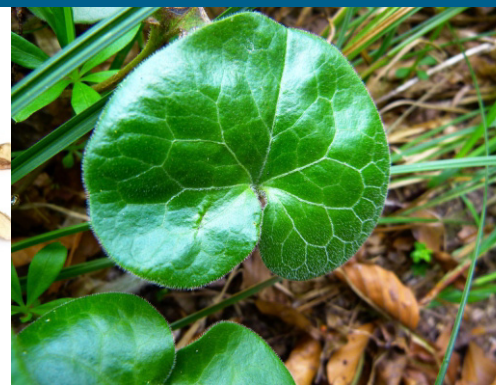


DISSERTATION

Bildung von DNA-Addukten durch α - und β -Asaron in primären Rattenhepatozyten



vorgelegt von **Simone Stegmüller**

Bildung von DNA-Addukten durch α - und β -Asaron in primären Rattenhepatozyten

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

D 386



vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Simone Stegmüller

geboren in Bad Dürkheim

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 21. September 2020

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Januar 2017 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Schrenk durchgeführt.

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Werner Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Schrenk

2. Berichterstatterin: Prof Dr. rer. nat. Elke Richling

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abstract	IX
Kurzzusammenfassung	X
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Allgemeine Grundlagen	4
2.1.1 Phenylpropanoide.....	4
2.1.2 Chemische Kanzerogenese.....	8
2.2 Asarone.....	10
2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften.....	10
2.2.2 Vorkommen und Verwendung.....	11
2.2.3 Toxikokinetik.....	12
2.2.4 Metabolismus.....	14
2.2.4.1 Metabolismus von α -Asaron.....	15
2.2.4.2 Metabolismus von β -Asaron.....	18
2.2.5 Toxikodynamik.....	20
2.2.5.1 Akute und subakute Toxizität.....	20
2.2.5.2 Zytotoxizität.....	20
2.2.5.3 Gentoxizität und Mutagenität.....	22
2.2.5.4 Reproduktionstoxizität.....	24
2.2.5.5 Subchronische Toxizität.....	25
2.2.5.6 Chronische Toxizität/Kanzerogenität.....	25
3 Problemstellung	28
4 Ergebnisse und Diskussion	30
4.1 Asaronepoxide	30
4.1.1 Synthese.....	30
4.1.2 Stabilität der Epoxide in verschiedenen Lösungsmitteln.....	38
4.2 Reaktivität von α - und β -Asaronepoxid gegenüber 2'-Desoxynukleosiden.....	46
4.2.1 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin.....	47
4.2.2 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin.....	54
4.2.3 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxythymidin.....	60
4.2.4 Hypothetische Nebenprodukte	63
4.2.5 Zusammenfassung der Resultate der Reaktivitätsstudien	66

II | Inhaltsverzeichnis

4.3	Synthese der DNA-Addukte.....	68
4.4	Methodenentwicklung und -etablierung	69
4.4.1	Optimierung der DNA-Extraktion	69
4.4.2	Enzymatische DNA-Hydrolyse und Probenvorbereitung	71
4.4.3	Quantifizierung von DNA-Addukten mittels UHPLC-ESI _{pos} -MS/MS.....	71
4.4.4	Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin in DNA-Hydrolysaten.....	79
4.5	<i>In-Vitro</i> -Studie.....	81
4.5.1	Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Adduktbildungsrate.....	82
4.5.2	Kinetik der DNA-Adduktbildung	87
4.5.3	Zusammenfassung und Diskussion der <i>in-vitro</i> -Studie	90
5	Zusammenfassung und Ausblick	93
6	Materialien.....	95
6.1	Geräte	95
6.2	Verbrauchsmaterialien.....	97
6.3	Chemikalien.....	97
7	Methoden	99
7.1	Synthesen.....	99
7.1.1	Epoxide	101
7.1.1.1	Synthese von Dimethyldioxiran (DMDO).....	101
7.1.1.2	Synthese von α -Asaronepoxid.....	102
7.1.1.3	Synthese von β -Asaronepoxid.....	104
7.1.2	Asaron-DNA-Addukte	106
7.1.2.1	Synthese von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyguanosin (<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG).....	106
7.1.2.2	Synthese von <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin (<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA)	107
7.1.3	Stabil-isotopenmarkierten Asaron-DNA-Addukte	108
7.1.3.1	Synthese von [¹⁵ N ₅] <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin ([¹⁵ N ₅] <i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA)	108
7.1.3.2	Synthese von [¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyguanosin ([¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG)	109
7.2	Analytische Methoden	110
7.2.1	HPLC-UV/VIS-Methode.....	110
7.2.2	Präparative HPLC.....	111
7.2.3	Semi-präparative HPLC	112
7.2.4	HPLC-ESI _{pos} -MS/MS.....	113
7.2.5	UHPLC-ESI _{pos} -MS/MS.....	113
7.3	Primäre Rattenhepatozyten	115

7.3.1	Kollagenaseperfusion, Kultivierung und Inkubation	115
7.3.2	DNA-Isolierung	118
7.3.3	Enzymatische Hydrolyse und Probenvorbereitung	119
8	Literaturverzeichnis	121
9	Abbildungsverzeichnis	128
10	Tabellenverzeichnis	133
Anhang		i
Genehmigungen		i
Lebenslauf		ii
Tagungsbeiträge		iv
Publikationen		v
Danksagung		vi
Erklärung		viii

Abkürzungsverzeichnis

Symbole/Formelzeichen

c	Stoffmengenkonzentration [mol l ⁻¹] = [M]
g	Erdbeschleunigung, ≈ 9,81 m s ⁻¹
J	Kopplungskonstante [Hz]
m	Masse [g]
M	molare Masse [g mol ⁻¹]
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, dimensionslos
n	Stichprobenumfang
p	Signifikanzniveau
R²	Bestimmtheitsmaß der linearen Anpassung
R_f	Retentionsfaktor
t	engl.: <i>time</i> , dt.: Zeit
t_R	Retentionszeit
V	Volumen
δ	chemische Verschiebung [ppm]
ρ	Dichte in m V ⁻¹

Einheiten

%	Prozent
amu	engl.: <i>atomic mass unit</i> , atomare Masseneinheit
d	Tag(e)
Da	Dalton
g	Gramm
° C	Grad Celsius
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
m	Meter
M	Molarität
min	Minute
mol	Mol
ppm	engl.: <i>parts per million</i> ; Teile pro Million
psi	engl.: <i>pound-force per square inch</i>
s	Sekunde
V	Volt

SI-Präfixe

M	Mega, gr.: <i>mégas</i> = groß	10 ⁶
k	Kilo, gr.: <i>chilioi</i> = tausend	10 ³
c	Zenti, lat.: <i>centrum</i> = hundert	10 ⁻²
m	Milli, lat.: <i>hundert</i> = tausend	10 ⁻³
μ	Mikro, gr.: <i>mikrós</i> = klein	10 ⁻⁶
n	Nano, gr.: <i>nános</i> = Zwerg	10 ⁻⁹
p	Piko, ital.: <i>piccolo</i> = klein	10 ⁻¹²
f	Femto, skand.: <i>femton</i> = fünfzehn	10 ⁻¹⁵

Abkürzungen

A₂₆₀/A₂₈₀	Absorptionsquotient der Absorption von 260 nm und 280 nm
A₂₆₀/A₂₃₀	Absorptionsquotient der Absorption von 260 nm und 230 nm
AP-Stelle	apurinische oder apyrimidinische Stelle
ARLM	Aroclor 1254-vorbehandelte Rattenlebermikrosomen
AUC	engl.: <i>area under the curve</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BLM	Rinderlebermikrosomen
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	engl.: <i>collision activated dissoziation gas</i> (MS-Parameter)
CDCl₃	Chloroform- <i>d</i>
CDU	engl.: <i>collagen digestion units</i>
CE	engl.: <i>collision energy</i> (MS-Parameter)
CEP	engl.: <i>collision cell entrance potential</i> (MS-Parameter)
CIP	engl.: <i>calf intestine phosphatase</i> , dt.: alkalische Phosphatase
CoA	Coenzym A
CUMS	engl.: <i>chronic unpredictable mild stresses</i> , dt.: chronischer, unvorhersehbarer leichter Stress
CUR	engl.: <i>curtain gas</i> (MS-Parameter)
CXP	engl.: <i>collision cell exit potential</i> (MS-Parameter)
CYP	Cytochrom
d	Duplett (NMR-Spektroskopie)
D₂O	Deuteriumoxid
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dG	2'-Desoxyguanosin
DMDO	Dimethyldioxiran
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dN	Desoxyribonukleosid(e)
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , dt.: Desoxyribonukleinsäure
DP	engl.: <i>declustering potential</i> (MS-Parameter)
dT	2'-Desoxythymidin
dt.	deutsch
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch
EP	engl.: <i>entrance potential</i> (MS-Parameter)
eq.	engl.: <i>equal concentration</i> , dt.: Äquivalentkonzentration
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	lat.: <i>et alii</i> , dt.: und andere
FasL	Fas-Ligand
FKS	fetales Kälberserum
FP	engl.: <i>focusing potential</i> (MS-Parameter)
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase

VI | Abkürzungsverzeichnis

gr.	griechisch
GS1	Gas 1; engl.: <i>nebulizer gas</i> , Zerstäubergas (MS-Parameter)
GS2	Gas 2; engl.: <i>heater gas</i> , Heizgas (MS-Parameter)
H₂O_{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HCA	engl.: <i>hepatocellular adenoma</i> , dt.: hepatozelluläres Adenom
HCC	engl.: <i>hepatocellular carcinoma</i> , dt.: hepatozelluläres Karzinom
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HLM	humane Lebermikrosomen
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
HR	homologe Rekombination
<i>i. p.</i>	lat.: <i>intra peritoneum</i> ; intraperitoneal, dt.: in die Bauchhöhle
IL-1b	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IS	engl.: <i>ionspray voltage</i> (MS-Parameter)
IS	interner Standard
IUPAC	engl.: <i>international union of pure and applied chemistry</i>
JECFA	engl.: <i>joint FAO/WHO expert committee on food additives</i>
KG	Körpergewicht
lat.	lateinisch
LD₅₀	mittlere letale Dosis
LLA	Laktatdehydrogenase-Leakage-Assay
LOD	engl.: <i>limit of detection</i> , dt.: Nachweis- oder Detektionsgrenze
LOQ	engl.: <i>limit of quantification</i> , dt.: Bestimmungs- oder Quantifizierungsgrenze
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
m	Multiplett (NMR-Spektroskopie)
MeOH-AS	50:50 Mischung aus Methanol und 0,1%iger wässriger Ameisensäure
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase
ML	Messlösung
MMR	Mismatch-Reparatur
MN	Micrococcale Nuklease
MRM	engl.: <i>multiple reaction monitoring</i>
MRT	engl.: <i>mean residence time</i> , mittlere Verweildauer
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
N1-1'-OH-2H-A-dA	<i>N</i> 1-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin
N²-1'-OH-2H-A-dG	<i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin
N²-MIE-dG	<i>N</i> ² -(<i>trans</i> -Methyliso-eugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin
N3-1'-OH-2H-A-dA	<i>N</i> 3-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin
N3-1'-OH-2H-A-dC	<i>N</i> 3-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin
N3-1'-OH-2H-A-dT	<i>N</i> 3-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxythymidin
N⁴-1'-OH-2H-A-dC	<i>N</i> ⁴ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin
N⁶-1'-OH-2H-A-dA	<i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin
N7-1'-OH-2H-A-dG	<i>N</i> 7-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin
N7-1'-OH-2H-A-GA	<i>N</i> 7-1'-Hydroxy-dihydroasaron-guanin
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	engl.: <i>non-homologous end joining</i> , dt.: nicht-homologe Endenvereinigung
NL	engl.: <i>neutral loss</i> , dt.: Neutralverlust
NMR	engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> , dt.: Kernresonanzspektroskopie
O²-1'-OH-2H-A-dC	O ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin

O⁶-1'-OH-2H-A-dG	O ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin
p. a.	lat.: <i>pro analysi</i> , dt. für die Analyse
p. o.	lat.: <i>per os</i> , dt.: über den Mund
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCP	Pentachlorphenol
PDE II	Phosphodiesterase II
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> , negativer dekadische Logarithmus der (solvatisierten) Protonen-Aktivität
pos	positiv
RLM	Rattenlebermikrosomen
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> , dt.: Ribonukleinsäure
RP	engl.: <i>reversed phase</i> , dt.: Umkehrphase
rpm	engl.: <i>revolutions per minute</i> , dt.: Umdrehungen pro Minute
RRT	Resazurin-Reduktions-Test
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
S9-Mix	engl.: <i>supernatant</i> ; Überstand der 10–20 min Zentrifugation bei 9000 g (meist aus männlicher, Aroclor 1254-induzierter Rattenleber)
SCE	engl.: <i>sister chromatid exchange</i> , Schwesterchromatidaustauschrategie
SD	engl.: <i>standard deviation</i> , dt.: Standardabweichung
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dt.: Natriumlaurylsulfat
skand.	skandinavisch
SL	Stammlösung
SLM	Schweinelebermikrosomen
S_N2	nukleophile Substitution 2
SOS-Chromotest	<i>Escherichia coli</i> PQ37-Gentoxizitätstest
SRB	Sulforhodamine B-Assay
SULT	Sulfotransferase
t	Triplett (NMR-Spektroskopie)
TEM	engl.: <i>temperature</i> (MS-Parameter)
TIC	engl.: <i>total ion chromatogram</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	engl.: <i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TU	Technische Universität
U	Enzymeinheit, entspricht der Substratumsetzung von 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$
UDS-Assay	ungeplante DNA-Synthese-Assay
UHPLC	engl.: <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
USA	engl.: <i>united states of america</i> , dt.: Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
VIS	engl.: <i>visible</i> , dt.: sichtbar
w	weiblich
WST-1	Water-Soluble-Tetrazolium-Assay
XID	engl.: <i>extracted ion chromatogram</i>
ZV	Zwischenverdünnung
γ-H2AX	phosphorylierte Form des Histons H2AX

VIII | Abkürzungsverzeichnis

Tiermodelle

Stamm	Hauptmerkmale
B6C3F1-Maus	1. hybride Filialgeneration der Mäusestämme C57BL/6J (w) und C3H/HeJ (m)
Balb/c-Maus	Albino-Inzuchtstamm, Balb (Bagg albino)
C3H/HeJ-Maus	Inzuchtstamm mit spontaner Mutation im <i>toll-like receptor 4</i> Gen
C57BL/6J-Maus	Inzuchtstamm, dunkelbraunes bis schwarzes Fell
CF1-Maus	Albino-Auszuchtstamm, CF (Carworth Farms)
Fischer 344-Ratte	Albino-Inzuchtstamm
OF1-Maus	Albino-Auszuchtstamm, OF1 (Oncins France 1)
SD-Ratte	Albino-Auszuchtstamm, SD (Sprague-Dawley)
Swiss-Maus	Albino-Auszuchtstamm
Wistar Ratte	Albino-Auszuchtstamm

Zelllinien

Zelllinie	Ursprung/Beschreibung
F1	V79 Zellen transfiziert mit Cytochrom P 450 1A2 und Sulfotransferase 1C1 der Ratte
H1	V79-Zellen transfiziert mit humanem Cytochrom P 450 1A2 und humaner Sulfotransferase 1A1*1
HepG2	humane Leberkarzinomzelllinie
pRH	primäre Rattenhepatozyten
THLE-2	humane Hepatozyten
tV79	V79-Zellen transfiziert mit humanem Cytochrom P 450 1A2 und humaner Sulfotransferase 1C2
U251	humane Glioblastom-Zelllinie
V79	Hamster-Lungenfibroblasten

Abstract

Natural food ingredients can have a genotoxic potential. An example of this is phenylpropanoids, which are secondary plant constituents found in a variety of spice and herbal plants. Prominent representatives of these substances are estragole and methyleugenol. Both allylic compounds have hepatocarcinogenic effects in animal experiments, whereby the ultimate carcinogen postulated is the formation of a carbenium ion as a result of the spontaneous cleavage of a sulfate residue after hydroxylation and subsequent sulfonation of the side chain. This carbenium ion is able to form adducts with nucleophiles such as proteins and DNA. α - and β -asarone occupy a special position in the context of phenylpropenes as a whole, because in contrast to other 1-propenylic phenylpropenes such as anethole, methylisoeugenol and isosafrol, they are carcinogenic in animal experiments, just like the allylic compounds estragole and methyleugenol.

At the beginning of the present PhD thesis the metabolism of α - and β -asarone was widely unknown. From previous studies, the hypothesis was derived that the two 1-propenyl asarones are not metabolized and thus activated by hydroxylation and subsequent sulfonation like the allylic representatives, but that epoxidation of the side chain could lead to reactive metabolites. After the metabolite spectrum of α - and β -asarone was elucidated and the epoxides were identified as responsible for the mutagenic potential of the compounds in the Ames fluctuation test, the question of DNA adduct formation in primary rat hepatocytes was to be answered. For this purpose, the reactivity of the asarone epoxides to deoxynucleosides was investigated and the adducts formed were characterized. In an in-vitro study, a concentration-dependent relationship to the formed DNA adducts could be determined using a sensitive UHPLC-MS/MS method. Furthermore, in investigations of time dependency, indications of repair of the formed adducts were found.

Kurzzusammenfassung

Natürliche Inhaltsstoffe von Lebensmitteln können ein genotoxisches Potential haben. Ein Beispiel dafür sind Phenylpropanoide, welche als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in einer Vielzahl von Gewürz- und Kräuterpflanzen vorkommen. Zu den prominenten Vertretern dieser Stoffe gehören Estragol und Methyleugenol. Beide allylische Verbindungen wirken hepatokanzerogen im Tierversuch, wobei als ultimates Kanzerogen die Bildung eines Carbeniumions infolge einer spontanen Abspaltung eines Sulfatrestes nach Hydroxylierung und anschließender Sulfonierung der Seitenkette postuliert wird. Dieses Carbeniumion ist in der Lage mit Nucleophilen wie Proteinen und DNA Addukte zu bilden. α - und β -Asaron nehmen im Gesamtkontext der Phenylpropene eine Sonderstellung ein, denn im Gegensatz zu anderen 1-propenylischen Phenylpropenen wie Anethol, Methylisoeugenol und Isosafrol sind sie wie die allylischen Verbindungen Estragol und Methyleugenol kanzerogen im Tierversuch.

Zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit war der Metabolismus von α - und β -Asaron weitestgehend unbekannt. Aus früheren Studien leitete sich die Hypothese ab, dass die beiden 1-propenylischen Asarone, nicht wie die allylischen Vertreter über Hydroxylierung und anschließender Sulfonierung metabolisiert und somit aktiviert werden, sondern eine Epoxidierung der Seitenkette zu reaktiven Metaboliten führen könnte. Nachdem das Metabolitenspektrum von α - und β -Asaron aufgeklärt wurde und die Epoxide als verantwortlich für das mutagene Potential der Verbindungen im Ames-Fluktuationstest identifiziert werden konnten, sollte die Frage der DNA-Adduktbildung in primären Rattenhepatozyten beantwortet werden. Hierfür wurde die Reaktivität der Asaronepoxide gegenüber 2'-Desoxynucleosiden untersucht und die gebildeten Addukte charakterisiert. In einer *in-vitro*-Studie konnte mit Hilfe einer sensitiven UHPLC-MS/MS-Methode ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang zu den gebildeten DNA-Addukten festgestellt werden. Weiter wurden in Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit Hinweise auf Reparatur der gebildeten Addukte gefunden.

1 EINLEITUNG

Die Untersuchung genotoxischer Kanzerogene auf die Bildung von DNA-Addukten als Biomarker der Wirkung und ebenso als Indikatoren für das Krebsrisiko ist eine bewährte Methode, welche eine stetige Entwicklung durch neue Analyseverfahren erfährt. Durch schon lang bekannte Methoden wie das ^{32}P -Postlabeling kann sensitiv das Vorkommen von DNA-Addukten detektiert werden. Durch modernere Methoden wie dem Einsatz von hochauflösender Massenspektroskopie ist es zusätzlich möglich, auch die Struktur von DNA-Addukten aufzuklären und gezielt nach einzelnen strukturellen Veränderungen der DNA zu forschen. Durch stetige Verbesserungen der Analysemethoden und somit Senkung der Nachweisgrenzen auf unter ein Addukt pro 10^8 Nucleosiden, ist es für immer mehr Substanzen möglich neben dem Vorhandensein von DNA-Addukten, auch Hinweise auf deren Struktur zu erhalten.

Das Vorkommen von genotoxischen Kanzerogenen als Kontaminanten in Lebensmitteln ist spätestens seit den Erkenntnissen über Acrylamid und anderen hitzeinduzierten Kontaminanten im Bewusstsein der aktuellen Forschung. Daneben können auch natürliche Inhaltsstoffe von Lebensmitteln ein genotoxisches Potential haben. Um solche Inhaltsstoffe handelt es sich zum Beispiel bei Phenylpropenen, einer Untergruppe der Phenylpropanoide, welche als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in einer Vielzahl von Gewürz- und Kräuterpflanzen vorkommen. Strukturell handelt es sich hier um einen Benzolring, welcher zum einen eine 1-propenylische oder allylische (2-propenylische) Seitenkette und zum anderen verschiedene Substituenten wie Methoxy- und/oder Hydroxygruppen trägt. Zu den prominenten Vertretern dieser Stoffe gehören Estragol und Methyleugenol. Beide allylische Verbindungen wirken hepatokanzerogen im Tierversuch, wobei als ultimales Kanzerogen die Bildung eines Carbeniumions infolge einer spontanen Abspaltung eines Sulfatrestes nach Hydroxylierung und anschließender Sulfonierung der Seitenkette postuliert wird. Dieses Carbeniumion ist in der Lage mit Nucleophilen wie Proteinen und DNA Addukte zu bilden.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den beiden 1-propenylischen Vertretern der Phenylpropene, α - und β -Asaron. Diese beiden nehmen im Gesamtkontext der Phenylpropene eine Sonderstellung ein, denn im Gegensatz zu anderen 1-propenylischen Phenylpropenen wie Anethol,

2 | Einleitung

Methylisoeugenol und Isosafrol sind sie wie die allylischen Verbindungen Estragol und Methyleugenol kanzerogen im Tierversuch.

Ebenso war zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit der Metabolismus von α - und β -Asaron weitestgehend unbekannt. Aus früheren Studien leitete sich die Hypothese ab, dass die beiden 1-propenylischen Asarone, nicht wie die allylischen Vertreter über Hydroxylierung und anschließender Sulfonierung metabolisiert und somit aktiviert werden, sondern eine Epoxidierung der Seitenkette zu reaktiven Metaboliten führen könnte.

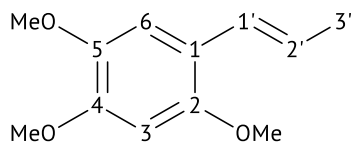
Das im Folgenden vorgestellte Forschungsprojekt ist ein Teilaspekt eines gemeinschaftlich durchgeführten DFG-Projektes (Nr. 241845322) der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (Technische Universität Kaiserslautern) und Prof. Dr. Melanie Esselen (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) mit dem Titel „Metabolismus und Gentoxizität in der Nahrung vorkommender kanzerogener Phenylpropanoide“.

2 KENNTNISSTAND

In diesem Kapitel wird zuerst auf allgemeine Grundlagen, welche Basis für die vorliegenden Arbeit sind eingegangen. Im Folgenden wird der aktuelle Kenntnisstand zu Beginn der praktischen Arbeiten zu den untersuchten Verbindungen α - und β -Asaron abgebildet. Zuerst werden die physikochemischen Eigenschaften dargelegt und das Vorkommen erläutert. Danach wird auf Toxikokinetik, Metabolismus und Toxikodynamik der beiden Asarone im Detail eingegangen.

Nomenklatur

Zur besseren Übersichtlichkeit und da die IUPAC-Namen der im Folgenden behandelten Substanzen zu sehr langen, nur schwer zuzuordnenden Namen führen würden, wird eine vereinfachter Nomenklatur eingeführt. Hierzu wird die Nummerierung des Kohlenstoffgrundgerüsts der



Muttersubstanzen stets beibehalten, hier dargestellt am Beispiel von α -Asaron. Weiter werden Muttersubstanzen und deren abgeleitete Metaboliten mit einer *trans*-konfigurierten Seitenkette

mit α bezeichnet und mit β bei einer *cis*-Konfiguration der Seitenkette. Diese Vereinfachung dient einer besseren Übersichtlichkeit beim Zuordnen der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und bei der Beschreibung der Reaktivitäten. Weiter ist es so möglich, die Abstammung der Metaboliten dem Namen zu entnehmen. Die IUPAC-Namen der Verbindungen können der einleitenden Liste in Kapitel 7.1 entnommen werden.

2.1 Allgemeine Grundlagen

2.1.1 Phenylpropanoide

Phenylpropanoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, welche aus dem Grundbaustein L-Phenylalanin abgeleitet werden. Pflanzen und Mikroorganismen sind in der Lage L-Phenylalanin über den Shikimisäureweg zu synthetisieren. Durch Desaminierung entsteht Zimtsäure, welche nach Hydroxylierung in *p*-Position mit Coenzym A (CoA) kondensiert. *p*-Cumaryl-CoA ist die Vorläuferverbindung für eine Vielzahl an Naturstoffen (Abbildung 2-1). Als einfachste Phenylpropanoide gelten die Hydroxyzimtsäuren, wie Sinapinsäure oder auch Monolignole, wie Coniferylalkohol (Abbildung 2-2). Sie beide tragen das charakteristische Grundgerüst aus Benzolring und C₃-Seitenkette, sowie Substituenten am Benzolring (Methoxy-, Hydroxy-, und/oder Methylendioxy-Gruppen) (Dixon *et al.*, 2002, Vogt, 2010).

Aus *p*-Cumaryl-CoA leiten sich viele Verbindungen der Untergruppen Flavonoide, Isoflavonoide, Cumarine, Stilbene, Catechine, Proanthocyanidine, Lignane/Lignine und Phenylpropene ab. Die in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropanoide gehören zur Untergruppe der Phenylpropene. Diese zeichnen sich durch eine ungesättigte C₃-Seitenkette aus. Innerhalb dieser Untergruppe wird noch weiter zwischen den allylischen und den 1-propenylischen Phenylpropenen unterschieden. Die bekanntesten Vertreter der allylischen Phenylpropene sind Methyleugenol, Estragol, Eugenol, Apiol, Myristicin und Safrol. In der Gruppe der 1-propenylischen Phenylpropenen findet man den bekanntesten Vertreter Anethol, aber auch Methylisoeugenol und Isoeugenol (Abbildung 2-3). Auch die in dieser Arbeit betrachteten Asarone α - und β -Asaron gehören zur Gruppe der 1-propenylischen Phenylpropene.

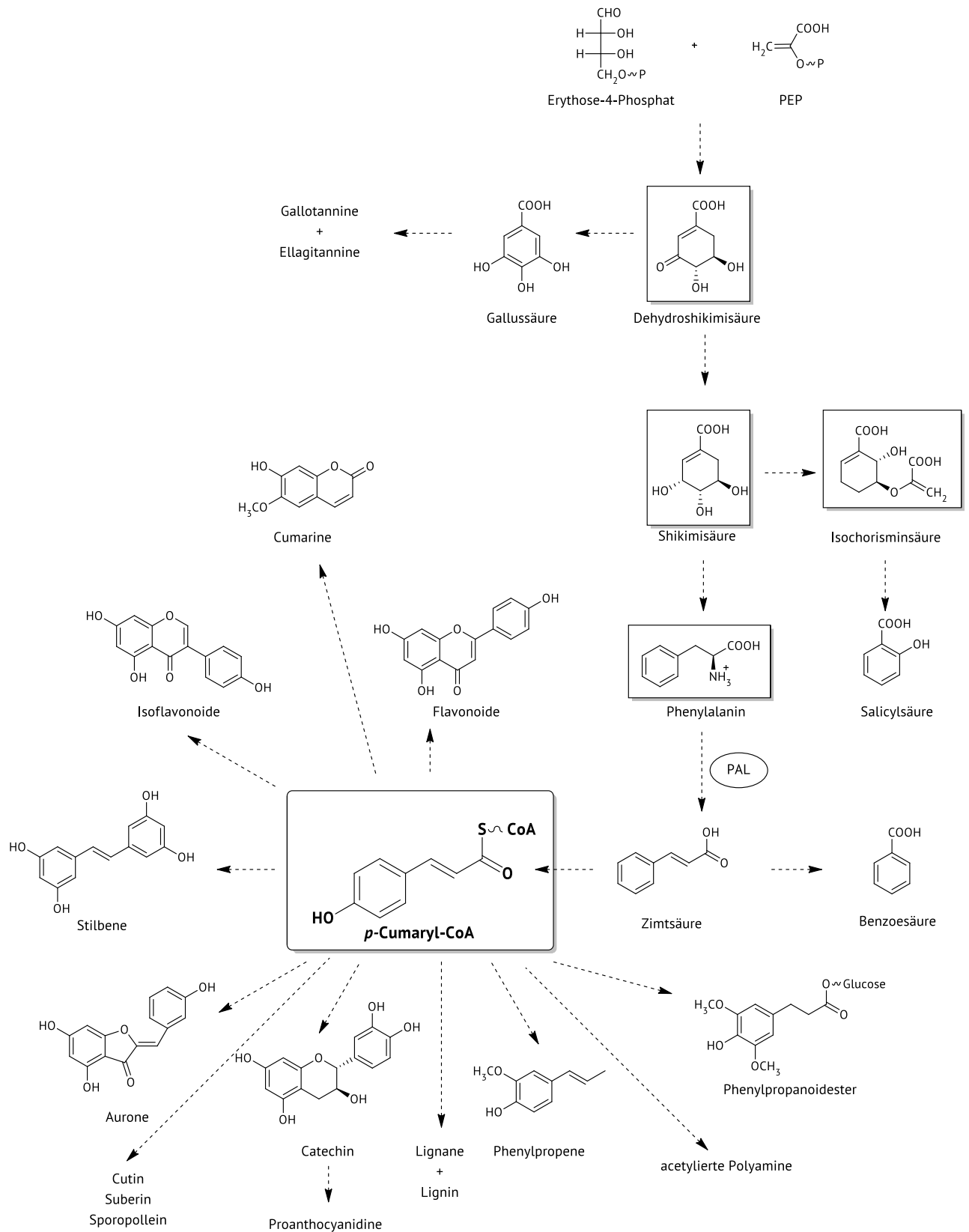


Abbildung 2-1: Diversifizierung von Phenylpropanoiden basierend auf dem allgemeinen Phenylpropanoid-Weg. Die Metaboliten des Shikimatwegs und der zentrale Metabolit *p*-Cumaryl-CoA sind hervorgehoben. PEP: Phosphoenolpyruvat, PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (modifiziert nach Vogt, 2010).

6 | Kenntnisstand

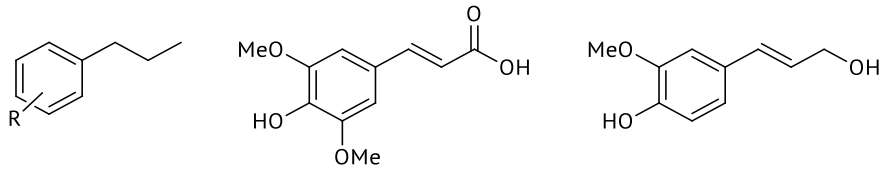


Abbildung 2-2: Strukturen der Phenylpropan-Grundstruktur (links), von Sinapinsäure (mitte) und Coniferylalkohol (rechts).

Im Allgemeinen scheint es strukturelle Merkmale zu geben, welche für das kanzerogene Potential der Phenylpropene verantwortlich sind. Die meisten in dieser Hinsicht positiv getesteten Substanzen weisen folgende strukturelle Gemeinsamkeiten auf: allylische Seitenkette in Kombination mit ein oder zwei Sauerstoffsubstituenten am Benzolring und keine freie phenolische Hydroxygruppe. Safrol, Methyleugenol und Estragol sind kanzerogen *in vivo* (Miller *et al.*, 1983), wohingegen andere allylische Phenylpropanoide, welche mehr als zwei Sauerstoffgruppen oder eine phenolische Hydroxygruppe tragen wie Apiol, Eugenol und Myristicin nicht (hepato)kanzerogen im Tierversuch waren (Miller *et al.*, 1983). Die Bildung eines ultimalen Kanzerogens verläuft sowohl für Safrol als auch für Methyleugenol und Estragol über den gleichen Weg ab. Zuerst findet eine Cytochrom P 450-Enzym (CYP) vermittelte 1'-Hydroxylierung der Seitenkette statt. Diese Hydroxygruppe wird anschließend mittels Sulfotransferase (SULT) sulfoniert und es entsteht nach spontaner Abspaltung des Sulfatrestes ein reaktives Carbeniumion (Abbildung 2-4).

Diese Aktivierung findet bei den anderen allylischen Phenylpropenen nicht statt. Zum einen aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe, welche rasch durch Enzyme wie Glucuronidasen abgefangen werden, und zum anderen aufgrund der sterischen Hinderung der vielen Substituenten am Benzolring die nicht durch die CYP hydroxyliert werden können, nicht statt.

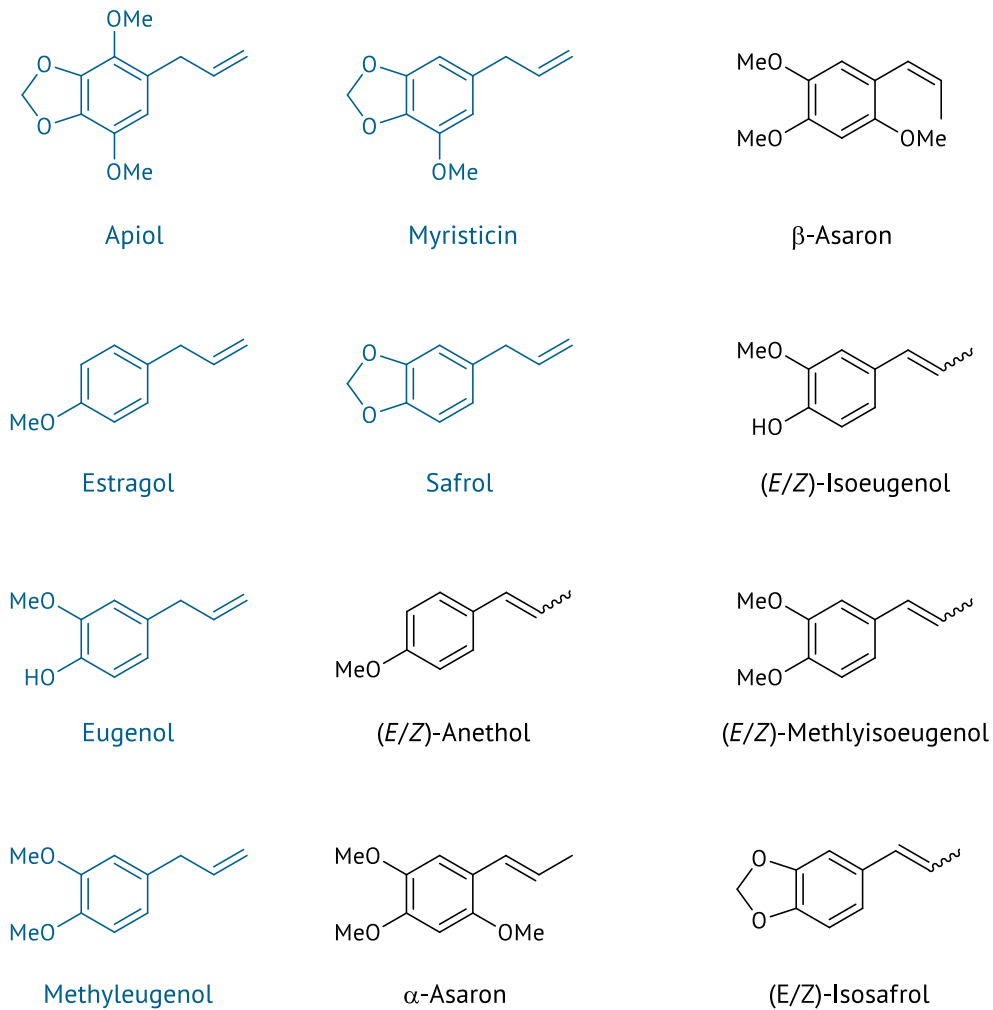


Abbildung 2-3: Strukturen der bekanntesten Vertreter der Phenylpropene. Allylische Phenylpropenen in blau, 1-propenylische Phenylpropenen in schwarz.

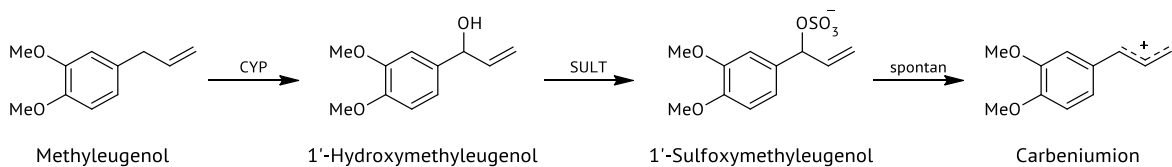


Abbildung 2-4: Metabolische Aktivierung von allylischen Phenylpropenen am Beispiel von Methyleugenol. CYP: Cytochrom P 450 Enzyme, SULT: Sulfotransferase.

Die 1-propenylischen Vertreter Anethol und Isosafrol zeigen keine oder keine eindeutige kanzerogene Wirkung *in vivo* (IARC, 1976; Kim *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1983; Purchase *et al.*, 1992; Wiseman *et al.*, 1987). Im Gegensatz hierzu zeigt die 1-propenylischen Verbindungen Isoeugenol positive Effekte lediglich bei männlichen Mäusen, und die beiden 1-propenylischen Asarone, α- und β-Asaron sind kanzerogen im Tierversuch (Wiseman *et al.*, 1987).

2.1.2 Chemische Kanzerogenese

Als Kanzerogenese wird der Prozess der Entstehung von malignen (bösartigen) Tumoren, für welche endogene und exogene Faktoren wie Chemikalien, ionisierende Strahlung und Viren verantwortlich sind bezeichnet. Diese Faktoren werden als Kanzerogene bezeichnet. Unter chemischen Kanzerogenen sind Substanzen definiert, die:

- Tumoren induzieren, welche in nicht-exponierten Individuen nicht entstehen.
- Tumoren mit einer erhöhten Inzident induzieren, welche auch in nicht-exponierten Individuen entstehen.
- zur früheren Entwicklung von Tumoren führen als in nicht-exponierten Individuen.
- die Multiplizität von Tumoren erhöhen.

Sowohl die Anzahl der Tumore als auch die Latenzzeit bis zur Tumorentstehung ist abhängig von der Dosis des Kanzerogens. Es kann zwischen direkten und indirekten Kanzerogenen unterschieden werden. Direkte Kanzerogene wirken unverändert, also direkt kanzerogen, indirekte Kanzerogene hingegen müssen erst metabolisch aktiviert werden, sodass die gebildeten Metaboliten die eigentlich kanzerogen wirkenden Verbindungen sind. Weiter wird unterschieden, ob es sich um ein genotoxisches Kanzerogen, d. h. eine Substanz, welche mit der DNA interagiert und Mutationen auslösen kann, oder um ein nicht-genotoxisches Kanzerogen, d. h. eine Substanz, die Prozesse wie die Zellproliferation beeinflussen und eher als Tumorpromotor wirken kann, handelt (Marquardt, 2013; Vohr, 2010).

Die chemische Kanzerogenese wird heute als komplexer und mehrstufiger Prozess betrachtet, welcher aus mindestens drei Phasen, der Initiation, der Promotion und der Progression besteht. Als Initiation wird die Erzeugung einer Mutation durch ein DNA-schädigendes Agens verstanden, welches zu einer irreversiblen Veränderung des Erbgutes führen kann. Dies ist ein sehr seltenes und auf einzelne Zellen begrenztes Ereignis, mit welchem die initiierte Zelle einen Wachstumsvorteil erlangt, welche in dieser Phase sehr gering ist und ohne Promotion nur sehr langsam erfolgt. Die Initiation kann schnell und schon nach einmaliger Exposition erfolgen. Aufgrund der geringen phänotypischen Veränderung von initiierten Zellen sind diese nur schwer von normalen Zellen zu unterscheiden. Die Promotion wird als Prozess der Beschleunigung der Tumorentstehung verstanden. Ohne vorhergehende Initiation führen tumorpromovierende Substanzen nicht zu Tumoren. Ihre Exposition benötigt einen längeren Zeitraum und für die meisten Tumorpromotoren wird auch eine Schwellendosis angenommen. Dieser Prozess ist, im Gegensatz zur Initiation, reversibel. Tumorpromotoren wirken auf das gesamte Gewebe und führen zu einer selektiven Vermehrung der initiierten Zellen. Hieraus entsteht eine Vergrößerung der präneoplastischen Population, welche zur Bildung eines benignen Tumors führt. Während der Progression findet nun

die Umwandlung von Präneoplasien und benignen Tumoren in malignen Tumoren statt. Dieser Prozess beinhaltet zahlreiche genetische und phänotypische Veränderungen und führt auch oft zum Verlust oder der Inaktivierung von Genen, welche für z. B. die DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose etc. verantwortlich sind. Phänotypisch lässt sich ein weitestgehend uneingeschränktes Wachstum unter Verdrängung von gesundem Gewebe feststellen. Weiter findet auch eine Umprogrammierung zugunsten der Energiegewinnung und der Synthese von Makromolekülen für die Zellvermehrung statt (Fahrer und Kaina, 2017; Lohs *et al.*, 1999; Marquardt, 2013; Vohr, 2010).

