oda Y, Tsumura F, Sutter TR, Guengerich FP, Inoue K.: Metabolism of benzo[*a*]pyrene to trans-7,8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo[*a*]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 623-9, 1999.

- Shou, M., Harvey, R.G., Penning, T.M.: Contribution of dihydrodioldehydrogenase to the metabolism of (\pm)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in fortified rat liver subcellular fractions. *Carcinogenesis* 13, 1575-1582, 1992.
- Shou, M., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V.: Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A2, 1A2, and epoxide hydrolase. *Biochemistry* 49, 15807-15813, 1996.
- Sidman, J.W.: The electronic spectra and structure of the quinines. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4567-4572, 1956.
- Sims, P.: The metabolism of benzo[a]pyren by rat liver homogenates. *Biochem. Pharmacol.* 16, 613-618, 1974.
- Sims, P., Grover, P.L.: Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 20, 165-274, 1974a.
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal., K., Hewer, A.: Metabolic activation of Benzo[a]pyren proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252, 326-327, 1974b.
- Skipper, P.L., Peng, X., SooHoo, C.K., Tannenbaum, S.R.: Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure. *Drug. Metab. Rev.* 26, 111-124, 1994.
- Slaga, T.J., Bracken, W.J., Gleason, G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M., Conney, A.H.: Marked differences in the skin tumor-iniating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Res.* 39, 67-71, 1979.
- Smithgall, T.E., Harvey, R.G., Penning, T.M.: Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 4, 1814-1820, 1988.
- Snyder, L.R.: Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr.*, 92, 223-230, 1974.
- Stansbury, K.H., Flesher, J.W., Gupta, R.C.: Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from benzo[a]pyrene in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 254-259, 1994.
- Stansbury, K.H., Noll, D.M., Groopman, J.D., Trush, M.A.: Enzyme-mediated dialdehyde formation: An alternative pathway for benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol bioactivation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1174-1180, 2000.
- Stewart, J.G., Williams, P.A.: Formulation of multicomponent mobile solvents for liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 198, 489-494, 1980.
- Stohs, S.J., Grafstrom, R.C., Burke, M.D., and Orrenius, S.: Benzo[a]pyren Metabolism by Isolated Rat Intestinal Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 71-80, 1977.
- Surh, Y.-J., Liem, A., Miller, E.C., Miller, J.A.: Metabolic activation of the carcinogen 6-hydroxymethylbenz[a]pyrene: formation of an electrophilic sulphuric acid ester and benzylic DNA adducts in rat liver in vivo and in reactions in vitro. *Carcinogenesis* 10, 1519-1528, 1989.
- Swierenga, S.H.H., Heddle, J.A., Sigal, E.A., Gelman, J.P.W., Brillinger, R.L., Douglas, G.R., Nestmann, E.R.: Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberration and sister-chromatid ex-

- change in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 249, 301-322, 1991.
- Thakker, D.R., Yagi, H., Lu, A.Y.H., Levin, W., Conney, A.H., Jerina, D.M.: Metabolism of Benzo[a]pyrene: conversion of (\pm)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to highly mutagenic 7,8-diol-9,10-epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3381-3385, 1976.
- Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Ryan, D., Thomas, P.E., Karle, J.M., Lehr, R.E., Jerina, D.M., and Conney, A.H.: Metabolism of benzo[a]anthracene to its tumorigenic 3,4-dihydrodiol. *Mol. Pharmacol.* 15, 138-153, 1979.
- Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Tada, M., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H., and Jerina, D.M.: Stereoselective metabolism of the (+)- and (-)-enantiomers of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[a]anthracene by rat liver microsomes and by a purified and reconstituted cytochrome P-450 system. *J. Biol. Chem.* 257, 5103-5110, 1982.
- Thakker, D.R., Yagi, H., Levin, W., Wood, A.W., Conney, A.H., and Jerina, D.M.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolic activation to ultimate carcinogens. In: *Bioactivation of foreign compounds* [Anders, M.W. (eds.)] pp 177-242, Academic Press, Orlando, 1985.
- Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Yeh, H.J.C., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H., Jerina, D.M.: Stereoselective metabolism of the (+)-(S,S)- and (-)-(R,R)-enantiomers of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[c]phenanthrene by rat and mouse liver microsomes and by purified and reconstituted P-450 system. *J. Biol. Chem.* 261, 5404-5413, 1986.
- Thakker, D.R., Boehlert, C., Mirsadeghi, S., Levin, W., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Yagi, H., Pannell, L.K., Sayer, J.M., and Jerina, D.M.: Differential stereoselectivity on metabolism of triphenylene by cytochromes P-450 in liver microsomes from 3-methylcholanthren- and phenobarbital-treated rats. *J. Biol. Chem.* 263, 98-105, 1988.
- Tebbens, B.D., Thomas J.F., and Mukai, M.: Aromatic Hydrocarbon Production Related to Incomplete Combustion. *A.M.A. Arch. Ind. Health*, 13, 567-573, 1956a.
- Tebbens, B.D., Thomas J.F., and Mukai, M.: Hydrocarbon Synthesis in Combustion. *A.M.A. Arch. Ind. Health*, 13, 567-573, 1956b.
- Thomas, P.E., Reik, L.M., Ryan, D.E., and Levin, W.: Induction of two immunochemically related rat liver cytochrome P-450 isozymes, cytochromes P-450c and P-450d, by structurally diverse xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 258, 4590-4598, 1983.
- Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., Shuker, L.: Human carcinogens so far identified. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 795-807, 1989.
- Van Duuren, B.L., Sivak, A., Langseth, L., Goldschmidt, B.M., Segal, A.: Initiators and promoters in tobacco carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 28, 173-180, 1968.
- Van Duuren, B.L., Katz, C., and Goldschmidt, B.M.: Cocarcinogenic agents in tobacco carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 703-705, 1973.
- Van Duuren, B.L., and Goldschmidt, B.M.: Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 1237-1241, 1976.
- Van Gorp, J.R., and Hankinson, O.: Single-step phototoxic selection procedure for isolating cells that possess aryl hydrocarbon hydroxylase. *Cancer Res.* 43, 6031-6038, 1983.

