

Aus dem Walther-Straub-Institut  
für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. T. Gudermann

---

# **Beitrag zur Aktivierung von Myosmin**

---

Dissertation zum  
Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von  
Christof Högg  
aus  
Rosenheim

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Wolfgang Zwickenpflug

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2011

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Myosmin . . . . .	3
1.1.1 Entdeckung und Vorkommen . . . . .	3
1.1.2 Physikalisch chemische Eigenschaften . . . . .	5
1.1.3 Synthese . . . . .	5
1.1.4 Toxikologie von Myosmin . . . . .	6
1.1.5 Biosynthese . . . . .	7
1.2 Bisher bekannte in vitro und in vivo Aktivierungen von Myosmin . . . . .	9
1.2.1 Nitrosierung von Myosmin . . . . .	9
1.2.2 Peroxidierung von Myosmin . . . . .	11
1.2.3 Metabolismus von Myosmin in der Wistar-Ratte nach peroraler Verabreichung . . . . .	13
1.2.4 Übersicht . . . . .	14
1.3 DNA-Addukte . . . . .	15
<b>II Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2 Material</b>	<b>21</b>
2.1 Geräte . . . . .	21

2.2	Materialien . . . . .	28
2.3	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Peroxidation von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd . . . . .	33
3.2	Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte . . . . .	34
3.2.1	Synthese von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion [62] . . . . .	34
3.2.2	Synthese von 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	35
3.2.2.1	3',5'-Diacetyl-thymidin [63] . . . . .	35
3.2.2.2	3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin [63] . . . . .	35
3.2.2.3	3-(3''-Picolyl)thymidin [64] . . . . .	35
3.3	Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben . . . . .	37
3.3.1	Isolierung der DNA aus Gewebeproben und Bestimmung der DNA-Konzentration . . . . .	37
3.3.2	Vorversuch zur Derivatisierung von 3-Pyridylmethanol mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC) . . . . .	38
3.3.3	Hydrolytische Spaltungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	38
3.3.3.1	Vorversuche mit verschiedenen Säuren und Basen . . . . .	38
3.3.3.2	Spaltungsversuche mit Perchlorsäure ( $HClO_4$ ) . . . . .	39
3.4	Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben . . . . .	40
3.4.1	Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA [65] . . . . .	40
3.4.2	Fluoreszenz Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	41
3.4.2.1	Derivatisierung mit Dansylchlorid [66] . . . . .	41
3.4.2.2	Derivatisierung mit 1-Naphthylisocyanat [70] . . . . .	41
3.4.2.3	Derivatisierung mit 2-Naphthoylchlorid [71] . . . . .	43

<b>III</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	Peroxidation von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd . . . . .	47
4.2	Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte . . . . .	58
4.2.1	Synthese von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion . . . . .	58
4.2.2	Synthese von 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	64
4.2.3	Zusammenfassung der Messergebnisse und Vergleich der NMR-Daten . . . . .	70
4.3	Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben . . . . .	73
4.3.1	Derivatisierung von 3-Pyridylmethanol mit PFBC . . . . .	73
4.3.2	Hydrolytische Spaltung des Standards 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	76
4.3.2.1	Vorversuche mit verschiedenen Säuren und Basen . . . . .	76
4.3.2.2	Spaltungsversuche mit Perchlorsäure . . . . .	84
4.3.2.3	Zusammenfassung der Spaltungsversuche . . . . .	96
4.4	Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben . . . . .	97
4.4.1	Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA . . . . .	98
4.4.2	Fluoreszenz Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin . . . . .	103
4.4.2.1	Derivatisierung mit Dansylchlorid . . . . .	104
4.4.2.2	Derivatisierung mit 1-Naphthylisocyanat . . . . .	111
4.4.2.3	Derivatisierung mit 2-Naphthoylechlorid . . . . .	128
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>131</b>
5.1	Peroxidierung von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd . . . . .	131
5.2	Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte . . . . .	133
5.3	Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben . . . . .	134

5.4 Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picoly)thymidin in Gewebeproben . . . . .	135
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>Danksagung</b>	<b>149</b>

# Zusammenfassung

Myosmin gehört zur Gruppe der Tabakalkaloide und konnte, außer in Tabak, ebenso in Lebensmitteln nachgewiesen werden. In einer Vielzahl von Grundnahrungsmitteln lässt sich diese Substanz auffinden. Ihr allgemeines Vorkommen konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass Myosmin über die Nahrung von jedem Menschen - unabhängig von seinen zusätzlichen Rauchgewohnheiten - aufgenommen wird. Die Risikobewertung ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Die im Metabolismus der Ratte gefundenen Abbauprodukte zeigen auf, dass auch bei einer Aktivierung bis zu einem elektrophilen Intermediat, welches mit der DNA oder Proteinen interagieren könnte, zusätzliche Mechanismen erklärt werden müssen. So kann bei dem Auffinden einiger Stoffwechselprodukte, z.B. dem 3-Pyridylmethanol gezeigt werden, dass dessen Entstehung auch über nicht Cytochrom P450 abhängige Systeme möglich sein kann, was in dieser Arbeit belegt und in der Diskussion auch eingehend erörtert wird. Generell ist erwähnenswert, dass die Tabakalkaloide und deren Einwirkung auf den Menschen hauptsächlich durch deren Vertreter Nikotin beforscht wurden. Myosmin, das gegenüber dem Nikotin in geringeren Konzentrationen in Tabak auftritt, wird aber dafür in Nahrungsmitteln in höherem Ausmaß gefunden. Daraus wird auch die Problematik einer möglichen Risikobewertung der beiden Substanzen zueinander erkennbar. Die 4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl (POB)- bzw. 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB)-Bildung, welche in Zusammenhang mit der Krebsentstehung durch Tabak diskutiert wird, bezieht sich auf Myosmin und Nikotin. Dadurch, dass beide Nikotinoide dieses POB-Intermediat, wenn auch auf verschiedene Weise bilden, ist eine Differenzierung bezüglich einer genauen Entstehung sehr schwierig. Kenntnisse dieser Zusammenhänge sind gerade bei der Diskussion zur Raucherproblematik äußerst wichtig.

In dieser Arbeit wurden zunächst Peroxidierungen mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )/Horseradish Peroxidase (HRP) der aus dem Metabolismus der Ratte bekannten Myosmin-Stoffwechselprodukte 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd durchgeführt. Bis auf 3-Pyridylaldehyd bilden alle untersuchten Myosmin-Metaboliten Nikotinsäure. 3'-Hydroxymyosmin bildet außerdem 3-Pyridylelessigsäure, welches einem Zerfall in noch nicht identifizierte Produkte unterliegt.

Die gefundenen Ergebnisse ermöglichen eine Ergänzung der bisherigen Erkenntnisse der Myosmin-Aktivierung durch Peroxidation. Da offenbar ein 3-Pyridylmethyl-Intermediat bei der Peroxidierung von Myosmin und beim Metabolismus der Ratte als Vorstufe des 3-Pyridylmethanol auftritt schien eine Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte sinnvoll. Dabei wird von einer möglichen Addukt-Bildung der reaktiven 3-Pyridylmethyl-Species ausgegangen. Beide DNA-Addukte, 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion (Ausbeute 55 %) und 3-(3''-Picolyl)thymidin (Ausbeute 53 %), konnten mittels magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) charakterisiert werden. Das 3-(3''-Picolyl)thymidin wurde als Pyridylmethyl-DNA-Addukt-Referenzstandard verwendet. In Anlehnung an die HPB-freisetzenden DNA-Addukte wurden Vorversuche zur sauren bzw. alkalischen Spaltung von 3-(3''-Picolyl)thymidin durchgeführt. Eine Freisetzung des aus der Abspaltung von 3-Pyridylmethyl resultierenden 3-Pyridylmethanols gelang aber erst mit Perchlorsäure ( $HClO_4$ ). Allerdings entsteht entweder nur sehr wenig 3-Pyridylmethanol oder 3-(3''-Picolyl)thymidin zerfällt in unbekannte Produkte. Dies gibt im Vergleich zu der Vorgehensweise bei den HPB-freisetzenden Addukten Anlass zur Diskussion der Quantifizierung bei Realproben. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Spaltungsversuche, wurde ein weiterer Zugang zur Analyse von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten durch den Nachweis von 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukten nach enzymatischer Hydrolyse von DNA aus Gewebeproben untersucht. Um eine entsprechende Nachweisempfindlichkeit des Pyridylmethyl-DNA-Addukt-Referenzstandards 3-(3''-Picolyl)thymidin zu erreichen wurde die Methode der Fluoreszenzderivatisierung angewendet. Es wurden Versuche mit drei Fluoreszenz-Markern durchgeführt: Mit Dansylchlorid fand keine Derivatisierung des 3-(3''-Picolyl)thymidins unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen statt. Nach Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 1-Naphthylisocyanat konnten zwei Fluoreszenzderivate 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin charakterisiert werden. Die Anwesenheit anderer DNA-Nukleoside scheint diese Umsetzung nicht zu stören. Wurde allerdings die Umsetzung in Tris-HCl-Puffer als Reaktionsmedium durchgeführt, fand keine Derivatisierung des 3-(3''-Picolyl)thymidin mehr statt. Eine Derivatisierung direkt auf der SPE-Säulen-Phase führte zu keiner Reaktion. Erste Fluoreszenz-HPLC-Messungen zeigen keine wesentliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber dem Detektionsverfahren mittels Diode Array Detektion (DAD). Die Derivatisierung mit 2-Naphthoylchlorid von 3-(3''-Picolyl)thymidin ergab zwei bis auf weiteres nicht charakterisierbare Fluoreszenzderivate. Für weiterführende Arbeiten, gegebenenfalls das 3-Pyridylmethyl-Addukt vollständig als Pyrimidin-Derivat zu vermessen, stand leider keine Liquid Chromatography/Massenspektroskopie (LC/MS)-Anlage zur Verfügung.

# Teil I

## Einleitung



# 1. Einleitung

## 1.1 Myosmin

### 1.1.1 Entdeckung und Vorkommen

Bei Tabakalkaloiden, zu deren Gruppe Myosmin gehört, handelt es sich um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, denen eine Funktion als Fraß- bzw. Insektenschutz und eine Beteiligung bei der Entgiftung und der Wachstumsregulation nachgesagt werden [1]. Weitere wichtige Alkaloide der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) sind Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin (Abbildung 1.1).

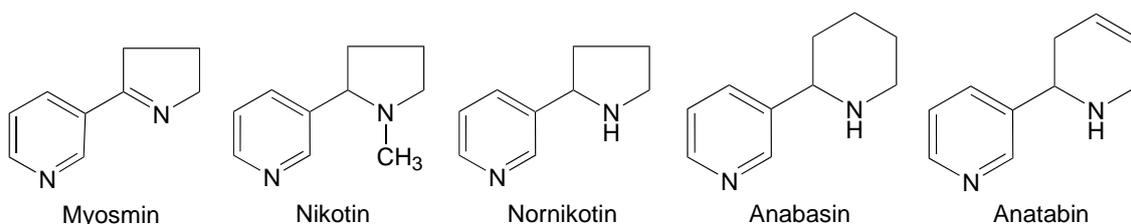


Abbildung 1.1: Strukturen einiger Tabakalkaloide

Die Menge an vorhandenen Alkaloiden in Pflanzen der Gattung *Nicotiana* wird hauptsächlich durch Anbauweise, Reifungsgrad, sowie den Einsatz von Düngemitteln bestimmt. Jeder Schritt des Tabakanbaus, der sich auf den Pflanzenmetabolismus auswirkt, kann in bestimmten Grenzen die Menge an gebildeten Alkaloiden beeinflussen. Während Tabakblätter den höchsten Gehalt an Nikotin besitzen, verfügen die Wurzeln bereits über weniger, der Stängel hingegen weist den geringsten Anteil auf. Der Gehalt an Alkaloiden steigt insbesondere während des Reifungsprozesses an. Nach Ernte und Fermentation enthält der Rohtabak je nach Sorte 5 bis 180 mg/g Nikotin. Die Gehalte für Nornikotin und Anatabin belaufen sich auf durchschnittlich 2 mg/g bzw. 1 mg/g. [2, 3]

Zwischen 1900 – 1914 wurden von Pictet und Noga [4] Nebenalkaloide im Tabakextrakt gefunden. 1933 und 1935 konnten Wenusch und Schöller [5] mehrere Nebenalkaloidbasen aus Zigarrenrauch gewinnen.

Dazu kristallisierten sie die aus Destillation von Zigarrenrauchgasen gewonnenen Fraktionen mit Pikrinsäure. Versetzte man eines der Kristallisate mit Natriumhydroxid und Wasser, entstand ein intensiver, an Mäuseurin erinnernder Geruch, welcher sich als Pikrat des vorliegenden Myosmins charakteristisch identifizieren ließ. So erhielt auch die dem Pikrat zugrunde liegende Base Myosmin seinen Namen nach dem griechischen Wort Myo (Maus, Muskel).

Des Weiteren konnten Wenusch und Schöller [5] erste Angaben über Löslichkeit, Basizität, Kristallisierbarkeit, Molekulargewicht sowie erste strukturelle Hinweise von Myosmin veröffentlichen.

1936 bestimmten Späth, Wenusch und Zajic [5] das genaue Molekulargewicht und legten erstmals die Konstitution der damals als schwer zugänglich bezeichneten Tabakrauch-Base fest. Im selben Jahr wurde Myosmin durch Späth und Mamoli [6] synthetisiert und die gefundene Molekülstruktur bestätigt.

Eine Synthese mit höherer Ausbeute gelang 1944 Woodward et al. [7], indem Nikotin bei 570 °C über Quarz zu Myosmin und anderen Produkten (u.a. 3-Pyridylderivate, Blausäure, Ammoniak) dehydrogeniert wurde.

Untersuchungen zur chemischen Reaktivität von Myosmin führten 1945 Woodward und Eisner [8] durch. Der qualitative und quantitative Nachweis von Myosmin in der Tabakpflanze gelang nach Tso und Jeffrey [9] schließlich 1953 mittels Papierchromatografie.

Außer in Tabakpflanzen (*Nicotiana*) konnte Myosmin später auch in anderen Pflanzen und Lebensmitteln nachgewiesen werden. Bisher dachte man, dass das Vorkommen von Myosmin mit dem Auftreten von Nikotin und anderen Nikotinoiden gekoppelt sei.

Luanratana et al. 1982 [10] fanden Myosmin und andere Tabakalkaloide in den Blättern und Wurzeln von *Duboisia hopwoodii*, welche aufgrund der narkotischen Wirkung von den Aborigines gekaut bzw. für Zeremonien und Rituale verwendet werden. 1998 konnte von Zwickenpflug et al. [11] Myosmin auch in Nüssen und 2002 von Tyroller et al. [12] in Nahrungsmitteln wie Weizen, Reis, Mais, Hirse, Kartoffeln, Tomaten, Karotten, Kakao, Äpfeln, Ananas, Kiwi, Milch und Sahne nachgewiesen werden. In den Lebensmitteln wurde zwischen 0.02 und 6.1 ng Myosmin/g gefunden, was vergleichbar mit der von Sakuma et al. [13] im Nebenstromrauch einer Zigarette gemessenen Menge ist (73 – 224 µg Myosmin/Zigarette).

Im Gegensatz zu Nikotin, dessen natürliches Vorkommen nach bisherigen Kenntnisstand weitgehend auf die Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) begrenzt ist, kommt folglich Myosmin in einer Vielzahl weiterer Pflanzenfamilien vor.

### 1.1.2 Physikalisch chemische Eigenschaften

3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin (Myosmin) mit der Summenformel  $C_9H_{10}N_2$  hat ein Molekulargewicht von 146.19. Der Schmelzpunkt liegt zwischen 39 und 42 °C, der Siedepunkt bei 129 °C. Das hellgelbe Pulver besitzt im Infrarotspektrum ein Absorptionsmaximum von  $\nu_{C=N} = 1618 \text{ cm}^{-1}$  [14]. Das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung liegt bei  $\lambda_{max} = 234 \text{ nm}$  [15].

Die Beobachtung, dass Myosmin mit wässriger Hydroxylamin-Lösung als Carbonylkomponente reagiert [16], gab den Hinweis auf ein reversibles Hydrolyse-Gleichgewicht, dessen pH-Abhängigkeit mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren beschrieben werden kann. So liegt Myosmin im Sauren hauptsächlich als Aminoketon und im Basischen in der Ringform vor. Bei einem pH-Wert von 6.8 liegt es lediglich zu 1 % in der offenkettigen Form vor [16, 17]. (Abbildung 1.2)

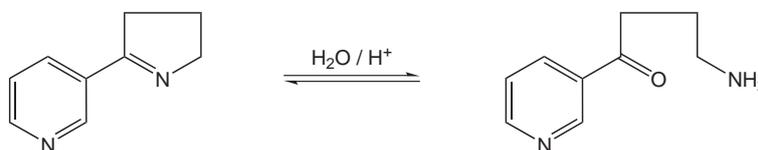


Abbildung 1.2: Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin im sauren Milieu

### 1.1.3 Synthese

Die erste Synthese von Myosmin wurde 1936 von Späth und Mamoli [6] durchgeführt, indem sie von einer an Nikotin erprobten Synthesemethode ausgingen. So wurden im Laufe der Zeit mehrere Synthesewege mit unterschiedlichen Reinheitsgraden entwickelt:

Pyrolysiert man Nikotin unter Quarz-Kontakt bei Temperaturen von 570 °C, so erhält man Myosmin in einer Ausbeute von etwa 33 %, sowie andere Produkte [7] (Abbildung 1.3).

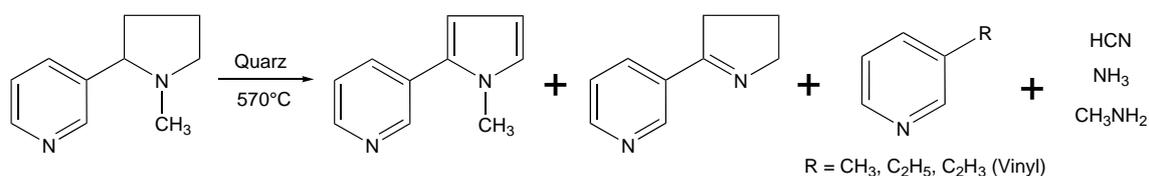


Abbildung 1.3: Pyrolyse von Nikotin

Eine höhere Ausbeute (80 – 90 %) erhält man bei der Behandlung von 1-(3-Pyridyl)-3-dimethylaminopropan-1-on mit Nitromethan. Hierbei entsteht Myosmin durch Reduktion von 1-(3-Pyridyl)-4-nitrobutan-1 am Raney-Nickel Katalysator in Ethanol [18].

Mundy et al. [19] beschreiben eine Drei-Stufen-Synthese des Myosmins, bei der Nikotinsäure mit Thionylchloriden versetzt wird. Das daraus entstandene Nikotinoylchlorid wird mit 2-Pyrrolidon zu N-Nikotinoyl-2-pyrrolidon umgesetzt. Pyrolysiert

man das Selbige zu gleichen Teilen mit Calciumoxid erhält man eine Mischung, welche Myosmin zu 67 % und mehrere 2-Pyrrolidon-Derivate zu 33 % enthält.

Bis heute ist die von Brandänge und Lindblom [14] vorgeschlagene Synthese von Myosmin aus Nikotinsäureethylester und N-Vinylpyrrolidon die am häufigsten verwendete. Man erhält Myosmin in einer Ausbeute von 63 %. (Abbildung 1.4)

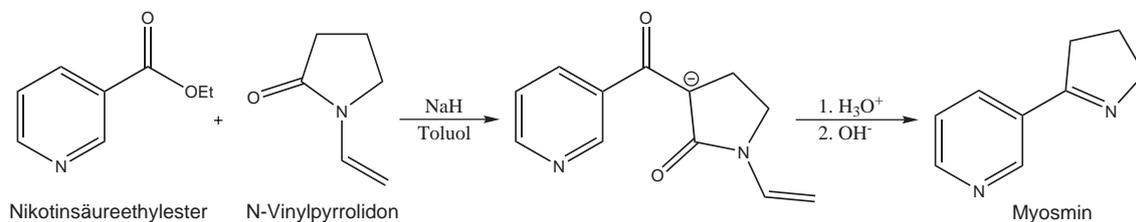


Abbildung 1.4: Darstellung von Myosmin

### 1.1.4 Toxikologie von Myosmin

Myosmin ist aus toxikologischer Sicht bislang noch verhältnismäßig wenig erforscht. Der LD<sub>50</sub>-Wert liegt bei der Ratte zwischen 190 (i.p.) und 1875 mg/kg KG (oral) [20]. Mäusen wurde über einen Zeitraum von 50 Wochen täglich 0.5 mg Myosmin verabreicht. Während 76 % der Tiere den Versuch überlebten lag die Überlebensquote in der Kontrollgruppe bei 98 %. [21]

Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte im Testsystem *Escherichia coli* polA<sup>+</sup>/polA<sup>-</sup> eine Induktion von DNA-Schäden beobachtet werden [22].

Ein Anstieg des spontanen Schwesterchromatid-Austausches in Ovarialzellen von Hamstern nach in vivo Behandlung konnte nicht festgestellt werden [23].

Bei Untersuchungen an Zellen der menschlichen Nasenschleimhaut und an menschlichen Lymphozyten zeigte der Comet-Assay nach der Inkubation mit Myosmin DNA-Schäden [24], während an der Kalbsthymus-DNA in vitro eine kovalente Bindung nach Behandlung mit radioaktiv markiertem Myosmin unter Nitrosierungsbedingungen bei einem pH-Wert von 3 – 5 nachgewiesen werden konnte [25].

2006 gelang der Nachweis des genotoxischen Potenzials von Myosmin an humanen Ösophaguszelllinien [26]. Die Versuche gaben auch Hinweise auf eine Hemmung der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase durch Myosmin. Versuche mit humanen Lymphozyten, bei denen durch Myosmin im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen-Test eine moderate Erhöhung der Mutationsfrequenz gemessen wurde bestätigten ein mögliches genotoxisches Potential für den Menschen [27].

Untersuchungen zur Toxikokinetik mit <sup>14</sup>C-markiertem Myosmin an Ratten ergaben eine Anreicherung des <sup>14</sup>C-Isotops in Drüsengewebe, wie Tränen-, Speichel- und Geschlechtsdrüsen, der Leber, der Nierenrinde und dem Ösophagus sowie im Bereich der Netzhaut [28].

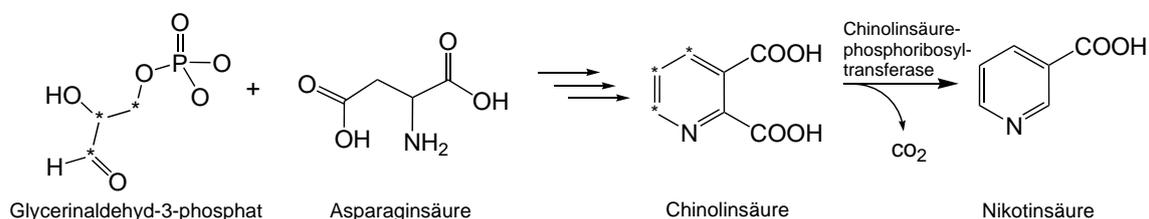
Im Metabolismus aktiviertes Myosmin ist bisher als noch nicht eindeutig genotoxisch nachweisbar. Die Reaktionsabfolge mit den Pyrimidin- und Purinbasen der DNA ist noch nicht eindeutig geklärt. Außerdem können Beeinflussungen durch Myosmin auf die Reaktionsabfolgen von Kinasen, Cytokinen und Telomerasen nicht ausgeschlossen werden.

### 1.1.5 Biosynthese

Alkaloide - so auch Myosmin - werden im Falle der Tabakpflanze primär in den Wurzeln durch Metabolisierung von Nikotin unter Beteiligung von Aminosäuren gebildet, von wo aus sie in die Blätter transportiert werden [29].

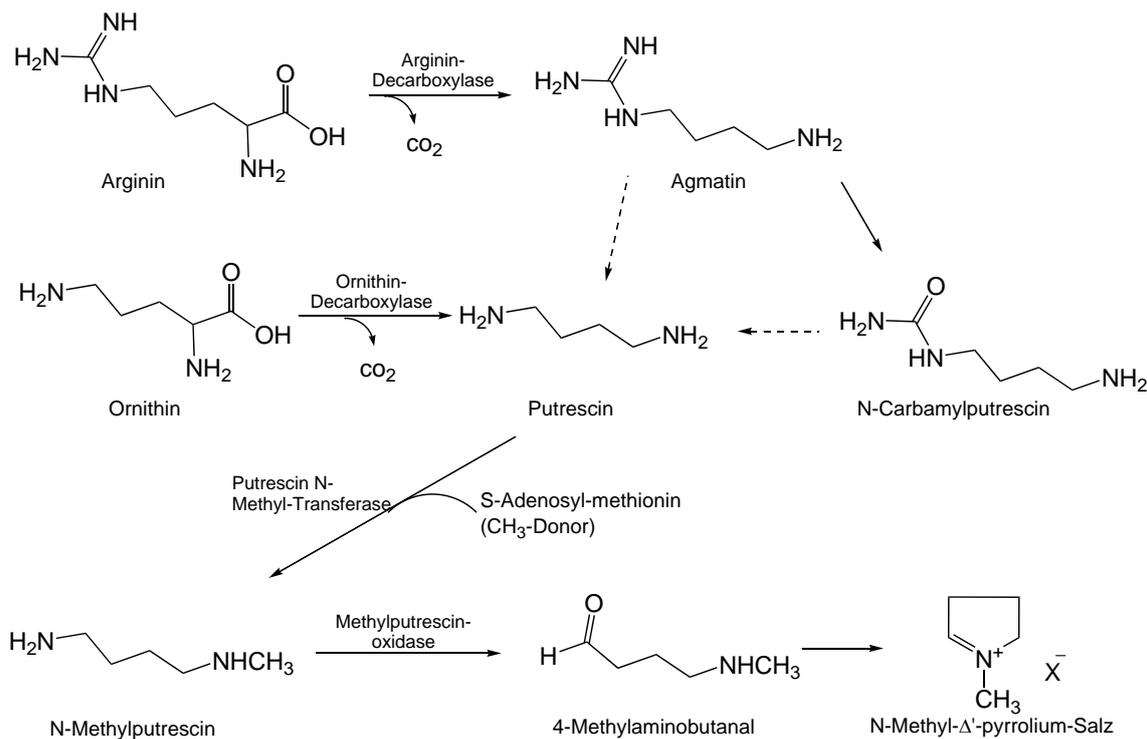
In ihrer Grundstruktur bestehen Tabakalkaloide aus einem Pyridinring und einem Pyrrolidinring.

Der Pyridinring ist auf die Nikotinsäure zurückzuführen, deren Biosynthese ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Aspartat oder Malat über Chinolinsäure erfolgt. Die C-Atome von Glycerinaldehyd-3-phosphat lassen sich alle an den Positionen C-4, C-5 und C-6 des Pyridinrings wiederfinden. Nach Gabe von 3-<sup>14</sup>C-Aspartat und 3-<sup>14</sup>C-Malat an *Nicotiana rustica* stellte man fest, dass der Einbau der markierten C-Atome fast nur an Position C-2 oder C-3 erfolgt und der Stickstoff des Pyridinrings von diesen Aminosäuren abstammt. [30] (Abbildung 1.5)



**Abbildung 1.5:** Biosynthese von Nikotinsäure

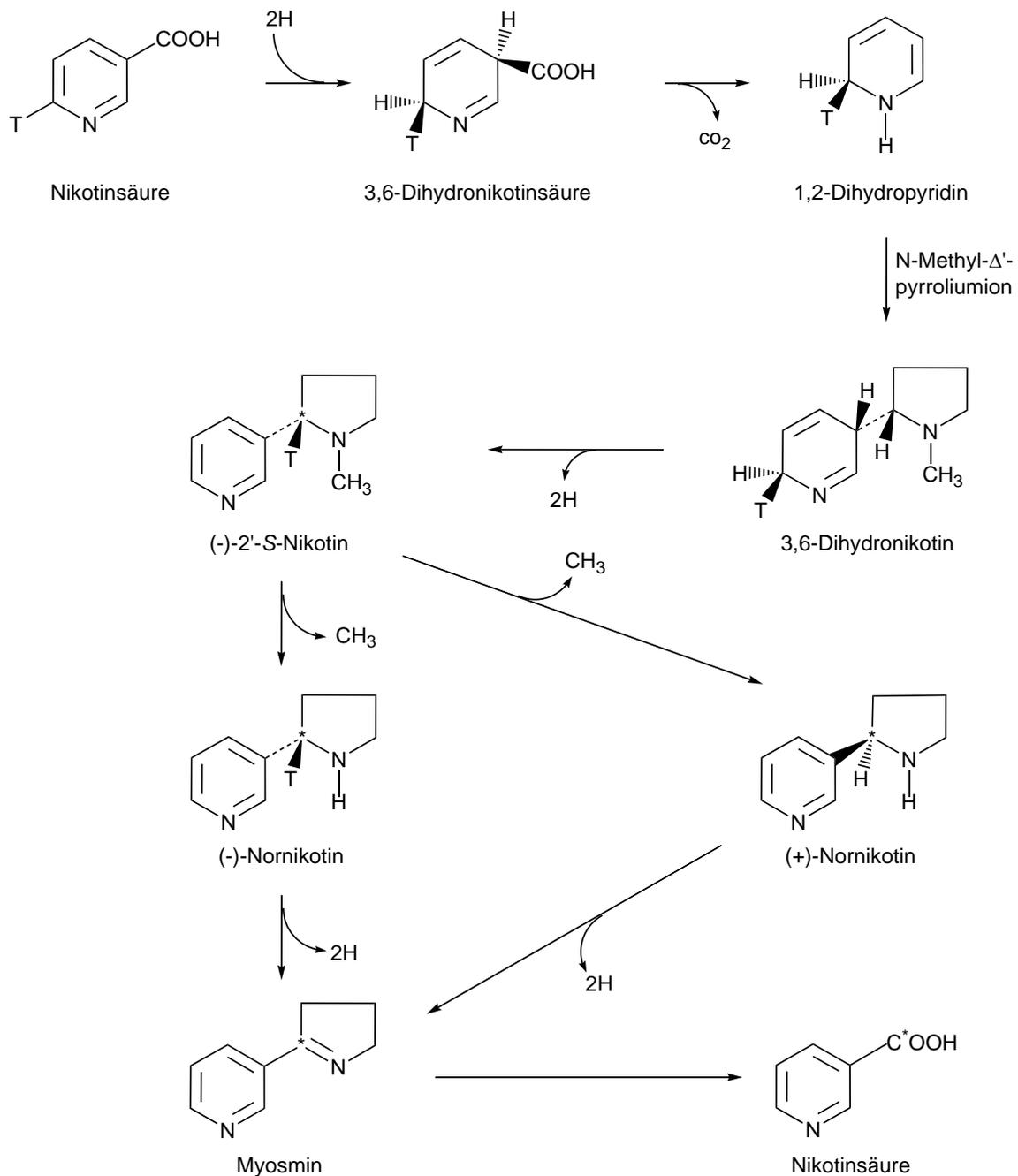
Der Aufbau des Pyrrolidinrings beginnt mit Putrescin, welches entweder über die Vorstufen Arginin, Agmatin und N-Carbamylputrescin oder durch Decarboxylierung von Ornithin gebildet wird [31]. Anschließend findet eine Methylierung des Putrescins durch die Putrescin-N-methyltransferase statt. Als Methylgruppendonator fungiert in diesem Schritt S-Adenosyl-methionin. Das entstandene N-Methylputrescin wird durch die Methylputrescinoxidase zu 4-Methylaminobutanal oxidativ desaminiert. Schließlich cyclisiert 4-Methylaminobutanal spontan zum N-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolium-salz. [32] (Abbildung 1.6)



**Abbildung 1.6:** Biosynthese des N-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolium-salzes

Zur Verknüpfung der beiden Vorstufen entsteht zunächst aus Nikotinsäure durch Protonierung die 3,6-Dihydronikotinsäure, welche unter Verlust von Kohlendioxid 1,2-Dihydropyridin bildet. Das N-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolium-salz kann nun an Position C-3 des 1,2-Dihydropyridin binden, wobei das 3,6-Dihydronikotin und nach Rearomatisierung des Pyridinrings durch Protonenabspaltung das (-)-2'-S-Nikotin entsteht. Durch Demethylierung von Nikotin entsteht Nornikotin. Dieser Prozess findet vor allem während der Alterung in den grünen Blättern der Tabakpflanze statt. Die Methylierung von Nornikotin zu Nikotin scheint entgegen früherer Vermutungen in der Tabakpflanze nicht stattzufinden. Die Demethylierung von (-)-2'-S-Nikotin im Tabak liefert (-)-2'-S-Nornikotin und (+)-2'-R-Nornikotin. [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39] (Abbildung 1.7)

In der Wachstumsphase von Pflanzen wird Myosmin durch Dehydrierung von Nornikotin gebildet [39, 40]. Nach Gabe von  $2'^{14}\text{C}$ -markiertem Nornikotin an intakte Tabakpflanzen über einen Zeitraum von acht Tagen, wurden 55 % der Radioaktivität unverändert in Nornikotin und 15 % in Myosmin wiedergefunden. Eine Gabe von  $2'^{14}\text{C}$ -Myosmin zeigte, dass kein markiertes Nikotin bzw. Nornikotin entstand, was auf einen irreversiblen Bildungsmechanismus von Myosmin hindeutet. Als Abbauprodukt von Myosmin entsteht hingegen Nikotinsäure, wobei der Großteil der markierten Kohlenstoffatome in der Carboxylgruppe gebunden ist [41, 29]. (Abbildung 1.7)



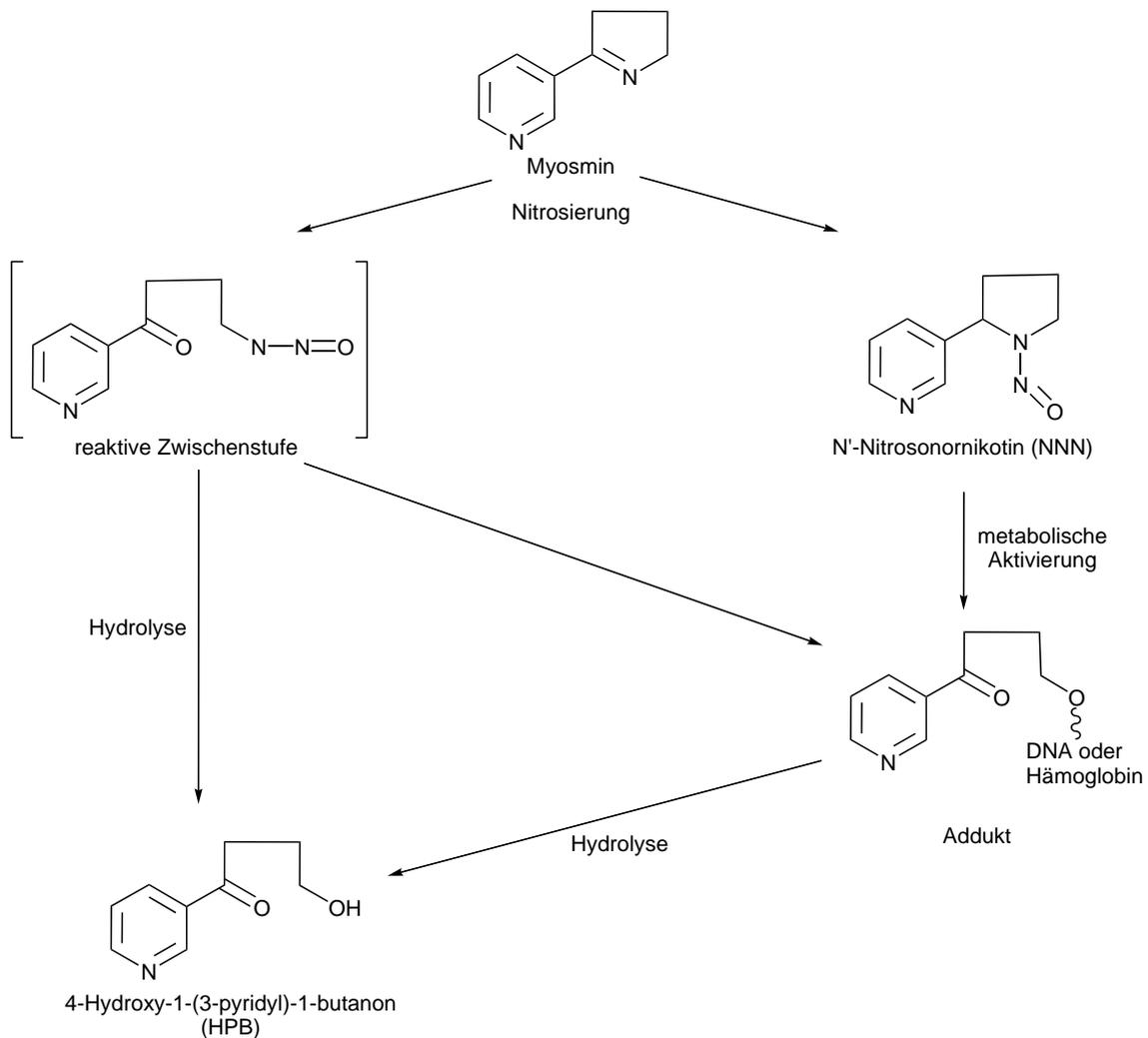
**Abbildung 1.7:** Bildung von (-)-2'S-Nicotin, Nornicotin und Myosmin aus Nikotinsäure und N-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolium-Salz (unter Verwendung Tritium-markierter Verbindungen) [37, 39]

## 1.2 Bisher bekannte in vitro und in vivo Aktivierungen von Myosmin

### 1.2.1 Nitrosierung von Myosmin

Die Nitrosierung von Myosmin wurde erstmalig von Zwickenpflug [42] detailliert beschrieben (Abbildung 1.8). Er erhielt nach Einleiten von  $N_2O_3$ -Gas in eine wässrige Myosminlösung ein vom pH-Wert abhängiges Produktgemisch aus N<sup>1</sup>-Nitrosornni-

kotin (NNN) und 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB). Diese Nitrosierungsprodukte konnten auch in humanem Magensaft, dem Myosmin und  $\text{NaNO}_2$  zugesetzt wurde, nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung liefert das reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Im Sauren hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketoform und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, von dem man annimmt, dass es in situ zum Ketoalkohol hydrolysiert. Höhere pH-Werte begünstigen hingegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins. Bei pH-Werten kleiner 2 wird allerdings wieder mehr NNN als HPB gebildet [25]. Bei der Umsetzung von Myosmin mit  $\text{NaNO}_2$  im Sauren wurde neben HPB auch 3'-Oximinomyosmin gefunden [43].



**Abbildung 1.8:** Nitrosierung von Myosmin und Reaktionsfolge zum Hydroxyketon

## 1.2 Bisher bekannte in vitro und in vivo Aktivierungen von Myosmin 11

Verglichen mit der Nitrosierung anderer Tabakalkaloide reagiert Myosmin rascher und unter Erzielung hoher Umsatzraten.

Der entscheidende Unterschied bei der Nitrosierung von Myosmin einerseits und der von Nikotin oder Nornikotin andererseits ist jedoch der Reaktionsmechanismus bezüglich der Bildung einer DNA-reaktiven Zwischenstufe. Bei Nikotin erfolgt zunächst eine Nitrosierung unter Bildung der beiden tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) N<sup>1</sup>-Nitrosonornikotin (NNN) bzw. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK). Erst nach deren metabolischer Aktivierung kann es zur Bildung von DNA- oder Protein-Addukten kommen. Im Falle des Myosmins wird die reaktive Zwischenstufe auch ohne metabolische Aktivierung direkt gebildet. Die Aktivierung von Myosmin durch Nitrosierung könnte demzufolge u.U. durch Aufnahme von Nitrit mit der Nahrung relevant sein.

### **1.2.2 Peroxidierung von Myosmin**

Einen weiteren Aktivierungsweg in vitro stellt die Peroxidierung dar. Die Inkubation von Myosmin mit Wasserstoffperoxid und Essigsäureanhydrid liefert 3-Pyridylesigsäure, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)butansäure, 3-Pyridylmethanol (3-Carbinol), HPB und Nornikotylin. Die Reaktion verläuft schnell und vollständig, wobei neben der elektrophilen Spezies Pyridyloxobutyl (POB), die auch bei Nitrosierung von Myosmin auftritt zusätzlich 3-Pyridylmethyl als reaktive Zwischenstufe auftreten kann [44]. (Abbildung 1.9)

Bei gleichzeitiger Inkubation von humanen Ösophaguszelllinien mit Wasserstoffperoxid konnte das genotoxische Potenzial von Myosmin unter Peroxidierungsbedingungen gezeigt werden [26].

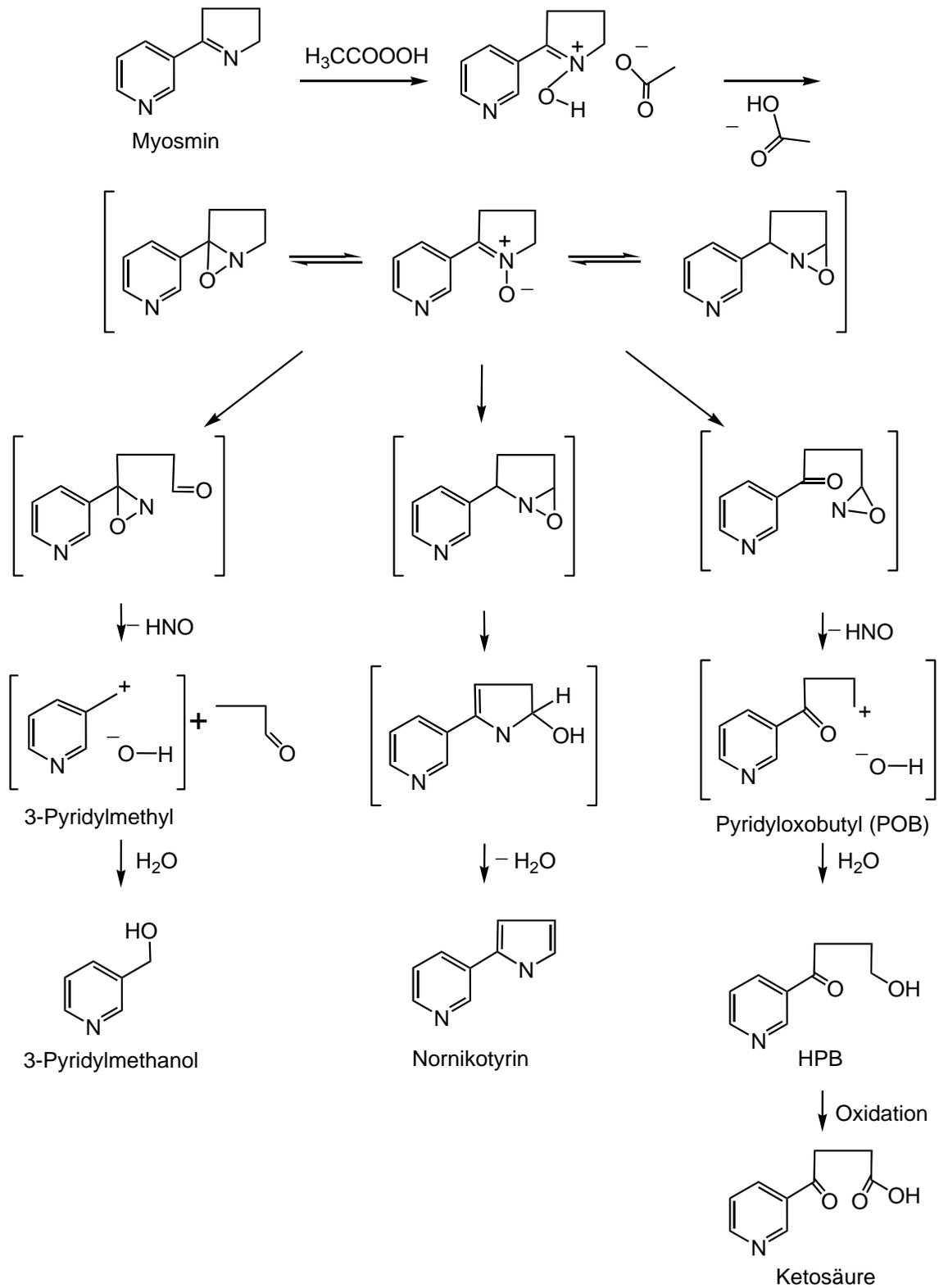


Abbildung 1.9: Reaktionsverlauf der Peroxidierung von Myosmin in vitro [44]

### 1.2.3 Metabolismus von Myosmin in der Wistar-Ratte nach peroraler Verabreichung

Um eine mögliche Aktivierung von über die Nahrung aufgenommenem Myosmin in der Mundhöhle bzw. der Speiseröhre mit berücksichtigen zu können, wurde für den Tierversuch eine perorale Verabreichung gewählt. <sup>3</sup>H-markiertes Myosmin wurde in den Konzentrationen 0.001, 0.005, 0.5 und 50  $\mu\text{mol/kg}$  KG auf ein Apfelstück gebracht und den im Vorfeld trainierten Tieren als Futter angeboten.

Für die Zeiträume 0 – 6 h, 6 – 24 h und 24 – 48 h wurde von jedem Tier der Urin gesammelt. Das Metabolitenspektrum im Urin zeigte zwei Hauptmetabolite und mehrere kleinere Signale, wobei kein unverstoffwechseltes Myosmin mehr vorhanden war. Identifiziert werden konnten 3-Pyridylessigsäure, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)butansäure (Ketosäure), 3-Pyridylmethanol (3-Carbinol), 3'-Hydroxymyosmin und 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB), wobei HPB und sein Oxidationsprodukt 4-Oxo-4-(3-pyridyl)butansäure den größten Anteil ausmachten. 3'-Hydroxymyosmin wird nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich aus Myosmin gebildet und könnte daher als Biomarker für eine Myosmin-Exposition dienen [45]. (Abbildung 1.10)

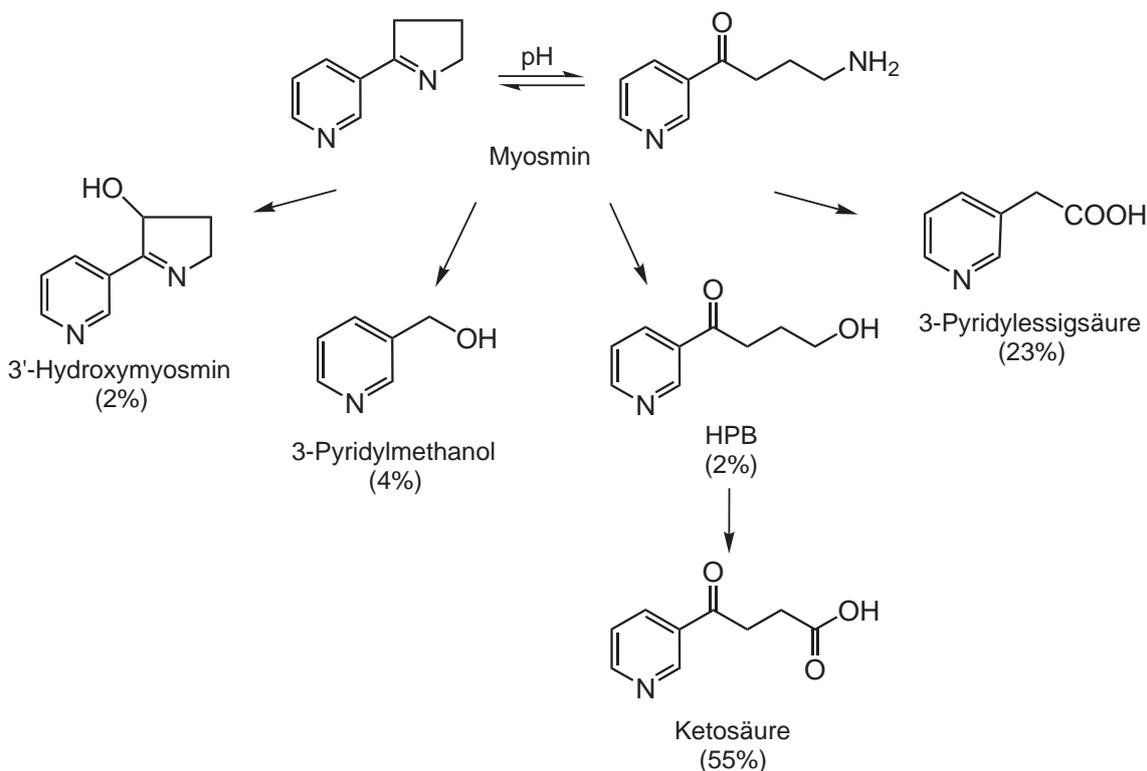


Abbildung 1.10: Metaboliten von Myosmin im Wistar-Ratten-Urin nach peroraler Gabe

### 1.2.4 Übersicht

Die Gabe von  $^3\text{H}$ -markiertes Myosmin an Wistar-Ratten zeigte die *in vivo* Verstoffwechslung von Myosmin zu 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylessigsäure, 3-Pyridylmethanol, Ketosäure und HPB. Abgesehen von 3'-Hydroxymyosmin konnten sämtliche im Rattenurin gefundenen Metabolite durch die beschriebenen *in vitro* Aktivierung gefunden werden.

Die *in vivo* Bildung von HPB kann *in vitro* sowohl durch Nitrosierung als auch durch Peroxidierung von Myosmin erklärt werden. 3-Pyridylessigsäure, 3-Pyridylmethanol und Ketosäure wurden durch Aktivierung von Myosmin durch Peroxidation gefunden. (Abbildung 1.11)

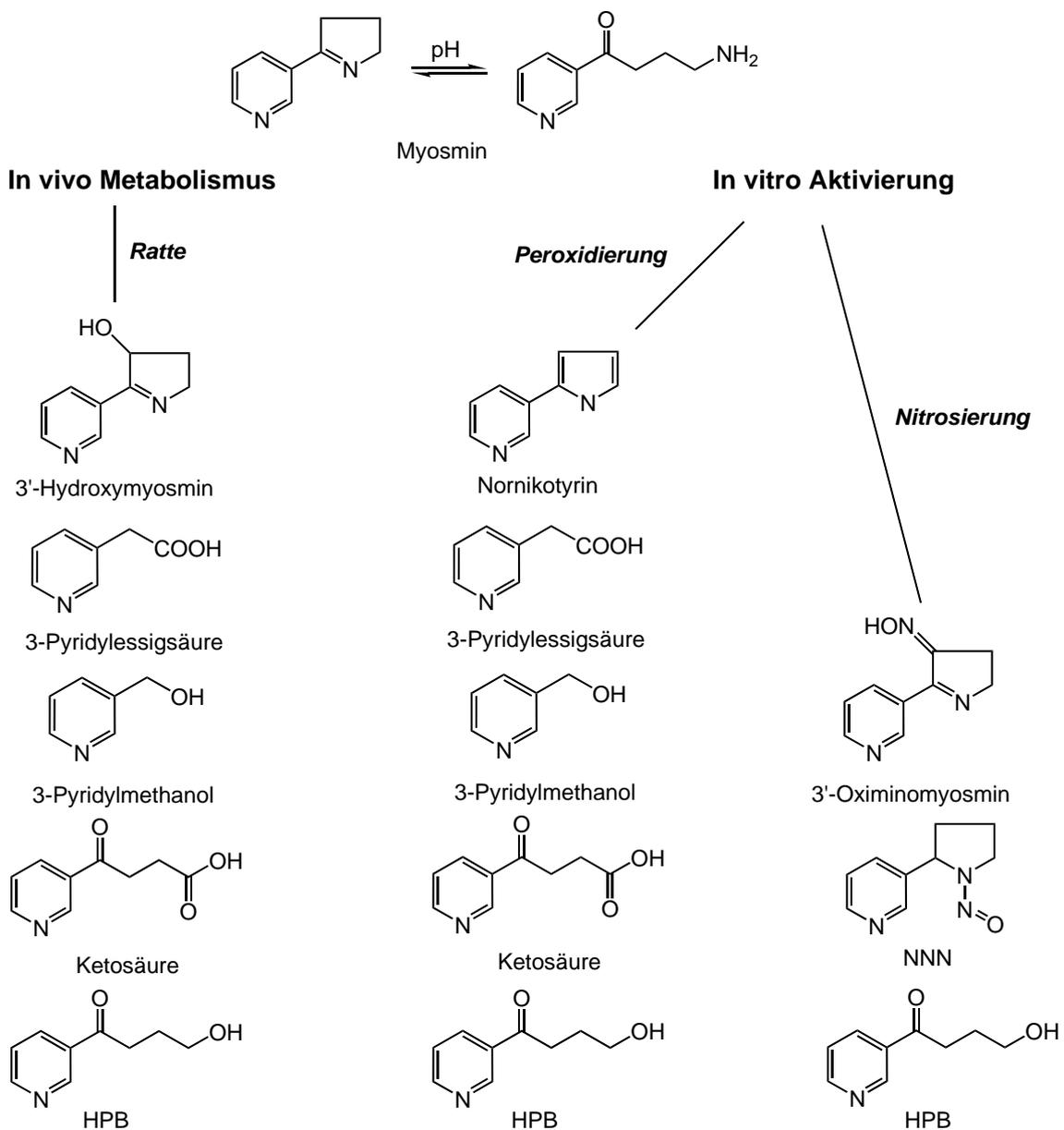


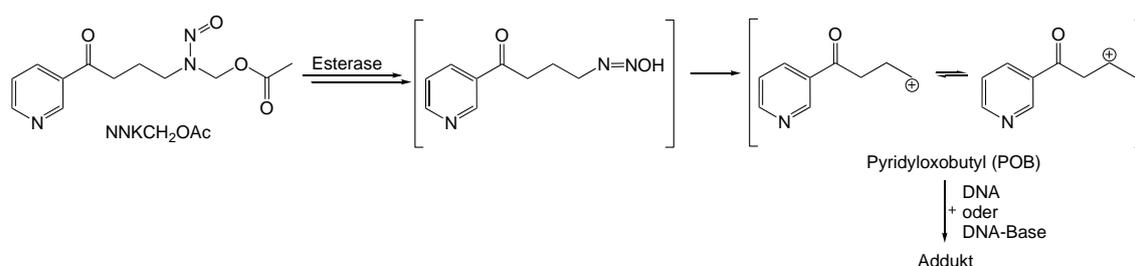
Abbildung 1.11: Übersicht

## 1.3 DNA-Addukte

DNA-Addukte werden über eine kovalente Bindung metabolisch aktivierter Kanzerogene an die DNA gebildet. Dabei kann die Bindung prinzipiell an allen Stickstoff- und enolisierten Sauerstoffatomen der DNA-Basen und den Hydroxylgruppen der Desoxyribose, sowie der Phosphorsäure erfolgen. Tatsächlich wird die Adduktbildung jedoch durch spezifische elektronische und stereochemische Parameter beeinflusst [46, 47].