Zur Verhinderung von Promotion und Progression bestehen verschiedene Kontroll- und Abwehrmechanismen, welche das Entstehen von initiierten Zellen verhindern sollen. DNA-Schäden können noch vor der Manifestation einer Mutation repariert werden. Dies kann auf verschiedene Wegen ablaufen, welche stark von der Art des DNA-Schadens abhängig sind. So wird zum Beispiel die Methylierung am O⁶ des Guanins durch direkte Schadensreversion enzymatisch (O⁶-Methylguanin-Methyltransferase; MGMT) rückgängig gemacht. Alkylierte oder oxidierte Basen, sowie Einzelstrangbrüche können mittels Basenexzisionsreparatur (BER) behoben werden. Hierbei werden zunächst die betroffenen Basen ausgeschnitten, sodass eine apurinische oder apyrimidinische (AP) Stelle entsteht. Nach Ausschneiden der AP-Stelle zusammen mit einigen Nachbar-Nukleotiden erfolgt die Neusynthese anhand des intakten unveränderten Gegenstrangs. Kommt es aufgrund von sperrigen DNA-Addukten oder Cyclobutandimeren (z. B. durch photoinduzierte Dimerisierung benachbarter Thymin-Reste) zur Verzerrung der helikalen Struktur der DNA, so wird die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) aktiv. Durch Ausschneiden eines größeren Bereichs (ca. 30 Nukleotide), welcher den Schaden enthält, wird durch die Information des Gegenstrangs der betroffene Bereich neu synthetisiert. Bei Basenfehlpaarungen greift die Mismatch-Reparatur (MMR), welche im Grunde wie die BER und NER ablaufen. Doppelstrangbrüche werden über homologe Rekombination (HR) oder nicht-homologe Endenvereinigung (*non-homologous end joining*, NHEJ) repariert. Während bei der HR das homologe Chromosom als Vorlage für die Verbindung und Neusynthese dient, werden bei der NHEJ die Enden der Doppelstränge ohne Vorlage verbunden. Diese Reparatur ist deutlich fehleranfälliger als die HR, wird jedoch benötigt, da die HR nur in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus ablaufen kann (Fahrer und Kaina, 2017; Vohr, 2010). Ein weiterer Mechanismus zur Eliminierung von initiierten Zellen ist die Induktion der Apoptose. Persistiert ein DNA-Schaden, so kann dieser Prozess, welcher auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, ausgelöst werden. Die Apoptose ist ein streng regulierter Weg, welcher in den extrinsischen (rezeptorvermittelten) und den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg eingeteilt werden kann, welche beide durch einen DNA-Schaden induziert werden können. Der so eingeleitete Zelltod sorgt nun dafür, dass Zellen mit geschädigtem Erbgut eliminiert

werden und somit die Tumorentstehung verhindert werden kann (Fahrer und Kaina, 2017; Vohr, 2010).

2.2 Asarone

2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

α -Asaron (1,2,4-Trimethoxy-5-[(1*E*)-1-propen-1-yl]benzol, CAS: 2883-98-9) und β -Asaron (1,2,4-Trimethoxy-5-[(1*Z*)-1-propen-1-yl]benzol; CAS: 5273-86-9) haben die Summenformel $C_{12}H_{16}O_3$ und ein Molekulargewicht von $208,254 \text{ g mol}^{-1}$. β -Asaron weist eine Dichte von $1,082 \text{ g cm}^{-3}$ auf. Bei Raumtemperatur (RT) liegt α -Asaron als farbloser, kristalliner Feststoff vor. Sein Schmelzpunkt liegt bei $57\text{--}61 \text{ }^\circ\text{C}$ und sein Siedepunkt bei $296 \text{ }^\circ\text{C}$. Im Gegensatz dazu liegt β -Asaron mit einem Schmelzpunkt von $16\text{--}18 \text{ }^\circ\text{C}$ bei RT als farbloses Öl vor. Unterhalb dieser Temperatur bildet es farblose Kristalle (Cartus, 2014). Beide Isomere sind sehr schwer löslich in Wasser, jedoch leicht löslich in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Chloroform, Acetonitril oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

Asarone zählen zu den Phenylpropanoiden und hier zu der Gruppe der Phenylpropene. Strukturell unterscheiden sich α - und β -Asaron nur in der Konfiguration der Doppelbindung der Seitenkette. Sie besitzen einen Benzolring als Grundgerüst, welcher mit drei Methoxygruppen in Position 2, 4 und 5 substituiert ist. Weiter trägt der Benzolring in 1-Position eine propenylische Seitenkette, welche bei α -Asaron *trans*-konfiguriert und bei β -Asaron *cis*-konfiguriert ist. Ein weiterer Vertreter der Gruppe der Asarone ist das γ -Asaron eine allylische Seitenkette besitzt (Abbildung 2-5).

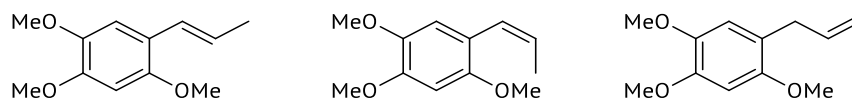


Abbildung 2-5: Strukturformeln von α -Asaron (links), β -Asaron (mitte) und γ -Asaron (rechts).

Da in dieser Arbeit nur die 1-propenylischen Asarone behandelt werden, wird in den weiteren Kapiteln auch primär auf diese eingegangen. Grund dafür ist, dass sich in den vorausgegangenen und parallel durchgeführten Arbeiten (DFG Projektnr. 241845322) von Kerstin Berg, Alexander Cartus und Sabrina Hauptenthal gezeigt haben, dass γ -Asaron im Vergleich zu den 1-propenylischen Asaronen keine oder nur eine geringe Bedeutung für die Risikobewertung der Asarone in pflanzliche Lebensmittel hat. Dies lässt sich weiter dadurch begründen, dass die Exposition gegenüber γ -Asaron vermutlich gering ist und in den Untersuchungen zur Mutagenität im Ames-Fluktuations-Test keine Hinweise auf ein mutagenes Potential gefunden werden konnten (Berg *et al.*, 2016).

2.2.2 Vorkommen und Verwendung

Asarone kommen natürlich als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in diversen Gewürz- und Kräuterpflanzen vor (COE, 2005; Hu und Feng, 2000; Satyal *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2007; Rana *et al.*, 2013). Der prominenteste Vertreter ist hier die Kalmuspflanze (*Acorus calamus* L.) aus der Familie der *Acoraceae* (Kalmusgewächse). Bekannt sind bisher 27 unterschiedliche Kalmus Genotypen, welche sich sowohl in der Menge an ätherischem Öl (2,8–9,5 %) als auch im Gehalt an α - und β -Asaron im ätherischen Öl unterscheiden. Die Spannweite reicht für α -Asaron von 0,83–16,82 % und für β -Asaron von 66–92 % (Rana *et al.*, 2013). Hierbei spielen sowohl Herkunft als auch die Varietät der Kalmuspflanzen eine große Rolle. Im ätherischen Öl der indischen tetraploiden Varietät sind bis zu 95 % β -Asaron zu finden, wohingegen die triploide europäische Varietät nur ca. 10 % β -Asaron enthält (COE, 2005). Kalmusöl aus Pflanzen der diploiden Varietät, welche auch als eigene Gattung, *Acorus americanus* RAF. beschrieben wird, enthält kein β -Asaron (Zuba und Byrska, 2012). Neben diesen beiden Hauptkomponenten kann das ätherische Öl der Kalmuspflanze auch geringe Gehalte an γ -Asaron (2,0–2,3 %) enthalten (Satyal *et al.*, 2013). Weitere Pflanzen, welche hohe Gehalte an α -Asaron aufweisen sind *Asarum europaeum* L. (gewöhnlicher Haselwurz) aus der Familie der *Aristolochiaceae* (Osterluzeigewächse) und *Guatteria gaumeri* GREENMAN aus der Familie der *Annonaceae* (Annonengewächse) (Enríques *et al.*, 1980; Oprean *et al.*, 1998).

In der traditionellen chinesischen und mexikanischen Medizin finden das ätherische Öl und Auszüge aus verschiedenen Pflanzenteilen von asaronhaltigen Pflanzen Anwendung um u. a. Atemwegserkrankungen, Nervenkrankheiten und erhöhten Cholesterinspiegel zu behandeln (Rajput *et al.*, 2014). Da diese Pflanzen schon über 2000 Jahre als Phytopharmaka Anwendung finden, sind α - und β -Asaron häufig beforschte Phytochemikalien, wobei der Hauptfokus der Forschung auf die pharmakologischen Aktivität der Substanzen liegt (Chellian *et al.*, 2017).

α -Asaron oder Auszüge der Rinde von *Guatteria gaumeri* GREENMAN, sind in der Lage das Serumcholesterin in hypercholesterolemischen Mäusen und Ratten zu senken (Chamorro *et al.*, 1998; Rodríguez-Páez *et al.*, 2003). In einer Studie mit männlichen Wistar Ratten zeigten Garduño-Siciliano *et al.* (2007), dass eine 5-tägige orale Aufnahmen von $80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Asaron den Gallenfluss erhöhen konnte und den Cholesterinspiegel im Serum und der Gallenflüssigkeit senkte. Weiter konnte eine abgeschwächte Expression von proinflammatorischen Cytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) im Hippocampus Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Mäuse nach Vorbehandlung mit α -Asaron (30 mg kg^{-1} *p. o.* einmal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen) gezeigt werden (Shin *et al.*, 2014). In zellfreien Assays wirkte α -Asaron im Bereich von 20–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konzentrationsabhängig antioxidativ als Superoxidfänger, Hydroxyfänger und Lipidperoxidase-Hemmer (Asha Devi *et al.*, 2014).

OF1-Mäuse, welchen eine Woche lang täglich 100 mg kg^{-1} α -Asaron *i. p.* appliziert wurde, hatten eine erhöht Aktivität der Enzyme Glutathionperoxidase und -reduktase in den Gehirnregionen Kortex, Striatum und Hippocampus. Die Superoxid-Dismutase-Aktivität war nur in den Regionen Striatum und Hippocampus erhöht (Pages *et al.*, 2010). Antiepileptische Effekte bei Mäusen nach oraler Aufnahme von bis zu $200 \text{ mg (kg KG)}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Asaron konnten durch Reduktion der Anfallshäufigkeit nach Elektroschocks gezeigt werden (Chen *et al.*, 2013).

α -Asaron-haltige Drogen wurden und werden daher in der traditionellen mexikanischen und chinesischen Medizin zur Senkung des Cholesterinspiegels und zur Behandlung zentralnervöser Erkrankungen wie Epilepsie eingesetzt.

Hingegen zeigt β -Asaron nach oraler Aufnahme ($25 \text{ mg mg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 28 Tage) eine antidepressive Wirkung in Sprague-Dawley (SD) Ratten, welche chronischem, unvorhersehbarem leichten Stress (*chronic unpredictable mild stresses* (CUMS)) ausgesetzt waren, durch die Induktion der hippocampalen Neurogenese (Dong *et al.*, 2014). Einige Studien (Maus und Ratte) deuten darauf hin, dass β -Asaron bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer durch dessen neuroprotektive und antiapoptotische Wirkung gegen neuronale Apoptose und Abschwächung von Neuroinflammation hilfreich sein könnte (Chen *et al.*, 2014; Geng *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

2.2.3 Toxikokinetik

Die orale Bioverfügbarkeit von α - und β -Asaron ist recht gering, was in dem ausgeprägten *First-Pass*-Effekt beider Verbindungen in der Leber begründet liegt (Chellian *et al.*, 2017).

Lu *et al.* (2014) beschreiben die orale Bioverfügbarkeit von α -Asaron bei männlichen SD-Ratten mit 18,9 %. Hier wurden den Tieren einmalig eine Dosis von $40 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ verabreicht. Die mittlere Verweildauer (MRT, *mean residence time*) betrug 55,5 min bei einer maximalen Plasmakonzentration von $1,56 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ und einer *Area under the curve* (AUC) $_{0-180 \text{ min}}$ von $68,8 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In dieser Studie wurden auch die kinetischen Parameter der intranasalen und intravenösen Applikation von α -Asaron untersucht. Es zeigte sich eine intranasale Bioverfügbarkeit von 81,3 %. Die MRT, die maximale Plasmakonzentration und die AUC $_{0-180 \text{ min}}$ der intranasalen Aufnahme lagen im Bereich der oralen Aufnahme, wobei hier nur ein Viertel der Dosis ($10 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$) appliziert wurde (Lu *et al.*, 2014). Weiter wurde eine schnelle Verteilung in Leber und Gehirn nach oraler Exposition beobachtet, welches zum einen den *First-Pass*-Effekt für α -Asaron – nach intranasaler und intravenöser Applikation wurden nur geringe Konzentrationen α -Asaron in der Leber beobachtet – und zum anderen auch die Möglichkeit der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zeigte (Lu *et al.*, 2014).

In zwei Studien aus dem Jahr 2012 untersuchten Fang *et al.* (2012a, b) die kinetischen Parameter von β -Asaron nach *i. v.* Applikation ($30 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$) an männlichen und weiblichen Kaninchen. Sie konnten zeigen, dass hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen bestand. Mit einer Plasmahalbwertszeit von 82,8 min und einer $\text{AUC}_{0-\infty}$ von $359,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ konnte eine rasche Resorption und anhand des Konzentrations-Zeit-Profiles eine Kinetik erster Ordnung beschrieben werden, welche einem linearen Zwei-Kompartimenten-Modell entspricht. Neben den kinetischen Parametern im Blutplasma wurden fünf verschiedenen Hirnregionen (Hippocampus, Kortex, Thalamus, Kleinhirn und Hirnstamm) untersucht. Die Konzentrationen in den Hirnarealen überstiegen die zeitgleiche Konzentration im Plasma und die Halbwertszeiten in diesen Regionen waren länger als im Blutplasma. Die Autoren schlossen daraus auf eine gute Blut-Hirnschranken-Durchlässigkeit und eine hohe Affinität zu Hirngewebe von β -Asaron. Weiter wurde die Exkretion von β -Asaron untersucht. Hierzu wurden nach 6, 12 und 24 h Urin und Faeces gesammelt und nach 24 h zusätzlich die Gallenflüssigkeit. Innerhalb der ersten 12 h wurde ein Großteil der verabreichten Menge an β -Asaron ausgeschieden. Innerhalb von 24 h wurden 62 % über den Urin und 22 % über die Faeces ausgeschieden. Nach 24 h konnten weitere 16 % in der Gallenflüssigkeit detektiert werden. Von der eingesetzten Menge an β -Asaron wurden 20 % als α -Asaron ausgeschieden, was indizierte, dass eine Umwandlung von β - in α -Asaron bis zur Exkretion stattfindet.

Im Jahr 2013 wurde von Meng *et al.* die Kinetik von α - und β -Asaron an männlichen SD-Ratten ($n = 6$) untersucht. Nach oraler Gabe von $200 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ des ätherischen Öls von *Acorus tatarinowii* SCHOTT, welches 11,4 % α -Asaron und 74,0 % β -Asaron enthielt, wurden zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 300, 480, 720, 960 und 1200 min Blutproben gesammelt. Die Plasmahalbwertszeit betrug bei beiden Verbindungen ca. 1 h. α -Asaron erreichte eine maximale Plasmakonzentration von $0,53 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ nach 11,25 min und β -Asaron eine Konzentration von $2,47 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ nach 13,75 min. Die $\text{AUC}_{0-\infty}$ betrug $57 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für α -Asaron und $408 \text{ mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für β -Asaron. Die Ergebnisse der Konzentration-Zeit-Kurve zeigten für beide Asarone eine Kinetik nach einem offenen Zwei-Kompartimenten-Modell an.

Eine weitere Kinetik-Studie wurde 2018 von Yang *et al.* durchgeführt. Männliche SD-Ratten ($n = 5$) erhielten eine einmalige Dosis von $2,22 \text{ mg kg}^{-1}$ β -Asaron oder $2,36 \text{ mg kg}^{-1}$ α -Asaron *i. v.* und im Anschluss wurden zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150 min Blutproben genommen. Über eine nicht-kompartimentelle Datenanalyse konnte eine $\text{AUC}_{0-\infty}$ von $21,28 \text{ } \mu\text{g min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ für α -Asaron und $12,20 \text{ } \mu\text{g min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ für β -Asaron ermittelt werden. Die Plasmahalbwertszeit betrug 28,9 und 13,4 min für α - und β -Asaron und mit maximalen Plasmakonzentrationen von 728 mg ml^{-1} und 611 mg ml^{-1} für α - und β -Asaron.

Untersuchungen an Mäusen, welche v. a. in vielen pharmakologischen Studien als Versuchstier Verwendung finden, zur oralen Bioverfügbarkeit sowie der Verteilung und Exkretion sind in der

Literatur nicht zu finden. Weiter sind die Erkenntnisse der oralen Aufnahme zu α - und β -Asaron in Ratten nur limitiert vorhanden. Es wurde jeweils nur eine Konzentration getestet und nur im Fall von α -Asaron ist die Verteilung im Organismus beschrieben (Lu *et al.*, 2014; Fang, *et al.*, 2012a; Fang, *et al.*, 2012b; Meng *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2018).

2.2.4 Metabolismus

Im Rahmen des DFG-Projektes „Metabolismus und Gentoxizität in der Nahrung vorkommender kanzerogener Phenylpropanoide“ beschäftigte sich Alexander Cartus unter anderem mit der Aufklärung des mikrosomalen Metabolismus von α - und β -Asaron.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Daten und Hypothesen zum Metabolismus der beiden Asarone vor. So identifizierten Hasheminejad und Caldwell (1994) *trans*- und *cis*-2,4,5-Trimethoxyzimtsäure als Hauptmetaboliten von α - und β -Asaron im Mediumüberstand primärer Hepatozyten (pRH) aus Fischer 344-Ratten nach 20-stündiger Inkubation mit jeweils 0,1 mM der Testsubstanzen. Pandit *et al.* (2011) zeigten, dass α -Asaron in einer ethanolischen Lösung in der Lage ist die Aktivität der CYPs in Rattenlebermikrosomen (RLM) um 15,2 % zu hemmen. Der IC_{50} -Wert der CYP 3A4-Hemmung lag hier bei $65,2 \pm 2,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Pandit *et al.*, 2011).

Die Hypothese, dass α - und β -Asaron über einen anderen Metabolismus-Weg einen Metaboliten bilden, welcher als ultimates Kanzerogen fungieren kann, wurde schon 1987 von Wiseman *et al.* aufgestellt. Als alternative Metabolismusroute wurde die Epoxidierung der Seitenkette vorgeschlagen. Auch Kim *et al.* (1999) postulierten die Bildung eines Epoxides, um das kanzerogene Potential von α -Asaron zu erklären. Jedoch hatte sich bis *dato* niemand mit der systematischen Aufklärung der mikrosomal gebildeten Metaboliten beschäftigt.

2.2.4.1 Metabolismus von α -Asaron

An Aroclor 1254-vorbehandelten Rattenlebermikrosomen (ARLM) wurde qualitativ und quantitativ der Metabolismus von α -Asaron untersucht (Cartus und Schrenk, 2016). Als Hauptmetaboliten stellten sich (*E*)-3'-Hydroxyasaron und dessen Oxidationsprodukt (*E*)-3'-Oxoasaron heraus. Weitere nachgewiesene Metaboliten waren die Seitenkettendirole *threo*- und *erythro*-1',2'-Dihydrodihydroxyasaron, das Keton 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton und die *O*-demethylierte Verbindung (*E*)-6-Hydroxyasaron. Mutmaßlich werden auch die *O*-demethylierten Metaboliten (*E*)-4-Hydroxyasaron und (*E*)-3-Hydroxyasaron sowie das Epoxid (*E*)-1',2'-Asaronepoxid (α -Asaronepoxid) gebildet (Abbildung 2-6).

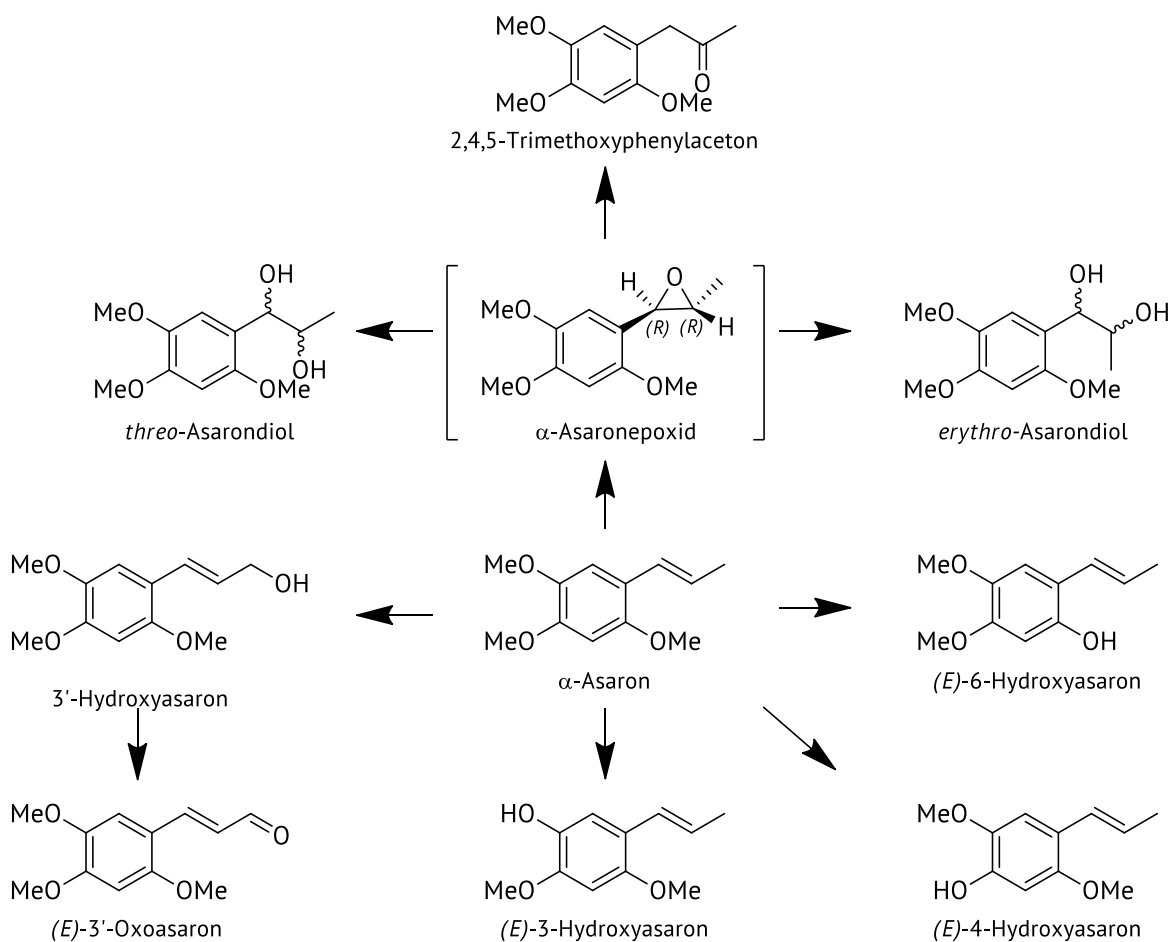


Abbildung 2-6: Mikrosomaler Metabolismus von α -Asaron modifiziert nach Cartus und Schrenk 2016.

Da bereits im Jahr 2000 von Mohan *et al.* (2000) die spontane Hydrolyse von *cis*-Anetholepoxid beschrieben wurde, haben Cartus und Schrenk (2016) diese auch für die beiden Epoxide, α - und β -Asaronepoxid untersucht um die Bildung des gefundenen Ketons zu erklären. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass beide Epoxide in einer wässrigen Lösung innerhalb von 4 min quantitativ in das Keton und die beiden Dirole übergehen. Das Produktspektrum dieser Umsetzung ist stark vom pH-Wert abhängig. Unter den bei mikrosomalen Inkubationen

herrschenden Bedingungen (pH 7,4) konnte bei α -Asaronepoxid eine Umsetzung von 16 % zum Keton und bei β -Asaronepoxid eine Umsetzung von 5,1 % zum Keton beobachtet. Das Verhältnis der beiden gebildeten Dirole lag bei beiden Epoxiden von *erythro*- zu *threo*-Asarondiold bei 1:4. Dieses Verhältnis wurde auch in mikrosomalen Inkubationen beobachtet (Cartus *et al.*, 2015).

Quantitative Untersuchungen zur Bildung der mikrosomalen Metaboliten von α -Asaron wurden bei einer konstanten Substratkonzentration von 500 μ M in ARLM, RLM, Rinderlebermikrosomen (BLM) Schweinelebermikrosomen (SLM) und humanen Lebermikrosomen (HLM) durchgeführt (Cartus und Schrenk, 2016). Nach 1 h Inkubation wurden bereits 25 % der eingesetzten Menge an α -Asaron von ARLM zu (*E*)-3'-Hydroxyasaron umgesetzt. Als Summe der Dirole wurden 9,3 % der eingesetzten Menge an α -Asaron identifiziert. In geringeren Mengen ließen sich das Keton (0,7 %), das (*E*)-3'-Oxoasaron (2 %) und *O*-demethylierte Verbindungen (1,8 %) nachweisen. Die gefundene Menge an Metaboliten unterschied sich zu der in Mikrosomen der Spezies Rind und Mensch gebildeten kaum. Jedoch zeigten SLM ein anderes Bild. Hier überwog die Bildung der Seitenkettendirole. In nicht-induzierten RLM wurde die geringste Bildung der Seitenkettendirole beobachtet. 2,7 % dieser Metaboliten wurden in der ersten Stunde gebildet. Hier überwog die Bildung von (*E*)-3'-Hydroxyasaron (15 %), wobei dessen Oxidationsprodukt mit 1,2 % nur in geringen Mengen detektiert wurde (Cartus und Schrenk, 2016).

Bei der Untersuchung der Bildung der Metaboliten in Abhängigkeit zur Substratkonzentration stellte sich heraus, dass bei ARLM, RLM, BLM, und HLM die Bildung von (*E*)-3'-Hydroxyasaron bei niedrigen Substratkonzentrationen überwog. Bei höheren Startkonzentrationen wurden mehr Seitenkettendirole gebildet, was für eine ausgeprägtere Metabolisierung über den Epoxid-Weg spricht. Eine Ausnahme stellen hier SLM dar. Bei niedriger Konzentration von α -Asaron wurde vermehrt eine *O*-Demethylierung beobachtet, wohingegen die Epoxidierung weitestgehend unabhängig von der Substratkonzentration ablief (Cartus und Schrenk, 2016).

Um das Metabolitenspektrum in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen humanen CYPs zu untersuchen, wurden auch Versuche mit Supersomes™ durchgeführt (Cartus, 2014). Supersomes™ sind Mikrosomen aus Insektenzellen (Sf9) welche selektiv durch Transfektion mit Baculoviren ein bestimmtes humanes CYP exprimieren und keinerlei basale Aktivität weiterer humaner CYPs besitzen. Es wurden sechs unterschiedliche humane CYPs mit dieser Methode untersucht: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4. Für CYP1A2 konnten nur die Metaboliten (*E*)-3'-Hydroxyasaron und dessen Oxidationsprodukt (*E*)-3'-Oxoasaron gefunden werden, wobei diese Umsetzung fast quantitativ innerhalb 1 h ablief (Abbildung 2-7). Weiterhin war CYP3A4 das einzige Enzym, welche in der Lage war, neben (*E*)-3'-Hydroxyasaron auch die Seitenkettendirole und das Keton zu bilden (Cartus, 2014).

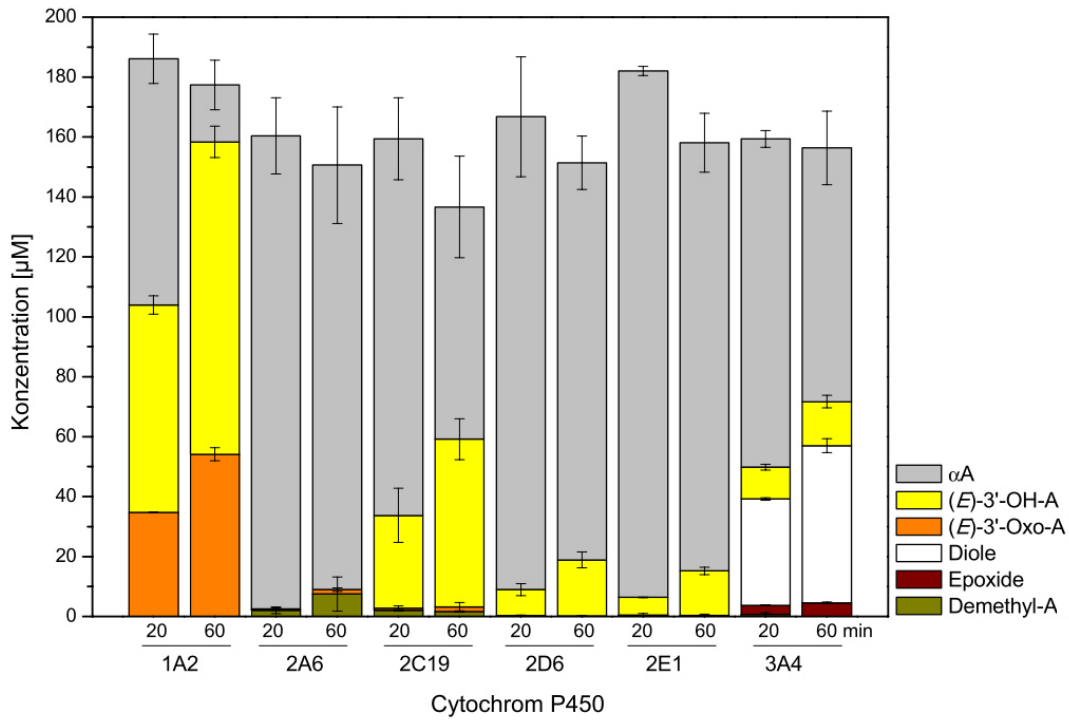


Abbildung 2-7: Konzentration der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von 200 μM α-Asaron (1 % Acetonitril). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge. αA: α-Asaron, (E)-3'-OH-A: (E)-3'-Hydroxyasaron, (E)-3'-Oxo-A: (E)-3'-Oxoasaron, Diole: Summe aus *erythro*- und *threo*-Asarondiold, Epoxide: Summe der Asaronepoxide, Demethyl-A: Summe der demethylierten Asaronmetaboliten (aus Cartus, 2014).

2.2.4.2 Metabolismus von β -Asaron

Der mikrosomale Metabolismus von β -Asaron wurde ebenso qualitativ in ARLM aufgeklärt (Cartus *et al.*, 2015). Identifiziert wurden die Metaboliten *threo*- und *erythro*-Dihydrodihydroxyasaron, (*E*)-3'-Hydroxyasaron, (*Z*)-3'-Hydroxyasaron, (*R/S*)-1'-Hydroxyasaron, 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton, die drei *O*-demethylierten Verbindungen (*Z*)-6-Hydroxyasaron, (*Z*)-4-Hydroxyasaron und (*Z*)-3-Hydroxyasaron sowie die Aldehyde (*E*)-3'-Oxoasaron und (*Z*)-3'-Oxoasaron (

Abbildung 2-8).

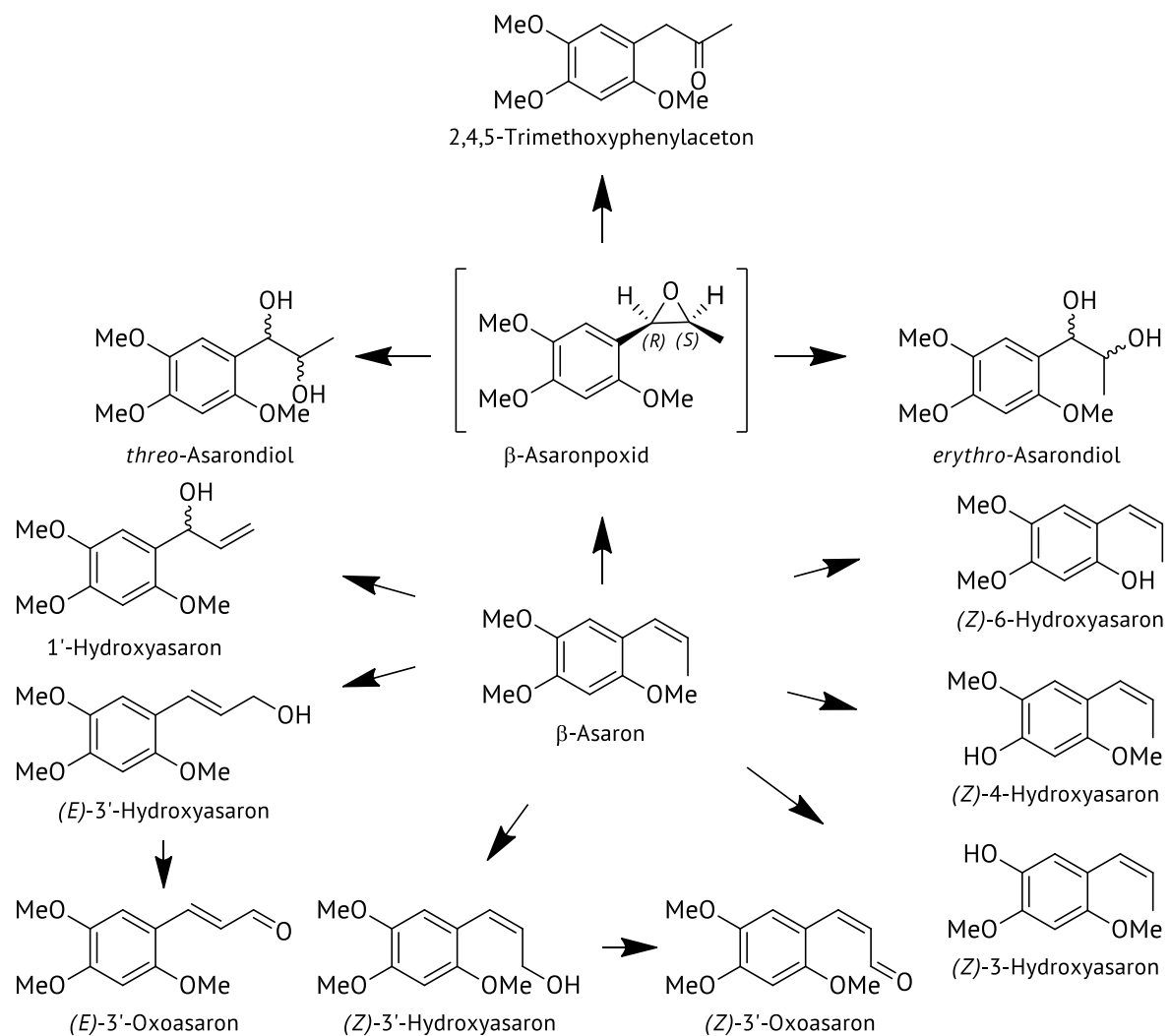


Abbildung 2-8: Mikrosomaler Metabolismus von β -Asaron, modifiziert nach Cartus *et al.* (2015).

Auch hier wurde das Asaronepoxid als reaktives Intermediat postuliert und gilt als Vorläufer der gebildeten Metaboliten 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton und der beiden Dirole (Cartus *et al.*, 2015).

Nach einstündiger Inkubation von ARLM wurden bereits 26 % der eingesetzten Menge an β -Asaron zu den beiden Diolen und dem Keton umgesetzt. Diese Gruppe der epoxidabgeleiteten Metaboliten

stellen somit die Hauptmetaboliten von β -Asaron dar. Gefolgt wird sie von der Gruppe der Seitenketten-Alkohole (15 %). Da es nicht möglich war diese chromatographisch zu trennen, wurden sie als Gruppe quantifiziert. Aufgrund von Untersuchungen mittels $^1\text{H-NMR}$ der Substanzen wurde eine Verteilung in Inkubationen mit ARLM von 18 % 1'-Hydroxyasaron, 12 % (*E*)-3'-Hydroxyasaron und 70 % (*Z*)-3'-Hydroxyasaron angenommen. In allen weiteren Inkubationen (RLM, BLM, SLM und HLM) wurde eine prozentuale Verteilung von 0 %, 20 % und 80 % angenommen. Die Oxo-Verbindungen sowie die *O*-demethylierten Verbindungen stellten mit 0,7 % und 1,6 % die minor-Metaboliten dar. Die relative Zusammensetzung des Metabolitenspektrums war bei allen untersuchten Mikrosomen sehr ähnlich, lediglich die absolute Menge der gebildeten Metaboliten variierte und ließ sich wie folgt ordnen: ARLM > HLM > BLM > SLM > RLM (Cartus *et al.*, 2015).

Die kinetischen Parameter zur konzentrationsabhängigen Bildung der Metaboliten von β -Asaron zeigten, dass im Gegensatz zu α -Asaron, für die Spezies ARLM, RLM, BLM und HLM, keine oder nur eine marginal geringe Abhängigkeit zur Substratkonzentration. Eine Ausnahme stellten auch hier SLM dar. Hier wird die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen bei geringer Substratkonzentration bevorzugt, was zum Nachteil der Bildung der Epoxid-abgeleiteten Metaboliten geschieht (Cartus *et al.*, 2015).

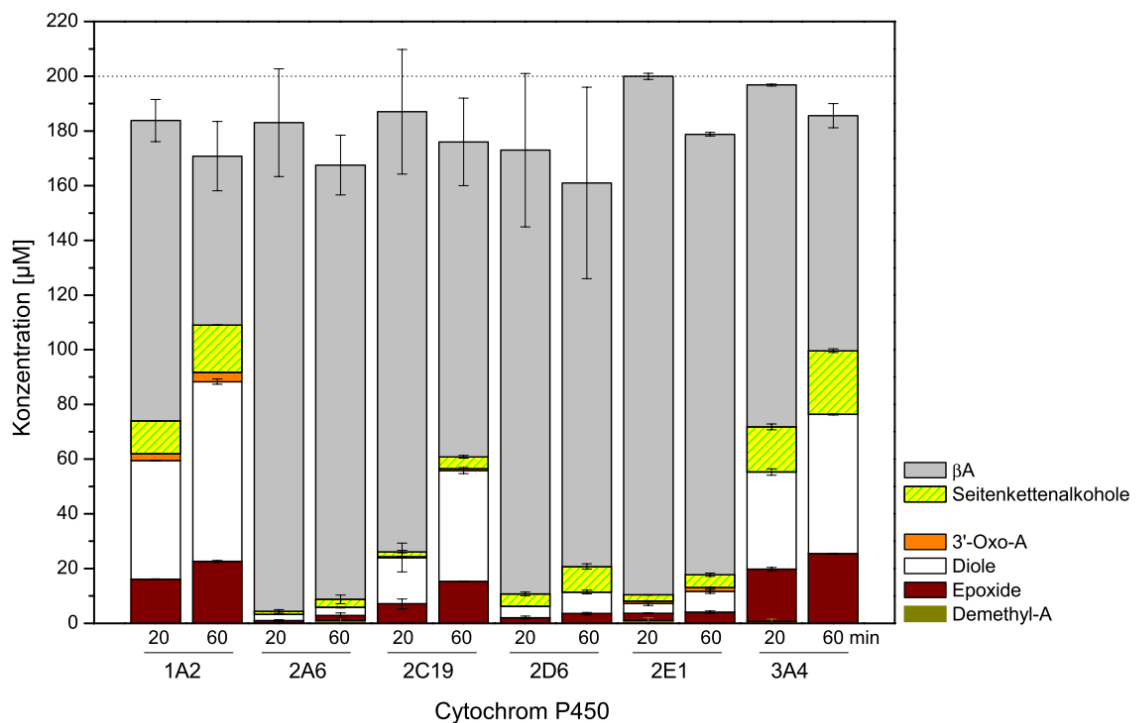


Abbildung 2-9: Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von 200 µM β -Asaron (1 % Acetonitril). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge β : β -Asaron, Seitenkettenalkohole: Summe aus 1'-Hydroxyasaron, (*E*)-3'-Hydroxyasaron und

(Z)-3'-Hydroxyasaron, 3'-Oxo-A: 3'-Oxoasaron, Diol: Summe aus *erythro*- und *threo*-Asarondiol, Epoxide: Summe der Asaronepoxide, Demethyl-A: Summe der demethylierten Asaronmetaboliten (aus Cartus, 2014).