- Vyas, K.P., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D.R., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H., and Jerina, D.M.: Stereoselective metabolism of the (+)- and (-)-enantiomers of trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene to bay-region 1,2-diol-3,4-epoxide diastereomers by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.* 22, 182-189, 1982.
- Vyas, K.P., van Bladeren, P.J., Thakker, D.R., Yagi, H., Sayer, J.M., Levin, W., Jerina, D.M.: Regioselectivity and stereoselectivity in the metabolism of trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrobenz[a]anthracene by rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 24, 115-123, 1983.
- Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M., Ozawa, N.: A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science* 215, 403-405, 1982.
- Watabe, T., Hakamata, Y., Hiratsuka, A., Ogura, K.: A 7-hydroxymethyl sulphate ester as an active metabolite of the carcinogen, 7-hydroxymethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 7, 207-214, 1986.
- Watabe, T., Hiratsuka, A., Ogura, K.: Sulphotransferase-mediated covalent binding of the carcinogen 7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene to calf thymus DNA and its inhibition by glutathione transferase. *Carcinogenesis* 8, 445-453, 1987.
- Weems, H.B., Mushtaq, M., and Yang, S.K.: Resolution of epoxide enantiomers of polycyclic aromatic hydrocarbons by chiral stationary-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 148, 328-338, 1985.
- Weems, H.B., Fu, P.P., and Yang, S.K.: Stereoselective metabolism of chrysene by rat liver microsomes. Direct separation of diol enantiomers by chiral stationary phase high-performance liquid chromatography. *Carcinogenesis* 7, 1221-1230, 1986.
- Weinberg, R.E.: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 3713-3721, 1989.
- Westendorf, J.: Ausserplanmäßige DNA-Synthese (UDS). In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* [Fahrig, R. (ed.)] Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 199-206, 1993.
- Wiebel, F.J.: Metabolism of monohydroxybenzo[a]pyrenes by rat liver microsomes and mammalian cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, 168, 609-621, 1975.
- Wilson, N.M., Christou, M., Turner, C.R., Wrighton, S.A., and Jefcoate, C.R.: Binding and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by seven purified forms of cytochrome P-450. *Carcinogenesis* 5, 1475-1483, 1984.
- Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P.M., Jerina, D.M., Conney, A.H.: Mutagenicity and cytotoxicity of benzo[a]pyrene arene oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells. *Cancer Res.* 36, 3350-3357, 1976.
- Wislocki, P.G., Bagan, E.S., Lu, A.Y.H., Dooley, K.L., Fu, P.P., Han-Hsu, H., Beland, F.A., Kadlubar, F.F.: Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay. *Carcinogenesis* 7, 1317-1322, 1986.
- Wood, A.W., Goode, R.L., Chang, R.L., Levin, W., Conney, A.H., Yagi, H., Dansette, P.M., Jerina, D.M.: Mutagenic and cytotoxic activity of benzo[a]pyrene-4,5-, 7,8-, and 9,10-oxides and the six corresponding phenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 3176-3180, 1975.

- Wood, A.W., Wislocki, P.G., Chang, R.L., Levin, W., Lu, A.Y.H., Yagi, H., Hernandez, P., Jerina, D.M., Conney, A.H.: Mutagenicity and cytotoxicity of benzo[a]pyrene benzo-ring epoxides. *Cancer Res.* 36, 3358-3366, 1976.
- Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D.R., Jerina, D.M., Conney, A.H.: Differences in mutagenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1389-1396, 1977.
- Wood, A.W., Levin, W., Thakker, D.R., Yagi, H., Chang, R.L., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Dansette, P.M., Whittaker, N., Turujman, S., Lehr, R.E., Kumar, S., Jerina, D.M., and Conney, A.H.: Biological activity of benzo[e]pyrene. An assessment based on mutagenic activities and metabolic profiles of the polycyclic hydrocarbon and its derivatives. *J. Biol. Chem.* 254, 4408-4415, 1979.
- Wynder, E.L. & Gori, G.B.: Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 825-832, 1977.
- Yagi, H., Vyas, K.P., Tada, M., Thakker, D.R., Jerina, D.M.: Synthesis of the enantiomeric bay-region diol epoxides of benz[a]anthracene and chrysene. *J. Org. Chem.* 47, 1110-1117, 1982.
- Yagi, H., Thakker, D.R., Ittah, Y., Croisy-Delcey, M., Jerina, D.M.: Synthesis and assignment of absolute configuration to the trans-3,4-dihydrodiols and 3,4-diol-1,2-epoxides of benzo[c]phenanthrene. *Tetrahedron Lett.* 24, 1349-1325, 1983.
- Yagi H., Jerina, D.M., Kasperek, G.J., Bruice, T.C.: A novel mechanism for the NIH-shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 69, 1985-1986, 1972.
- Yamagawa, K. & Ichikawa, K.: Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste. *Mitt. Med. Fak. Kaiserl. Univ. Tokio* 15, 295-344, 1915.
- Yan, J., Wang, L., Fu, P.P., Yu, H.: Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Res.* 557, 99-108, 2004.
- Yang, S.K., Roller, P.P., Fu, P.P., Harvey, R.G., Gelboin, H.V.: Evidence of a 2, 3-epoxide as an intermediate in the microsomal metabolism of benzo[a]pyrene to 3-hydroxybenzo[a]pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 77, 1176-1182, 1977a.
- Yang, S.K., Roller, P.P., and Gelboin, H.V.: Enzymatic mechanism of benzo[a]pyrene conversion to phenols and diols and an improved high-pressure liquid chromatographic separation of benzo[a]pyrene derivatives. *Biochemistry* 16, 3680-3687, 1977b.
- Yang, S.K., Chou, M.W., Wislocki, P.G., and Lu, A.Y.H.: Metabolism of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene: Quantification of metabolite formations in rat liver microsomes and a reconstituted enzyme system containing highly purified cytochrome P-450 or P-448. . In: *Polycyclic hydrocarbons and cancer: chemistry and biological effects* [(Gelboin, H.V., Ts'o, P.O. (eds.))] pp. 733-752. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.
- Yang, S.K., Mushtaq, M., and Chiu, P.L.: Stereoselective metabolism and activations of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis* [Harvey, R.G. (ed.)] ACS Symposium Series No. 283, pp. 19-34, American Chemical Society, Washington, D.C. 1985.

- Yang, S.K., and Chiu, P.L.: Cytochrome P-450-catalyzed stereoselective epoxidation at the K-region of benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 546-552, 1985.
- Yang, S.K., and Bao, Z.-P.: Stereoselective formations of K-region and non-K-region epoxides in the metabolism of chrysene by rat liver microsomal cytochrome P-450 isozymes. *Mol. Pharmacol.* 32, 73-80, 1987.
- Yang, S.K., Mushtaq M., Weems H.B., Miller, D.W., and Fu, P.P.: Stereoselective formation and hydration of 12-methylbenz[a]anthracene 5,6-epoxide enantiomers by rat liver microsomal enzymes. *Biochem. J.* 245, 191-204, 1987.
- Yang SK.: Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem. Pharmacol.* 37, 61-70, 1988.
- Yang, Y., Griffiths, W.J., Nordling, M., Nygren, J., Möller, L., Bergman, J., Liepinsh, E., Otting, G., Gustaffson, F.-A., Rafter, J., Sjövall, J.: Ring opening of benzo[a]pyrene in the germ-free rat is a novel pathway for formation of potentially genotoxic metabolites. *Biochemistry* 39, 15585-15591, 2000.
- You, M., Candrian, U., Maronpot, R.R., Stoner, G.D., Anderson, M.W.: Activation of the K-ras protooncogene in spontaneously occurring and chemically-induced lung tumors of the strain A mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3070-3074, 1989.
- Yu, H.: Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinogen. Ecotoxic. Rev.* 20, 149-183, 2002.
- Yun, C-H., Shimada, T., Guengerich, F.P.: Roles of human liver cytochromes P4502C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 52, 1868-1874, 1992.
- Zhang, F., Cortez, C., and Harvey, R.G.: New Synthetic approaches to Polycyclic aromatic hydrocarbons and their Carcinogenic Oxidized metabolites: Derivates of benzo[s]picene, benzo[rsf]pentaphene, and dibenzo[b,def]chrysene. *J. Org. Chem.* 65, 3952-3969, 2000.
- Zimmermeyer, B., Roge, G., Schöbronath, J.: Minderung der Emission von PAH am Beispiel einiger stationären Anlagen. In: *Krebserzeugende Stoffe in der Umwelt. Herkunft, Messung, Risiko, Minimierung.* VDI-Berichte 888, 93-115, 1991.

7 Anhang

Im Anhang werden die in den Ergebnissen nicht gezeigten Spektren der synthetischen und enzymatischen Derivate von Benzo[ghi]perylen und Anthanthren dargestellt.