Für die Kanzerogenität entscheidend sind das Ausmaß und die Lokalisation des entstandenen Schadens an der DNA. Bestehen die DNA-Addukte aufgrund mangelnder oder falscher Reparatur der DNA auch noch während der Zellreplikation, kann dies zu Genmutationen führen oder exponierte Zellen dazu veranlassen, sich in irreversibel veränderte Präneoplasien umzuwandeln [48, 49]. Liegt einmal eine Initiierung der Zelle vor, werden theoretisch auch die nachfolgenden Stadien der Promotion und Progression bis hin zur potenziell bösartigen Zell- bzw. Gewebsveränderung durchlaufen [49]. Für die Bewertung des kanzerogenen Potenzials einer Verbindung ist somit die Fähigkeit zur Bildung von DNA-Addukten ein wichtiger Faktor.

Die Vorgehensweise zur Ermittlung eines DNA-Addukts wurde bisher im Falle der TSNA Problematik analytisch folgendermaßen angegangen. Die Freisetzung des Adduktbildners wurde durch saure oder basische Hydrolyse der DNA bewerkstelligt und dieser anschließend identifiziert und quantifiziert [50]. Dabei ist die Fragestellung immer noch aktuell in welchem Ausmaß die Abspaltung des POBs oder der anderen Adduktbildner erfolgen kann (quantitativ).



**Abbildung 1.12:** Bildung der elektrophilen Zwischenstufe am Beispiel der Vorstufe NNKCH<sub>2</sub>OAc

Nach Inkubation von 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxythymidin, 2'-Desoxycytidin und Kalbsthymus-DNA mit den TSNA's NNK und NNN konnten verschiedene HPB-freisetzende Addukte charakterisiert werden. Dazu wurden die in vivo nicht auftretenden aktivierten Vorstufen, wie zum Beispiel NNKCH<sub>2</sub>OAc und NNNCH<sub>2</sub>OAc verwendet. Nach enzymatischer Spaltung kann die dabei gebildete elektrophile Zwischenstufe Pyridyloxobutyl (POB) mit den DNA-Basen reagieren und in vitro Addukte bilden (Hecht et al. 1986 [81], Wang et al. 1997 [52], Wang et al. 2003 [53], Thomson et al. 2004 [54], Hecht et al. 2004 [55], Upadhyaya et al. 2006 [56]). (Ab-

bildung 1.12)

Auch in vivo konnten nach oraler Gabe an F344-Ratten und A/J-Mäusen einige der bereits in vitro gefundenen Addukte nachgewiesen werden (Spratt et al. 1989 [57], Thomson et al. 2003 [58], Thomson et al. 2004 [54], Lao et al. 2006 [59]). Lao et al. [60] charakterisierten 2007 nach Gabe von NNK und NNAL (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) an F344-Ratten vollständige POB-Addukte, O<sup>2</sup>-[4-(3-pyridyl)-4-oxobut-1-yl]thymidin (O<sup>2</sup>-POB-dT) als Hauptprodukt.

Die Adduktbildungen wurden bisher vor allem mit Guanin, welches bevorzugt an den Positionen O-6 und N-2 angegriffen wird untersucht. Addukte mit den anderen DNA-Basen konnten ebenfalls nachgewiesen werden. (Abbildung 1.13)

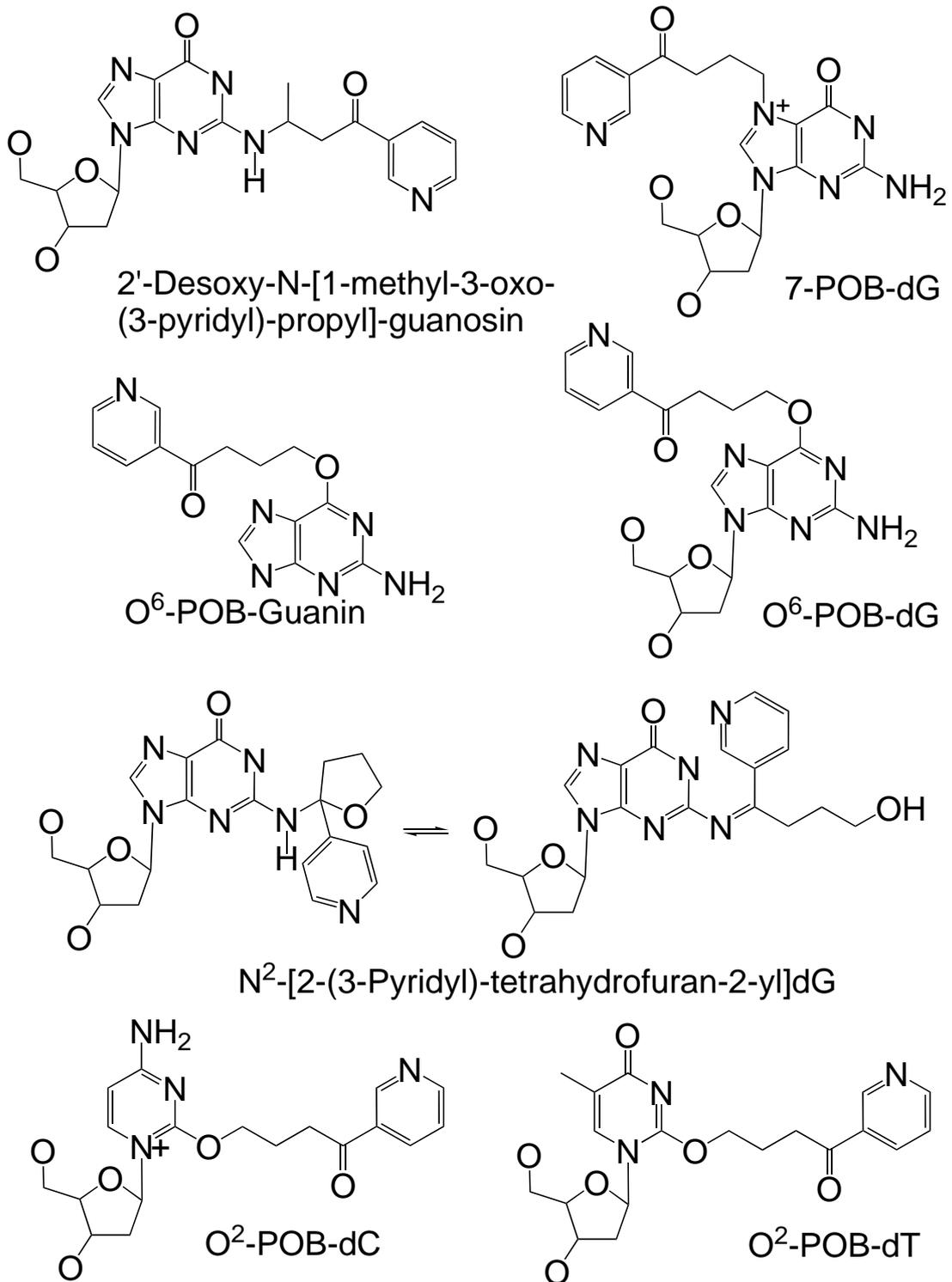
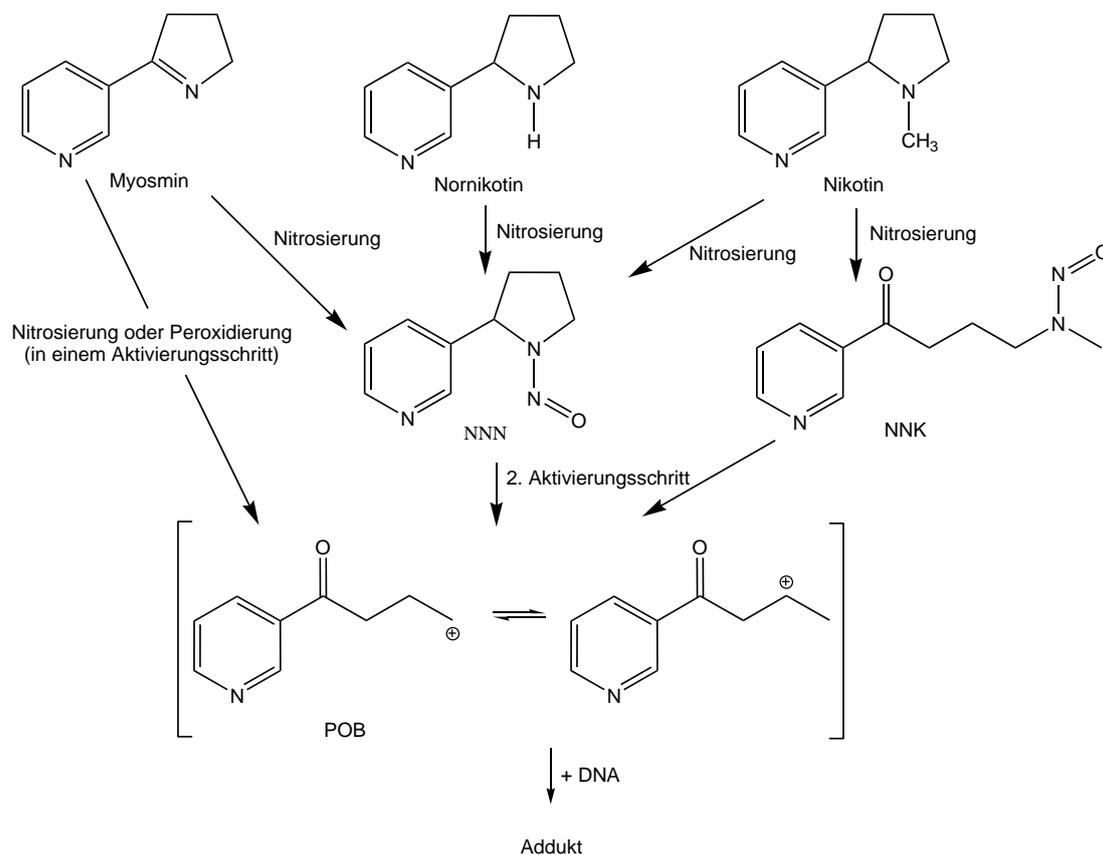


Abbildung 1.13: Bekannte Addukte am Beispiel NNK

Für die Aktivierung von Myosmin durch Nitrosierung und Peroxidierung wird die gleiche elektrophile Spezies Pyridyloxobutyl (POB) angenommen, wie sie ebenfalls nach enzymatischer Spaltung aktivierter Vorstufen einiger TSNA entsteht. Speziell bei der Peroxidation entsteht zusätzlich 3-Pyridylmethyl als reaktive Zwischenstufe. So ist anzunehmen, dass die aus Myosmin gebildeten Zwischenstufen ebenfalls analog zu NNK und NNN DNA-Addukte bilden können. Die Bestimmung der Tabakrauchexposition über HPB-freisetzende Addukte als Biomarker [50, 61] ist somit nicht mehr aussagekräftig, da Myosmin bereits über die Nahrung in unterschiedlichen Mengen aufgenommen wird.

Wie oben beschrieben sind für die TSNA zwei Aktivierungsschritte notwendig, um die reaktive Zwischenstufe POB zu bilden. Im Gegensatz hierzu liefert Myosmin bei Nitrosierung bzw. Peroxidierung die reaktive Zwischenstufe POB direkt, in einem Schritt. (Abbildung 1.14)



**Abbildung 1.14:** Vergleich der in vivo Aktivierung von Myosmin, Nornikotin und Nikotin

## **Teil II**

### **Material und Methoden**



## 2. Material

### 2.1 Geräte

- Hochdruckflüssigkeits Chromatographie:

Gynkotec HPLC/UV-DAD/Fluoreszenz System Dionex, Idstein:

Degaser Gynkotec ERC-3315

Gradientenpumpe Gynkotec M 480 G

Automatischer Probengeber Gynkotec GINA 50

UV-DA-Detektor UVD 340 S

Fluoreszenz-Detektor RF 2000

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System VWR, Darmstadt:

Gradientenpumpe Intelligent mit integriertem Degaser Hitachi L-2130

Automatischer Probengeber Hitachi L-2200

UV-DA-Detektor Hitachi L-2450

HPLC-Vorsäule:

LiChroCart guard column gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 4  $\times$  4 mm,  
Merck, Darmstadt

HPLC-Hauptsäulen:

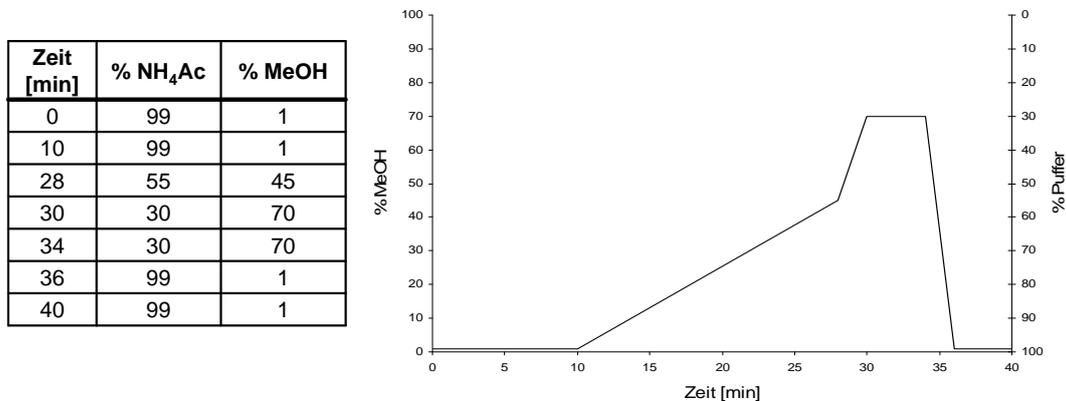
LiChroCart Purospher STAR RP-18e 5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm, Merck, Darmstadt

LiChroCart LiChrospher 60 RP-18 select B, 5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm, Merck, Darmstadt

**HPLC-System 1:**

Gynkotec HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 320 nm

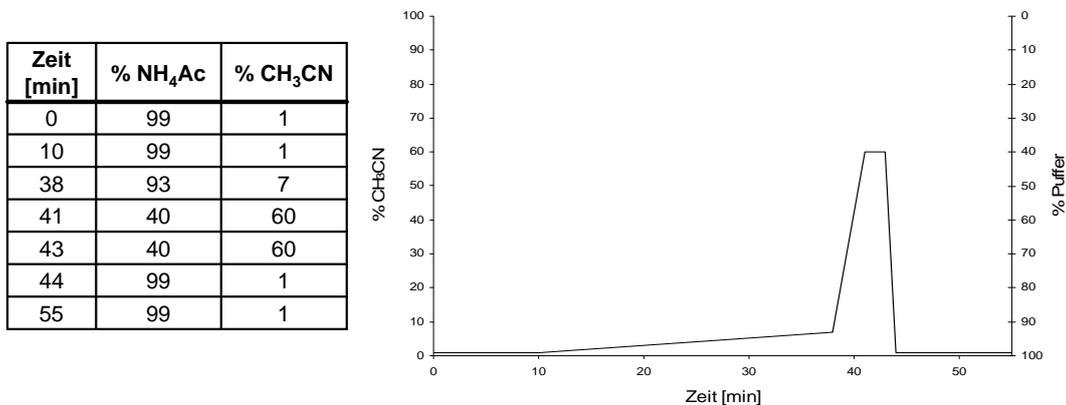


**Abbildung 2.1:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer + 50  $\mu$ L Triethylamin und Methanol; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 2:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

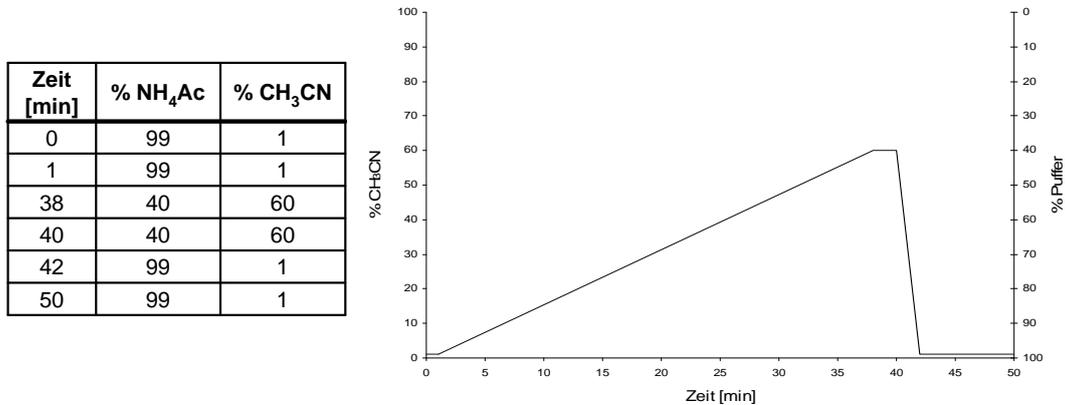


**Abbildung 2.2:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer pH = 5.0 und Acetonitril; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 3:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

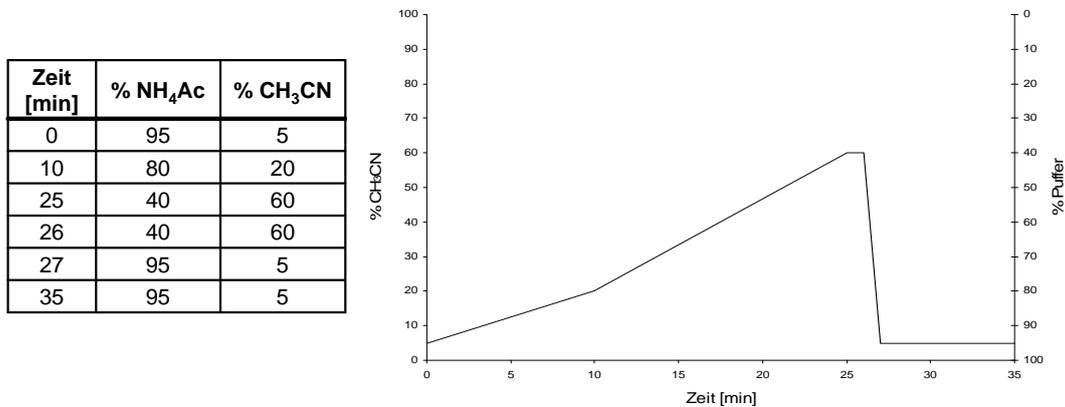


**Abbildung 2.3:** Gradientenprogramm: Fließmittel 40 mM Ammoniumacetat-Puffer und Acetonitril; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 4:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

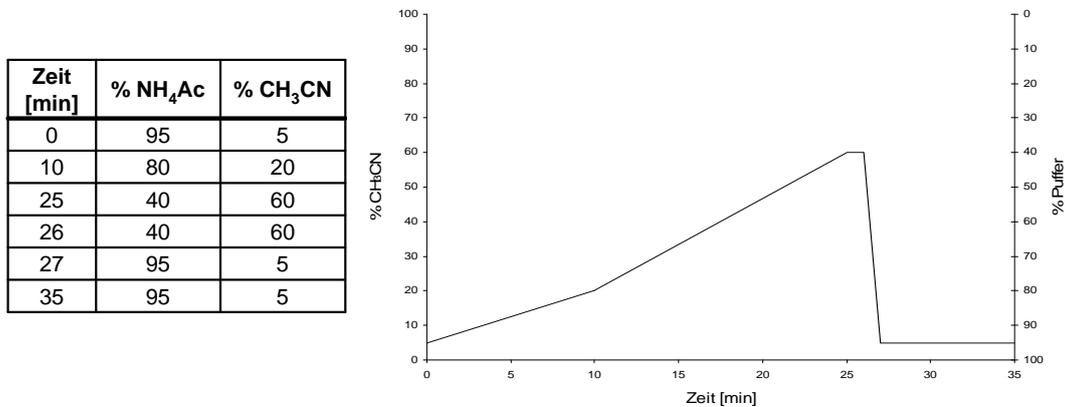


**Abbildung 2.4:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Acetonitril; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 5:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart LiChrospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

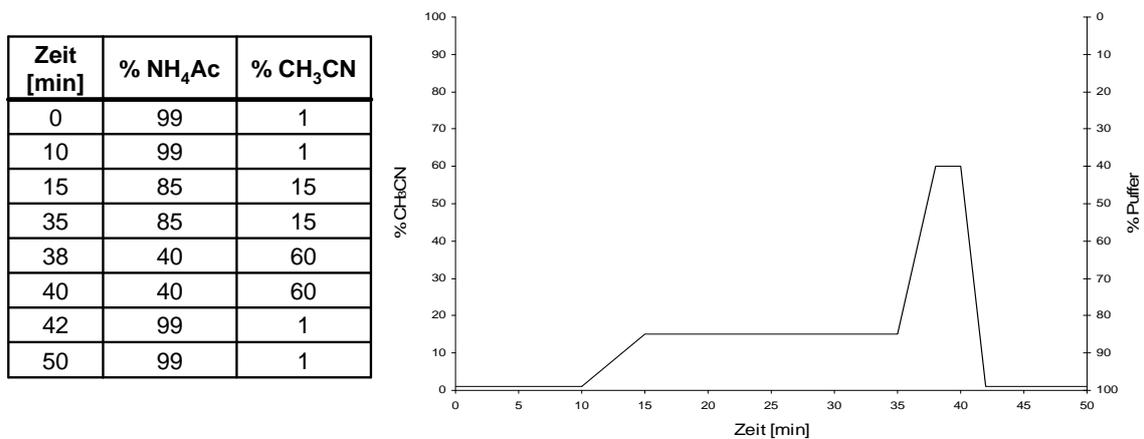


**Abbildung 2.5:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Acetonitril; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 6:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart LiChrospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

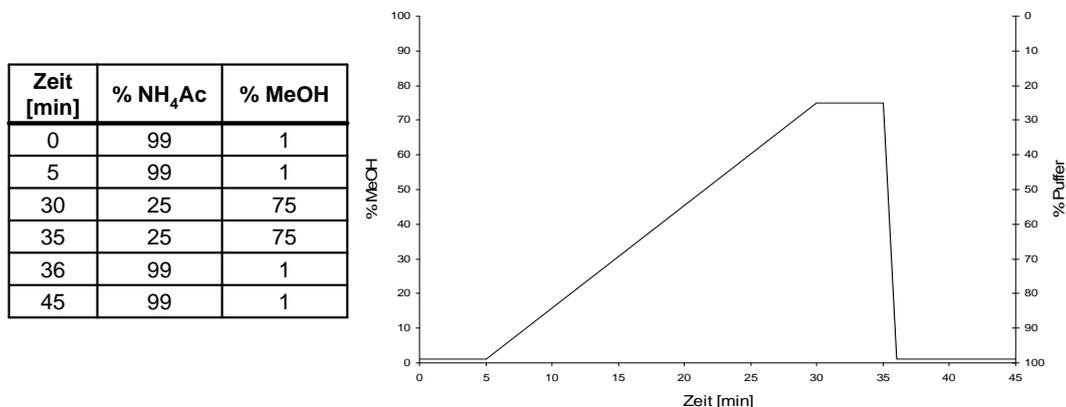


**Abbildung 2.6:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Acetonitril; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 7:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

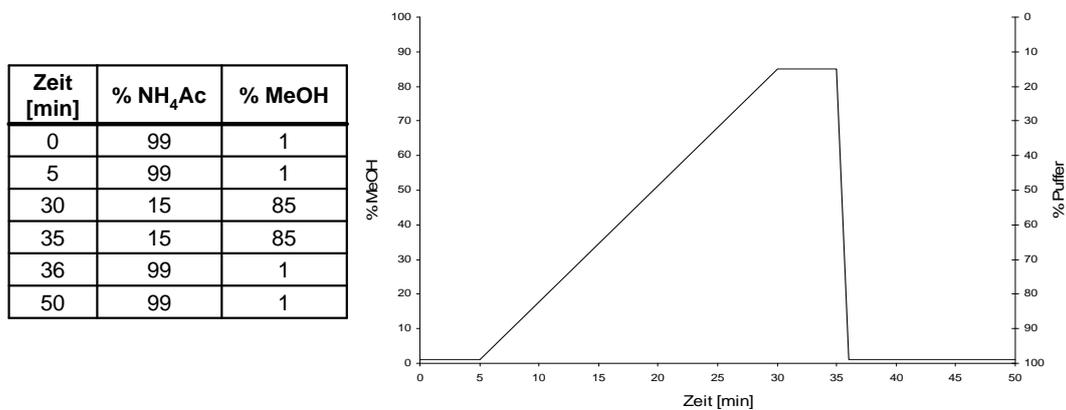


**Abbildung 2.7:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Methanol; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 8:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm

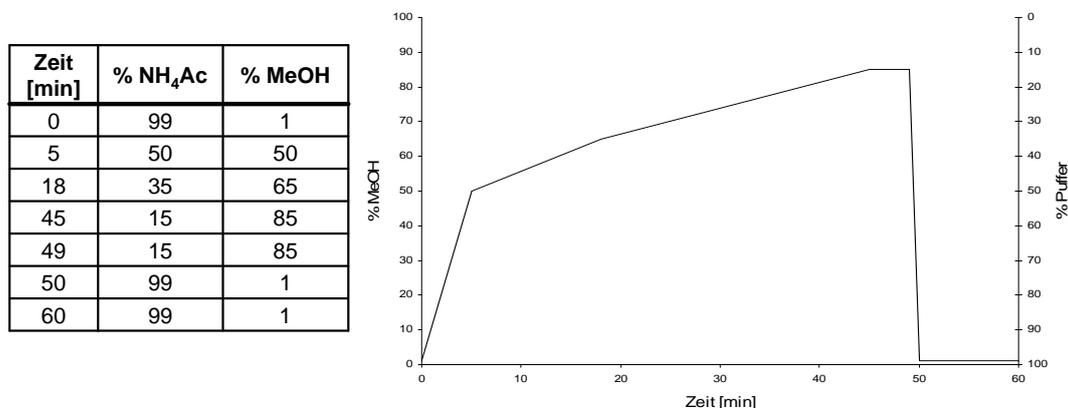


**Abbildung 2.8:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Methanol; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 9:**

LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System, LiChroCart Purospher

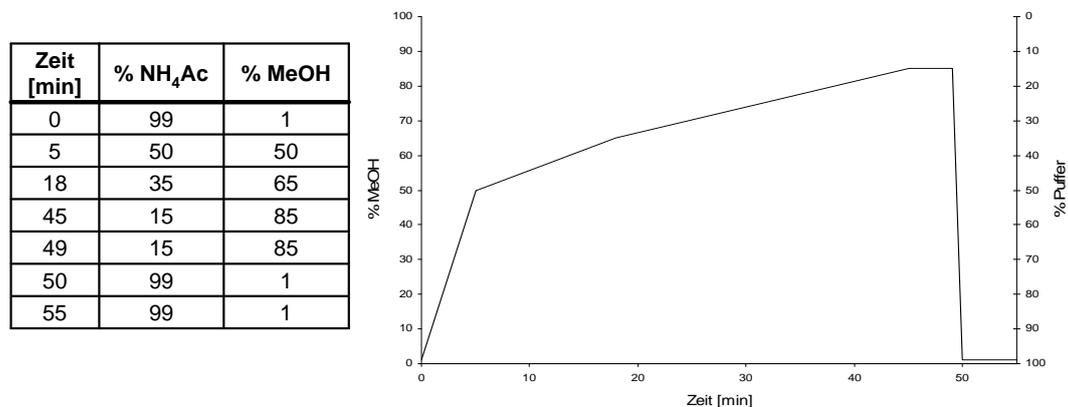
Aufgezeichnete Wellenlängen: 200 – 300 nm



**Abbildung 2.9:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer und Methanol; Flussrate 0.7 mL/min

**HPLC-System 10:**

Gynkotec HPLC/Fluoreszenz System, LiChroCart Purospher



**Abbildung 2.10:** Gradientenprogramm: Fließmittel 15 mM Ammoniumacetat-Puffer + 50  $\mu$ L Triethylamin und Methanol; Flussrate 0.7 mL/min

- Gaschromatograph/Massenspektrometer System:  
 Agilent 6850 Network GC-System in Kombination mit Agilent 5975C inert XL EI/CI MSD, Agilent Technologies, Böblingen  
 Messungen im Electron-Impact-Mode bei 70 eV  
 Säule: HP-5MS Kapillarsäule (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness), J&W Scientific, Agilent Technologies, Böblingen  
 Trägergas: Helium  
 Flussrate: 0.8 mL/min  
 Ofentemperaturgradientenprogramm: Die Temperatur wird 1 min lang auf

80 °C gehalten, dann in 15 °C/min auf 325 °C erhöht und schließlich 5 min lang auf 325 °C verblieben.

Einspritzblock-Temperatur: 250 °C

Transferline-Temperatur: 280 °C

Ionen-Quelle-Temperatur: 230 °C

Messungen im Scan-Mode: m/z 50 bis 450

- Zentrifugen:  
Minifuge GL, Bachhofer, Reutlingen  
Minizentrifuge 16 R, Hettich, Tuttlingen
- NMR-Gerät:  
NMR AS 400, OXFORD, Oxfordshire, UK  
Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm, bezogen auf das als interner Standard verwendete Lösemittel (DMSO-d<sub>6</sub>). Kopplungskonstanten  $^nJ$  über n Bindungen werden in Hz angegeben. Die Signalmultiplizität wird mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multipllett), und br (breit) beschrieben.
- Analysenwaage A-150-SX, COBOS, Spanien
- Digital pH-Meter, Knick Elektronische Messgeräte GmbH und Co., Berlin
- Gefriertrocknungsanlage, ALPHA 1 - 4 LSC, Martin Christ, Osterode am Harz
- Magnetrührer IKA Combimag RCT, Jahnke & Kunkel GmbH und Co. KG, Staufeu i. Breisgau
- Nanophotometer mit LabelGuard-Küvette, Implen, München
- Pipetten, 10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL, Gilson, Middletown, USA
- Rotationsverdampfer, Büchi, Glasapparatefabrik Flawil, Schweiz
- Spectrofluorophotometer RF-1502, Shimadzu, Duisburg
- Thermomixer, Eppendorf, Hamburg
- Trockenschrank Funktion Line, Heraeus-Kendro, Hanau
- Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- UV-Lampe, Quarzlampen GmbH, Hanau
- Vacuum Concentrator RCT 90, Jouan, Unterhaching
- Vortex-Rüttler, Heidolph, Kehlheim

## 2.2 Materialien

- Bond Elut C18 SPE-Säulen, 500 mg, 5 und 12 mL, Varian, Darmstadt
- Dünnschicht-Chromatographieplatten, 20 × 20 cm, Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt
- Einmal-Injektions-Kanülen Sterican Größe 18, Braun, Melsungen
- Einmalspritzen 1 mL Injekt F, Braun, Melsungen
- Eppendorfcups 1.5 mL und 2 mL, Eppendorf, Hamburg
- Konische Einsätze für Qualyvials, 0,1 ml mit Federhalterung, Chrompack, Frankfurt
- Maxivials, Packard, Frankfurt
- Microvials 300  $\mu$ L aus Polypropylen für die HPLC, Alltech, Unterhaching
- Nanosep MF 0.2  $\mu$ m Zentrifugenfilter, Pall, Dreieich
- Neutralit pH-Indikatorpapier, Merck, Darmstadt
- Pasteurpipetten aus Glas, Brand, Wertheim/Main
- Qualyvials, 1.5 mL und Silikon-Teflon-Septum, Zinsser Analytik, Frankfurt
- Injektionsflaschen 32.5 x 11.5 mm Fiolaxglas klar, AMBEG Dr. J. Dichter GmbH, Berlin
- Vollpipetten aus Glas, 10 mL und 20 mL, Brand, Wertheim/Main

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

- 1,4-Dioxan, Sigma, Deisenhofen
- 1-Naphthylisocyanat, Sigma, Deisenhofen
- 2'-Desoxyriboadenosin, Sigma, Deisenhofen
- 2'-Desoxyribocytidin, Sigma, Deisenhofen
- 2'-Desoxyriboguanosin, Sigma, Deisenhofen
- 2'-Desoxyribothymidin, Sigma, Deisenhofen
- 2-Naphthoylchlorid, Sigma, Deisenhofen

- 3'-Hydroxymyosmin aus eigener Synthese
- 3-Picolylchlorid, Sigma, Deisenhofen
- 3-Pyridylaldehyd, Sigma, Deisenhofen
- 3-Pyridylessigsäure, Sigma, Deisenhofen
- 3-Pyridylmethanol, Sigma, Deisenhofen
- 4-(Dimethylamino)pyridin, Sigma, Deisenhofen
- Acetonitril p.A., Merck, Darmstadt
- Aceton, Merck, Darmstadt
- Alkaline Phosphatase, Sigma, Deisenhofen
- Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt
- Ammoniumhydroxid, Sigma, Deisenhofen
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt
- Cäsiumcarbonat, Sigma, Deisenhofen
- Dansylchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Dichlormethan p.A., Merck, Darmstadt
- Diisopropylazodicarboxylat, Sigma, Deisenhofen
- Dimethylformamid, Sigma, Deisenhofen
- Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid-d<sub>6</sub>, Sigma, Deisenhofen
- DNA-Kit, Invisorb Spin Tissue Midi Kit, Invitex, Berlin:
  - Lysis-Puffer G
  - Proteinase K-Lösung
  - Binding-Puffer T
  - Waschpuffer
  - Elutions-Puffer D
- DNase I, Sigma, Deisenhofen
- Essigsäureanhydrid, Sigma, Deisenhofen
- Ethylacetat, Sigma, Deisenhofen

- Helium 99,99 % Trägergas, Linde AG, München
- Hexan, Sigma, Deisenhofen
- Horseradish Peroxidase, Sigma, Deisenhofen
- Humanlebergewebeproben, Rechtsmedizin, LMU-München
- Kalbsthymus-DNA, Sigma, Deisenhofen
- Lithiumhydroxid, Sigma, Deisenhofen
- Magnesiumchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Magnesiumoxid, Sigma, Deisenhofen
- Methanol p.A., Merck, Darmstadt
- Millipore-Wasser: deionisiertes Wasser (Hausversorgung), nachfolgend gereinigt durch Reagent Water System, Millipore, Königstein
- Natriumcarbonat, Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
- Natriumsulfat, Merck, Darmstadt
- Nikotinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Pentafluorobenzoylchlorid, Fluka, Deisenhofen
- Perchlorsäure, Merck, Darmstadt
- Phosphodiesterase, Sigma, Deisenhofen
- Pyridin, Merck, Darmstadt
- Salpetersäure, Merck, Darmstadt
- Salzsäure, Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure, Merck, Darmstadt

- Thymin, Sigma, Deisenhofen
- Triethylamin, Sigma, Deisenhofen
- Trimethylamin, Sigma, Deisenhofen
- Triphenylphosphin, Sigma, Deisenhofen
- Tris-HCl, Sigma, Deisenhofen
- Wasserstoffperoxid p.A., Merck, Darmstadt



## 3. Methoden

### 3.1 Peroxidation von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd

100  $\mu\text{g}$  (0.6  $\mu\text{mol}$ ) einer wässrigen Lösung von 3'-Hydroxymyosmin werden mit 5 – 10  $\mu\text{L}$  35 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 – 1.0  $\mu\text{mol}$ ) bei 37 °C 1 h inkubiert, wobei das Gesamtvolumen der Lösungen 500  $\mu\text{L}$  beträgt.

Die wässrigen Lösungen von 800  $\mu\text{g}$  (7.3  $\mu\text{mol}$ ) 3-Pyridylmethanol, 800  $\mu\text{g}$  (7.5  $\mu\text{mol}$ ) 3-Pyridylaldehyd und 800  $\mu\text{g}$  (4.6  $\mu\text{mol}$ ) 3-Pyridylelessigsäure werden ebenfalls wie oben beschrieben inkubiert.

Die Peroxidationen in Anwesenheit von Horseradish Peroxidase (HRP) werden in einem 150 mM Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37 °C 24 h lang und bei einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Zur Reaktion einer 1 mM 3'-Hydroxymyosmin-Lösung verwendet man 500 Units/mL HRP und 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 3-Pyridylmethanol (0.9 mM Lösung), 3-Pyridylaldehyd (0.9 mM Lösung) und 3-Pyridylelessigsäure (0.9 mM Lösung) werden mit 550 Units/mL HRP und 9.4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert.

Nach Inkubation werden sämtliche Lösungen mittels HPLC-System 1 bzw. HPLC-System 2 analysiert und mit Standardlösungen von Nikotinsäure, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol, 3-Pyridylaldehyd und 3'-Hydroxymyosmin co-chromatographiert.

## 3.2 Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte

### 3.2.1 Synthese von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion [62]

3-Pyridylmethanol (97  $\mu\text{L}$ , 1 mmol), Triphenylphosphin (787 mg, 3 mmol) und Thymin (126 mg, 1 mmol) werden in 4 mL trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Suspension tropft man langsam Diisopropylazodicarboxylat (DIAD, 591  $\mu\text{L}$ , 3 mmol) hinzu und rührt 1 h bei 100 °C unter Rückfluss. Es erfolgt ein Farbwechsel von gelb über orange nach rot. Nach dem Abkühlen liegt das Rohprodukt als braunes Öl vor.

Das Rohprodukt wird zunächst mittels HPLC-System 3 analysiert und mit den Chromatogrammen separater Reaktionen von 3-Pyridylmethanol bzw. Thymin mit Triphenylphosphin und DIAD verglichen.

Das durch Co-Chromatographie identifizierte Rohprodukt wird mit 5 mL C-18-SPE-Säulen und fraktionierter Eluation aufgereinigt und angereichert. Dazu werden zehn C-18-SPE-Säulen jeweils mit einem Säulenvolumen Methanol konditioniert, mit zwei Säulenvolumen Wasser gewaschen und dann je 30  $\mu\text{L}$  des zuvor in 500  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelösten Rohprodukts aufgetragen. Anschließend wird mit 1 mL  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (20:80 v/v) und dann mit 1 mL  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (25:75 v/v) eluiert. Die gesammelten Eluate der 25 %igen Acetonitril-Lösung werden gefriergetrocknet. Man erhält ein gelbweißes Harz (169.5 mg, 55 %).

Das reine Produkt wird in  $\text{DMSO-d}_6$  aufgenommen und mittels NMR-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC, HMBC) charakterisiert. (Abbildung 3.1)

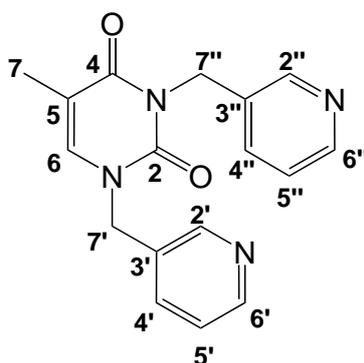


Abbildung 3.1: 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 1,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7), 4,94 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -7'), 5,01 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -7''), 7,32 (dd, 1H,  $^3J$  = 8.8 Hz, 6.6 Hz, CH-5''), 7,37 (dd, 1H,  $^3J$  = 9.2 Hz, 6.8 Hz, CH-5'), 7,65 (d, 1H,  $^3J$  = 7.7 Hz, CH-4''),

7.73 (d, 1H,  $^3J = 7.8$  Hz, CH-4'), 7.81 (s, 1H, CH-6), 8.44 (d, 1H,  $^3J = 4.0$  Hz, CH-6''), 8.50 (m, 2H, CH-6'/CH-2''), 8.56 (s, 1H, CH-2').

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta = 13.11$  (CH<sub>3</sub>-7), 42.35 (CH<sub>2</sub>-7''), 49.91 (CH<sub>2</sub>-7'), 109.11 (C-5), 124.08 (CH-5''), 124.27 (CH-5'), 132.89 (C-3'), 133.38 (C-3''), 136.03 (CH-4'), 136.12 (CH-4''), 140.80 (CH-6), 148.99 (CH-6''), 149.54 (CH-2''/CH-6'), 149.73 (CH-2'), 151.67 (C=O-2), 163.6 (C=O-4).

### 3.2.2 Synthese von 3-(3''-Picoly)thymidin

#### 3.2.2.1 3',5'-Diacetyl-thymidin [63]

Eine Suspension aus Thymidin (1.0 g, 4.10 mmol),  $Ac_2O$  (5 mL) und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) lässt man so lange rühren, bis das Reaktionsgemisch klar wird. Anschließend engt man durch Vakuumdestillation die Lösung ein und gibt 100 mL Dichlormethan hinzu. Die organische Phase wird zweimal mit 100 mL Wasser, einmal mit 100 mL einer  $NaHCO_3$ -Lösung und einmal mit 100 mL einer  $NaCl$ -Lösung gewaschen. Nachdem die organische Phase über  $Na_2SO_4$  getrocknet und der Feststoff abfiltriert wurde, entfernt man das Lösemittel im Vakuum. Man erhält ein farbloses Öl, welches anschließend durch HPLC-System 4 und GC/MS untersucht wird.

#### 3.2.2.2 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picoly)thymidin [63]

Zu einer Lösung von 3',5'-Diacetylthymidin (97.9 mg, 0.30 mmol) in 1 mL DMF gibt man Cäsiumcarbonat (300 mg, 0.90 mmol). Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Suspension auf 0 °C gebracht. Anschließend tropft man langsam 3-Picolylchlorid (75.45 mg, 0.46 mmol) hinzu und lässt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Am folgenden Tag wird Ethylacetat (15 mL) hinzugegeben und die organische Phase mit zweimal 15 mL Wasser und 15 mL einer gesättigten  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch HPLC-System 4 und GC/MS untersucht.

#### 3.2.2.3 3-(3''-Picoly)thymidin [64]

200 mg des Rohprodukts 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picoly)thymidin aus dem vorherigen Syntheseschritt werden in einer Mischung aus 1 mL  $MeOH$  und 0.5 mL  $H_2O$  gelöst. Unter Eiskühlung und ständigem Rühren gibt man  $LiOH$  (47 mg, 1.12 mmol) hinzu. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur entsteht ein orangefarbener Niederschlag. Anschließend wird das Lösemittel unter kontinuierlichem Stickstoffstrom

entfernt und der trockene orangefarbene Rückstand in 50 mL  $H_2O$  gelöst. Jeweils 10 mL trägt man auf vorkonditionierte 12 mL C-18-SPE-Säulen auf und eluiert mit 20 mL  $CH_3CN/H_2O$  (5:95 v/v), 10 mL  $CH_3CN/H_2O$  (10:90 v/v) und 10 mL  $CH_3CN/H_2O$  (20:80 v/v). Die Eluate mit  $CH_3CN/H_2O$  10:90 und 20:80 werden vereint und gefriergetrocknet. Man erhält 129.25 mg reinweißes Pulver in einer Gesamtausbeute von 52 %.

Das erhaltene Produkt wird mittels HPLC-System 4 analysiert und durch NMR-Spektroskopie ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HMQC, HMBC) charakterisiert. (Abbildung 3.2)

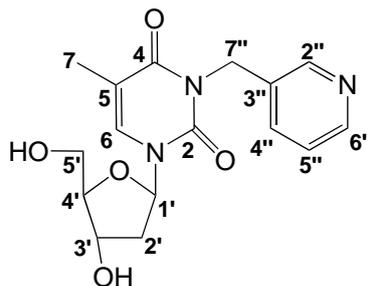


Abbildung 3.2: 3-(3''-Picolyl)thymidin

$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 1.83 (s, 3H, CH3-7), 2.09 - 2.13 (m, 2H, CH2-2'), 3.57 (dd, 1H,  $^3J$  = 11.9, 11.6 Hz, CH-5'a), 3.56 (dd, 1H,  $^3J$  = 11.8, 11.9 Hz, CH-5'b), 3.77 (q, 1H,  $^3J$  = 3.7, 3.3, 3.7 Hz, CH-4'), 4.25 - 4.22 (m, 1H, CH-3'), 5.00 (s, 2H, CH2-7''), 5.04 (b, 1H, OH-5'), 5.25 (b, 1H, OH-3'), 6.19 (t, 1H,  $^3J$  = 6.5, 7.0 Hz, CH-1'), 7.33 (dd, 1H,  $^3J$  = 4.8, 3.1 Hz, CH-5''), 7.66 (d, 1H,  $^3J$  = 8.0 Hz, CH-4''), 7.81 (s, 1H, CH-6), 8.45 (d, 1H,  $^3J$  = 4.7 Hz, CH-6''), 8.52 (s, 1H, CH-2'').

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 13.42 (CH3-7), 39.47 (CH2-2'), 42.04 (CH2-7''), 61.69 (CH2-5'), 70.73 (CH-3'), 85.46 (CH-1'), 87.94 (CH-4'), 109.09 (C-5), 124.08 (CH-5''), 133.34 (C-3''), 135.75 (CH-4''), 136.13 (CH-6), 148.99 (CH-6''), 149.79 (CH-2''), 151.02 (C=O-2), 163.21 (C=O-4).

### 3.3 Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben

#### 3.3.1 Isolierung der DNA aus Gewebeproben und Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur DNA-Extraktion verwendet man einen DNA-Kit. So gibt man zu 100 mg einer zerkleinerten Humanlebergewebeprobe 2 ml Lysis-Puffer G, sowie 80  $\mu\text{L}$  Proteinase K-Lösung, durchmischt und inkubiert 2.5 h bei 52 °C im Thermomixer bis zur vollständigen Lyse. Im Anschluss wird die Probe vom nicht zersetzten Material befreit, indem man 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert und den Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nun wird 1 mL Binding-Puffer T zugesetzt, durchmischt, die Lösung in den Spin-Filter überführt und 1 min bei 52 °C im Thermomixer inkubiert. So wird eine Bindung der DNA an die non-chaotrope Membran des Filters erreicht. Anschließend zentrifugiert man den Spin-Filter 10 min bei 4000 U/min und verwirft das Filtrat. Um die DNA von Verunreinigungen wie Proteine und Kohlenhydrate zu befreien, wird der Spin-Filter zweimal mit 3 mL Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Nachfolgend trocknet man den Spin-Filter 1 h bei 50 °C im Trockenschrank bis sämtliches Ethanol des Waschpuffers verdampft ist. Zur Elution der DNA von der Filtermembran wird nun 500  $\mu\text{L}$  52 °C heißer Elutions-Puffer D auf den Filter gegeben, 6 min bei 52 °C inkubiert und die DNA durch Zentrifugieren bei 5000 U/min eluiert.

Die DNA-Konzentration wird photometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) bestimmt. Der Grad der Verunreinigung durch Kohlenhydrate und Proteine kann über die Absorptionen bei 230 und 280 nm ermittelt werden. Um das lineare Verhältnis von Absorption und Konzentration zu gewährleisten, ist es nötig die Absorption  $< 1$  zu messen. Am Photometer erreicht man die geeignete Verdünnung der Probe über die Schichtdicke, die an diesem Photometer durch Verwendung unterschiedliche Deckel auf der Küvette ermöglicht wird. So werden 4  $\mu\text{L}$  der Probe gemessen. Als Nulllinienabgleich dient reines Wasser. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Absorption errechnet sich nach folgender Formel:

$$c(DNA) = \frac{A_{260}}{20} \times F \quad (3.1)$$

$A_{260}$  = Absorption bei 260 nm

F: Verdünnungsfaktor des jeweiligen Deckels

### 3.3.2 Vorversuch zur Derivatisierung von 3-Pyridylmethanol mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC)

10  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 3-Pyridylmethanol in Dichlormethan (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) werden zur Derivatisierung mit einer Mischung aus einem Äquivalent PFBC (490  $\mu\text{L}$  Dichlormethan + 10  $\mu\text{L}$  PFBC) und 50 Äquivalenten 0.1 mol/L Trimethylamin in Dichlormethan/Hexan versetzt. Nach 2 h entfernt man die Lösemittel und alle übrigen, bei Raumtemperatur flüchtigen Substanzen im kontinuierlichen Stickstoffstrom. Anschließend wird der Rückstand in 500  $\mu\text{L}$  Dichlormethan gelöst und eine geeignete Verdünnung mittels GC/MS untersucht.

### 3.3.3 Hydrolytische Spaltungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin

#### 3.3.3.1 Vorversuche mit verschiedenen Säuren und Basen

Zur hydrolytischen Spaltung von 3-(3''-Picolyl)thymidin werden zunächst Vorversuche durchgeführt.

Dazu wird ca. 1 mg von 3-(3''-Picolyl)thymidin in 500  $\mu\text{L}$   $H_2O$  gelöst und jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Lösung mit verschiedenen Säuren oder Basen versetzt. Man lässt die Reaktionsgemische bei verschiedenen Temperaturen reagieren und/oder behandelt mit Ultraschall über unterschiedliche Zeitspannen. (Tabelle 3.1)

Die jeweiligen Reaktionslösungen werden anschließend neutralisiert und mittels HPLC-System 4 bzw. HPLC-System 5 co-chromatographisch analysiert.

#### Zu jeweils 100 $\mu\text{L}$ 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung:

Säure/Base	Zeit	Temperatur	Ultraschall
-	2 h	RT	+
1 N <i>HCl</i>	2 h	RT	+
1 N <i>HCl</i>	3 h	80 °C	-
4 N <i>HCl</i>	3 h	150 °C	-
12 N <i>HCl</i>	24 h	80 °C	-
12 N <i>HCl</i>	3 h	120 °C	-
65 %ige <i>HNO</i> <sub>3</sub>	20 h	80 °C	-
1 N <i>NaOH</i>	20 h	80 °C	-
verd. <i>H</i> <sub>2</sub> <i>SO</i> <sub>4</sub> / <i>H</i> <sub>2</sub> <i>O</i> <sub>2</sub>	1 h	RT	+
verd. <i>HNO</i> <sub>3</sub> / <i>HCl</i>	1 h	RT	+
0.1 %ige <i>HClO</i> <sub>4</sub>	72 h	RT	-
71 %ige <i>HClO</i> <sub>4</sub>	72 h	RT	-
71 %ige <i>HClO</i> <sub>4</sub>	3 h	RT	+

**Tabelle 3.1:** Vorversuche zur hydrolytischen Spaltung von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit verschiedenen Säuren und Basen

### 3.3.3.2 Spaltungsversuche mit Perchlorsäure ( $HClO_4$ )

Variation der  $HClO_4$ -Konzentration bei unterschiedlicher Reaktionszeit:

Je 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Wasser wird mit 42, 56, 70, 83 und 100  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (71 %) versetzt und 2, 3, 4 und 6 h mit Ultraschall behandelt. (Tabelle 3.2) Nach Neutralisation werden die Proben im HPLC-System 5 co-chromatographisch untersucht.

<b>Zu jeweils 100 <math>\mu\text{L}</math> 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung:</b>	
$HClO_4$ (71 %)	Zeit im Ultraschall
100 $\mu\text{L}$	2 h
100 $\mu\text{L}$	4 h
100 $\mu\text{L}$	6 h
42 $\mu\text{L}$	3 h
56 $\mu\text{L}$	3 h
70 $\mu\text{L}$	3 h
83 $\mu\text{L}$	3 h
100 $\mu\text{L}$	3 h

**Tabelle 3.2:** Hydrolytische Spaltungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit verschiedenen  $HClO_4$ -Konzentrationen

Variation der 3-(3''-Picolyl)thymidin-Konzentration:

In je 1 mL Wasser werden ca. 2 mg und ca. 6 mg von 3-(3''-Picolyl)thymidin gelöst. Je 100  $\mu\text{L}$  der niedrig konzentrierten und der höher konzentrierten 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösungen werden mit 100  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (71 %) versetzt und 2 bzw. 3 h mit Ultraschall behandelt. Die vier so erhaltenen Proben werden neutralisiert und mittels HPLC-System 5 co-chromatographisch untersucht.

Variation der  $HClO_4$ -Konzentration und der 3-(3''-Picolyl)thymidin-Konzentration bei unterschiedlicher Reaktionszeit:

Wässrige Lösungen von 3-(3''-Picolyl)thymidin der Konzentrationen 2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  und 0.83  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  werden zu je 100  $\mu\text{L}$  mit 50, 100 und 150  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (71 %) versetzt und 1 bzw. 2 h mit Ultraschall behandelt. (Tabelle 3.3)

Die einzelnen Proben werden neutralisiert und mittels HPLC-System 4 co-chromatographisch untersucht.

Konzentration 3-(3''-Picolyl)thymidin	$HClO_4$ (71 %)	Zeit im Ultraschall
2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	1 h
1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	1 h
0.83 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	1 h
2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	1 h
2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	2 h
1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	1 h
2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	1 h
2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	2 h

**Tabelle 3.3:** Hydrolytische Spaltungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit  $HClO_4$

## 3.4 Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben

### 3.4.1 Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA [65]

Zunächst werden 20 mg Kalbsthymus-DNA in 2 mL 10 mM Tris-HCl/5 mM  $MgCl_2$ -Puffer gelöst. 200  $\mu\text{L}$  der DNA-Lösung versetzt man mit 1000 Units DNase I und inkubiert 10 min bei 37 °C im Thermomixer. Anschließend werden 0.05 Units Phosphodiesterase und 306 Units Alkaline Phosphatase zugegeben und nochmals 1 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Um die Enzyme zu entfernen wird die Lösung filterzentrifugiert und anschließend im HPLC-System 6 chromatographiert und mit einer Lösung der einzelnen Nukleoside 2'-Desoxyriboadenosin, 2'-Desoxyriboguanosin, 2'-Desoxyribocytidin und 2'-Desoxyribothymidin in 10 mM Tris-HCl/5 mM  $MgCl_2$ -Puffer verglichen.