Die Untersuchung der sechs humanen CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) mittels SupersomesTM ergab, dass alle sechs CYPs qualitativ ein sehr ähnliches Metabolitenspektrum generierten. Hauptmetaboliten waren, wie schon in den mikrosomalen Inkubationen, das Keton und die Seitenkettendirole, welche sich vom Epoxid ableiten (Abbildung 2-9). Daneben konnten die Seitenkettenalkohole auch durch alle sechs CYPs gebildet werden. Im Gegensatz dazu konnten die *O*-demethylierten Verbindungen nur in sehr geringen Mengen detektiert werden (Cartus, 2014).

2.2.5 Toxikodynamik

Neben den bereits genannten untersuchten pharmakologischen Eigenschaften von α - und β -Asaron ist auch schon seit den 80er Jahren die toxikologische Relevanz dieser Substanzen bekannt. Im Folgenden sollen die wichtigsten Studien zur Toxizität der beiden Verbindungen dargelegt werden.

2.2.5.1 Akute und subakute Toxizität

Die akute Toxizität von α - und β -Asaron ist relativ gering. So wurde für α -Asaron ein LD₅₀-Wert (halblethale Dosis) von >1000 mg (kg KG)⁻¹ nach oraler Applikation bei männlichen Swiss Mäusen ($n = 20$) ermittelt (Chen *et al.*, 2013). Geringere LD₅₀-Werte für α -Asaron wurden nach *i. p.*-Injektion an Balb/c-Mäusen ($n = 10$) berechnet, 245,2 mg (kg KG)⁻¹ und 225,5 mg (kg KG)⁻¹ (JECFA, 1981; Morales-Ramírez *et al.*, 1992). Der LD₅₀-Wert nach oraler Aufnahme lag für β -Asaron bei 1010 mg (kg KG)⁻¹ in der Ratte und 1560 mg (kg KG)⁻¹ in der Maus (JECFA, 1981; L. Liu *et al.*, 2013).

Klinische Symptome der akuten α -Asaron-induzierten Toxizität nach *i. p.*-Applikation bei Mäusen waren Koordinationsstörungen (Ataxie), Atemnot (Dyspnoe), herabhängende Augenlider (Ptosis) sowie aufgestelltes Fell (Piloerektion) (Morales-Ramírez *et al.*, 1992). Nach 5-tägiger *i. p.*-Injektion von 100 mg (kg KG)⁻¹ β -Asaron an 4–8 Wochen alten SD-Ratten konnte eine systemische Toxizität in Form einer Reduktion des Körpergewichts und der Futteraufnahme beobachtet werden. Des Weiteren waren klinische Symptome, wie Ptosis und Piloerektion zu beobachten (Ramos-Ocampo und Hsia, 1988).

2.2.5.2 Zytotoxizität

Es wurden bereits zahlreiche Studien zur Zytotoxizität von α - und β -Asaron in diversen Zellsystemen und mit verschiedenen Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Die Daten zur Zytotoxizität zeigen, dass α - und β -Asaron einen schwachen oder moderaten zytotoxischen Effekt auf die untersuchten Zelltypen

haben. Die Zytotoxizität beider Substanzen konnte sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig in den Testsystemen beobachten werden. Nach 72-stüniger Inkubation mit α - und β -Asaron wurden in allen getesteten Zelllinien eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation beobachtet. Weiter scheint die Stärke des zytotoxischen Effektes und damit einhergehend der berechnete EC_{50} -Wert stark vom betrachteten Endpunkt abzuhängen. Die Fähigkeit der Zellen Resazurin zu Resorufin zu reduzieren (Resazurin-Reduktions-Test, RRT) scheint ein deutlich empfindlicherer Endpunkt zu sein als die Membranintegrität, welche mit dem Laktatdehydrogenase-Leakage-Assay (LLA) bestimmt wird. Im RRT zeigten sich die metabolisch kompetenten pRH nach 24 h empfindlicher gegenüber α - und β -Asaron als die humane Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 bei vergleichbaren eingesetzten Konzentrationen.

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der EC_{50} -Werte des zytotoxischen Effektes von α - und β -Asaron in verschiedenen Zellsystemen sowie die untersuchte Behandlungsdauer und der verwendete Assay.

	EC_{50} [μ M]	Zellsystem	Behandlungs- dauer	Assay	Literatur
α-Asaron	~1000	pRH (F)	20 h	LLA	Hasheminejad and Caldwell, 1994
	1067	pRH (W)	24 h	LLA	Cartus, 2014
	109	H1	24 h	RRT	Berg, 2016
	131	F1	24 h	RRT	Berg, 2016
	204	tV79	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	221	THLE-2	72 h	WST-1	Patel <i>et al.</i> , 2015
	230	pRH (W)	24 h	RRT	Cartus, 2014
	31	HepG2	72 h	RRT	Berg, 2016
	362	V79	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	367	HepG2	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	70	F1	72 h	RRT	Berg, 2016
	88	H1	72 h	RRT	Berg, 2016
	93	V79	72 h	RRT	Berg, 2016
β-Asaron	~1000	pRH (F)	20 h	LLA	Hasheminejad and Caldwell, 1994
	532	HepG2	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	472	V79	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	419	HepG2	72 h	RRT	Berg, 2016
	361	U251	72 h	SRB	Li <i>et al.</i> , 2018
	313	F1	24 h	RRT	Berg, 2016
	201	pRH (W)	24 h	LLA	Cartus, 2014
	197	tV79	24 h	RRT	Haupenthal <i>et al.</i> , 2017
	193	THLE-2	72 h	WST-1	Patel <i>et al.</i> , 2015
	113	H1	72 h	RRT	Berg, 2016
	108	H1	24 h	RRT	Berg, 2016
	105	V79	72 h	RRT	Berg, 2016
	102	F1	72 h	RRT	Berg, 2016
	92	pRH (W)	24 h	RRT	Cartus, 2014

F1: V79-Zellen transfiziert mit Cytochrom P 450 1A2 und Sulfotransferase 1C1 der Ratte; H1: V79-Zellen transfiziert mit humanem Cytochrom P 450 1A2 und humaner Sulfotransferase 1A1*1; HepG2: humane Leberkarzinomzelllinie; pRH: primäre Rattenghepatozyten; THLE-2: humane Hepatozyten; tV79: V79-Zellen transfiziert mit humanem Cytochrom P 450 1A2 und humaner Sulfotransferase 1C2; V79: Hamster-Lungenfibroblasten; U251: humane Glioblastom-Zelllinie.

LLA: Laktatdehydrogenase-Leakage-Assay; RRT: Resazurin-Reduktions-Test; SRB: Sulforhodamine B-Assay; WST-1: Water-Soluble-Tetrazolium-Assay.

Eine Unterscheidung von α - und β -Asaron im Hinblick auf ihr zytotoxisches Potential ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich. Untersuchungen von Unger und Melzig (2012), welche die Zytotoxizität über die relative DNA-Synthese mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay darstellten, zeigten, dass für α -Asaron eine Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($240 \mu\text{M}$) ausreichten, um die Syntheserate um 50 % zu reduzieren, während im Falle von β -Asaron $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($480 \mu\text{M}$) nötig waren.

Der Mechanismus der Zytotoxizität von β -Asaron im Konzentrationsbereich von 30–960 μM wurde an U251-Glioma-Zellen untersucht. Nach 48 h zeigte sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Apoptoserate und des G1-Zellzyklusarrests durch Behandlung der Zellen mit β -Asaron (Li *et al.*, 2018). Auf Proteinebene wurde eine Aktivierung der Apoptose-auslösenden Liganden TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) und FasL (Fas-Ligand) beobachtet, eine vermehrte Spaltung der Caspasen 8 und 3 sowie die Freisetzung von Cytochrom *c*. Dies zeigte, dass sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg am Mechanismus der Apoptoseauslösung durch β -Asaron beteiligt sind (Li *et al.*, 2018). Ein erhöhte Apoptoserate und Induktion der Caspasen 3 und 7 wurde auch in THLE-2-Zellen nach 6- und 12-stündiger Behandlung mit α - und β -Asaron beobachtet (Patel *et al.*, 2015). Ähnliche Ergebnisse wurden in humanen Magenkrebszelllinien nach 24 h Inkubation mit 120 und 240 μM β -Asaron in Bezug auf die Apoptoserate gefunden (Wu *et al.*, 2015).

2.2.5.3 Gentoxizität und Mutagenität

Die Frage, ob α - und β -Asaron ein gentoxisches Potential besitzen und wenn ja, ob und welche Metaboliten dafür verantwortlich sind, ließ sich zu Beginn des DFG Projektes „Gentoxizität und Metabolismus von in der Nahrung vorkommenden Phenylpropanoiden“ mit der zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Literatur nicht beantworten. Vor allem die Arbeiten von Kerstin Berg und Sabrina Hauptenthal trugen zur Aufklärung dieser Frage bei.

Ein häufig eingesetzter Test, um das mutagene Potential von Chemikalien zu beurteilen, ist der sogenannte Ames-Test. Die Literaturdaten von α - und β -Asaron zu diesem Test zeigen ein widersprüchliches Bild. So wurde α -Asaron mit und ohne metabolische Aktivierung mittels Leberhomogenat (S9-Mix) in den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA98, TA100, TA1535, TA1537 und TA1538 von Hsia *et al.* (1979), Göggelmann und Schimmer (1983) Ramos-Ocampo und Hsia (1988) und Marczevska *et al.* (2013) negativ in Bezug auf ein mutagenes Potential getestet. Negative Ergebnisse für β -Asaron in diesen Stämmen lieferten Hsia *et al.* (1979) sowie Ramos-Ocampo und Hsia (1988) mit und ohne S9-Mix. Göggelmann und Schimmer (1983) publizierten für β -Asaron positive Ergebnisse ($43 \mu\text{g}$ pro Platte), jedoch nur in Stamm TA100 mit S9-Mix. Neuere Ergebnisse bestätigten diesen Befund. So wurde in dem *S. typhimurium* Stamm TA100 mit S9-Mix α -Asaron in

einer Konzentration von 150 µg/Platte und β-Asaron in einer Konzentration von 100 µg/Platte positiv getestet werden (Cassani-Galindo *et al.*, 2005). Lediglich für β-Asaron wurde bisher eine konzentrationsabhängiges mutagenes Potential (ab 50 µg/Platte) im Ames-Test mit S9-Mix im Stamm TA100 gezeigt (Liu *et al.*, 2013). α-Asaron (0–200 µg ml⁻¹) zeigte im *in vitro* Mikrokerntest (HepG2-Zellen+S9-Mix) keine Effekte (Unger und Melzig, 2012). β-Asaron zeigte positive Effekte ab einer Konzentration von 50 µg ml⁻¹ (Unger und Melzig, 2012; Kevekordes *et al.*, 2001). Dieser Effekt konnte im *in vivo* Mikrokerntest polychromatischer Erythrozyten des Knochenmarks von Swiss Mäusen (m+w) für β-Asaron nach einmaliger *i. p.*-Applikation von 182 mg (kg KG)⁻¹ nicht bestätigt werden (Asha Devi *et al.*, 2014).

Studien zur Gentoxizität von α- und β-Asaron lieferten ebenfalls widersprüchliche Daten. So wurden α- und β-Asaron im Konzentrationsbereich von 1–1000 µM im ungeplante DNA Synthese (UDS)-Assay in pRH einmal negativ (Ramos-Ocampo und Hsia, 1988) und einmal positiv (Hasheminejad und Caldwell, 1994) getestet. Bei der Untersuchung der Schwesterchromatidaustauschrates (SCE, *sister chromatid exchange*) zeigte α-Asaron sowohl *in vitro* in humanen Lymphozyten konzentrationsabhängig ab 60 µg ml⁻¹ als auch *in vivo* in Knochenmarkszellen von Balb/c-Mäusen (25–100 mg (kg KG)⁻¹, *i. p.*) eine Induktion von SCE-positiven Chromosomen beobachtet werden (Morales-Ramírez *et al.*, 1992). Kevekordes *et al.* (1999) beobachteten im *Escherichia coli* PQ37-Gentoxizitätstest (SOS-Chromotest) für β-Asaron (0,05–6,30 µg/Test) mutagene und gentoxische Effekte mit S9-Mix.

In der Arbeit von Kerstin Berg wurde das mutagenes Potential von α- und β-Asaron sowie deren Metaboliten im Ames-Fluktuationstest an den *S. typhimurium* Stämmen TA97a, TA98 und TA100 studiert. α- und β-Asaron zeigten mit und ohne S9-Mix keine Effekte in den Stämmen TA98 und TA97a (Berg *et al.*, 2016; Berg, 2016). In Stamm TA100 konnten konzentrationsabhängige Effekte von α- und β-Asaron mit S9-Mix beobachtet werden. Weiter zeigte der Ames-Fluktuationstest für γ-Asaron, dem allylischen Vertreter der Asarone, mit und ohne S9-Mix kein mutagenes Potential (Berg *et al.*, 2016).

Im Folgenden wurden auch einige Metaboliten von α- und β-Asaron auf ihr mutagenes Potential hin untersucht. Die Seitenkettendiolen *erythro*- und *threo*-Asarondiolen, das Keton 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton und 3'-Oxoasaron erwiesen sich als negativ in allen getesteten Stämmen mit und ohne metabolische Aktivierung. Die einzigen getesteten Metaboliten mit positivem Effekt im Ames-Fluktuationstest waren α- und β-Asaronepoxid. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg positiver *wells* im *S. typhimurium* Stamm TA100 ohne S9-Mix konnte für α- und β-Asaronepoxid beobachtet werden, wobei der Effekt ausgeprägter und bei geringeren Konzentrationen bereits signifikant für β-Asaronepoxid war. Bei der Inkubation mit S9-Mix fiel auf, dass die Anzahl an positiven *wells* bei gleicher Asaronepoxid-Konzentration im

Vergleich zur Bestimmung ohne S9-Mix geringer ausfiel. Die Anwesenheit von Epoxidhydrolasen und nukleophilen Bestandteilen im S9-Mix führten hier zu einem Abfangen bzw. Abreagieren der Epoxide, bevor diese einen mutagene Effekt auf die Zellen ausüben konnten. Auch zeigte das endständige γ -Asaronepoxid weder ohne noch mit S9-Mix einen mutagenen Effekt in allen getesteten *S. typhimurium* Stämmen (Berg *et al.*, 2016).

Im *in vitro* Comet-Assay haben Hauptenthal *et al.* (2017) das gentoxische Potential der Asaron-Isomere untersucht. In Hamster-Lungenfibroblasten (V79-Zellen) wurden Strangbrüche ab einer Konzentration von 1 μM bei α - und β -Asaron detektiert. Jedoch ergab die Behandlung mit einer Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG), welches einen Marker für oxidative DNA-Schäden darstellt, keine zusätzlichen Strangbrüche. In V79-Zellen, welche mit humanem Cytochrom P 450 1A2 und humaner Sulfotransferase 1C2 transfiziert waren (tv79-Zellen), war der Effekt ausgeprägter. Bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM induzierten α - und β -Asaron DNA-Strangbrüche und die Behandlung mit FPG führte bei beiden Isomeren zu einer Zunahme der Strangbruchrate ab einer Konzentration von 1 μM . In HepG2-Zellen konnte nur für α -Asaron ein signifikant-positiver Effekt ab 50 μM gezeigt werden, wobei keine FPG-sensitiven Stellen detektiert wurden. Für β -Asaron war ein leichter, konzentrationsabhängiger Trend im Anstieg der Schweifintensivität im Comet-Assay zu beobachten, jedoch erreichten die Werte keine statistische Signifikanz (Hauptenthal *et al.*, 2017). Bei der Untersuchung der γ -H2AX-Expression, einem Marker für Doppelstrangbrüche, zeigte sich in HepG2-Zellen ein ähnliches Bild. Für α -Asaron stieg die Expression ab 10 μM signifikant an, wohingegen β -Asaron einen konzentrationsabhängigen Trend zeigte, aber keine signifikante Expression (Hauptenthal *et al.*, 2017).

Insgesamt zeigen diese neusten Ergebnisse, dass α - und β -Asaron ein gentoxisches und mutagenes Potential nach metabolischer Aktivierung haben und dass α - bzw. β -Asaronepoxid höchstwahrscheinlich für die Mutagenität verantwortlich sind.

2.2.5.4 Reproduktionstoxizität

Im *Dominant-Lethal*-Test wurde α -Asaron an CF1-Mäusen getestet. Hierbei wurden männlichen Tieren ($n = 10$) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 0, 10 oder 30 mg (kg KG)^{-1} oral appliziert und anschließend mit unbehandelten Weibchen verpaart. In den behandelten Gruppen wurde ein erhöhter Postimplantationsverlust festgestellt. In der höchsten Dosisgruppe wiesen die Männchen eine erniedrigte Spermakonzentration und -motilität auf (Chamorro *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie mit α -Asaron an CF1-Mäusen, in welcher sowohl Männchen als auch Weibchen ($n = 10$) an fünf Tagen pro Woche und über einen Zeitraum von acht aufeinanderfolgenden Wochen jeweils 0, 10 oder 20 mg (kg KG)^{-1} verabreicht wurden, konnten keine reproduktionstoxischen Effekt nachgewiesen werden (Chamorro *et al.*, 1999). Bei Mäusen, welchen von Tag 6 bis 15 der Trächtigkeit

täglich 0, 5, 15, 30 oder 60 mg (kg KG)⁻¹ α -Asaron oral appliziert wurden, wurde eine erhöhte Embryoletalität ab 15 mg kg⁻¹ KG und in der höchsten Dosisgruppe zusätzlich Fehlbildungen des Fötus (Hydrozephalus, überzählige Rippen, Klumpfüße und Lippenspalten) beobachtet (Salazar *et al.*, 1992). Hühnereiembryos, welche α - oder β -Asaron in einer Konzentration von 0,04–4,00 mg/Ei in den Dottersack injiziert bekamen, zeigten keinerlei Effekt bei α -Asaron. Für β -Asaron konnte eine Überlebensrate von 43 % bei 0,04 mg pro Ei und eine 100%ige Letalität bei 4,00 mg pro Ei beobachtet werden (Yabiku, 1980).

Daten zu *in-vivo*-Untersuchungen der Reproduktionstoxizität von β -Asaron in Nagern fehlen gänzlich und die Datenlage zu α -Asaron ist, v. a. die *Dominant-Lethal*-Studien betreffend, sehr limitiert, jedoch muss aufgrund der positiven Testresultate ein reproduktionstoxisches Potential von α - und β -Asaron Verbindung vermutet werden.

2.2.5.5 Subchronische Toxizität

Die subchronische Toxizität von α - und β -Asaron wurde bisher nur wenig erforscht. Meist wurden zu diesem Thema Studien betrachtet, bei welchen Extrakte oder ätherische Öle von asaronhaltigen Pflanzen über das Futter an Ratten gegeben worden ist (JECFA, 1981). Hier ist jedoch nicht bekannt, wie hoch die Dosis von α - oder β -Asaron war. Aus einer Studie von Chen *et al.* (2013), welche die anti-epileptische Wirkung von α -Asaron untersuchte, konnten einige Beobachtungen zur subchronische Toxizität von α -Asaron abgeleitet werden. Männlich Swiss-Mäuse ($n = 8$) wurden 50, 100, oder 200 mg (kg KG)⁻¹ *p. o.* für 28 Tage behandelt und ihr Verhalten und Aussehen wurden aufgezeichnet, um äußerliche Veränderungen sowie Störungen von Atmung, Kreislauf, Nervensystem und geänderte Verhaltensmuster zu erfassen. In den Dosisgruppen 50 und 100 mg (kg KG)⁻¹ konnten keine äußerlichen Veränderungen, sowie Verhaltensstörungen und Reflexverluste festgestellt werden. In der höchsten Dosisgruppe von 200 mg (kg KG)⁻¹ konnte eine leicht verminderte spontane Bewegungsaktivität beobachtet werden. Im Kontext dieser Studie wurden keine histopathologischen Untersuchungen der Versuchstiere durchgeführt (Chen *et al.*, 2013).

2.2.5.6 Chronische Toxizität/Kanzerogenität

Die Erkenntnisse über das hepatokanzerogene Potential von α - und β -Asaron wurden bereits im Jahr 1987 gewonnen. Wiseman *et al.* (1987) untersuchten die hepatokanzerogene Wirkung verschiedener Phenylpropanoide an männlichen B6C3F1-Mäusen. Hierzu wurden verschiedene Versuchsanordnungen verwendet. Im ersten Experiment wurden den Tieren insgesamt 1000 mg/Tier (in 4 Injektionen an Tag 1, 8, 15 und 22) α - oder β -Asaron *i. p.* appliziert. Nach einer Beobachtungszeit von 13 Monaten wurden die Mäuse histopathologisch untersucht. Die Behandlung mit α -Asaron ($n = 47$) führte bei 89 % der Tiere zu hepatozellulären Karzinomen (HCC)

und Adenomen (HCA). Ein Tier wies zusätzlich ein subkutanes Hämangiosarkom auf. 83 % der Tiere entwickelten HCC und HCA nach Applikation von β -Asaron ($n = 43$), wobei ein Tier darüber hinaus ein Adenokarzinom im Dünndarm entwickelte.

Im zweiten Experiment wurde eine einmalige *i. p.*-Injektion an zwölf Tage alten männlichen B6C3F1-Mäusen vorgenommen und nach eine Beobachtungszeit von zehn Monaten erfolgte die Nekropsie. Hier wurde β -Asaron neben den anderen Alkenylbenzolen untersucht. Bei einer Dosis von $52 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ β -Asaron ($n = 30$) wiesen 69 % der Tiere HCC und HCA auf (Wiseman *et al.*, 1987).

Im dritten Experiment sollte der Einfluss des Sulfotransferase-Inhibitors Pentachlorphenol (PCP) auf die Bildung von HCC und HCA untersucht werden. Dazu wurden im direkten Vergleich zwölf Tage alte männliche B6C3F1-Mäuse einmalig *i. p.* mit verschiedenen Konzentrationen an Alkylbenzolen mit und ohne Vorbehandlung mit PCP behandelt. Die Vorbehandlung erfolgte 45 min vor der eigentlichen Behandlung mit $10,7 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ PCP. Für α -Asaron ($156,2 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$, *i. p.*) konnte keine Reduktion der Anzahl an Tieren mit HCC bzw. HCA beobachtet werden (85 %; $n = 39$, ohne PCP vs. 86 %; $n = 37$, mit PCP). Die Vorbehandlung mit PCP führte bei β -Asaron ($52,1 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$, *i. p.*) sogar zu einer leichten Erhöhung der HCC bzw. HCA-positiven Tiere (62 %; $n = 35$, ohne PCP vs. 79 %; $n = 39$, mit PCP) (Wiseman *et al.*, 1987).

Analog zu den Studien von Wiseman *et al.* (1987) wurde eine weitere Studie an zwölf Tage alten männlichen B6C3F1-Mäusen von Kim *et al.* (1999) durchgeführt. Es wurden jeweils ca. 35 Tiere wurden einmalig *i. p.* mit $52,1 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ und $104,1 \text{ mg (kg KG)}^{-1}$ α -Asaron behandelt. Nach 10–11 Monaten wiesen in beiden Gruppen jeweils 91 % der Tiere HCC und HCA auf. Diese Ergebnisse liegen im Bereich der von Wiseman *et al.* (1987) gefundenen Tumorinzidenzen.

Zur Tumorinzidenz oder auch im Allgemeinen zur chronischen Toxizität in Mäuse von α - und β -Asaron nach oraler Aufnahme gibt es bislang keine Publikationen.

In einer unveröffentlichten Studie von Taylor *et al.* 1981, welche von JECFA (1981) zitiert wurde, wurden Ratten (je 25 Männchen und 25 Weibchen pro Dosisgruppe) in einer 2-Jahres-Studie untersucht, welche Futter bekamen, welches 0 %, 0,04 %, 0,08 % oder 0,2 % β -Asaron enthielt. Die Mortalität betrug in der 0,2 %-Gruppe bereits nach 84 Wochen 100 %. Auch in der nächst-geringeren Dosisgruppe (0,08 %) konnte eine erhöhte Mortalität beobachtet werden (genauer Wert wurde in der Studie nicht genannt). Insgesamt war die mittlere Überlebensrate für Weibchen geringer als für Männchen. Weiter wurden Leiomyosarkome des Dünndarms in allen Dosisgruppen gefunden (1 Tier bei 0,04 %; 6 Tiere bei 0,08 % und 9 Tiere bei 0,2 %). Auffälligerweise waren nur männliche Ratte von Leiomyosarkomen betroffen. Desweiteren wurden pathologische Veränderungen in beiden Geschlechtern gefunden, wie seröse Flüssigkeit in Bauch- und Pleuralhöhle, Veränderungen der

Leber (koagulative Nekrose), fettige Degeneration und Infiltration des Herzens, Atrophie des Herzens, kardiale Fibrosen und interkardiale Thrombosen. In den beiden höchsten Konzentrationen konnte eine leichte Verringerung des Körpergewichtes in beiden Geschlechtern festgestellt werden (JECFA, 1981).

3 PROBLEMSTELLUNG

Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe α - und β -Asaron kommen natürlicherweise in den Pflanzen der Gattungen *Acorus*, *Asarum* und in einigen Pfeffersorten vor. Ätherische Öle und auch wässrige Auszüge aus diesen Pflanzen werden zum Aromatisieren von Lebensmitteln und als Phytopharmaka eingesetzt. α - und β -Asaron wirkten im Tierversuch kanzerogen und es gibt Hinweise auf ein mutagenes Potential.

Im Rahmen der Dissertation von Alexander Cartus wurde der mikrosomale Metabolismus von α - und β -Asaron aufgeklärt. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Epoxidierung der Seitenkette für β -Asaron den Hauptmetabolisierungsweg und für α -Asaron eine der Hauptrouten im Metabolismus darstellt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Epoxide als ultimale DNA-reaktiven Metaboliten von α - und β -Asaron darstellen, welches in der vorliegenden Arbeit überprüft werden soll.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob α - und β -Asaron in der Lage sind DNA-Addukte in primären Rattenhepatozyten zu bilden und ob diese Bildung konzentrations- und/oder zeitabhängig verläuft.

Um diese Frage zu beantworten, sollte im Vorfeld eine reproduzierbare Syntheseroute und Produktaufarbeitung zur Darstellung der Asaronepoxide entwickelt werden. Weiter sollte die Stabilität der Epoxide in verschiedenen Lösungsmitteln überprüft werden. Diese Syntheseprodukte wurden auch für andere im DFG-Projekt inbegriffene Arbeiten benötigt und die Erkenntnisse dieser Arbeiten – Zytotoxizität, Mutagenität und Gentoxizität – sind zum Teil auch für den Fortschritt und die Interpretation der erhaltenen Daten von hoher Relevanz. Im weiteren Verlauf und v. a. nachdem im Rahmen des Projektes gezeigt werden konnte, dass die Epoxide als einzige Phase-I-Metaboliten der Asarone ein konzentrationsabhängiges mutagenes Potential im Ames-Fluktuationstest zeigten (durchgeführt von Kerstin Berg), sollte die Reaktivität der Epoxide gegenüber isolierten DNA-Basen untersucht werden. Nach Identifizierung der gebildeten Addukte von DNA-Basen mit α - und β -Asaron sollte eine geeignete Syntheseroute entwickelt werden und deren isotopenmarkierten Analoga dargestellt werden, um eine möglichst sensitive *Ultra High Performance Liquid*

Chromatography-Tandem-Massenspektrometrie-Methode (UHPLC-MS/MS-Methode) zur Detektion und Quantifizierung der DNA-Addukte etablieren zu können. Des Weiteren sollte parallel sowohl die Isolierung der DNA sowie deren enzymatische Hydrolyse in Hinblick auf die Reinheit der DNA und Minimierung des Enzymeinsatzes optimiert werden.

Nach Optimierung und Etablierung der Methoden, sollte eine *in-vitro*-Studie zur Bestimmung der DNA-Adduktlevel in pRH nach Behandlung mit α - und β -Asaron durchgeführt werden. Hierbei sollte die Abhängigkeit der DNA-Adduktbildung sowohl von der eingesetzten Konzentration der Asarone als auch von der Dauer der Inkubation untersucht werden.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

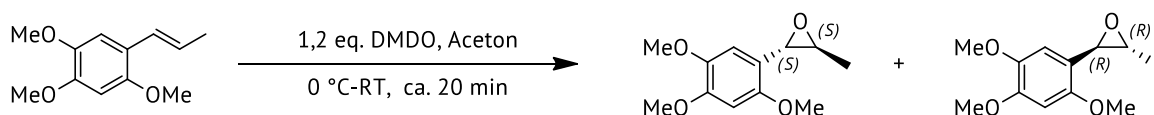
In diesem Kapitel werden die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Zuerst wird die Darstellung der Asaronepoxide sowie deren Stabilität in verschiedenen Lösungsmitteln betrachtet. Es folgt die Reaktivität der Asaronmetaboliten gegenüber Nucleosiden und die Identifizierung und Charakterisierung der gebildeten Reaktionsprodukte. Nach Vorstellen der durchgeführten Optimierungen und Etablierung der benötigten Methoden, werden die Ergebnisse der *in-vitro*-Studie zur Bestimmung der DNA-Adduktbildungsrate in pRH nach Inkubation mit α - und β -Asaron gezeigt und in Kontext zu aktueller Literatur gestellt.

4.1 Asaronepoxide

4.1.1 Synthese

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Entwicklung und Optimierung der durchgeführten Synthesen vorgestellt. Die optimierten Syntheserouten sowie die Charakterisierung der Produkte sind in Kapitel 7.1 detailliert dargestellt.

Als Grundlage für die Synthese der Asaronepoxide diente die Veröffentlichung von Kim *et al.* (1999) in welcher die Synthese von α -Asaronepoxid beschrieben wurde.



Syntheseroute der Darstellung von α -Asaronepoxid nach Kim *et al.* (1999).

Hierfür wurde eine Dimethyldioxiran (DMDO)-Lösung in einer Konzentration von ungefähr 0,08 M in Aceton eingesetzt. Der Reaktionsansatz einer Lösung in Aceton von α -Asaron mit 1,2 äquimolar DMDO wurde bei 0 °C für 30 min gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels aus der

Reaktionsmischung und Lösen des Rückstandes in *n*-Hexan, wurden nach Auskristallisieren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach einigen Tagen weiße Kristalle erhalten.

Die Herstellung der DMDO-Lösung erfolgte zu Beginn nach einer im Arbeitskreis Schrenk etablierten Methode. Hierfür wurde unter Argonatmosphäre eine Mischung aus Natriumhydrogencarbonat (96 g, 1,14 mol), destilliertem Wasser (80 ml) und Aceton (50 ml) hergestellt, zu welcher innerhalb von 30 min eine Mischung aus je 60 ml Aceton und destilliertem Wasser zugetropft wurde, während im gleichen Zeitraum in sechs Portionen Kaliumperoxomonosulfat (180 g, 0,29 mol) hinzugegeben wurde. Nach anschließender Destillation bei ca. 30 mbar in eine auf ca. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte Vorlage wurde durchschnittlich eine Konzentration der DMDO-Lösung von 0,046 M erzielt. Mit den so hergestellten DMDO-Lösungen wurden erste Versuchen mit α -Asaron als Ausgangsmaterial, analog zu Kim *et al.* (1999) durchgeführt. Dieses Vorgehen führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde ein gelber, öliges Rückstand erhalten, welcher sich nach Zugabe von getrocknetem *n*-Hexan bräunlich färbte und nur wenig in *n*-Hexan löste. Weiter fiel auf, dass nach einigen Tagen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Lösung keine Kristallbildung zu beobachten war. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde das erhaltene Produkt untersucht und festgestellt, dass es sich nicht um das gewünschte Epoxid handelte. Jedoch hatte eine Umsetzung der Ausgangsverbindung α -Asaron stattgefunden. Die typischen Signale der Protonen der ungesättigten Seitenkette an 1'- und 2'-Position, welche im Bereich einer chemischen Verschiebung von 5,5–6,5 ppm im $^1\text{H-NMR}$ zu sehen sein sollten, waren im Produkt-NMR nicht mehr vorhanden. Es wurde vermutet, dass sich eine Mischung mehrerer Oxidationsprodukte gebildet haben könnte. Versuche mit β -Asaron als Ausgangsmaterial führten auch nicht zum gewünschten Produkt, dem Epoxid. Jedoch konnten hier nach 4 Tagen Kristallisationszeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kleine weiße Kristalle beobachtet werden. Die Isolierung der Kristalle war aufgrund des öligen Untergrundes und der sehr geringen Menge nicht möglich.

Die mit der vorhandenen Methode möglichen Konzentrationen der DMDO-Lösung beliefen sich auf maximal 0,05 M und wich damit von der in der Vorschrift von Kim *et al.* (1999) beschriebenen Konzentration um ca. 40 % ab. Es wurde postuliert, dass dies verantwortlich für die fehlende Produktbildung der Synthese war. Daher wurde im Folgenden die Darstellung von DMDO nach Adam *et al.* (1991) durchgeführt. Hierbei wurde eine Suspension aus 254 ml destilliertem Wasser, 192 ml Aceton und 58 g Natriumhydrogencarbonat hergestellt und auf $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dieser Suspension wurden unter starkem Rühren fünf Portionen Oxone[®] (120 g, 0,195 mol) alle 3 min zugegeben. Die Destillation des Produktes erfolgte direkt nach Abklingen der Reaktion bei 100–130 mbar in eine auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte Vorlage. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Destillat ein

Volumen von ca. 150 ml aufwies. Nach dieser Methode konnten deutlich höhere DMDO-Konzentrationen von 0,085–0,098 M in der Lösung erzielt werden.

Die Epoxid-Synthese wurden mit den höherkonzentrierten DMDO-Lösungen wiederholt und es zeigte sich, dass sowohl mit α - als auch mit β -Asaron eine Bildung von weiß-gelblichen Kristallen nach Kristallisation zu beobachten war. Durch Umkristallisieren in siedendem *n*-Hexan und Filtrieren der heißen Lösung mit einem Faltenfilter konnte die Ausbeute Epoxide auf 84 % für α -Asaronepoxid und 74 % für β -Asaronepoxid gesteigert werden. Die Reinheit wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmt und lag für α -Asaronepoxid bei >98 % und für β -Asaronepoxid >96 %. α -Asaronepoxid stellte sich als weiß bis hellgelbliche Kristalle dar. Im Gegensatz dazu stellte sich β -Asaronepoxid als blättrige bis leicht nadelförmige, weiß-hellgelbe Kristalle dar. Im Vergleich konnten Kim *et al.* (1999) für die Synthese von α -Asaronepoxid nur eine Ausbeute von 52 % erzielen. Die hier beschriebene Methode brachte somit eine Steigerung der Ausbeute um 32 %. Die Synthese von β -Asaronepoxid ist in der Literatur zuvor noch nicht beschrieben worden.

Charakterisierung von α -Asaronepoxid

In Abbildung 4-1 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von α -Asaronepoxid in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) dargestellt und die entsprechenden Signale der Protonen wurden zugeordnet.

Die Protonen der Methylgruppe mit einer chemischen Verschiebung δ von 1,43 ppm koppeln vicinal mit dem $\text{C}^{2'}$ -Proton mit einer Kopplungskonstante J von 5,15 Hz und stellen sich als Duplett im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dar. Das Proton der $2'$ -Position der Seitenkette erfährt eine höhere Entschirmung durch den Oxiranring und wird dadurch in Richtung Tieffeld verschoben ($\delta = 2,92$ ppm). Es koppelt zusätzlich mit dem $\text{C}^{3'}$ -Proton mit $J = 2,14$ Hz und hat eine Aufspaltung eines Dupletts-vom-Quartett. Die drei Methoxygruppen mit $\delta = 3,79, 3,82$ und $3,86$ ppm sind als klare Singuletts im Spektrum abgebildet. Durch den entschirmenden Effekt der Sauerstoffatome findet keine Kopplung mit anderen Protonen im Molekül statt. Die Nachbarschaft zum Benzolring bedingt die Tieffeldverschiebung des Signals des $1'$ -Protons zu $\delta = 3,88$ ppm. Wie Abbildung 4-1 zeigt, findet hier eine Aufspaltung zum Duplett statt, welche aus der vicinalen Kopplung ($J = 2,11$ Hz) mit dem $2'$ -Proton resultiert. Die Ringprotonen an C^5 und C^6 liegen mit $\delta = 6,49$, und $6,63$ ppm im Bereich der aromatischen Protonen und sind als Singuletts dargestellt. Diese Tieffeldverschiebung resultiert aus dem Ringstromeffekt des Benzolrings.

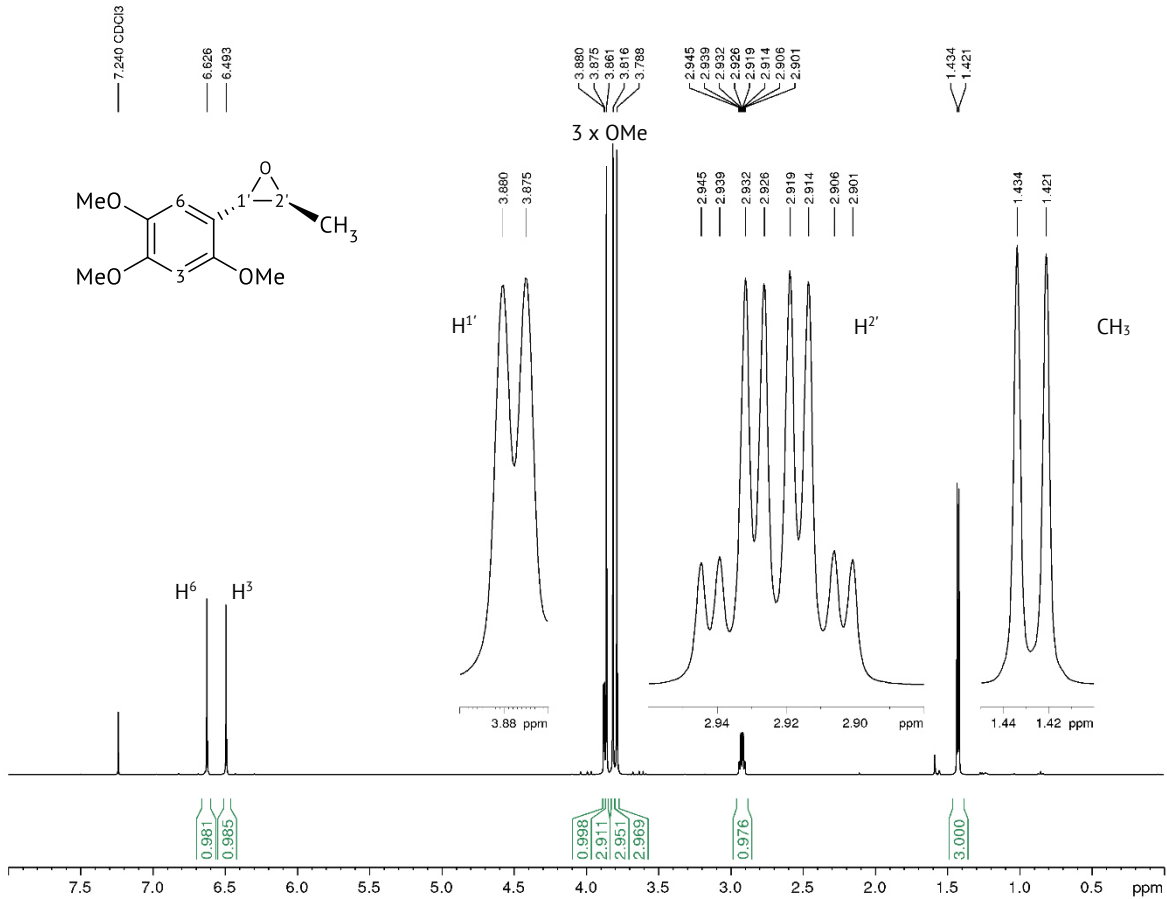


Abbildung 4-1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von α -Asaronepoxid in CDCl_3 . $^1\text{H-NMR}$ (400 Hz, CDCl_3) δ [ppm]: 1,43 (3H, d, $^3J = 5,15$ Hz, CH_3), 2,92 (1H, dq, $^3J = 2,14$ Hz, 5,14 Hz, $\text{H}^{2'}$), 3,79 (3H, s, OCH_3), 3,82 (3H, s, OCH_3), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,88 (1H, d, $^3J = 2,11$ Hz, $\text{H}^{1'}$), 6,49 (1H, s, H^3), 6,63 (1H, s, H^6).

Verglichen mit den $^1\text{H-NMR}$ -Daten für α -Asaronepoxid aus Kim *et al.* (1999) (Tabelle 4-1) ist ersichtlich, dass diese übereinstimmen und somit α -Asaronepoxid erfolgreich synthetisiert wurde.