7.1 Spektroskopische Daten (FD-MS) der synthetischen Derivate von Benzo[ghi]perylen

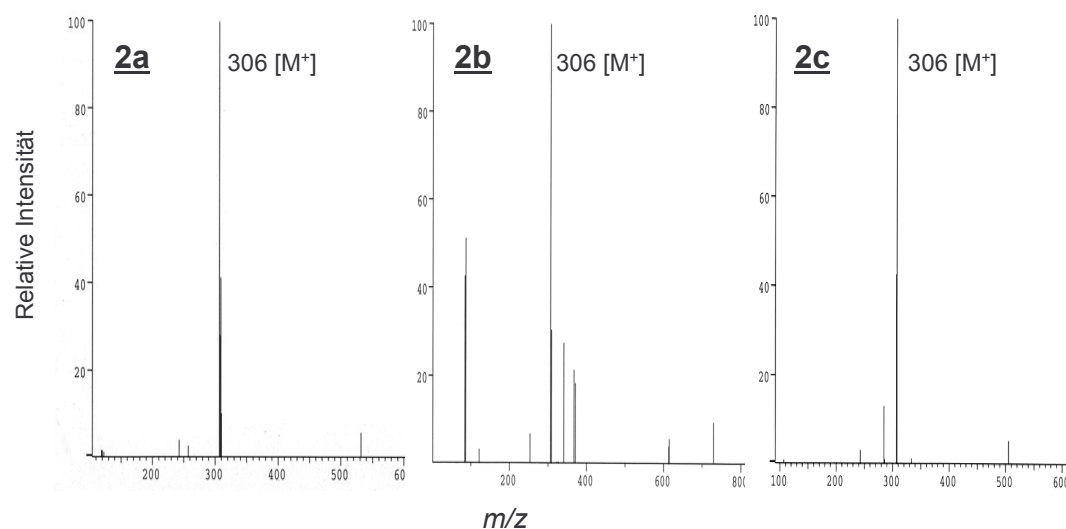


Abbildung 7.1: FD-Massenspektren der Chinone des Benzo[ghi]perylens **2a**, **2b**, **2c** (Abschn. 2.1.3.2). Abkürzungen s. Tab. 3.7.

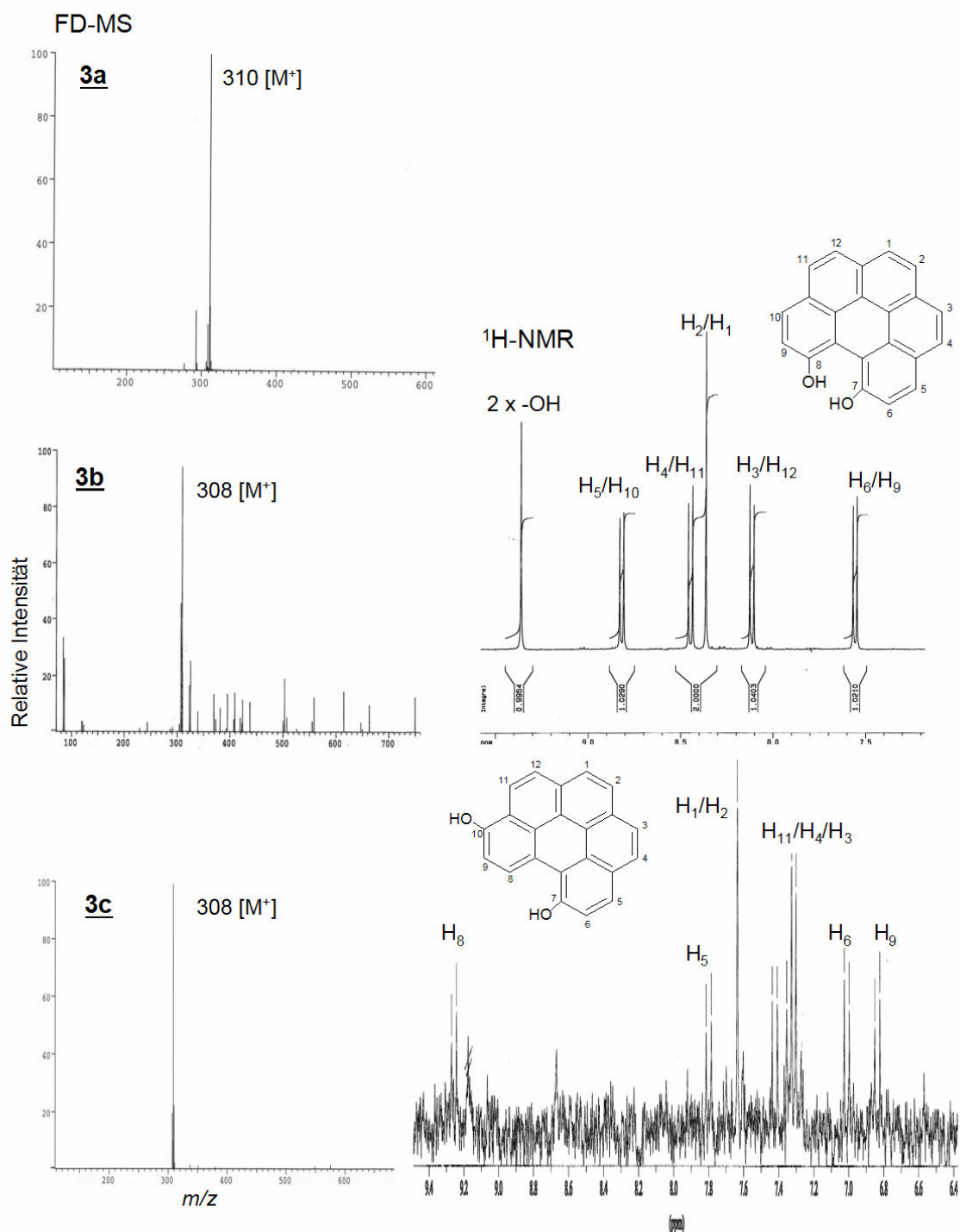


Abbildung 7.2: FD-Massenspektren der Reduktionsprodukte der Chinone des Benzo[ghi]-perylens **3a**, **3b**, **3c** und ¹H-NMR-Spektren von **3b** und **3c** (s. Abschn. 2.1.4.1). Abkürzungen s. Tab. 3.7