2 mg Kalbsthymus-DNA werden in 200  $\mu\text{L}$  Elutions-Puffer D/10 mM Tris-HCl/5 mM  $MgCl_2$ -Puffer (pH 7.0) gelöst und 10  $\mu\text{L}$  (0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) einer 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung in 10 mM Tris-HCl/5 mM  $MgCl_2$ -Puffer (pH 7.0) beigemischt. Im Folgenden wird die oben beschriebene, enzymatische Hydrolyse durchgeführt. Das resultierende Gemisch wird anschließend im HPLC-System 9 analysiert und mit der enzymatischen Hydrolyse von 2 mg Kalbsthymus-DNA in 200  $\mu\text{L}$  Elutions-Puffer D/10 mM Tris-HCl/5 mM  $MgCl_2$ -Puffer (pH 7.0), einer Lösung der einzelnen Nukleoside 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxythymidin und 3-(3''-Picolyl)thymidin in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.0) (je 6.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) co-chromatographiert.

### 3.4.2 Fluoreszenz Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin

#### 3.4.2.1 Derivatisierung mit Dansylchlorid [66]

Für die Versuche verwendet man eine frische Dansylchlorid-Lösung. Dazu werden 5 mg Dansylchlorid in 2 mL Aceton gelöst. In einer Versuchsreihe versetzt man eine wässrige Lösung von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit Dansylchlorid-Lösung und verschiedenen Basen und erhitzt auf 50 bzw. 80 °C. (Tabelle 3.4) Nach dem Abkühlen und Neutralisieren werden die einzelnen Lösungen mittels HPLC-System 7 co-chromatographisch untersucht.

Zu jeweils 50 $\mu\text{L}$ 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung:			
Dansylchlorid	Base	Temperatur	Zeit
50 $\mu\text{L}$	-	50 °C	1 h, 4 h
50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$ 0.5 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	50 °C	1 h
50 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$ $\text{NEt}_3$	50 °C	1 h, 3 h
50 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$ $\text{NEt}_3$	80 °C	1 h

**Tabelle 3.4:** Versuche zur Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit Dansylchlorid

#### 3.4.2.2 Derivatisierung mit 1-Naphthylisocyanat [70]

##### Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril

Zu jeweils 100  $\mu\text{L}$  einer 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung in Acetonitril gibt man eine Spatelspitze Magnesiumoxid und schüttelt, um eine möglichst wasserfreie Lösung zu erhalten. Nun werden 20  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat zugegeben. Nach 1 h bei 80 °C im Trockenschrank wird das Trockenmittel abzentrifugiert. Den Überstand versetzt man in einem neuen Gefäß mit 50  $\mu\text{L}$  Wasser und stellt das Gemisch 1 h bei 25 °C in den Trockenschrank. Anschließend wird der Niederschlag abzentrifugiert, die überstehende Lösung filterzentrifugiert und das Filtrat durch HPLC-System 7 untersucht.

Zur Co-Chromatographie wird in der obigen Versuchsbeschreibung die 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung gegen Acetonitril ersetzt und im Folgenden ebenso verfahren.

##### Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril in Anwesenheit von Pyridin bzw. Triethylamin

Zu jeweils 100  $\mu\text{L}$  einer mit Magnesiumoxid getrockneten 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung in Acetonitril werden 5  $\mu\text{L}$  Pyridin bzw. Triethylamin und 20  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat gegeben. Nach 1 h bei 80 °C im Trockenschrank entfernt man den reinweißen Feststoff durch Zentrifugieren, fügt 50  $\mu\text{L}$  Wasser hinzu und lässt das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur stehen. Der entstandene Niederschlag

wird durch Filterzentrifugieren entfernt.

Die entstandenen Gemische werden mit einer in gleicher Weise behandelten Mischung aus Pyridin bzw. Triethylamin mit 1-Naphthylisocyanat mittels HPLC-System 8 bzw. 9 verglichen. Außerdem wird eine mit Magnesiumoxid getrocknete Probe der Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung mit Pyridin und 1-Naphthylisocyanat mittels GC/MS analysiert.

### **Derivatisierung eines Gemisches aus den DNA-Nukleosiden und 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril in Anwesenheit von Pyridin**

200  $\mu\text{L}$  einer Mischung der einzelnen Nukleoside 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxythymidin und 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril (je 6.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) werden 5  $\mu\text{L}$  Pyridin und 20  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat gegeben und 1 h bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Der entstandene reinweiße Niederschlag wird durch Zentrifugieren entfernt. Anschließend wird die Probe mit 100  $\mu\text{L}$  Wasser versetzt, durchmischt und 1 h lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der entstandene reinweiße Niederschlag wird durch Filterzentrifugieren entfernt. Das Filtrat wird mittels HPLC-System 9 analysiert. Zur Co-Chromatographie verwendet man eine Derivatisierung von 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxythymidin in Acetonitril (je 6.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) mit 5  $\mu\text{L}$  Pyridin und 20  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat sowie eine Probe der Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril mit Pyridin und 1-Naphthylisocyanat von dem vorherigen Ansatz.

### **Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Tris-HCl-Puffer in Anwesenheit von Pyridin**

100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin in einer 10 mM Tris-HCl/5 mM MgCl<sub>2</sub>-Puffer (6.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) werden mit 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril gemischt. Zum Trocknen der Lösung wird zweimal mit Magnesiumoxid geschüttelt und jeweils das Trockenmittel durch Zentrifugieren entfernt. Anschließend gibt man 20  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat zu und stellt die Probe 1 h bei 80 °C in den Trockenschrank. Die entstandene Suspension wird mit 50  $\mu\text{L}$  Wasser versetzt, durchmischt und wiederum für 1 h bei 80 °C in den Trockenschrank gestellt. Der entstandene reinweiße Niederschlag lässt sich anschließend schlecht abzentrifugieren, so dass dieser nur durch Filterzentrifugieren entfernt werden kann. Das Filtrat co-chromatographiert man im HPLC-System 9 mit der Reaktionsproduktlösung aus der Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril mit Pyridin und 1-Naphthylisocyanat.

### **Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin auf der SPE-Säule**

Bei weiteren Versuchen, in denen 3-(3''-Picolyl)thymidin auf C-18-SPE-Säulen mit

1-Naphthylisocyanat zur Reaktion gebracht werden soll, trägt man 200  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picoly)thymidin in  $\text{H}_2\text{O}$  (6.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) auf eine präkonditionierte 5 mL C-18-SPE-Säule auf. Anschließend eluiert man mit 1 mL Wasser, lässt die Säule trocken saugen und entfernt das restliche Wasser durch Zentrifugieren. Nun gibt man 200  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat-Lösung (50  $\mu\text{L}$  1-Naphthylisocyanat in 500  $\mu\text{L}$  Acetonitril) auf. Nach 30 min im Trockenschrank bei 80 °C wird zweimal mit 1 mL trockenem Acetonitril eluiert. Zu beiden Eluaten werden anschließend 50  $\mu\text{L}$  Wasser zugegeben und nach 30 min Stehenlassen bei Raumtemperatur der reinweiße Feststoff abzentrifugiert und filterzentrifugiert. Die Filtrate chromatographiert man mit dem HPLC-System 8 und vergleicht sie mit der Reaktionslösung aus der Derivatisierung von 3-(3''-Picoly)thymidin in Acetonitril mit Pyridin und 1-Naphthylisocyanat.

**Fluoreszenz-Chromatographie von 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin**

Die bei der Reaktion von 3-(3''-Picoly)thymidin in Acetonitril mit Pyridin und 1-Naphthylisocyanat entstandenen Reaktionsprodukte 3'-(1'''-Naphthyluretan)-3-(3''-Picoly)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-Picoly)thymidin werden durch einige Läufe im HPLC-System 9 fraktioniert gesammelt und Extinktions- und Emissionsmaximum am Fluoreszenzspektrometer ermittelt. Anschließend werden beide Reaktionsprodukte im HPLC-System 10 bei der Extinktion 282 nm und Emission 360 nm chromatographiert.

**3.4.2.3 Derivatisierung mit 2-Naphthoylchlorid [71]**

Zunächst trocknet man 100  $\mu\text{L}$  einer 3-(3''-Picoly)thymidin-Lösung in Acetonitril mit Magnesiumoxid. Nun werden 5  $\mu\text{L}$  Pyridin und 10  $\mu\text{L}$  2-Naphthoylchlorid zugegeben, vermischt und das Reaktionsgemisch 30 min lang bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Im Anschluss fügt man 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  hinzu. Nach 15 min bei 80 °C im Trockenschrank wird der reinweiße Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC-System 8 analysiert. Zur Co-Chromatographie dient die eben beschriebene Reaktion, bei der die 3-(3''-Picoly)thymidin-Lösung gegen trockenes Acetonitril ersetzt wird.

Für die GC/MS-Analyse wird die aus obiger Reaktion erhaltene Derivatisierungsprobe zur Anreicherung und Entfernung des Pyridins auf eine präkonditionierte 5 mL C-18-SPE-Säule aufgetragen. Zunächst eluiert man mit 1 mL  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (20:80 v/v) und dann mit 1 mL Acetonitril. Letzteres Eluat wird im kontinuierlichen Stickstoffstrom eingengt und mittels GS/MS untersucht.



## Teil III

# Ergebnisse und Diskussion



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Peroxidation von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd

Ausgehend von den beschriebenen Aktivierungen von Myosmin (Kapitel 1.2, Seite 9 ff) wurde die *in vitro* Oxygenierung von einigen bereits im Rattenurin gefundenen Stoffwechselprodukten weiter untersucht. Dazu wurden 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylmethanol, 3-Pyridylaldehyd und 3-Pyridylessigsäure mit Wasserstoffperoxid bzw. dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) inkubiert.

#### 3'-Hydroxymyosmin

3'-Hydroxymyosmin wurde nur wenig im Metabolismus in Ratten (2 %) gefunden, was zur Annahme führte, es oxidiere zur 3-Pyridylessigsäure als Endprodukt weiter. In den Abbildungen 4.1 und 4.2 (Seite 49 und 50) sind die HPLC-Chromatogramme und die dazugehörigen UV-Spektren der Peroxidation mit  $H_2O_2$  bzw. Peroxidation mit HRP von 3'-Hydroxymyosmin, den Referenzsubstanzen Nikotinsäure, 3-Pyridylessigsäure, 3'-Hydroxymyosmin und 3-Pyridylmethanol gegenübergestellt:

Die Peroxidation mit  $H_2O_2$  (Chromatogramm A, Seite 49) zeigt, dass nur geringe Mengen 3-Pyridylessigsäure (A2), aber auch eine größere Menge Nikotinsäure (A1) entsteht. Bei enzymatischer Peroxidation mit HRP (Chromatogramm B, 49) findet man 3-Pyridylessigsäure (B2) und Nikotinsäure (B1) in ähnlichem Ausmaß, wobei durch Enzymzusatz der Gesamtumsatz der Reaktion wie erwartet höher ausfällt. 3'-Hydroxymyosmin wurde hierbei fast vollständig umgesetzt.

In beiden Fällen wurde eine Bildung von 3-Pyridylmethanol (E3) nicht beobachtet. Also oxidiert 3'-Hydroxymyosmin nicht wie vermutet direkt zum vermeintlichen

Endprodukt 3-Pyridylessigsäure, sondern bildet sowohl Nikotinsäure, als auch 3-Pyridylessigsäure.

### 3-Pyridylessigsäure

3-Pyridylessigsäure wurde zu 23 % im Rattenurin isoliert. Chromatogramm A in Abbildung 4.3 (Seite 51) und Chromatogramm C in Abbildung 4.4 (Seite 52) zeigt, dass bei Inkubation von 3-Pyridylessigsäure (A3/C3) mit  $H_2O_2$  bzw. HRP ein Zerfall in bisher nicht identifizierte Produkte (A1/C1/C4/C5) stattfindet. Nikotinsäure (B2/D2) wird nicht gebildet.

### 3-Pyridylmethanol

3-Pyridylmethanol wurde zu 4 % im Rattenurin gefunden, also in derselben Größenordnung wie 3'-Hydroxymyosmin. Auch hier lag auf Grund des geringen Anteils im Rattenurin die Vermutung nahe, dass 3-Pyridylmethanol direkt zu Nikotinsäure oxidiert.

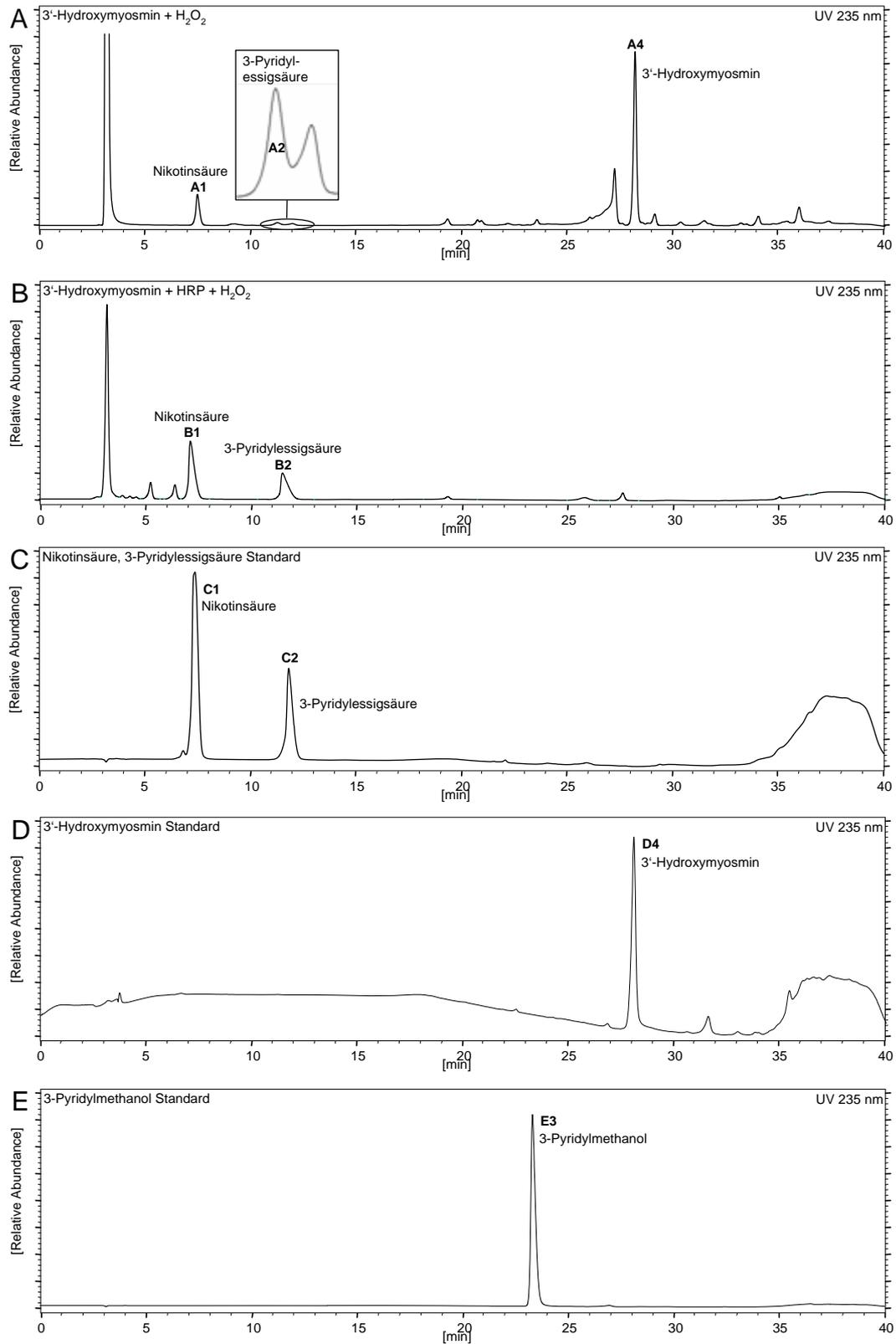
Aus den Abbildungen 4.5 und 4.6 (Seite 53 und 54) geht hervor, dass nach Peroxidation von 3-Pyridylmethanol (A2) mit  $H_2O_2$  neben Nikotinsäure (A1) auch 3-Pyridylaldehyd (A3) entsteht. Die Inkubation von 3-Pyridylmethanol (B2) mit HRP liefert ebenfalls Nikotinsäure (B1) und 3-Pyridylaldehyd (B3) bei einem etwas höheren Umsatz.

3-Pyridylmethanol kann also zu Nikotinsäure und 3-Pyridylaldehyd oxidiert werden.

### 3-Pyridylaldehyd

Auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse wurde 3-Pyridylaldehyd peroxidiert (Abbildungen 4.7, 4.8 (Seite 55 und 56)):

Sowohl bei Peroxidierung von 3-Pyridylaldehyd (A2/B2) mit  $H_2O_2$ , als auch unter Zusatz von HRP, entsteht Nikotinsäure (A1/B1).



**Abbildung 4.1:** A: 3'-Hydroxymyosmin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, B: 3'-Hydroxymyosmin + HRP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C, D und E: Standards Nikotinsäure, 3-Pyridylessigsäure, 3'-Hydroxymyosmin und 3-Pyridylmethanol (HPLC-System 1)

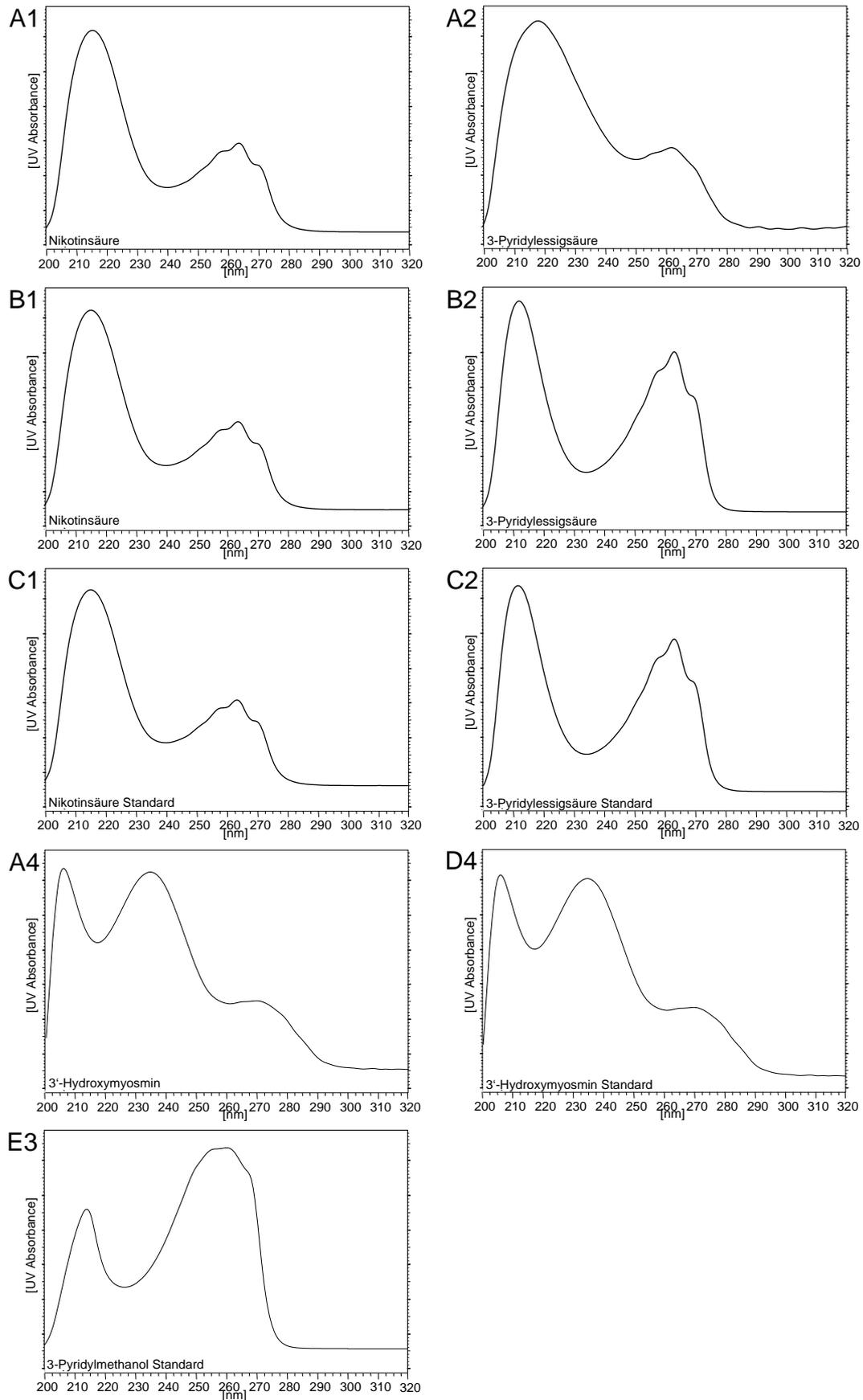


Abbildung 4.2: UV-Spektren zu Abbildung 4.1

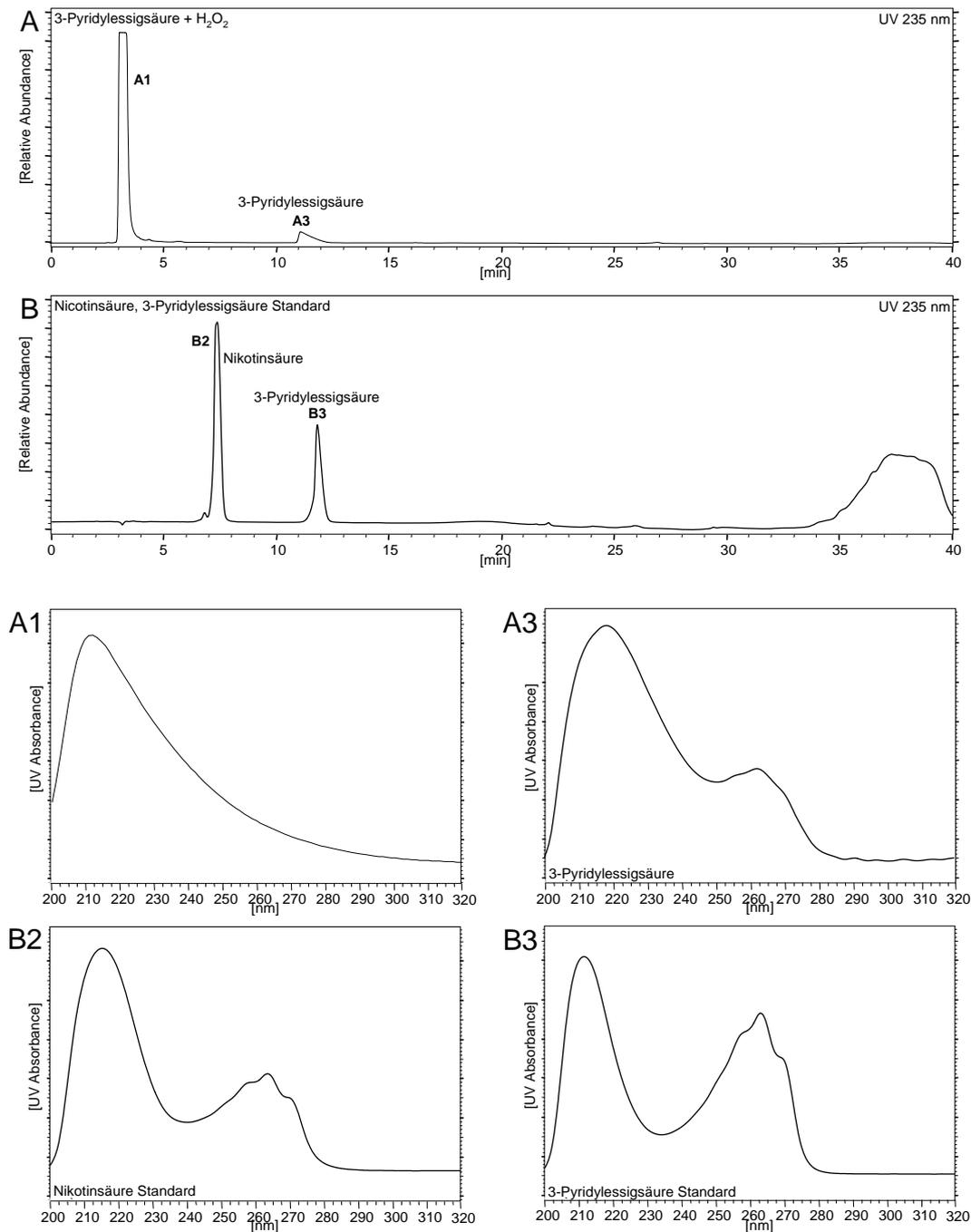


Abbildung 4.3: A: 3-Pyridylelessigsäure + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und B: Standards Nikotinsäure und 3-Pyridylelessigsäure sowie die dazugehörigen UV-Spektren (HPLC-System 1)

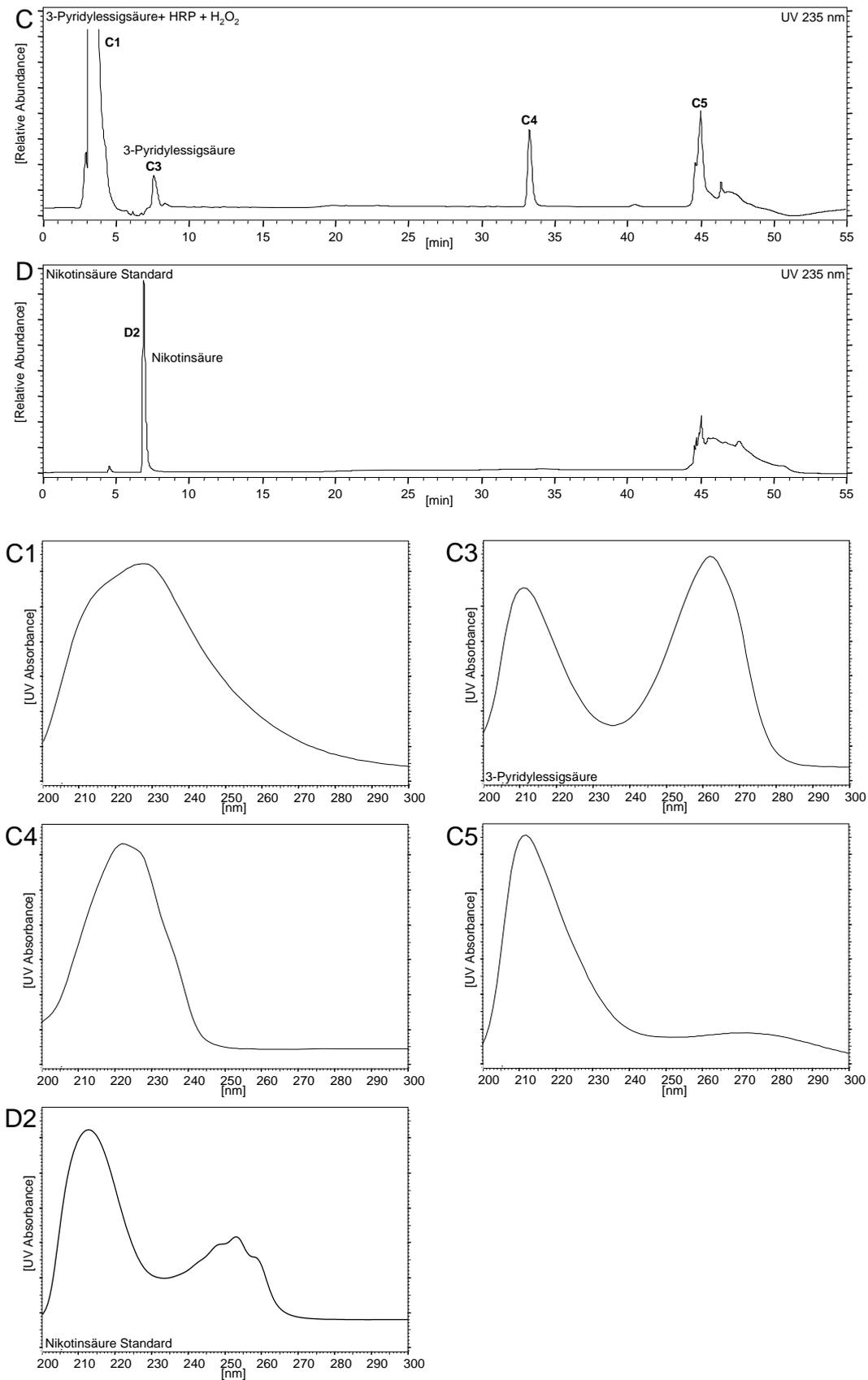


Abbildung 4.4: C: 3-Pyridylacetic acid + HRP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und D: Standard Nicotinic acid sowie die dazugehörigen UV-Spektren (HPLC-System 2)

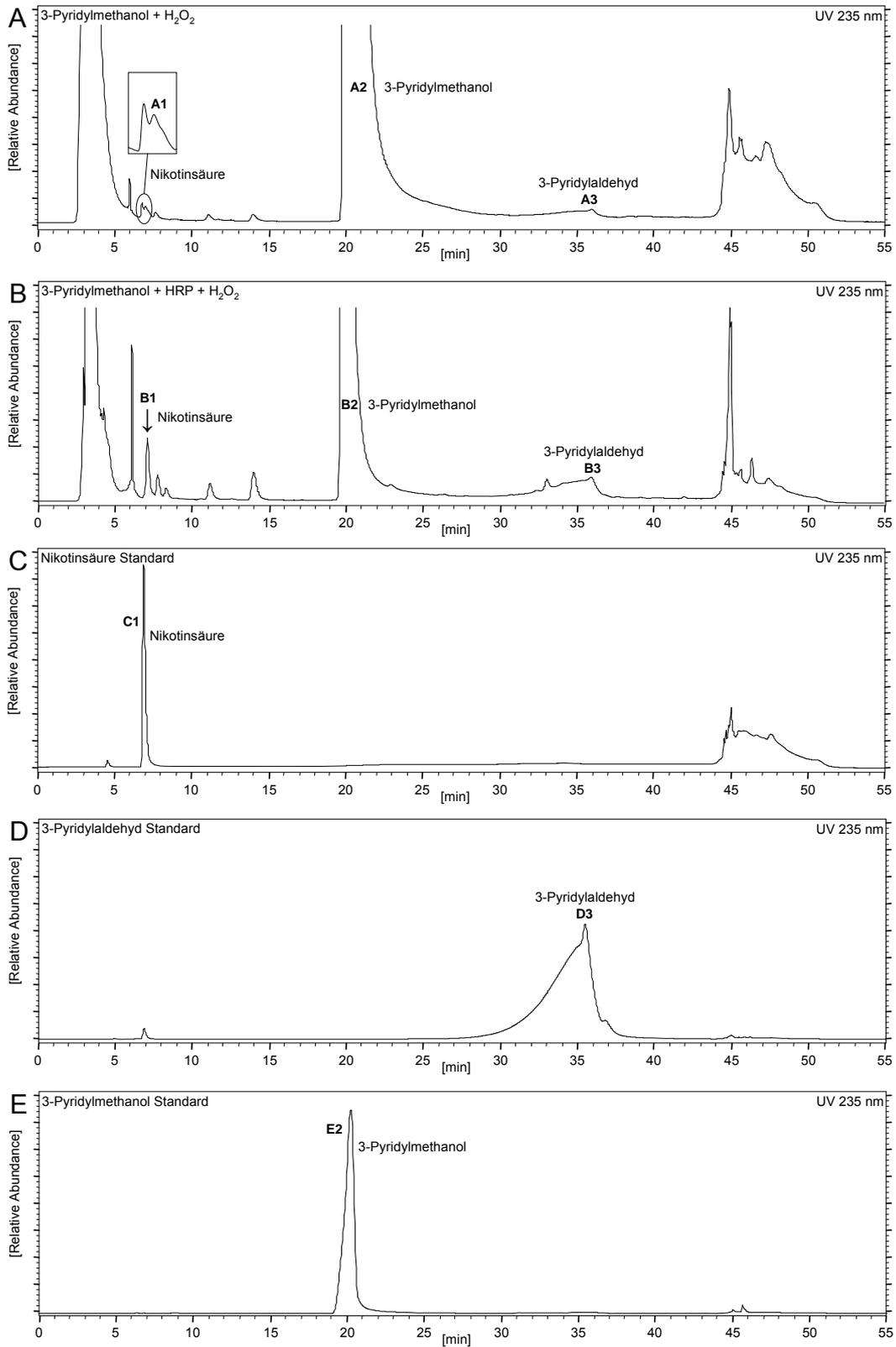


Abbildung 4.5: **A:** 3-Pyridylmethanol +  $H_2O_2$ , **B:** 3-Pyridylmethanol + HRP +  $H_2O_2$ , **C, D** und **E:** Standards Nikotinsäure, 3-Pyridylaldehyd und 3-Pyridylmethanol (HPLC-System 2)

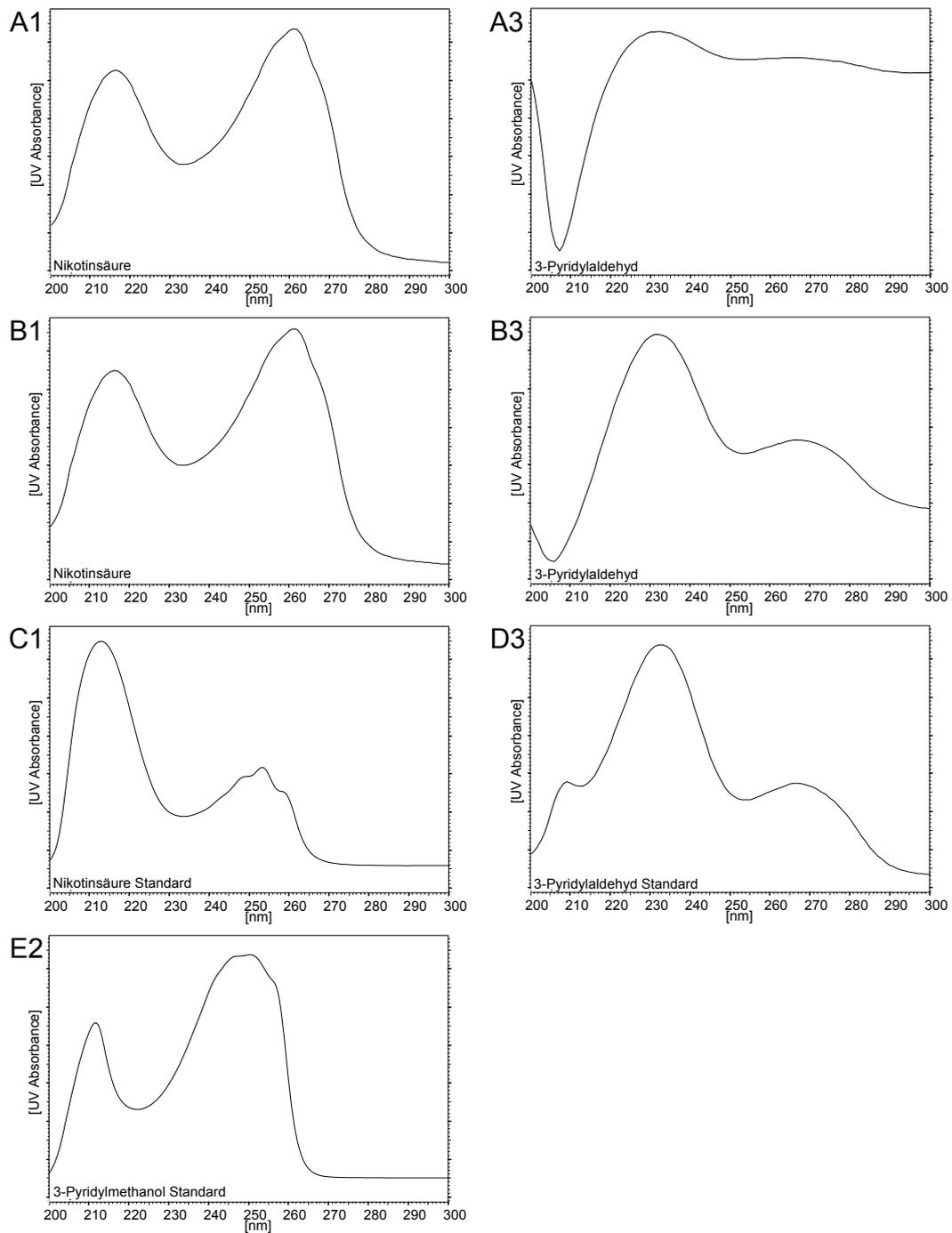


Abbildung 4.6: UV-Spektren zu Abbildung 4.5

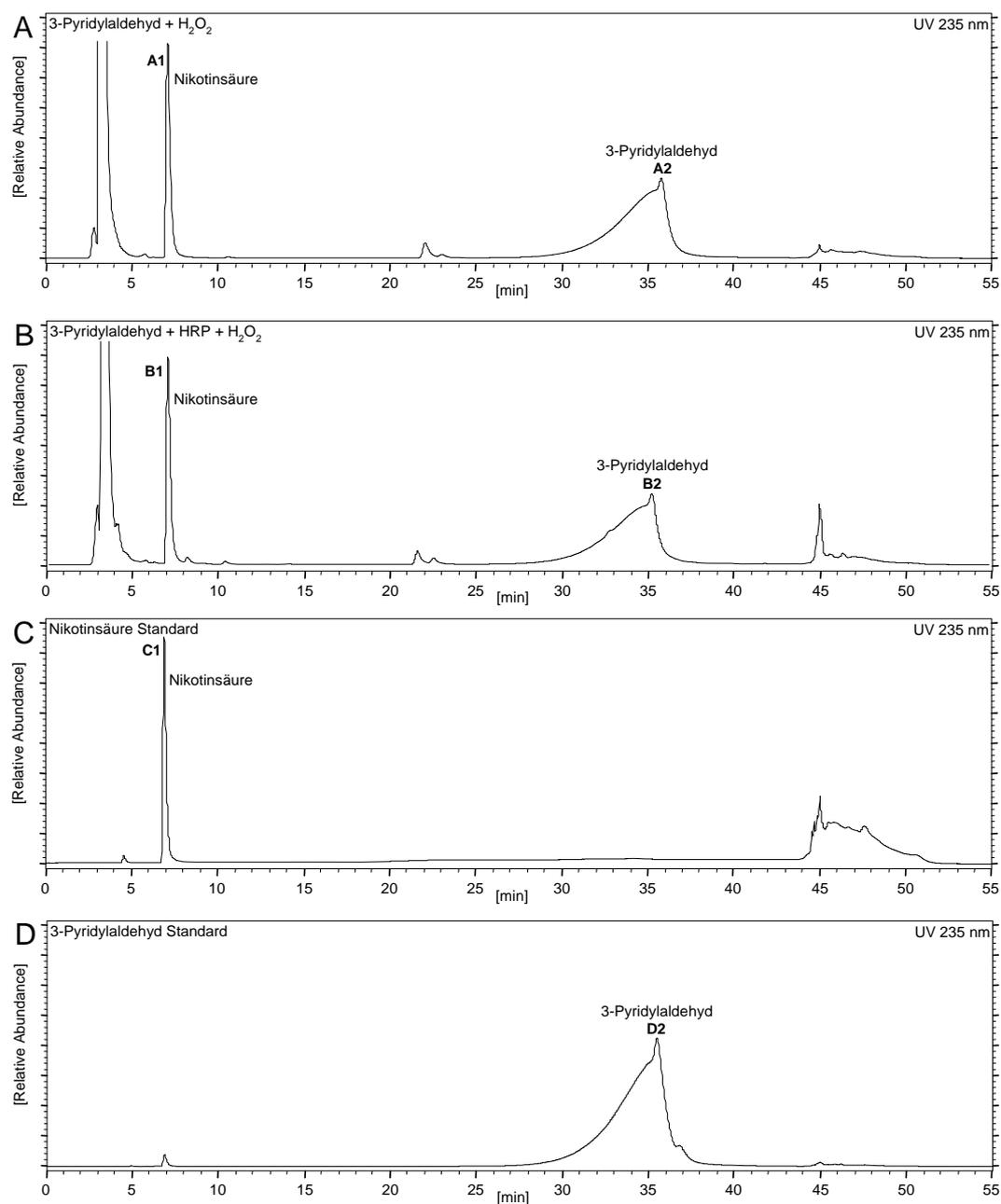


Abbildung 4.7: A: 3-Pyridylaldehyd + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, B: 3-Pyridylaldehyd + HRP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C und D: Standards Nikotinsäure und 3-Pyridylaldehyd (HPLC-System 2)

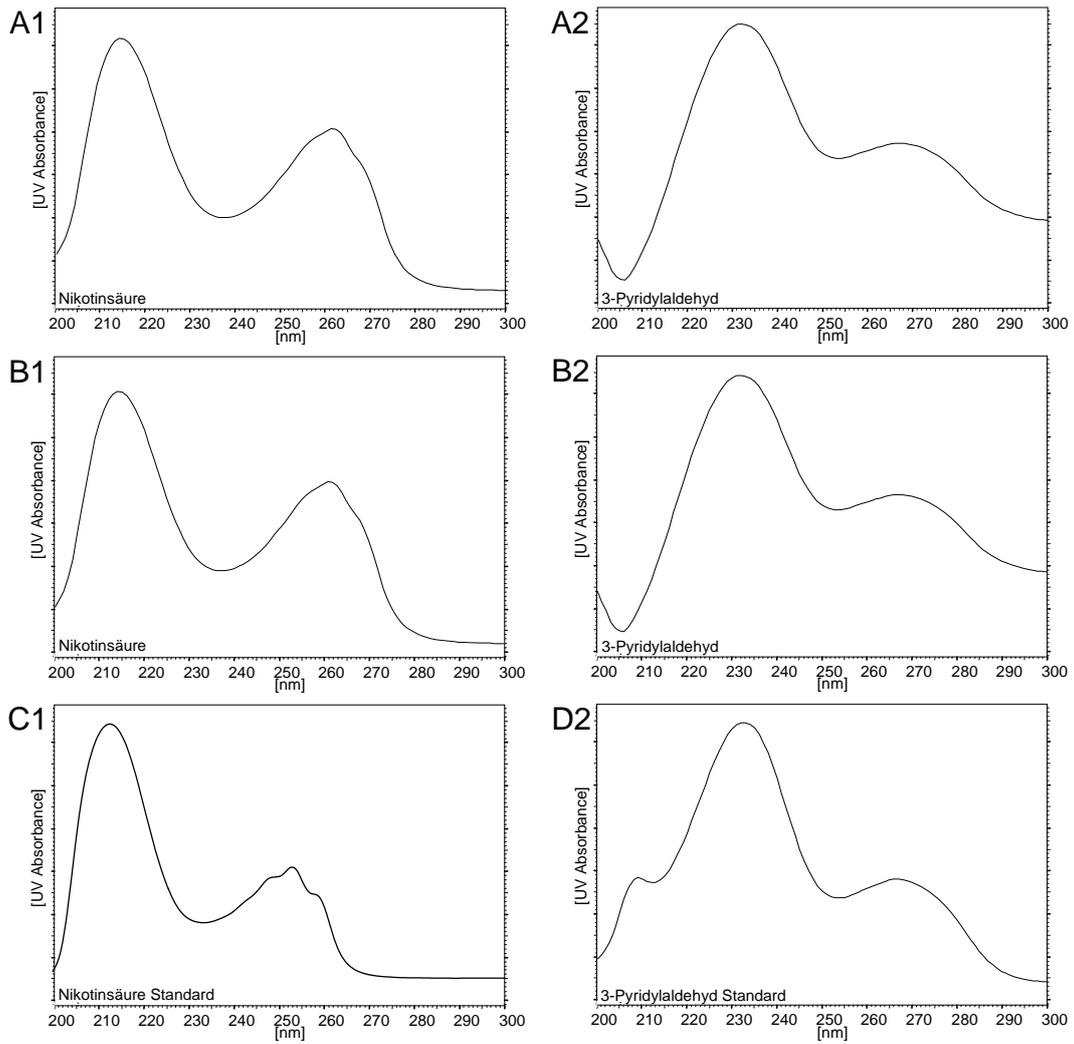
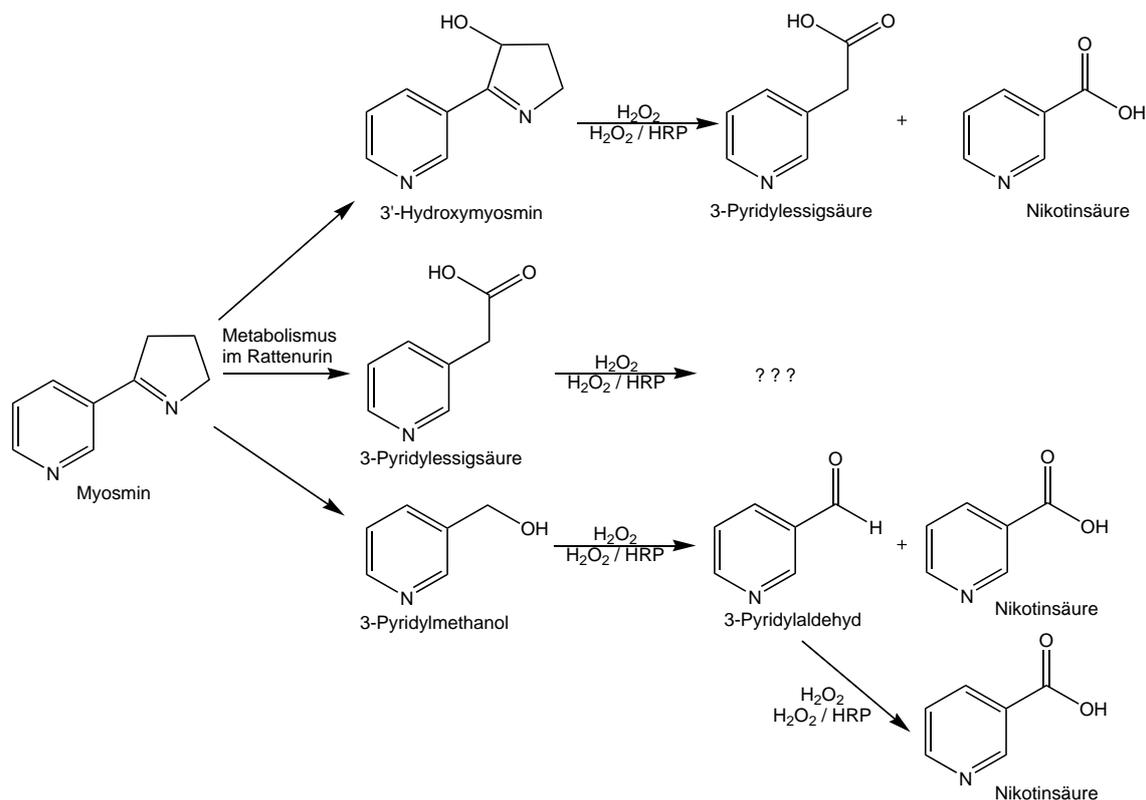


Abbildung 4.8: UV-Spektren zu Abbildung 4.7



**Abbildung 4.9:** Oxidationsschema der Myosmin-Metaboliten 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylessigsäure und 3-Pyridylmethanol

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Oxidationsschema (Abbildung 4.9) zusammengefasst. Die im Rattenurin gefundenen Myosmin-Metaboliten 3'-Hydroxymyosmin und 3-Pyridylmethanol bilden beide nach Inkubation mit  $H_2O_2$  bzw. HRP Nikotinsäure. 3-Pyridylessigsäure, welches auch bei der Peroxidation von 3'-Hydroxymyosmin mit  $H_2O_2$  bzw. HRP entstand, zerfällt in noch nicht identifizierte Produkte. 3-Pyridylmethanol peroxidiert zu Nikotinsäure und 3-Pyridylaldehyd, wobei letzteres auch nach Peroxidation mit  $H_2O_2$  bzw. HRP Nikotinsäure bildet.

## 4.2 Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte

Nach Zwickenpflug und Tyroller [44] entstehen unter Peroxidierung von Myosmin zwei reaktive Zwischenstufen, die mit der DNA interagieren und so ein kanzerogenes Potenzial entwickeln könnten. Auf die kanzerogene Relevanz der reaktiven Spezies POB wurde bereits im Abschnitt DNA-Addukte (Kapitel 1.3, Seite 15) eingegangen. Die ebenfalls gebildete elektrophile 3-Pyridylmethyl-Zwischenstufe vermag vermutlich in ähnlicher Weise wie POB mit der DNA zu interagieren. So wurden im Folgenden zwei mögliche 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte synthetisiert, welche als Standard für aus Gewebeproben extrahierte DNA dienen könnten.

### 4.2.1 Synthese von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion

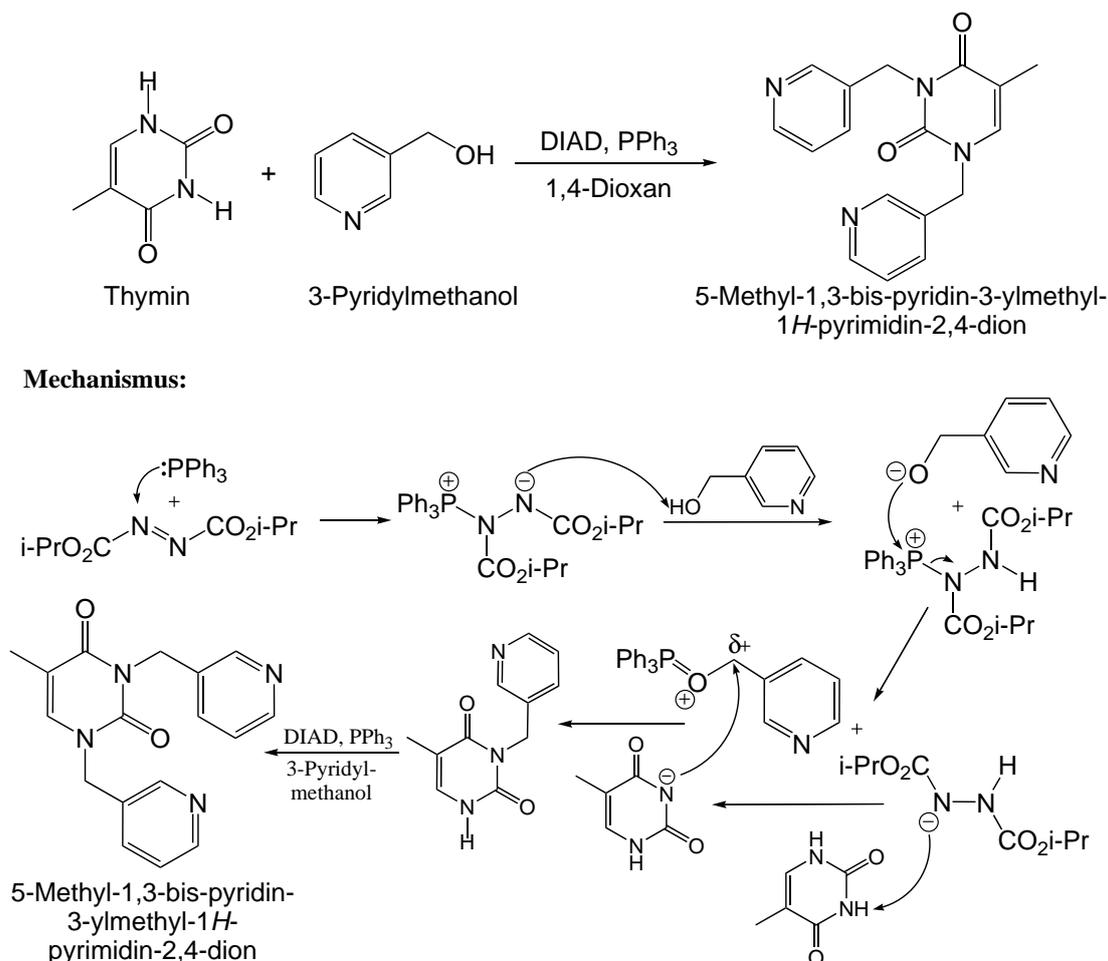
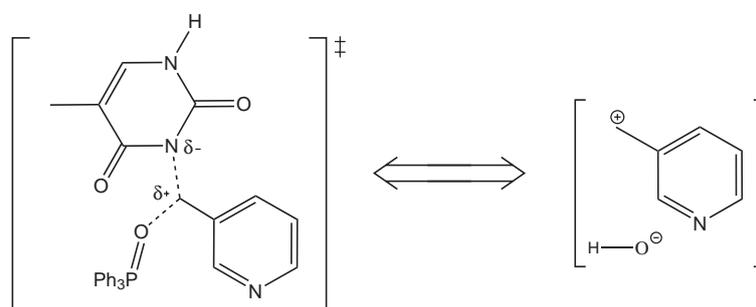


Abbildung 4.10: Mitsunobu-Reaktion von 3-Pyridylmethanol mit Thymin

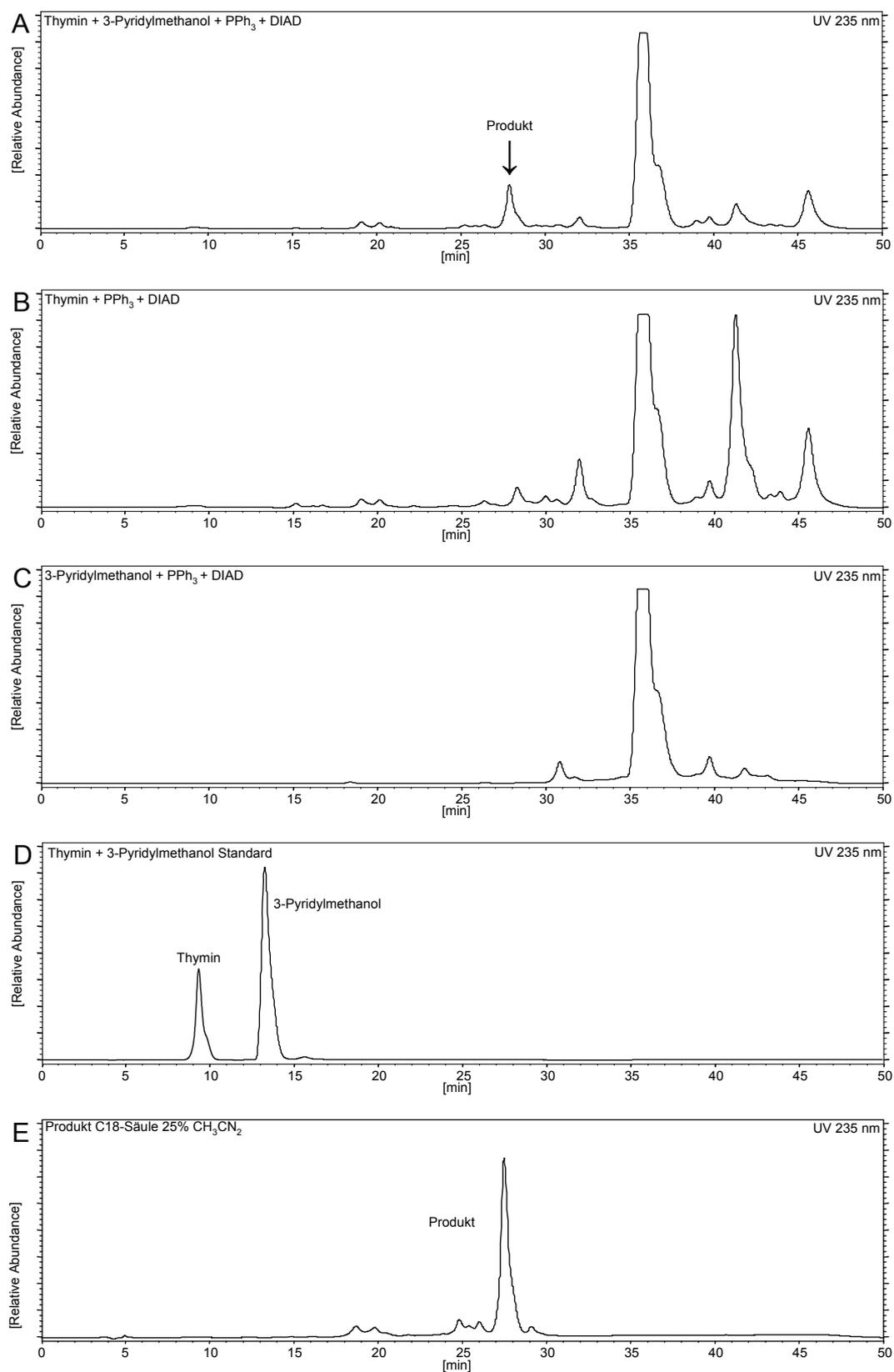
Die Mitsunobu-Reaktion nach Richichi et al. [62] aktiviert 3-Pyridylmethanol auf chemischem Weg und bindet zweimal an die Pyrimidin-Base Thymin. Als Produkt lässt sich 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion isolieren (Abbildung 4.10).