Tabelle 4-1: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von α -Asaronepoxid mit Kim *et al.* (1999). Aufgenommen in CDCl_3 .

	eigene Messung			Kim <i>et al.</i> (1999)		
	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
CH_3 (3 H)	1,43	d	5,15	1,45	d	5,1
$\text{H}^{2'}$ (1 H)	2,92	dq	2,14; 5,14	3,02	dq	5,1; 2,1
OCH_3 (3 H)	3,79	s		3,82	s	
OCH_3 (3 H)	3,82	s		3,84	s	
OCH_3 (3 H)	3,86	s		3,89	s	
$\text{H}^{1'}$ (1 H)	3,88	d	2,11	3,90	d	2,2
H^3 (1 H)	6,49	s		6,52	s	
H^6 (1 H)	6,63	s		6,66	s	

δ [ppm]: chemische Verschiebung, J [Hz]: Kopplungskonstante; s: Singulett, d: Duplett, dq: Duplett vom Quartett.

Charakterisierung von β -Asaronepoxid

Das Produkt der Reaktion von β -Asaron mit DMDO in Aceton wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. In CDCl_3 als Lösungsmittel wurde das in Abbildung 4-2 dargestellte Spektrum erhalten.

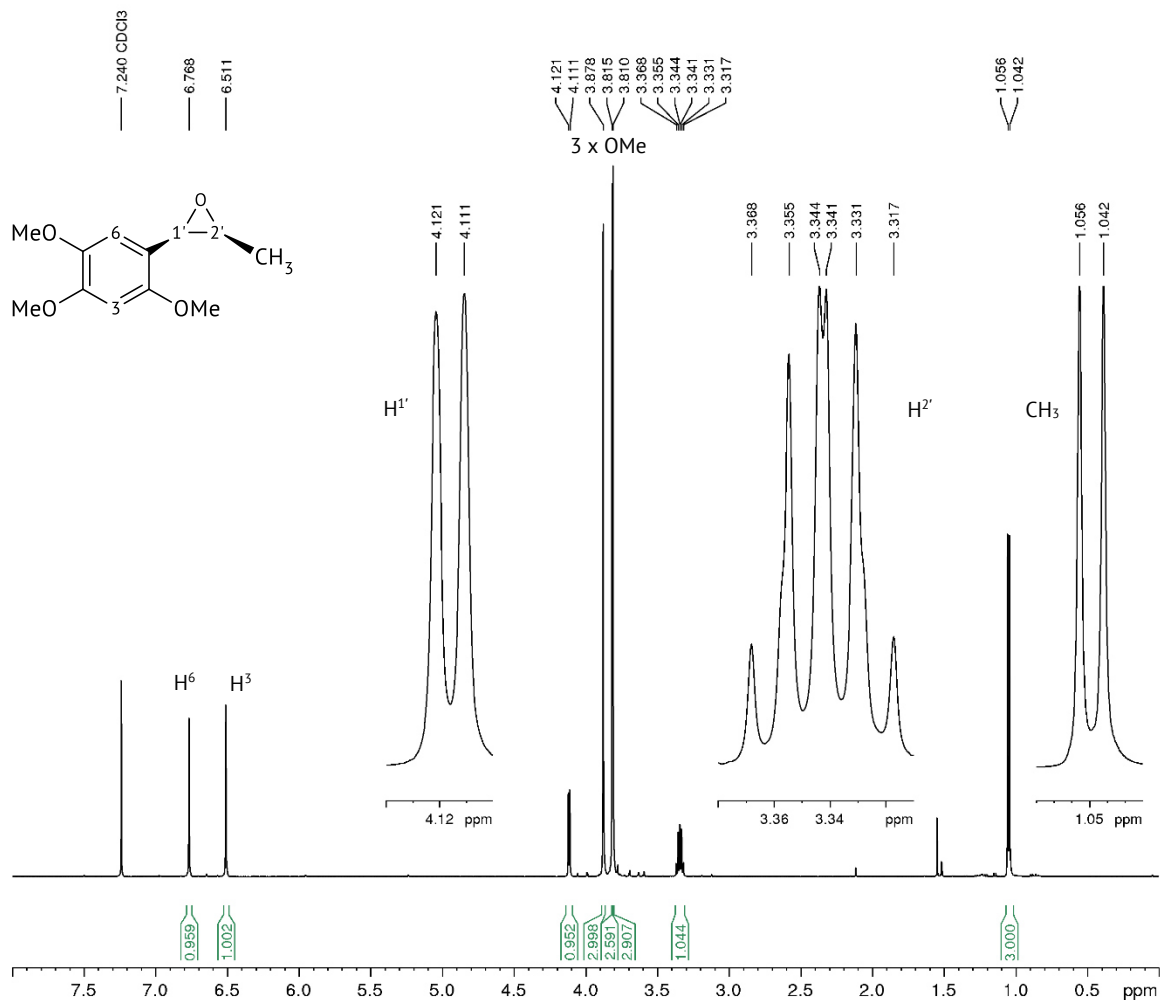


Abbildung 4-2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von β -Asaronepoxid in CDCl_3 . $^1\text{H-NMR}$ (400 Hz, CDCl_3) δ [ppm]: 1,05 (3H, d, $^3J = 5,36$ Hz, CH_3), 3,34 (1H, m, $\text{H}^{2'}$), 3,81 (3H, s, OCH_3), 3,82 (3H, s, OCH_3), 3,88 (3H, s, OCH_3), 4,12 (1H, d, $^3J = 4,20$ Hz, $\text{H}^{1'}$), 6,51 (1H, s, H^3), 6,77 (1H, s, H^6).

Die Signale im Tieffeld bei 6,51 ppm und 6,77 ppm lassen sich den Protonen H^3 und H^6 am Benzolring zuordnen. Sie erfahren eine große Entschirmung und damit einen Tieffeldshift durch den Ringstromeffekt des Benzolrings. Das Duplett bei einer Verschiebung von δ 4,12 ppm wird durch das Proton an 1'-Position der Seitenkette hervorgerufen. Es findet eine vicinale Kopplung zwischen dem Proton $\text{H}^{1'}$ und $\text{H}^{2'}$ mit $J = 4,20$ Hz statt. Die Singulets bei δ 3,81, 3,82 und 3,88 ppm entsprechen den Protonen der Methoxygruppen am Benzolring, während das Multipllett bei δ 3,34 ppm dem Proton an 2'-Position am Oxiranring entspricht. Hier findet eine höhere Abschirmung und eine Hochfeldverschiebung durch den positiven induktiven (+I)-Effekt der benachbarten Methylgruppe

statt. Da die Verbindung noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist, wurde kein Vergleich mit Literaturspektren angestellt.

In Abbildung 4-3 ist in Schwarz das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von β -Asaron und in Rot das von β -Asaronepoxid, sowie farblich markiert die Signale der Protonen der Seitenkette dargestellt. Bei der Gegenüberstellung der beiden Spektren von Edukt und Produkt ist erkennbar, dass eine vollständige Umsetzung stattgefunden hat. Nach der Epoxidierung sind die Signale der 1'- und 2'-Protonen der Seitenkette aus dem Bereich der olefinischen Protonen von 6,39 ppm bzw. 5,65 ppm in den Bereich der aliphatischen Protonen von 3,29–3,35 ppm bzw. 4,01 ppm, in Nachbarschaft zu den Heteroatomen, verschoben worden. Im Bereich des Multipletts des Signals des 2'-Protons des Epoxides findet eine Überlagerung mit dem Signal des Wassers im Lösungsmittel bei 3,3 ppm statt. Weiter wurde beobachtet, dass die endständige Methylgruppe der Seitenkette durch das Fehlen der Doppelbindung weniger Entschirmung erfuhr und damit von 1,78 ppm zu 0,96 ppm weiter in Richtung Hochfeld verschoben wird im Vergleich zu Ausgangsverbindung.

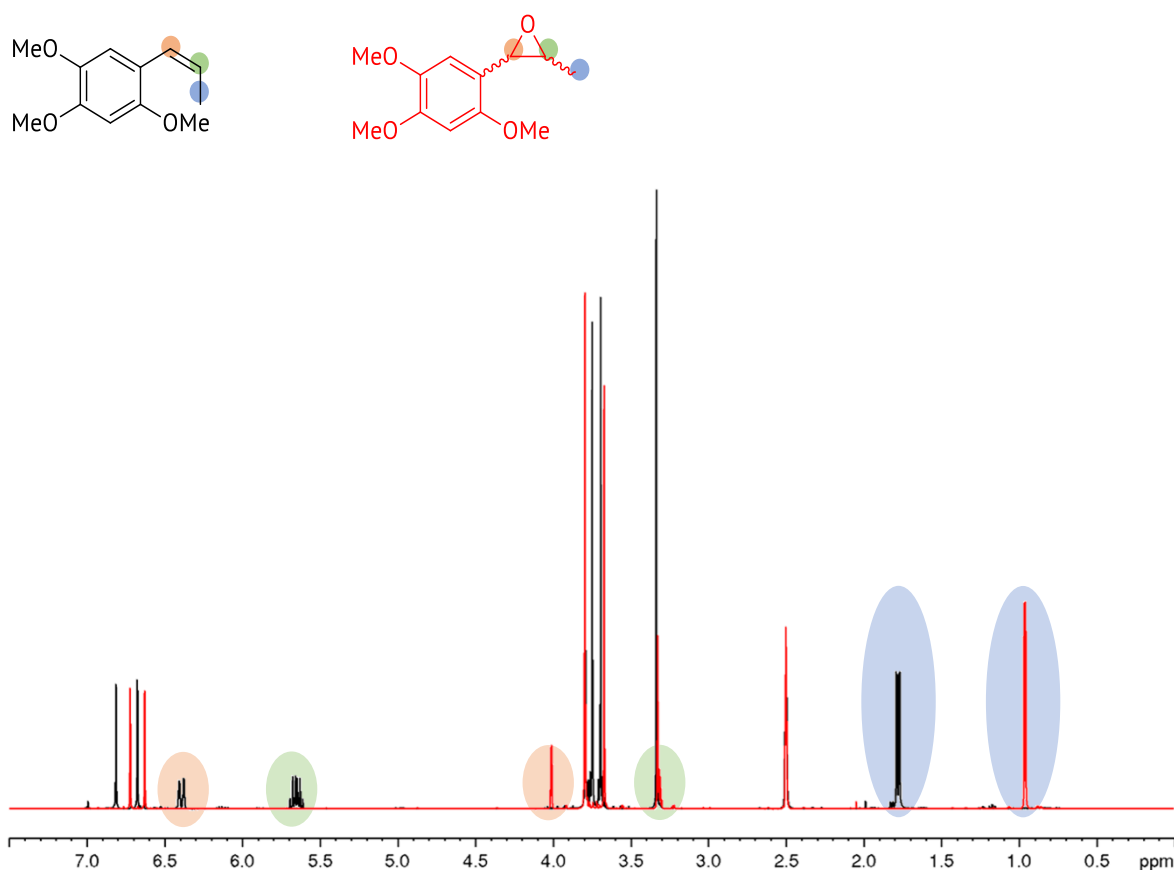


Abbildung 4-3: Überlagerte $^1\text{H-NMR}$ von β -Asaron (schwarz) und β -Asaronepoxid (rot) aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$.

In Tabelle 4-2 sind die chemischen Verschiebungen, Multiplizitäten und die Kopplungskonstanten der Ausgangsverbindung β -Asaron und dem Syntheseprodukt β -Asaronepoxid im Detail gegenübergestellt.

Tabelle 4-2: Gegenüberstellung der Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von β -Asaron und β -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$.

	β -Asaron			β -Asaronepoxid		
	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
CH₃ (3 H)	1,78	dd	$^3J = 7,08$ $^4J = 1,84$	0,96	d	$^3J = 5,52$
OCH₃ (3 H)	3,69	s		3,67	s	
OCH₃ (3 H)	3,75	s		3,79	s	
OCH₃ (3 H)	3,79	s		3,80	s	
H^{2'} (1 H)	5,65	qd	$^3J = 7,06$ $^3J = 11,58$	4,01	d	$^3J = 4,11$
H^{1'} (1 H)	6,39	dd	$^3J = 11,54$ $^4J = 1,78$	3,29–3,35	m	
H³ (1 H)	6,67	s		6,63		
H⁶ (1 H)	6,81	s		6,72		

δ [ppm]: chemische Verschiebung, J [Hz]: Kopplungskonstante; s: Singulett, d: Duplett, dd: Duplett vom Duplett, m: Multipllett.

Die Epoxidierung der Seitenkette von α - und β -Asaron findet stereoselektiv statt, sodass für α -Asaron das *trans*-Produkt und für β -Asaron das *cis*-Produkt dargestellt werden kann. Genauer betrachtet ist es aber wahrscheinlich, dass sich das Produkt der Reaktionen jeweils aus einem Enantiomerenpaar zusammensetzt. Für α -Asaron wird also das Enantiomerenpaar ($1'S$, $2'S$)-Asaronepoxid und ($1'R$, $2'R$)-Asaronepoxid (im Folgenden wird das Enantiomerenpaar α -Asaronepoxid genannt) und mit β -Asaron selektiv das Enantiomerenpaar ($1'R$, $2'S$)-Asaronepoxid und ($1'S$, $2'R$)-Asaronepoxid (im Folgenden wird das Enantiomerenpaar als β -Asaronepoxid bezeichnet) gebildet. Da die Enantiomere weder mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie noch mit den hier in der Arbeit verwendeten chromatographischen Methoden unterschieden bzw. isoliert werden können, wird im Folgenden nicht mehr weiter darauf eingegangen.

Die kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen (Abbildung 4-4) zeigten weiter, dass sich diese beiden Enantiomerenpaare gut voneinander unterscheiden lassen. Beide Epoxide wurden in CDCl_3 aufgenommen. Das Spektrum von α -Asaronepoxid ist in Rot und das von β -Asaronepoxid in Schwarz abgebildet. Zu beobachten ist, dass die endständige Methylgruppe der Seitenkette vom *cis*-konfigurierten β -Asaronepoxid eine höhere Abschirmung erfährt mit δ 1,05 ppm als die *trans*-konfigurierte von α -Asaronepoxid mit δ 1,43 ppm. Das Signal des 2'-Protons von α -Asaronepoxid ist weiter Hochfeld verschoben, es erfährt also durch den negativen Induktiven (–I)-Effekt des Oxiranrings eine höhere Entschirmung, als das 2'-Protons des β -Asaronepoxids. Das Duplett des 1'-Protons weist eine chemische Verschiebung δ 3,88 ppm für α -Asaronepoxid und δ 4,12 ppm für β -Asaronepoxid auf. Die Protonen der Methoxygruppen und das Ring-Protonen werden von der Konfiguration der Seitenkette kaum beeinflusst.

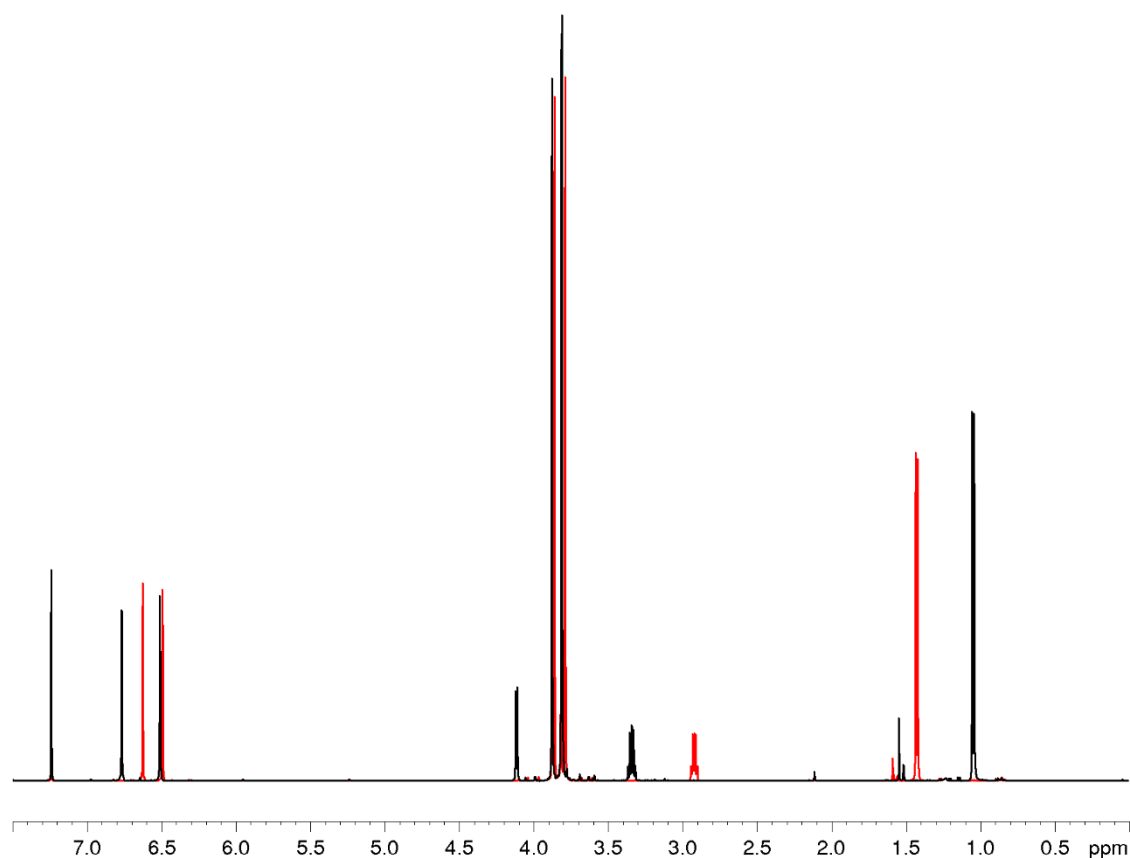


Abbildung 4-4: Überlagerte $^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid (rot) und β -Asaronepoxid (schwarz) aufgenommen in CDCl_3 400 MHz.

In Tabelle 4-3 sind die Auswertungen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von α -Asaronepoxid und β -Asaronepoxid gegenübergestellt. Der auffälligste Unterschied beider Verbindungen ist, dass das Signal des 2'-Protons bei α -Asaronepoxid zu einem sauberen Duplett-vom-Quartett aufgespalten ist und bei β -Asaronepoxid ein Multiplett mit unklarer Aufspaltung zu sehen ist. Diese Beobachtung ist unabhängig vom gewählten Lösungsmittel.

Tabelle 4-3: Gegenüberstellung der Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von α -Asaronepoxid und β -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl_3 .

	α -Asaronepoxid			β -Asaronepoxid		
	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
CH_3 (3 H)	1,43	d	$^3J = 5,16$	1,05	d	$^3J = 5,36$
$\text{H}^{2'}$ (1 H)	2,92	dq	$^3J = 2,15$ $^3J = 5,14$	3,34	m	
OCH_3 (3 H)	3,79	s		3,81	s	
OCH_3 (3 H)	3,82	s		3,82	s	
OCH_3 (3 H)	3,86	s		3,88	s	
$\text{H}^{1'}$ (1 H)	3,88	d	$^3J = 2,12$	4,12	d	$^3J = 4,12$
H^3 (1 H)	6,49	s		6,51	s	
H^6 (1 H)	6,63	s		6,77	s	

δ [ppm]: chemische Verschiebung, J [Hz]: Kopplungskonstante; s: Singulett, d: Duplett, dq: Duplett vom Quartett, m: Multiplett.

Eine Charakterisierung hinsichtlich der Retentionszeiten von HPLC und UHPLC konnte ebenso wie eine massenspektrometrische Analyse nicht erfolgen, da die synthetisierten Epoxide instabil im wässrigen Milieu sind (siehe Kapitel 4.1.2) und diese Methoden wässrige Fließmittel erforderten.

4.1.2 Stabilität der Epoxide in verschiedenen Lösungsmitteln

Um mehr Informationen über die Reaktivität der Epoxide in verschiedenen Lösungsmitteln zu erhalten, wurden verschiedene ^1H -NMR-Messungen durchgeführt. Die Stabilität der Epoxide wurde mit dem Ziel untersucht die Halbwertszeit abschätzen zu können. Ausgewählt wurden dafür Chloroform (CDCl_3), da es in der Literatur schon erfolgreich als Lösungsmittel für die Epoxide verwendet wurde und somit eine Stabilität dieser über mehrere Stunden erwartet wurde. Weiter wurde Acetonitril- d_3 getestet, da es ein geeignetes Lösungsmittel für spätere Synthesen mit anschließender chromatographische Aufarbeitungen darstellt, sowie DMSO- d_6 , da die Epoxide in anderen Projekten auch als Inkubationssubstanzen für die Zellkultur dienen sollten und DMSO ein gängiges und für die Zellen gut verträgliches Lösungsmittel ist. Weiter sollte auch das Verhalten der Epoxide in wässrigen Lösungen untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten im Weiteren das Entwickeln der Syntheserouten für mögliche DNA-Addukte erleichtern.

Stabilität von α -Asaronepoxid

Für die Untersuchung zur Stabilität von α -Asaronepoxid in verschiedenen Lösungsmitteln wurde dieses zunächst unter Argon in getrockneten, deuterierten Lösungsmitteln (DMSO- d_6 , CDCl_3 und Acetonitril- d_3) gelöst und unmittelbar zur ersten Messung eingesetzt. Anschließend wurden die Proben im NMR-Röhrchen für fünf Tage bei RT belassen und erneut vermessen.

Aus Abbildung 4-5 wird ersichtlich, dass α -Asaronepoxid in CDCl_3 über fünf Tage bei RT stabil ist. Es konnten im aufgenommenen Spektrum keine zusätzlichen Signale detektiert werden, welche auf eine Reaktion mit den Spuren an Wasser, welche im Lösungsmittel noch nachzuweisen waren, schließen lassen. Dass das verwendete CDCl_3 nicht frei von Wasserspuren war, konnte am Signal der Wasserprotonen bei einer chemischen Verschiebung von 1,5 ppm gesehen werden. Die Spektren in Abbildung 4-5 sind nahezu deckungsgleich.

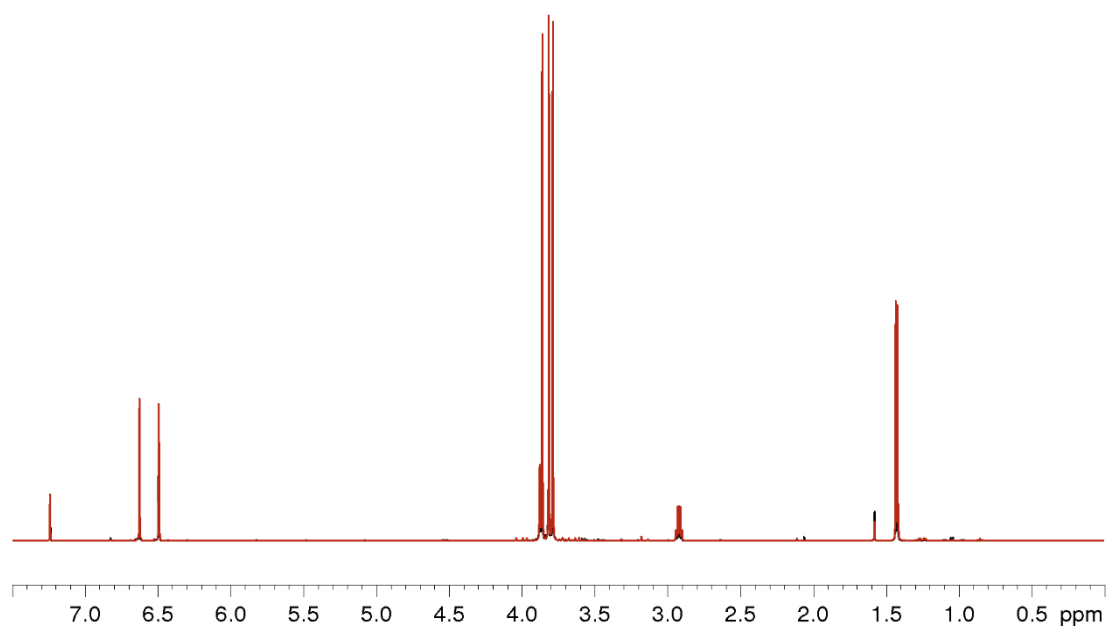


Abbildung 4-5: ^1H -NMR von α -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl_3 , $t = 0 \text{ h}$ (rot) und $t = 123 \text{ h}$ (schwarz).

Bei der Betrachtung der Spektren von α -Asaronepoxid zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ h}$ und $t = 123 \text{ h}$, welche in Acetonitril- d_3 (Abbildung 4-6) aufgenommen wurden, ist zu sehen, dass auch hier die Stabilität von α -Asaronepoxid über fünf Tage bestätigt werden kann. Jedoch ist bei genauer Betrachtung zu sehen, dass Veränderungen im Bereich von 3,1–3,45 ppm zu sehen sind. Dies Zunahme der Peaks im Rauschen der Baseline deuten darauf hin, dass Reaktionen in der Lösung stattgefunden haben. Diese sind wahrscheinlich durch das restliche Wasser im Lösungsmittel, zu erkennen am Signal bei einer Verschiebung von 2,1 ppm, möglich geworden. Jedoch sind diese so gering, dass im Allgemeinen von einer Stabilität von α -Asaronepoxid für fünf Tage bei RT ausgegangen werden kann.

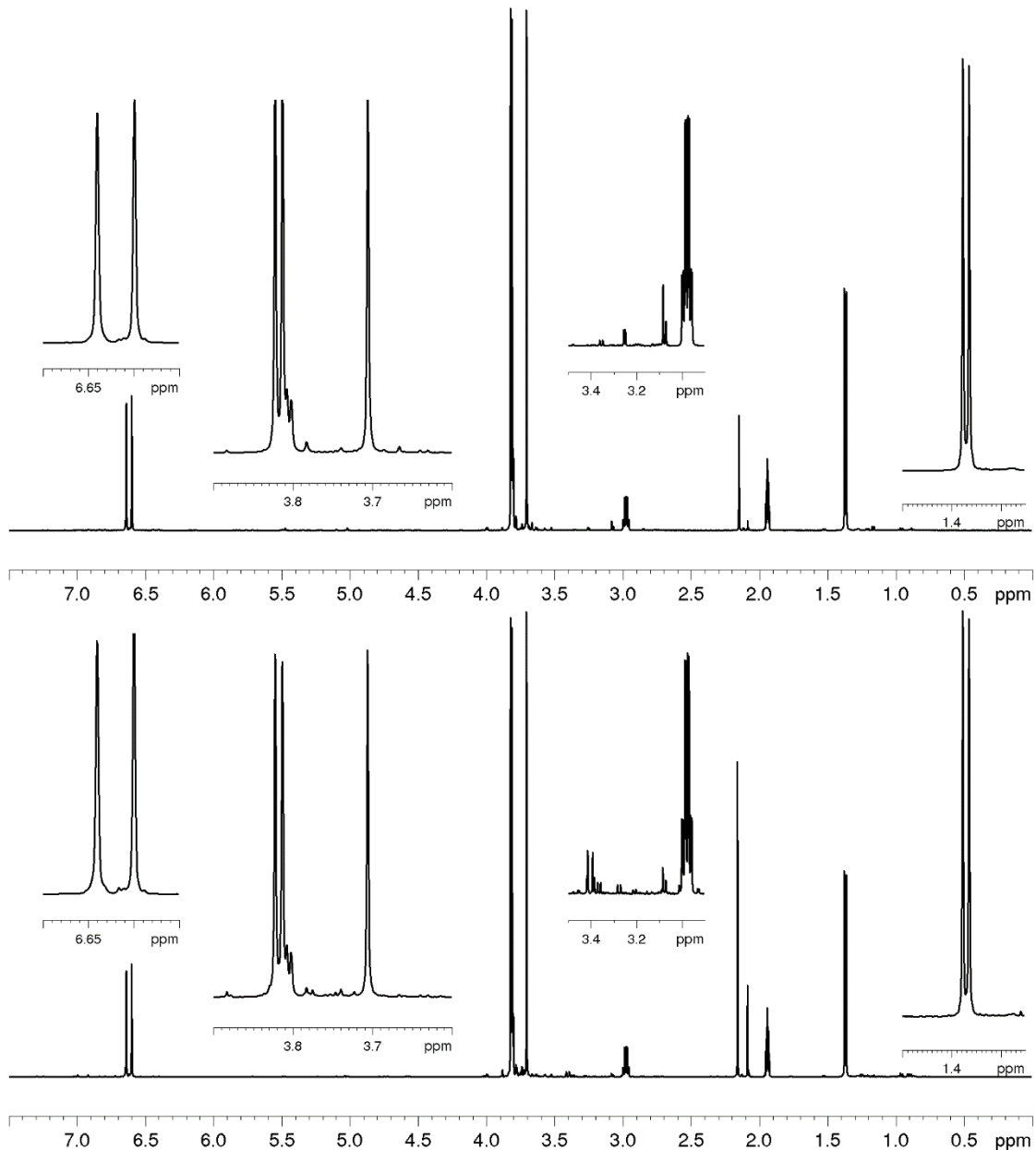


Abbildung 4-6: ^1H -NMR von α -Asaronepoxid aufgenommen in Acetonitril- d_3 $t = 0$ h oben und $t = 123$ h unten.

Auch die Stabilität von α -Asaronepoxid in $\text{DMSO}-d_6$ wurde untersucht. Dies ist vor allem im Hinblick darauf, dass die Epoxide in Zellkulturexperimenten untersucht werden sollen von Bedeutung, da DMSO hier standardmäßig als Lösungsmittel eingesetzt wird. Die Untersuchungen zeigten, dass die Spektren der Messungen von $t = 0$ h und $t = 123$ h deckungsgleich sind (Abbildung 4-7). Es scheint, dass auch die Restmenge an Wasser in DMSO , was durch das Signal bei 3,3 ppm zu erkennen ist, kein Einfluss auf die Stabilität von α -Asaronepoxid über 5 Tage bei RT hatte.

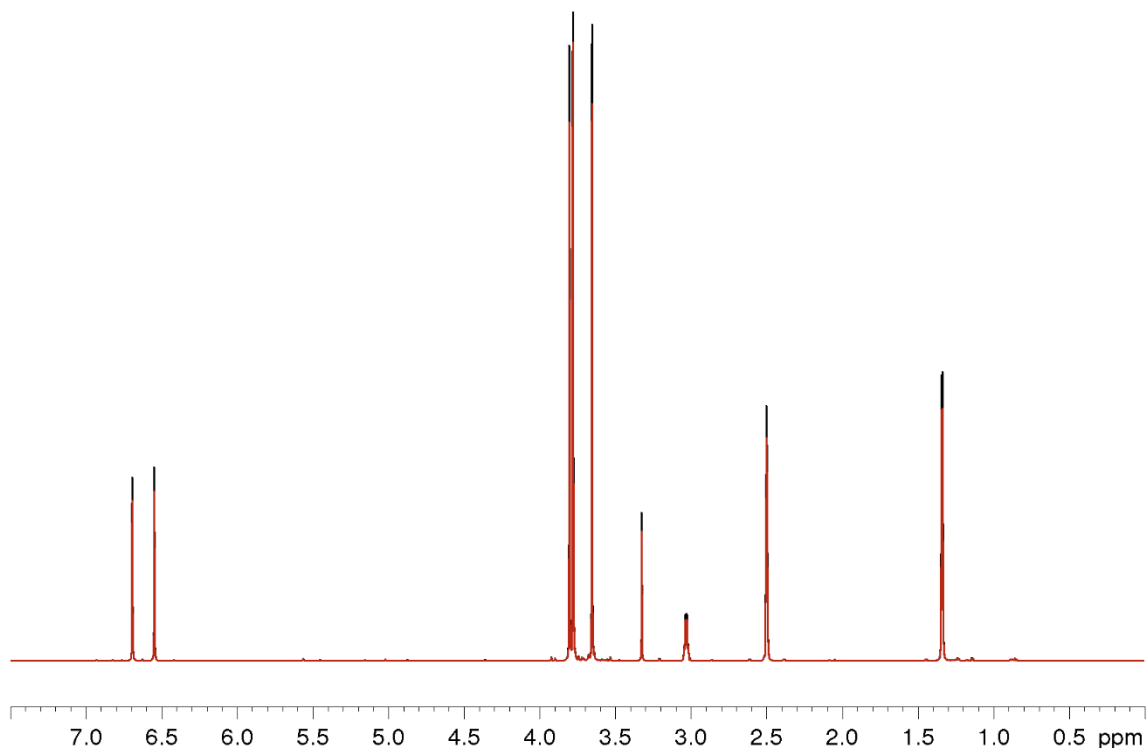


Abbildung 4-7: ^1H -NMR von α -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$; Überlagerte Signale der Messung bei $t = 0$ h (rot) und $t = 123$ h (schwarz).

Kim *et al.* (1999) beschrieben die Halbwertszeit von α -Asaronepoxid in wässrigem 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer mit 4,0 min und in Gegenwart von 154 mM Kaliumchlorid mit 2,4 min. Für die Messung mittels HPLC sollten Startbedingung mit einem wässrigen Anteil von ca. 90 % verwendet werden. Hierfür sollte im Vorhinein die Stabilität bzw. die Halbwertszeit von α -Asaronepoxid nach Zugabe von Wasser bestimmt werden. 10 mg α -Asaronepoxid wurden in 50 μl Acetonitril gelöst und in ein NMR-Messröhrchen überführt. Erst unmittelbar vor der Messung wurde die Probe mit 550 μl D_2O versetzt. Es sollten stündlich Messungen der Probe erfolgen, um die Umsetzung des Epoxids zu dessen Reaktionsprodukte im wässrigen Milieu zu beobachten.

Wie in Abbildung 4-8 zu sehen ist, konnte bereits in der ersten Messung direkt nach der Zugabe von D_2O zum in 50 μl gelösten α -Asaronepoxid kein Epoxid mehr detektiert werden. Die Umsetzung hat innerhalb wenige Sekunden vollständig stattgefunden. Entstanden ist eine Mischung aus *erythro*-Asarondioldiol, *threo*-Asarondioldiol und 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone (Abbildung 4-9). Das Singulett bei $\delta = 2,26$ ppm kann dem 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone zugeordnet werden und das Multiplett bei $\delta = 4,03$ ppm kann den Diolen zugeordnet werden. Über das Peakflächenverhältnis und unter Einbeziehung, dass unter dem Singulett zwei Protonen liegen und unter dem Multiplett ein Proton, ergibt sich ein Verhältnis von Diolen zu Keton von 10:6.

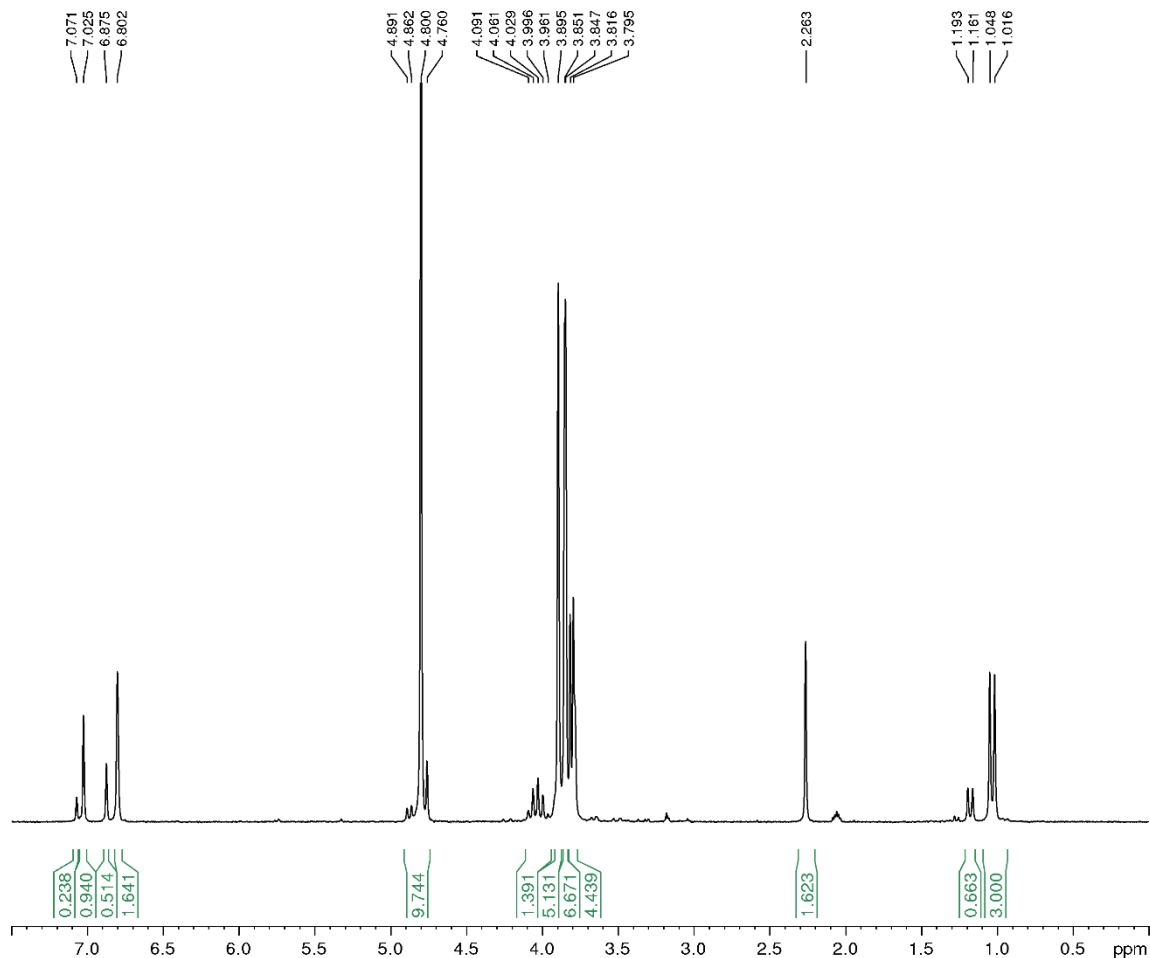


Abbildung 4-8: $^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid aufgenommen in 50 μl Acetonitril und 550 μl D_2O . Messung direkt nach der Zugabe von D_2O .

Die Halbwertszeit von α -Asaronepoxid in wässriger Lösung beträgt nur wenige Minuten. Die genaue Halbwertszeit ist mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nicht zu bestimmen, da die Zeit vom Herstellen der Lösung bis zum Messen des NMR-Spektrums mit 8 Scans ungefähr 4 min betrug. Es ist also zu erwarten, dass α -Asaronepoxid in wässriger Lösung innerhalb kürzester Zeit zu den beiden Diolen und dem Keton reagieren.

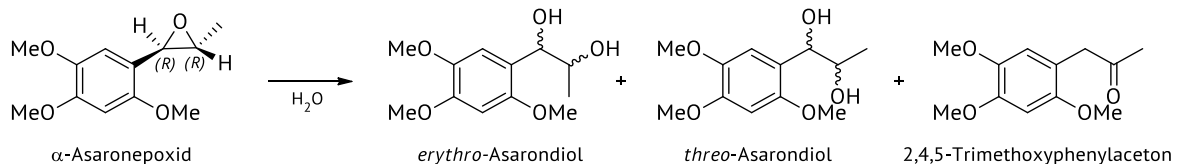


Abbildung 4-9: Hydrolyse von α -Asaronepoxid im wässrigen Milieu.

Die Messungen zur Halbwertszeit wurden über 61 Stunden durchgeführt. So konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich auch über diesen Zeitraum das Verhältnis der gebildeten Produkte nicht veränderte (Abbildung 4-10).

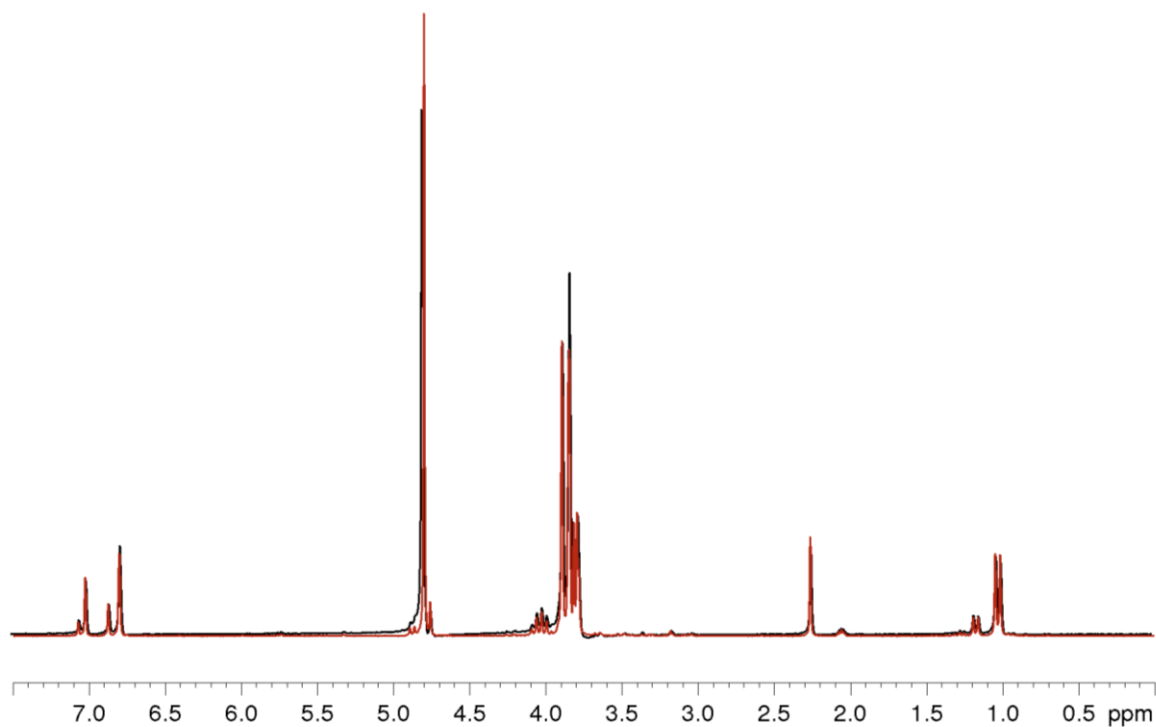


Abbildung 4-10: ^1H -NMR der Halbwertszeit Messungen von α -Asaronepoxid in 50 μl Acetonitril und 550 μl D_2O nach 0 h (rot) und nach 61 h (schwarz).