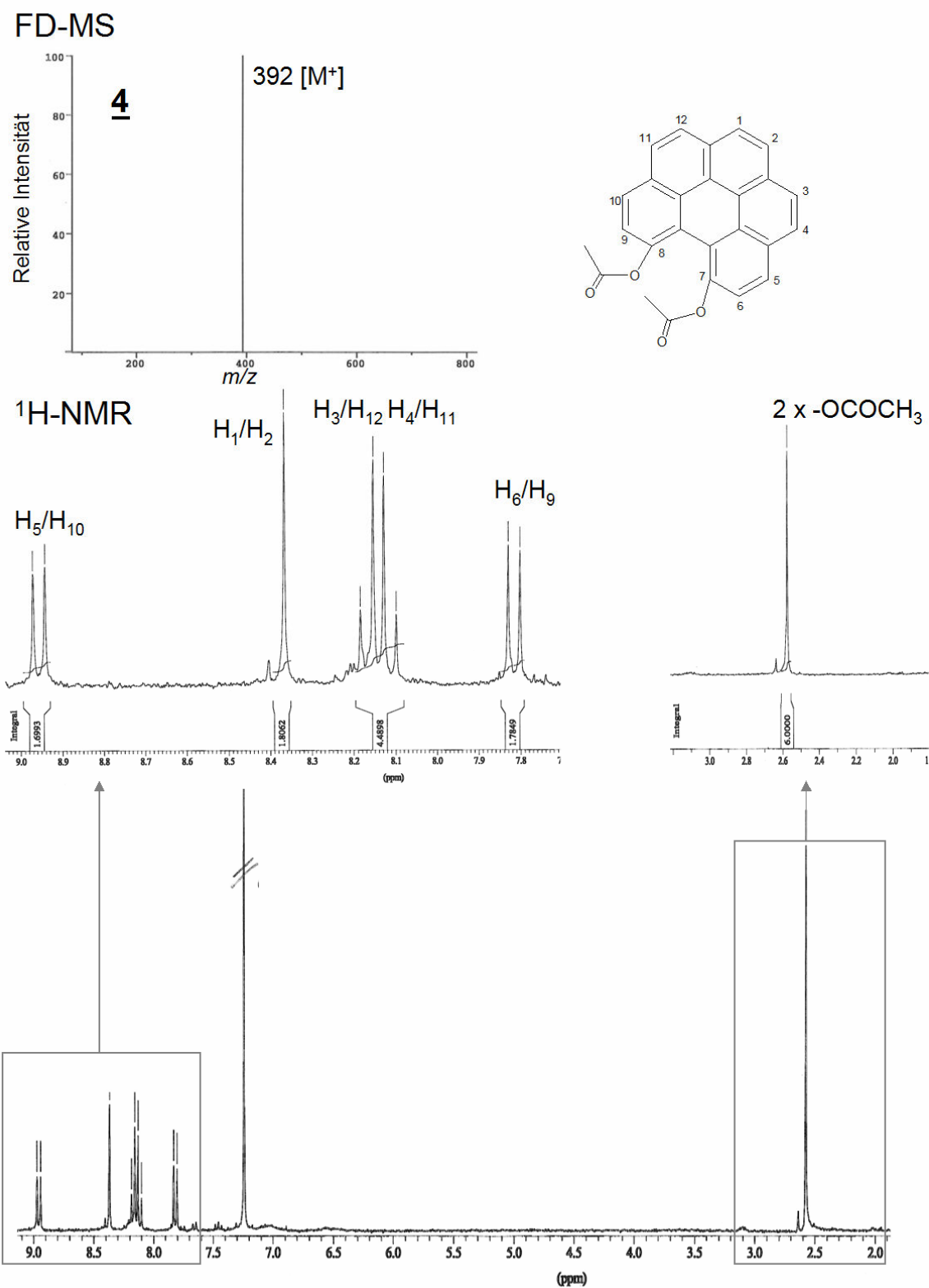


Abbildung 7.3: FD-Massenspektrum und ¹H-NMR von 7,8-Diacetoxybenzo[ghi]perylene 4 (s. Abschn. 2.1.4.2).

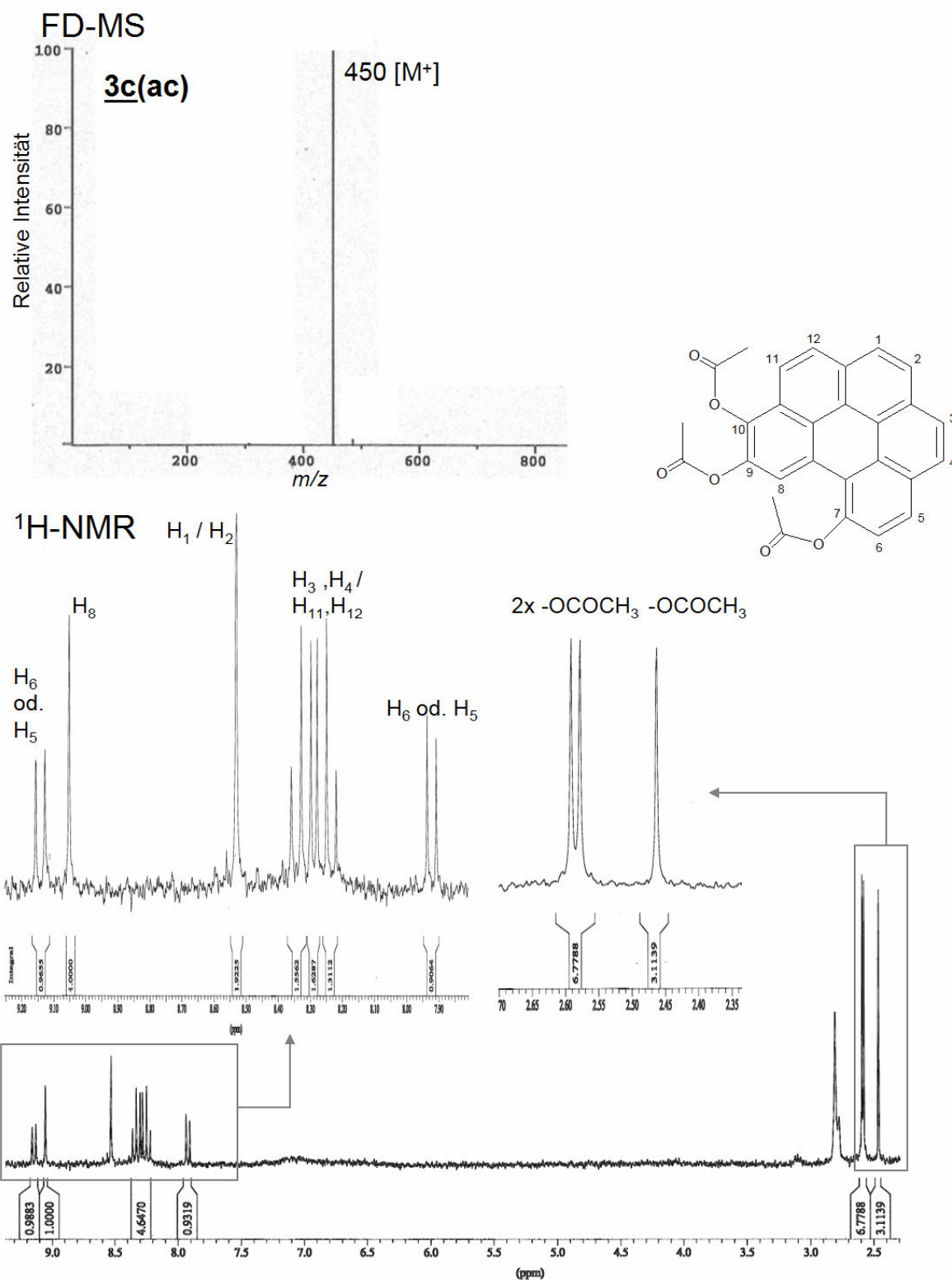


Abbildung 7.4: FD-Massenspektrum und ¹H-NMR von 7,9,10-Triacetoxybenzo[ghi]perylene **3c(ac)** (s. Abschn. 3.1.2.1).