In Abbildung 4.10 ist außerdem der detaillierte Mechanismus der Reaktion abgebildet. Durch die Reaktion der OH-Gruppe des 3-Pyridylmethanols mit  $\text{PPh}_3$  und DIAD wird eine gute Abgangsgruppe gebildet und so ein Rückseitenangriff durch das deprotonierte, nucleophile Thymin möglich. Der dabei gebildete Übergangszustand entspricht in seiner Ladungsverteilung der elektrophilen Zwischenstufe 3-Pyridylmethyl, die bei der Myosminperoxidation postuliert wurde (Kapitel 1.2.2, Seite 11 ff; Abbildung 4.11).

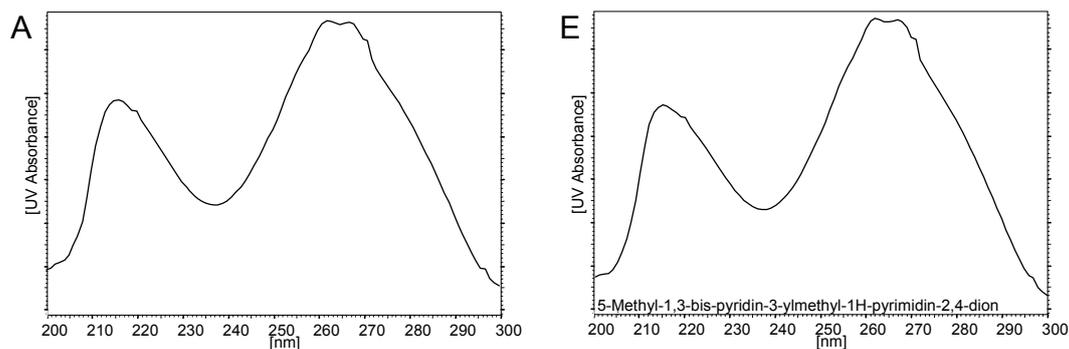


**Abbildung 4.11:** Vergleich der Übergangszustände der Mitsunobu-Reaktion mit der elektrophilen Zwischenstufe der Myosminperoxidation

Abbildung 4.12 zeigt den co-chromatografischen Vergleich der Reaktion von Thymin und 3-Pyridylmethanol (A) mit den entsprechenden Vergleichsreaktionen von Thymin (B) bzw. 3-Pyridylmethanol (C). Der Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass ein neues Produkt entstanden ist. Das durch C-18-SPE angereicherte Produkt ist in Chromatogramm E dargestellt.

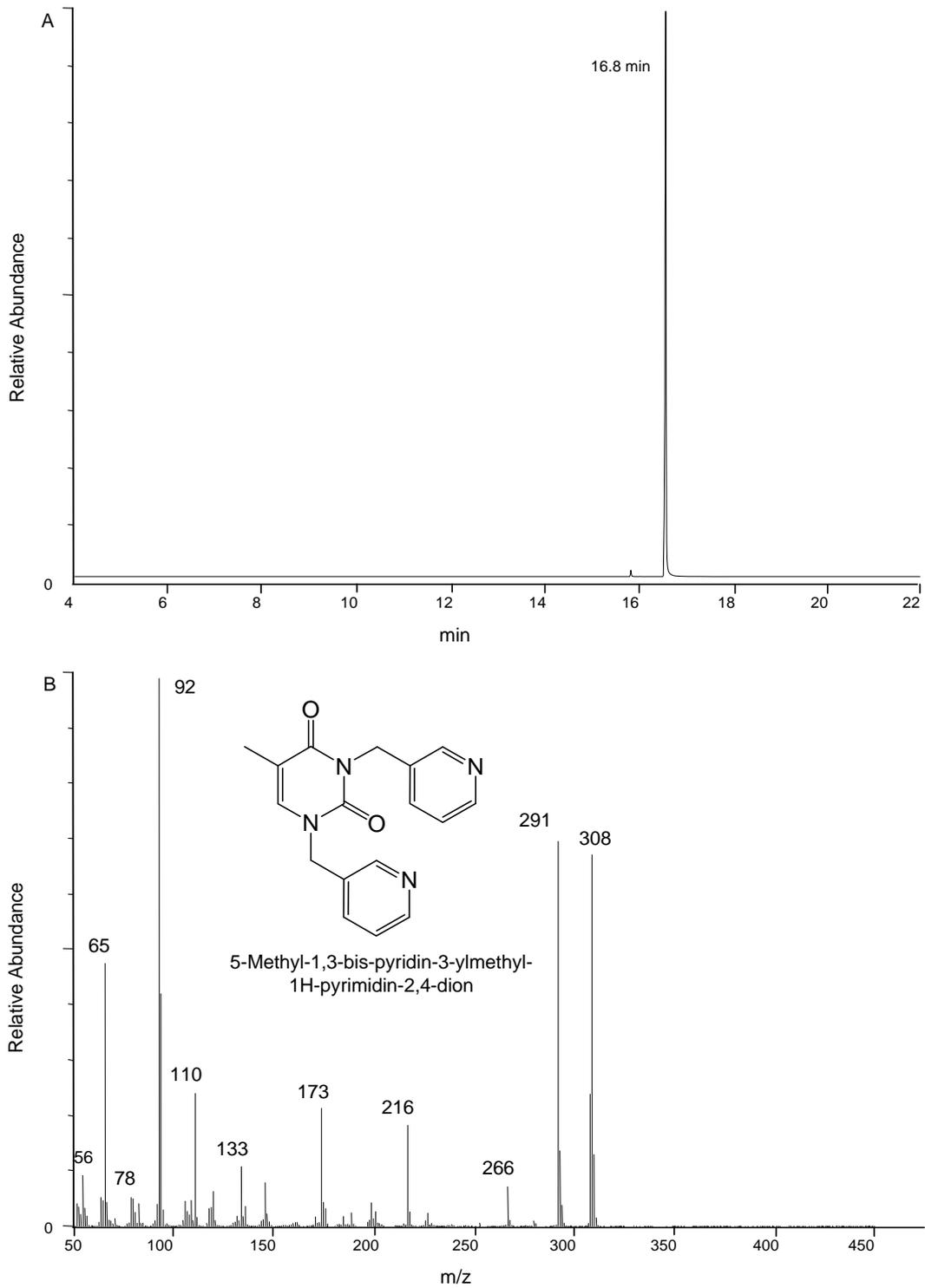


**Abbildung 4.12:** Gegenüberstellung der Chromatogramme von **A:** Thymin + 3-Pyridylmethanol + PPh<sub>3</sub> + DIAD mit den Vergleichsreaktionen **B:** Thymin+PPh<sub>3</sub> + DIAD und **C:** 3-Pyridylmethanol + PPh<sub>3</sub> + DIAD, **D:** dem Thymin + 3-Pyridylmethanol Standard und **E:** dem aufgereinigten Produkt (HPLC-System 3)



**Abbildung 4.13:** UV-Spektren-Vergleich der Produkt-Signale in A und dem aufgereinigten Produkt in E (Abbildung 4.12)

Bei der Charakterisierung des Produkts mittels NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC, HMBC) (Tabelle 4.1, Seite 72) konnte dieses eindeutig als 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion identifiziert werden. Die Gesamtausbeute betrug 55 %. Das Produkt wurde außerdem mit GC/MS analysiert (Abbildung 4.14) und das dazugehörige Fragmentierungsschema formuliert (Abbildung 4.15). Man erhält einen Molekülionen-Peak bei  $m/z$  308 und einen Basis-Peak bei  $m/z$  92.



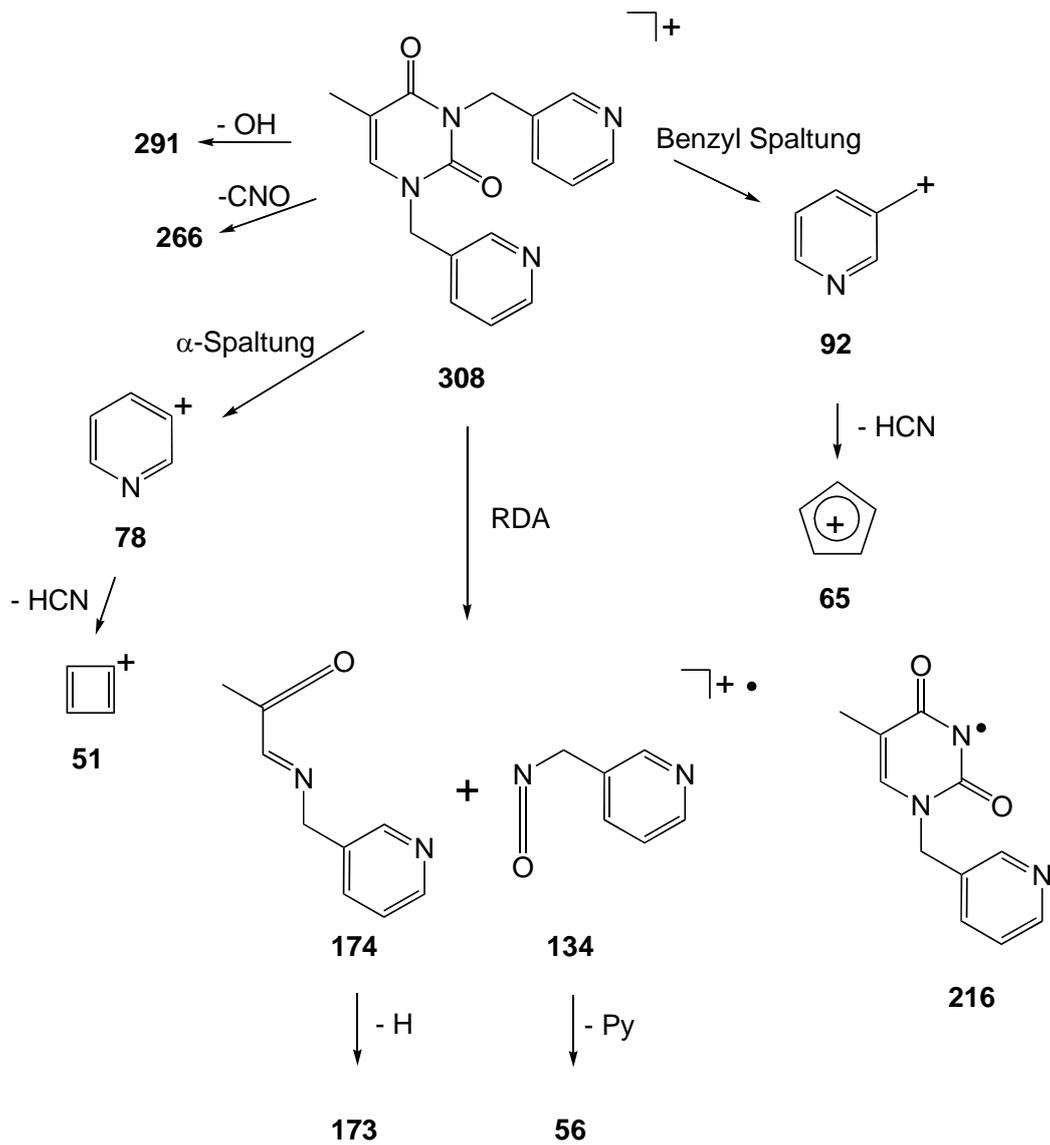


Abbildung 4.15: Fragmentierung von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion

### 4.2.2 Synthese von 3-(3''-Picolyl)thymidin

Zur Synthese von 3-(3''-Picolyl)thymidin wurde in drei Reaktionschritten das reaktive 3-Pyridylmethyl an das Nukleosid Thymidin gebunden.

#### 3',5'-Diacetyl-thymidin [63]

Im ersten Reaktionsschritt werden die beiden Hydroxylgruppen der 2'-Desoxyribose des Thymidins geschützt. Dazu acetyliert man die OH-Gruppen mit Essigsäureanhydrid in Anwesenheit des Katalysators DMAP und erhält so 3',5'-Diacetyl-thymidin (Abbildung 4.16).

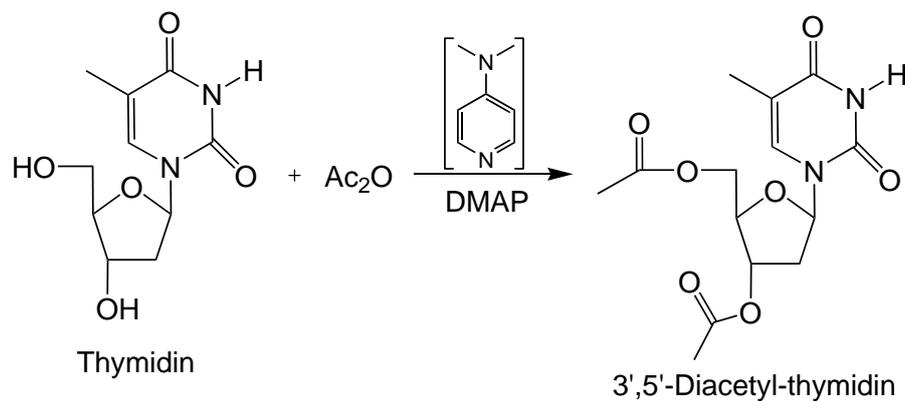
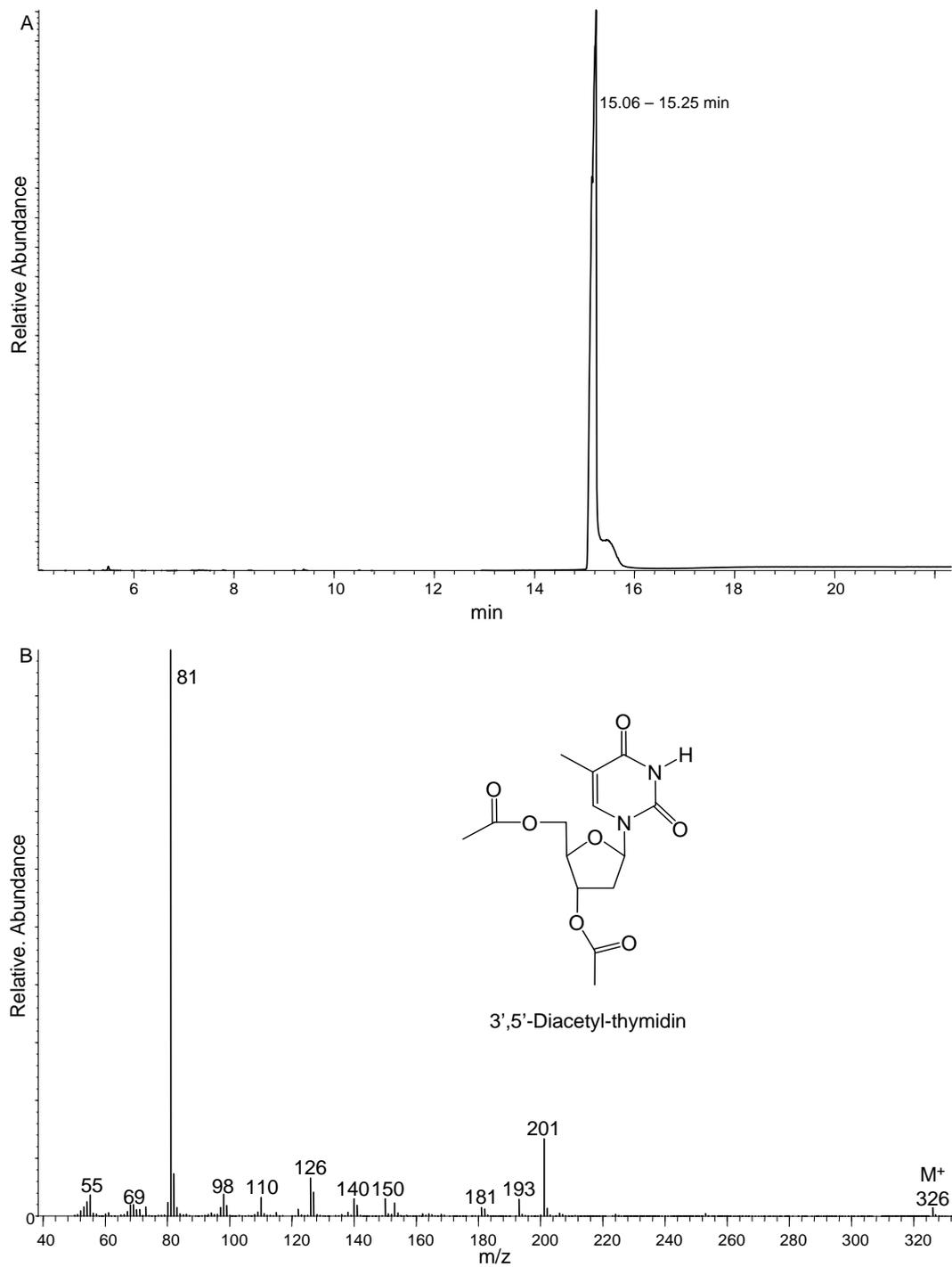


Abbildung 4.16: Acetylierung von Thymidin

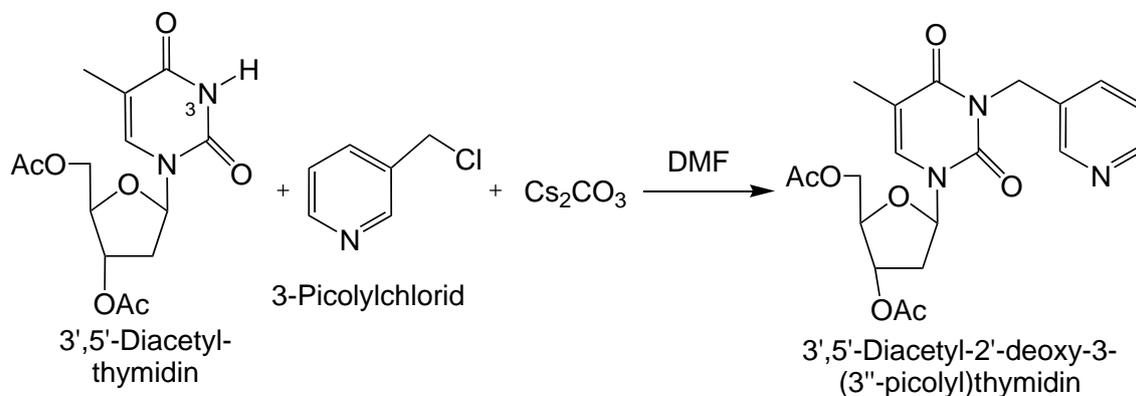
Das Produktgemisch wurde mittels HPLC-System 4 (Abbildung 4.21, Seite 69) und GC/MS (Abbildung 4.17) analysiert. Das 3',5'-Diacetyl-thymidin konnte an Hand seines in der Literatur [72] angegebenen Referenz-Massenspektrum ( $m/z$  326,  $M^+$ ;  $m/z$  81, Basis-Peak) identifiziert werden.



**Abbildung 4.17:** GC-Chromatogramm (A) im Scan-Mode m/z 50 bis 450 und 70 eV; MS-Spektrum: Durchschnitt 15.06 bis 15.25 min von 3',5'-Diacetyl-thymidin (B)

### 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin [63]

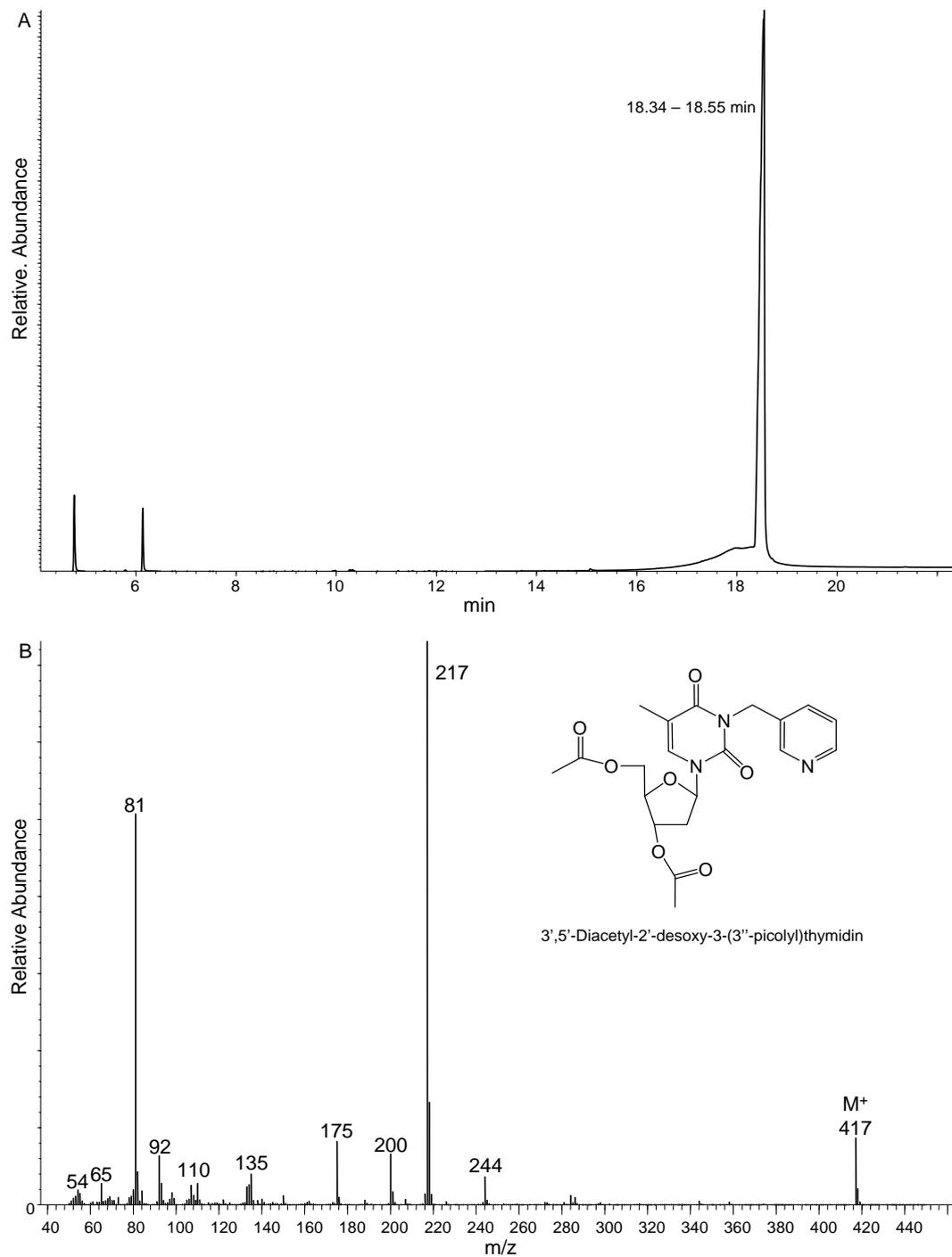
Im zweiten Reaktionsschritt wird 3',5'-Diacetyl-thymidin an der N-3-Position durch  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  deprotoniert, wodurch ein nukleophiler Angriff an 3-Picolylchlorid möglich wird (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18:** Reaktion von 3',5'-Diacetyl-thymidin mit 3-Picolylchlorid

Das Rohprodukt wurde im HPLC-System 4 (Abbildung 4.21, Seite 69) sowie durch GC/MS (Abbildung 4.19) untersucht:

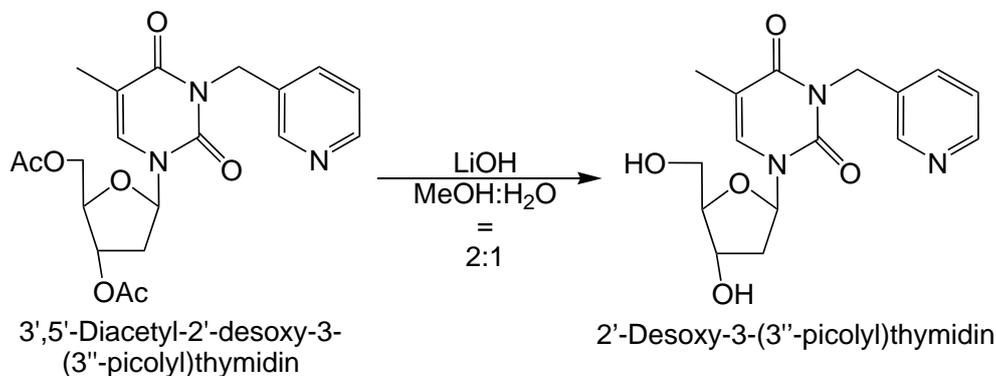
Das Signal C4 im HPLC-Chromatogramm C repräsentiert offenbar eine Verbindung mit lipophileren Eigenschaften als das Signal des Edukts 3',5'-Diacetyl-thymidin (B3) in Chromatogramm B. Eine Substitution des Wasserstoffatoms am N-3-Stickstoff des 3',5'-Diacetyl-thymidin könnte diese Veränderung der Lipophilie erklären. Außerdem besitzt das Signal C4 ein sehr ähnliches UV-Spektrum im Vergleich zu 3',5'-Diacetyl-thymidin (B3). Bei der GC/MS-Analyse zeigt das Chromatogramm ein Signal bei 18.34 bis 18.55 min. Im EI-Massenspektrum dieses Hauptsignals konnte der Molekülionen-Peak  $m/z$  417 des 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin gefunden werden. Beide Messergebnisse weisen also darauf hin, dass 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin entstanden ist. Die Richtigkeit dieser Feststellung ließ sich durch die NMR-Analyse des Endproduktes nach dem folgenden Syntheseschritt beweisen.



**Abbildung 4.19:** GC-Chromatogramm (A) im Scan-Mode  $m/z$  50 bis 450 und 70 eV; MS-Spektrum: Durchschnitt 18.34 bis 18.55 min von 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin (B)

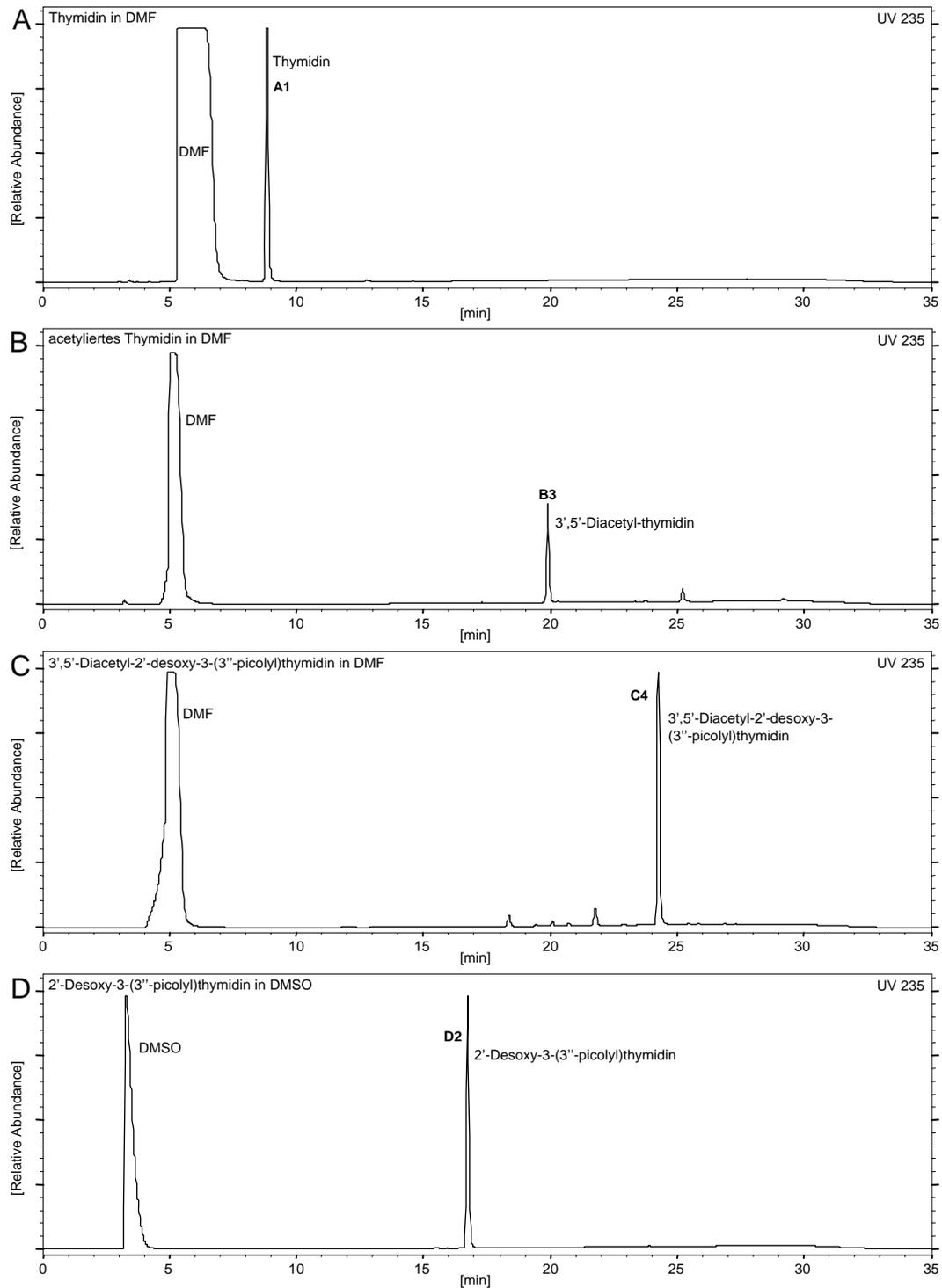
**3-(3''-Picoly)thymidin [64]**

Im letzten Syntheseschritt müssen die Acetyl-Schutzgruppen abgespalten werden, um das Pyridylmethyl-Thymidin-Addukt zu erhalten. Mit *LiOH* wird eine basische Esterhydrolyse durchgeführt, wodurch 2'-Desoxy-3-(3''-picoly)thymidin entsteht (Abbildung 4.20).



**Abbildung 4.20:** Deacetylierung von 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picoly)thymidin

Das gefriergetrocknete Produkt wird durch das HPLC-System 4 (Abbildung 4.21, Seite 69) analysiert und mittels NMR-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC, HMBC) (Tabelle 4.1, Seite 72) charakterisiert. Eine GC/MS-Analyse war auf Grund der hydrophilen Eigenschaft des Moleküls nicht möglich. Die Gesamtausbeute betrug 52 %.



**Abbildung 4.21:** **A:** Thymidin Standard in DMF, **B:** 3',5'-Diacetyl-thymidin in DMF, **C:** 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin und **D:** 3-(3''-picolyl)thymidin (HPLC-System 4)

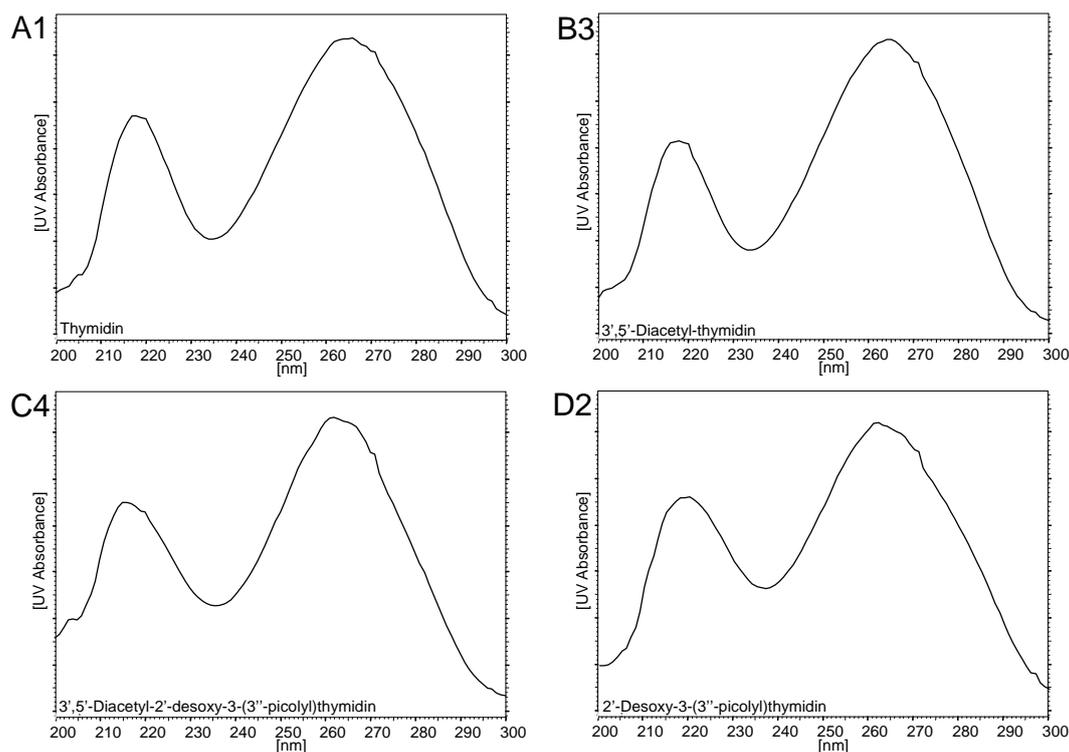


Abbildung 4.22: UV-Spektren zur Abbildung 4.21

### 4.2.3 Zusammenfassung der Messergebnisse und Vergleich der NMR-Daten

5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion konnte durch HPLC-DAD (Abbildung 4.12, Seite 60), GC/MS (Abbildung 4.14, Seite 62) und NMR-Spektroskopie (Abbildung 4.1, Seite 72) identifiziert werden. Das EI-MS ergab einen Molekionen-Peak bei  $m/z$  308 mit einem Basis-Peak bei  $m/z$  92. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 218 nm und 264 nm.

Die Zwischenstufe 3',5'-Diacetyl-thymidin konnte mittels HPLC-DAD (Abbildung 4.21, Seite 69) und GC/MS (Abbildung 4.17, Seite 65) durch die Übereinstimmung des gemessenen Massenspektrums mit der Literatur [72] ( $m/z$  326,  $M^+$ ;  $m/z$  81, Basis-Peak) identifiziert werden.

Im darauf folgenden Syntheseschritt erhielt man 3',5'-Diacetyl-3-(3''-picolyl)thymidin, welches durch HPLC-DAD (Abbildung 4.21, Seite 69) und GC/MS (Abbildung 4.19, Seite 67) analysiert wurde und im EI-MS einen Molekionen-Peak bei  $m/z$  417 sowie einen Basis-Peak bei  $m/z$  217 zeigte. Das UV-Spektrum besitzt die gleichen Maxima bei 217 und 263 nm wie Thymidin, 3',5'-Diacetyl-thymidin und 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion.

Nach alkalischer Hydrolyse und Aufreinigung wurde das Produkt mittels HPLC-DAD (Abbildung 4.21, Seite 69) und NMR-Spektroskopie (Tabelle 4.1, Seite 72)

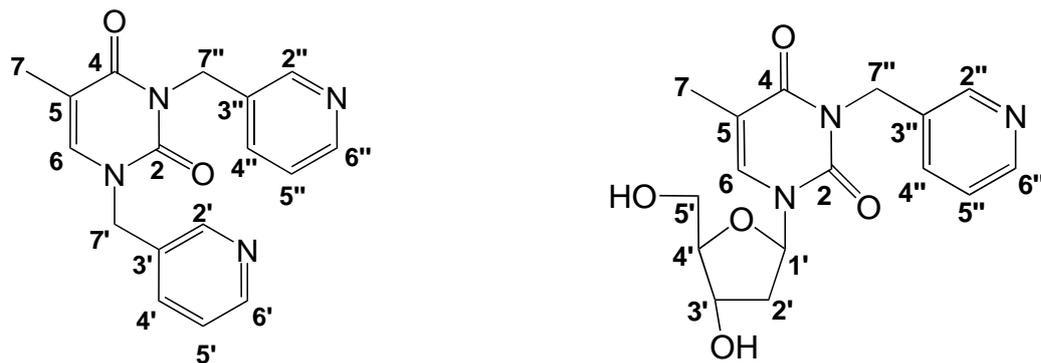
charakterisiert. Wegen seiner hydrophilen Eigenschaften konnte keine GC/MS-Messung durchgeführt werden.

Die Gesamtausbeute für 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion betrug 55 %, die für 3-(3''-Picolyl)thymidin 52 %.

Tabelle 4.1 stellt die NMR-Daten beider Pyridylmethyl-DNA-Addukte gegenüber. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der 3-Picolyl-Substituenten sowie die Thymin-Struktur zeigen nahezu die gleichen Verschiebungen.

Die zwei Signale bei 1.82 und 7.81 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion erhält man von dessen Thymin-Struktur. Die beiden Stickstoff-verbundenen 3-Picolyl-Substituenten liefern unterschiedliche Verschiebungen, so dass weitere zehn Signale im Spektrum zu finden sein müssten. Man erhält aber nur neun Signale, weshalb bei 8.50 ppm eine Überlagerung der Signale von Wasserstoffatom H-6' (d) und Wasserstoffatom H-2'' (s) vermutet wird, da diese eine identische Verschiebung aufweisen.

Die eindeutige Bindung der zwei 3-Picolyl-Substituenten an die beiden Stickstoffatome des Thymin konnte durch das HMBC-NMR aufgeklärt werden: Nur Wasserstoffatom H-7' koppelt mit Kohlenstoffatom C-6 und nur Wasserstoffatom H-7'' koppelt mit Kohlenstoffatom C-4, während beide mit Kohlenstoffatom C-2 koppeln (linke Molekülstruktur in Tabelle 4.1).



	Position	chemische Verschiebung ( $\delta$ )	Position	chemische Verschiebung ( $\delta$ )
$^1\text{H}$ (ppm)	6	7.81 (s, 1H)	6	7.81 (s, 1H)
	7	1.82 (s, 3H)	7	1.83 (s, 3H)
	2'	8.56 (s, 1H)	1'	6.19 (t, 1H, $^3J = 6.5, 7.0$ Hz)
	4'	7.73 (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz)	2'	2.09 - 2.13 (m, 2H)
	5'	7.37 (dd, 1H, $^3J = 9.2, 6.8$ Hz)	3'	4.25 - 4.22 (m, 1H, CH-3')
	6'	8.50 (m, 2H, CH-6'/CH-2'')		5.25 (b, 1H, OH-3')
	7'	4.94 (s, 2H)	4'	3.77 (q, 1H, $^3J = 3.7, 3.3, 3.7$ Hz)
			5'	3.57 (dd, 1H, $^3J = 11.9, 11.6$ Hz, CH-5'a)
				3.56 (dd, 1H, $^3J = 11.8, 11.9$ Hz, CH-5'b)
				5.04 (b, 1H, OH-5')
			2''	8.50 (m, 2H, CH-6'/CH-2'')
			4''	7.65 (d, 1H, $^3J = 7.7$ Hz)
			5''	7.32 (dd, 1H, $^3J = 8.8, 6.6$ Hz)
			6''	8.44 (d, 1H, $^3J = 4.0$ Hz)
		7''	5.01 (s, 2H)	
$^{13}\text{C}$ (ppm)	2	151.67	2	151.02
	4	163.60	4	163.21
	5	109.11	5	109.09
	6	140.80	6	136.13
	7	13.11	7	13.42
	2'	149.73	1'	85.46
	3'	132.89	2'	39.47
	4'	136.03	3'	70.73
	5'	124.27	4'	87.94
	6'	149.54	5'	61.69
	7'	49.91		
			2''	149.79
			3''	133.34
			4''	135.75
		5''	124.08	
		6''	148.99	
		7''	42.04	

**Tabelle 4.1:** NMR Daten (400 MHz in DMSO- $d_6$ ) von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion und 3-(3''-Picolyl)thymidin

## 4.3 Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben

Unter anderem wurden vor allem auf dem Gebiet der TSNA die POB-DNA-Addukte untersucht (Kapitel 1.3, Seite 15). So gelang es Foiles et al. [50], Hecht [67] und Richter et al. [68] die HPB-Vorstufe durch saure Hydrolyse von DNA aus Humangeewebe abzuspalten. Durch Derivatisierung des erhaltenen HPBs mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFBC) und anschließender Analyse mittels hochauflösender GC/MS konnten so indirekt POB-DNA-Addukte nachgewiesen werden.

Bei der Peroxidierung von Myosmin entsteht neben der reaktiven Spezies POB unter anderem eine reaktive 3-Pyridylmethyl-Zwischenstufe. Letztere könnte ebenso mit der DNA interagieren und so ein kanzerogenes Potential entwickeln. Im Gegensatz zu den POB-DNA-Addukten (HPB-freisetzende Addukte) sind bis jetzt die 3-Pyridyl-DNA-Addukte noch nicht untersucht worden.

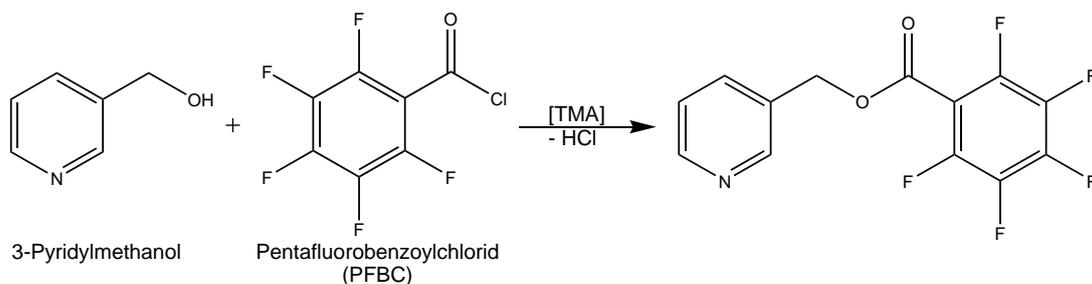
Zum Nachweis von in Humangeweben vermutlich enthaltenen 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten wurde zunächst DNA aus Humanlebergewebe isoliert. Analog zu Foiles et al. [50], Hecht [67] und Richter et al. [68] wurde vermutet, dass man ebenfalls in Folge saurer oder alkalischer Hydrolyse der DNA 3-Pyridylmethanol von den 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten erhält.

Vorab wurde die Möglichkeit der Derivatisierbarkeit von 3-Pyridylmethanol mit PFBC untersucht, um die für einen Nachweis geeignete Empfindlichkeit zu erreichen. Anschließend Spaltungsversuche des im vorherigen Kapitel 4.2.2 (Seite 64 ff) synthetisierten 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukts 3-(3''-Picolyl)thymidin sollten zeigen, ob überhaupt eine Abspaltung des 3-Pyridylmethyls möglich ist.

### 4.3.1 Derivatisierung von 3-Pyridylmethanol mit PFBC

Nach saurer bzw. alkalischer Hydrolyse aus Gewebe gewonnener DNA entsteht aus dem abgespaltenen 3-Pyridylmethyl-Rest vermutlich das 3-Pyridylmethanol (Spaltprodukt von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten). Da 3-Pyridylmethanol hydrophile Eigenschaften besitzt und so als Alkohol-Derivat in sehr geringer Konzentration mit hochauflösender GC/MS nicht optimal erfasst werden kann, wurde es mit PFBC derivatisiert und vorerst mittels GC/MS (EI) untersucht.

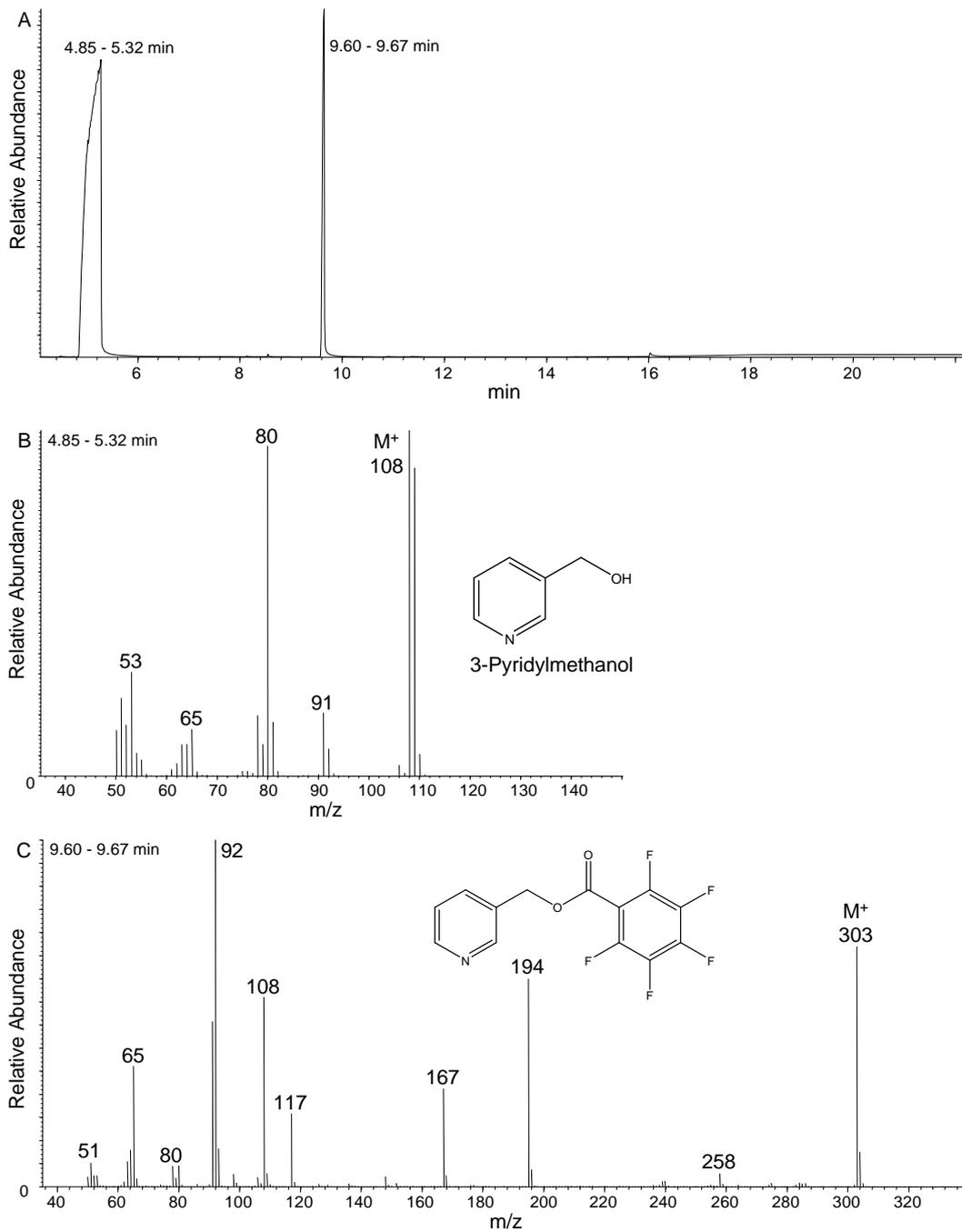
3-Pyridylmethanol wird in Anwesenheit des Katalysators Trimethylamin (TMA) mit PFBC umgesetzt. Der entstandene Ester besitzt aufgrund des fünffach fluorierten Benzyls eine erhöhte Elektronendichte, wodurch eine leichtere negativ-chemische Ionisation bei hochauflösender Massenspektroskopie ermöglicht wird und so eine Steigerung der Empfindlichkeit resultiert. (Abbildung 4.23)



**Abbildung 4.23:** Derivatisierung von 3-Pyridylmethanol mit PFBC

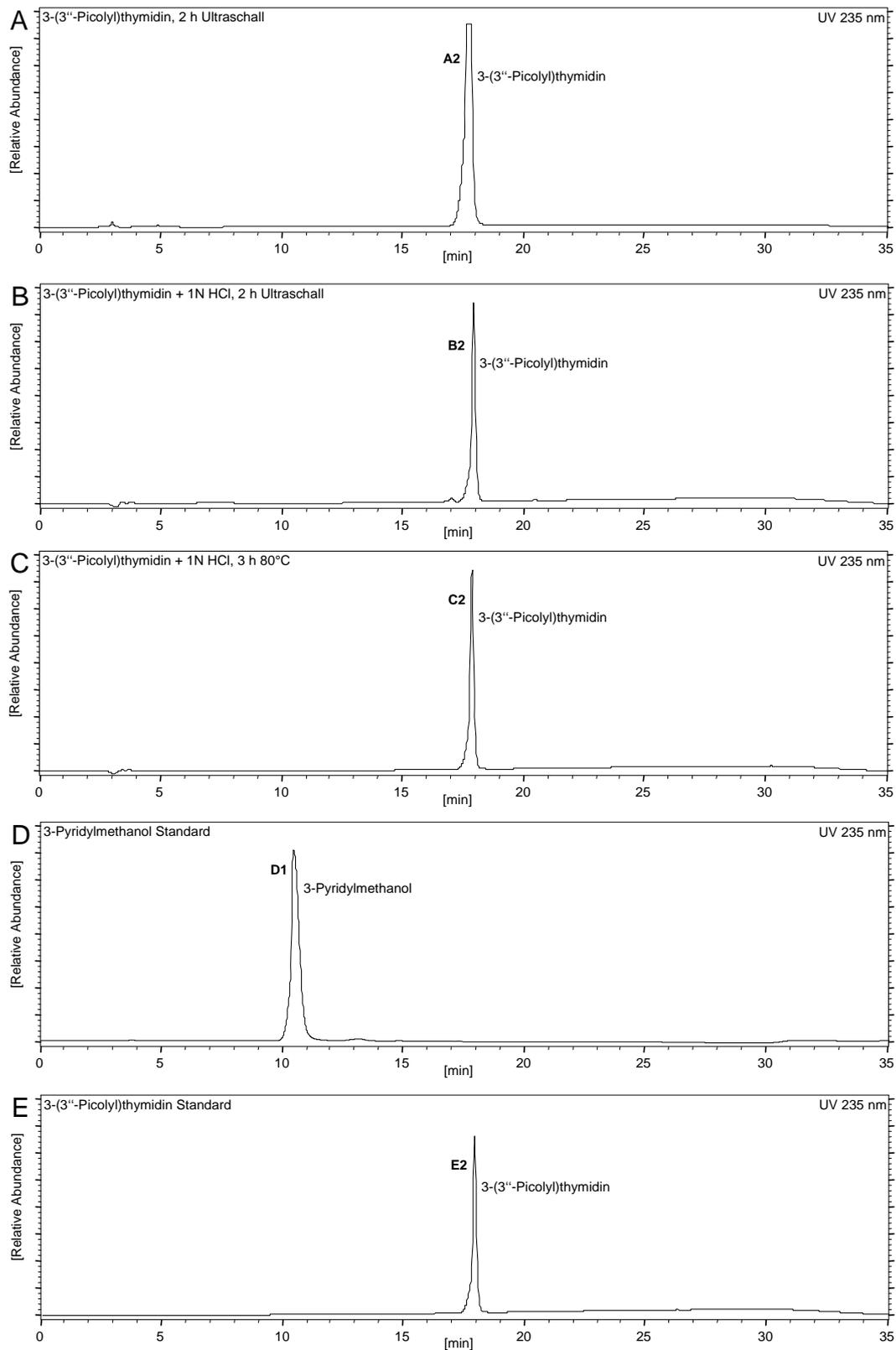
Die erhaltene Reaktionslösung wurde mittels GC/MS (EI) untersucht (Abbildung 4.24). Im GC-Chromatogramm (A) erhält man zwei Signale. Das erste Signal bei 4.85 bis 5.32 min entspricht nicht umgesetztem 3-Pyridylmethanol, welches im EI-Massenspektrum (B) den Molekülionen-Peak und Basis-Peak bei  $m/z$  108 besitzt (vgl. Literaturspektrum [72]). Das derivatisierte 3-Pyridylmethanol lässt sich im Massenspektrum (C) des zweiten Signals bei 9.60 - 9.67 min identifizieren (Molekülionen-Peak bei  $m/z$  303 und Basis-Peak bei  $m/z$  92).