Stabilität von β -Asaronepoxid

Die gleichen Untersuchungen, die zur Stabilität von α -Asaronepoxid gemacht wurden, wurden auch mit β -Asaronepoxid durchgeführt. Für die Stabilität in CDCl_3 wurde dasselbe Ergebnis beobachtet. Die Spektren direkt nach lösen des Epoxids und nach 123 h sind Deckungsgleich (Abbildung 4-11). Ebenso konnte keine Veränderungen im Spektrum von β -Asaronepoxid mit $\text{DMSO-}d_6$ als Lösungsmittel beobachtet werden (Abbildung 4-12). Über 123 h konnte eine Zunahme des Wassersignals bei δ 3,3 ppm beobachtet werden. Woher diese Zunahmen kam, konnte nicht geklärt werden. Die NMR-Röhrchen waren für die Zeit der Lagerung bei RT mittels Parafilm® abgedichtet, um ein Eindringen von Luftfeuchtigkeit aufgrund der Hygroskopie des Lösungsmittels zu vermeiden. Die Menge an Wasser in der Probe ist jedoch so gering, dass keine Reaktion zu den Diolen und dem Keton stattfand.

44 | Ergebnisse und Diskussion

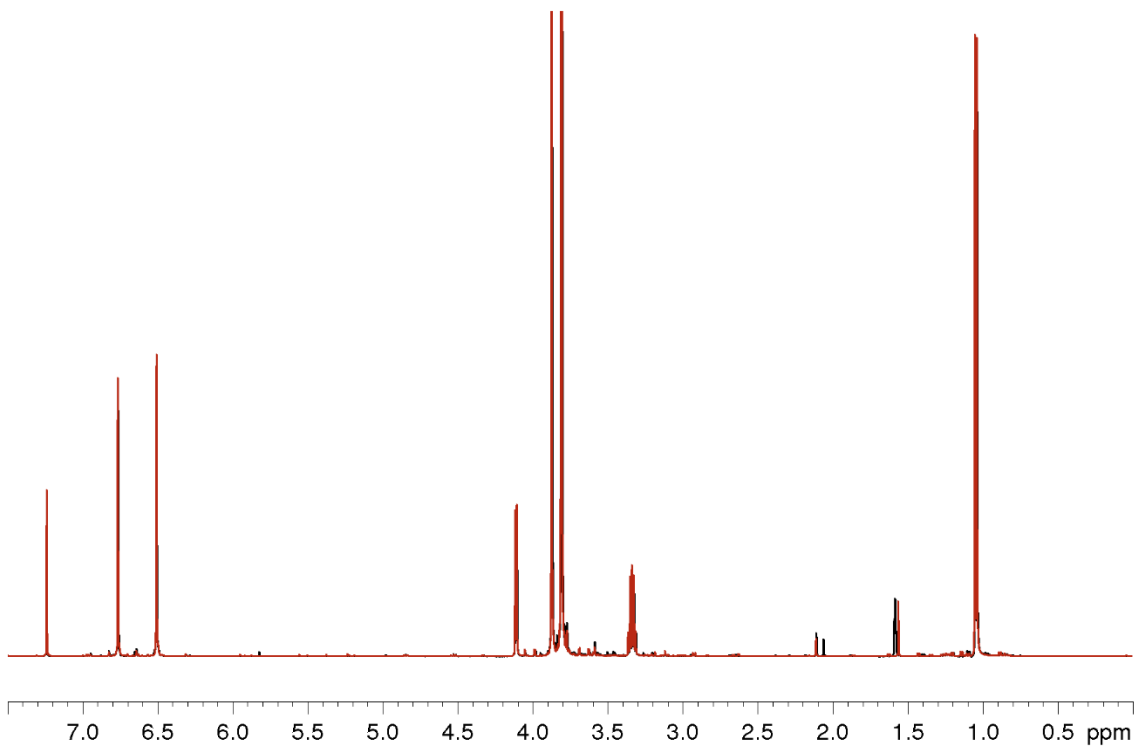


Abbildung 4-11: ¹H-NMR von β-Asaronepoxid aufgenommen in CDCl₃; Überlagerte Signale der Messung bei t = 0 h (rot) und t = 123 h (schwarz).

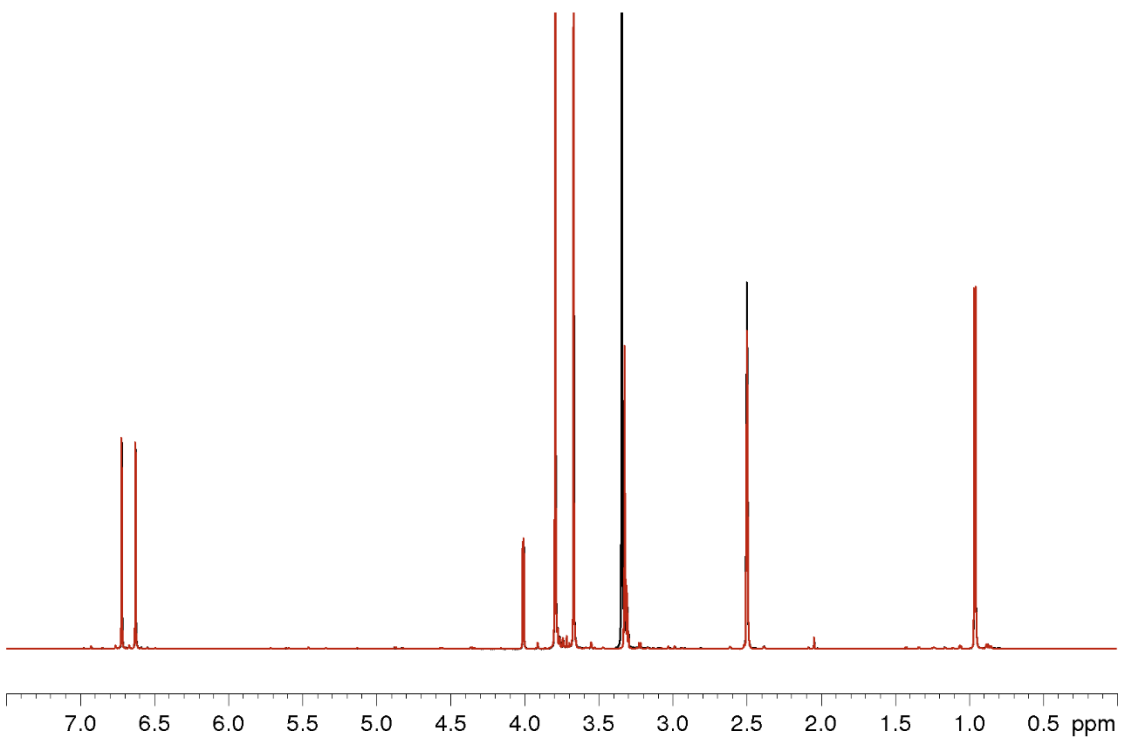


Abbildung 4-12: ¹H-NMR von β-Asaronepoxid aufgenommen in DMSO-*d*₆. Überlagerte Signale der Messung bei t = 0 h (rot) und t = 123 h (schwarz).

Lediglich mit Acetonitril als Lösungsmittel gab es nach fünf Tagen wie bei α -Asaronepoxid kleinere Abweichungen im Spektrum im Vergleich zur Messung bei $t = 0$ h. Im Bereich von 3,5–4,2 ppm ist eine leichte Zunahme an Signalen im Rauschen der Baseline zu erkennen (Abbildung 4-13). Diese ist jedoch so gering, dass im Allgemeinen von einer guten Stabilität von β -Asaronepoxid in Acetonitril bei RT über fünf Tage ausgegangen werden kann.

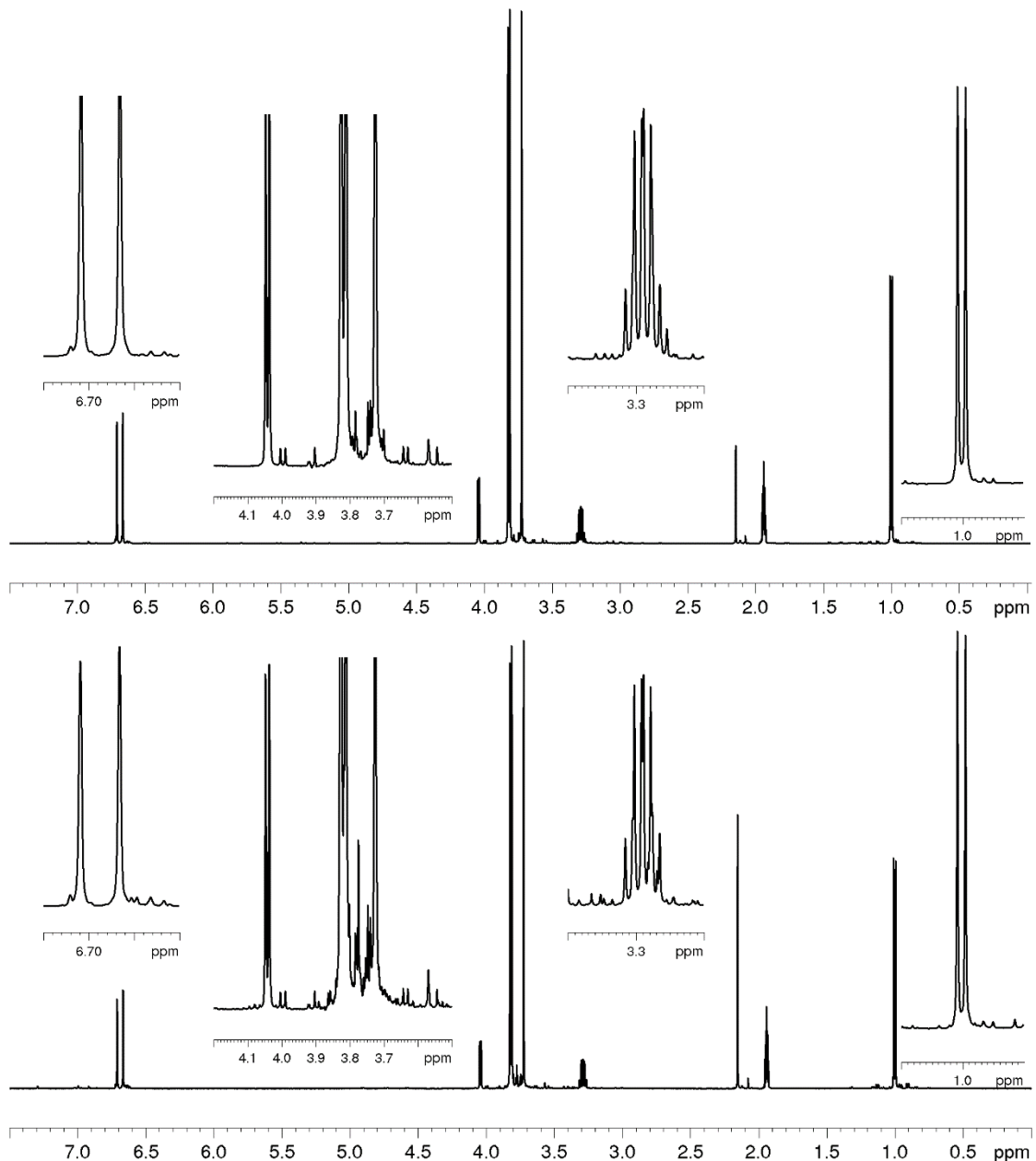


Abbildung 4-13: $^1\text{H-NMR}$ von β -Asaronepoxid aufgenommen in Acetonitril- d_3 $t = 0$ h oben und $t = 123$ h unten.

Versuche zur Stabilität von β -Asaronepoxid in wässriger Lösung wurden von Cartus *et al.* (2015) durchgeführt. Wie bei α -Asaronepoxid ist eine Reaktion innerhalb weniger Minuten zu beobachten. Weiter wurde die pH-Wert-Abhängigkeit des Produktspektrum der Hydrolyse der Epoxide untersucht. Hierbei zeigt sich, dass bei α -Asaronepoxid bei $\text{pH} \leq 9$ die Bildung des

erythro-Asarondiold bevorzugt wird. Bei pH 10 ist die Menge an Diol ungefähr gleich der an Keton. Ab pH 11 übersteigt die Ketonbildung die Diolbildung um ein Vielfaches. Die Hydrolyse von β -Asaronepoxid zeigt ein ähnliches Bild. Im Sauren (pH 0–4) wird vermehrt *erythro*-Asarondiold gebildet. Im Bereich von pH 5–9 ist das Verhältnis von Diol zu Keton ungefähr eins. Ab pH 10 übersteigt die Ketonbildung die Diolbildung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass α - und β -Asaronepoxid in den Lösungsmitteln DMSO, Chloroform und Acetonitril eine Stabilität bei RT über min. fünf Tage aufweisen. In wässrigen Lösungen findet bei beiden Epoxiden innerhalb weniger Minuten eine Hydrolyse zu den Diolen, *erythro*-Asarondiold und *threo*-Asarondiold und dem Keton 2,4,5-Trimethoxyphenlyaceton statt.

4.2 Reaktivität von α - und β -Asaronepoxid gegenüber

2'-Desoxynukleosiden

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reaktivität verschiedener Asaronmetaboliten gegenüber den DNA-Basen 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxythymidin (dT) und 2'-Desoxycytidin (dC) beschrieben (Abbildung 4-14).

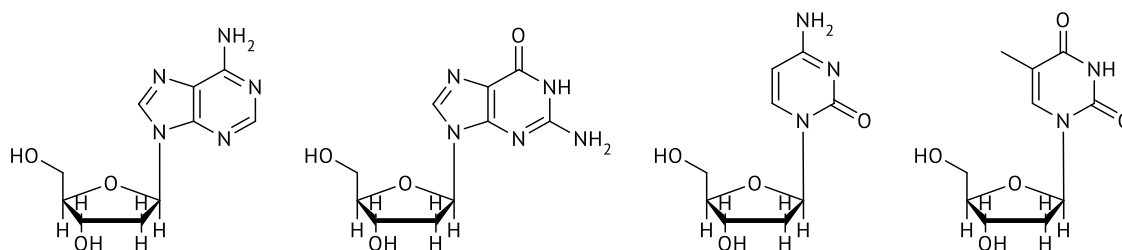


Abbildung 4-14: Strukturformeln der DNA-Basen 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxythymidin (von links nach rechts).

Hierzu wurden Ansätze im Maßstab von jeweils 500 μ l Gesamtvolumen durchgeführt und diese anschließend mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gekoppelt mit einem UV/VIS (ultraviolettes und *visible* (sichtbares) Licht)-Detektor (vgl. Kapitel 7.2.1) und HPLC gekoppelt mit Elektrosprayionisation (ESI)-MS analysiert. Der Grund für die geringen Probenvolumina waren die aufwendige Synthese von α - und β -Asaronepoxid und somit sollten diese limitierenden Chemikalien eingespart werden.

Zuerst wurde aufgrund der vorangegangenen Stabilitätsversuche der Epoxide in verschiedenen Lösungsmitteln die Reaktivität von α - und β -Asaronepoxid mit den Purinbasen dG und dA in DMSO untersucht, da aufgrund der freien Aminogruppe die Epoxide hier einen Angriffspunkt für die Adduktbildung finden könnten. Dazu wurden Reaktionsansätze mit jeweils 20 mM Epoxid und

10 mM Purinbase in 500 μ l DMSO angesetzt und für 24 h bei 37 °C belassen. Anschließend wurde die Reaktionsmischungen mittels HPLC-UV/VIS untersucht. Um eine Veränderung in den Reaktionsmischungen zu erkennen, wie die Abnahme der Peakhöhe/-fläche der Nucleoside und das Auftreten neuer Peaks im Chromatogramm, wurden die Reaktanten einzeln vermessen. Hierbei wurde beobachtet, dass unter den HPLC-Bedingungen (0,1%ige, wässrige Ameisensäure und Methanol) die Hydrolyseprodukte *erythro*-Asarondioldiol, *threo*-Asarondioldiol und 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone (im Folgenden als Keton bezeichnet) gebildet wurden (Abbildung 4-15). Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen aus den Stabilitätsversuchen von α - und β -Asaronepoxid im wässrigen Milieu. Unter den gewählten HPLC-Bedingungen (Kapitel 7.2.1) konnte kein Unterschied in den Produktspektren der Hydrolyse von α - und β -Asaronepoxid festgestellt werden.

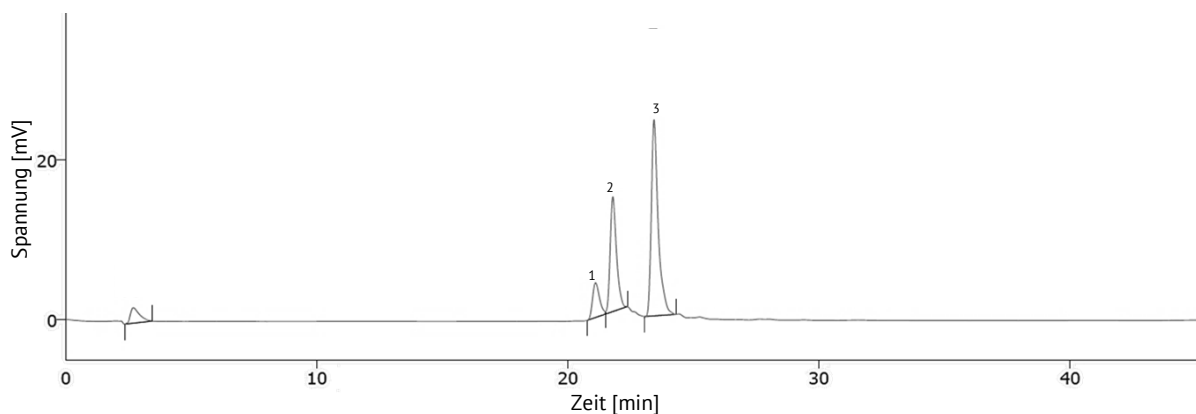


Abbildung 4-15: HPLC-UV/VIS-Chromatogramm einer 2 mM β -Asaronepoxid-Lösung in DMSO bei einer Wellenlänge von 275 nm. Mit 1: *threo*-Asarondioldiol bei $t_R = 21,1$ min, 2: *erythro*-Asarondioldiol bei $t_R = 21,8$ min und 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone bei $t_R = 23,4$ min.

Die Hydrolyseprodukte und die Nucleoside konnten mit der gewählten HPLC-UV/VIS-Methode gut getrennt werden und entstandene Produkte detektiert werden können. Die Retentionszeiten der Hydrolyseprodukte wurden mit synthetisch dargestellten Äquivalenten (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Alexander Cartus) überprüft und bestätigt. Neben DMSO wurde für die Reaktionsansätze eine 50:50 Mischung aus Methanol und 0,1%iger, wässriger Ameisensäure (im Folgenden als „MeOH-AS“ bezeichnet) und ein 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (im Folgenden als „Puffer“ bezeichnet) verwendet.

4.2.1 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin

Charakterisierung mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-ESI-MS

In Abbildung 4-16 ist zu sehen, dass bei der Reaktion von α -Asaronepoxid mit dA in DMSO keine Produktbildung stattfindet, ebenso in MeOH-AS. Lediglich in Puffer ist ein weiterer Peak (Peak 5)

48 | Ergebnisse und Diskussion

zu erkennen, welcher unter den vorhandenen HPLC-Bedingungen nicht vollständig vom Keton zu trennen war. Dieser Peak wurde weiter untersucht, um eine etwaige Adduktbildung zu verifizieren.

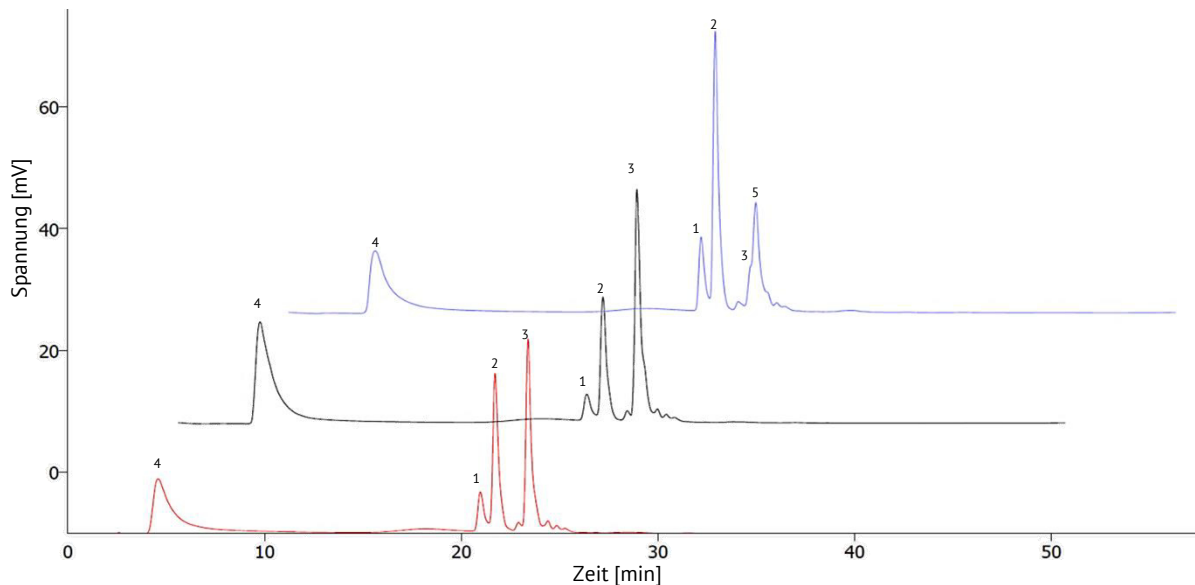


Abbildung 4-16: Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM α -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyadenosin in Dimethylsulfoxid (rot), Methanol : 0,1%ige Ameisensäure (50:50) (schwarz) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 4: 2'-Desoxyadenosin, 5: Reaktionsprodukt.

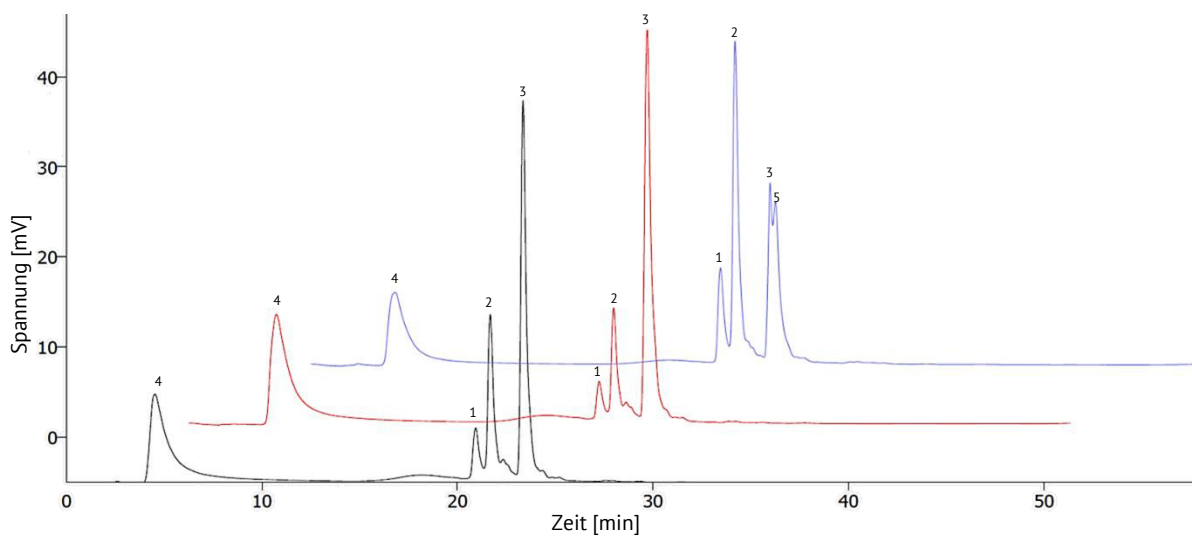


Abbildung 4-17: Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM β -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyadenosin in DMSO (schwarz), Methanol:0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 4: 2'-Desoxyadenosin, 5: Reaktionsprodukt.

Die Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA in den drei gewählten Lösungsmitteln lieferte ein ähnliches Bild. Aus Abbildung 4-17 geht hervor, dass in DMSO und in MeOH-AS kein Produkt gebildet wurde. In Puffer ist hingegen ein Peak (5) zu erkennen, welcher dieselbe Retentionszeit aufweist, wie der Produktpeak der Reaktion von α -Asaronepoxid mit dA.

Um die gebildeten Produkte (Peak 5) genauer zu untersuchen, wurden massenspektrometrische Messungen im *Fullscan* mit positiver Ionisierung durchgeführt. Hierzu wurde die HPLC-UV/VIS-Methode auf ein HPLC-ESI_{pos}-MS-System, bestehend aus einer Perkin Elmer HPLC und einem API 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems), übertragen. Folgenden MS-Parameter wurden verwendet: *curtain gas*: 20 psi, *ion spray voltage*: 4200 V, Temperatur: 400 °C, Gas 1: 20 psi, Gas 2: 20 psi, *declustering potential*: 60 V, *focus potential*: 400 V, *entrance potential*: 5 V. In Abbildung 4-18 sind die Chromatogramme und das Massenspektrum der Reaktionsmischung von α -Asaronepoxid mit dA in Puffer dargestellt.

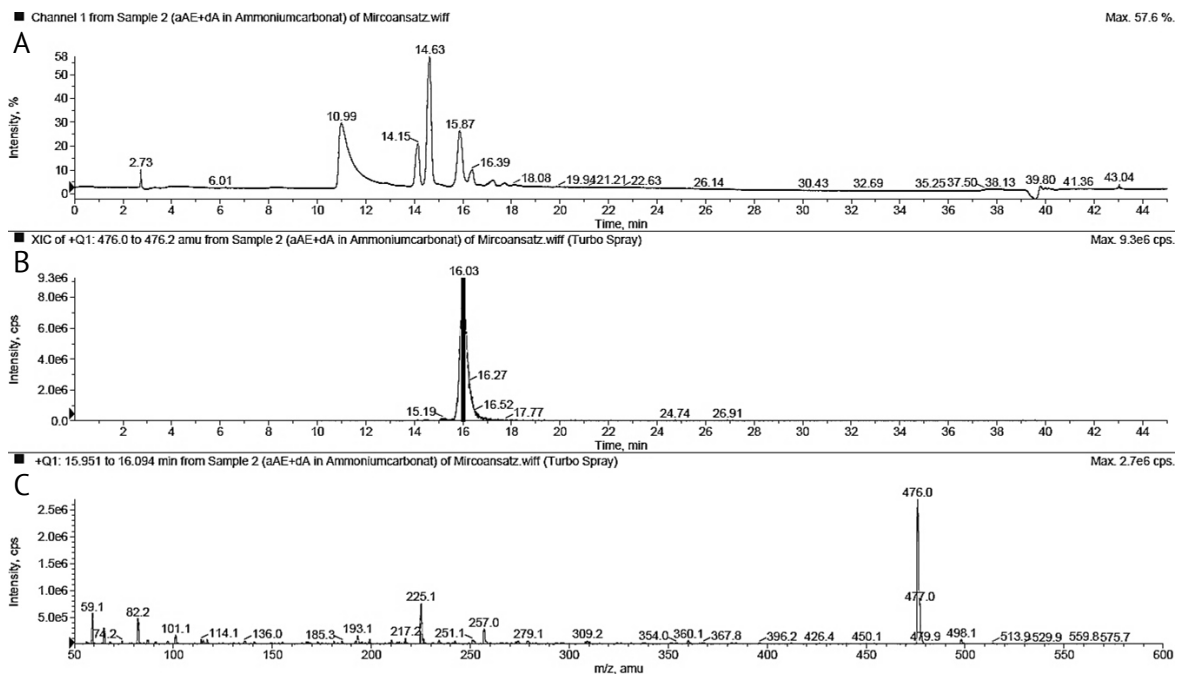


Abbildung 4-18: HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm des Reaktionsansatzes von α -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer. HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: *Extracted ion chromatogram* (XIC) der Q₁ Massen 476,0–476,2 amu. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,951–16,094 min.

Bei den Messungen konnte zur Retentionszeit von etwa 16 min eine Masse von m/z 476 detektiert werden. Im *extracted ion chromatogram* (extrahiertes Ionenchromatogramm; XIC) (Abbildung 4-18 (B)) stellte sich diese Masse als einzelner Peak dar. Diese Masse passte zu drei hypothetischen dA- α -Asaron-Addukten N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (N^6 -1'-OH-2H-A-dA), $N1$ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin ($N1$ -1'-OH-2H-A-dA) und $N3$ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin ($N3$ -1'-OH-2H-A-dA) (Abbildung 4-19). Weiter war es denkbar, dass sich die Position der Hydroxygruppe an der Seitenkette des Asarons in 2'-Position befindet. Der Reaktionsansatz der Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA lieferte das gleiche Ergebnis. Auch hier konnte unter dem Produktpeak im UV/VIS-Chromatogramm eine Masse mit m/z 476 detektiert werden.

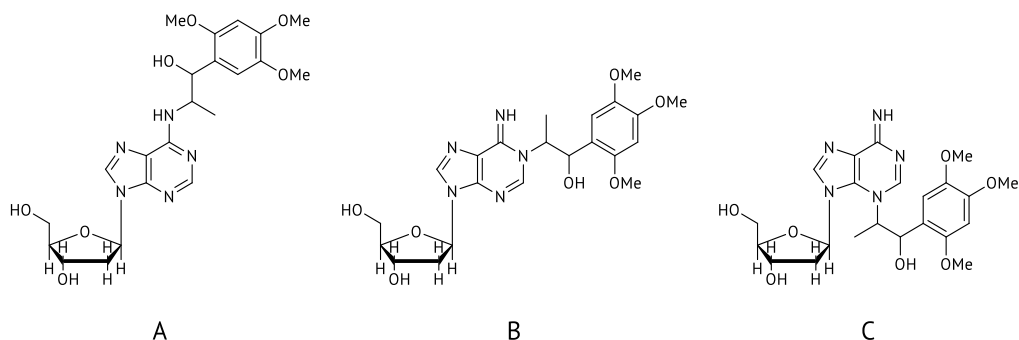


Abbildung 4-19: Strukturformeln der hypothetischen Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin. A: *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin, B: *N*¹-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin und C: *N*³-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin.

Die hier erzielten Erkenntnisse ließen darauf schließen, dass die α - und β -Asaronepoxid unter schwach basischen Bedingungen in der Lage sind mit dA im wässrigen Milieu zu reagieren. Hierbei entstand ein Produkt mit einem m/z von 476. Die Messungen mittels HPLC-UV/VIS und mittels HPLC-ESI_{pos}-MS zeigten keine weiteren Produkte bei den obengenannten Reaktionen. Die Reaktionsansätze in DMSO und MeOH-AS wurden ebenfalls mittels MS vermessen. Es konnten keine Hinweise auf eine Adduktbildung beobachtet werden, was die Ergebnisse aus den HPLC-UV/VIS-Messungen bestätigte.

Charakterisierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Um das gebildete Produkt genauer untersuchen zu können wurden größere Ansätze der Reaktion hergestellt. Da in den Reaktionsansätzen der Charakterisierung mittels HPLC-UV/VIS bzw. HPLC-ESI_{pos}-MS beobachtet wurde, dass es keinen Unterschied macht, welches der beiden Epoxide für die Adduktbildung eingesetzt wird, wurde im Folgenden die Reaktionen mit β -Asaronepoxid durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurden Reaktionen im Maßstab von 10 ml durchgeführt und die Konzentration der Reaktanten auf 40 mM β -Asaronepoxid und 20 mM dA verdoppelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mittels präparativer-HPLC aufgearbeitet. Hierzu wurde der Gradient der analytischen HPLC-Methode (Kapitel 7.2.1) im Produktbereich (20–28 min) etwas abgeflacht, um eine bessere Trennung der Produkte zu erzielen. Um diese Trennung zu verbessern, wurde zusätzlich Acetonitril anstatt Methanol als Fließmittel verwendet. Unter diesen Bedingungen konnten Keton und Addukt getrennt werden (Kapitel 7.2.2). Die erhaltenen Fraktionen wurden unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit und anschließend bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert.

Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und ESI_{pos}-MS²-Experimenten wurde die Identifizierung des Adduktes vorgenommen. Wie in Abbildung 4-19 dargestellt sind für die Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA drei Produkte denkbar.

In Abbildung 4-20 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsproduktes dargestellt, welches dem $\text{N}^6\text{-1'-OH-2H-A-dA}$ -Addukt entspricht. Den Signalen bei $\delta = 8,37$ ppm und $\delta = 8,15$ ppm konnten die Protonen des Purinrings genauer an Position C8 und C2 zugeordnet werden. Sie erfuhren aufgrund ihrer Nachbarschaft zu Heteroatomen und des Ringstromeffektes des heteroaromatischen Systems eine große Entschirmung und sind daher im tiefen Feld des Spektrums zu finden. Als Singulets mit einer chemischen Verschiebung von 7,00 ppm und 6,67 ppm stellten sich die Ringprotonen am Benzolring des Asaronrestes dar. Das charakteristische Triplett mit δ 6,34 ppm und einer Kopplungskonstante von 6,93 Hz entsprach dem Proton an C1-Position der Ribose. Das Proton an 1'-Position der Seitenkette des Asaronrestes wies ein δ von 4,40 ppm auf. Die Signale bei δ 2,25 ppm, 2,71 ppm, 3,87 ppm und 3,96 ppm konnten den Protonen der Ribose zugeordnet werden. Die drei Singulets der Protonen der Methoxygruppen am Benzolring erschienen im Spektrum bei δ 3,62 ppm, 3,75 ppm und 3,84 ppm. Das Duplett bei 1,03 ppm resultierte aus dem Signal der Protonen der Methylgruppe an 3'-Position des Asarons. Die Zuordnung der Protonen war aufgrund des breiten und intensiven Wassersignals nicht eindeutig, da hierdurch einige charakteristische Signale wie z. B. das Signal des Protons am 2'-Kohlenstoff des Asarons überlagert wurden. Eine hinreichende Menge an Protonen konnte jedoch zugeordnet werden, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass die Bindung an der exozyklischen Aminogruppe des dAs stattgefunden hat.

Für die DNA-Adduktbildung von Epoxiden mit dA ist in der Literatur beschrieben, dass diese bevorzugt an N1- oder N3-Position des dA stattfindet (Koskinen & Plná, 2000). Hätte eine solche Bildung stattgefunden, wären im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum charakteristische Signale der Protonen an C8 und C2 des Purinrings weniger stark entschirmt und im Bereich von 7,5–8,0 ppm zu finden.

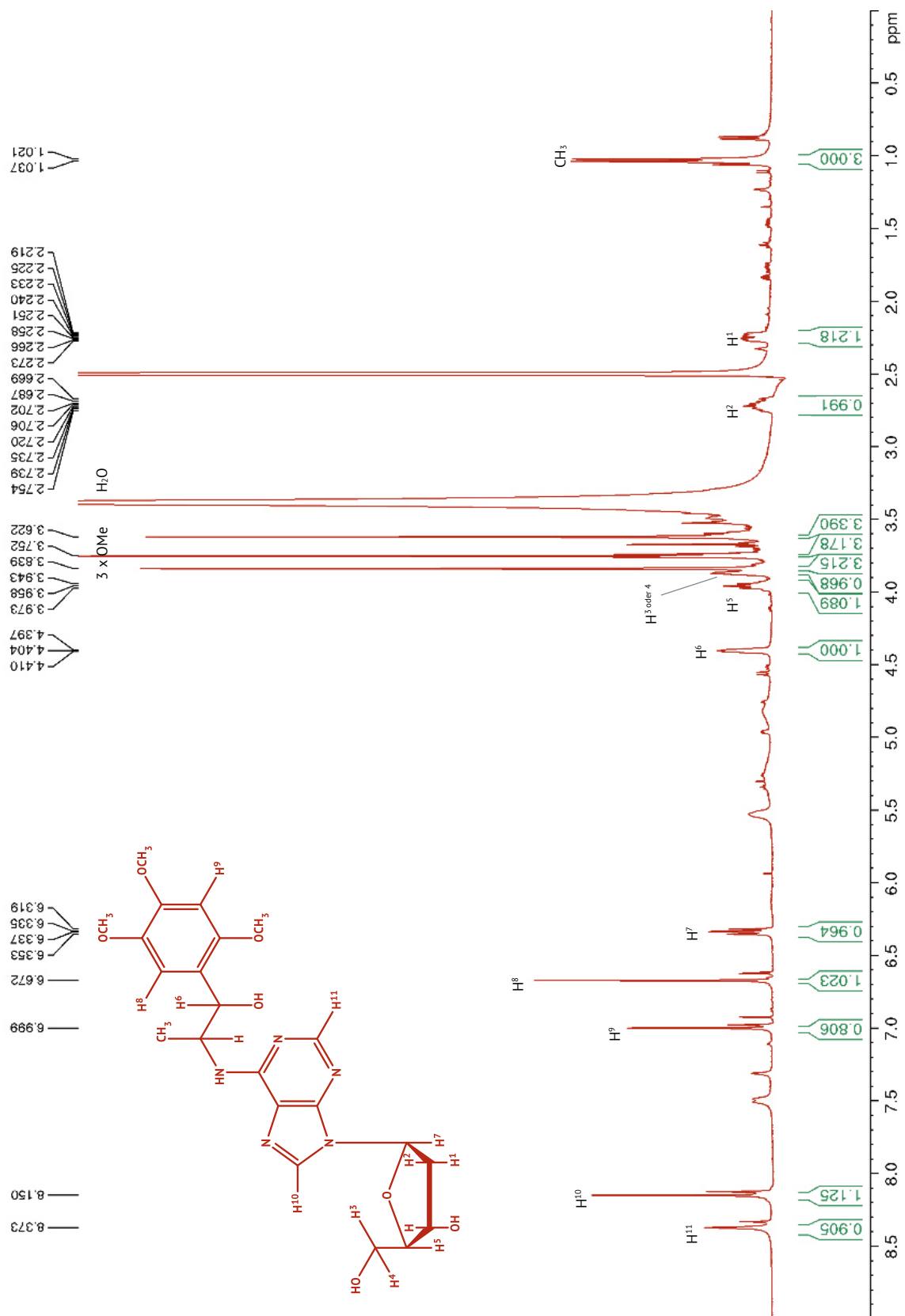


Abbildung 4-20: $^1\text{H-NMR}$ von des Produktes der Reaktion von 2'-Desoxyadenosin mit β -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ST-144) δ [ppm]: 1,03 (d, $J = 6,31$ Hz, 3H, CH_3); 2,25 (m, 1 H, H^1); 2,71 (m, 1 H, H^2); 3,62 (s, 3 H, OCH_3); 3,75 (s, 3 H, OCH_3); 3,84 (s, 3 H, OCH_3); 3,87 (m, 1 H, H^3 oder 4); 3,96 (m, 1 H, H^5); 4,40 (m, 1 H, H^6); 6,34 (t, $J = 6,93$ Hz, 1 H, H^7); 6,67 (s, 1 H, H^8); 7,00 (s, 1 H, H^9); 8,15 (s, 1 H, H^{10}); 8,37 (s, 1 H, H^{11}).

Weiter war aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ersichtlich, dass es sich hier unterschiedliche Enantiomere bildeten. N^6 -1'-OH-2H-A-dA weist in der Seitenkette des Asaronrestes zwei Stereozentren auf, sodass vier Isomere erwartet werden können. Über einen Peakflächenvergleich im Bereich der aromatischen Protonen konnte für das Hauptisomer Anteil von ca. 80 % berechnet werden.