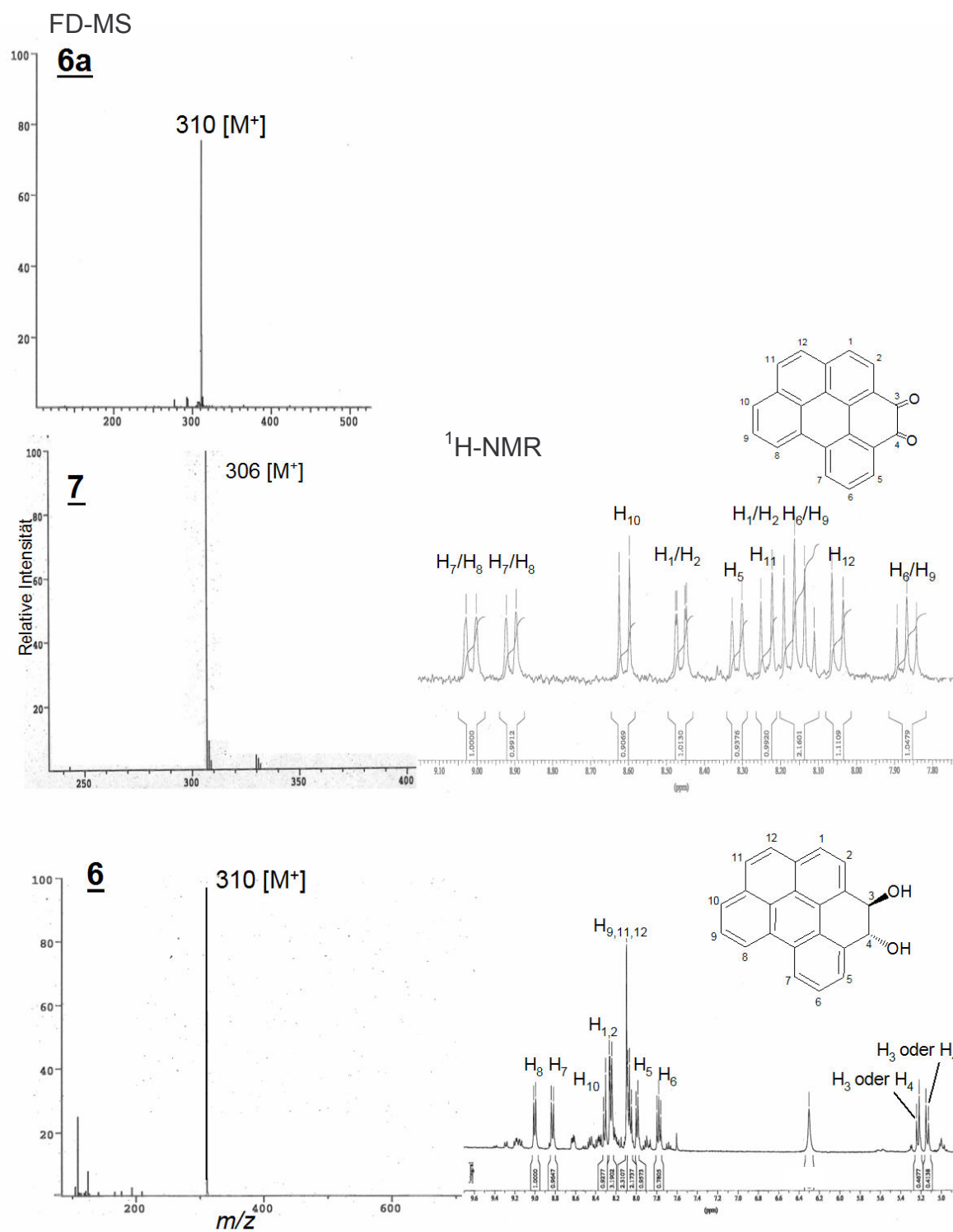


Abbildung 7.5: FD-Massenspektrum (FD-MS) des *cis*-3,4-Dihydrodiols **6a** und FD-MS und ¹H-NMR-Spektren des 3,4-Chinons **7** und *trans*-3,4-Dihydrodiols **6** (s. Abschn. 2.2.5.1)

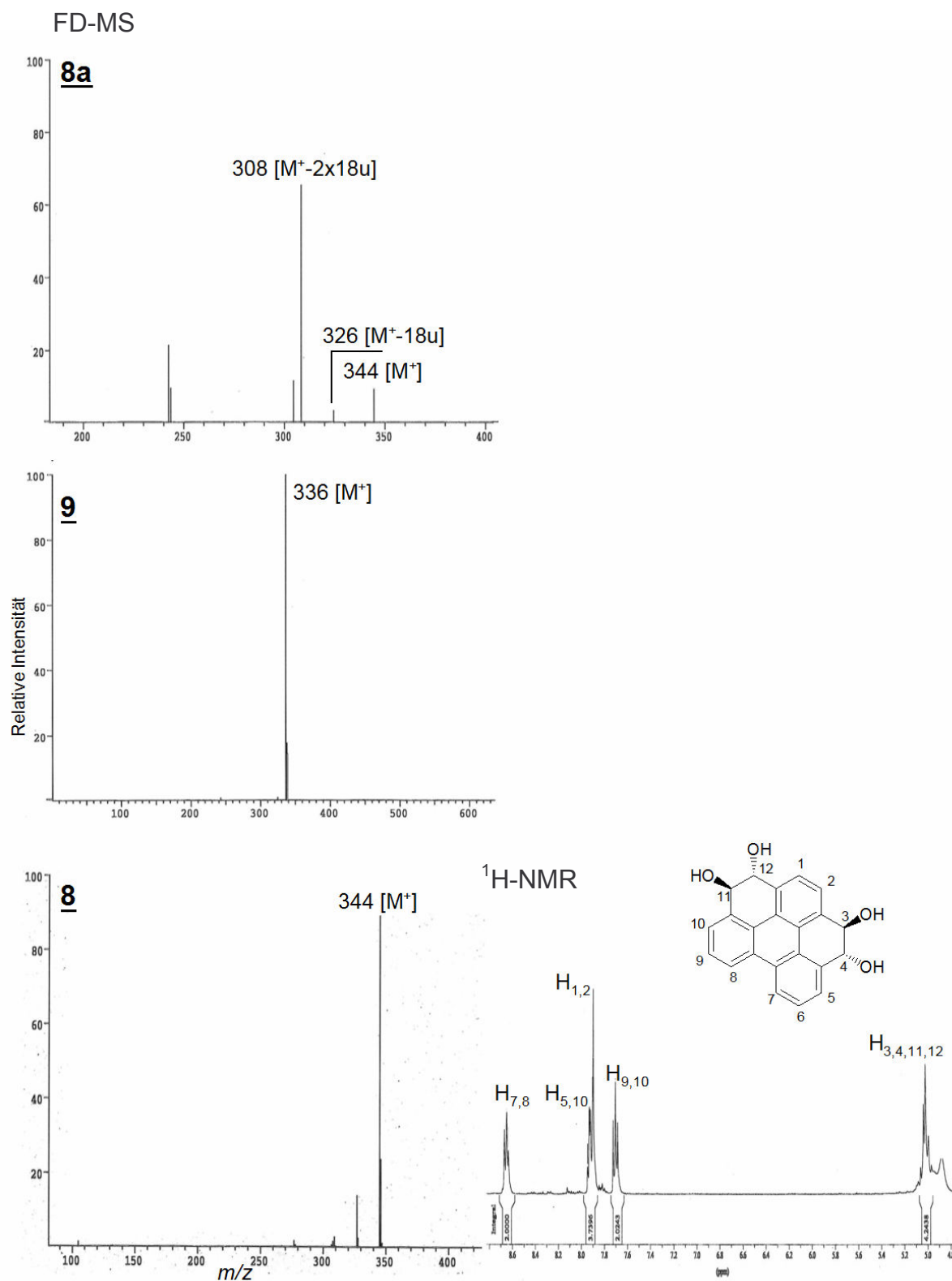


Abbildung 7.6: FD-Massenspektren (FD-MS) des *cis,cis*-3,4,11,12-Bisdihydrodiols **8a** und 3,4,11,12-Bischinons **9**, FD-MS und ¹H-NMR-Spektrum des *trans*-3,4-*trans*-11,12-Bisdihydrodiols **6** (s. Abschn. 2.1.5.2)