3-Pyridylmethanol konnte also mit PFBC derivatisiert werden. Für den späteren Nachweis nach Hydrolyse der DNA sollte PFBC allerdings im mehrfachen Überschuss eingesetzt werden, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen.

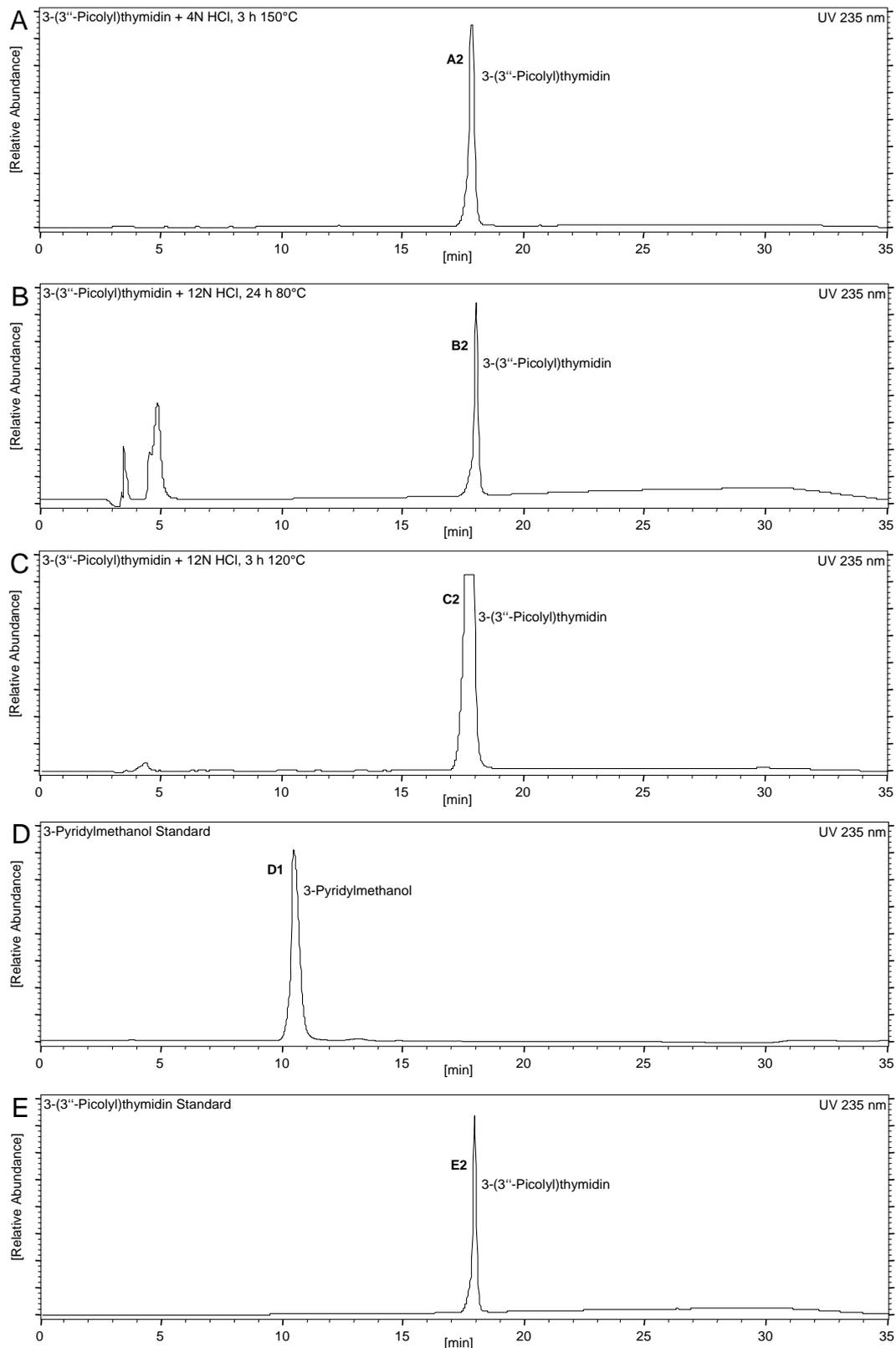


**Abbildung 4.24:** GC-Chromatogramm (A) im Scan-Mode m/z 50 bis 450 und 70 eV; MS-Spektrum: Durchschnitt 4.85 bis 5.32 min von 3-Pyridylmethanol (B) und Durchschnitt 9.60 bis 9.67 min von derivatisiertem 3-Pyridylmethanol (C)





**Abbildung 4.26:** **A:** 3-(3''-Picolyl)thymidin 2 h Ultraschall, **B:** 3-(3''-Picolyl)thymidin + 1 N *HCl* 2 h Ultraschall und **C:** 3-(3''-Picolyl)thymidin + 1 N *HCl* 3 h, 80 °C, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picolyl)thymidin (HPLC-System 5)



**Abbildung 4.27:** A: 3-(3''-Picoly)thymidin 4 N *HCl* 3 h, 150 °C, B: 3-(3''-Picoly)thymidin + 12 N *HCl* 24 h, 80 °C und C: 3-(3''-Picoly)thymidin + 12 N *HCl* 3 h, 120 °C, D und E: Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 5)

**Spaltungsversuche mit Salpetersäure ( $HNO_3$ ), Natronlauge ( $NaOH$ ), Schwefelsäure/Wasserstoffperoxid ( $H_2SO_4/H_2O_2$ ) und Salpetersäure/Salzsäure ( $HNO_3/HCl$ )**

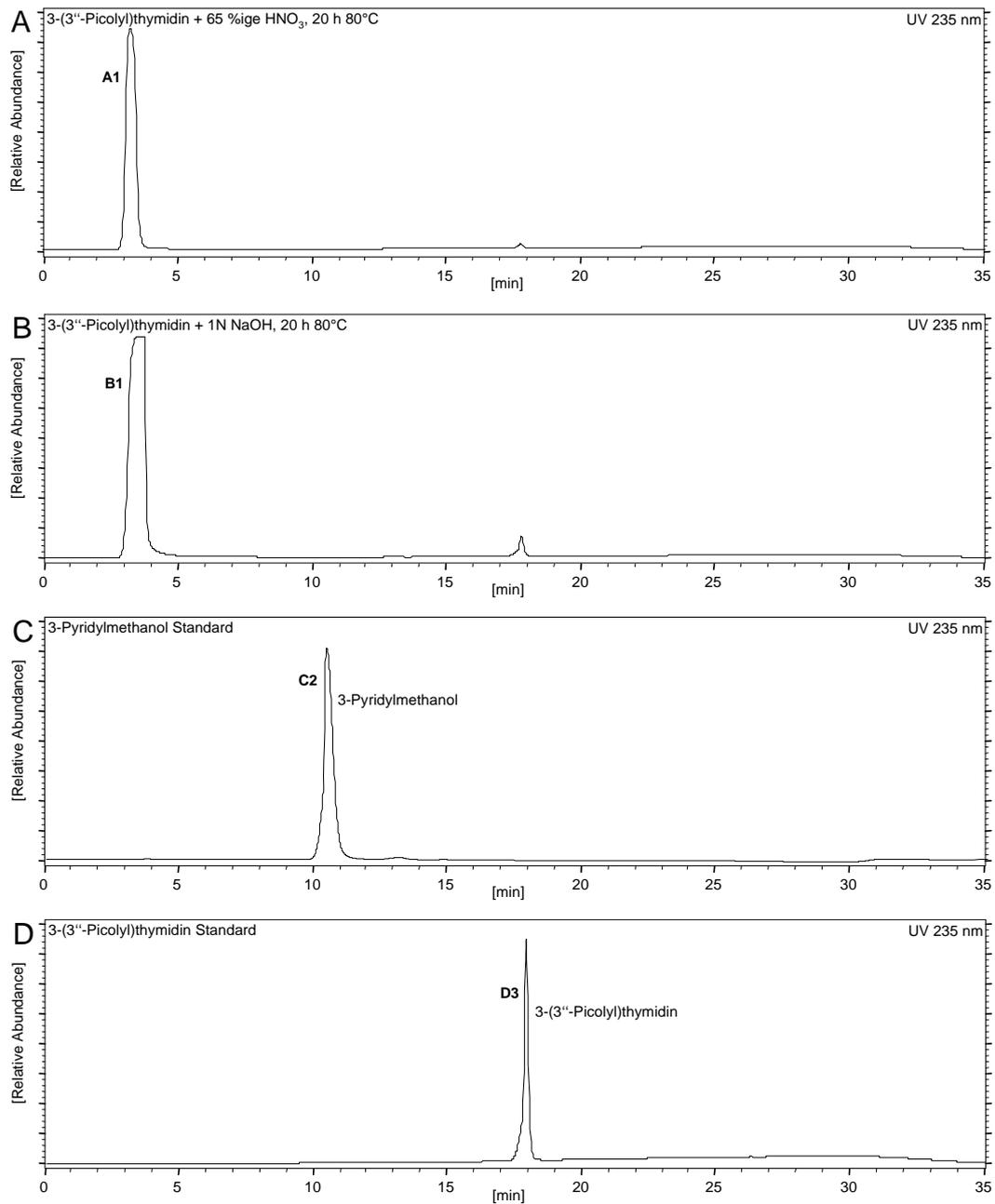
In Abbildung 4.28, Seite 80 sind die Chromatogramme der hydrolytischen Spaltungsversuche mit 65 %iger  $HNO_3$ , 20 h bei 80 °C (A), und 1 N  $NaOH$ , 20 h bei 80 °C (B) den Standards 3-Pyridylmethanol (C) und 3-(3''-Picolyl)thymidin (D) gegenübergestellt. In beiden Reaktionen lässt sich im Chromatogramm nur noch ein breites Signal vor der Retentionszeit 5 min (A1/B1) finden. 3-(3''-Picolyl)thymidin ist also in mehrere unbekannte hydrophile Substanzen zerfallen.

Auch bei der Umsetzung mit  $H_2SO_4/H_2O_2$ , 1 h Ultraschall (A), und  $HNO_3/HCl$ , 1 h Ultraschall (B), wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin gänzlich zersetzt (A1/B1) (Abbildung 4.29, Seite 81).

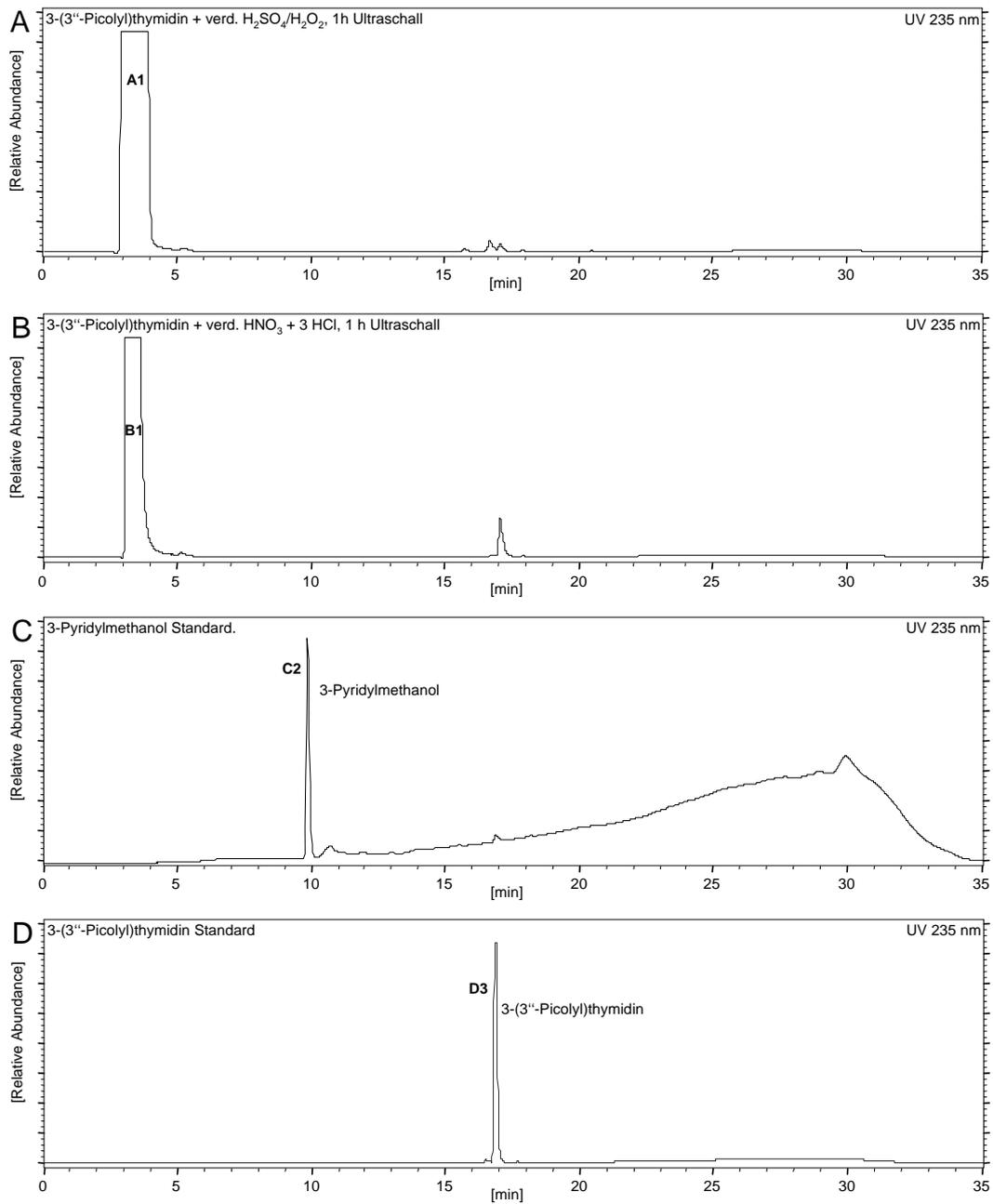
**Spaltungsversuche mit Perchlorsäure ( $HClO_4$ )**

Im Vorversuch wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin zunächst mit 0.1 %iger  $HClO_4$  72 h lang bei Raumtemperatur (RT) (A), danach in gesonderten Ansätzen mit 71 %iger  $HClO_4$  72 h lang bei RT (B) bzw. 3 h lang mit Ultraschall (C) behandelt (Abbildung 4.30 und 4.31, Seite 82 und 83). Chromatogramm A zeigt keinerlei Umsatz des 3-(3''-Picolyl)thymidin (A2). In Chromatogramm B und C kann dagegen jeweils ein Signal (B1/C1), das dem abzuspaltenden 3-Pyridylmethanol (D1) entspricht, zugeordnet werden. Die Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 71 %iger  $HClO_4$  3 h lang im Ultraschallbad (C) liefert zusätzliche Signale, die unbekanntes Zerfallsprodukten entsprechen können. Desweiteren wurde bei den Reaktionen B und C 3-(3''-Picolyl)thymidin (B2/C2) nur in sehr geringem Maße umgesetzt.

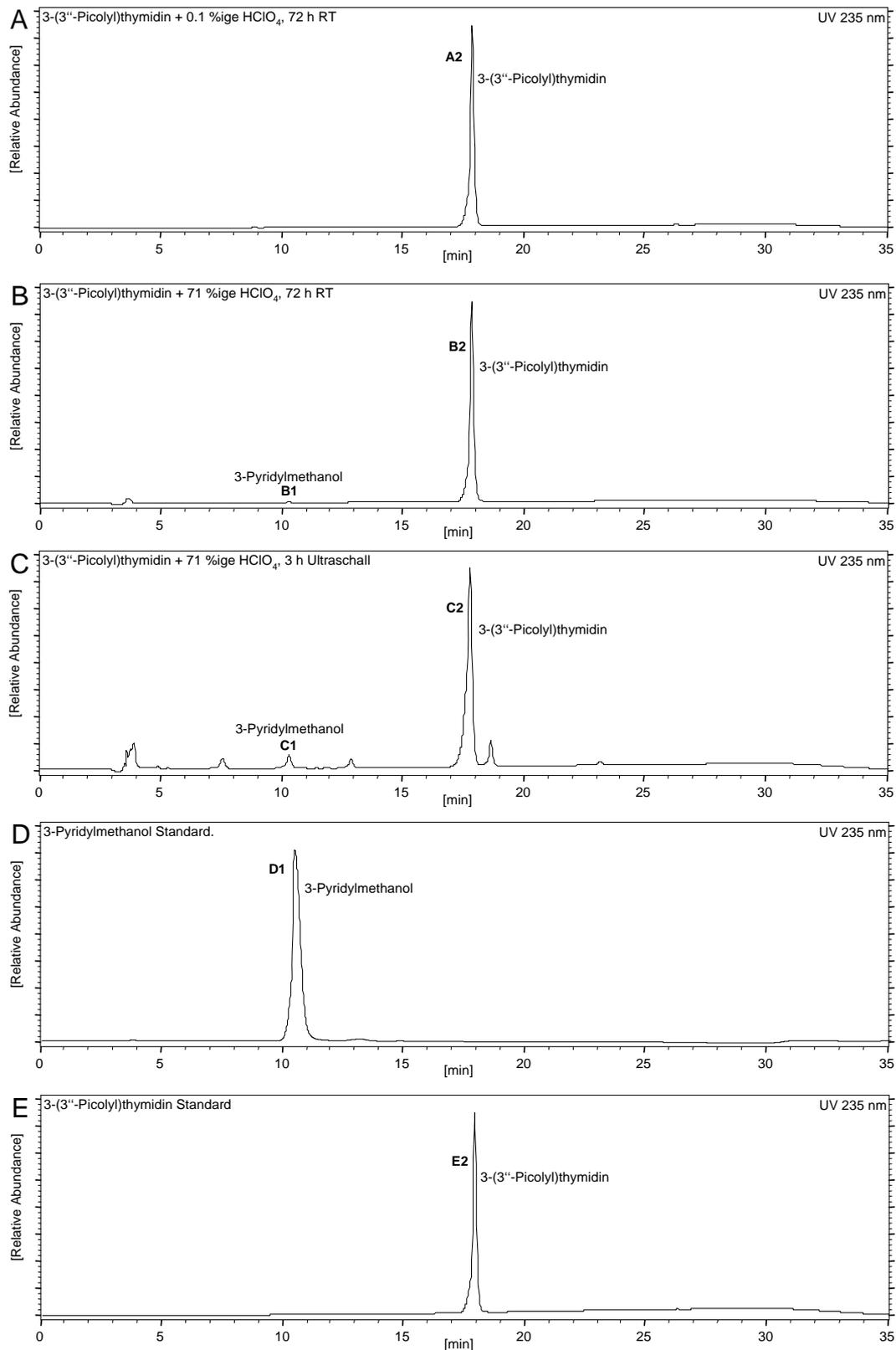
Die hydrolytische Spaltung mit  $HClO_4$  muss also optimiert werden, um eine möglichst vollständige Umsetzung von 3-(3''-Picolyl)thymidin zu erreichen und somit entsprechend viel 3-Pyridylmethanol zu gewinnen.



**Abbildung 4.28:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 65 %iger  $HNO_3$  20 h, 80 °C und **B:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 1 N  $NaOH$  20 h, 80 °C, **C** und **D:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 5)



**Abbildung 4.29:** **A:** 3-(3''-Picolyl)thymidin  $H_2SO_4/H_2O_2$ , 1 h Ultraschall und **B:** 3-(3''-Picolyl)thymidin +  $HNO_3/HCl$ , 1 h Ultraschall, **C** und **D:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picolyl)thymidin (HPLC-System 4)



**Abbildung 4.30:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 0.1 %iger  $HClO_4$  72 h, RT, **B:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 71 %iger  $HClO_4$  72 h, RT und **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 71 %iger  $HClO_4$  3 h, Ultraschall, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 5)

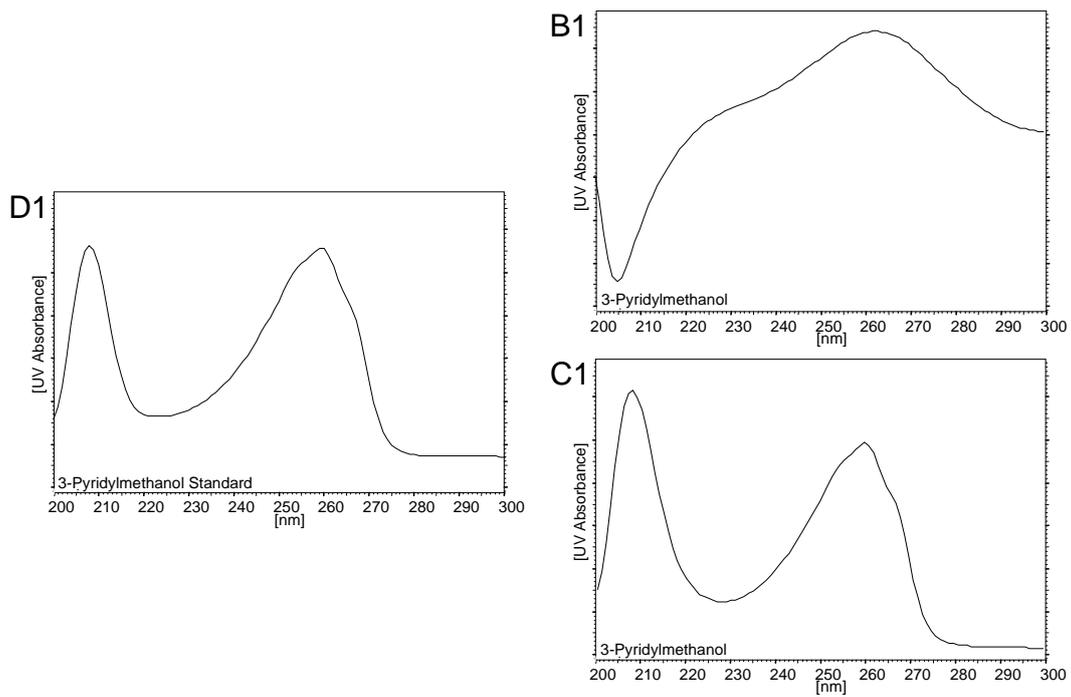


Abbildung 4.31: UV-Spektren zu Abbildung 4.30

### 4.3.2.2 Spaltungsversuche mit Perchlorsäure

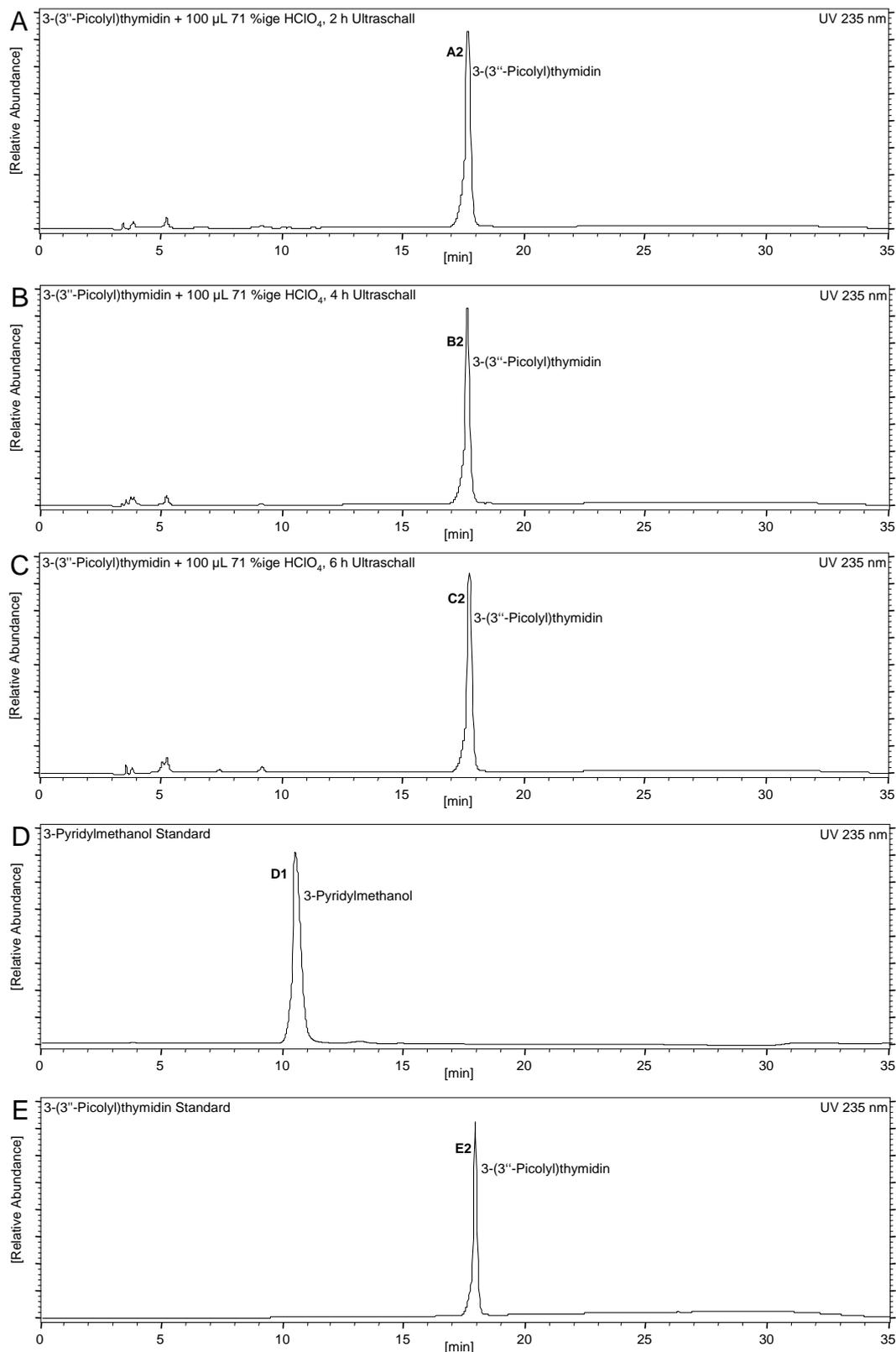
Die Vorversuche mit verschiedenen Säuren und Basen im vorherigen Kapitel 4.3.2.1 haben gezeigt, dass von 3-(3''-Picolyl)thymidin durch Behandlung mit 71 %iger  $HClO_4$  geringe Mengen 3-Pyridylmethanol abgespalten werden können. Folgende Adduktspaltung wurde unternommen, um die Hydrolyse mit  $HClO_4$  zu optimieren.

Zunächst wurde 100  $\mu\text{L}$  einer wässrigen 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung in verschiedenen Zeitabschnitten mit 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $HClO_4$  inkubiert:

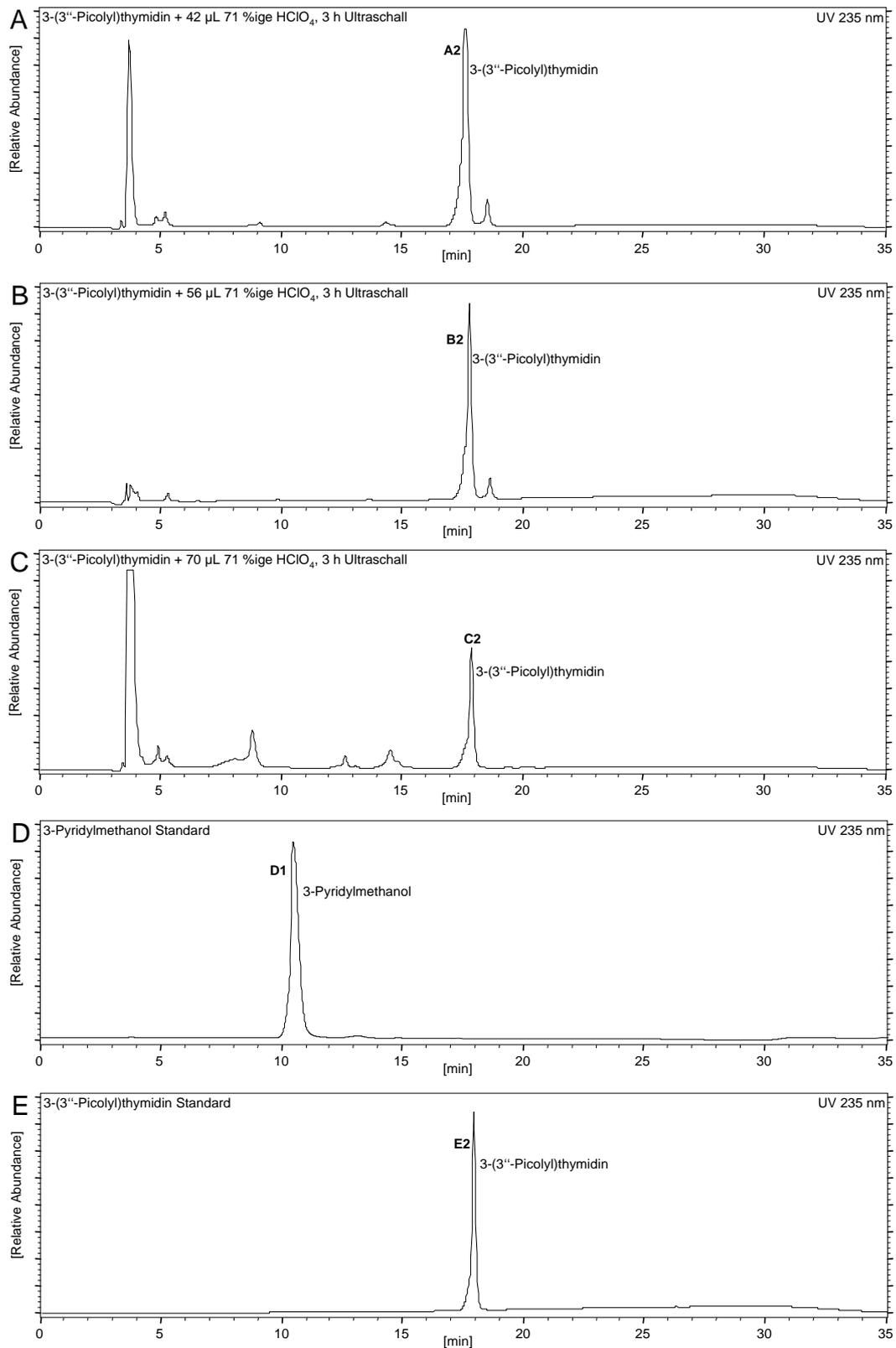
Abbildung 4.32 (Seite 85) zeigt, dass nach 2 h (A), 4 h (B) und 6 h (C) Behandlung mit Ultraschall kein 3-Pyridylmethanol entsteht und kein wesentlicher Zerfall des 3-(3''-Picolyl)thymidin stattfindet. So lässt sich vorerst keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit feststellen.

Desweiteren wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin mit unterschiedlichen Mengen 71 %iger  $HClO_4$  (Veränderung der Konzentration im Gesamtvolumen) 3 h lang mit Ultraschall inkubiert (Abbildung 4.33 und 4.34, Seite 86 und 87):

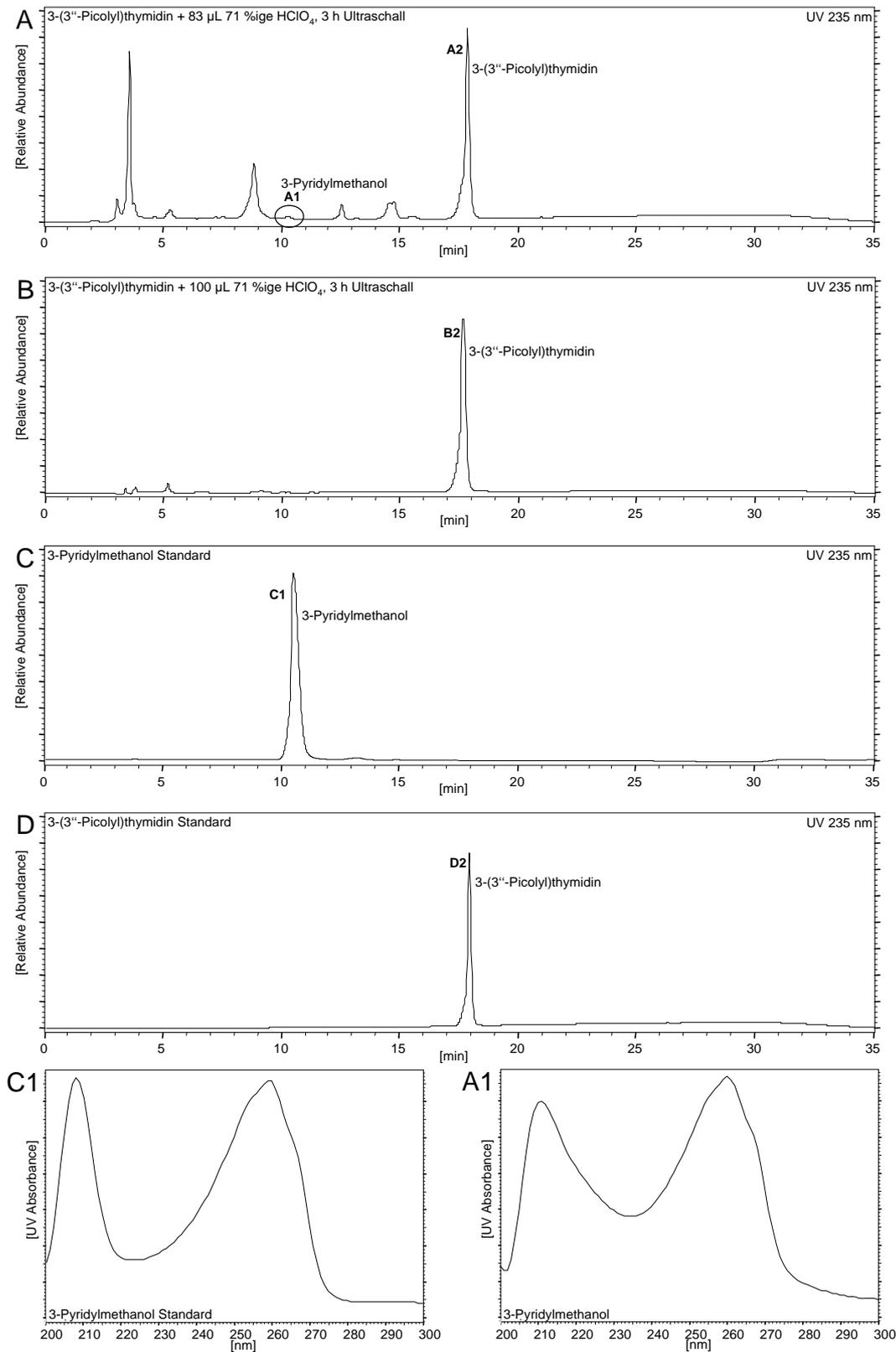
Nach Zugabe von 42  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (A) zersetzt sich 3-(3''-Picolyl)thymidin zwar stärker in unbekannte Zerfallsprodukte als bei Zugabe von 56  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (B), aber in beiden Fällen entsteht kein 3-Pyridylmethanol. Auch in Chromatogramm C (70  $\mu\text{L}$   $HClO_4$ ) entsteht kein 3-Pyridylmethanol. (Abbildung 4.33, Seite 86) Erst nach Zugabe von 83  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  entstehen geringe Mengen 3-Pyridylmethanol (A2), aber auch sehr viele Zerfallsprodukte (Chromatogramm A, Abbildung 4.34, Seite 87). Inkubiert man mit 100  $\mu\text{L}$   $HClO_4$  (höchste Konzentration) so findet wiederum kein nennenswerter Zerfall des 3-(3''-Picolyl)thymidin statt, weshalb auch kein 3-Pyridylmethanol entsteht (Chromatogramm B, Abbildung 4.34, Seite 87). Bisher kann also keine  $HClO_4$ -Konzentrationsabhängigkeit für die Hydrolyse von 3-(3''-Picolyl)thymidin festgestellt werden.



**Abbildung 4.32:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 100 µL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 2 h Ultraschall, **B:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 100 µL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 4 h Ultraschall und **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 100 µL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 6 h Ultraschall, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 5)



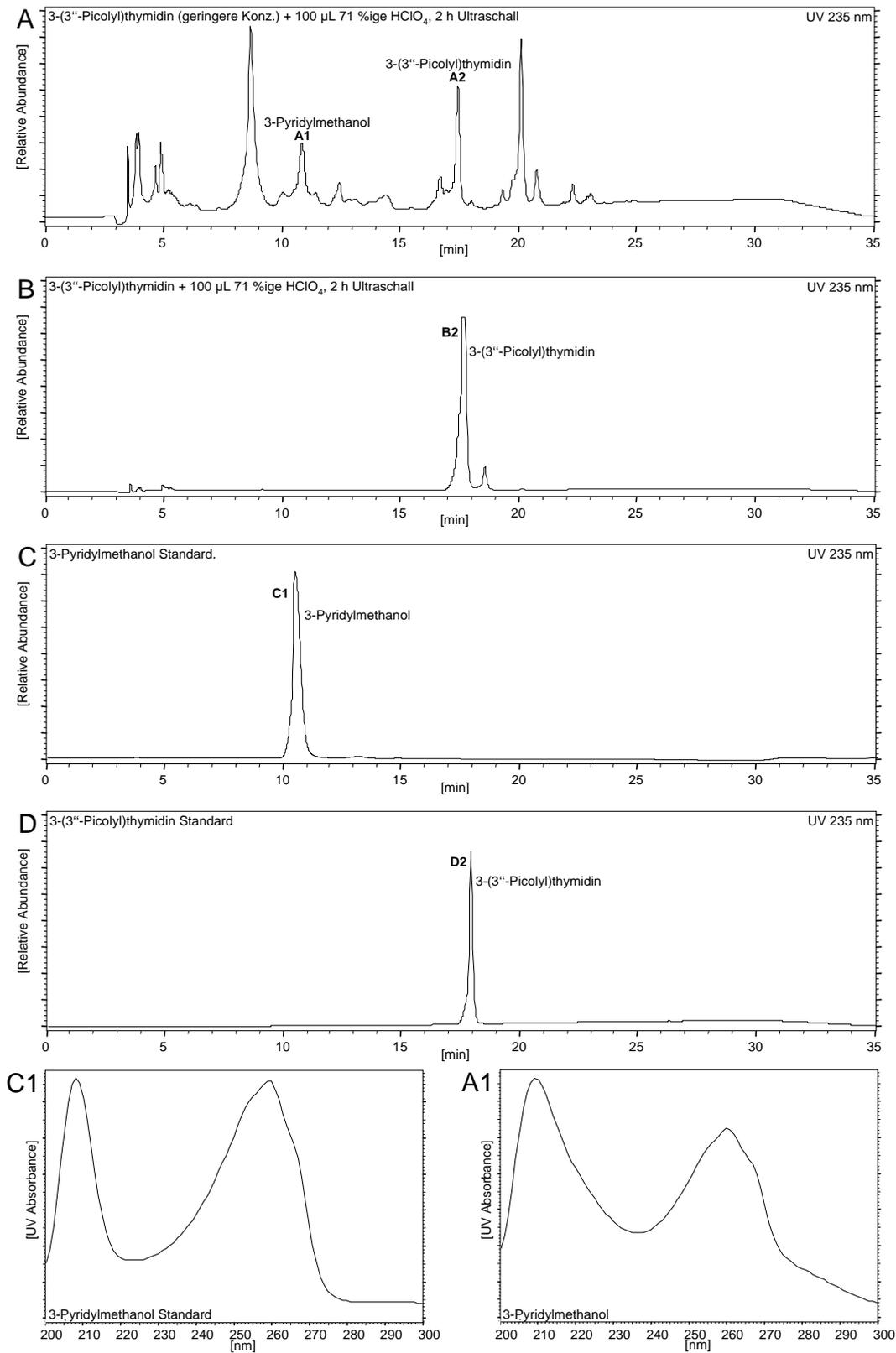
**Abbildung 4.33:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 42  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 3 h Ultraschall, **B:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 56  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 3 h Ultraschall und **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + 70  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 3 h Ultraschall, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin und UV-Spektren (HPLC-System 5)



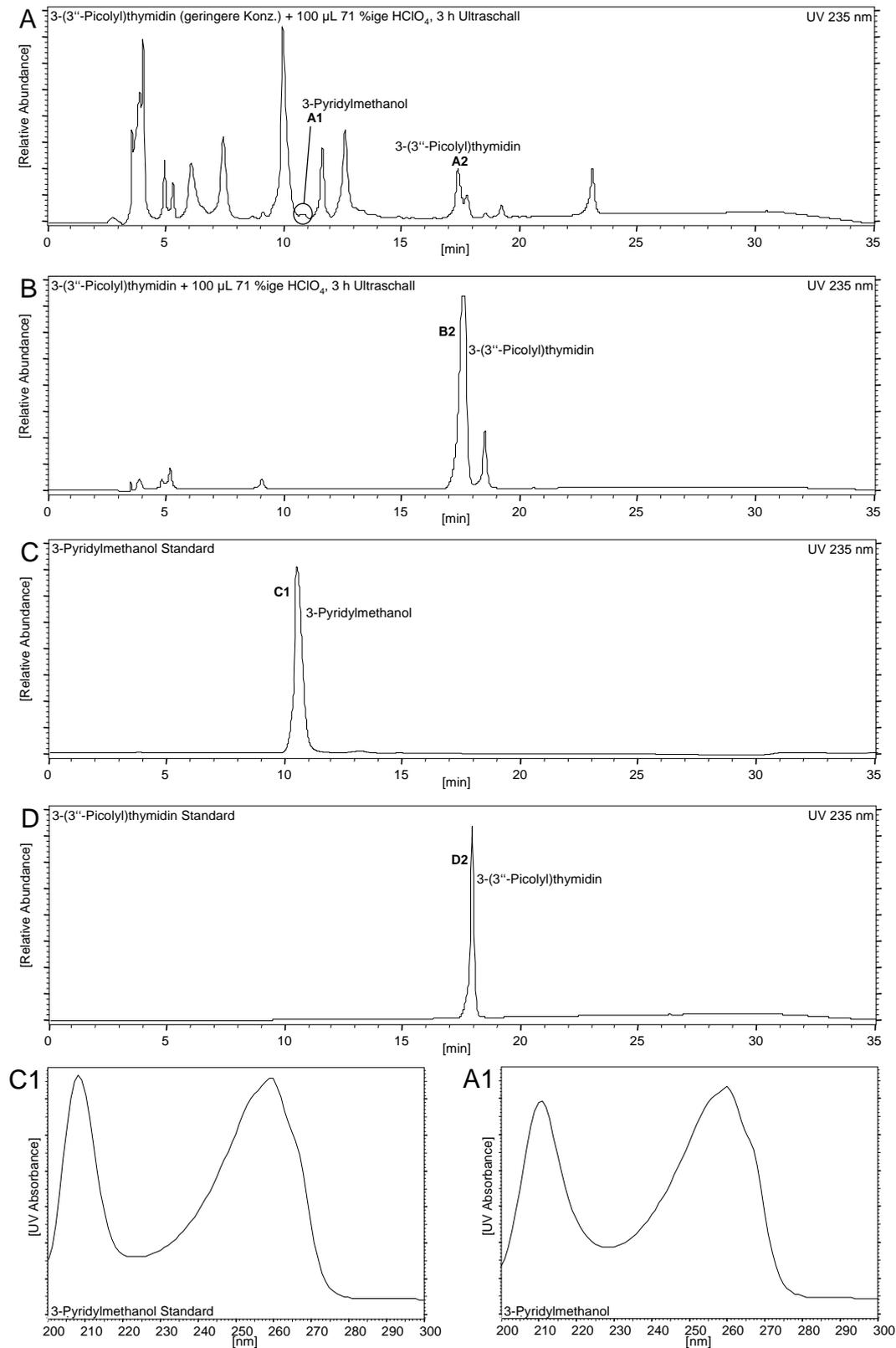
**Abbildung 4.34:** A: 3-(3''-Picoly)thymidin + 83  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 3 h Ultraschall und B: 3-(3''-Picoly)thymidin + 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 3 h Ultraschall, C und D: Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 5)

Im Vorversuch wurden je 100  $\mu\text{L}$  einer niedrig und einer höher konzentrierten Lösung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Anwesenheit von 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  2 bzw. 3 h lang mit Ultraschall behandelt. Die Chromatogramme der Ansätze, die jeweils 2 h mit Ultraschall behandelt wurden, sind in Abbildung 4.35 (Seite 89), die 3 h inkubiert wurden in Abbildung 4.36 (Seite 90) zu finden:

Während die Vorversuche mit niedriger 3-(3''-Picolyl)thymidin-Konzentration Chromatogramme mit hohem Anteil an unbekanntem Zerfallsprodukten aufweisen, zeigen die jeweils gegenübergestellten Vorversuche mit höherer 3-(3''-Picolyl)thymidin-Konzentration keinen nennenswerten Zerfall. So entsteht auch nur nach Inkubation des Ansatzes in niedriger 3-(3''-Picolyl)thymidin-Konzentration 3-Pyridylmethanol in relativ geringem Anteil, während sich das Signal des 3-(3''-Picolyl)thymidins in Abhängigkeit zur Reaktionszeit entsprechend verkleinert. Zudem ist zu bemerken, dass das erhaltene 3-Pyridylmethanol-Signal im Verhältnis zur Abnahme des Edukt-Signals nicht entsprechend an Intensität zunimmt. Daher ist eine zusätzliche Zersetzung des 3-Pyridylmethanols durch die Säure nicht auszuschließen.



**Abbildung 4.35:** **A:** 3-(3''-Picolyl)thymidin (geringe Konzentration) + 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 2 h Ultraschall und **B:** 3-(3''-Picolyl)thymidin + 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 2 h Ultraschall, **C** und **D:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picolyl)thymidin, und UV-Spektren (HPLC-System 5)



**Abbildung 4.36:** **A:** 3-(3''-Picolyl)thymidin (geringe Konzentration) + 100  $\mu$ L 71 %iger  $HClO_4$ , 3 h Ultraschall und **B:** 3-(3''-Picolyl)thymidin + 100  $\mu$ L 71 %iger  $HClO_4$ , 3 h Ultraschall, **C** und **D:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picolyl)thymidin, und UV-Spektren (HPLC-System 5)

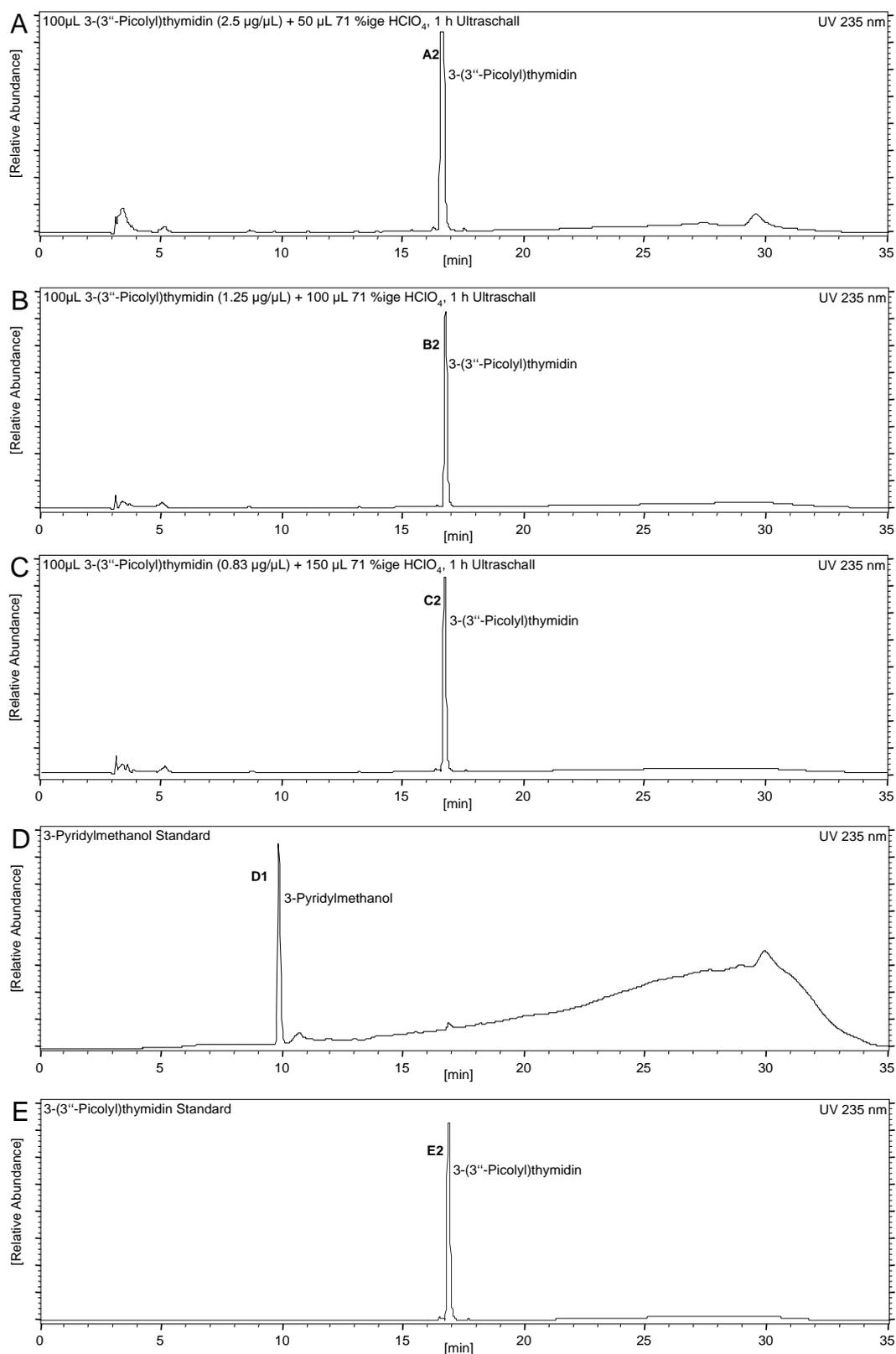
Auf Grund der bisherigen Messergebnisse im Vorversuch ist es im Folgenden nötig, mit definierten Konzentrationen des zu spaltenden 3-(3''-Picolyl)thymidin zu arbeiten. Dazu wurden in einzelnen Ansätzen Lösungen von 3-(3''-Picolyl)thymidin unterschiedlicher Konzentration (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0.83  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 50, 100 und 150  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  1 bzw. 2 h lang im Ultraschallbad inkubiert:

Die Chromatogramme der Reaktionen von 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 50  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  (A), 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  (B) und 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (0.83  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 150  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  (C) (jeweils 1 h lang mit Ultraschall behandelt) sind in Abbildung 4.37 (Seite 92) gegenübergestellt. Bei allen drei Ansätzen wurde kein 3-Pyridylmethanol gebildet. Ein Zerfall des 3-(3''-Picolyl)thymidin kann nur unwesentlich festgestellt werden.

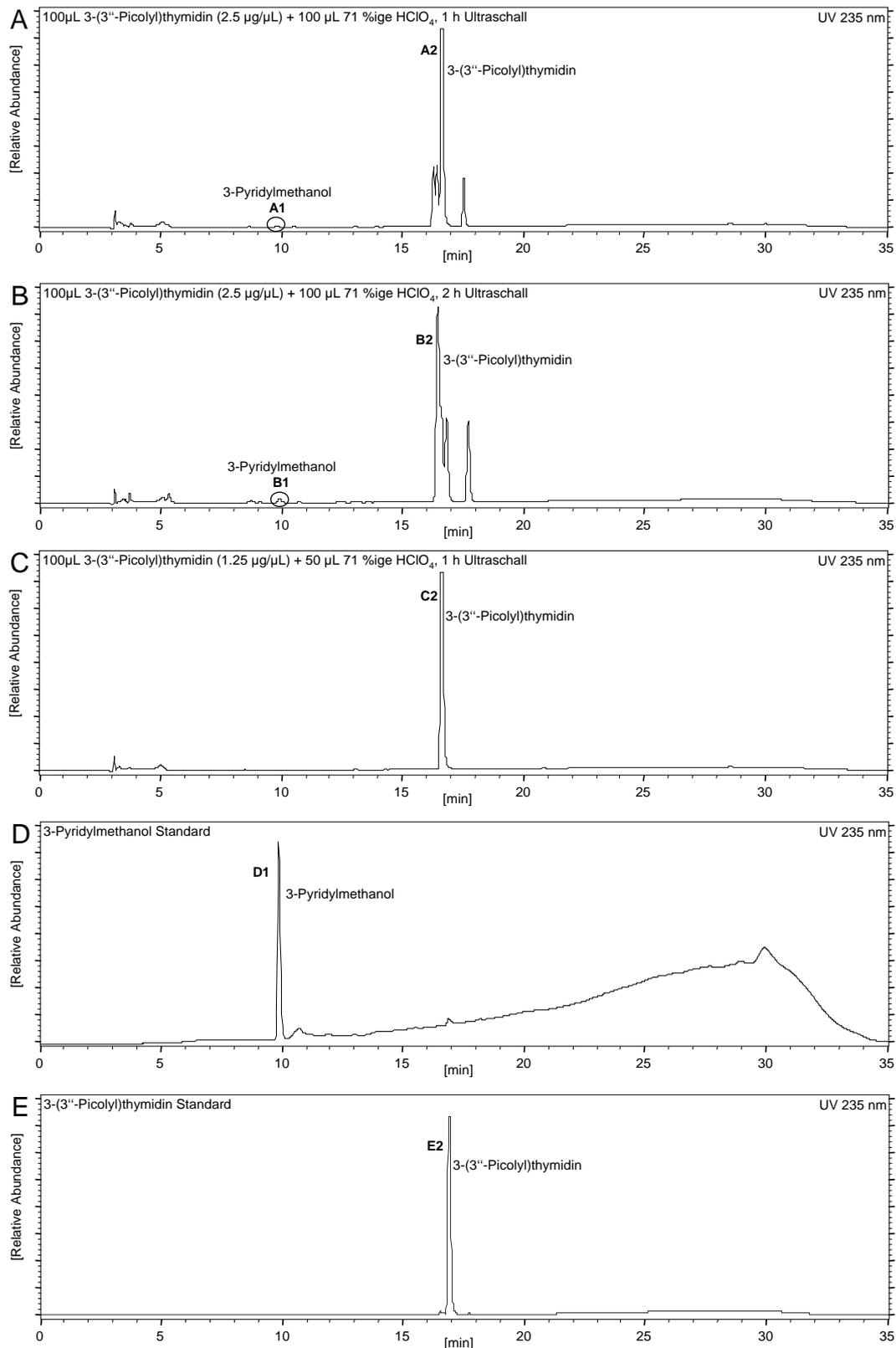
Bei weiteren Ansätzen wurden 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  1 h lang (A), 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  2 h lang (B) und 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 50  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  1 h lang (C) im Ultraschallbad umgesetzt (Abbildung 4.38 und 4.39, Seite 93 und 94). Chromatogramm A und B zeigen einen geringen Zerfall des 3-(3''-Picolyl)thymidins zu unbekanntem Produkten und zu einer sehr geringen Menge 3-Pyridylmethanol (A1/B1). In Chromatogramm C ist dagegen kein Umsatz des 3-(3''-Picolyl)thymidins festzustellen.