Charakterisierung mittels $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}^2\text{-Spektroskopie}$

Zur weiteren Charakterisierung der Verbindung wurden $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}^2$ -Experimente durchgeführt.

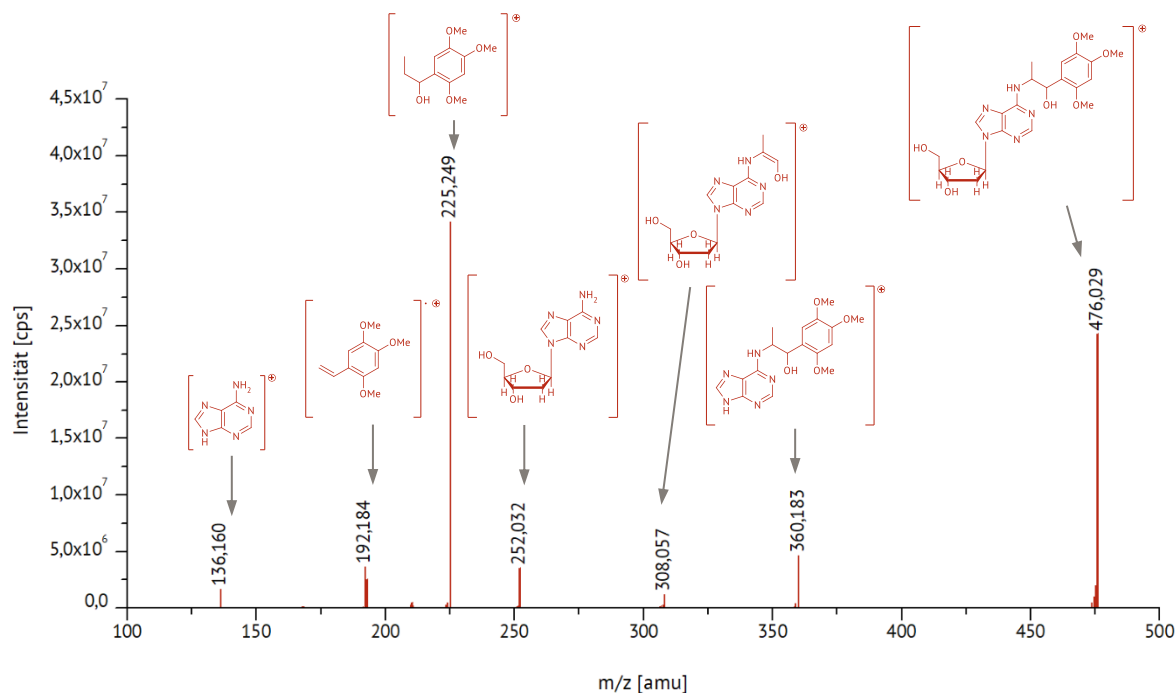


Abbildung 4-21: $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}^2$ -Spektrum von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin, ESI-MS/MS -System: Qtrap 5500 (AB Sciex), MS/MS -Parameter gemäß UHPLC-ESI-MS/MS-Methode (vgl. Kapitel 7.2.5), Scanrate: 200 Da/s, MCA 150 Scans, Flussrate: $10 \mu\text{l min}^{-1}$ (Spritzenpumpe), m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.

Das in Abbildung 4-21 dargestellte MS^2 -Spektrum des Produktes zeigte das Molekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei einem m/z 476,029. Das intensivste Fragmentation wies ein m/z 225,249 auf und resultierte aus der Abspaltung des 2'-Desoxyadenosins. Als weitere charakteristische Fragmentationen konnten die Abspaltung der Ribose (m/z 360,183), die Abspaltung des Asaronrestes (m/z 252,032) sowie die zusätzliche Abspaltung der Ribose (m/z 136,160) beobachtet werden. Das Fragmentation mit einem m/z 308,057 resultierte aus der Abspaltung des dreifach substituierten Benzolrings, anschließender Umlagerung und Ausbildung einer Doppelbindung. Bei einem m/z 192,184 konnte als Fragmentation der Asaronrest nach Abspaltung der Hydroxygruppe und einer Methylgruppe mit anschließender Ausbildung einer Doppelbindung nachgewiesen werden. Alle auftretenden Fragmentationen konnten der vorgeschlagenen Verbindung zugeordnet werden.

Zusammen mit den Ergebnissen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte hier mit hinreichender Sicherheit bestätigt werden, dass sich bei der Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA im Basischen N^6 -1'-OH-2H-A-dA als Hauptprodukt bildete.

4.2.2 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin**Charakterisierung mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-ESI-MS**

Die Adduktbildungsversuche wurden analog mit 2'-Desoxyguanosin als Reaktionspartner durchgeführt. Die Reaktion erfolgte jeweils mit 10 mM dG und 20 mM α - oder β -Asaronepoxid entweder in 500 μ l DMSO, MeOH-AS oder Puffer und einer Reaktionsdauer von 24 h bei 37 °C. Die Ergebnisse HPLC-UV/VIS-Untersuchungen der Reaktion von α -Asaronepoxid mit dG sind in Abbildung 4-22 dargestellt. In allen drei Reaktionsansätzen konnte ein Signal bei einer Retentionszeit von 23,4 min (Peak 7) beobachtet werden. Es fällt auf, dass auch hier für die Reaktion in Puffer die größte Umsetzung zum Reaktionsprodukt stattgefunden hat.

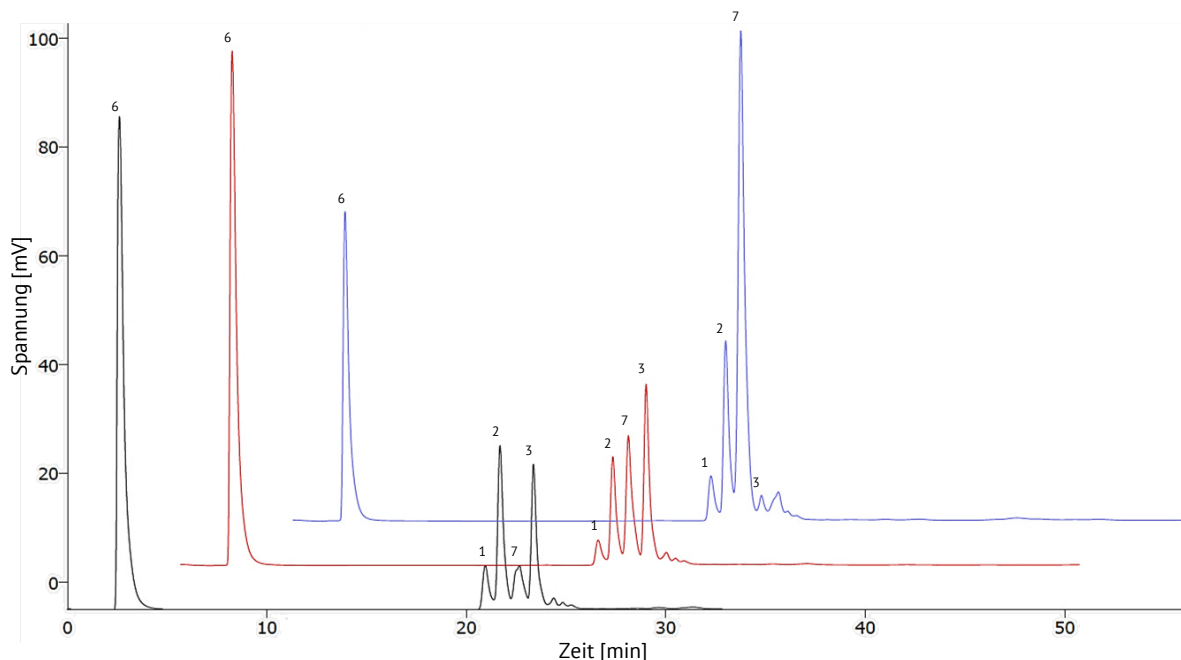


Abbildung 4-22: Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM α -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyguanosin in DMSO (schwarz), Methanol:0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondiol, 2: *erythro*-Asarondiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 6: 2'-Desoxyguanosin, 7: Reaktionsprodukt.

Mit β -Asaronepoxid als Reaktionspartner zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei hier in DMSO keine Reaktion zu beobachten war (Abbildung 4-23). Auch hier war mit Puffer als Lösungsmittel die größte Umsetzung zum Produktpeak 7 zu beobachten. Bei der Reaktion mit β -Asaronepoxid in Puffer fand im Vergleich zur Reaktion mit α -Asaronepoxid eine größere Abnahme der Peakfläche von dG statt.

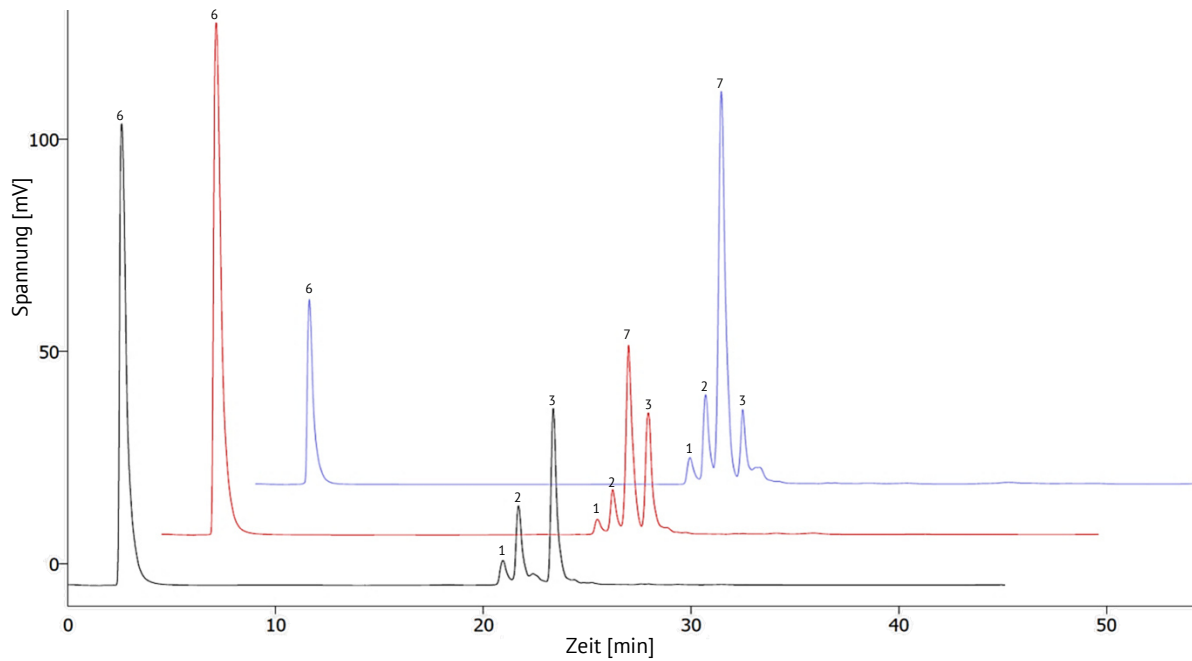


Abbildung 4-23: Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM β -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyguanosin in DMSO (schwarz), Methanol : 0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 6: 2'-Desoxyguanosin, 7: Reaktionsprodukt.

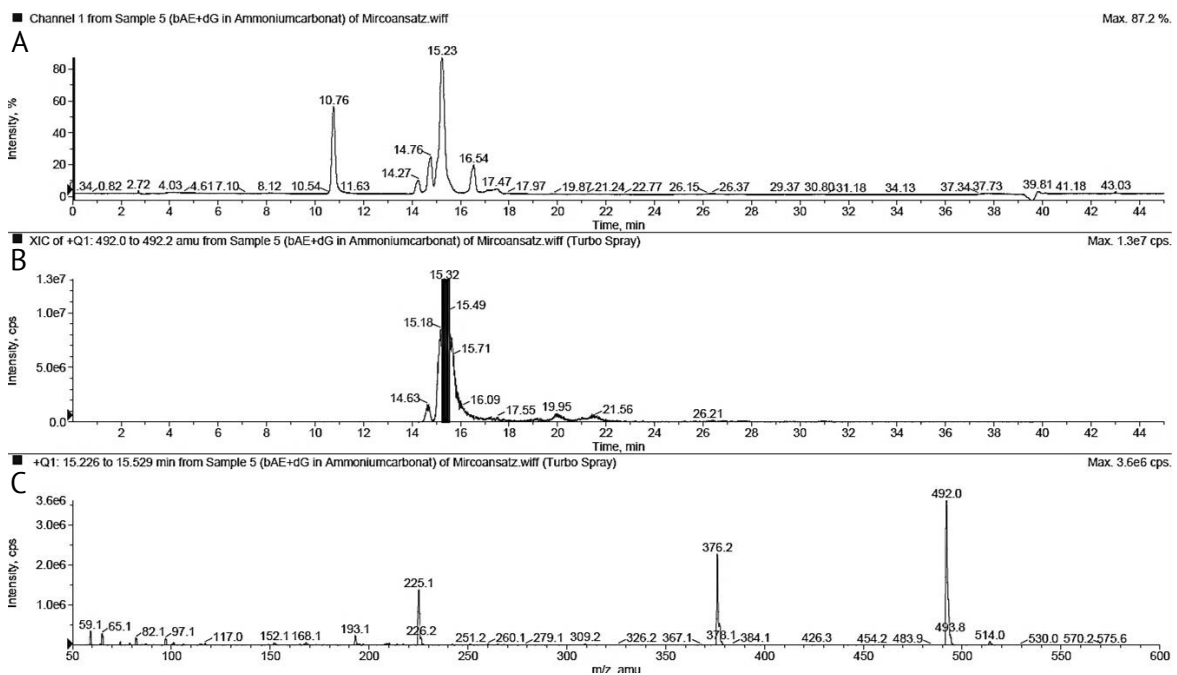


Abbildung 4-24: HPLC-ESI_{pos}-MS-Scan des Reaktionsansatzes von α -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: *Extracted ion chromatogram* (XIC) der Q1 Massen 492,0–492,2 amu. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,226–15,529 min.

Mittels HPLC-ESI_{pos}-MS wurden die Reaktionsansätze von β -Asaronepoxid mit dG weiter untersucht mit dem Ziel das entstandene Produkt zu charakterisieren. Anhand des Reaktionsansatzes in Puffer konnte gezeigt werden, dass das Signal bei t_R 15,3 min ein m/z von 492 besitzt (Abbildung 4-24).

Diese entspricht den drei hypothetische dG-Addukten *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (*N*²-1'-OH-2H-A-dG), *N*⁷-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (*N*⁷-1'-OH-2H-A-dG) und *O*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (*O*⁶-1'-OH-2H-A-dG) (Abbildung 4-25). Weiter konnte zu gleichen Retentionszeit ein Signal von *m/z* 376 detektiert werden, welches dem Addukt *N*⁷-1'-Hydroxy-dihydroasaron-guanin (*N*⁷-1'-OH-2H-A-GA) entsprechen könnte. Dieses kann nach Abspaltung der Ribose aus *N*⁷-1'-OH-2H-A-dG entstehen. Eine genauere Identifizierung und Charakterisierung konnte auch hier erst nach Synthese im größeren Maßstab erfolgen. Jedoch war es wahrscheinlich, dass das Guanin-Addukt *N*⁷-1'-OH-2H-A-GA unter den gewählten HPLC-Bedingungen später eluieren würde, da es durch den Verlust der Ribose weniger polar ist als die anderen Addukte. Auch die Bildung von *N*⁷-1'-OH-2H-A-dG als stabiles Addukt wurde als relativ unwahrscheinlich angesehen, da aus der Literatur bekannt ist, dass *N*⁷-Addukte von anderen Epoxiden wie z. B. von Glycidamid oder Styrol auf Grund der Ladung an *N*⁷-Guanosin zur Abspaltung der Ribose neigen und somit zu Guanin-Addukten führen (Segerbäck *et al.*, 1995; Da Costa *et al.*, 2003, Schrader und Linscheid, 1997).

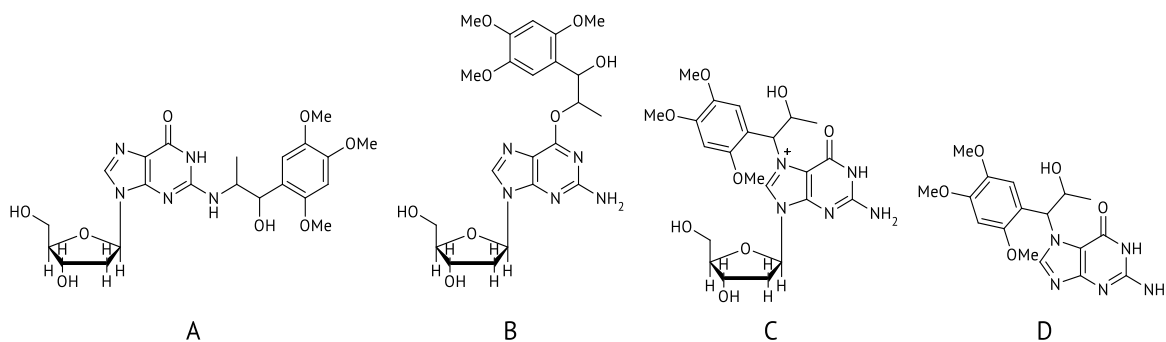


Abbildung 4-25: Strukturformeln der hypothetischen Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin. A: *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin; B: *O*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin, C: *N*⁷-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und D: *N*⁷-1'-Hydroxy-dihydroasaron-guanin.

Weiter wurden auch die Reaktionsansätze in MeOH-AS und die Ansätze mit α -Asaronepoxid in allen drei Lösungsmitteln massenspektrometrisch untersucht. In allen Reaktionsmischung konnte die Bildung eines Produktes mit *m/z* 492 nachgewiesen werden. Weitere etwaige Produkte konnten unter den gewählten Bedingungen im Massenbereich von 50–600 amu in keinem der Reaktionsansätze mit dG nachgewiesen werden.

Charakterisierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie erfolgte am Reaktionsprodukt aus β -Asaronepoxid (40 mM) und dG (20 mM) in Puffer mit einem Gesamtvolumen von 10 ml. Der Reaktionsansatz wurde mittels präparativer-HPLC aufgearbeitet, wofür der Gradient der HPLC-UV/VIS-Methode im Bereich von 20–30 min zur besseren Trennung der Reaktanten

abgeflacht wurde (vgl. Kapitel 7.2.2). Die erhaltenen Fraktionen wurden unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit und anschließend bis zu Gewichtskonstanz lyophilisiert.

Für die Reaktion von dG mit β -Asaronepoxid konnte eine Fraktion gesammelt werden, welche dem Produktpeak in den vorherigen Untersuchungen entsprach. Mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-ESI_{pos}-MS wurde diese vor dem Lyophilisieren der Fraktion bestätigt. Der so erhaltene Feststoff wurde zum einen für die Messung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und zum anderen zu massenspektrometrischen Untersuchungen eingesetzt.

In Abbildung 4-26 ist das ¹H-NMR des Produktes in der Übersicht dargestellt und die Signale wurden den Protonen des Moleküls zugeordnet.

Das Signal bei δ 10,57 ppm war dem Proton an N1-Position des dGs zuzuordnen. Es erfuh durch die hohe Elektronegativität des freien Elektronenpaares am Stickstoff und der Nachbarschaft zu dem heteroaromatischen System des Purins eine hohe Abschirmung und hat einen starken Tieffeldshift. Das Proton an C8 des dGs ist etwas weniger stark entschirmt mit δ 7,86 ppm. Die arylischen Protonen des Asaronrestes ergeben jeweils ein Singulett bei δ = 6,80 ppm und δ = 6,68 ppm. Die Signale bei δ 2,11 ppm, 2,62 ppm, 3,53 ppm, 3,77 ppm, 3,87 ppm, 4,32 ppm und 6,06 ppm konnten den Protonen der 2'-Desoxyribose zugeordnet werden. Das Multipllett bei δ = 5,07 ppm resultierte aus dem Proton an 1'-Position der Asaronseitenkette. Die drei Singulett mit jeweils einem relativen Integral von drei entstammten den Protonen der Methoxygruppen am Benzolring. Das Multipllett bei δ 3,48 ppm entsprach dem Proton an 2'-Position der Asaronseitenkette. Die größte Abschirmung erfuhren die Protonen der Methylgruppe am Asaronrest mit δ = 1,08 ppm.

Aus den Ergebnissen der ¹H-NMR-Spektroskopischen Untersuchungen ging hervor, dass als Produkt der Reaktion von β -Asaronepoxid mit dG das Addukt N²-1'-OH-2H-A-dG resultierte. Alle weiteren hypothetischen Addukte konnten aufgrund des ¹H-NMR-Spektrums und dem Retentionsverhalten des Adduktes mittels HPLC ausgeschlossen werden. Begründet lag das darin, dass für das O⁶-1'-OH-2H-A-dG kein Signal für das Proton an N1-Position detektiert werden sollte und weiter ein Signal für die beiden Protonen an N²-Position erkennbar sein sollten. Wie schon erwähnt ist die Stabilität des N7-1'-OH-2H-A-dG durch die Ladung an N7 nur begrenzt und aus der Literatur ist bekannt, dass diese schnell unter Abspaltung der Ribose zu N7-1'-OH-2H-A-GA zerfallen würde. Diese Beobachtungen stützten die These, dass bei der Reaktion von β -Asaronepoxid mit dG das Addukt N²-1'-OH-2H-A-dG entstand.

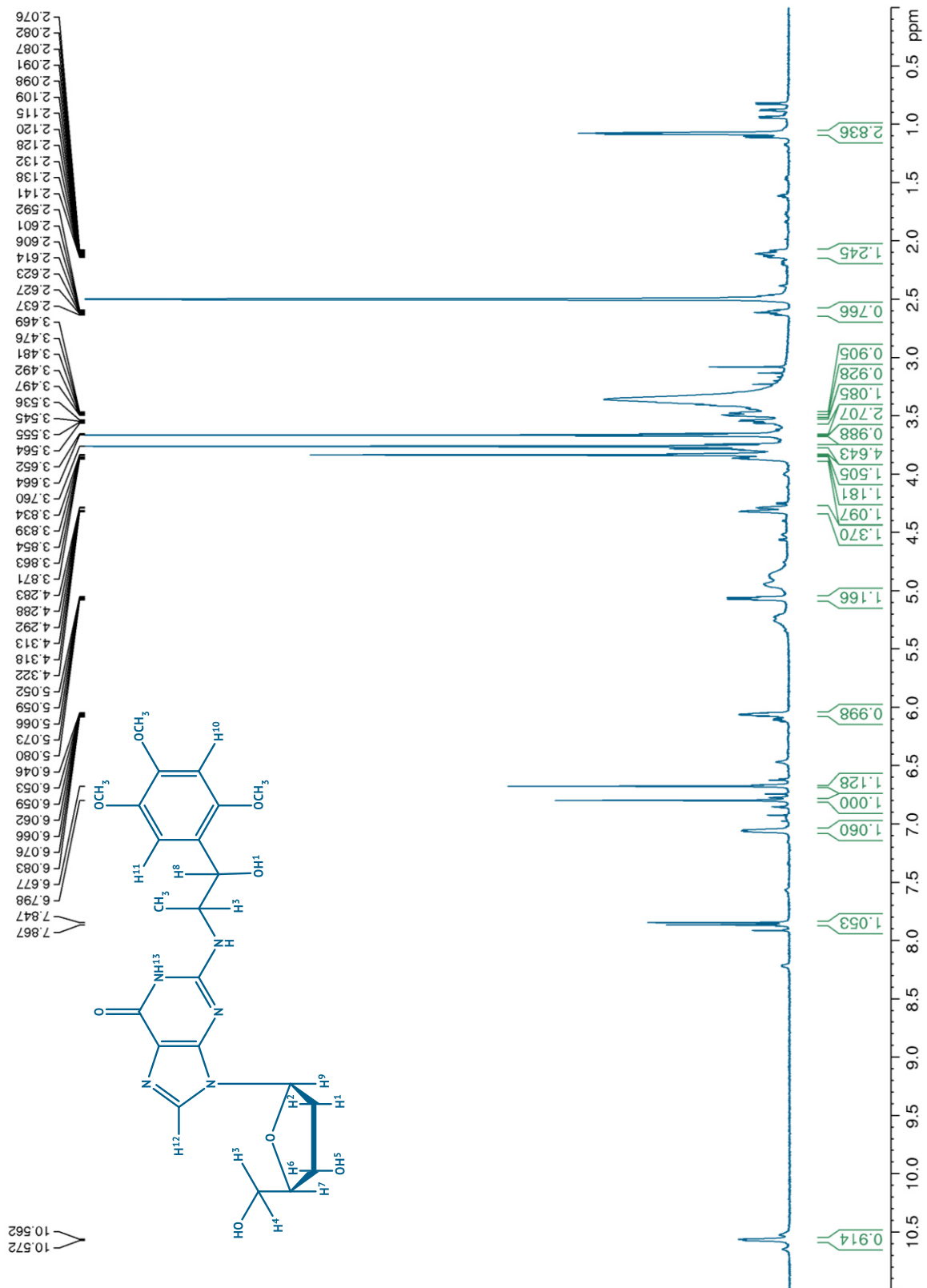


Abbildung 4-26: $^1\text{H-NMR}$ von der Produktfraktion der Reaktion von 2'-Desoxyguanosin mit β -Asaronepoxid aufgenommen in DMSO- d_6 . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6 , ST-141) δ [ppm]: 1,08 (d, 3 H, CH₃); 2,11 (m, 1 H, H³); 2,62 (m, 1 H, H²); 3,48 (m, 1 H, H³); 3,53 (m, 1 H, H⁴); 3,66 (s, 3 H, OCH₃); 3,76 (s, 3 H, OCH₃); 3,77 (m, 1 H, OH⁵); 3,84 (s, 3 H, OCH₃); 3,87 (m, 1 H, H⁶); 4,32 (d, 1 H, H⁷); 5,07 (m, 1 H, H⁸); 6,06 (m, 1 H, H⁹); 6,68 (s, 1 H, H¹⁰); 6,80 (s, 1 H, H¹¹); 7,86 (s, 1 H, H¹²); 10,57 (m, 1 H, H¹³).

Charakterisierung mittels ESI_{pos}-MS²-Spektroskopie

Mittels MS²-Experimenten wurden die Ergebnisse der ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt.

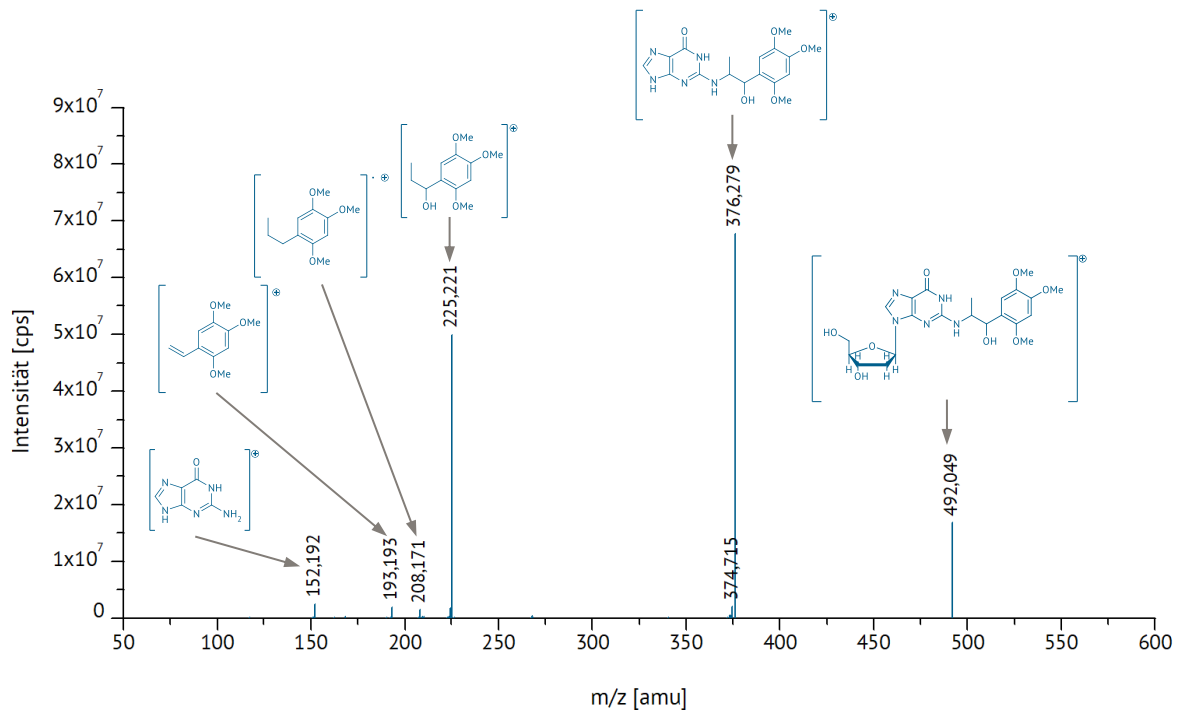


Abbildung 4-27: ESI_{pos}-MS²-Spektrum von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin, ESI-MS/MS-System: Qtrap 5500 (AB Sciex), MS/MS-Parameter gemäß UHPLC-ESI-MS/MS-Methode (vgl. Kapitel 7.2.5), Scanrate: 200 Da/s, MCA 200 Scans, Flussrate: 10 μl min⁻¹ (Spritzpumpe), *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis

Das ESI_{pos}-MS²-Spektrum von *N*²-1'-OH-2H-A-2'-dG, welches in Abbildung 4-27 dargestellt ist, zeigte das Molekülion [M+H]⁺ mit *m/z* 492,049. Das Fragmentmolekül, welches nach der Abspaltung der Desoxyribose entstand, wies mit einem *m/z* 376,279 die höchste Intensität auf. Weiter konnten noch Fragmentionen bei *m/z* 225,221 (Abspaltung von dG) und *m/z* 152,192 (Guanin nach Abspaltung der Ribose und des Asaronrestes) beobachtet werden. Für das Fragmention von *m/z* 208,171, welches durch die Abspaltung von dG und zusätzlicher Abspaltung der Hydroxygruppe entstanden war, und das Fragmention bei mit *m/z* 193,193, welches zusätzlich noch eine Abspaltung der terminalen Methylgruppe aufwies, wurden die geringsten Intensitäten beobachtet. Diese Fragmentionen bestätigten die angenommene Struktur des dG-Adduktes. Bei einem nukleophilen Angriff von dG an die 1'-Position des Asaronepoxids würde die resultierende Hydroxylgruppe in 2'-Position der Asaronseitenkette lokalisiert sein. Diese Struktur würde aber nicht zu den Fragmenten *m/z* 208,171 und *m/z* 193,193 führen.

Durch die Kombination der Analysen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und ESI_{pos}-MS²-Analysen konnte bestätigt werden, dass das Hauptprodukt der Reaktion von β-Asaronepoxid mit dG im Basischen das Addukt *N*²-1'-OH-2H-A-dG war.

4.2.3 Reaktionen von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxythymidin

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Adduktbildung zwischen den Asaronepoxiden und den Nucleosiden in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer zur Produktbildung führte, wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch Reaktionsansätze in diesem Medium durchgeführt. Neben den Purinbasen dA und dG sollten auch die Pyrimidinbasen dC und dT auf Reaktivität gegenüber Asaronepoxiden analysiert werden. Hierzu wurden Lösungen von 10 mM dC bzw. dT mit 20 mM α - oder β -Asaronepoxid in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer hergestellt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Reaktion von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin

Für Reaktionsansätze mit dC konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zu den Reaktionen mit dA und dG das Verhältnis von Diolen zu Keton deutlich verändert war (Abbildung 4-28). Es war kaum Keton (Peak 3) in den Reaktionsansätzen zu detektieren. Weiter konnte sowohl mit α -Asaronepoxid als auch mit β -Asaronepoxid die Bildung eines Reaktionsproduktes (Peak 10) beobachtet werden.

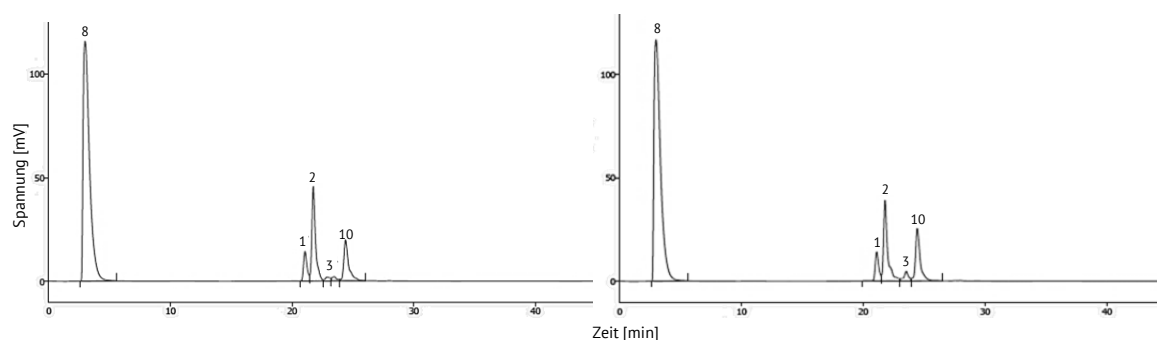


Abbildung 4-28: HPLC-UV/VIS-Chromatogramme der Reaktionen von 2'-Desoxycytidin mit α -Asaronepoxid (links) und β -Asaronepoxid (rechts) in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer bei einer Wellenlänge von 275 nm. 1: *threo*-Asarondiol, 2: *erythro*-Asarondiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 8: 2'-Desoxycytidin und 10: Reaktionsprodukt.

Für das Reaktionsprodukt von β -Asaronepoxid mit dC in Puffer wurden die in Abbildung 4-29 dargestellten hypothetischen Addukte angenommen. Aufgrund der allgemeinen Reaktivität von dC gegenüber Elektrophilen war sowohl die Bildung der nukleophilen Angriff des N^4 - und des N^3 -Stickstoffs denkbar, welche zu den Addukten N^4 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin (N^4 -1'-OH-2H-A-dC) und N^3 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin (N^3 -1'-OH-2H-A-dC) führen würden. Weiter war auch die Adduktbildung über den O^2 -Sauerstoff möglich, woraus das Addukt O^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin (O^2 -1'-OH-2H-A-dC) resultieren würde. Alle drei Verbindungen weisen eine molare Masse von 451,47 g mol⁻¹ auf.

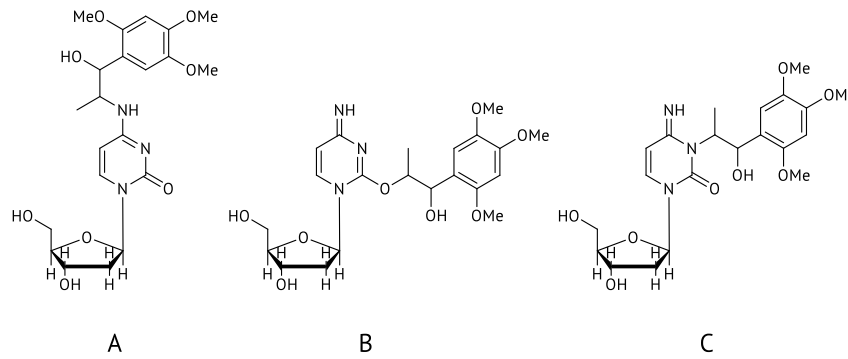


Abbildung 4-29: Hypothetische Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin. A: *N*⁴-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxycytidin, B: *O*²-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxycytidin und C: *N*³-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxycytidin.

Mittels HPLC-ESI_{pos}-MS wurden die beiden Reaktionsansätze von α - und β -Asaronepoxid mit dC im *Fullscan*-Modus untersucht. Es konnten keine Hinweise auf die Bildung der hypothetisch möglichen dC-Addukte (Abbildung 4-29) gefunden werden. Die hypothetischen dC-Addukten würden im positiven Modus ein m/z 452 aufweisen. Wie in Abbildung 4-30 zu sehen war, konnten den Peak bei Minute 15,4 und 17,4 keine passende Masse zugeordnet werden. Auch ein XIC des m/z 452 zeigte keine Hinweise auf die Bildung eines der hypothetischen Addukte bei einer anderen Retentionszeit.

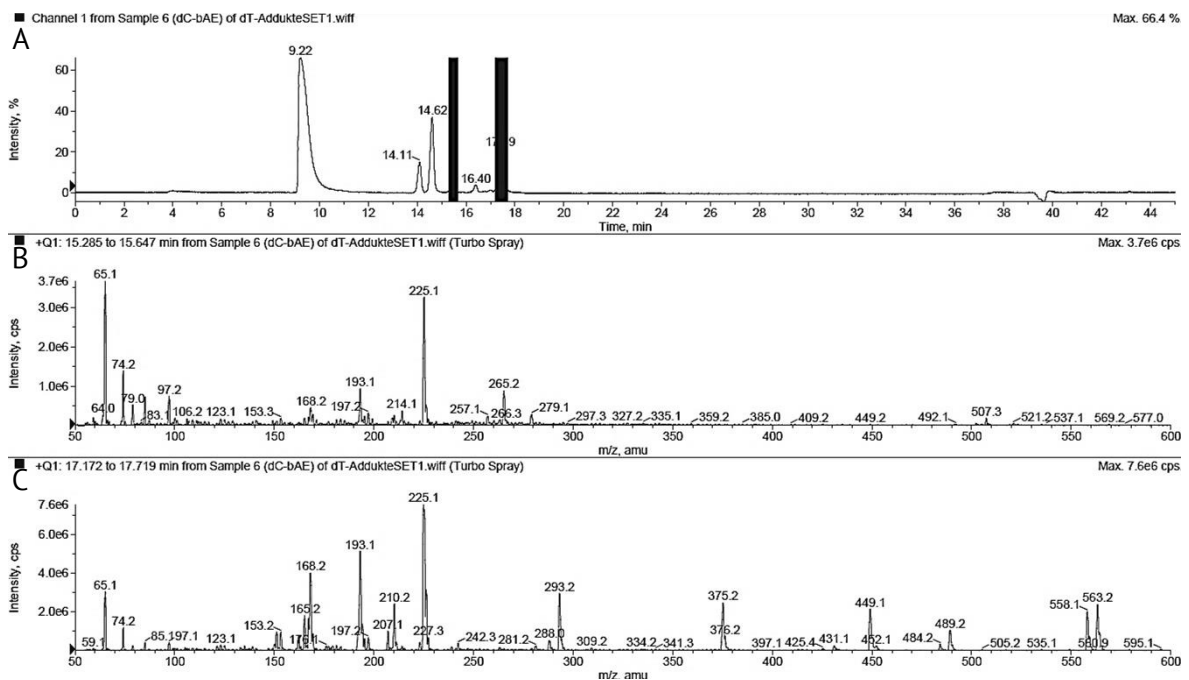


Abbildung 4-30: HPLC-ESI_{pos}-MS-Spektrum des Reaktionsansatzes von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: Extrahiertes Massenspektrum von 15,285–15,647 min. C: Extrahiertes Massenspektrum von 17,172–17,719 min.

Für die im MS-Spektrum beobachteten m/z konnten keine weiteren Addukte aus der von Asaronepoxid mit dC abgeleitet werden. Nachdem die Untersuchungen mittels Neutralverlust (NL) von 116 Da, was den Verlust der Desoxyribose darstellt und ein übliches Verfahren ist, um dN-Addukte zu detektieren, keine Hinweise auf eine Adduktbildung lieferten, wurde

geschlussfolgert, dass unter den herrschenden Bedingungen keine Adduktbildung stattfindet. Zur Aufklärung der Identität des Produktpeaks (Peak 10) wurden Hypothesen zur Bildung von Biaddukten der Epoxide bzw. mit deren Hydrolyseprodukten aufgestellt (siehe Kapitel 4.2.4).

Reaktion von α - und β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxythymidin

Mit dT als Nukleosid wurden ebenfalls Reaktionsansätze von α - und β -Asaronepoxid in Puffer durchgeführt. Im HPLC-UV/VIS-Chromatogramm ließen sich neben den Hydrolyseprodukten zwei Produktpeaks bei 22,6 min (Peak 11) und 24,4 min (Peak 12) beobachten (Abbildung 4-31). Ähnlich wie bei der Reaktion von dC mit α -Asaronepoxid war hier die Bildung des Ketons als Hydrolyseprodukt deutlich reduziert zu den vorhergegangenen Reaktionen in Puffer.