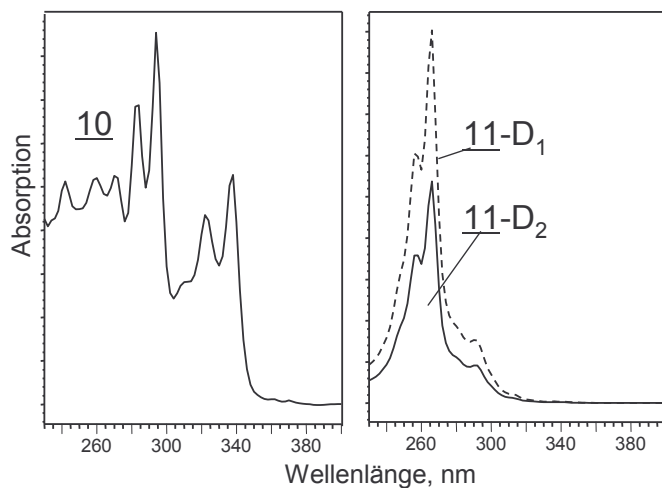


Abbildung 7.7: UV-Spektren von *trans*-3,4-Bis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4-dihydrobenzo[ghi]perylene **10** und *trans*-3,4-*trans*-11,12-Tetrakis [(α -menthoxyacetyl)oxy]-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene **11** (s. Abschn.2.1.6)

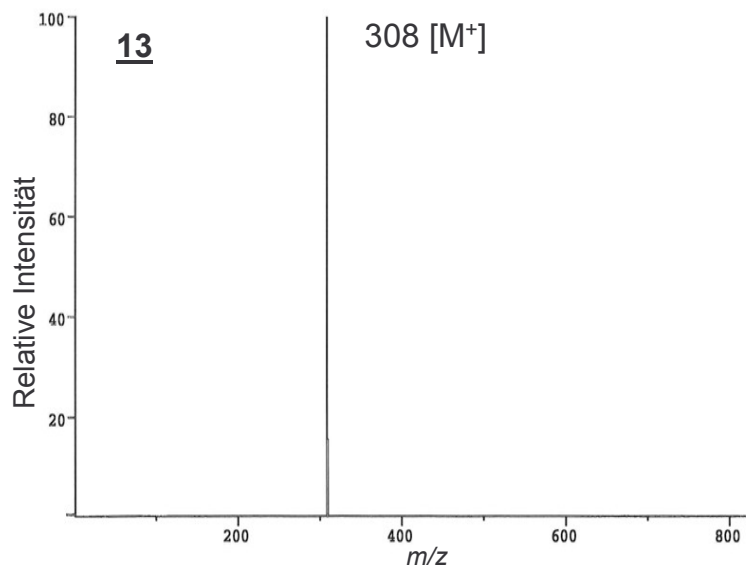


Abbildung 7.8: FD-Massenspektrum von 3,4,11,12-Bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydrobenzo[ghi]perylene **13** (s. Abschn. 2.1.7.2).

7.2 Spektroskopische Daten zu den Metaboliten von Anthanthren

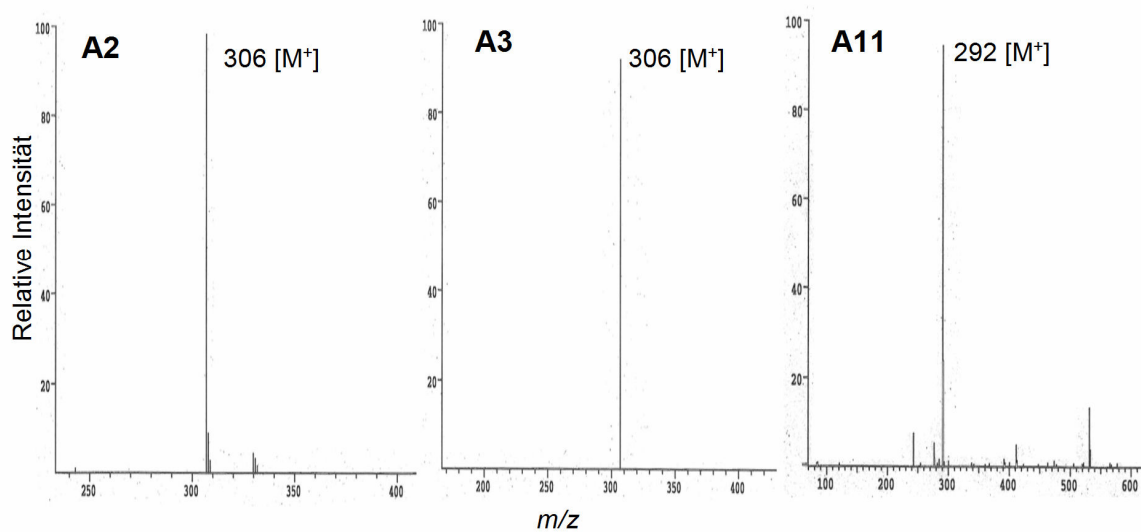


Abbildung 7.9: FD-Massenspektren der Metaboliten A2, A3 und A11 von Anthanthren; Abschn. 3.3.1, Abkürzungen s.Tab. 3.2

7.2.1 Vorversuch zur Strukturaufklärung der Metaboliten A2 und A3

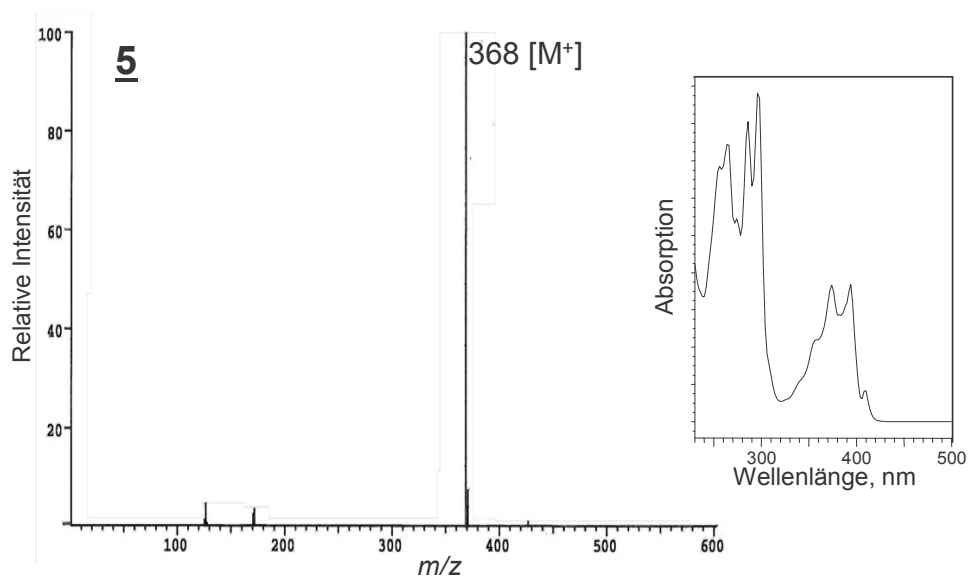


Abbildung 7.10: FD-Massenspektrum und UV-Spektrum von 1,6-Diacetoxybenzo[a]pyren 5 (s. Abschn. 2.1.4.3)