Zuletzt wurden je 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picolyl)thymidin (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mit 150  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  1 h (A) bzw. 2 h (B) im Ultraschall inkubiert (Abbildung 4.40, Seite 95). Bei beiden Ansätzen entsteht in ähnlich geringem Ausmaß wie bei den vorherigen Reaktionen nur wenig 3-Pyridylmethanol (A1/B1). Auch die längere Inkubationszeit von 2 h bringt keine Steigerung der 3-Pyridylmethanol Menge.

Es entstand also nur bei den Ansätzen, bei denen 3-(3''-Picolyl)thymidin der Konzentration 2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  mit 100 bzw. 150  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$  inkubiert wurde, überhaupt 3-Pyridylmethanol. Allerdings wurde dieses immer nur in geringer Menge gebildet, wobei stets eine große Menge von nicht umgesetztem Edukt vorhanden blieb.



**Abbildung 4.37:** **A:** 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picoly)thymidin (2.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) + 50  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 1 h Ultraschall, **B:** 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picoly)thymidin (1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) + 100  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 1 h Ultraschall, und **C:** 100  $\mu\text{L}$  3-(3''-Picoly)thymidin (0.83  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) + 150  $\mu\text{L}$  71 %iger  $\text{HClO}_4$ , 1 h Ultraschall, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 4)



**Abbildung 4.38:** **A:** 100 μL 3-(3''-Picoly)thymidin (2.50 μg/μL) + 100 μL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 1 h Ultraschall, **B:** 100 μL 3-(3''-Picoly)thymidin (2.50 μg/μL) + 100 μL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 2 h Ultraschall, und **C:** 100 μL 3-(3''-Picoly)thymidin (1.25 μg/μL) + 50 μL 71 %iger HClO<sub>4</sub>, 1 h Ultraschall, **D** und **E:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picoly)thymidin (HPLC-System 4)

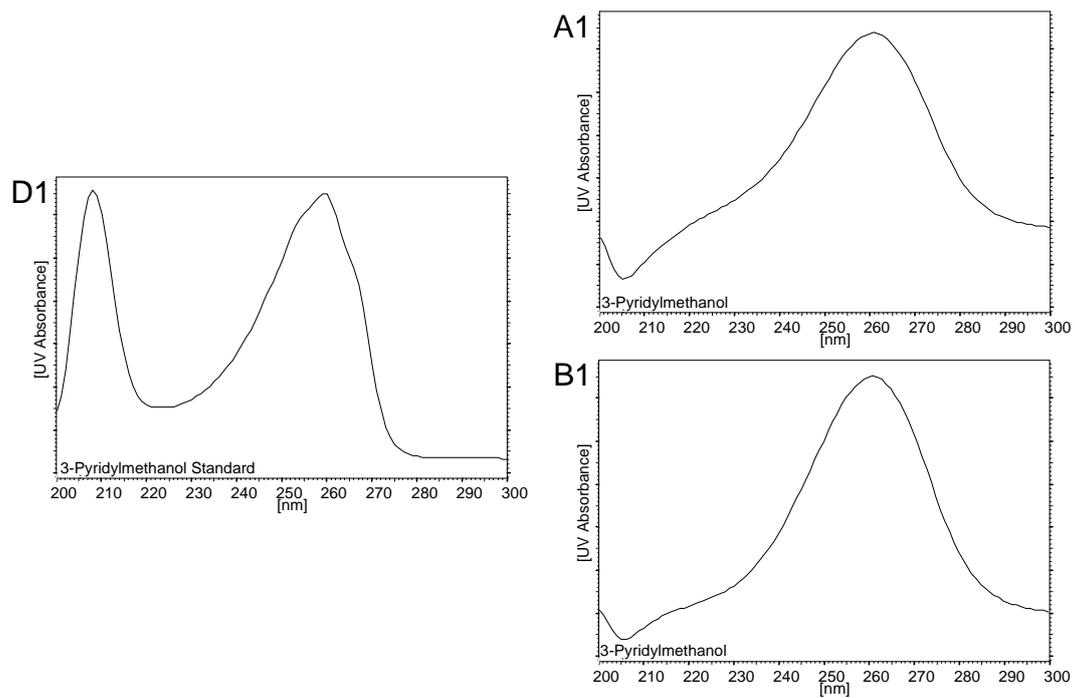
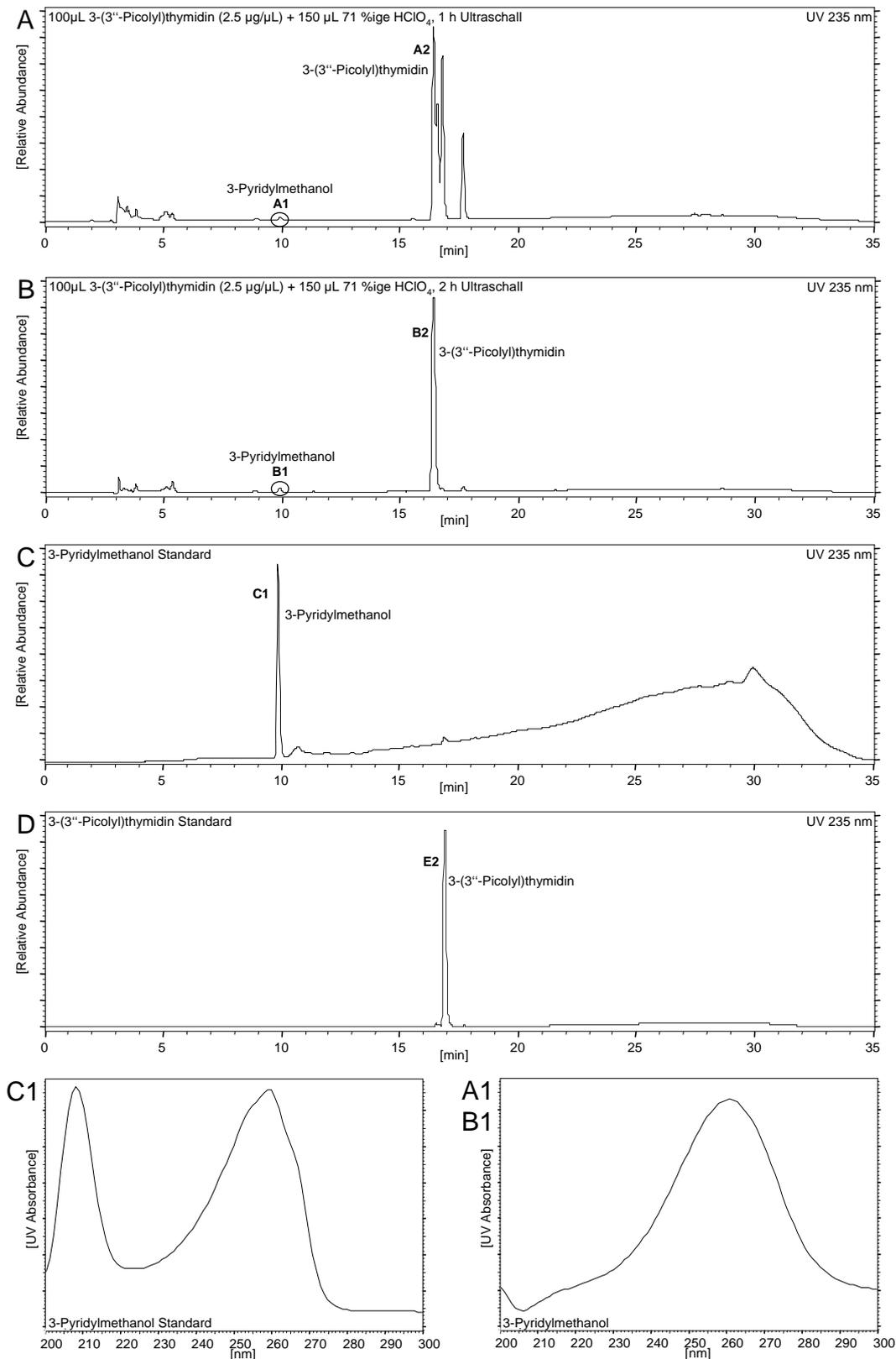


Abbildung 4.39: UV-Spektren zu Abbildung 4.38



**Abbildung 4.40:** **A:** 100  $\mu$ L 3-(3''-Picolyl)thymidin (2.50  $\mu$ g/ $\mu$ L) + 50  $\mu$ L 71 %iger  $HClO_4$ , 1 h Ultraschall und **B:** 100  $\mu$ L 3-(3''-Picolyl)thymidin (1.25  $\mu$ g/ $\mu$ L) + 100  $\mu$ L 71 %iger  $HClO_4$ , 1 h Ultraschall, **C** und **D:** Standards 3-Pyridylmethanol und 3-(3''-Picolyl)thymidin, und UV-Spektren (HPLC-System 4)

#### 4.3.2.3 Zusammenfassung der Spaltungsversuche

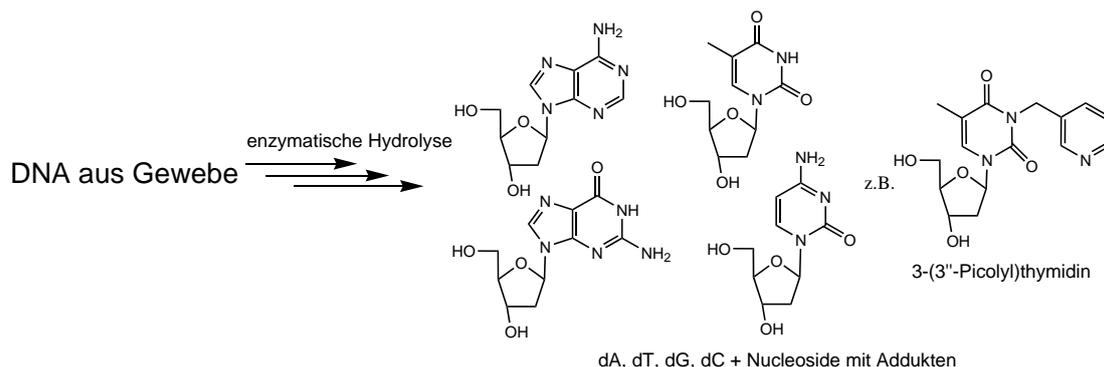
3-(3''-Picoly)thymidin lässt sich mit  $HCl$  nach Richter et al. [68] nicht spalten. 3-Pyridylmethanol konnte nur nach Inkubation mit  $HClO_4$  detektiert werden.

Die Spaltungsvorversuche mit  $HClO_4$  ergaben, dass zunächst keine Abhängigkeit der Inkubationszeit sowie die erforderliche  $HClO_4$ -Konzentrationsabhängigkeit bis dahin nicht optimal festzustellen ist. Daraus scheint das Verhältnis zwischen 3-(3''-Picoly)thymidin und  $HClO_4$  eine Rolle zu spielen.

Allgemein ist zu bemerken, dass entweder nur sehr wenig 3-Pyridylmethanol entsteht oder ein Komplettzerfall des 3-(3''-Picoly)thymidin stattfindet. Außerdem ist davon auszugehen, dass 3-Pyridylmethanol selbst einer Zersetzung durch  $HClO_4$  unterliegt.

## 4.4 Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben

Das synthetisierte 3-(3''-Picolyl)thymidin (Kapitel 4.2.2, Seite 64 ff) stellt eines der möglicherweise gebildeten 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukte dar. Geht man davon aus, dass bei der Oxygenierung von Myosmin *in vivo* dieses Addukt gebildet wird, so kann 3-(3''-Picolyl)thymidin als Referenzstandard zum Nachweis in Gewebeproben verwendet werden.



**Abbildung 4.41:** Vorgehensweise zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben

Nach Isolierung der DNA aus Humanlebergewebeproben wird zunächst die DNA durch enzymatische Hydrolyse in die Nucleoside 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxythymidin (Thymidin, dT), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxycytidin (dC) und in mögliche Nucleoside mit Addukt gespalten. So würde z.B. auch das 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukt 3-(3''-Picolyl)thymidin als Hydrolyseprodukt entstehen. (Abbildung 4.41)

Geht man davon aus, dass die Konzentration der aus Humanlebergewebe stammenden Nucleoside nur sehr gering ist, muss die Konzentration eines möglichen 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukts noch kleiner sein. Um die Messbarkeit einer solch niedrigen Addukt-Konzentration zu gewährleisten wurde die Möglichkeit der Fluoreszenz-Derivatisierung in Verbindung mit vorheriger Anreicherung auf SPE-Säulen in Betracht gezogen. Zur Fluoreszenz-Derivatisierung des 3-(3''-Picolyl)thymidins wären die beiden Hydroxylgruppen am 2'-Desoxyribose-Ring gut geeignet.

So wurde zunächst die enzymatische Hydrolyse an Kalbsthymus-DNA getestet. Anschließend wurde versucht, 3-(3''-Picolyl)thymidin mit verschiedenen Fluoreszenz-Markern wie Dansylchlorid, 1-Naphthylisocyanat und 2-Naphthoylechlorid zu derivatisieren.

### 4.4.1 Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA

An Stelle aus Humanleber gewonnener DNA wurde zunächst die Spaltung von Kalbsthymus-DNA durch enzymatische Hydrolyse untersucht (Abbildung 4.42 und 4.43): Der co-chromatographische Vergleich mit den Standards der Nukleoside 2'-Desoxycytidin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxythymidin (dT) und 2'-Desoxyadenosin (dA) (Chromatogramme B, C, D, E) zeigt, dass sich Kalbsthymus-DNA (Chromatogramm A) in diese spalten lässt. Es entstehen außerdem keine weiteren störenden Signale.

Die aus Humanleber gewonnene DNA liegt nach der Isolierung aus dem Gewebe im Elutions-Puffer D (Kapitel 3.3.1, Seite 37) vor. Laut Hersteller besteht der Elutions-Puffer D aus einem Tris-HCl-Puffer und dem Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Um zu untersuchen, ob auch in Anwesenheit dieses Puffers die enzymatische Hydrolyse durchführbar ist, wurde die Kalbsthymus-DNA in Elutions-Puffer D und dem in der Versuchsvorschrift verwendeten Tris-HCl/ $MgCl_2$ -Puffer gelöst.

Das Chromatogramm A in Abbildung 4.44 (Seite 101) zeigt die enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA mit 3-(3''-Picolyl)thymidin in Elutions-Puffer D/Tris-HCl/ $MgCl_2$ -Puffer. Zur Co-Chromatographie sind die Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA in Elutions-Puffer D/Tris-HCl/ $MgCl_2$ -Puffer (B), einer Standard-Lösung der DNA-Nukleoside mit 3-(3''-Picolyl)thymidin (C) und einem 3-(3''-Picolyl)thymidin-Standard (D) gegenübergestellt (siehe Kapitel 3.4.1, Seite 40). Der Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass bei beiden enzymatischen Hydrolysen alle vier DNA-Nukleoside entstehen. 3-(3''-Picolyl)thymidin (A5) bleibt von der enzymatischen Hydrolyse unbeeinflusst.

So lässt sich die enzymatische Hydrolyse zur Gewinnung der einzelnen Nukleoside und Nukleoside mit Addukt vermutlich problemlos auf Humanleber-DNA übertragen.

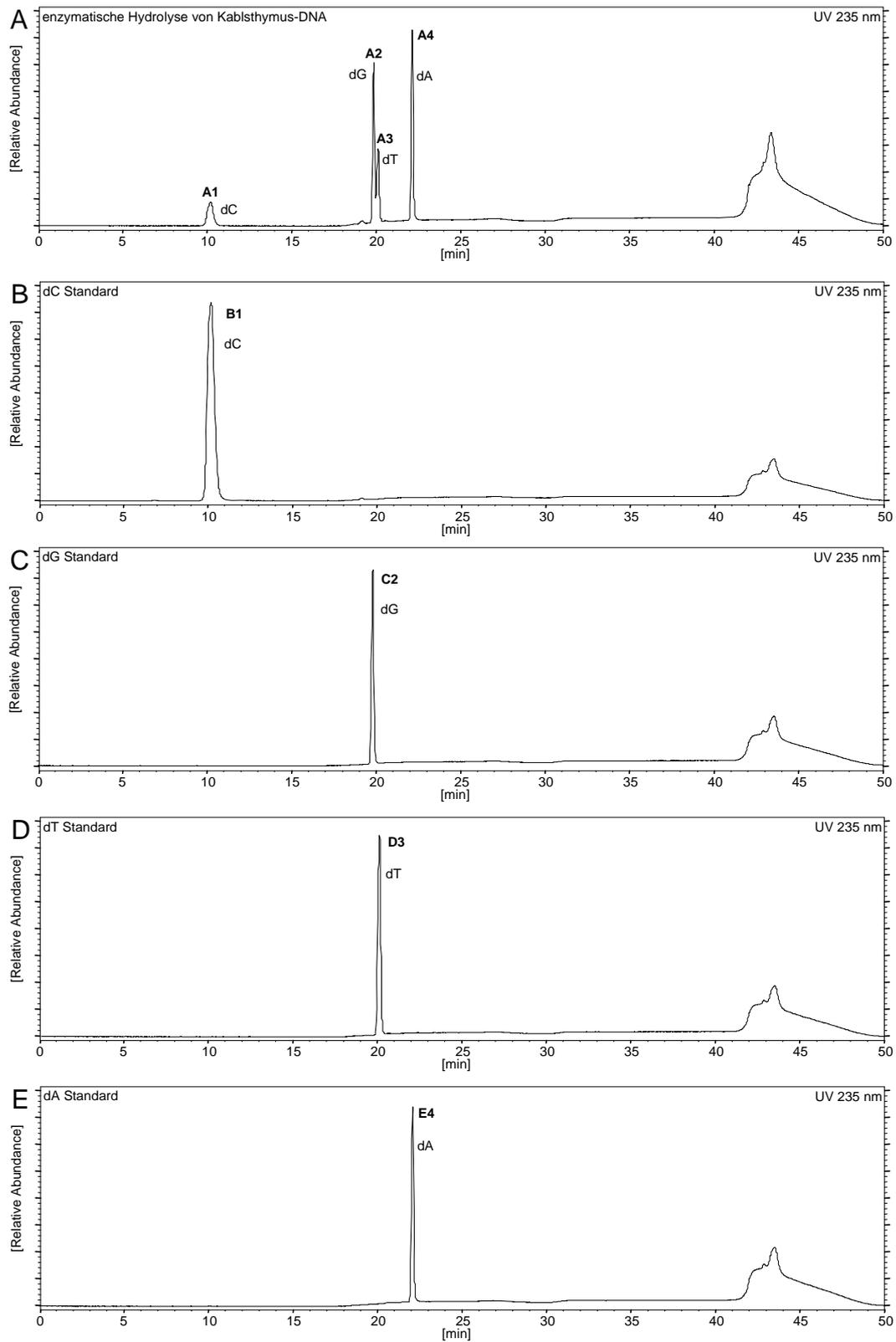


Abbildung 4.42: **A**: Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA, **B**, **C**, **D** und **E**: Standards dC, dG, dT und dA (HPLC-System 6)

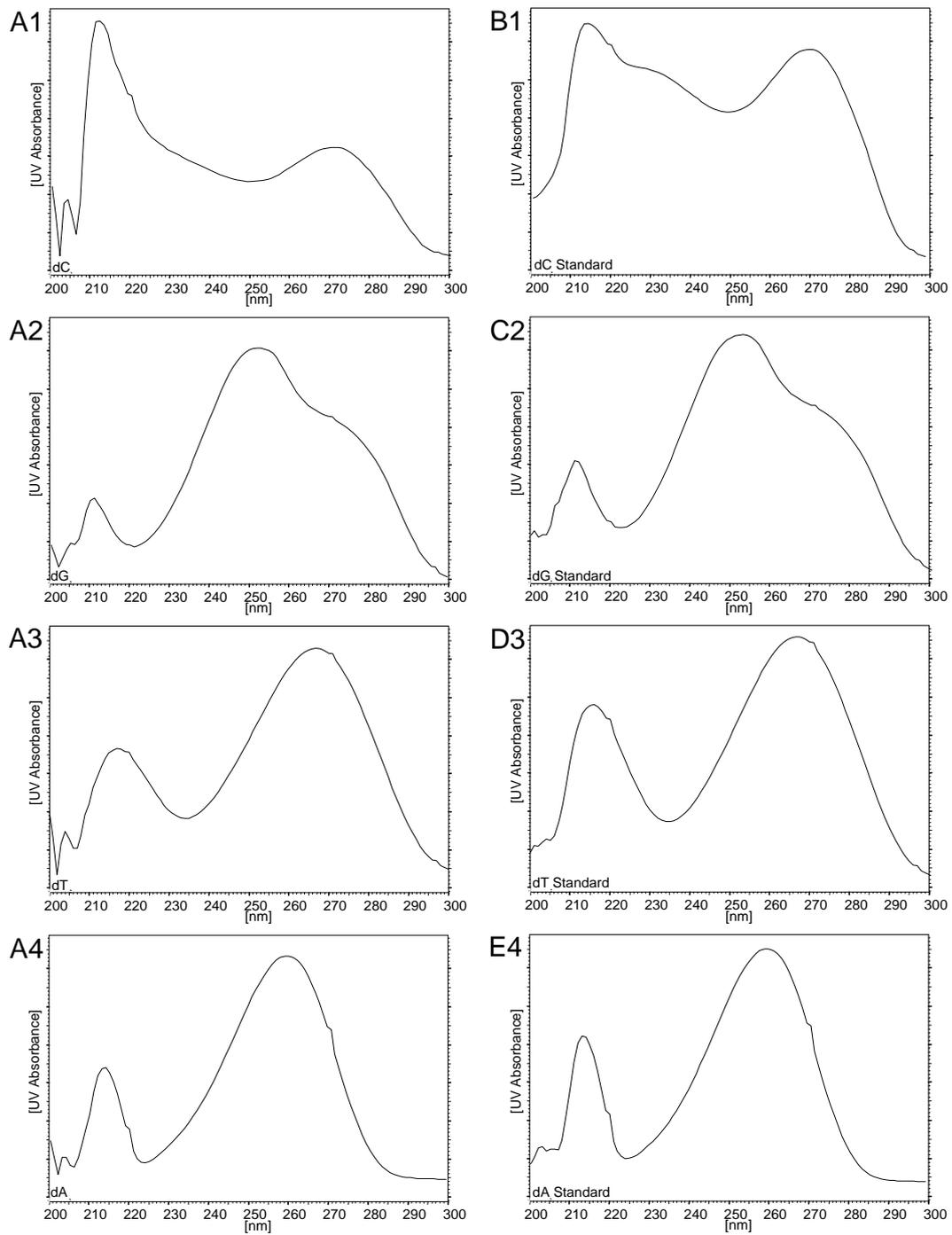
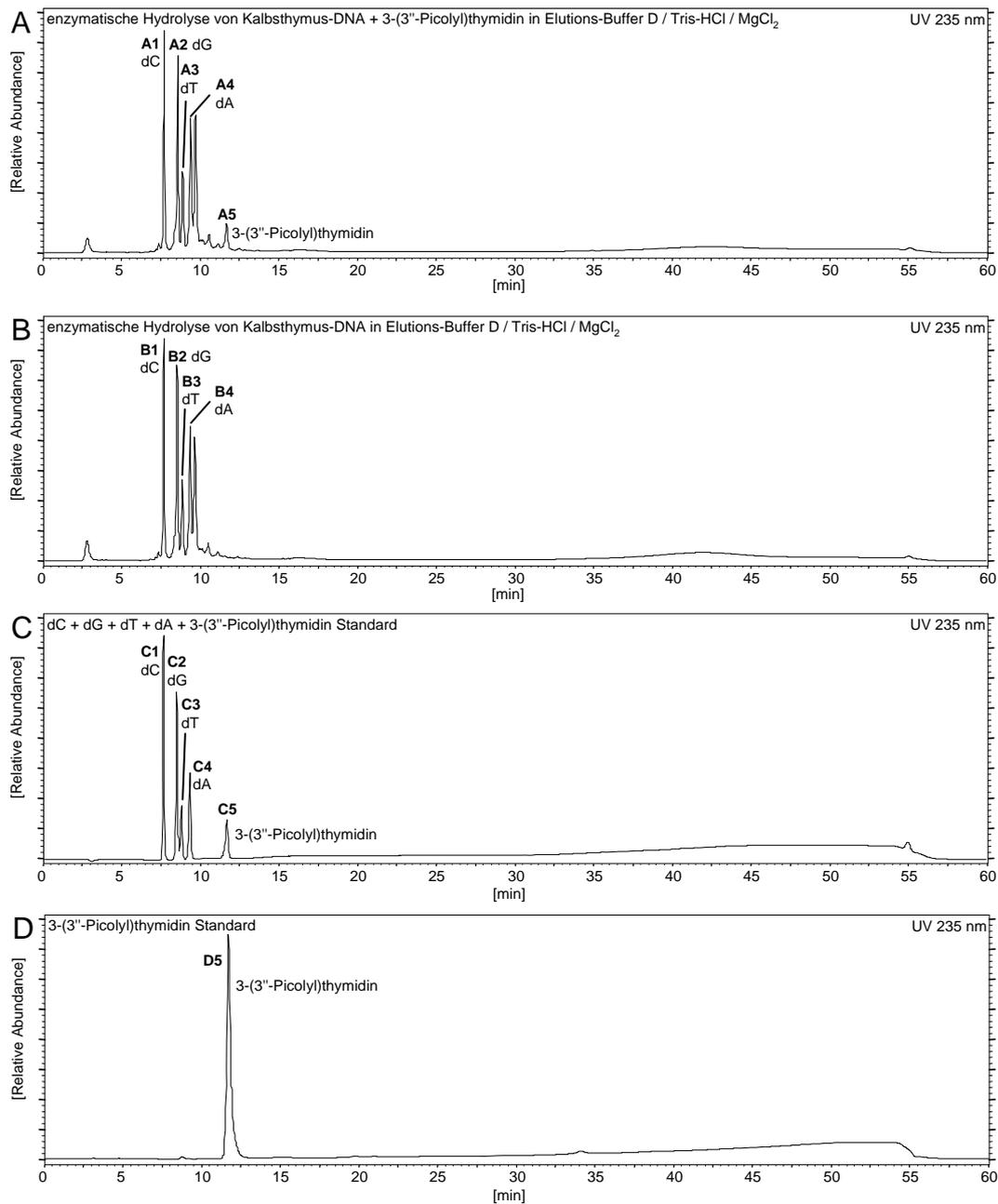


Abbildung 4.43: UV-Spektren zu Abbildung 4.42



**Abbildung 4.44:** **A:** Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA mit 3-(3''-Picoly)thymidin in Elutions-Puffer D / Tris-HCl / MgCl<sub>2</sub>-Puffer, **B:** Enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA in Elutions-Puffer D / Tris-HCl / MgCl<sub>2</sub>-Puffer, **C:** Standards dC, dG, dT, dA und 3-(3''-Picoly)thymidin und **D:** 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 9)

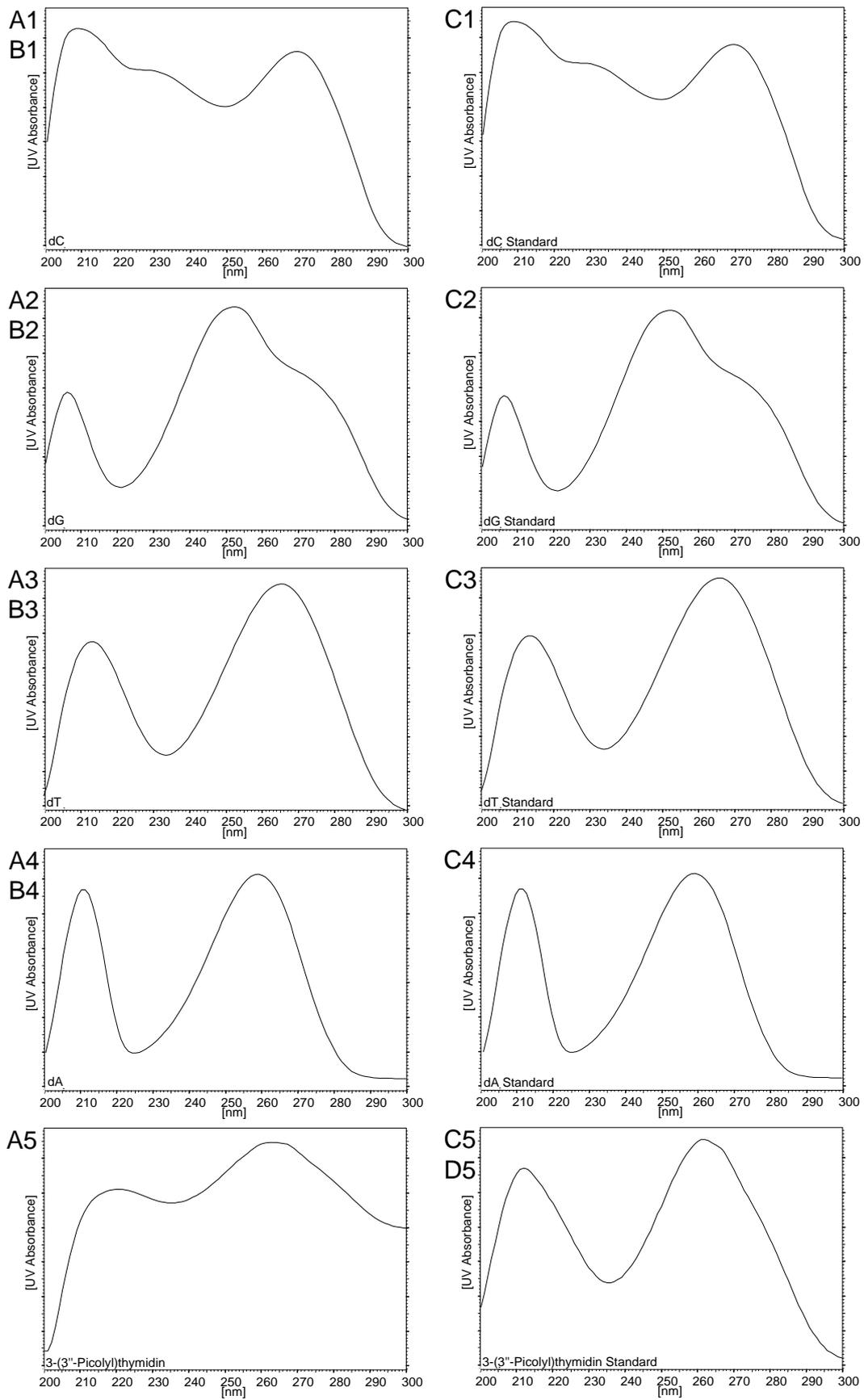
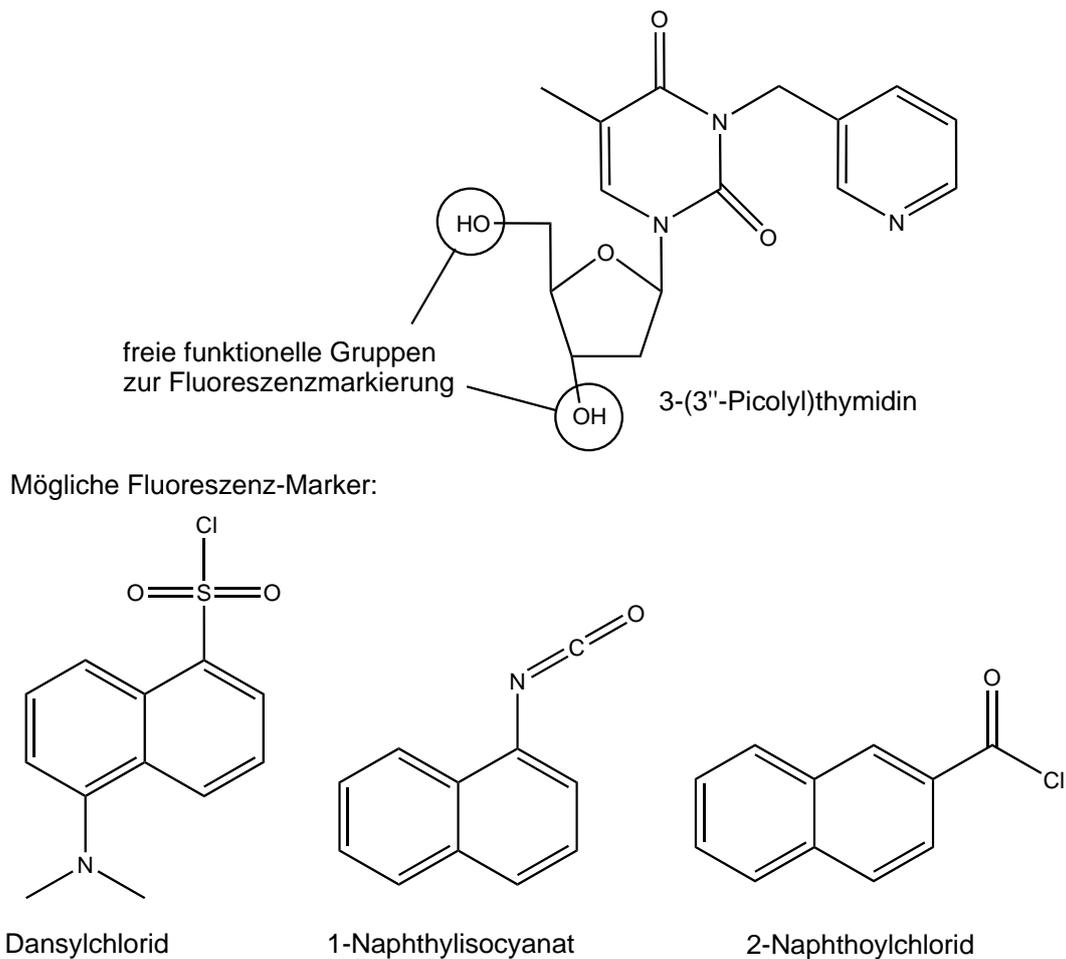


Abbildung 4.45: UV-Spektren zu Abbildung 4.44

### 4.4.2 Fluoreszenz Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picoly)thymidin

Bei einer zuvor durchgeführten Messung von 3-(3''-Picoly)thymidin im Fluoreszenzspektrometer konnte keine Fluoreszenzaktivität der Substanz festgestellt werden. 3-(3''-Picoly)thymidin besitzt zwei Hydroxylgruppen am 2'-Desoxyribose ring, an die geeignete Fluoreszenz-Marker gebunden werden könnten. So wurde im Folgenden versucht, eine Derivatisierung mit den Fluoreszenz-Markern Dansylchlorid, 1-Naphthylisocyanat und 2-Naphthoylchlorid zu erreichen. (Abbildung 4.46)



**Abbildung 4.46:** Derivatisierbare funktionelle Gruppen am 3-(3''-Picoly)thymidin und dafür getestete Fluoreszenz-Marker

#### 4.4.2.1 Derivatisierung mit Dansylchlorid

Dansylchlorid wird normalerweise zur Fluoreszenzderivatisierung von Aminen verwendet [66]. Peng et al. [69] konnten aber auch die Hydroxylgruppe von 8-Hydroxyquinolin in Anwesenheit einer Base in THF mit Dansylchlorid derivatisieren. Daher wurde versucht, 3-(3''-Picolyl)thymidin mit Dansylchlorid umzusetzen.

Da nach der enzymatischen Hydrolyse der aus Gewebeproben gewonnenen DNA die Produkte in Puffer vorliegen, werden die Vorversuche im wässrigen Medium durchgeführt. Dansylchlorid ist nicht wasserlöslich und wird daher nach Costantini et al. [66] in Aceton gelöst. Die Messungen werden zunächst mittels HPLC-DAD in ausreichender Konzentration durchgeführt. Dies ermöglicht den Vergleich von UV-Spektren sowie die genaue Bestimmung der Extinktion und Emission eventuell neuer Fluoreszenz-Derivate für eine spätere Fluoreszenz-Chromatographie.

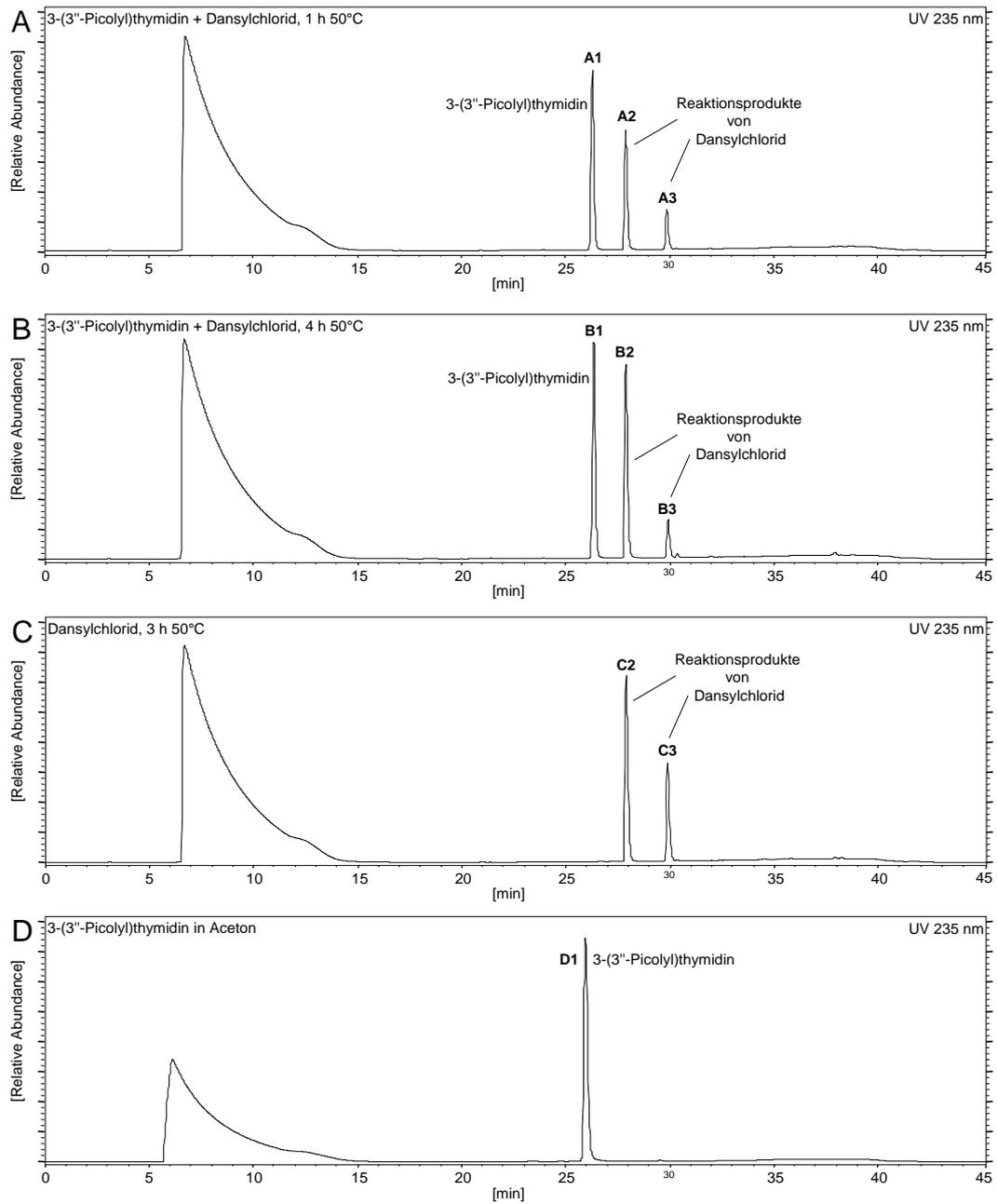
Anfangs wurde versucht 3-(3''-Picolyl)thymidin ohne Base 1 h (A) bzw. 4 h (B) bei 50 °C mit Dansylchlorid umzusetzen. Die resultierenden Chromatogramme A und B sowie die dazugehörigen UV-Spektren sind in Abbildung 4.47 und 4.48 (Seite 105 und 106) zu finden. Durch co-chromatographischen Vergleich der beiden Ansätze mit einer Dansylchlorid-Lösung (C), die 3 h lang auf 50 °C erhitzt wurde und einem 3-(3''-Picolyl)thymidin Standard (D) geht hervor, dass 3-(3''-Picolyl)thymidin nicht umgesetzt wurde.

Weitere Ansätze wurden mit Triethylamin und Natriumcarbonat als Base durchgeführt:

Bei 50 °C wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin 1 h (A) bzw. 3 h (B) in Anwesenheit von Triethylamin und 1 h in Anwesenheit von Natriumcarbonat mit Dansylchlorid inkubiert. Ein co-chromatographischer Vergleich ergibt auch hier, dass keine Reaktion mit 3-(3''-Picolyl)thymidin stattgefunden hat. (Abbildung 4.49 und 4.50, Seite 107 und 108)

Desweiteren wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin 1 h bei 80 °C in Anwesenheit von Triethylamin inkubiert. Auch hier zeigt der co-chromatographische Vergleich mit einer ähnlich behandelten Dansylchlorid-Standardlösung und dem 3-(3''-Picolyl)thymidin Standard, dass 3-(3''-Picolyl)thymidin nicht derivatisiert werden konnte. (Abbildung 4.51 und 4.52, Seite 109 und 110)

Es findet also keine Derivatisierung mit Dansylchlorid unter den hier verwendeten wässrigen Bedingungen statt.



**Abbildung 4.47:** A: 3-(3''-Picoly)thymidin + Dansylchlorid 1 h 50 °C, B: 3-(3''-Picoly)thymidin + Dansylchlorid 4 h 50 °C, C: Dansylchlorid 3 h 50 °C und D: 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 7)

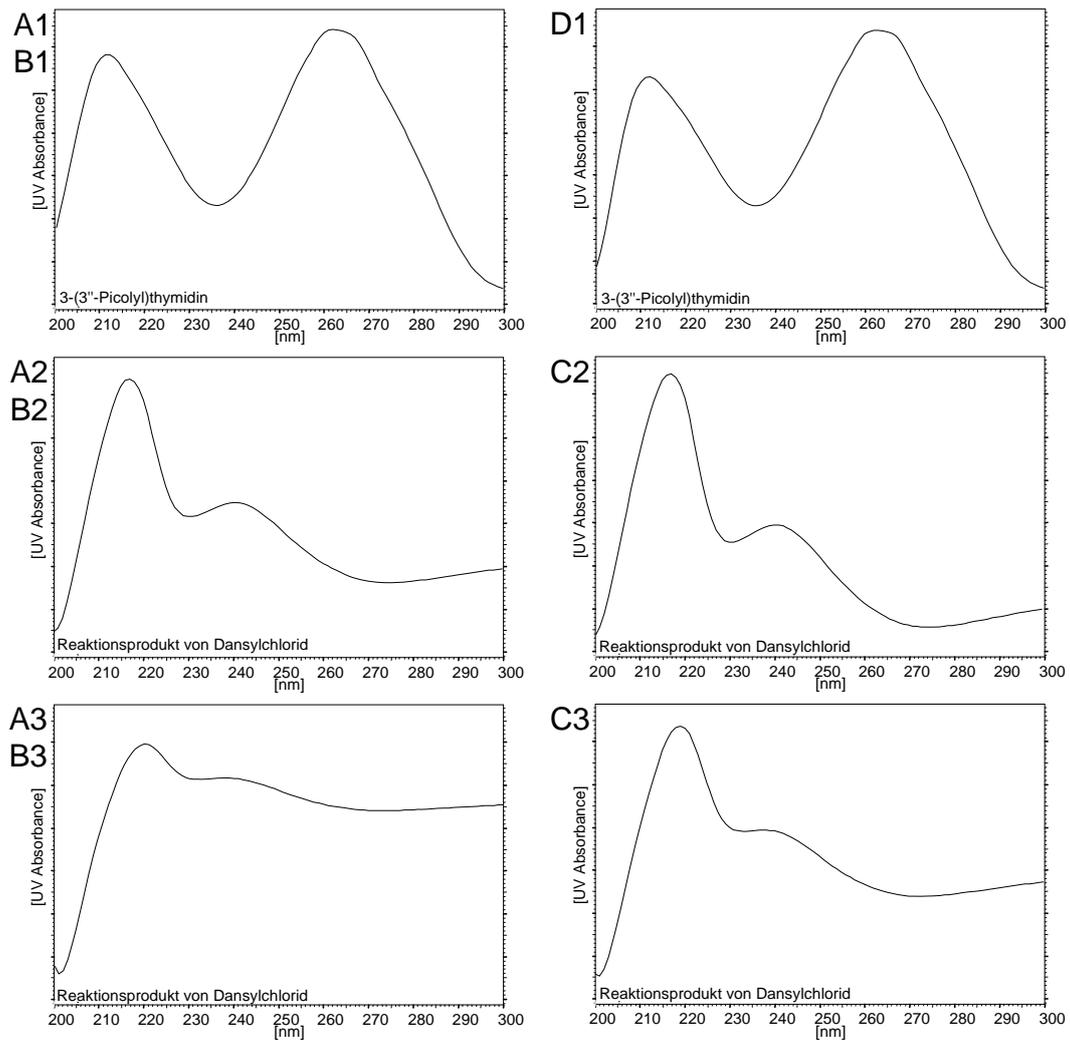
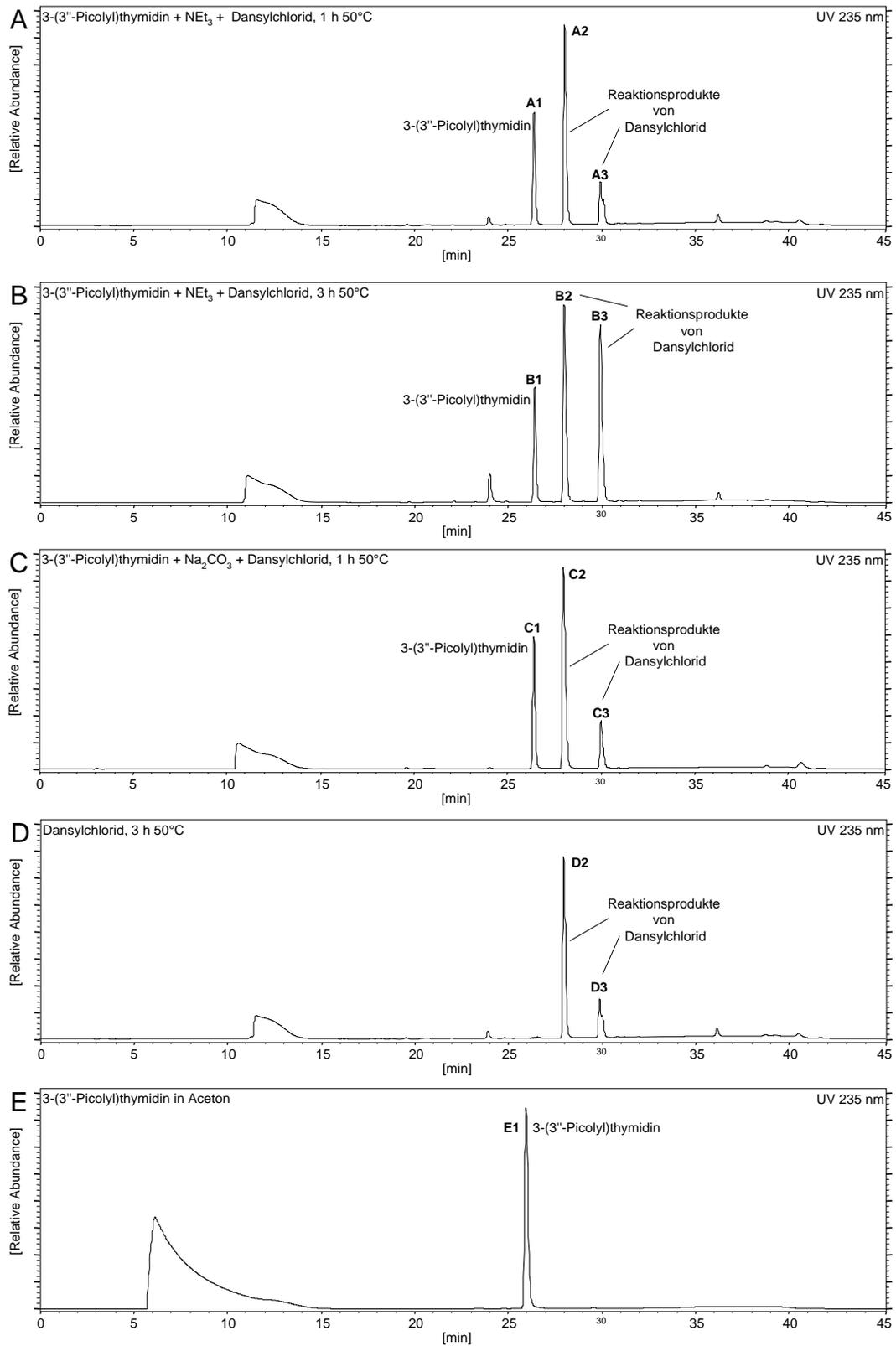


Abbildung 4.48: UV-Spektren zu Abbildung 4.47



**Abbildung 4.49:** A: 3-(3''-Picoly)thymidin +  $NEt_3$  + Dansylchlorid 1 h 50 °C, B: 3-(3''-Picoly)thymidin +  $NEt_3$  + Dansylchlorid 3 h 50 °C, C: 3-(3''-Picoly)thymidin +  $Na_2CO_3$  + Dansylchlorid 1 h 50 °C, D: Dansylchlorid 3 h 50 °C und D: 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 7)