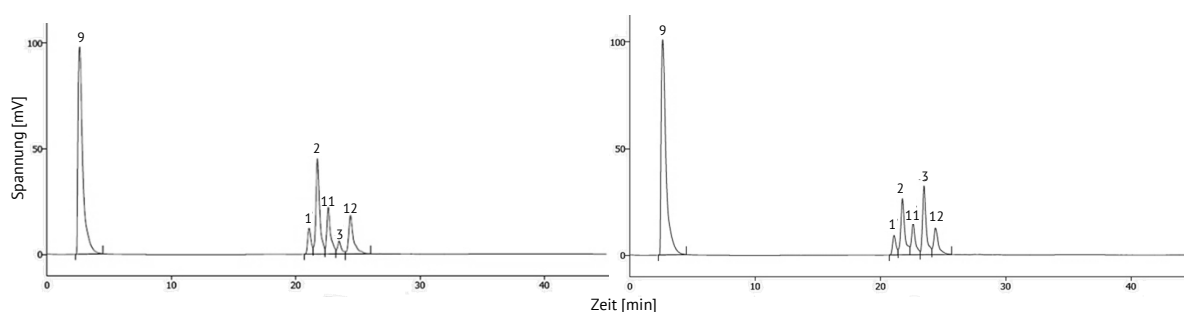


Abbildung 4-31: HPLC-UV/VIS-Chromatogramme des Reaktionsansatzes von 2'-Desoxythymidin mit α -Asaronepoxid (links) und mit β -Asaronepoxid (rechts) in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer bei einer Wellenlänge von 275 nm. 1: *threo*-Asarondiol, 2: *erythro*-Asarondiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton, 9: 2'-Desoxythymidin und 11 und 12: Reaktionsprodukte.

Der Reaktionsansatz von dT mit β -Asaronepoxid wies ebenfalls zwei Produktpeaks bei 22,6 min (Peak 11) und 24,4 min (Peak 12) auf. Jedoch war hier das Verhältnis der Hydrolyseprodukte vergleichbar mit den Reaktionen mit dA und dG in Puffer. Die zwei Produktpeaks stehen im Widerspruch zu den hypothetischen Addukten mit dT. Denn hier würde man nur ein $N3$ -Addukt $N3$ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxythymidin ($N3$ -1'-OH-2H-A-dT) erwarten (Abbildung 4-32).

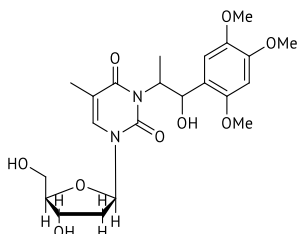


Abbildung 4-32: Hypothetisches Addukt von Asaronepoxid mit 2'-Desoxythymidin, $N3$ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxythymidin.

Massenspektrometrischen Untersuchungen lieferten Aufschluss über die entstandenen Reaktionsprodukte. Hierbei zeigte sich, dass zur Retentionszeit von Peak 11 ein m/z 467 detektiert werden konnte (Abbildung 4-33:C), welches dem hypothetischen dT-Addukt $N3$ -1'-OH-2H-A-dT entsprach.

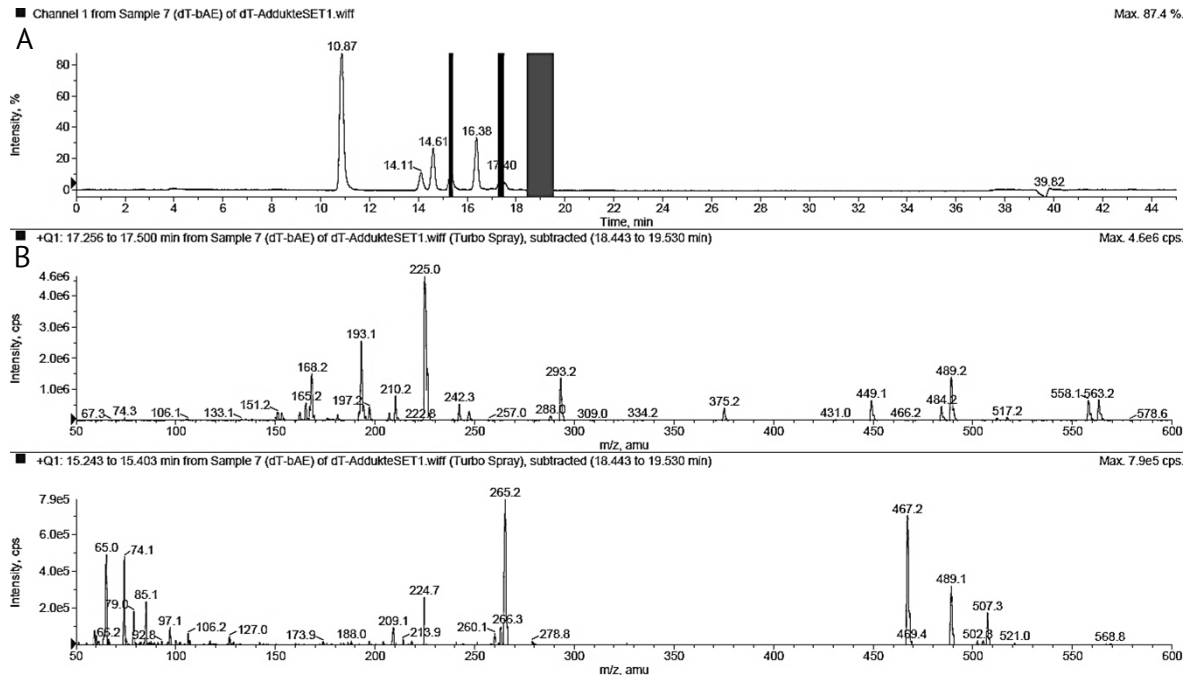


Abbildung 4-33: HPLC-ESI_{pos}-MS-Spektrum des Reaktionsansatzes von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxythymidin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: Extrahiertes Massenspektrum von 17,256–17,500 min. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,243–15,403 min.

Für den Peak bei t_R 17,4 min konnte keine Reaktion mit dT beobachtet werden. Auch im Reaktionsansatz von dC mit β -Asaronepoxid konnte ein Peak bei t_R 17,4 min beobachtet werden. Daher wurde versucht zu klären, um welches Reaktionsprodukt es sich handelt. Durch Experimente im *neutral loss* (NL) Modus konnte abermals ausgeschlossen werden, dass es sich hier um Reaktionsprodukte mit dNs handelt. Weiter widerlegten diese Messungen auch die postulierte Adduktbildung mit dT. Im Reaktionsansatz konnten keine Hinweise auf eine Adduktbildung von Asaronepoxiden mit dT im Basischen gefunden werden. Die nachfolgenden NL-Messungen von DNA-Hydrolysaten inkubierter pRH bestätigten, dass sich nur Addukte mit dA und dG gebildet hatten.

4.2.4 Hypothetische Nebenprodukte

Auffällig war, dass in allen Reaktionsansätzen ein Peak mit m/z 449 und ein Peak mit m/z 467 zu beobachten waren und diese im XID auch ein Signal bei $t_R \cong 17,4$ min und $t_R \cong 16,5$ zeigten. Da in den Reaktionsmischungen außer dNs nur noch die Epoxide, bzw. deren Hydrolyseprodukte enthalten waren, wurde die Hypothese eines Biaddukts aus zwei Asaronepoxiden bzw. aus Asaronepoxid mit einem der Hydrolyseprodukte aufgestellt.

Unter basischen Reaktionsbedingungen, wie sie es in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer vorherrschen ($\text{pH} \approx 9$), ist es denkbar, dass Asarondiole ein Proton abstrahieren und somit als

Nukleophil an den sterisch weniger gehinderten 2'-Kohlenstoff des Asaronepoxid angreift. Dadurch erfolgt die Ringöffnung des Epoxids unter Protonenaufnahme, woraus ein Produkt mit m/z 465 resultieren könnte. Das Produkt weist eine Verknüpfung zwischen den 2'-Kohlenstoffatomen Seitenketten der beiden Verbindungen auf (Abbildung 4-34: A).

Weiter könnte im Basischen auch die Ringöffnung des Epoxides durch nukleophilen Angriff eines Hydroxidions stattfinden. Das so entstandene Nukleophil könnte nun wiederum an den 2'-Kohlenstoff der Seitenkette nächsten Epoxids angreifen und ein Addukt bilden. Das entstandene Produkt würde auch ein m/z von 467 aufweisen, unterscheidet sich aber darin, dass hier eine Verknüpfung vom 2'-Kohlenstoff zum 1'-Kohlenstoff stattgefunden hat (Abbildung 4-34: B).

Die dritte theoretische Adduktbildung wäre die Reaktion des Ketons mit einem Asaronepoxid. Das Keton liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit dem Enol vor (Keto-Enol-Tautomerie). Das Enol wiederum könnte im Basischen ein Proton abstrahieren und somit als Nukleophil in einer S_N2 -Reaktion an das Epoxid binden. Das entstandene Produkt würde ein m/z von 449 aufweisen und ist jeweils über den 2'-Kohlenstoff miteinander verknüpft (Abbildung 4-34: C).

Mit der Beobachtung der Bildung von Biaddukten aus Epoxiden sich selbst und seinen Hydrolyseprodukten konnte die Produktbildung bei fehlender dN-Adduktbildung der Reaktionen von Asaronepoxid mit dC bzw. dT aufgeklärt werden. Weiter wurden alle massenspektrometrisch untersuchten Reaktionsansätze auf das Vorhandensein der Biaddukte analysiert. In allen Ansätzen, welche mit Ammoniumcarbonat-Puffer als Lösungsmittel durchgeführt wurden, konnten das m/z 449 und das m/z 467 nachgewiesen werden. Die Signalintensität variierte jedoch stark zwischen den Ansätzen. So konnte bei den Reaktionen mit dG und dA nur eine geringe Signalintensität der beiden Massen im XIC festgestellt werden. Hingegen konnte bei den Ansätzen mit dT und dC eine verhältnismäßig hohe Signalintensität der beiden Massen im XIC gemessen werden. Eine quantitative Aussage über die Bildung von Epoxidbiaddukten im Basischen konnte aber anhand der durchgeführten Messungen nicht getroffen werden, da hier nur im *Fullscan*-Modus ohne die Zugabe von internen oder externen Standards gemessen wurde. Lediglich ein relativer Vergleich der Proben kann gezogen werden, da bei allen Ansätzen die gleichen Mengen an Edukten eingesetzt wurden, die Reaktionsdauer und -temperatur gleich war und auch immer das gleiche Volumen der Proben für die MS-Messungen eingesetzt wurde.

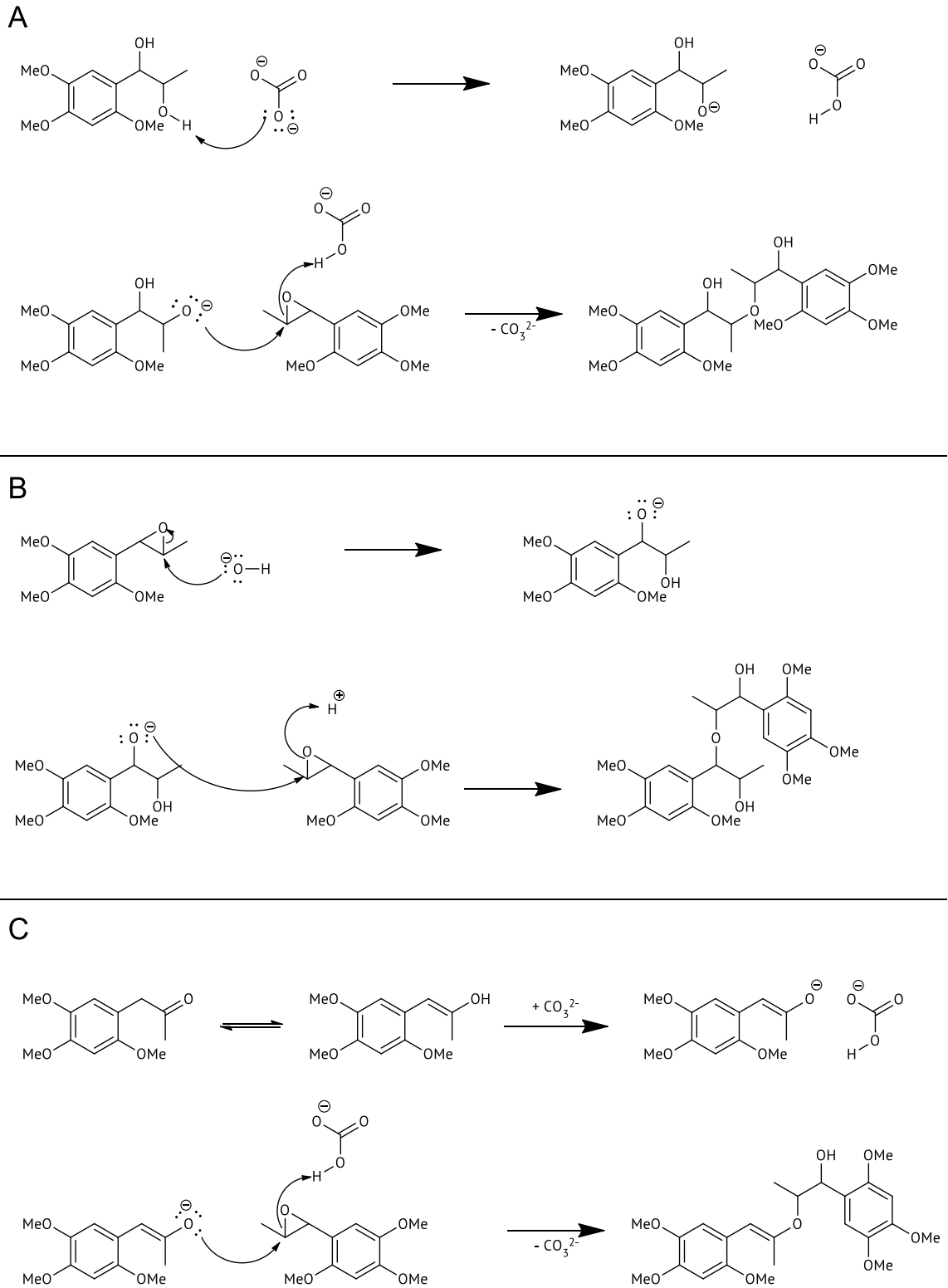


Abbildung 4-34: Reaktionsmechanismen der Reaktionen von A: Asarondiol mit Asaronepoxid im Basischen, B: Asaronepoxid mit Asaronepoxid im Basischen und C: Asaronketon mit Asaronepoxid im Basischen.

4.2.5 Zusammenfassung der Resultate der Reaktivitätsstudien

Zusammenfassend betrachtet ist festzustellen, dass die α - und β -Asaronepoxide gegenüber 2'-Desoxynukleosiden eine Reaktivität im Basischen aufweisen. Für dA und dG konnten in den massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden, dass hier starke Hinweise auf die Bildung der vermuteten Addukte zu sehen sind. Die Nachfolgenden $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchungen bestätigten diese Annahme und lieferte zusammen mit den MS^2 -Spektren der Verbindungen die Aufklärung deren Struktur. Für die Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA wurde als Hauptprodukt N^6 -1'-OH-2H-A-dA und für von β -Asaronepoxid mit dG wurde als Hauptprodukt N^2 -1'-OH-2H-A-dG identifiziert.

Es zeigte sich also, dass die Asaronepoxide sowohl mit dA als auch mit dG unter den hier beschriebenen Reaktionsbedingungen bevorzugt Addukte mit der exozyklischen Aminfunktion bilden und dabei einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus beschreiben. In Abbildung 4-35 ist der postulierte Mechanismus der Reaktion von β -Asaronepoxid mit dA und dG unter schwach basischen Bedingungen dargestellt.

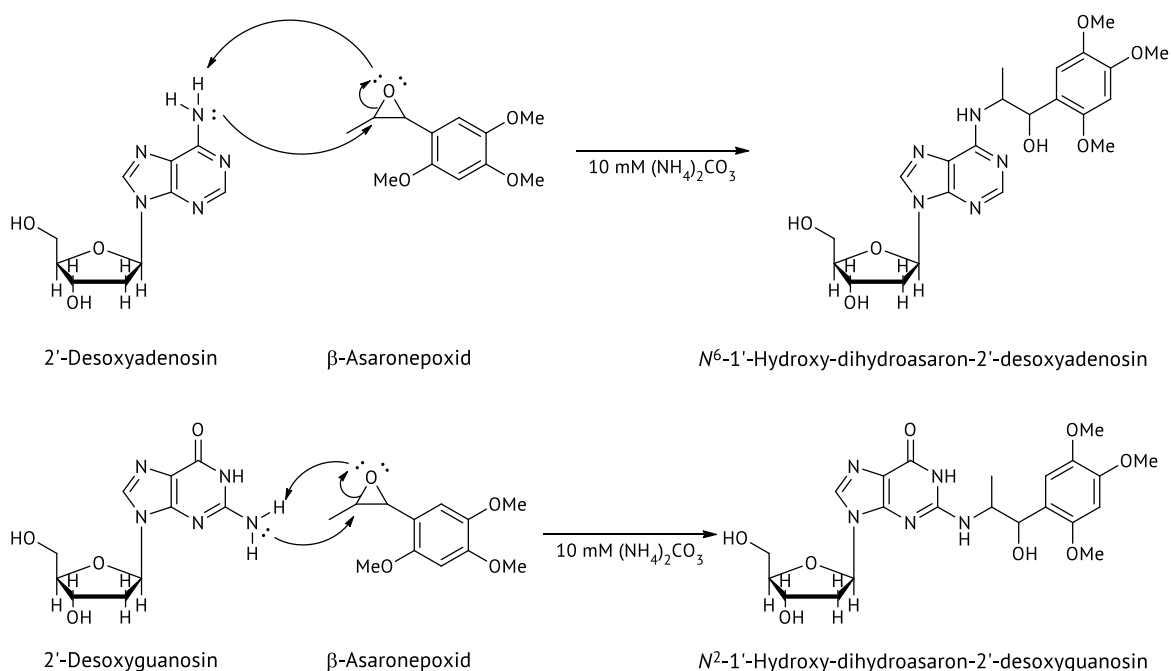


Abbildung 4-35: Postulierte Reaktionsmechanismen der Bildung der Hauptprodukte für die Reaktionen von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin (oben) und 2'-Desoxyguanosin (unten) unter schwach basischen Bedingungen.

Da beide Addukte Stereoisomere darstellen wurde die HPLC-Methode modifiziert, um eine Auftrennung zu erhalten. Hierbei konnte durch Variation des Gradienten und der Fließmittel Methanol und Acetonitril bzw. Essig- und Ameisensäure in Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 % keine Auftrennung erhalten werden. Daher wurde im Folgenden mit dem Isomerengemisch als dA- bzw. dG-Addukt gearbeitet.

Um zu verifizieren, dass es sich bei den beobachteten Addukten tatsächlich um Reaktionsprodukte der Epoxide handelt und diese nicht durch deren Hydrolyseprodukte entstehen können, wurden die Reaktionen in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer mit den Hydrolyseprodukten wiederholt. Hierzu wurden jeweils 20 mM Lösungen von α - und β -Asaronepoxid in Ammoniumcarbonat hergestellt und diese für 24 h bei 37 °C belassen. Im Anschluss wurden die Desoxynukleoside in einer Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. In allen Reaktionsansätzen konnte kein Hinweis auf eine Reaktion zwischen Hydrolyseprodukten und Desoxynukleosiden gefunden werden. Weiter wurden auch Versuche mit dem Metaboliten 3'-Oxoasaron durchgeführt. Auch hier konnte kein Reaktionsprodukt mit 2'-Desoxynukleosiden beobachtet werden.

Die Reaktivitätsversuche von α - und β -Asaronepoxid mit dC oder dT lieferten unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Adduktbildung. Hierbei konnte aber das Phänomen der Biadduktbildung von Asaronepoxid und dessen Hydrolyseprodukten beobachtet werden und hypothetischen Biaddukten zugeordnet werden. Die Biadduktbildung fand bei den Reaktionen mit den Pyrimidinbasen im größeren Maße als bei den Reaktionen mit Purinbasen statt. Hierbei könnten Konkurrenzreaktionen eine Rolle spielen.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Asaronepoxide in der Lage sind mit den Purinbasen dA und dG Addukte zu bilden, wurden Vorversuche zur DNA-Bildung in pRH vorgenommen. Hierzu wurden pRH für 24 h mit hohen Konzentrationen an α - und β -Asaron inkubiert und deren DNA-Hydrolysate massenspektrometrisch untersucht. Diese wiesen Signale für die Adduktbildung mit dA und dG auf, aber es konnte keine Bildung von Pyrimidin-Addukten beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden die synthetische Darstellung der beiden Addukte und deren stabil-isotopenmarkierten Analoga vorgenommen. Dies diente dem Ziel diese zur Methodenentwicklung und -etablierung einer sensitiven UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode einsetzen zu können, welche für spätere *in vivo*-Studien benötigt wurde.

4.3 Synthese der DNA-Addukte

Die Synthese der DNA-Addukte erfolgte analog zu verschiedenen Arbeiten, die sich mit DNA-Addukten von Phenylpropenen beschäftigten (Herrmann *et al.*, 2014; Monien *et al.*, 2011). Hier lief die Adduktbildung unter möglichst physiologischen Bedingungen ab. Das bedeutet ein Puffer, meist Phosphatpuffer (pH~7,8), wurde eingesetzt, um das Nucleosid zu lösen und ein organischer Lösungsvermittler (Acetonitril oder DMSO) wurde verwendet, um den reaktiven Metaboliten zu lösen. Die Reaktionen fanden im Überschuss des Metaboliten und meist im molaren Verhältnis 1:2, bei 37 °C und oft über mehrere Tage statt.

Durch die Voruntersuchungen zur Reaktivität der Epoxide gegenüber den Desoxyribonucleosiden (Kapitel 4.2) konnten die optimalen Reaktionsbedingungen für die Synthese festgestellt werden. Die Reaktionen fanden in einer 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung mit einem pH-Wert von 9 und mit DMSO als Lösungsvermittler statt (Kapitel 7.1.2.1 und 7.1.2.2).

Unter den optimierten Bedingungen konnte eine Ausbeute von 13,4 % N^2 -1'-OH-2H-A-dG und eine Ausbeute von 8,4 % N^6 -1'-OH-2H-A-dA erzielt werden. Die Isolierung der Addukte aus der Reaktionsmischung wurde mittels präparativer HPLC durchgeführt, die erhaltene Produktfraktion wurde lyophilisiert und die Ausbeute gravimetrisch bestimmt.

Zur Synthese der stabil-isotopenmarkierten Standards wurde die optimierte Synthese der Addukte auf eine Nucleosidmenge von maximal 1 mg herunterskaliert. Hierzu wurden kleine Ansätze mit nicht-markierten Nucleosiden als Vorversuche durchgeführt. Die lineare Skalierung ergab ein Reaktionsgesamtvolumen von 135 μ l, woraufhin, aufgrund der unzureichenden Durchmischung, fast keine Adduktbildung stattfand. Das Erhöhen des Ansatzvolumens bei gleichbleibender Stoffmenge auf 550 μ l, ein trockenes Vorlegen der Edukte und das vorherige Lösen der festen Reaktionsbestandteile in 50 μ l DMSO erwiesen sich als geeignete Reaktionsbedingungen. Die weitere Aufarbeitung konnte analog zu der etablierten Methode durch Herunterskalieren auf eine semi-präparative Methode an der präparativen HPLC erfolgen. Mit den stabil-isotopenmarkierten Nucleosiden konnten mit der Methode (Kapitel 7.1.3) die Produkte in einer Ausbeute von 53 % [$^{15}N_5$] N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und 34 % [$^{15}N_5$] N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin erhalten werden. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte hier über einen Peakflächenvergleich mittels HPLC-UV/VIS. Als Referenzlösungen wurde eine Konzentrationsreihe der nicht-markierten Addukte eingesetzt.

4.4 Methodenentwicklung und -etablierung

In diesem Kapitel soll der Prozess der Entwicklung, Verbesserung, Etablierung und Validierung der Methoden, wie sie für die Durchführung der *in-vitro*-Studie zur Bestimmung der DNA-Addukt-Bildungsrate in pRH nach Inkubation mit α - und β -Asaron benötigt wurden, dargestellt werden. Optimiert wurden die DNA-Extraktion und die enzymatische Hydrolyse der DNA. Für die Quantifizierung der DNA-Addukte und von dG wurden eine UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode und ein HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode entwickelt und etabliert. Die daraus resultierenden finalen Methoden sind in Kapitel 7.2 und 7.3 beschrieben. Einige Methoden basierten auf bereits im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Schrenk genutzten Methoden und wurden nur auf die bestimmte Fragestellung hin optimiert.

4.4.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Die DNA der frisch abgelösten pRH wurden mittels enzymatischer Lyse und anschließender Chloroform-Phenol-Extraktion isoliert. Hierzu bestand ein Arbeitskreis-internes Protokoll, welche im Allgemeinen auf den Veröffentlichungen von Gross-Bellard *et al.* (1973), Strauss (1993) und Hansen (1974) sowie den Protokollen, entnommen aus den Lehrbüchern „Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsmethoden für das molekularbiologische Labor“ (Jansohn und Rothhämel, 2012) und „Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics“ (Mülhardt, 2013), basierte. Hierbei wurde eine enzymatische Lyse der Zellen in, mit SDS (Natriumdodecylsulfat) und Triton-X-100 versetzten, TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer unter Zugabe von Proteinase K und RNase A durchgeführt. Die DNA wurde mittels Chloroform-Phenol-Extraktion und Ethanol-fällung isoliert. Dieses Protokoll, im Folgenden Standardprotoll genannt, eignete sich gut, um größere Mengen an DNA aus tierischen Zellen oder Geweben zu isolieren. Für die anschließende Hydrolyse der DNA und Messung der Adduktlevel war es unabdingbar, dass die isolierte DNA möglichst frei von organischen Verunreinigungen war und keine Kontamination mit RNA enthielt. Die Reinheit der erhaltenen DNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} geben hierbei eine Aussage über eventuell vorliegenden Verunreinigungen. Ein Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} von 1,8 gilt für DNA als Nachweis für reine DNA. Geringere Werte sprechen für Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol oder anderen in diesem Bereich absorbierenden Substanzen hin. Hingegen spricht ein höherer Wert für eine Kontamination mit RNA. Ein Quotient von 2,0 entspricht reiner RNA. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{230} nimmt bei reiner DNA einen Wert von 1,8–2,0 an, wobei der Wert über dem des Quotienten von A_{260}/A_{280} liegt (Hauk, 2013, Farrell, 2010).

Die Extraktion nach Standardprotokoll lieferte eine zufriedenstellende Menge an DNA (min. 30 µg pro Inkubation) jedoch traten immer wieder Proben auf, die Verunreinigungen mit RNA aufwiesen. Insgesamt lag der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} für einen Großteil der Proben bei ca. 1,9. Daraufhin sollte diese RNA-Kontamination durch Variation der Menge, des Zeitpunktes der Zugabe und der Inkubationsdauer reduziert werden.

Die Arbeiten zu der oben genannten Fragestellung wurde von Frau Christine Fuchs im Rahmen ihres Forschungspraktikums mit dem Titel „DNA-Isolierung aus primären Rattenhepatozyten - Reduktion der RNA Kontamination“ durchgeführt und werden hier nur als Zusammenfassung der von ihr generierten Ergebnisse wiedergegeben.

Die Variation des Zeitpunktes der Zugabe der RNase A-Lösung zeigte die größte Reduktion der RNA Kontamination. Hierbei machte es einen Unterschied, ob die Inkubation bei RT oder bei 37 °C durchgeführt wurde. Eine Steigerung der Menge an RNase A in der Inkubationslösung führte nicht zu einer Reduktion der Kontamination. Somit ist davon auszugehen, dass die Menge von 50 µg RNase A ausreichend war, um die Kontamination auf ein Minimum zu reduzieren. Aufgrund der Ergebnisse der Forschungsarbeit von Christine Fuchs wurde das Standardprotokoll in folgenden Punkten modifiziert:

1. 5 µl RNase A-Lösung (10 mg ml^{-1}) wurden in das Reaktionsgefäß, in welches die Zelllösung in TAE-Puffer überführt wurde, vorgelegt und die Zugabe der Proteinase K-Lösung erst danach vorgenommen.
2. Die vereinigten wässrigen Phasen der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden mit weiteren 5 µl RNase A-Lösung versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach erneut mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung extrahiert.

Diese Änderung führte nun zu reiner DNA, aber, bedingt durch den zusätzlichen Extraktionsschritt und durch DNasen, welche im Lysat vor der Zugabe der Proteinase K DNA abbauen, auch zu deutlichen Verlusten in der Ausbeute an DNA. Die Menge an erhaltener DNA war abschließend so gering, dass noch weitere Modifikationen der Isolationsmethode vorgenommen werden mussten.

Das Vorlegen der Proteinase K-Lösung wurde anstatt der RNase A-Lösung vorgenommen, um etwaig freigesetzte DNase direkt zu inaktivieren und somit eine höhere Ausbeute an DNA zu erhalten. Die Inkubation mit RNase A-Lösung erfolgte nun nach Durchmischung des Lysates. Um die zweite Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung zu vermeiden, erfolgte die zweite Inkubation mit RNase A-Lösung in der resultierenden wässrigen Phase nach dem ersten Extraktionsschritt. Diese Modifikationen führten zu einer ausreichenden Menge und hohen Reinheit der isolierten DNA. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 7.3.2 beschrieben und wurde für alle Proben der *in-vitro*-Studie angewandt.

4.4.2 Enzymatische DNA-Hydrolyse und Probenvorbereitung

Die enzymatische Hydrolyse der DNA erfolgte analog zum Protokoll beschrieben in Schumacher *et al.* (2013). Die Menge der eingesetzten DNA wurde auf 30 µg erhöht und dementsprechend die Mengen der eingesetzten Lösungsmittel und Enzyme angepasst. Die Inkubationen erfolgten stets bei 37 °C unter Rühren. Ziel war es, trotz geringer Enzymmengen, eine quantitative hydrolytische Spaltung der isolierten DNA zu erlangen. Auch wurden die Inkubationszeiträume geringfügig angepasst. Das modifizierte Protokoll, wie es für alle Proben der *in-vitro*-Studie angewandt wurde, ist in Kapitel 7.3.3 beschrieben.

Die so erhaltenen Hydrolysate wurden auf Eis mit eiskaltem Ethanol zur Proteinfällung versetzt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde bis zur Trockne vakuumzentrifugiert. Bis zur Messung wurde dieser Rückstand bei 4 °C gelagert und unmittelbar vor der Vermessung in einer Lösung aus 75 % Methanol versetzt mit 0,1 % Essigsäure gelöst und der Überstand nach Zentrifugation zur Messung eingesetzt. Diese Maßnahme war notwendig, da beobachtet wurde, dass die Intensität der Adduktssignale in Matrix bei längerer Lagerung der gelösten Proben abnahm. Da die Abnahme von Analyten und isotopenmarkierten Standards in gleichem Maße erfolgte, stellte das für die absolute Quantifizierung der Addukte kein Problem dar. Jedoch hätte dies die absolute Nachweisgrenze der Methode negativ beeinflusst.

4.4.3 Quantifizierung von DNA-Addukten mittels UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS

Methodenentwicklung

Eines der Kernziele der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst sensitive und robuste UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der DNA-Addukte von α - und β -Asaron in DNA-Hydrolysaten zu entwickeln. Als HPLC-ESI-MS/MS-System wurde hierfür zu Beginn eine HPLC-Anlage der Firma Agilent (1200 Series) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (API 3200) verwendet. Zum Erstellen einer *multiple reaction monitoring* (MRM)-Methode wurden mit den synthetisierten Addukten N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG ein substanz- und gerätespezifisches Tuning durchgeführt, um die Parameter von Ionisierung, Fragmentierung und Detektion zu optimieren. Die verwendete HPLC-Methode wurde auf Grundlage der Erkenntnisse der Reaktivitätsstudien angepasst. Da die Entwicklung der analytischen Methoden parallel zur Optimierung der Darstellung der Standards verlief, wurden für die ersten Messungen kein stabil-isotopenmarkierter Standard verwendet, da dieser noch nicht verfügbar war, sondern ein strukturell sehr ähnliches dG-Addukt verwendet, N^2 -(*trans*-Methyliso-eugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin (N^2 -MIE-dG), welches aus Vorarbeiten noch im Arbeitskreis vorhanden war (Diplomarbeit Simone Stegmüller).

72 | Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4-4: HPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung der DNA-Addukte in DNA-Hydrolysaten (System: 1200 Series, Agilent Technologies).

Säule	LiChrospher® 100 RP 18, 125 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)						
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP 18, 4 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)						
Injektionsvolumen	20 µl						
Flussrate	700 µl min ⁻¹						
Säulenofentemperatur	30 °C						
Fließmittel A	0,1%ige wässrige Ameisensäure						
Fließmittel B	Methanol, HPLC grade						
Zeit (min)	0	7	12	12,1	17	17,1	22
Fließmittel A (%)	99	30	30	5	5	99	99
Fließmittel B (%)	1	70	70	95	95	1	1

Mit dieser Methode war es möglich, DNA-Addukte in Zelllysaten von pRH nach Inkubation mit α - und β -Asaron zu detektieren. In Abbildung 4-36 ist die Adduktbildungsrate von N^2 -1'-OH-2H-A-dG in pRH nach 24stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron dargestellt. Nach Inkubation mit α -Asaron konnten bei einer Inkubationskonzentration von 100 µM 221 N^2 -1'-OH-2H-A-dG pro 10^8 Nucleosiden detektiert werden. Ein konzentrationsabhängiger Verlauf der Adduktbildung konnte nach Inkubation mit β -Asaron ab einer Konzentration von 50 µM beobachtet werden. Mit dieser HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode konnte eine Bestimmungsgrenze (LOQ; *limit of quantification*) von 67 Addukten pro 10^8 Nucleosiden erzielt werden. Die Detektion des dA-Adduktes war mit dieser Methode nicht möglich. Alle gemessenen Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze (LOD; *limit of detection*).

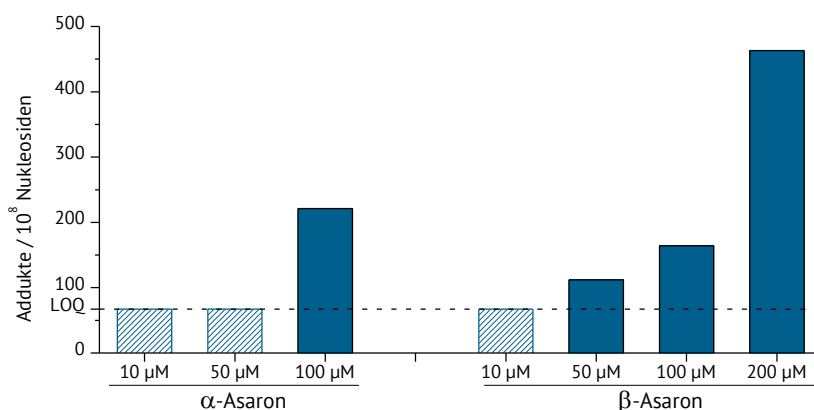


Abbildung 4-36: DNA-Adduktbildungsrate von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin in primären Rattenhepatozyten nach 24stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 1$). HPLC-ESI-MS/MS-System: 1200 Series (Agilent Technologies), API 3200 (Applied Biosystems). LOQ: *limit of quantification*, Bestimmungsgrenze.

Im Kontext der Entwicklung einer sensitiven (U)HPLC-MS/MS-Analytik musste diese Methode weiter optimiert werden. Dazu wurde die vorhandene Trennsäule mit den Dimensionen 125 mm x 4 mm und einer Partikelgröße von 5 µm durch eine UHPLC-Säule mit den Dimensionen 50 mm x 4 mm und einer Partikelgröße von 1,8 µm. Mit der Verkleinerung der Partikelgröße und gleichzeitiger Auswahl einer Säule, mit welcher Messungen bei höheren Gegendrücken möglich war, wurden deutlich schmalere Peaks erzielt, wodurch ein intensiveres Signal erhalten und die Bestimmungsgrenze gesenkt wurde.

Diese Modifikation führte zu Peakbreiten der Addukte von etwa 0,2 min und zur Senkung des LOD in den Bereich von etwa 20 Addukten pro 10⁸ Nukleosiden für beide Addukte. Die Sensitivität des vorhanden Massenspektrometers (API 3200) reichte nicht aus, um die Methode in Bereich des LOD von 1–5 Addukten pro 10⁸ Nukleosiden zu optimieren. Deshalb wurde für die weitere Entwicklung die bisherigen Erkenntnisse auf ein sensitiveres System, bestehend aus einer Series 1290 infinity UHPLC(Agilent Technologies) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer mit Ionenfalle (QTrap 5500, AB Sciex), übertragen. Es lagen sowohl von N²-1'-OH-2H-A-dG als auch von N⁶-1'-OH-2H-A-dA die stabil-isotopenmarkierten Analoga vor. Zur Erstellung einer MRM-Methode wurden mit alle vier Substanzen ein substanz- und gerätespezifisches Tuning vorgenommen. Die UHPLC-Methode wurde weiter modifiziert. Durch einen Wechsel des Fließmittels A von 0,1%iger wässriger Ameisensäure auf 0,1%ige wässrige Essigsäure konnte sowohl eine Fokussierung der chromatographischen Signale als auch eine Verbesserung der Signalintensität beobachtet werden. Weiter konnte das Injektionsvolumen auf 5 µl reduziert werden. Dies war nötig, um die Proben der *in vitro*-Studie, welche lediglich ein Volumen von 50 µl aufweisen, adäquat vermessen zu können. Am Ende der Methodenoptimierung stand eine UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode mit den in Tabelle 4-5 und Tabelle 4-6 aufgeführten Parametern und einem LOD von 1 bzw. 2 Addukten pro 10⁸ Nukleosiden für N²-1'-OH-2H-A-dG bzw. N⁶-1'-OH-2H-A-dA.

Tabelle 4-5: UHPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung von N²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (N²-1'-OH-2H-A-dG) und N⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (N⁶-1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. System: Series 1290 infinity (Agilent Technologies).

Säule	U-VDSpher PUR C18-E, 50 mm x 4 mm, 1,8 µm (VDS Optilab)							
Vorsäule	U-VDSpher PUR C18-E, 4 mm x 4 mm, 1,8 µm (VDS Optilab)							
Injektionsvolumen	5 µl							
Flussrate	800 µl min ⁻¹							
Säulenofentemperatur	25 °C							
Fließmittel A	0,1%ige wässrige Essigsäure; LC-MS _{grade}							
Fließmittel B	Methanol, MS _{grade}							
Zeit (min)	0,00	1,00	1,20	3,50	3,51	5,00	5,01	7,00
Fließmittel A (%)	90	90	50	20	5	5	90	90
Fließmittel B (%)	10	10	50	80	95	95	10	10

74 | Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4-6: ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der Methode zur Quantifizierung von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (*N*²-1'-OH-2H-A-dG) und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (*N*⁶-1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. MS-System: Qtrap 5500 (AB Sciex).

	Q1	Q3	<i>t</i> _R	DP	EP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	492,1	225,0	2,48	76	10	27	18	25	medium	5500	500	65	60
<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA	492,1	376,1 [#]	2,48	76	10	17	20	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	476,1	225,0 [#]	2,78	101	10	25	18	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA	476,1	360,2	2,78	101	10	23	18	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	497,1	225,1	2,48	36	10	27	18	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA	497,1	381,2 [#]	2,48	36	10	15	18	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA	481,1	365,2 [#]	2,78	116	10	23	18	25	medium	5500	500	65	60
[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	481,1	225,1	2,78	81	10	23	16	25	medium	5500	500	65	60

Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], *t*_R: erwartete Retentionszeit [min], DP: Declustering Potential [V], EP: Eingangspotential [V], CE: Kollisionsenergie [V], CXP: Zellaustrittspotential [V], CUR: Curtain Gas [psi], CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], TEM: Temperatur [°C], GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi], [#]Übergang, welcher als Quantifier verwendet wurde.

Das resultierende Chromatogramm einer Lösung aus jeweils 1 nM *N*²-1'-OH-2H-A-dG und *N*⁶-1'-OH-2H-A-dA sowie deren stabil-isotopenmarkierten Analoga ist in Abbildung 4-37: dargestellt.

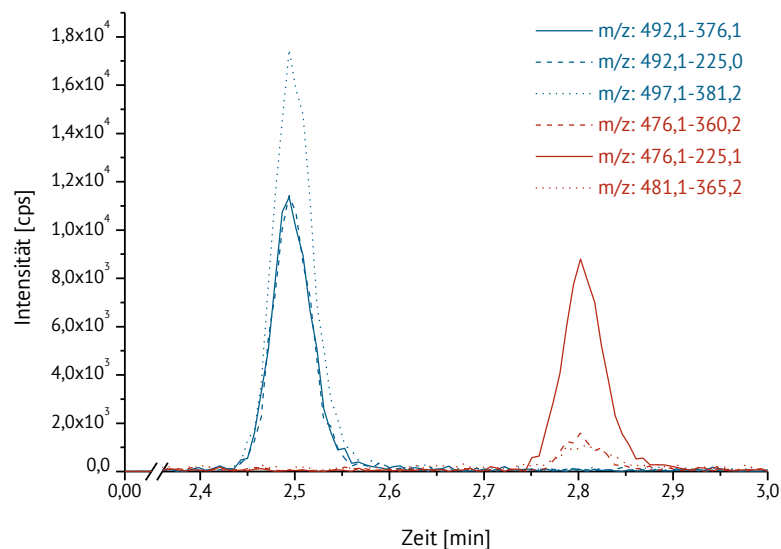


Abbildung 4-37: UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Messung) eines Standards aus *N*²-1'-OH-2H-A-dG, *N*⁶-1'-OH-2H-A-dA, [¹⁵N₅]*N*²-1'-OH-2H-A-dG und [¹⁵N₅]*N*⁶-1'-OH-2H-A-dA, jeweils 1 nM gemessen mit der optimierten UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (Kapitel 7.2.5).