7.3 Spektroskopische Daten zu den Metaboliten von Benzo[ghi]perylen

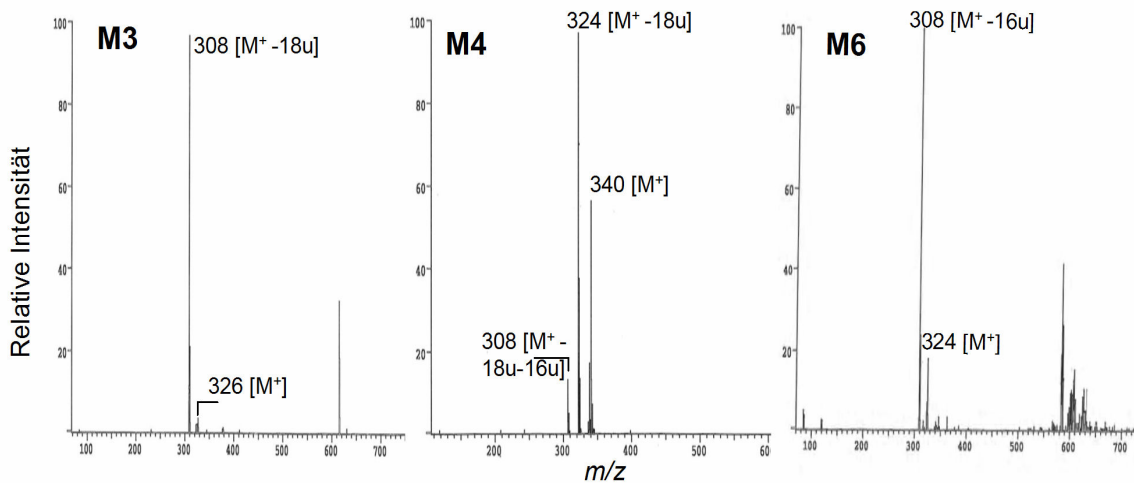


Abbildung 7.11: FD-Massenspektren der Metaboliten M3, M4, und M6; Abschn. 3.4.1, Abkürzungen s. Tab. 3.7

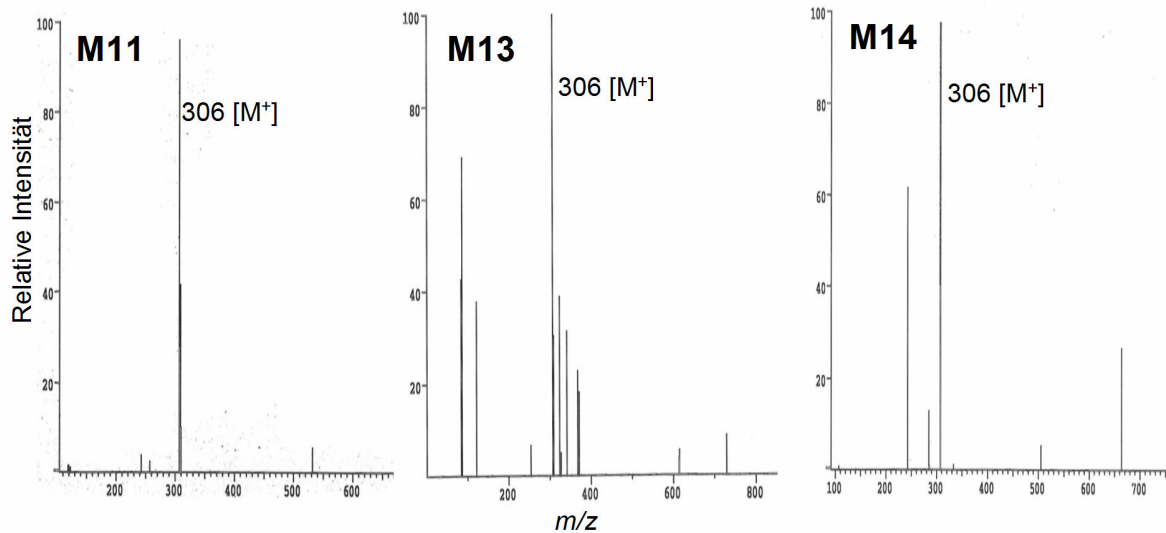


Abbildung 7.12: FD-Massenspektren der Metaboliten M11, M13, M14 von Benzo[ghi]perylen; Abschn. 3.4.1, Abkürzungen s. Tab. 3.7

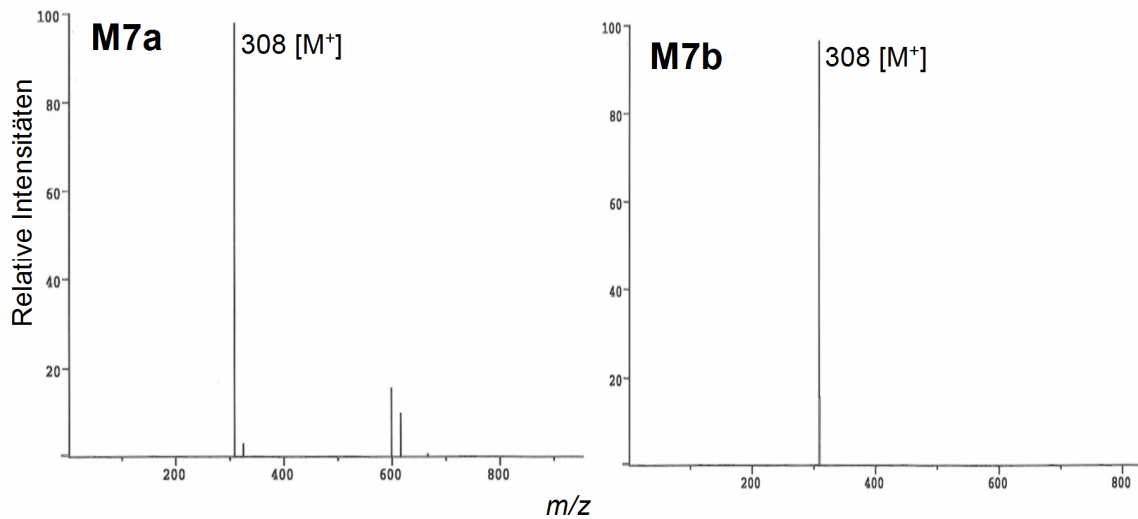


Abbildung 7.13: FD-Massenspektren der Metaboliten M7a und M7b von Benzo[ghi]perylen, Abschn. 3.4.1.2, Abkürzungen s. Tab. 3.7