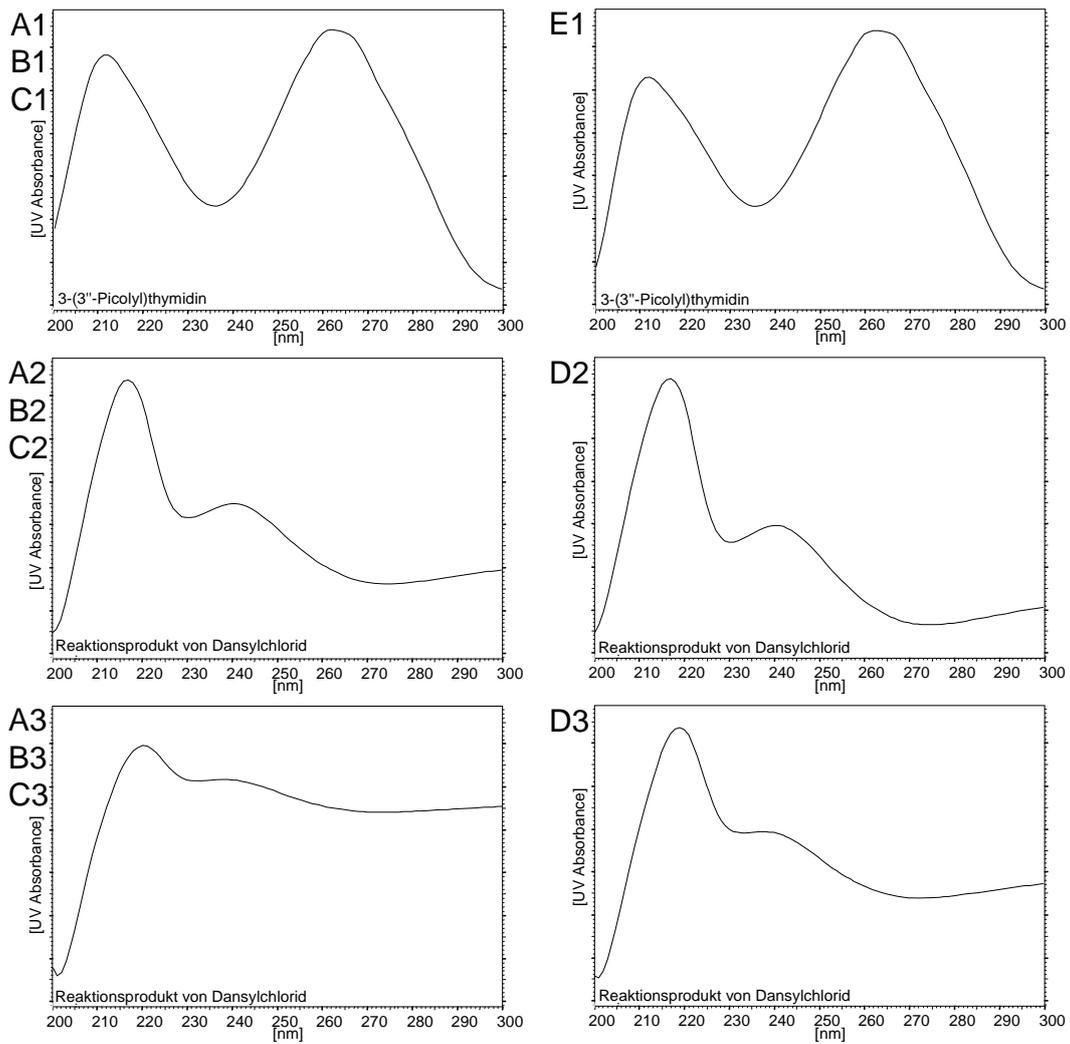
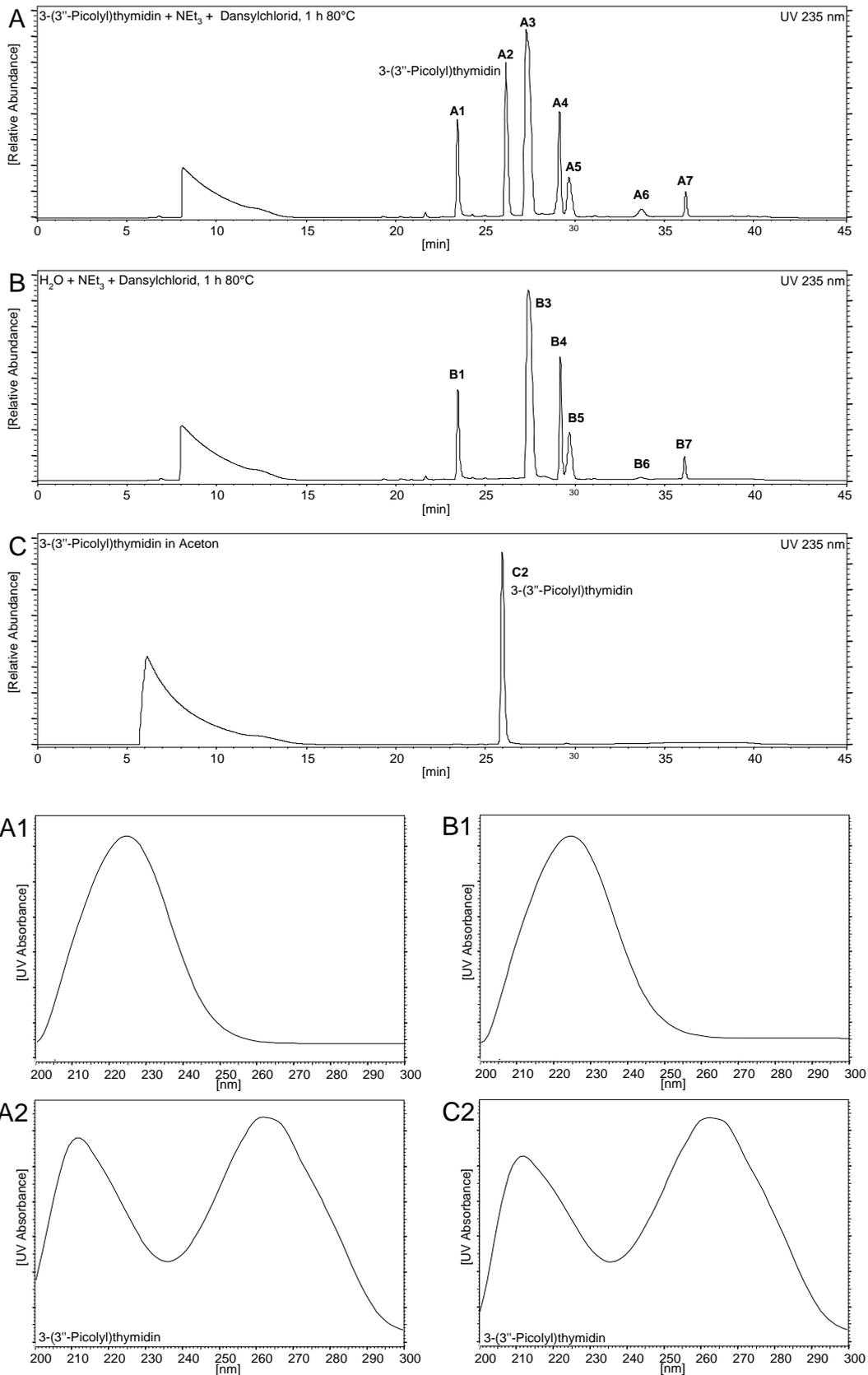


Abbildung 4.50: UV-Spektren zu Abbildung 4.49



**Abbildung 4.51:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin +  $NEt_3$  + Dansylchlorid 1 h 80 °C, **B:**  $H_2O_2$  +  $NEt_3$  + Dansylchlorid 1 h 80 °C, **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin Standard und UV-Spektren (HPLC-System 7)

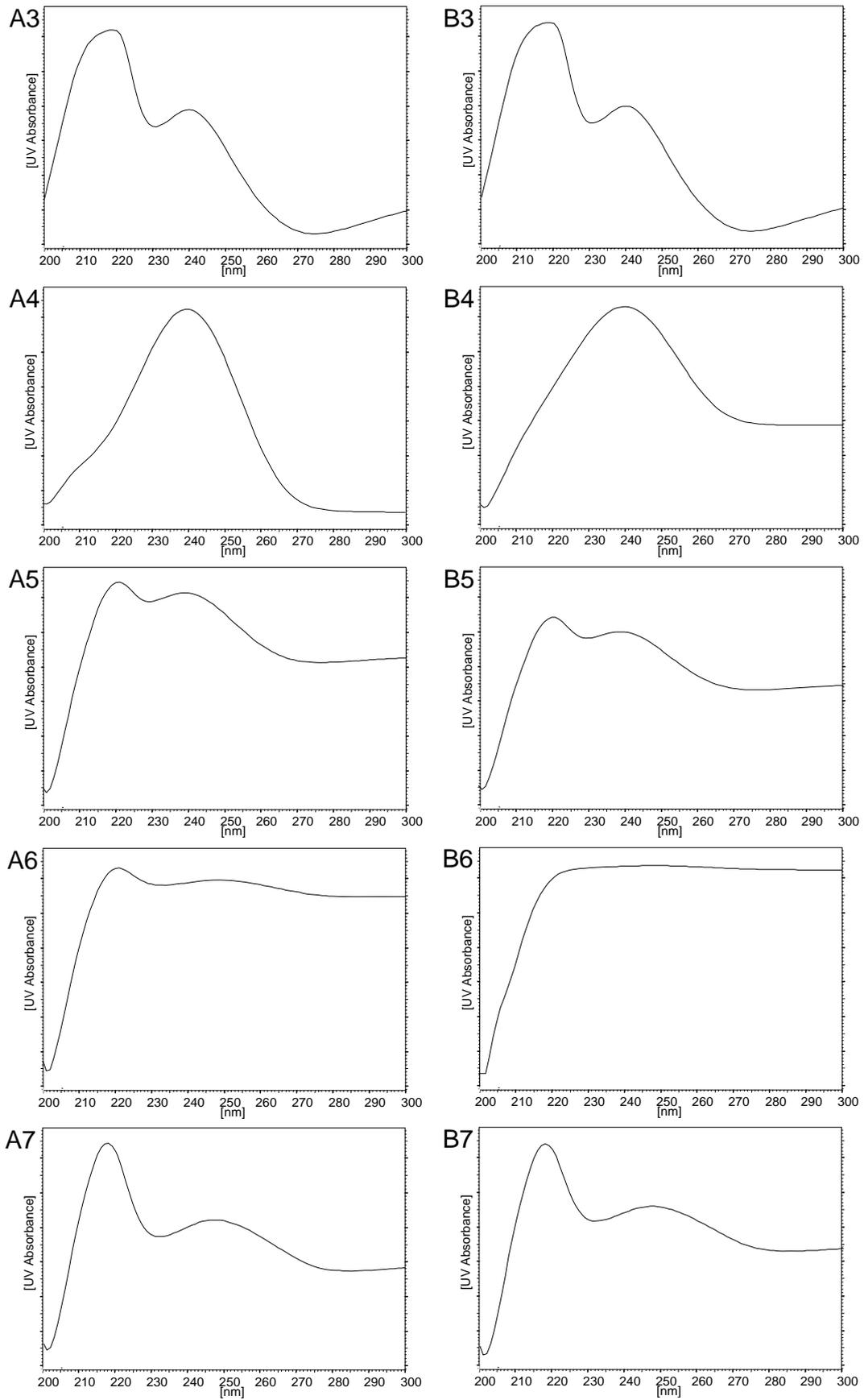


Abbildung 4.52: UV-Spektren zu Abbildung 4.51

#### 4.4.2.2 Derivatisierung mit 1-Naphthylisocyanat

McEntyre et al. [70] konnten den einwertigen Alkohol Cholin mit dem Fluoreszenz-Marker 1-Naphthylisocyanat in Acetonitril bei Raumtemperatur umsetzen. Bei seinen Versuchen ging er von wässrigen Proben aus, die in geringem Volumen mit Acetonitril vermischt wurden und entfernte anschließend den wässrigen Anteil durch ein Trockenmittel. Auf diese Weise konnte eine Reaktion mit dem hygroskopischen 1-Naphthylisocyanat erreicht werden. Der Überschuss von 1-Naphthylisocyanat wurde durch Zugabe von Wasser in Form des daraus resultierenden Niederschlags entfernt.

Im Folgenden wird versucht, nach McEntyre et al. [70] 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 1-Naphthylisocyanat zu derivatisieren.

Anfangs wurden die Messungen mittels HPLC-DAD in ausreichender Konzentration durchgeführt. Auf diese Weise ist der Vergleich von UV-Spektren sowie eine genaue Bestimmung der Extinktion und Emission der entstandenen Fluoreszenz-Derivate für die spätere Fluoreszenz-Chromatographie gegeben.

#### Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril

3-(3''-Picolyl)thymidin wurde in Acetonitril bei 80 °C mit 1-Naphthylisocyanat 1 h lang inkubiert (A). Der chromatographische Vergleich mit einer ebenso behandelten 1-Naphthylisocyanat-Lösung (B) und einem 3-(3''-Picolyl)thymidin-Standard (C) zeigt, dass unter diesen Bedingungen keine Reaktion stattgefunden hat. (Abbildung 4.53, Seite 113)

#### Derivatisierung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril in Anwesenheit von Pyridin bzw. Triethylamin

3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril wurde in Anwesenheit von Pyridin mit 1-Naphthylisocyanat 1 h lang auf 80 °C (A) erhitzt und das resultierende Chromatogramm mit den Chromatogrammen einer ebenso behandelten Lösung von 1-Naphthylisocyanat mit Pyridin (B) sowie einem 3-(3''-Picolyl)thymidin Standard (C) verglichen. Chromatogramm A zeigt zwei neue Signale A3 und A4. Zur Retentionszeit von 3-(3''-Picolyl)thymidin (C1) ist kein Signal mehr vorhanden. Folglich wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin vollständig zu zwei unbekanntem Produkten umgesetzt, die später als 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin identifiziert werden konnten. (Abbildung 4.54, Seite 114)

In Abbildung 4.55 und 4.56 (Seite 115 und 116) wird die Umsetzung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Anwesenheit von Triethylamin 1 h lang bei 80 °C (C) mit der Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Anwesenheit von Pyridin mit 1-Naphthylisocyanat 1 h lang bei 80 °C (A) sowie mit dem jeweiligen Leerwert (1-Naphthylisocyanat + Pyridin (B) bzw. 1-Naphthylisocyanat + Triethylamin (D)) verglichen.

Auch hier entstehen die bei der Reaktion in Anwesenheit von Pyridin erhaltenen zwei unbekanntenen Produkte A3/C3 und A4/C4. Bei der Reaktion in Anwesenheit von Triethylamin (C, Seite 115) wurde 3-(3''-Picolyl)thymidin im Vergleich zu der Reaktion in Anwesenheit von Pyridin (A, 115) nicht vollständig umgesetzt. In Chromatogramm A wird das Signal von 3-(3''-Picolyl)thymidin von dem Pyridin-Signal überdeckt (HPLC-System 9). Der vollständige Umsatz von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Anwesenheit von Pyridin ist in Chromatogramm A der vorherigen Abbildung 4.54 (Seite 114) ersichtlich (HPLC-System 8).

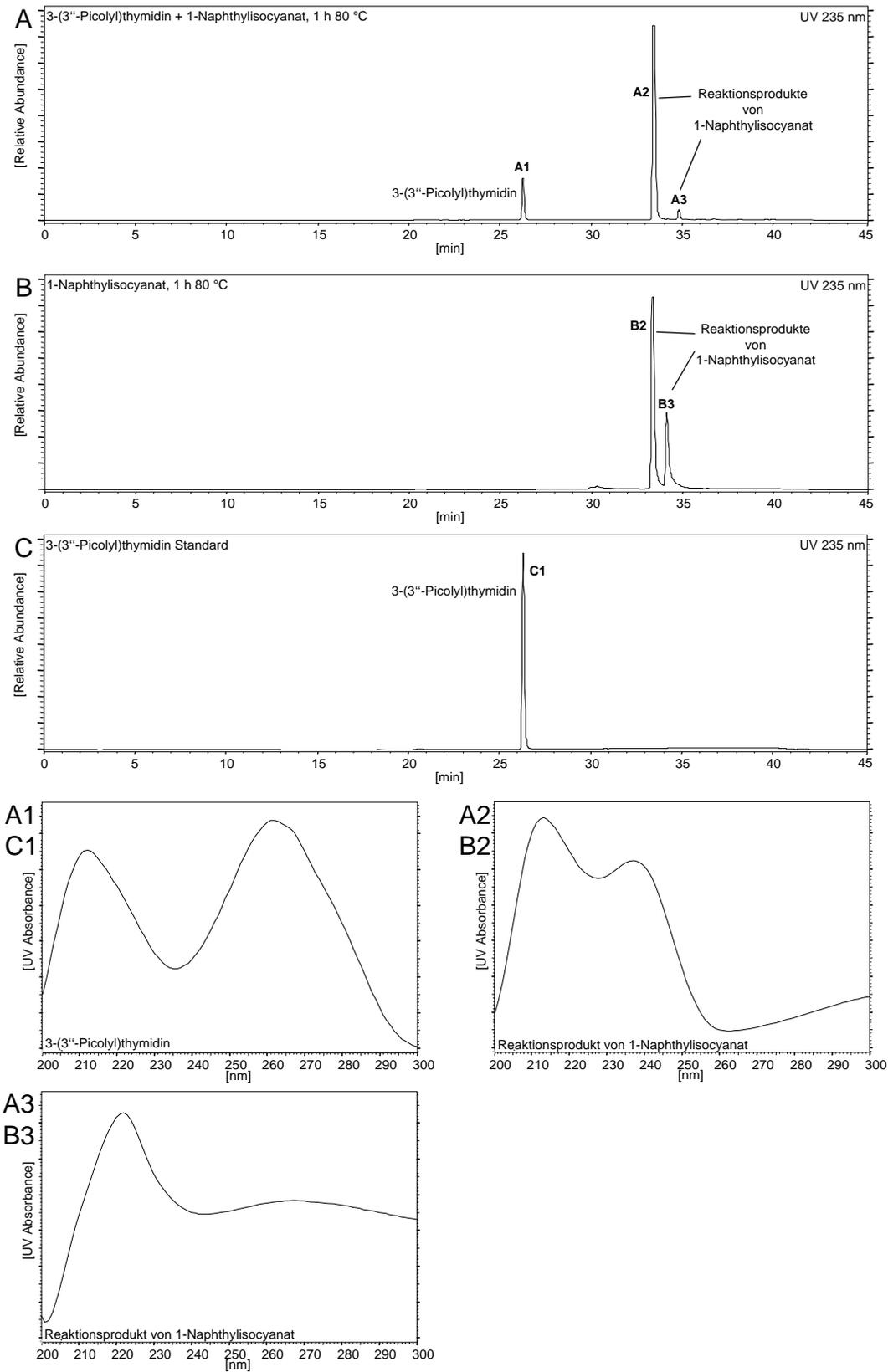
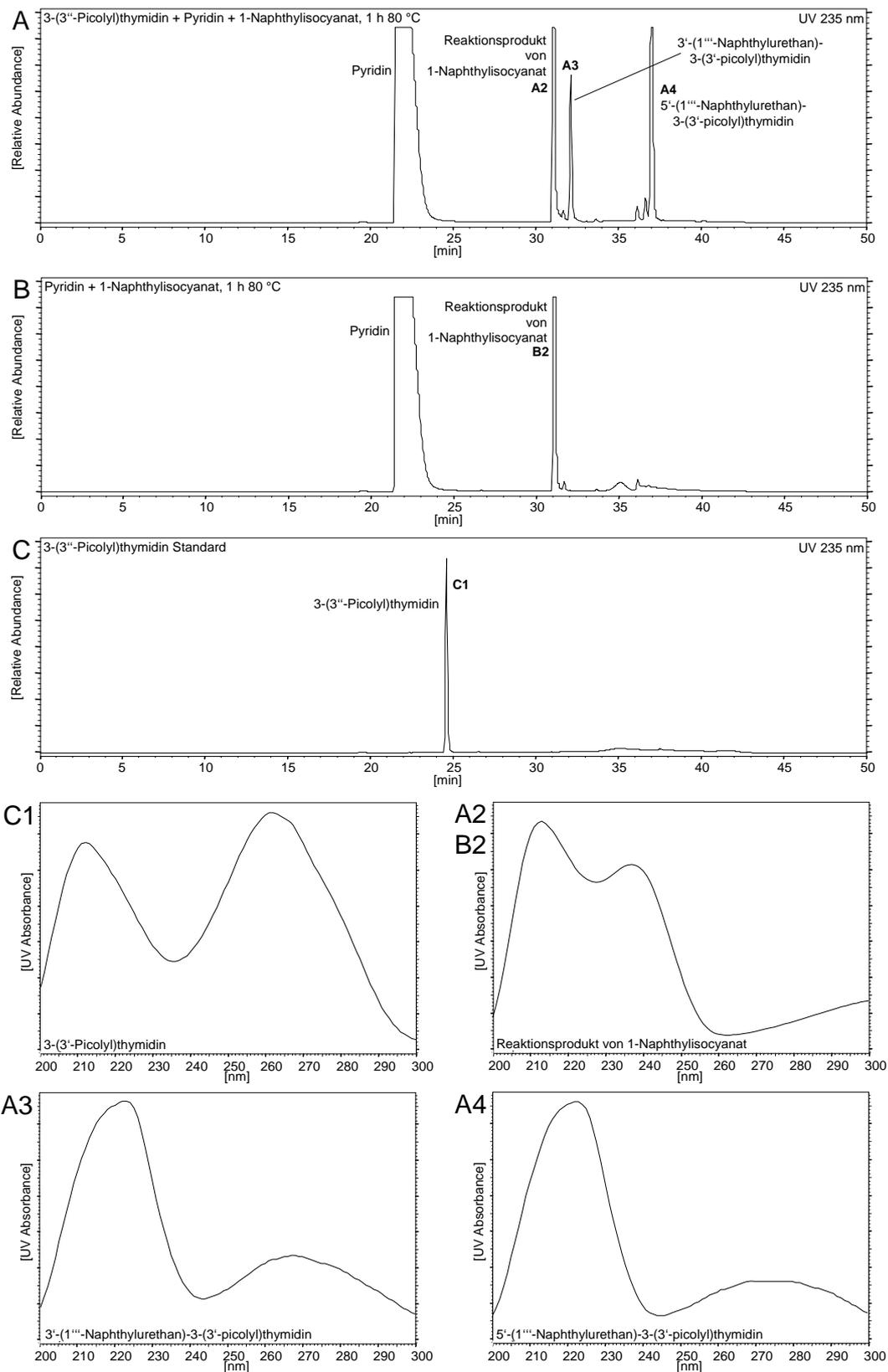
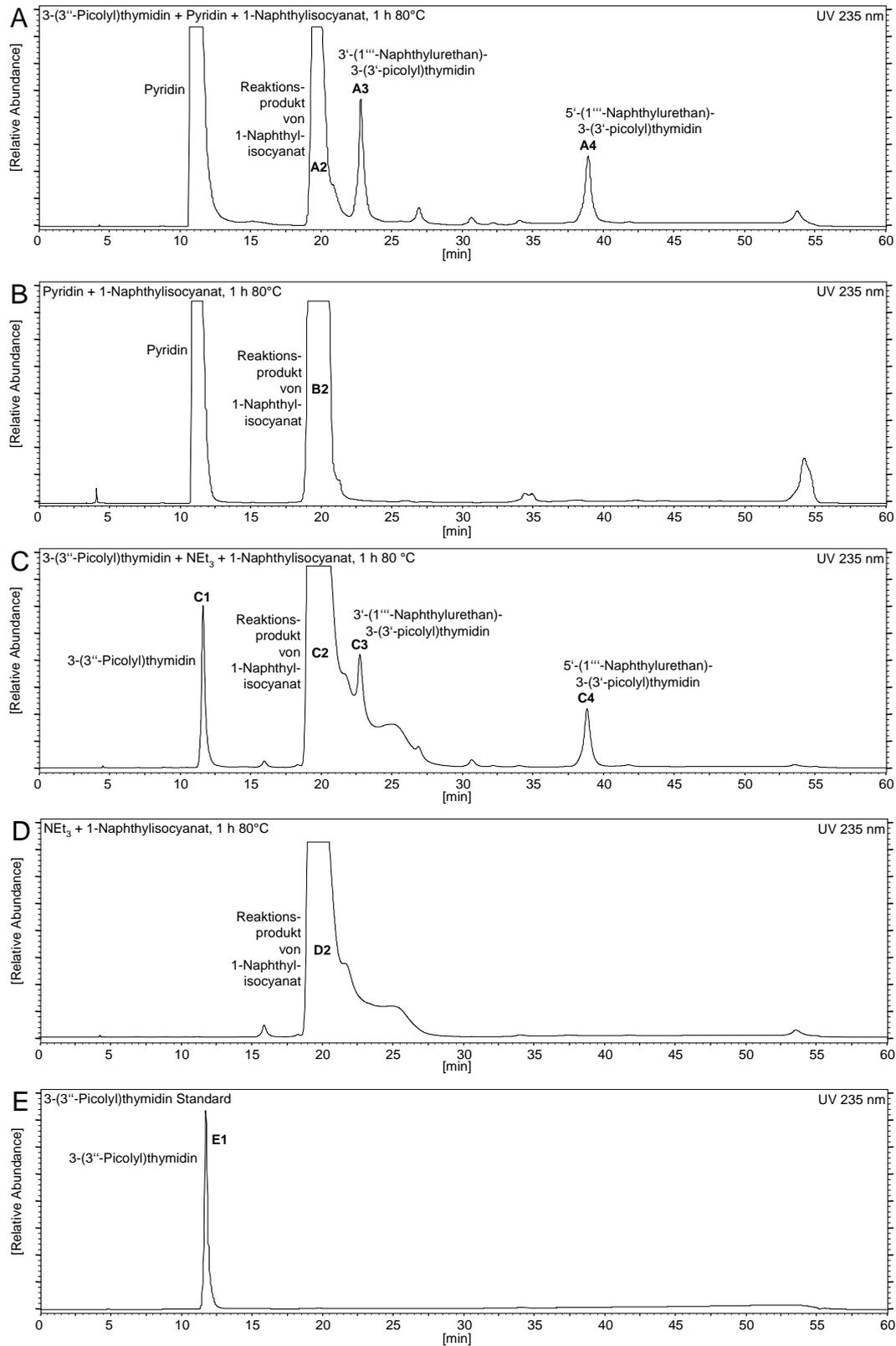


Abbildung 4.53: A: 3-(3''-Picolyl)thymidin + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C, B und C: Standards 1-Naphthylisocyanat und 3-(3''-Picolyl)thymidin, und UV-Spektren (HPLC-System 7)



**Abbildung 4.54:** A: 3-(3''-Picolyl)thymidin + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C, B: Pyridin + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C und C: 3-(3''-Picolyl)thymidin Standard, und UV-Spektren (HPLC-System 8)



**Abbildung 4.55:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C, **B:** Pyridin + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C, **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + *NEt*<sub>3</sub> + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C, **D:** *NEt*<sub>3</sub> + 1-Naphthylisocyanat 1 h 80 °C und **E:** 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 9)

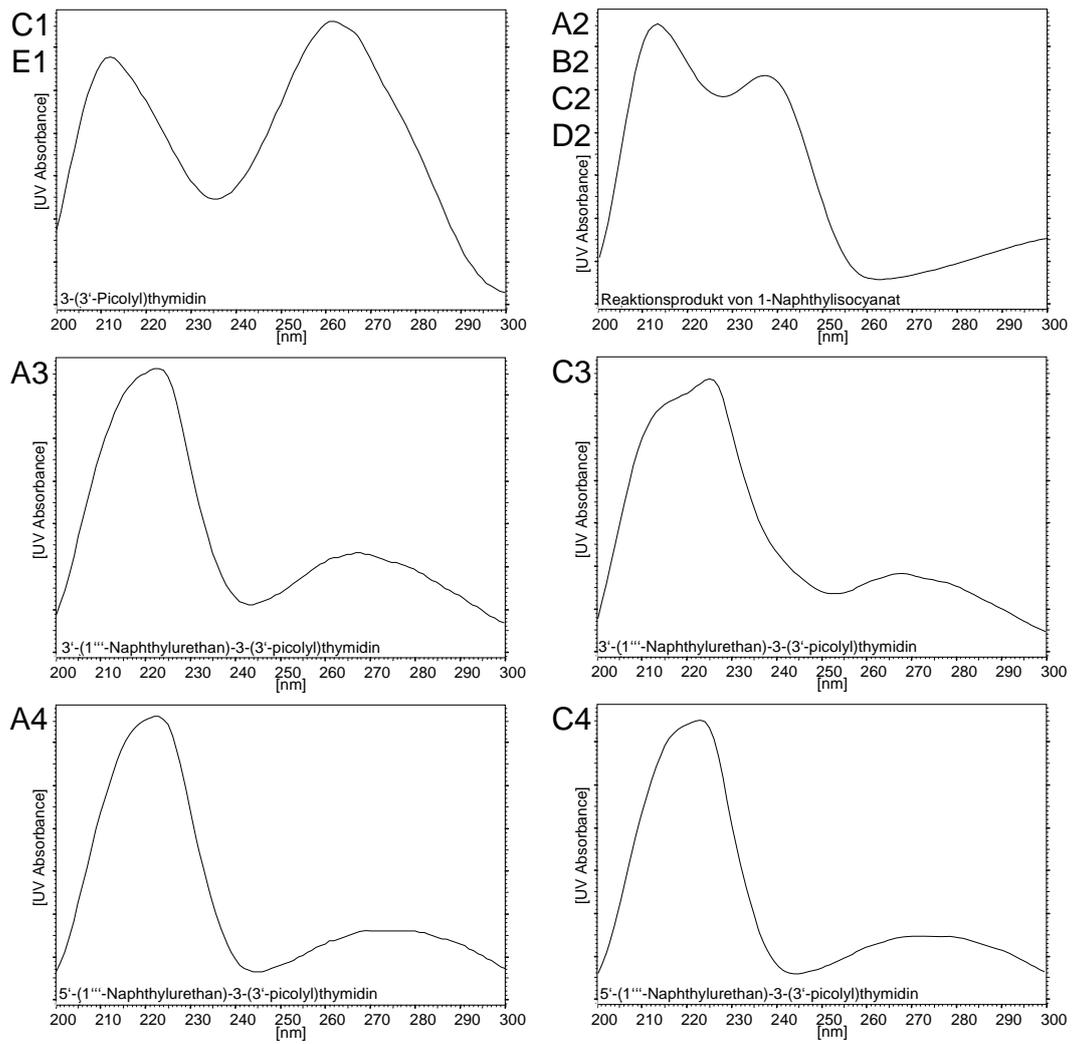


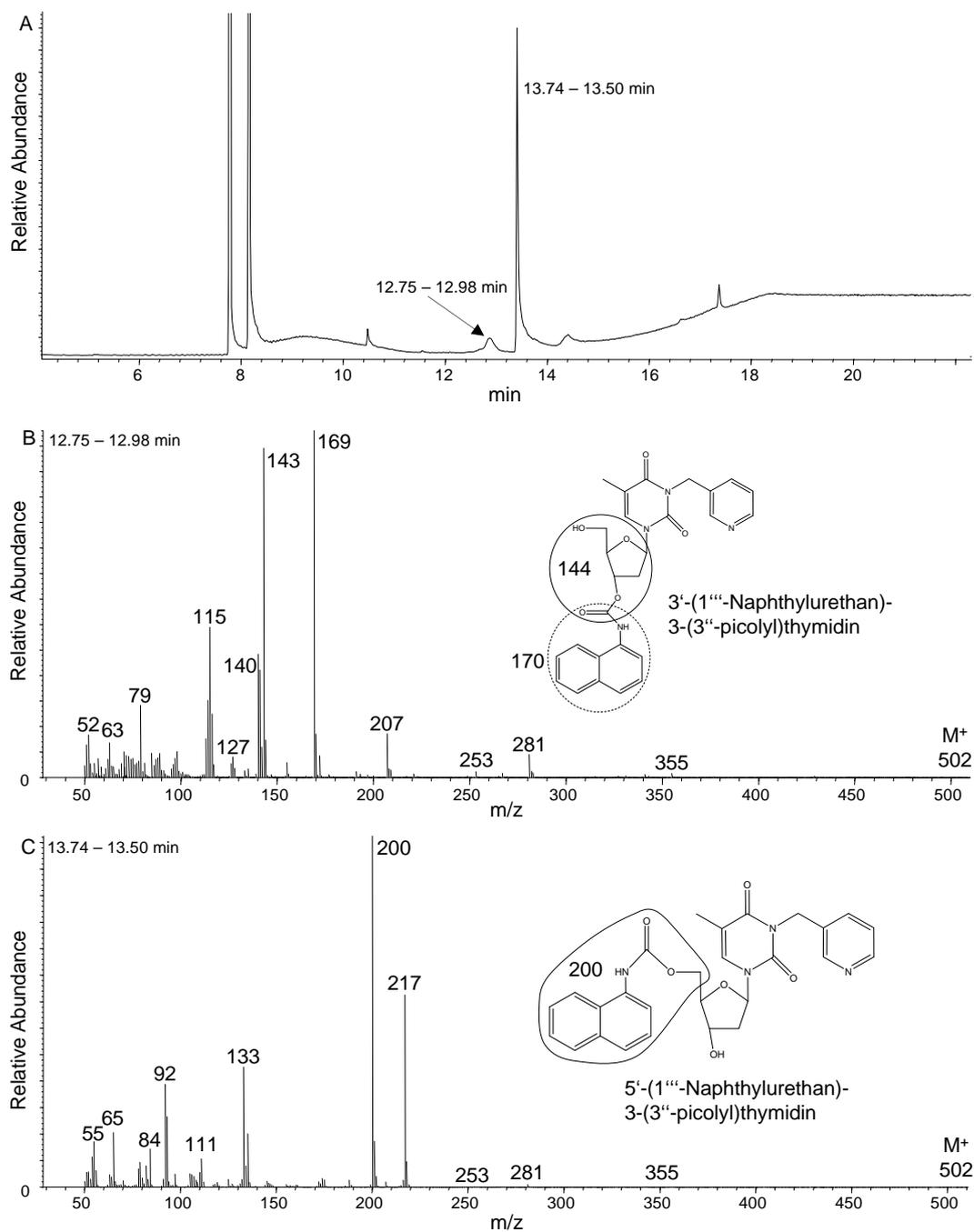
Abbildung 4.56: UV-Spektren zu Abbildung 4.55

Um die unbekanntenen Produkte zu identifizieren wurde eine Probe der Umsetzung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in wasserfreien Acetonitril mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin mittels GC/MS untersucht. Im resultierenden Chromatogramm (Abbildung 4.57, Seite 118) lassen sich zwei Signale den jeweils einfach derivatisierten 3-(3''-Picolyl)thymidin-Derivaten mit dem Molekülonen-Peak  $m/z$  502 zuordnen.

Das erste Signal zwischen 12.75 und 12.98 min zeigt ein EI-Massenspektrum (B) mit dem Molekülonen-Peak bei  $m/z$  502 und einen Basis-Peak bei  $m/z$  169. Der Basis-Peak bei  $m/z$  169 und ein weiterer Peak hoher Intensität bei  $m/z$  143 lässt auf zwei Fragmente schließen, die speziell auf die Bindung des Fluoreszenz-Markers an die 3'-Hydroxylgruppe des 2'-Desoxy-3-(3''-picolyl)thymidin hinweist (Abbildung 4.57, Seite 118).

Das EI-Massenspektrum C des Signals bei 13.74 bis 13.50 min besitzt einen Molekülonen-Peak bei  $m/z$  502 und einen Basis-Peak bei  $m/z$  200. Insbesondere der Basis-Peak bei  $m/z$  200 lässt sich zu einem Fragment zuordnen, das die Bildung des an 5'-Position derivatisierten 2'-Desoxy-3-(3''-Picolyl)thymidin beweist (Abbildung 4.57, Seite 118).

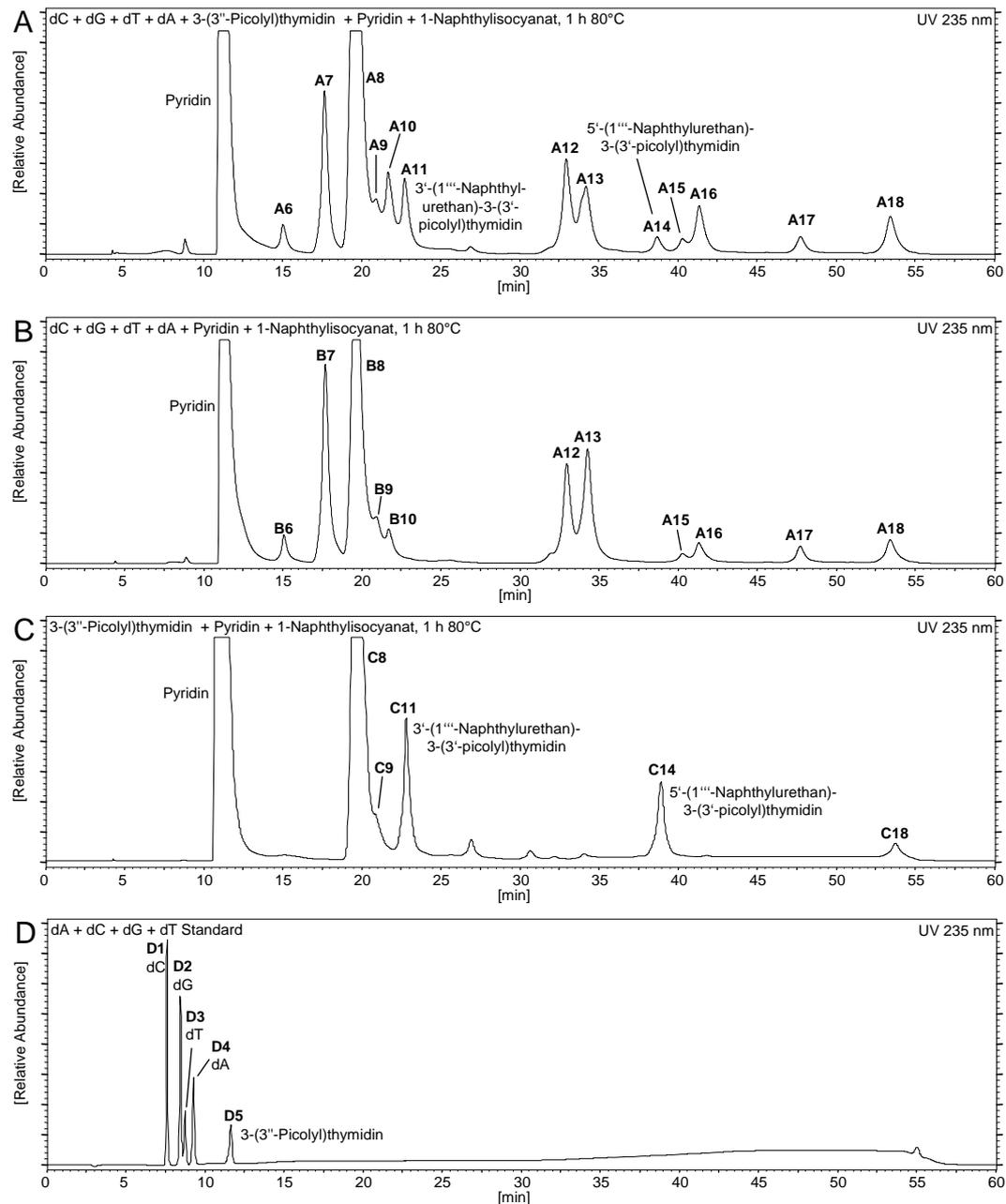
Hinweise auf ein zweifach derivatisiertes 3-(3''-Picolyl)thymidin mit  $m/z$  671 konnten bei der GC/MS-Analyse nicht gefunden werden.



**Abbildung 4.57:** GC-Chromatogramm (A) im Scan-Mode  $m/z$  50 bis 450 und 70 eV; MS-Spektrum: Durchschnitt 12.75 bis 12.98 min von 3'-Derivat des 2'-Desoxy-3-(3''-picolyl)thymidin (B) und Durchschnitt 13.74 bis 13.50 min von 5'-Derivat des 2'-Desoxy-3-(3''-Picolyl)thymidin (C)

**Derivatisierung eines Gemisches aus den DNA-Nukleosiden und 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril in Anwesenheit von Pyridin**

In Abbildung 4.58 (Seite 120) ist die Umsetzung einer Mischung aus 2'-Desoxycytidin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxythymidin (dT), 2'-Desoxyadenosin (dA) und 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin 1 h lang bei 80 °C in Chromatogramm A abgebildet. Ein co-chromatographischer Vergleich mit einer Mischung aus dC, dG, dT und dA (B) und einer 3-(3''-Picolyl)thymidin-Lösung (C), die jeweils in Acetonitril mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin 1 h lang bei 80 °C inkubiert wurden, sowie einem dC, dG, dT und dA-Standard (D), zeigt, dass in Chromatogramm A und B alle Nukleoside (D1,D2,D3,D4) vollständig umgesetzt wurden. In Chromatogramm A sind außerdem 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin (A11/C11) und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin (A14/C14) entstanden, die im Wesentlichen nicht von anderen Derivatisierungs-Produkten überlagert werden (ersichtlich aus dem Vergleich mit Chromatogramm B). Die Derivatisierungs-Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin wird also nicht durch Anwesenheit von Nukleosiden gestört.



**Abbildung 4.58:** **A:** dC + dG + dT + dA + 3-(3''-Picoly)thymidin + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C, **B:** dC + dG + dT + dA + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C, **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C, **D:** dC + dG + dT + dA + 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 9)

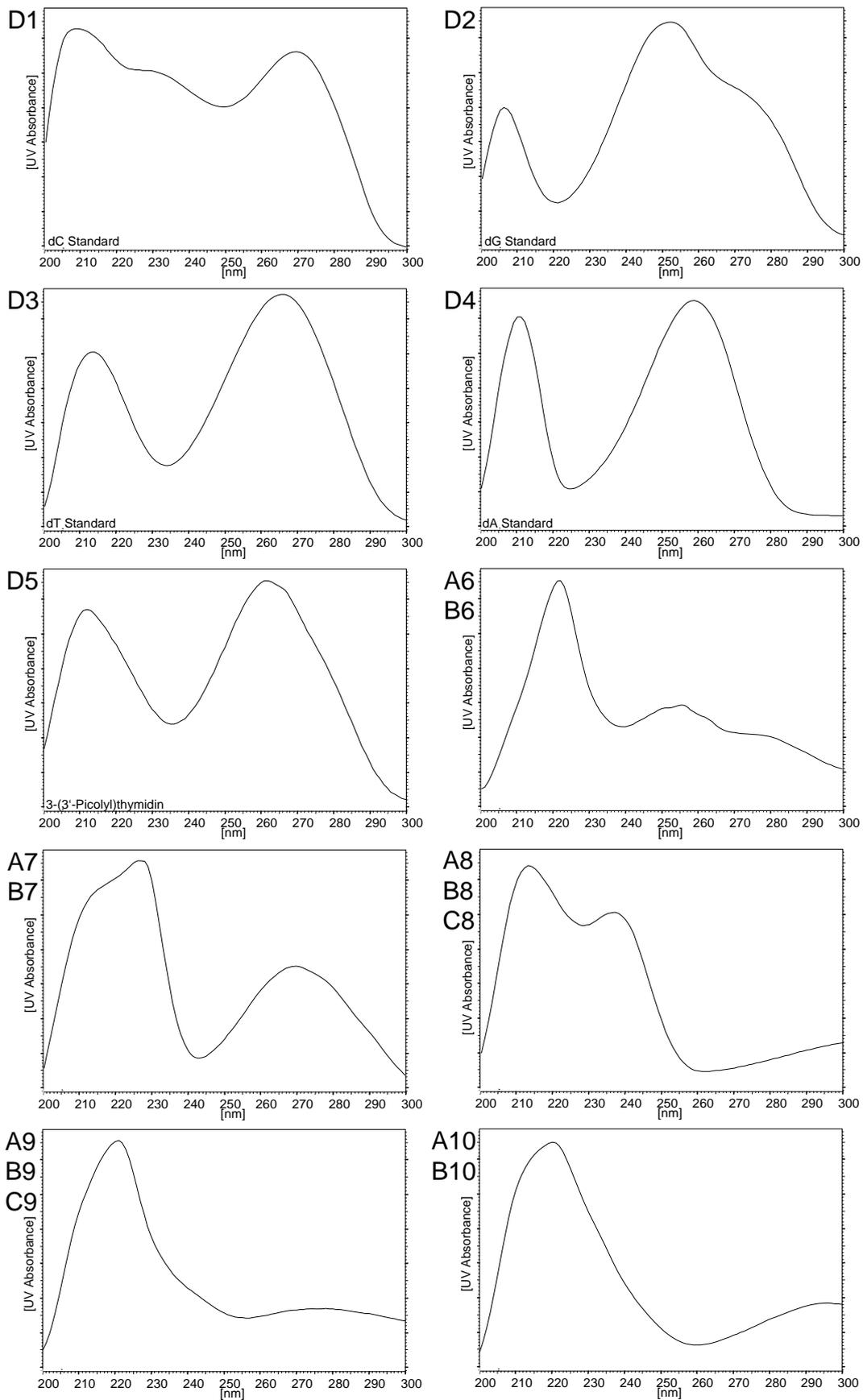


Abbildung 4.59: UV-Spektren zu Abbildung 4.58

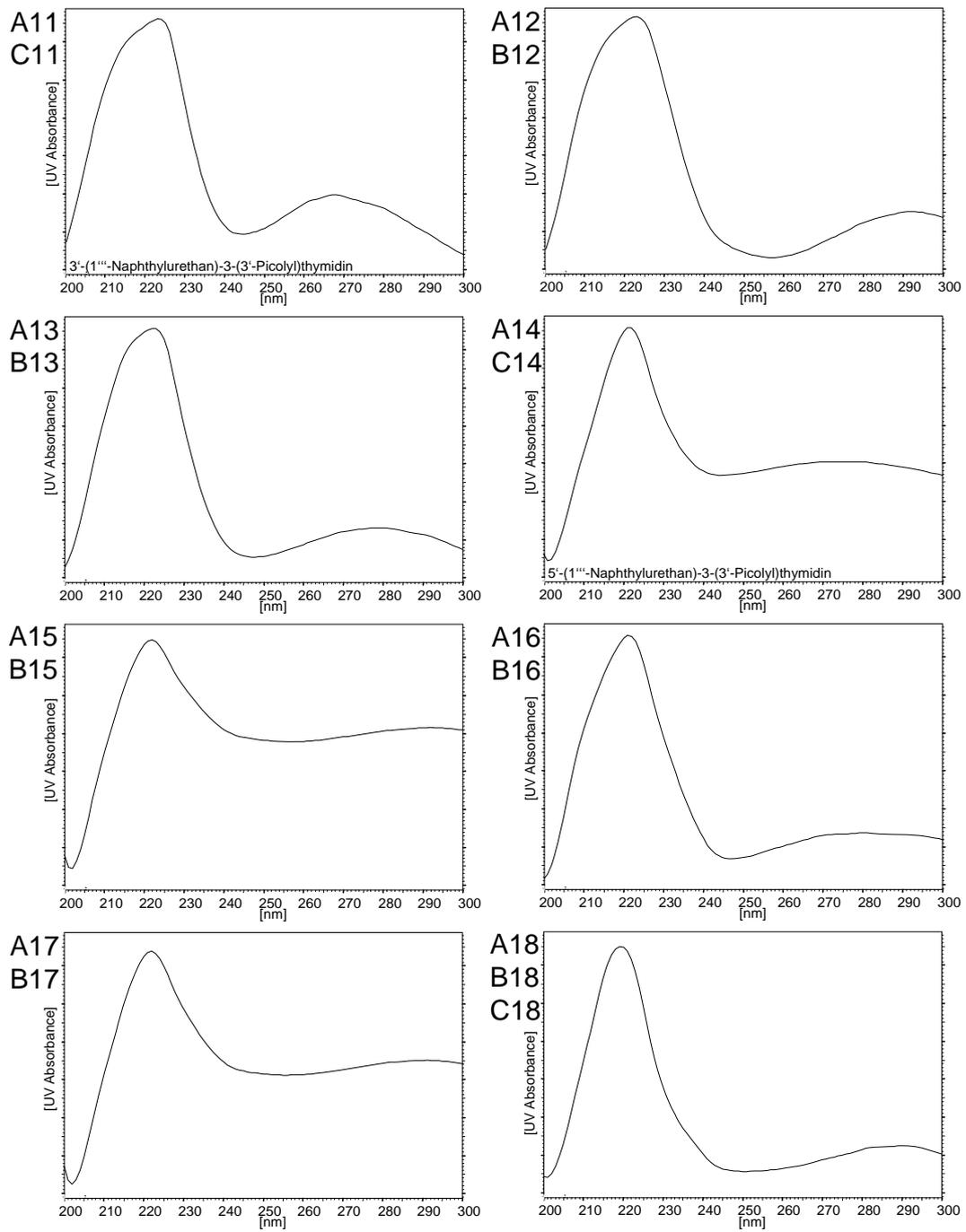
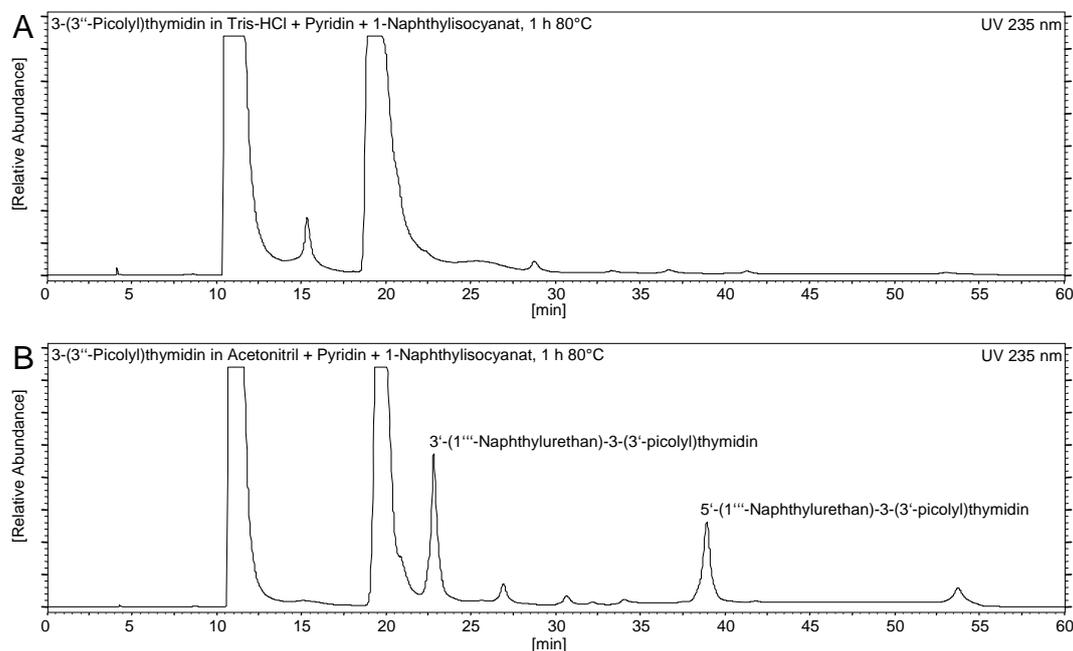


Abbildung 4.60: UV-Spektren zu Abbildung 4.58

**Derivatisierung von 3-(3''-Picoly)thymidin in Tris-HCl-Puffer in Anwesenheit von Pyridin**

Die aus Humanlebergewebe gewonnene DNA liegt nach der Aufarbeitung im Elutions-Puffer D vor. Laut Hersteller besteht der Elutions-Puffer D aus EDTA und Tris-HCl-Puffer. Die anschließende enzymatische Hydrolyse der DNA findet in Tris-HCl /  $MgCl_2$ -Puffer statt. Deshalb muss für die Versuche mit dem synthetisierten DNA-Addukt-Standard 3-(3''-Picoly)thymidin von einer Mischung der oben erwähnten Puffer ausgegangen werden.

Im Folgenden wird 3-(3''-Picoly)thymidin zunächst in Tris-HCl-Puffer gelöst und so die im vorherigen Versuch erfolgreiche Derivatisierung mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin 1 h lang bei 80 °C durchgeführt. Die Messung der Probe (A) mittels HPLC-System 9 im Vergleich zu der Umsetzung von 3-(3''-Picoly)thymidin in Acetonitril mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin (B) ergab, dass keine Umsetzung zu den Fluoreszenz-Derivaten 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin mehr stattfindet. (Abbildung 4.61) Außerdem ist am Ende des Versuchs nach der Zugabe von Wasser ein zäher Niederschlag zu beobachten. Der Tris-HCl-Puffer scheint also die Reaktion stark zu beeinflussen.

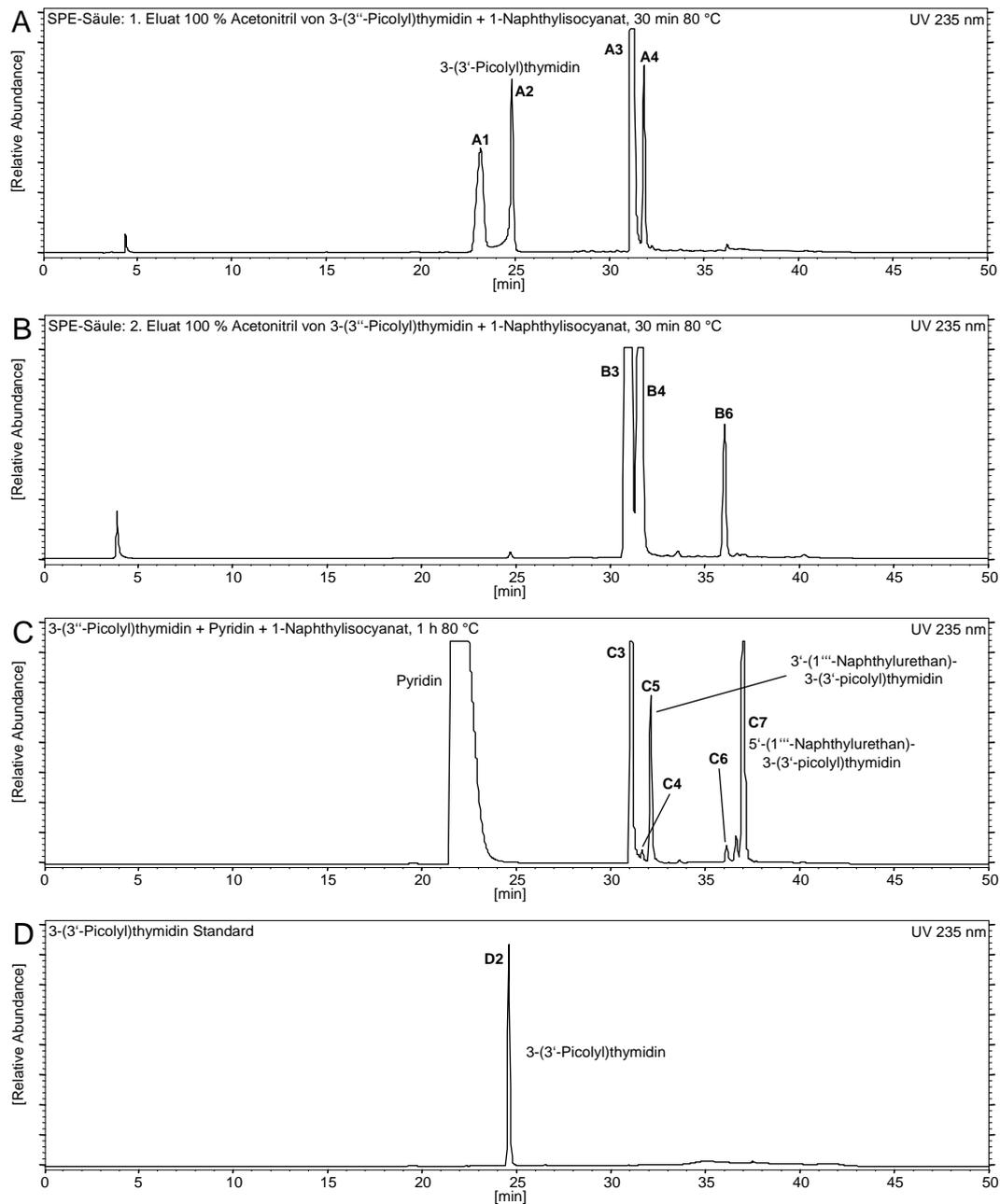


**Abbildung 4.61:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin in Tris-HCl + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C, **B:** 3-(3''-Picoly)thymidin in Acetonitril + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C (HPLC-System 9)

### Derivatisierungsversuche von 3-(3''-Picolyl)thymidin in $H_2O$ auf der SPE-Säule

Zur Derivatisierung auf der SPE-Säulen-Phase wurde versucht 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 1-Naphthylisocyanat bei 80 °C umzusetzen (Kapitel 3.4.2.2, Seite 42). In Abbildung 4.62 (Seite 125) sind die Chromatogramme der Eluate (A, B) sowie der Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 1-Naphthylisocyanat in Anwesenheit von Pyridin (C) und des 3-(3''-Picolyl)thymidin Standards (D) abgebildet:

Chromatogramm A und B zeigt im Vergleich zu der erfolgreichen Umsetzung von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Chromatogramm C und dem 3-(3''-Picolyl)thymidin Standard (D), dass bei der ersten und zweiten Elution mit Acetonitril nur 3-(3''-Picolyl)thymidin und die bekannten Signale von 1-Naphthylisocyanat detektiert wurden. Eine Umsetzung zu den bekannten Fluoreszenz-Derivaten 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin (C5) und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin (C7) sowie zu anderen Produkten wurde nicht gefunden.