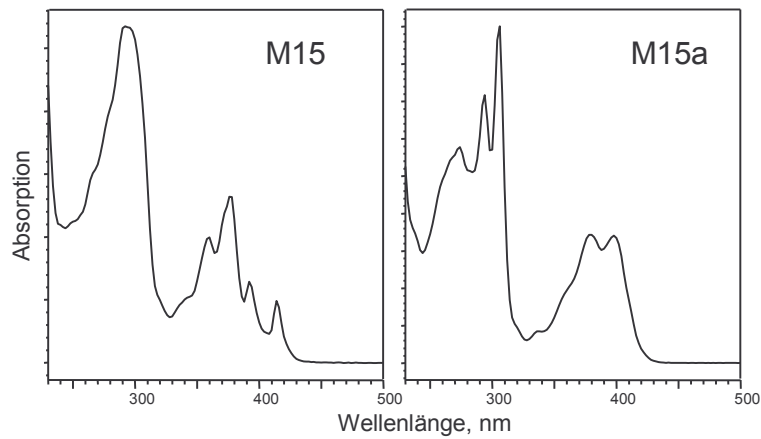


Abbildung 7.14: UV-Spektren der Metaboliten M15 und M15a von Benzo[ghi]perylen, Abschn. 3.4.1, Abkürzungen s. Tab. 3.7

7.4 Eichgeraden der Metaboliten von Benzo[ghi]perylen

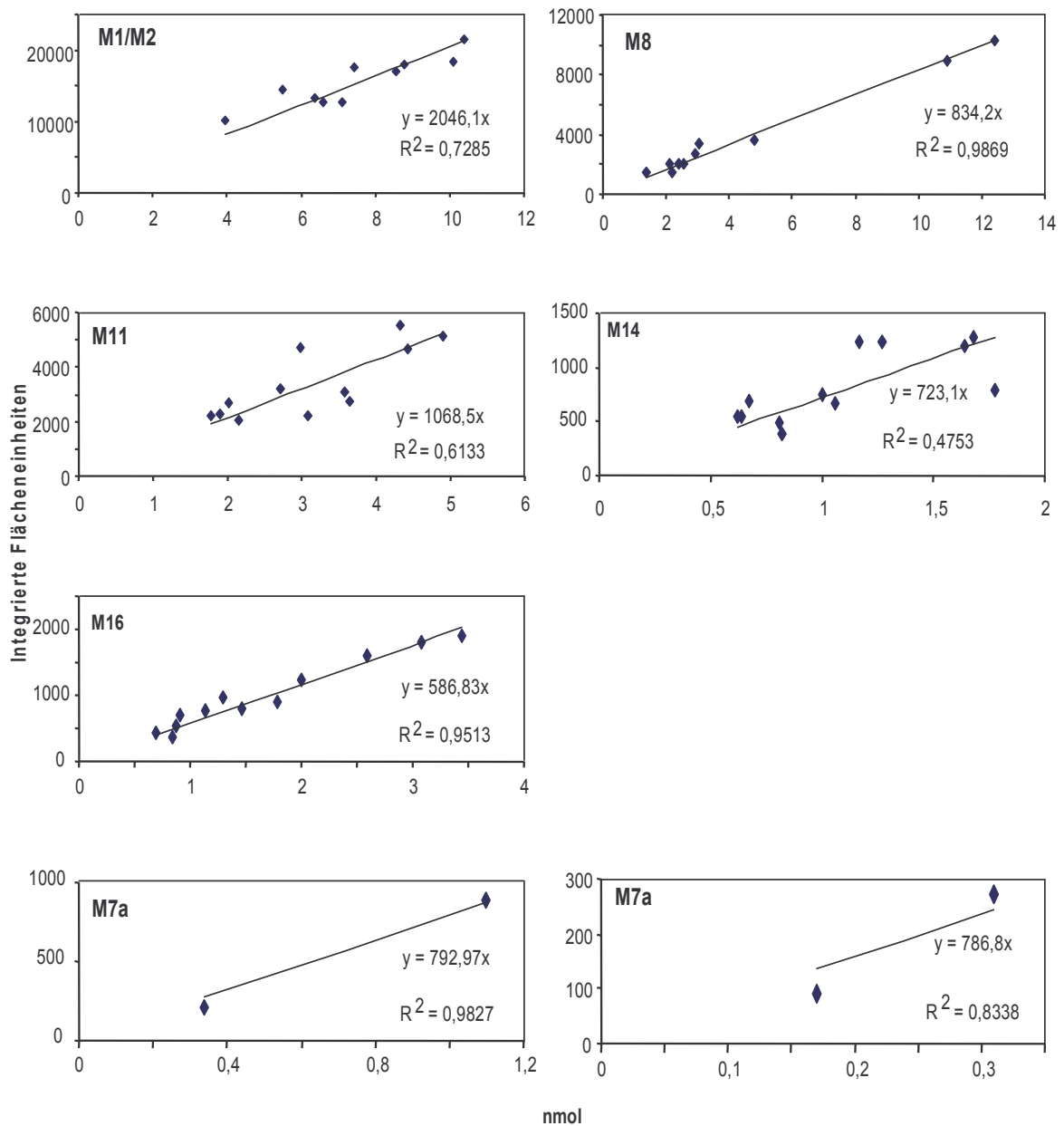


Abbildung 7.15: Eichgeraden der Metaboliten Benzo[ghi]perylen; Abschn. 3.5, Abkürzungen, s. Tab. 3.7

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Grupe

Anschrift: Am Römertor 20, 55116 Mainz

Familienstand: ledig

Geburtsdatum: 04.04.1972

Geburtsort: Frankfurt a. M.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1978 – 07/1983	Grundschule Lorsbach	Hofheim a.T.
08/1983 – 07/1989	Elisabethen-Schule	Hofheim a.T.
08/1989 – 07/1992	Gymnasiale Oberstufe	Hofheim a.T.

Berufliche Ausbildung

08/1992 – 08/1994	Ausbildung zur Pharmazeutisch Technischen Assistentin im Stiftung Kollegium Pharmazeutikum in Frankfurt a. M.	
09/1994 – 02/1995	Praktikum Stein'sche Apotheke	Hofheim a.T.
03/1995	Praktische Prüfung	

Hochschulausbildung

SS1995 – SS1999	Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg- Universität, Mainz
11/1999 – 11/2000	Praktisches Jahr Schiller-Apotheke, Mainz
11/2000	3. Staatsexamen und Approbation zum Apotheker
Seit 12/2000	Promotion im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg- Universität, Mainz in der AG Prof. Dr. K.L. Platt über das The- ma: „ <i>Untersuchung der mikrosomalen Biotransformation von Benzo[ghi]perylen, einem polyaromatischen Kohlenwasserstoff ohne dem Strukturelement einer Bay-Region des kanzerogenen Benzo[a]pyrens.</i> “
09/2003 – 02/2005	Stipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG) der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Publikationen

(Artikel, Vorträge, Poster)

Grupe, S., Degenhardt, C., Frank, H., Seidel, A., Platt, K.L.:

Biotransformation of anthanthrene and benzo[ghi]perylene, genotoxic polyaromatic hydrocarbons without a bay-region.

43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 2002.

Grupe, S., Fickler, M., Platt, K.L.:

Phase I biotransformation of benzo[ghi]perylene, a genotoxic polyaromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region.

19th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds. Amsterdam, NL, 21.–25. September 2003

Platt, K. L., **Grupe, S.**, Fickler, M.:

Mutagenicity, biotransformation and DNA binding of benzo[ghi]perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region.

46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 2005.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 371 (Suppl. 1) (2005) R98/412

Platt, K. L., Degenhardt, C., **Grupe, S.**, Frank, H., Seidel, A.:

Microsomal activation of dibenzo[def,mno]chrysene (anthanthrene), a hexacyclic aromatic hydrocarbon without a bay-region, to mutagenic metabolites.

Chem. Res. Toxicol., 15 (2002) 332-342

Platt, K.L., **Grupe, S.**: Microsomal biotransformation of benzo[ghi]perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region.

Chemical Research in Toxicology, im Druck, 2005