**Abbildung 4.62:** **A:** SPE-Säule: 1. Eluat 100 % Acetonitril von 3-(3''-Picoly)thymidin + 1-Naphthylisocyanat, 30 min 80 °C, **B:** SPE-Säule: 2. Eluat 100 % Acetonitril von 3-(3''-Picoly)thymidin + 1-Naphthylisocyanat, 30 min 80 °C, **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin + Pyridin + 1-Naphthylisocyanat, 1 h 80 °C und **D:** 3-(3''-Picoly)thymidin Standard (HPLC-System 8)

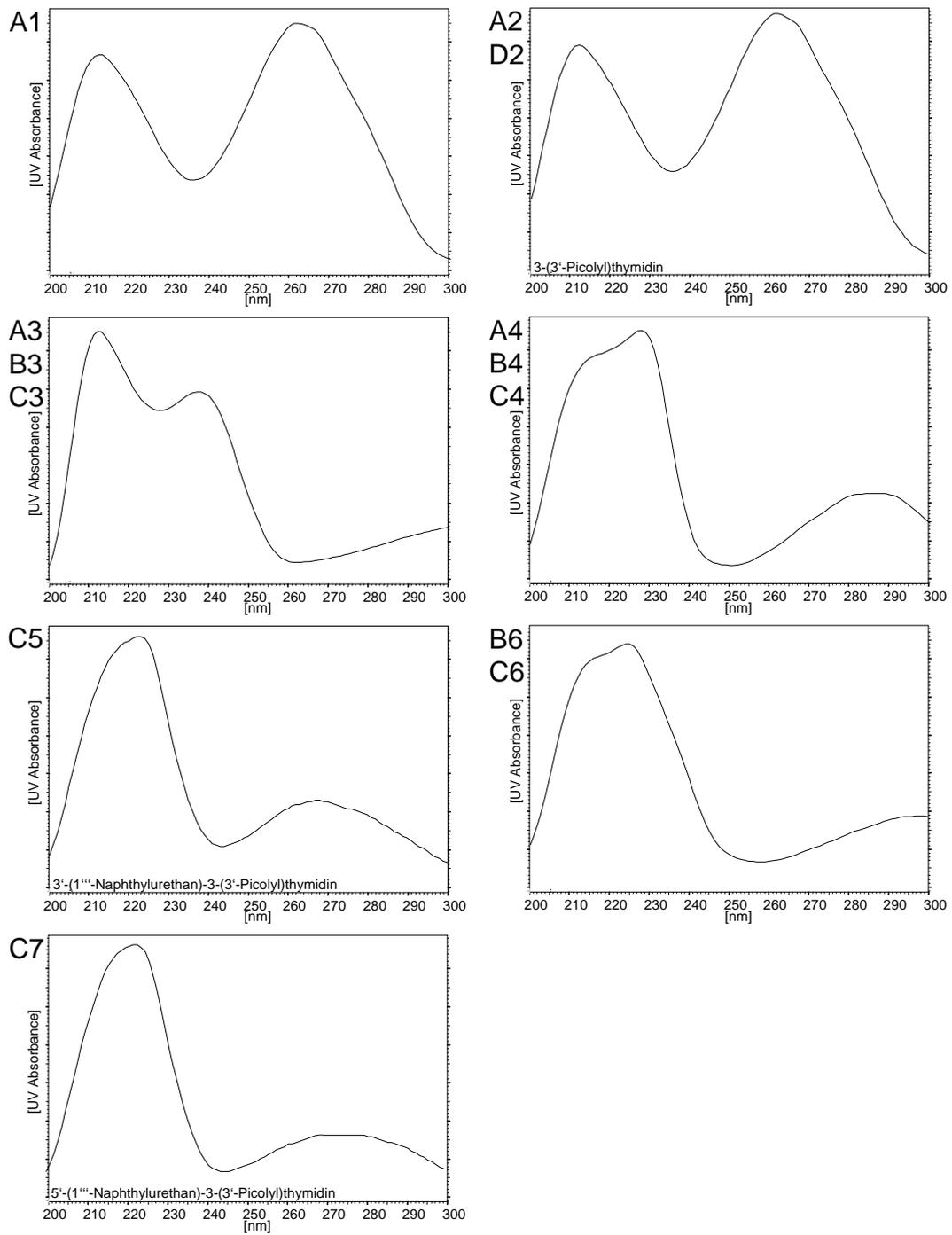


Abbildung 4.63: UV-Spektren zu Abbildung 4.62

**Fluoreszenz-Chromatographie von 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin**

Für die Fluoreszenz-Chromatographie wurden einige Läufe der beiden Fluoreszenz-Derivate fraktioniert gesammelt und das Extinktions- und Emissionsmaximum im Fluoreszenzspektrometer ermittelt. Für 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin konnte ein Extinktionsmaximum bei 283 nm und Emissionsmaximum bei 357 nm erfasst werden. Die Messung von 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin ergab ein Extinktionsmaximum bei 281 nm und ein Emissionsmaximum bei 363 nm. Um beide Derivate zu erfassen, wurde zur Fluoreszenz-HPLC-Messung die Extinktion auf 282 nm und Emission auf 360 nm eingestellt.

Erste Fluoreszenz-HPLC-Messungen ergaben, dass die gewünschte Empfindlichkeit im Vergleich zu den HPLC-DAD-Messungen nicht erreicht werden konnte.

**Zusammenfassung**

In Anwesenheit von Pyridin konnte 3-(3''-Picolyl)thymidin in Acetonitril vollständig mit 1-Naphthylisocyanat zu 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin umgesetzt werden. Die Anwesenheit anderer Nukleoside scheint die Reaktion nicht zu stören, im Wesentlichen konnte auch keine Überlagerung von Derivatisierungsprodukten anderer Nukleoside festgestellt werden. Liegt 3-(3''-Picolyl)thymidin allerdings in Tris-HCl-Puffer vor ist eine Derivatisierung unter den verwendeten Bedingungen mit 1-Naphthylisocyanat nicht mehr möglich. Eine Derivatisierung auf der SPE-Säulen-Phase führte zu keiner Reaktion. Die ersten Fluoreszenz-HPLC-Messungen von 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin ergaben keine wesentliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber einer DAD-Detektion.

#### 4.4.2.3 Derivatisierung mit 2-Naphthoylchlorid

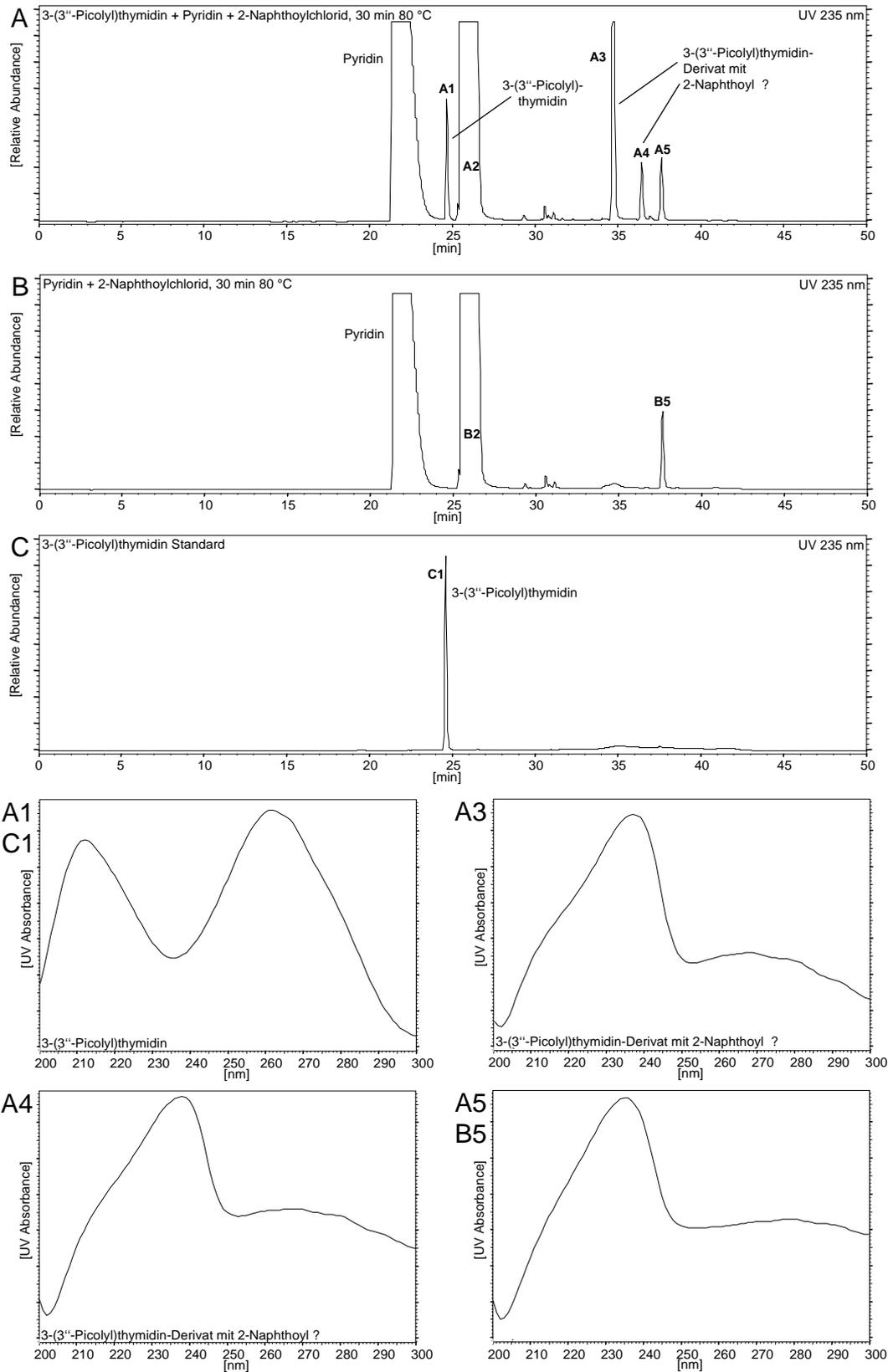
Nach Zanette et al. [71], die aliphatische Alkoholpolyethoxylate und Polyethylenglycole mit u.a. 2-Naphthoylchlorid fluoreszenz-derivatisierten wird im folgenden 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 2-Naphthoylchlorid in Anwesenheit von Pyridin umgesetzt. In Abbildung 4.64 (Seite 129) sind die Chromatogramme der Reaktion von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 2-Naphthoylchlorid in Anwesenheit von Pyridin (30 min bei 80 °C) (A) und des Leerwerts (2-Naphthoylchlorid in Anwesenheit von Pyridin, 30 min bei 80 °C) (B) gegenübergestellt. So sind in Chromatogramm A zwei neue Signale A3 und A4 detektiert worden. Ein Vergleich mit dem 3-(3''-Picolyl)thymidin-Standard in Chromatogramm C zeigt, dass 3-(3''-Picolyl)thymidin nicht vollständig umgesetzt wurde.

Zur Identifizierung der neuen Signale wurde eine Probe der Umsetzung von 3-(3''-Picolyl)thymidin mit 2-Naphthoylchlorid in Anwesenheit von Pyridin durch eine SPE-Säule angereichert und mittels GC/MS analysiert. In Abbildung 4.65 (Seite 130) sind das GC-Chromatogramm und die dazugehörigen EI-Massenspektren dargestellt:

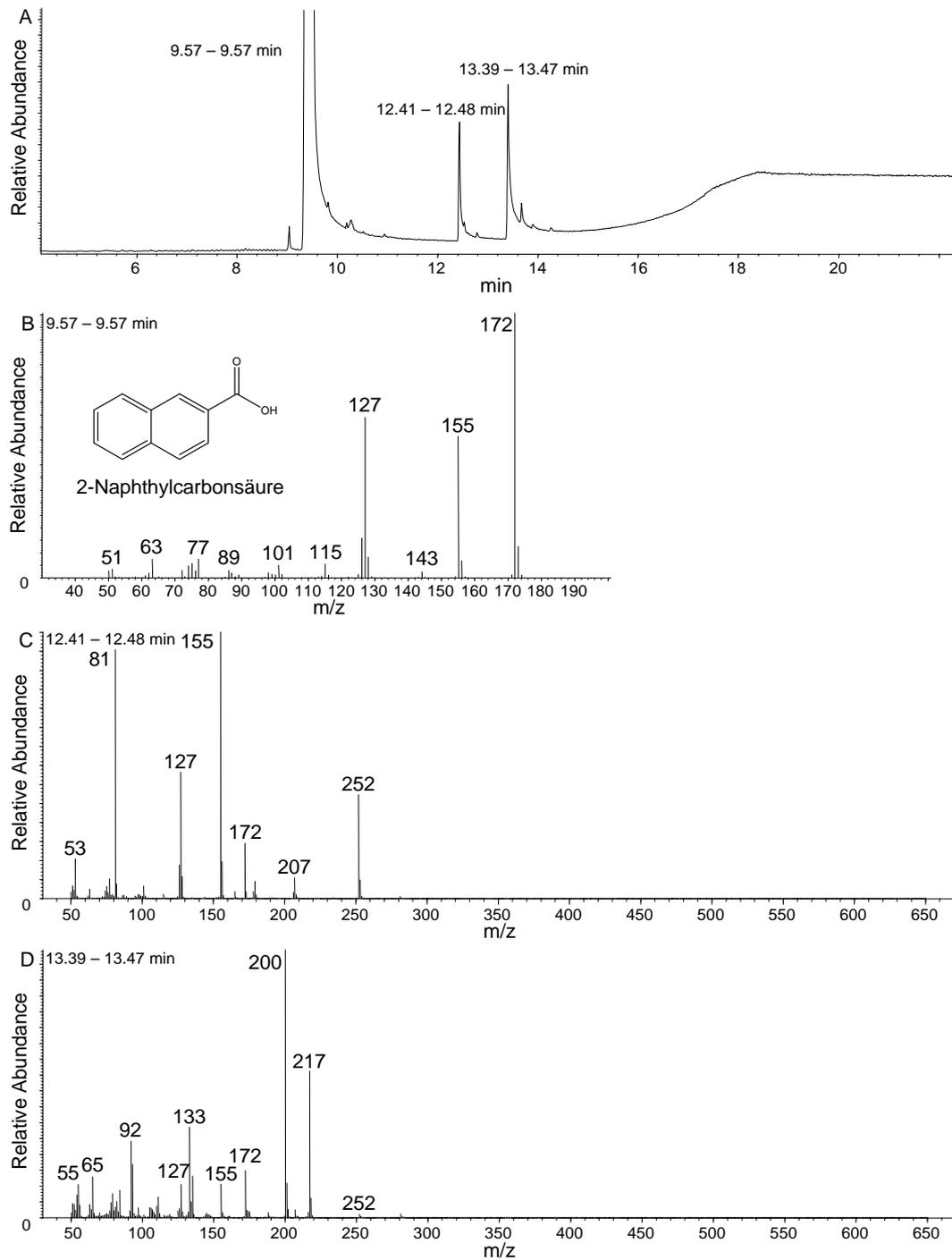
Das erste Signal zwischen 9.57 bis 9.57 min entspricht der durch Reaktion von 2-Naphthoylchlorid mit Wasser entstandenen 2-Naphthylcarbonsäure. Das zugehörige EI-Massenspektrum (B) (Molekülionen- und Basis-Peak bei  $m/z$  172) stimmt mit einem Referenz-Massenspektrum [72] überein. Die Signale bei 12.41 bis 12.48 min und 13.39 bis 13.47 min sind zwei möglichen 3-(3''-Picolyl)thymidin-Fluoreszenz-Derivaten zuzuordnen. Bei 12.41 bis 12.48 min erhält man ein EI-Massenspektrum (C) mit einem Basis-Peak bei  $m/z$  155, bei 13.39 bis 13.47 min ein EI-Massenspektrum (D) mit einem Basis-Peak bei  $m/z$  200. Ein Molekülionen-Peak für das denkbare, zweifach derivatisierte 3-(3''-Picolyl)thymidin-Fluoreszenz-Derivat ( $m/z$  641) und für die beiden potentiellen, einfach derivatisierten 3-(3''-Picolyl)thymidin-Fluoreszenz-Derivate ( $m/z$  487), konnte in beiden Massenspektren nicht gefunden werden. Außerdem konnten keine Fragmente, die eine Derivatisierung an der 3'-OH- bzw. 5'-OH-Position des 2'-Desoxyribose-Rings von 3-(3''-Picolyl)thymidin beweisen, zugeordnet werden. Im Vergleich zu dem EI-Massenspektrum von 2-Naphthylcarbonsäure hingegen weisen einige 2-Naphthoyl-Fragmente ( $m/z$  172, 155, 127) darauf hin, dass in den untersuchten Verbindungen 2-Naphthoyl enthalten war.

#### Zusammenfassung

3-(3''-Picolyl)thymidin lässt sich mit 2-Naphthoylchlorid derivatisieren. Allerdings findet kein vollständiger Umsatz statt. Die beiden entstandenen 3-(3''-Picolyl)thymidin-Fluoreszenz-Derivate konnten bis auf Weiteres nicht identifiziert werden.



**Abbildung 4.64:** **A:** 3-(3''-Picoly)thymidin + Pyridin + 2-Naphthoylchlorid 30 min 80 °C, **B:** Pyridin + 2-Naphthoylchlorid 30 min 80 °C, **C:** 3-(3''-Picoly)thymidin Standard und UV-Spektren (HPLC-System 8)



**Abbildung 4.65:** GC-Chromatogramm (A) im Scan-Mode m/z 50 bis 450 und 70 eV; MS-Spektrum: Durchschnitt 9.57 bis 9.57 min von 2-Naphthoic acid (B), Durchschnitt 12.41 bis 12.48 min (C) und Durchschnitt 13.39 bis 13.47 min (D)

## 5. Diskussion

### 5.1 Peroxidierung von 3'-Hydroxymyosmin, 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und 3-Pyridylaldehyd

Die gefundenen Ergebnisse ermöglichen die Kenntnisse und Zusammenhänge des Myosmin-Metabolismus zu ergänzen. Die Bildung von Nikotinsäure aus 3'-Hydroxymyosmin in den beschriebenen Oxidationen würde die Entstehung einer oxidierten Spezies am Pyrrolidinring, ähnlich wie bei der Myosmin-Peroxidation beschrieben, voraussetzen. So entstehen 3-Pyridylelessigsäure und Nikotinsäure als Endprodukte. Da die Peroxidation von 3-Pyridylelessigsäure allein nicht zur Bildung von Nikotinsäure führte, könnte Nikotinsäure analog der Peroxidierung von Myosmin über 3-Pyridylmethanol entstehen. Das 3-Pyridylmethanol konnte nicht als Zwischenprodukt bei der Peroxidierung von 3'-Hydroxymyosmin nachgewiesen werden. (Oxidationsschema: Abbildung 4.9, Seite 57)

Das Entstehen der Nikotinsäure lässt sich des Weiteren durch Peroxidation des 3-Pyridylmethanols zeigen. Der Zerfall in zusätzliche polarere Stoffwechselprodukte ist anzunehmen, aber noch unklar und muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Eine Bildung von Nikotinsäure scheint also aus verschiedenen Metaboliten des Myosmins, wenn auch über mehrere Reaktionsstufen möglich zu sein. Welche Rolle Myosmin als Vorstufe oder als Nikotinsäure-Donator im menschlichen Organismus spielt ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht beantwortbar.

So wie bei Nikotin konnte bei Myosmin eine Aktivierung des Pyridinrings, welche u.U. einen vollständigen Abbau der Substanzen zur Folge hätte, noch nicht festgestellt werden. Es muss angeführt werden, dass die Oxygenierungen des N-1-Stick-

stoffatoms am Pyridinring und des N-1'-Stickstoffatoms am Pyrrolring, die in der Abfolge N-Oxide bilden würden, bei Nikotin, nicht aber bei Myosmin beobachtbar sind bzw. bei letzterem dies zu instabilen Oxiran-Derivaten führt [44]. Daraus kann gefolgert werden, dass bei der Aktivierungen der Substanz das N-1'-Stickstoffatom am Pyrrolidinring involviert sein muss. Wenn auch viele Vorgänge und Abläufe, insbesondere bei dem Metabolismus des Nikotins durch Cyp-450 Systeme erklärt werden können, müsste daher hier, was das Auftreten der Nikotinsäure anbelangt, eine Aktivierung der N-1'-Position des Pyrrolidinrings durch zusätzliche Oxidationssysteme berücksichtigt werden.

Die Imin-Gruppe im Myosmin-Molekül, welche die  $sp^2$ -Hybridisierung der C=N-Gruppe beinhaltet und für Peroxid-, Superperoxid- sowie ROS (reactive oxygen species)-Interaktionen prädestiniert ist, scheint diesen Reaktionsablauf zu begünstigen. Das aus der Oxiran-Bildung hervorgehende N-Oxid ist demnach nicht zu stabilisieren und bildet unter Öffnung und Abbau des Pyrrolrings die entsprechenden Metaboliten aus. Dieser Reaktionsweg ist sowohl im Rattenversuch als auch im *in vitro* Peroxidierungsversuch nachvollziehbar. Durch Cyp-450 Oxidationssysteme allein lässt sich die Generierung der Verbindungen 3-Pyridylelessigsäure, 3-Pyridylmethanol und HPB in einem Aktivierungsschritt offenbar nicht ausreichend erklären. Diese Enzyme oxidieren vorzugsweise die Kohlenstoffatome des Pyrrolrings und liefern relativ stabile hydroxylierte Verbindungen unter Erhalt des Pyrrolrings wie im Falle von Nikotin gezeigt werden konnte [73]. Lediglich das Auftreten von 3'-Hydroxymyosmin, welches in geringen Mengen im Tierversuch zu finden ist, lässt ein Myosmin-Derivat unter Erhalt des Pyrrolrings erkennen. Offenbar ist dieser Metabolit in Folge einer Cyp-450 Oxidation entstanden. Dies wäre ein Hinweis, dass in der Ratte sowohl Cyp-450 Oxidationen als auch Peroxidierungen im Verlauf der Myosmin-Metabolisierung auftreten können. In diesem Zusammenhang bietet sich an einer exakten Validierung des 3'-Hydroxymyosmins nachzugehen, da es einen spezifischen Metaboliten für das Alkaloid liefern könnte und damit als Biomarker für dessen Aufnahme, eventuell auch beim Menschen dienen kann. Damit würde sich eventuell die Möglichkeit ergeben durch Biomonitoring diese Substanz an Hand von Urinproben zu bestimmen und zwischen Nikotin und Myosminaufnahme z.B. bei Rauchern und Nichtrauchern eventuell besser unterscheiden zu können.

Im Gegensatz zu Myosmin benötigen die TSNAs NNK und NNN eine enzymatische Aktivierung und sind nach heutiger Kenntnis entweder auf die Methylierung der DNA oder die POB-DNA-Addukt-Bildung beschränkt [81, 52, 53, 54, 55, 56]. Aufgrund der bisherigen Kenntnislage könnten so identische POB-DNA-Addukte sowohl nach enzymatischer Aktivierung der TSNA als auch nach Aktivierung durch Nitrosierung bzw. Peroxidierung von Myosmin entstehen [42, 44]. Die bei der Peroxidierung von Myosmin zusätzlich gebildeten elektrophilen 3-Pyridylmethyl-Spe-

zies könnten in ähnlicher Weise 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte bilden und so ein kanzerogenes Potenzial entwickeln. 3-Pyridylmethyl steht nach bisheriger Kenntnis ausschließlich mit Myosmin als Ausgangssubstanz in Zusammenhang. Daher ermöglichen 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte eventuell neue Perspektiven um zwischen der Auswirkung von Tabak-Genuss und der Aufnahme von Myosmin über Lebensmittel bei Nicht- oder Passivrauchern zu unterscheiden. Wobei eine etwaige Überlagerung dieser Effekte diskutiert werden muss, weil Myosmin in Lebensmitteln und im Tabak vorkommt. So eignet sich eventuell das synthetisierte 3-(3''-Picolyl)thymidin als Addukt-Referenzstandard zum Nachweis bei einer geeigneten Analysenmethode aus Gewebeproben, welches im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

## 5.2 Synthese zweier möglicher 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukte

Die Addukt-Synthese mit einem 3-Pyridylmethanol-Derivat ist aus folgenden Gründen verständlich. Die Bildung des HPBs aus den beiden Pyridylpyrrolidinen Nikotin, über den TSNA-Weg und aus Myosmin, unter direkter Nitrosierung oder Peroxidierung ist einschlägig bekannt. So wurde beim Metabolismus von Nikotin durch den Mikroorganismus *Pseudomonas putida* Biotyp A als Abbauprodukt das HPB ebenso gefunden [74]. Das HPB könnte also offensichtlich durch andere exogene biologische Systeme z.B. bei bakteriellen Verunreinigungen von Tabakprodukten, bei deren Fermentierung, Lagerung und Verarbeitung, vor der Aufnahme von Nikotin gebildet werden. Der Abbauweg zum 3-Pyridylmethanol ist ausgehend von den Pyridylpyrrolidinen hingegen bisher nur für Myosmin beschrieben. Daher erschien es sinnvoll, im Rahmen der Myosmin-Aktivierung eine mögliche Addukt-Spezies über das 3-Pyridylmethyl-Derivat zu untersuchen.

Bei der Synthese von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion wurde von 3-Pyridylmethanol als Reaktant ausgegangen. Die verwendete Methode basiert auf einer Mitsunobu-Reaktion. Als eine Einstufige Reaktion mussten keine Zwischenprodukte isoliert werden. Das zweifach N-substituierte Thymin beweist, dass ein Angriff an beiden Aminogruppen des Thymins möglich ist. So findet auch bei der ebenfalls durchgeführten Synthese von 3-(3''-Picolyl)thymidin eine Addukt-Bildung an N-3-Position statt. Eine weitere einstufige Synthesemöglichkeit von 5-Methyl-1,3-bis-pyridin-3-ylmethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion wäre über einen halogenierten Reaktanten wie z.B. 3-Picolylchlorid, das auch bei der 3-(3''-Picolyl)thymidin-Synthese verwendet wurde gegeben [75]. In einer mehrstufigen Synthese ist es aber auch möglich nach Kocalka et al. [76] die OH-Gruppe von 3-Pyridylmethanol zur Bildung einer guten Abgangsgruppe zu mesylieren und dann mit einer Pyrimidin- oder Purinbase umzusetzen. Diese Alternative wäre allerdings abhängig von verschiedenen

Basen und Lösemitteln, wodurch man eine Mischung aus N- und O-Regioisomeren erhalten würde. Eine Addukt-Bildung an O-2 bzw. O-4 der Pyrimidin-Base wäre also denkbar. Da aber bei beiden durchgeführten Synthesen eindeutig jeweils nur ein 3-Pyridylmethyl-Addukt isoliert und charakterisiert werden konnte, scheint die Addukt-Bildung an N-3-Position wahrscheinlicher.

Beide gezeigten Synthesen konnten nur in organischen Lösemittel durchgeführt werden, wodurch eine Übertragung auf ein physiologisches System problematisch wäre. Dennoch gilt wie auch bei zahlreichen DNA-Addukten: Wenn eine elektrophile Spezies in situ in Anwesenheit von DNA gebildet wird, ist eine Addukt-Bildung möglich. Deshalb wird in den beiden nachfolgenden Abschnitten die Spaltung der Addukte, deren Nachweismöglichkeiten ohne Spaltung und die Grenzen der bisherigen Analysemethoden diskutiert.

### 5.3 Vorversuche zum Nachweis von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten in Gewebeproben

Die Freisetzung von HPB aus POB-DNA-Addukten wurde bereits mehrfach untersucht [50, 67, 68, 77, 78]. Die Methode besteht darin HPB als Folgeprodukt von POB, das durch saure Hydrolyse von der DNA abgespalten wird, zu erfassen. Dieses Vorgehen könnte u.U. auch auf Myosmin-abgeleitete Addukte übertragbar sein. Es wurde davon ausgegangen, dass u.U. 3-Pyridylmethanol von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten aus Gewebe isolierter DNA abgespalten werden kann. Zu bemerken ist allerdings, dass im Gegensatz zum POB-Addukt, bei dem meist eine O-Akloholat- oder Amid-Bindung vorliegt, im Fall des verwendeten 3-Pyridylmethyl-Addukt-Standards 3-(3''-Picolyl)thymidin eine Alkylbindung zu trennen wäre (siehe Abbildung 4.25, Seite 76).

Die durchgeführten sauren bzw. alkalischen Spaltungsversuche mit dem synthetisierten 3-Pyridylmethyl-Addukt-Standard 3-(3''-Picolyl)thymidin zeigten jedoch, dass Pyridylmethanol wenn überhaupt nur in geringen Mengen durch Inkubation mit  $HClO_4$  abgetrennt worden ist. Im Einzelnen konnte keine Abhängigkeit der Inkubationszeit sowie keine  $HClO_4$ -Konzentrationsabhängigkeit, aber ein Zusammenhang des Verhältnisses zwischen 3-(3''-Picolyl)thymidin und  $HClO_4$  festgestellt werden. Diese Tatsache könnte bei einer aus Gewebe extrahierten unbekanntem Addukt-Konzentration in der DNA-Probe die Anwendung stark beeinträchtigen. Des Weiteren entstanden bei der Spaltung entweder nur geringe Mengen an 3-Pyridylmethanol, oder 3-(3''-Picolyl)thymidin unterlag einem Zerfall in viele unbekannte Produkte, die weiter nicht verfolgt wurden. Einige Ergebnisse geben außerdem Anlass davon auszugehen, dass 3-Pyridylmethanol auch selbst zersetzt wird. Offenbar geschieht dies unter Spaltung des Pyridinrings, wodurch die dabei auftretenden Fragmente

mit HPLC-DAD nicht oder mit GC/MS nur sehr aufwendig zu bestimmen wären. Realistisch betrachtet ließe sich von einer aus Gewebe gewonnenen DNA-Probe, in der wahrscheinlich nur geringe Mengen an DNA-Addukt vorhanden ist, sehr wenig 3-Pyridylmethanol abspalten, wodurch die Nachweisbarkeit des 3-Pyridylmethanols an hohe analytische Voraussetzungen geknüpft ist.

Diese Ergebnisse erlauben generell die Methode der Addukt-Abspaltung insbesondere zur Abspaltung des 3-Pyridylmethanols von 3-(3''-Picolyl)thymidin als auch die Methode der HPB-freisetzenden-DNA-Addukte zu diskutieren. Da eine Abspaltung von POB mit der Ungewissheit bezüglich der Quantität behaftet sein kann, bedeutet das, bezugnehmend auf die Literatur der HPB-Abspaltung, dass auch hier, wenn überhaupt nur mit hohen Schwankungen und in einem Ausmaß unter 50 % eine Abspaltung bisher berichtet wurde. Wie die Arbeiten von Murphy et al. [79] und Carmella und Hecht [80] zeigten liegen die Spaltungsraten zwischen 17 – 40 % bzw. 10 – 15 % (20 % bei den Hämoglobin-Addukten – gemessen als Radioaktivität). Dies verdeutlicht, dass eine brauchbare Analytik in diesem Spurenbereich schwer zu bewerkstelligen ist, obwohl sicher daraus der Trend der Belastung von Rauchern und Nichtrauchern absehbar ist. Hingegen ist aber bei der geringen Belastung von Nichtrauchern und Passivrauchern eine Abschätzung aufgrund zu hoher Schwankungen schwieriger zu beurteilen. Es müsste also auf eine Messung der ungespaltenen POB- bzw. 3-Pyridylmethyl-Addukte abgezielt werden können, was aber nur mit einer LC/MS Methode zu bewältigen wäre. Dabei spielt die Empfindlichkeit dieser Gerätespezifikation nach heutiger Kenntnislage die entscheidende Rolle. So kann z.B. für die Messung einer POB-adduktierten DNA-Base eine Empfindlichkeit erreicht werden, die nur nach vorheriger Verabreichung sehr hoher Dosen von NNN und NNK an Ratten und Mäusen erfolgt [58, 59, 60]. Jedoch für Realproben seitens der NNN- und NNK-Aufnahme durch Belastung aus Tabak und Tabakrauch beim Menschen, reicht diese Empfindlichkeit noch nicht aus. Analoges dürfte auch für das 3-Pyridylmethyl-Addukten zu erwarten sein. In diesem Zusammenhang ist zusätzlich zu bemerken, dass die DNA, aber auch einige DNA-Addukte sehr stabil sein können. So könnte das untersuchte 3-(3''-Picolyl)thymidin aus eben diesen Gründen schwierig zu spalten sein.

## **5.4 Vorversuche zum Nachweis von 3-(3''-Picolyl)thymidin in Gewebeproben**

Die Spaltung durch saure bzw. alkalische Hydrolyse des Referenzstandards 3-(3''-Picolyl)thymidin war unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen nicht durchzuführen. Ein weiterer Zugang zur Analyse von 3-Pyridylmethyl-DNA-Addukten wäre durch den Nachweis von 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukten nach enzymatischer Hydrolyse von DNA aus Gewebeproben gegeben.

Da aktuell keine LC/MS-Analytik zu Verfügung steht, wurde versucht eine entsprechende Empfindlichkeit durch Fluoreszenzderivatisierung zu erreichen.

Das synthetisierte 3-(3''-Picolyl)thymidin stellt möglicherweise ein solches 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukte dar. Zur Fluoreszenzmarkierung sind die beiden Hydroxylgruppen des Riboserings gut geeignet.

Zur Gewinnung möglicher 3-Pyridylmethyl-Nukleosid-Addukte ist eine enzymatische Aufarbeitung der aus Gewebeproben isolierten DNA nötig. Nach Aufarbeitung der DNA aus Gewebeproben liegt diese im Elutions-Puffer D vor. Eine mögliche Beeinflussung der anschließenden enzymatischen Hydrolyse durch diesen Puffer konnte bei den durchgeführten Versuchen nicht festgestellt werden.

Eine Fluoreszenzderivatisierung des 3-(3''-Picolyl)thymidin mit Dansylchlorid findet scheinbar unter wässrigen Bedingungen nicht statt. Peng et al. [69] hingegen gelang die Derivatisierung von 8-Hydroxychinolin in THF mit NaOH als Base. Die OH-Gruppe des 8-Hydroxychinolins ist dabei allerdings direkt an einen Aromaten gebunden, was die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Derivatisierung des Alkohol-Derivats mit Dansylchlorid, welches normalerweise zur Derivatisierung von Aminen verwendet wird, zu sein scheint. Die beiden Hydroxylgruppen des 2'-Desoxyribose-Rings von 3-(3''-Picolyl)thymidin stehen hingegen nicht in Nachbarschaft zu einem aromatischen System. So kann ein Alkoholat, das nach Deprotonierung der jeweiligen OH-Gruppe nicht über einen zusätzlichen Mesomerie-Effekt stabilisiert werden, wodurch eine Reaktion mit Dansylchlorid erschwert wird. Des Weiteren zeigen laufende Versuche, dass auch keine Derivatisierung in organischen Lösemitteln stattfindet.

3-(3''-Picolyl)thymidin konnte mit 1-Naphthylisocyanat nur im Lösemittel Acetonitril mit Pyridin als Base fluoreszenzderivatisiert werden. Beide identifizierten Fluoreszenz-Derivate 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picolyl)thymidin sind auch neben anderen Derivatisierungsprodukten der Nukleoside mittels HPLC-Analyse trennbar. Probleme traten erst auf, als man von einer in Tris-HCl-Puffer gelösten 3-(3''-Picolyl)thymidin-Probe ausging. Der Tris-HCl-Puffer ist ein Bestandteil des Elutions-Puffers D und zur enzymatischen Hydrolyse verwendet worden. Dieser scheint mit 1-Naphthylisocyanat zu reagieren und sowohl die Probenaufarbeitung als auch die eigentliche Umsetzung wesentlich zu stören. Laufende Versuche des 3-(3''-Picolyl)thymidin auf SPE-Säulen zur Anreicherung und Entfernung des Tris-HCl- bzw. Elutions-Puffers D zeigen Probleme mit der Stabilität des 3-(3''-Picolyl)thymidin im Zusammenhang mit verschiedenen Elutionsmitteln u.a. Acetonitril und Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auf. Sicherlich gibt es andere Methoden zur Isolierung von DNA aus Gewebeproben bei denen die DNA mit Ethanol gefällt wird und daher anschließend nicht in EDTA- oder Tris-HCl-Puffer gelöst vorliegt [81, 82, 83]. Doch die gängi-

gen und etablierten Methoden zur Hydrolyse der DNA in deren Nucleoside werden enzymatisch im Tris-HCl-Puffer durchgeführt [84, 57, 53]. Bei weiteren Vorversuchen konnte auf einer SPE-Säulen-Phase angereichertes 3-(3''-Picoly)thymidin mit 1-Naphthylisocyanat nicht zur Reaktion gebracht werden. Erste Fluoreszenz-HPLC-Messungen der beiden identifizierten Fluoreszenzderivate 3'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin und 5'-(1'''-Naphthylurethan)-3-(3''-picoly)thymidin ließen außerdem keine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber einer DAD-Detektion feststellen. Scheinbar resultiert aus dem angeregten  $\Pi$ -System des Naphthyl-Fluorophors eine zu geringe Intensität, was weiter nicht untersucht wurde.

Eine Derivatisierung mit 2-Naphthoylchlorid führte zu einer nicht vollständigen Umsetzung des 3-(3''-Picoly)thymidins. Die beiden entstandenen Fluoreszenzderivate konnten bis auf Weiteres nicht charakterisiert werden. Eine Steigerung des Umsatzes z.B. durch Reaktion in einem anderem Reaktionsmedium sowie der Einfluss des Tris-HCl-Puffers bzw. Elutions-Puffers D auf die Reaktion und Probenaufarbeitung stehen noch aus. Bei Fluoreszenz-HPLC-Messungen ist davon auszugehen, dass eine ähnliche Problematik der Empfindlichkeit wie bei der 1-Naphthylisocyanat-Derivatisierung auftritt, da derselbe Naphthyl-Grundkörper zu Grunde liegt.

Der Naphthyl-Grundkörper scheint also eine zu geringe Emissions-Intensität zu liefern. Ein Grund könnte die Bindung an das relativ große Molekül 3-(3''-Picoly)thymidin zu sein. Das Dansylchlorid hingegen besitzt eine zusätzliche auxochrome Gruppe, die durch zusätzliche Delokalisation der  $\Pi$ -Elektronen der Naphthyl-Struktur die Elektronen leichter anregbar macht und offenbar zu einer höheren Intensität führt.

Die Fluoreszenz-Derivatisierungen mit anderen Markern höherer Fluoreszenz-Intensität stehen noch aus. Als Beispiel kann das Anthracen-9-carbonylchlorid angeführt werden, welches mit seinem  $\Pi$ -System von drei Benzolringen genügend Fluoreszenzaktivität besitzt, um das Cholesterol zu markieren. Die Derivatisierung mit dieser Substanz ergaben laut Literatur eine Nachweisgrenze von bis 5 fmol [85]. McEntyre et al. [70] geben hingegen mit dem in dieser Arbeit verwendeten 1-Naphthylisocyanat eine Nachweisgrenze des 1-Naphthylurethancholins von 25 pmol an. Auch hinsichtlich der Probenaufarbeitung und der Problematik, dass ein wässriges Puffer-Medium nach der DNA-Probenaufarbeitung vorliegt, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Neben der Methode der Fluoreszenzmarkierung könnte auch der Ringschluss zwischen der Pyrimidin- und 3-Picoly-Struktur über eines der beiden Carbonyle zu einem Pyrido-1,3-oxazin und so ein  $\Pi$ -System resultieren, das fluorophore Eigenschaften besitzt.



# Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
COSY	Correlation Spectroscopy
Cyp-450	Cytochrom P450
d	Tage(e)
dA	2'-Desoxy(ribo)adenosin
d.h.	das heißt
DAD	Diode Array Detection
dC	2'-Desoxy(ribo)cytidin
dG	2'-Desoxy(ribo)guanosin
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	2'-Desoxy(ribo)thymidin, Thymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
eV	Elektronenvolt
ff	folgende
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde(n)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon, Ketoalkohol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

---

HRP	Horseradish peroxidase
Hz	Hertz
Ketosäure	4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	Liquid Chromatography
LD	Letale Dosis
M	molar
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
max	Maximum
min	Minute(n)
MS	Massenspektroskopie
N	normal
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N'-Nitrosornikotin
PFBC	Pentafluorobenzoylchlorid
POB	4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl
RDA	Retro-Diels-Alder
ROS	reactive oxygen species
RP	reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SPE	Solid-phase extraction, Festphasenextraktion
THF	Tetrahydrofuran
TMA	Trimethylamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

# Literatur

- [1] Tso TC (1990) Tobacco-specific N-nitrosamines. in: Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant; pp 467–472; eds: Tso TC; Ideal Inc., Beltsville MD USA
- [2] Franke W (1992) Naturpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [3] Rundlöf T Olsson E Wiernik A Back S Aune M Johansson L Wahlberg I (2000) Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of *N*-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. *J. Agric. Food Chem.* 48:4381–4388
- [4] Noga E (1914) The alkaloids in tobacco extract. *Fach. Mitt. Tabakregie* Nos. 1 and 2
- [5] Späth E Wenusch A Zajic E (1936) Die Konstitution des Myosmins (V. Mitteil. über Tabakbasen). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 69:393–396
- [6] Späth E Mamoli L (1936) Synthese des Myosmins (VI. Mitteil. über Tabakbasen) und Bemerkungen zu einer Notiz von Miss T.M. Reynolds und R. Robins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 69:757–760
- [7] Woodward CF Eisner A Haines PG (1944) Pyrolysis of nicotine to myosmine. *J. Am. Chem. Soc.* 66:911–914
- [8] Haines PG Eisner A Woodward CF (1945) Chemical reactivity of myosmine. *J. Am. Chem. Soc.* 67:1258–1262
- [9] Tso TC Jeffrey RN (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in maryland tobacco. *Arch. Biochem. Biophys.* 43:269–285
- [10] Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449–451
- [11] Zwickenspflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachus hypogaea* and *Corylus avellana*. *J. Agric. Food Chem.* 46:2703–2706

- [12] Tyroller S Zwickelpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J. Agric. Food Chem.* 50:4909–4915
- [13] Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 12:199–209
- [14] Brandänge S Lindblom L (1976) *N*-Vinyl as *N*-H protection group. A convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem. Scand.* 30:39
- [15] Swain ML Eisner A Woodward CF Brice BA (1949) Ultraviolet absorption spectra of nicotine, nornicotine and some of their derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 71:1341–1345
- [16] Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem. Scand. Ser. B* 37:643–644
- [17] Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J. Org. Chem.* 54:4462–4468
- [18] Stein ML Burger A (1957) New synthesis of myosmine. *J. Am. Chem. Soc.* 79:154–156
- [19] Mundy BP Larsen BR McKenzie LF Braden G (1972) A convenient synthesis of myosmine. *J. Org. Chem.* 37:1635–1636
- [20] Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63:423–424
- [21] French FA Freedlander BL Furst A (1957) Absence of effect of myosmine and nicotyrine on the development of spontaneous pulmonary adenomas in strain A mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2:203–204
- [22] Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat. Res.* 101:39–43
- [23] Riebe M Westphal K (1983) Studies on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by various alkaloids. *Mutat. Res.* 124:281–286
- [24] Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwickelpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192:171–177

- [25] Wilp J Zwickenspflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem. Toxicol.* 40:1223–1228
- [26] Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line. *Toxicology* 222:71–79
- [27] Havla JB Hill CE Abdel-Rahman SZ Richter E (2009) Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay. *Food Chem. Toxicol.* 47:237–241
- [28] Glas S Tyroller S Zwickenspflug W Steiner K Kiefer G Richter E (2007) Tissue distribution and excretion of myosmine after i.v. administration to Long-Evans rats using quantitative whole-body autoradiography. *Arch. Toxicol.* 81:151–161
- [29] Leete E (1974) Biosynthesis of the minor alkaloids of tobacco. *tobaccodocuments.org* bw/91469:1–20
- [30] Yang KS Gholson RK Waller GR (1965) Studies on nicotine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 87:4184–4188
- [31] Yoshida D Mitake T (1966) Agmatine and N-carbamylputrescine as intermediates in the formation of nicotine by tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 7:301–305
- [32] Dewey LJ Byerrum RU Ball CD (1955) Biosynthesis of the pyrrolidine ring of nicotine. *Biochem. Biophys. Acta* 18:141–142
- [33] Leete E (1977) Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. *Recent Adv. Chem. Comp. Tob. Tob. Smoke* 365–388
- [34] Dawson RF Christman DR D'Adamo A Solt ML Wolf AP (1960) Biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotine acids. *J. Am. Chem. Soc.* 82:2628–2633
- [35] Dawson RF Christman DR Solt ML Wolf AP (1960) The biosynthesis of nicotine from nicotinic acid: chemical and radiochemical yields. *Arch. Biochem. Biophys.* 91:144–150
- [36] Dawson RF Osdene TS (1972) Speculative view of tobacco alkaloid biosynthesis. *Recent Adv. Phytochem.* 5:317–338
- [37] Friesen JB Leete E (1990) Nicotine synthase - an enzyme from *Nicotiana* species which catalyzes the formation of (*S*)-nicotine from nicotinic acid and 1-methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium chloride. *Tetrahedron Lett.* 31:6295–6298

- [38] Alworth WL Rapoport H (1965) Biosynthesis of the nicotine alkaloids in *Nicotiana glutinosa*. Interrelationship among nicotine, nornicotine, anabasine, and anatabine. Arch. Biochem. Biophys. 112:45–53
- [39] Kisaki T Tamaki E (1966) Phytochemical studies on the tobacco alkaloids-X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotary changes in tobacco plants. Phytochem. 5:293–300
- [40] Leete E Chedekel MR Bodem GB (1972) Synthesis of myosmine and nornicotine, using an acyl carbanion equivalent as an intermediate. J. Org. Chem. 37:4465–4466
- [41] Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum*. Beitr. Tabakforsch. Int. 12:113–116
- [42] Zwickenspflug W (2000) *N*-Nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitroso-nornicotine). J. Agric. Food Chem. 48:392–394
- [43] Hecht SS Han S Kenney PM Wang M Lindgren B Wang Y Lao Y Hochalter JB Upadhyaya P (2007) Investigation of the reaction of myosmine with sodium nitrite in vitro and in rats. Chem. Res. Toxicol. 20:543–549
- [44] Zwickenspflug W Tyroller S (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. Chem. Res. Toxicol. 19:150–155
- [45] Zwickenspflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. Drug Metab. Dispos. 33:1648–1656
- [46] Weinstein IB (1983) The monitoring of DNA adducts as an approach to carcinogen detection. Ann. Rev. Pub. Health 4:409–413
- [47] Gupta RC (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6943–6947
- [48] Perera FP (1988) The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. Mutat. Res. 205:255–269
- [49] Harris CC Vahakangas K Newman MJ Trivers GE Shamsuddin A Sinopoli N Mann DL Wright WE (1985) Detection of benzo[*a*]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6672–6676

- [50] Foiles PG Akerkar SA Carmella SG Kagan M Stoner GD Resau JH Hecht SS (1991) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine DNA-adducts in smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* 4:364–368
- [51] Hecht SS Rivenson A Braley J DiBello J Adams JD Hoffmann D (1986) Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff. *Cancer Res.* 46:4162–4166
- [52] Wang L Spratt TE Liu X-K Hecht SS Pegg AE Peterson LA (1997) Pyridyloxobutyl adduct  $O^6$ -[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine is present in 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone treated DNA and is a substrate of  $O^6$ -alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* 10:562–567
- [53] Wang M Cheng G Sturla SJ Shi Y McIntee EJ Villalta PW Upadhyaya P Hecht SS (2003) Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens. *Chem. Res. Toxicol.* 16:616–626
- [54] Thomson NM Mijal RS Ziegel R Fleischer NL Pegg AE Tretyakova NY Peterson LA (2004) Development of a quantitative liquid chromatography/electrospray mass spectrometric assay for a mutagenic tobacco specific nitrosamine-derived DNA adduct,  $O^6$ -[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* 17:1600–1606
- [55] Hecht SS Villalta PW Sturla SJ Cheng G Yu N Upadhyaya P Wang M (2004) Identification of  $O^2$ -substituted pyrimidine adducts formed in reactions of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 17:588–597
- [56] Upadhyaya P McIntee EJ Villalta PW Hecht SS (2006) Identification of adducts formed in the reaction of 5'-acetoxy- $N'$ -nitrosonornicotine with deoxyguanosine and DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 19:426–435
- [57] Spratt TE Trushin N Lin D Hecht SS (1989) Analysis of  $N^2$ -(pyridyloxobutyl)deoxyguanosine adducts in DNA of tissues exposed to tritium-labeled 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and  $N'$ -nitrosonornicotine. *Chem. Res. Toxicol.* 2:169–173
- [58] Thomson NM Kenney PM Peterson LA (2003) The pyridyloxobutyl DNA adduct,  $O^6$ -[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine, is detected in tissues from

- 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-treated A/J mice. *Chem. Res. Toxicol.* 16:1–6
- [59] Lao Y Villalta PW Sturla SJ Wang M Hecht SS (2006) Quantitation of pyridyloxobutyl DNA adducts of tobacco-specific nitrosamines in rat tissue DNA by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 19:674–682
- [60] Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem. Res. Toxicol.* 20:235–245
- [61] Hecht SS Carmella SG Foiles PG Murphy SE (1994) Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res.* 54:1912–1917
- [62] Richichi B Cicchi S Chiacchio U Romeo G Brandi A (2002) Chemo-, regio- and stereoselective Mitsunobu reaction of unprotected pyrimidine bases with hydroxypyrrolidines. *Tetrahedron Lett.* 43:4013–4015
- [63] Lusich H Young DD Lively MO Deiters A (2007) Photochemical DNA activation. *Org. Lett.* 9:1903–1906
- [64] Tanabe K Kanazaki H Ishii H Nishimoto S-I (2007) 2-Oxoalkyl caged oligonucleotides: one-electron reductive activation into emergence of ordinary hybridization property by hypoxic X-irradiation. *Org. Biomol. Chem.* 5:1242–1246
- [65] Wang M Upadhyaya P Dinh TT Bonilla LE Hecht SS (1998) Lactols in hydrolysates of DNA treated with  $\alpha$ -acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine or crotonaldehyde. *Chem. Res. Toxicol.* 11:1567–1573
- [66] Costantini A Vaudano E Del Prete V Danei M Garcia-Moruno E (2009) Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 57:10664–10669
- [67] Hecht SS (1998) Biochemistry, biology and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem. Res. Tox.* 11:559–603
- [68] Hölzle D Schlöbe D Tricker AR Richter E (2007) Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung. *Toxicology* 232:277–285

- [69] Peng R Wang F Sha Y (2007) Synthesis of 5-dialkyl(aryl)aminomethyl-8-hydroxyquinoline dansylates as selective fluorescent sensors for Fe<sup>3+</sup>. *Molecules* 12:1191–1201
- [70] McEntyre CJ Slow S Lever M (2009) Measurement of plasma free choline by high performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with 1-naphthyl isocyanate. *Anal. Chim. Acta* 644:90–94
- [71] Zanette M Marcomini A Marchiori E Samperi R (1996) High-performance liquid chromatographic-fluorescence determination of aliphatic alcohol polyethoxylates and poly(ethylene glycol)s in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 756:159–174
- [72] Spectral Database for Organic Compounds SDBS. [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi)
- [73] Yamazaki H Inoue K Hashimoto M Shimada T (1999) Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch. Toxicol.* 73:65–70
- [74] Wang SN Liu Z Tang HZ Meng J Xu P (2007) Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology* 153:1556–1565
- [75] Fernandez Gonzales M Bardwell DA Jeffery JC Ward MD (1996) Metal-polypyridyl complexes with pendant adenine and thymine groups as building blocks for hydrogen-bonded supramolecular assemblies. *Polyhedron* 15:1907–1911
- [76] Kocalka P Pohl R Rejman D Rosenberg I (2005) Synthesis of racemic and enantiomeric 3-pyrrolidinyl derivatives of purine and pyrimidine nucleobases. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* 24:805–808
- [77] Hecht SS (2008) Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* 21:160–171
- [78] Schlöbe D Hölzle D Hatz D von Meyer L Tricker AR Richter E (2008) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in lung, lower esophagus and cardia of sudden death victims. *Toxicology* 245:154–161
- [79] Murphy SE Palomino A Hecht SS Hoffmann D (1990) Dose-response study of DNA and hemoglobin adduct formation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in F344 rats. *Cancer Res.* 50:5446–5452

- [80] Carmella SG Hecht SS (1987) Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*<sup>2</sup>-nitrosornicotine. *Cancer Res.* 47:2626–2630
- [81] Hecht SS Trushin N Castonguay A Rivenson A (1986) Comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res.* 46:498–502
- [82] Gupta RC (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6943–6947
- [83] Reddy MV Randerath K (1994) Nuclease P1-enhanced <sup>32</sup>P-postlabeling assay for aromatic carcinogen-DNA adducts. *1B*:201–215
- [84] Upadhyaya P Sturla SJ Tretyakova N Ziegel R Villalta PW Wang MY Hecht SS (2003) Identification of adducts produced by the reaction of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with deoxyguanosine and DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 16:180–190
- [85] Bayliss MAJ Homer RB Shepherd MJ (1988) Anthracene-9-carbonyl chloride as a fluorescence and ultraviolet derivatising reagent for the high-performance liquid chromatographic analysis of hydroxy compounds. *J. Chromatogr. A* 445:393–402

# Danksagung

Danke.

Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Zwickenpflug für die Überlassung des Themas.

Auch danke ich Herrn Professor Dr. Eyer und Herrn Professor Dr. Richter als kommissarische Leiter, sowie Herrn Professor Dr. Gudermann als neuen Vorstand des Walther-Straub-Instituts für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Vor allem danke ich Herrn Dr. Wolfgang Zwickenpflug für die Betreuung, sowie Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Berichterstattung und Durchsicht dieser Arbeit.

Dem gesamten AK Richter danke ich für die freundliche Atmosphäre im Alltag.