Kalibriergeraden

Für die Erstellung der Kalibriergeraden von N^2 -1'-OH-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 10–10000 pM hergestellt. Die Messungen erfolgten aus einer Mischung der beiden Addukte in gleicher Konzentration und deren isotopenmarkierten Analoga in konstanter Konzentration von 1000 pM. Hierfür wurde zuerst jeweils eine 20 μ M Stammlösung (SL-A1 und SL-A2) in Wasser hergestellt, aus welcher die Zwischenverdünnung ZV 1–5 gemäß Tabelle 4-7 hergestellt wurden.

Tabelle 4-7: Pipettierschema zur Herstellung der Zwischenverdünnungen der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in DNA-Hydrolysaten.

Zwischen- verdünnung (ZV)	Verdünnungsfaktor	verwendete Lösung	Volumen [μ l]	Lösungsmittel Wasser [μ l]	Analyt- Endkonzentration [nM]
ZV 1	100	SL	10	990	200
ZV 2	10	ZV 1	100	900	20
ZV 3	10	ZV 2	100	900	2
ZV 4	10	ZV 3	100	900	0,2
ZV 5	10	ZV 4	100	900	0,02

Aus den Zwischenverdünnungen wurden die Messlösungen ML 1–24 hergestellt (Tabelle 4-8). Für die Messung der Kalibriergeraden wurde eine Stammlösung (SL-IS) der beiden isotopenmarkierten Analoga mit einer Endkonzentration von jeweils 5 nM in Wasser vorbereitet. Je 40 μ l ML und 10 μ l SL-IS wurden zusammen zur Messung eingesetzt.

Tabelle 4-8: Pipettierschema zur Herstellung der Messlösungen der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in DNA-Hydrolysaten.

Messlösung (ML)	verwendete Zwischenverdünnung (ZV)	V (ZV-A1) [μ l]	V (ZV-A2) [μ l]	V (H ₂ O _{ad}) [μ l]	Analyten- Endkonzentration [pM]
ML 1	ZV 1	25	25	350	10000
ML 2	ZV 1	20	20	360	8000
ML 3	ZV 1	15	15	370	6000
ML 4	ZV 1	10	10	380	4000
ML 5	ZV 2	50	50	300	2000
ML 6	ZV 2	25	25	350	1000
ML 7	ZV 2	20	20	360	800
ML 8	ZV 2	15	15	370	600
ML 9	ZV 2	10	10	380	400

76 | Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 4-8: Pipettierschema zur Herstellung der Messlösungen der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in DNA-Hydrolysaten.

Messlösung	verwendete Zwischenverdünnung	V (ZV-A1)	V (ZV-A2)	V (H ₂ O _{dd})	Analyten- Endkonzentration
(ML)	(ZV)	[μl]	[μl]	[μl]	[pM]
ML 10	ZV 3	50	50	300	200
ML 11	ZV 3	25	25	350	100
ML 12	ZV 3	20	20	360	80
ML 13	ZV 3	15	15	370	60
ML 14	ZV 3	10	10	380	40
ML 15	ZV 4	50	50	300	20
ML 16	ZV 4	25	25	350	10
ML 17	ZV 4	20	20	360	8
ML 18	ZV 4	15	15	370	6
ML 19	ZV 4	10	10	380	4
ML 20	ZV 5	50	50	300	2
ML 21	ZV 5	25	25	350	1
ML 22	ZV 5	20	20	360	0,8
ML 23	ZV 5	15	15	370	0,6
ML 24	ZV 5	10	10	380	0,4

Tabelle 4-9: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Quantifizierung von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (*N*²-1'-OH-2H-A-dG) in DNA-Hydrolysaten.

<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG/[¹⁵ N ₅] <i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	Mittelwert	Prozentuale Abweichung
Konzentration	Konzentration	Konzentration	Area	vom Mittelwert
[pM]	[pM]			
40	1000	0,04	0,033	5
60	1000	0,06	0,048	2
80	1000	0,08	0,060	4
100	1000	0,1	0,070	1
200	1000	0,2	0,139	2
400	1000	0,4	0,268	1
600	1000	0,6	0,393	4
800	1000	0,8	0,532	2
1000	1000	1	0,662	1
2000	1000	2	1,324	3
4000	1000	4	2,648	2
6000	1000	6	4,166	0
8000	1000	8	5,539	3
10000	1000	10	6,552	2

Für N^2 -1'-OH-2H-A-dG ergaben sich aus den Triplikat-Messungen die in Tabelle 4-9 gezeigten Messwerte. Für die Auswertung wurden nur die Messungen verwendet, bei welchen die Signalintensität höher als das 6fache des Grundrauschens lag, beide Übergänge Detektierbar waren und somit die Bestimmungsgrenze überschritten hatten. Dies war ab einer Konzentration von 40 pM der Fall. Daraus ergab sich die in Abbildung 4-38 dargestellte Kalibriergerade mit einer Geradengleichung von $y = 0,67294 x$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1,00$. Die Abweichung der Messwerte vom Mittelwert lag bei allen Bestimmungen bei $\leq 5\%$ und somit wird die Bestimmung als Reproduzierbar angesehen. Weiter wurden die Abweichung über 5 Messungen und über 5 Tage bei einer Konzentration von 1000 pM erhoben. Auch hier betrug diese weniger als 5%.

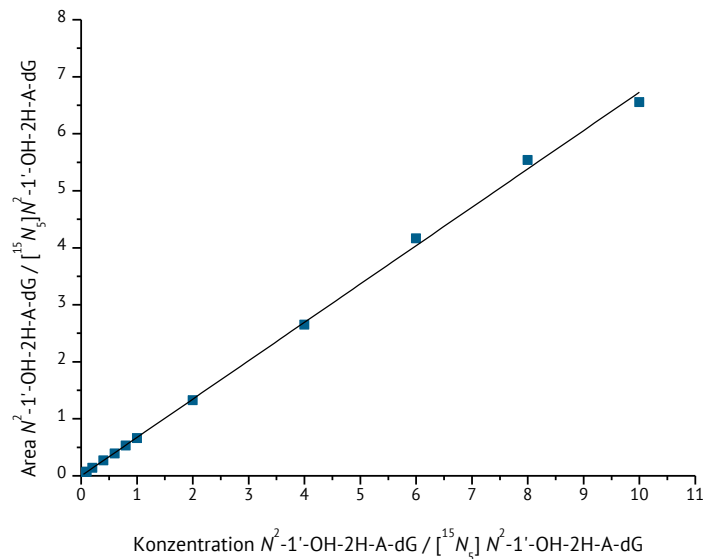


Abbildung 4-38: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (N^2 -1'-OH-2H-A-dG) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 0,67294 x$, Bestimmtheitsmaß: 1,00.

Für N^6 -1'-OH-2H-A-dA ergaben sich aus den Triplikat-Messungen die in Tabelle 4-10 gezeigten Messwerte. Für die Auswertung wurden nur die Messungen verwendet, bei welchen die Signalintensität höher als das 6fache des Grundrauschens lag, beide Übergänge Detektierbar waren und somit die Bestimmungsgrenze überschritten hatten. Dies war ab einer Konzentration von 200 pM der Fall.

In Abbildung 4-39 ist die resultierende Kalibriergerade von N^6 -1'-OH-2H-A-dA mit einer Geradengleichung von $y = 1,21227 x$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1,00$ dargestellt. Die prozentuale Abweichung vom Mittelwert war über alle Messungen $\leq 5\%$. Die Varianz über fünf aufeinander folgenden Messungen ($c = 1000$ pM) und an 5 aufeinander folgenden Tagen betrug weniger als 5%. Somit wurde die Methode der Quantifizierung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA als valide angesehen.

Zusätzlich wurden für beide Analyten die Widerfindung in Matrix bestimmt. Diese lag bei einer Analytkonzentration von 200 pM, 1000 pM und 8000 pM bei 98–102%.

Tabelle 4-10: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Quantifizierung von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (N^6 -1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten.

N^6 -1'-OH-2H-A-dA Konzentration [pM]	$[^{15}N_5]N^6$ -1'-OH-2H-A-dA Konzentration [pM]	N^6 -1'-OH-2H-A-dA/ $[^{15}N_5]N^6$ -1'-OH-2H-A-dA		
		Konzentration	Mittelwert Area	Prozentuale Abweichung vom Mittelwert
200	1000	0,2	0,229	3
400	1000	0,4	0,452	2
600	1000	0,6	0,728	5
800	1000	0,8	0,975	5
1000	1000	1	1,275	2
2000	1000	2	2,411	3
4000	1000	4	4,704	5
6000	1000	6	7,363	1
8000	1000	8	9,906	3
10000	1000	10	11,958	3

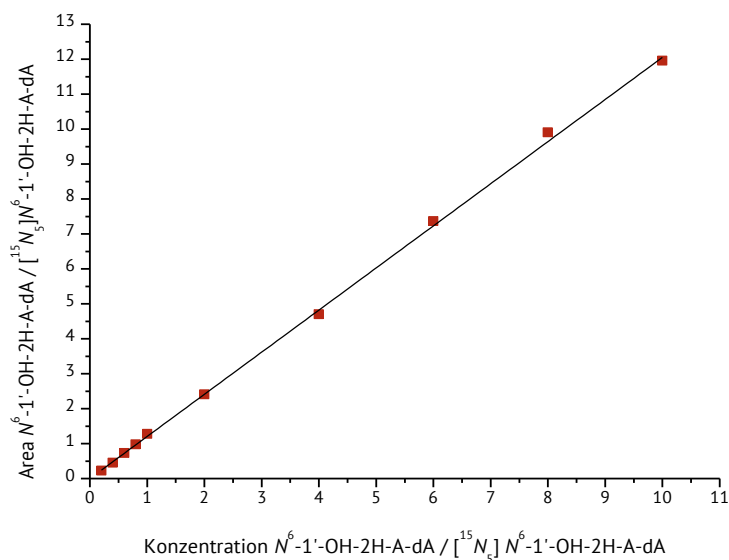


Abbildung 4-39: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (N^6 -1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 1,21227 x$. Bestimmtheitsmaß: 1,00.

Zusammenfassung

Mit der vorgestellten Methode zur Quantifizierung von N^2 -1'-OH-2H-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA in DNA-Hydrolysaten konnte eine Nachweisgrenze von 1 bzw. 2 Addukten pro 10^8 Nucleosiden realisiert werden. Weiter weist die Methode eine Bestimmungsgrenze von 2 bzw. 11 Addukten pro 10^8 Nucleosiden auf. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode wurde praktisch bestimmt und musste die Kriterien der Signalintensität des 6fachen des Grundrauschen des Quantifiers und eine Signalintensität des 3fachen des Grundrauschen des Qualifiers erfüllen. Da die absolute Intensität der Qualifierspur deutlich geringer war als die der Quantifierspur, überwog dieses Kriterium bei

der Identifizierung der Bestimmungsgrenze. Das absolute LOQ liegt für N^2 -1'-OH-2H-dG bei 0,2 fmol und für N^6 -1'-OH-2H-A-dA bei 1 fmol.

4.4.4 Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin in DNA-Hydrolysaten

Methodenentwicklung

Zur Berechnung der DNA-Adduktbildungsrate in pRH wurde die gemessene Konzentration an Addukten auf die Anzahl der vorhandenen Nukleosiden bezogen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte vor der Hydrolyse spektrophotometrisch und wurde durch Messung der Konzentration der Gehalte an Nukleosiden in den resultierenden Hydrolysaten ergänzt. Hintergrund dafür war die beobachtete inhomogenität der DNA-Lösungen. Dadurch konnte beim Normieren des DNA-Gehaltes vor der Hydrolyse nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Fehlern in der Konzentration kam. Eine Berechnung auf Grundlage des normierten DNA-Gehaltes würde zum Über- oder Unterschätzen der DNA-Adduktbildungsrate führen.

Da die bei der enzymatischen Hydrolyse verwendeten Enzyme, wie die Phosphodiesterase II (PDE II), dafür bekannt sind eine dA-Desaminase-Nebenaktivität zu besitzen (Schumacher *et al.*, 2013), wurde zur Bestimmung des DNA-Gehaltes die Konzentration an dG in den Hydrolysaten herangezogen. Unter der Annahme, dass der GC-Gehalt der DNA von pRH konstant bei 44 % liegt, wurde daraus die Menge an Nukleosiden in den einzelnen Hydrolysaten berechnet. Die Methode zur Quantifizierung von dG in Hydrolysaten bestand bereits im AG Schrenk und wurde im Hinblick auf Verkürzung der Analysendauer optimiert. Die Parameter der optimierte HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode sind in Tabelle 4-11 und Tabelle 4-12 dargestellt.

Tabelle 4-11: HPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten (System: 1100 Series, Agilent Technologies).

Säule	LiChrospher® 100 RP 18, 125 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)					
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP 18, 4 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)					
Injektionsvolumen	5 µl					
Flussrate	750 µl min ⁻¹					
Säulenofentemperatur	20 °C					
Fließmittel A	0,2%ige wässrige Ameisensäure					
Fließmittel B	Methanol, HPLC _{grade}					
Zeit [min]	0,0	6,0	6,1	13,0	13,1	18,0
Fließmittel A [%]	90	20	5	5	90	90
Fließmittel B [%]	10	80	95	95	10	10

Tabelle 4-12: ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der Methode zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten (MS-System: API 2000, Applied Biosystems).

	Q1	Q3	t _R	DP	FP	EP	CEP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
dG	268,2	151,9 [#]	3,9	6	350	4,5	12	15	18	20	2	4200	400	30	35
	268,2	134,9	3,9	6	350	14,5	12	47	20	20	2	4200	400	30	35
[¹⁵ N ₅]	273,1	157,3	3,9	26	370	4,0	20	17	4	20	2	4200	400	30	35
dG	273,8	138,9 [#]	3,9	26	370	4,0	20	49	4	20	2	4200	400	30	35

dG: 2'-Desoxyguanosin, Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], t_R: erwartete Retentionszeit [min], DP: Declustering Potential [V], FP: Focusing Potential [V], EP: Eingangspotential [V], CEP: Zelleintrittspotential [V], CE: Kollisionsenergie [V], CXP: Zellaustrittspotential [V], CUR: Curtain Gas [psi], CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], TEM: Temperatur [°C], GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi],

[#]Übergang, welcher als Quantifier verwendet wurde.

In Abbildung 4-40 ist das HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm der Messung eines Standards von dG in einer Konzentration von 25 µM und einer Konzentration des stabil-isotopenmarkierten Analoga von 20 µM dargestellt.

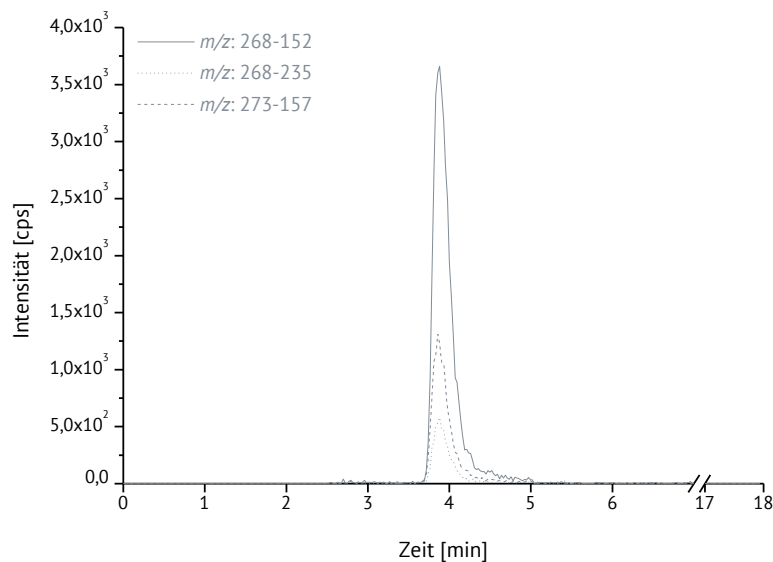


Abbildung 4-40: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Messung) eines dG-Standards (25 µM) mit [¹⁵N₅]dG (20 µM), gemessen mit der optimierten HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (Kapitel 7.2.4).

Kalibriergerade

Für die Quantifizierung von dG wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 25–500 µM vermessen. Die Konzentration von [¹⁵N₅]dG betrug 20 µM. Die Triplikat-Messungen ergaben die in Tabelle 4-13 dargestellten Messwerte und die daraus resultierende Kalibriergerade (Abbildung 4-41). Für die Methode zur Bestimmung des dG-Gehaltes wurden keine Grenzbetrachtung gemacht, da Erwartungsgemäß alle Proben in einem engen und vorhersehbaren Konzentrationsfenster von 200–400 µM lagen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode ergibt sich somit aus der kleinsten vermessenen Konzentration von 25 µM.

Tabelle 4-13: Messwerte der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten.

dG Konzentration [μM]	[$^{15}\text{N}_5$]dG Konzentration [μM]	Konzentration	Mittelwert Area	Prozentuale Abweichung vom Mittelwert
25	20	1,25	3,11	3,7
50	20	2,5	6,30	2,5
100	20	5	12,41	0,9
250	20	12,5	31,30	1,7
500	20	25	63,02	2,3

In Abbildung 4-41 ist die resultierende Kalibriergerade von dG mit einer Geradengleichung von $y = 2,51631 x$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1,00$ dargestellt. Die prozentuale Abweichung vom Mittelwert war über alle Messungen $\leq 5\%$. Die Wiederfindung wurde für alle fünf Konzentrationen der Kalibriergeraden in wässriger Lösung bestimmt und lag bezogen auf [$^{15}\text{N}_5$]dG bei 98–102 %.

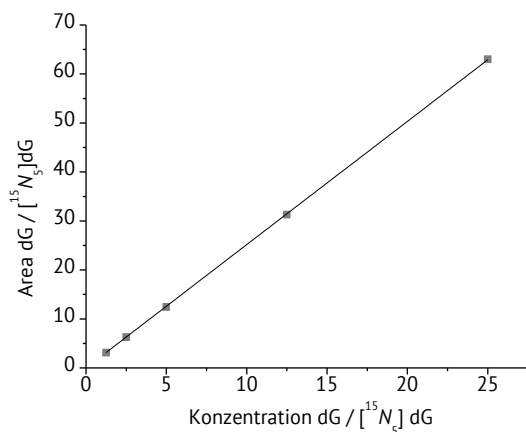


Abbildung 4-41: Kalibriergerade zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 2,51631 x$, Bestimmtheitsmaß: 1,00.

4.5 In-Vitro-Studie

Die durchgeführte *in-vitro*-Studie zur Bestimmung der DNA-Adduktbildungsrate in pRH umfasste die Messungen der Adduktgehalte nach Inkubation mit α - und β -Asaron ($c = 10\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$ und $200\ \mu\text{M}$) zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h, 24 h und 48 h. Die zur Studie eingesetzten männlichen Wistar-Ratten hatten ein Alter von ca. 5 Wochen, ein Durchschnittsgewicht am Tag der Perfusion von ca. 200 g und die Geschlechtsreife noch nicht erlangt. Die Durchführung der Perfusion, die Behandlung der Zellen, die Isolierung der DNA und deren enzymatische Hydrolyse erfolgt gemäß der in Kapitel 7.3 beschriebenen Methoden. Die Quantifizierung der DNA-Addukte

N^2 -1'-OH-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA sowie des dG-Gehaltes der Hydrolysate wurde nach den Methoden in Kapitel 7.2.4 und 7.2.5 durchgeführt.

Ziel der Studie war die Darstellung der DNA-Adduktbildungsrate in pRH in Abhängigkeit der Konzentration und der Inkubationsdauer.

4.5.1 Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Adduktbildungsrate

Zur Betrachtung der konzentrationsabhängigen Adduktbildungsrate wurden die Inkubationen von pRH mit α - und β -Asaron für 1 h, 6 h, 24 h und 48 h durchgeführt. Für die Negativkontrolle (DMSO) konnten in allen Inkubationen und für beide Verbindungen keine Addukte detektiert werden.

24-stündige Inkubation

Für die 24-stündige Inkubation mit α -Asaron ergaben sich in Abbildung 4-42 dargestellten Adduktbildungsrate für N^2 -1'-OH-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA.

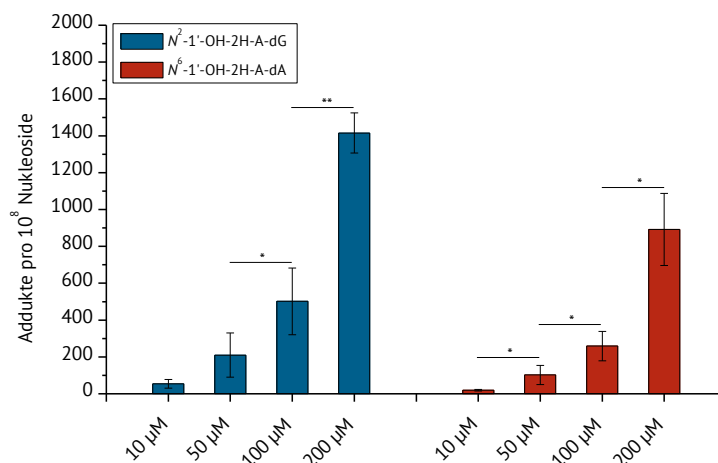


Abbildung 4-42: Adduktbildungsrate von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die angegebenen Signifikanzen wurden mittels einseitigem Student's t -Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Sowohl für N^2 -1'-OH-2H-A-dG als auch für N^6 -1'-OH-2H-A-dA konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Addukte pro 10^8 Nucleoside beobachtet werden, welche für beide Addukte ab einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ signifikant ist. Bei allen vermessenen Inkubationskonzentrationen überstieg die Menge an N^2 -1'-OH-2H-A-dG die von N^6 -1'-OH-2H-A-dA.

Ein ähnliches Bild zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation von pRH mit β -Asaron (Abbildung 4-43). Der konzentrationsabhängige Anstieg ist für diese Bestimmung bis $100 \mu\text{M}$ für beide Addukte signifikant, lediglich für die höchste Inkubationskonzentration von $200 \mu\text{M}$ β -Asaron konnte kein signifikanter Unterschied zur nächstkleineren Konzentration festgestellt werden. Dies lag vor allem

an den größeren Schwankungen in den einzelnen Bestimmungen der Adduktlevel in der höchsten Konzentration. Mit einem p-Wert von 0,06 für N^2 -1'-OH-2H-A-dG und einem p-Wert von 0,08 für N^6 -1'-OH-2H-A-dA erreichen die Bestimmungen nur knapp die Schwelle von $p = 0,05$ für statistische Signifikanz nicht. Daher kann ein konzentrationsabhängiger Anstieg über die beiden Addukte über den getesteten Konzentrationsbereich von 0–200 μM β -Asaron angenommen werden.

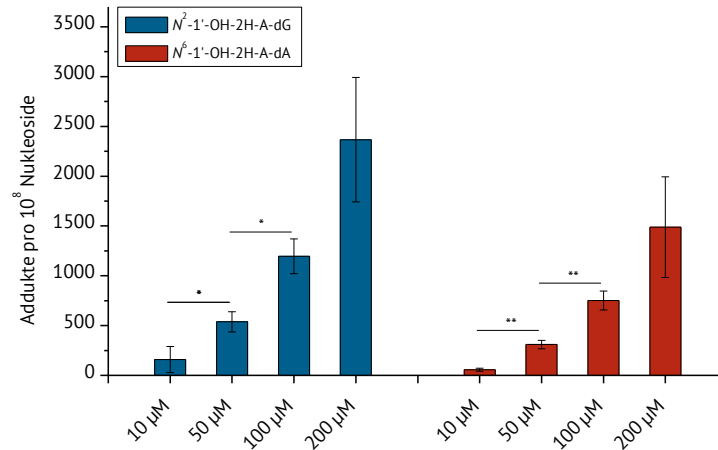


Abbildung 4-43: Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die angegebenen Signifikanzen wurde mittels einseitigem Students t -Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Vergleicht man die Bildungsraten nach Inkubation von α - und β -Asaron untereinander, so lässt sich beobachten, dass für β -Asaron insgesamt höhere Adduktbildungsraten beobachtet werden konnten (Abbildung 4-44).

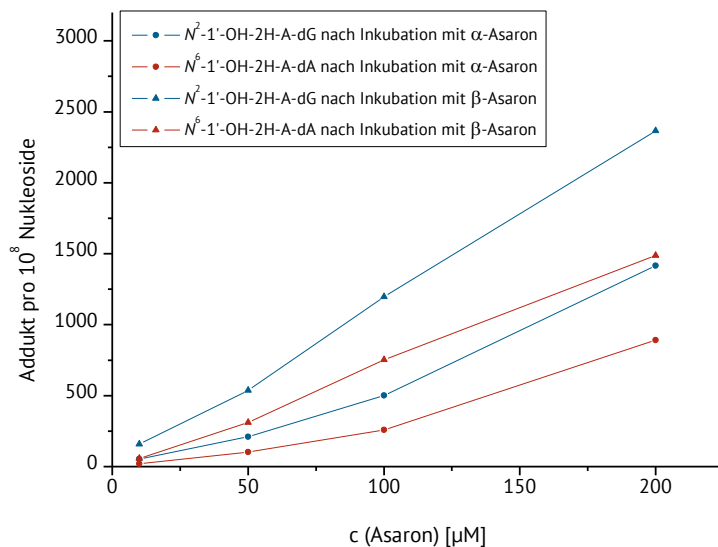


Abbildung 4-44: Gegenüberstellung der Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit.

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine weitestgehend lineare Beziehung zwischen der Inkubationskonzentration und der Adduktbildung besteht. Das Bestimmtheitsmaß der linearen

Anpassung lag bei den Bestimmungen nach Inkubation mit β -Asaron bei 0,98 und 0,99. Die lineare Anpassung der Adduktbildungsrate von N^2 -1'-OH-2H-A-dG nach 24-stündiger Inkubation mit α -Asaron wies ein R^2 von 0,98 auf und die von N^6 -1'-OH-2H-A-dA ein R^2 von 0,86 auf.

1-stündige Inkubation

Bei der Kurzzeitinkubation von 1 h von pRH mit α - und β -Asaron konnten in alle Testkonzentrationen die Addukte N^2 -1'-OH-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4-47 dargestellt ist, konnte auch für diese kurze Inkubationszeit ein konzentrationsabhängiger Anstieg beobachtet werden. Hierbei ist kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Addukten oder zwischen den beiden Asaronisomeren zu erkennen. Die Bestimmung der Adduktlevel nach Inkubation mit 200 μ M α -Asaron konnte nur in einem $n = 2$ erfolgen, da bei der DNA-Isolierung für eine Wiederholung keine genügende Reinheit der DNA erzielt werden konnte. Dies begründet auch den hohen Fehler bei dieser Bestimmung, da hier der Mittelwert und die Range der beiden Messwerte gezeigt wurden.

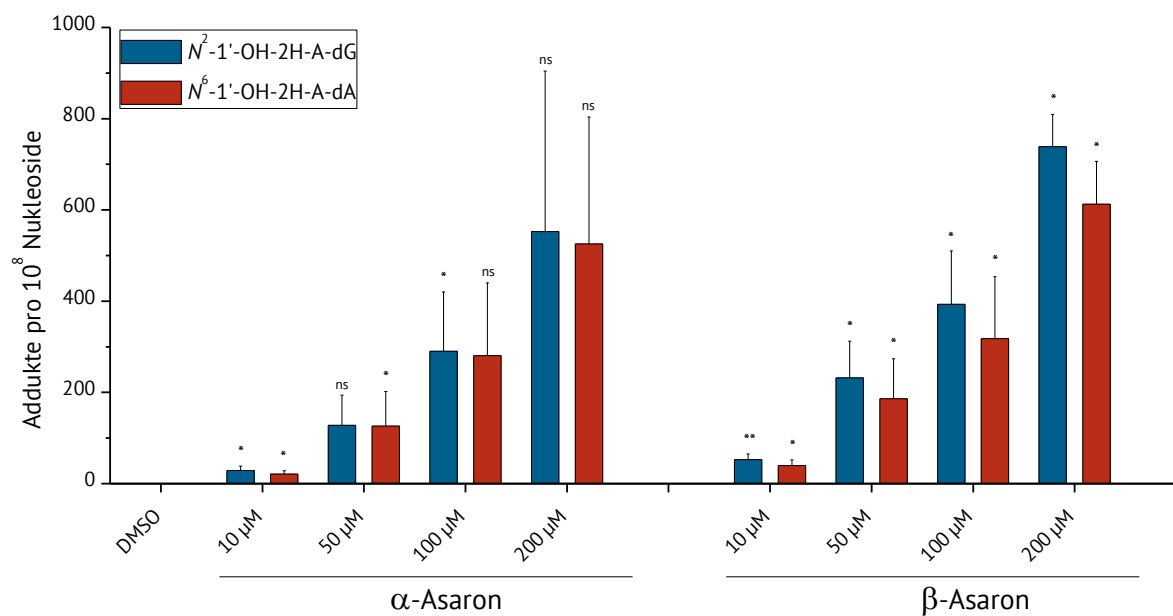


Abbildung 4-45: Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 1-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$) mit der Ausnahme α -Asaron 200 μ M ($n = 2$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, bzw. mit Range (für α -Asaron 200 μ M). Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μ M auf DMSO und wurden mittels Students t -Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant).

Abbildung 4-46 zeigt, dass sich für beide Asaronisomere und beide Addukte ein linearer Zusammenhang zwischen Inkubationskonzentration und Adduktbildungsrate ableiten lässt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Anpassung betrug bei allen Adduktbildungsraten $R^2 \geq 0,99$. Weiter zeigt Abbildung 4-46 im Mittel höhere Adduktlevel nach Inkubation mit β -Asaron, wobei bei Berücksichtigung der Standardabweichungen der Messreihen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann.

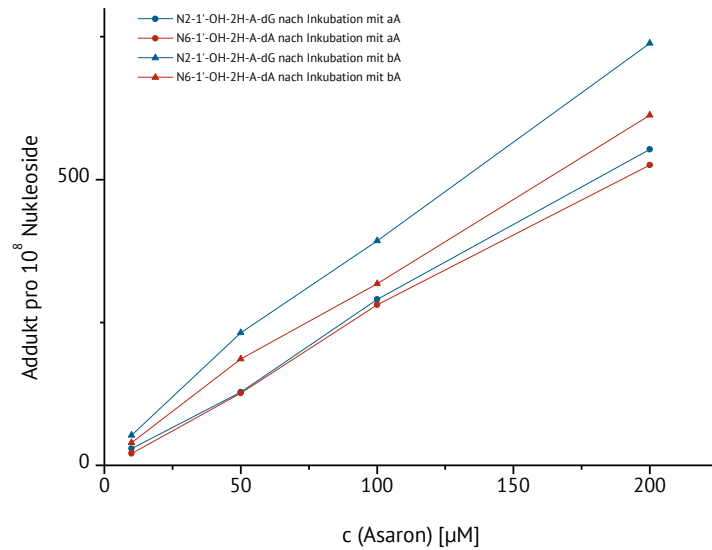


Abbildung 4-46: Gegenüberstellung der Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 1-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$) mit der Ausnahme α -Asaron 200 μM ($n = 2$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit.

6-stündige Inkubation

Der Inkubationszeitpunkt nach 6 h lieferte insgesamt die höchsten Adduktbildungsraten unabhängig von Asaronisomer oder Addukt. In Abbildung 4-47 ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Adduktlevel zu beobachten.

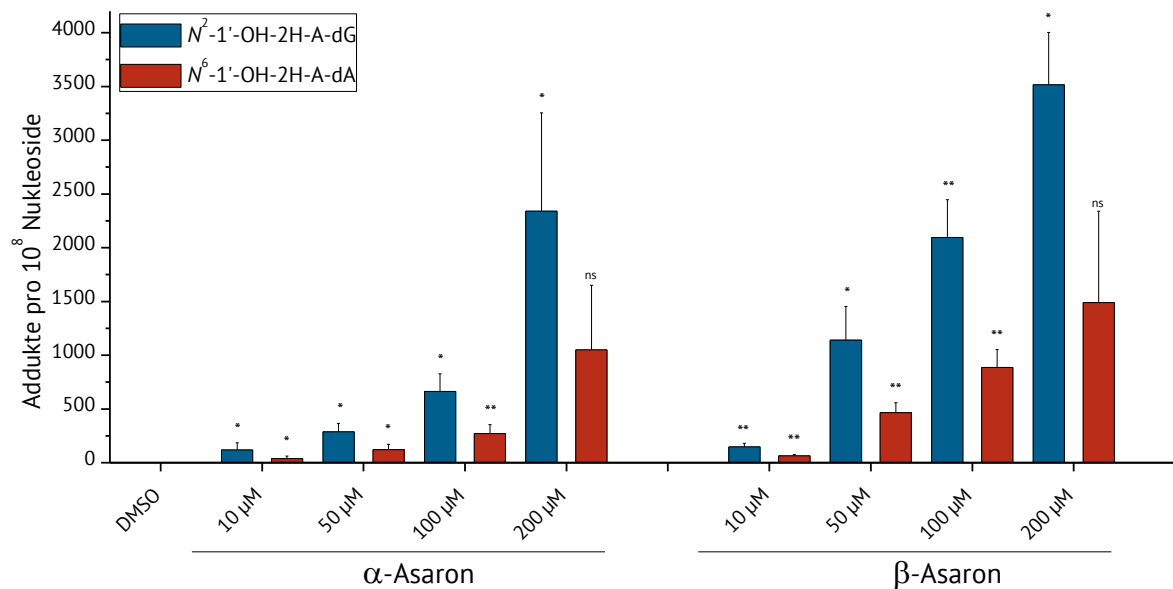


Abbildung 4-47: Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 6-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μM auf DMSO und wurden mittels Students t -Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant).

Für beide Asaronisomere konnte bei allen Inkubationskonzentrationen höher Adduktlevel für N^2 -1'-OH-2H-A-dG beobachtet werden, welche ab 50 μM auch statistisch signifikant sind. Im Mittel

konnten bei allen Inkubationen mehr als doppelt so viele dG-Addukte detektiert werden, als dA-Addukte. Nach 1-stündiger Inkubation konnte dies nicht beobachtet werden. Hier lagen die Adduktlevel in gleicher Größenordnung vor. Weiter zeigt Abbildung 4-48, dass die Adduktlevel nach Inkubation mit α -Asaron mit der Konzentration überlinear ansteigen, so ist eine größere Anstieg zur höchsten Inkubationskonzentration von 200 μM im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen für beide Addukte zu beobachten. Für β -Asaron ist ein Abflachen des Konzentrationsverlaufes der Adduktbildungsrate in den höheren Konzentrationen zu sehen.

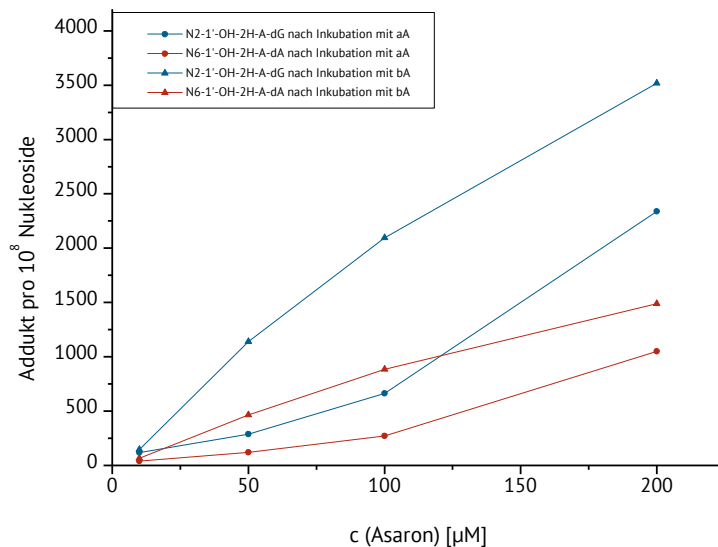


Abbildung 4-48: Gegenüberstellung der Adduktbildungsraten von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 6-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit.

48-stündige Inkubation

Nach 48-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen konnten die in Abbildung 4-49 dargestellten Adduktlevel gemessen werden. Im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten fiel auf, dass die Schwankung der Adduktlevel in den höheren Konzentrationen beider Asaronisomere relativ stark ausgeprägt war. Für α -Asaron konnte bis zu einer Testkonzentration von 100 μM ein statistisch signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der Adduktlevel gezeigt werden. Für 200 μM lässt sich ein weiterführender Trend beobachten, welcher aber keine Signifikanz aufweisen kann. Die Adduktlevel nach Inkubation mit β -Asaron zeigen einen konzentrationsabhängigen Trend, ohne statistische Sicherheit in den beiden höchsten Konzentrationen. Tendenziell lässt sich auch nach 48 h Inkubation mit beiden Isomeren höhere dG-Adduktlevel detektieren.

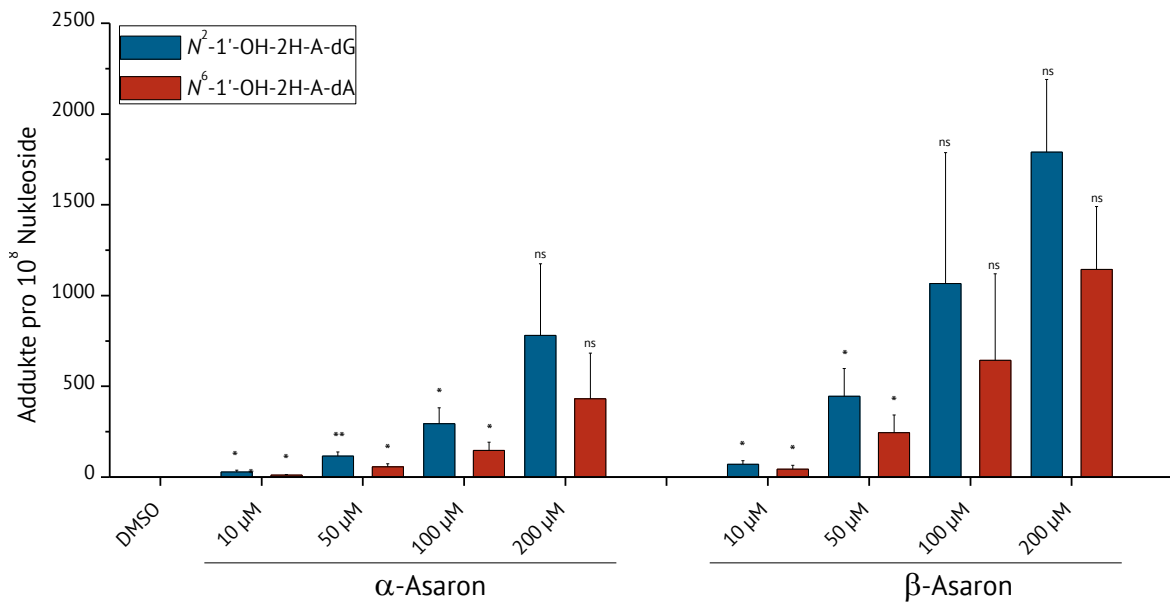


Abbildung 4-49: Adduktbildungsrate von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 48-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Signifikanz bezieht sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μ M auf DMSO und wurden mittels Students t -Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant).

4.5.2 Kinetik der DNA-Adduktbildung

Die Kinetik der Adduktbildungsrate wurde bei gleichbleibender Inkubationskonzentration über die vier Inkubationszeitpunkte (1, 6, 24 und 48 h) erstellt. In Abbildung 4-50 sind die Kinetiken der Adduktbildung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA der Inkubationen mit α -Asaron dargestellt.

Bei einer Konzentration von 10 μ M ist ein Anstieg bis 6 h und danach ein Abfall unter das Niveau der 1-stündigen Inkubation zu beobachten. Für die Inkubationskonzentrationen 50 μ M und 100 μ M α -Asaron ist ein konstantes Adduktlevel über 24 h und eine anschließende Abnahme bis 48 h zu beobachten, wobei hier kein signifikanter Unterschied zwischen allen vier Zeitpunkten zu sehen ist. Die Behandlung von pRH mit 200 μ M α -Asaron führte zur Zunahme der Gehalte an N^6 -1'-OH-2H-A-dA bis 24 h und zu einer Abnahme bis 48 h unter den Wert der 1-stündigen Inkubation. Aufgrund der großen Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Bestimmungen war eine statistische Auswertung der vorliegenden Kinetik nicht sinnvoll.

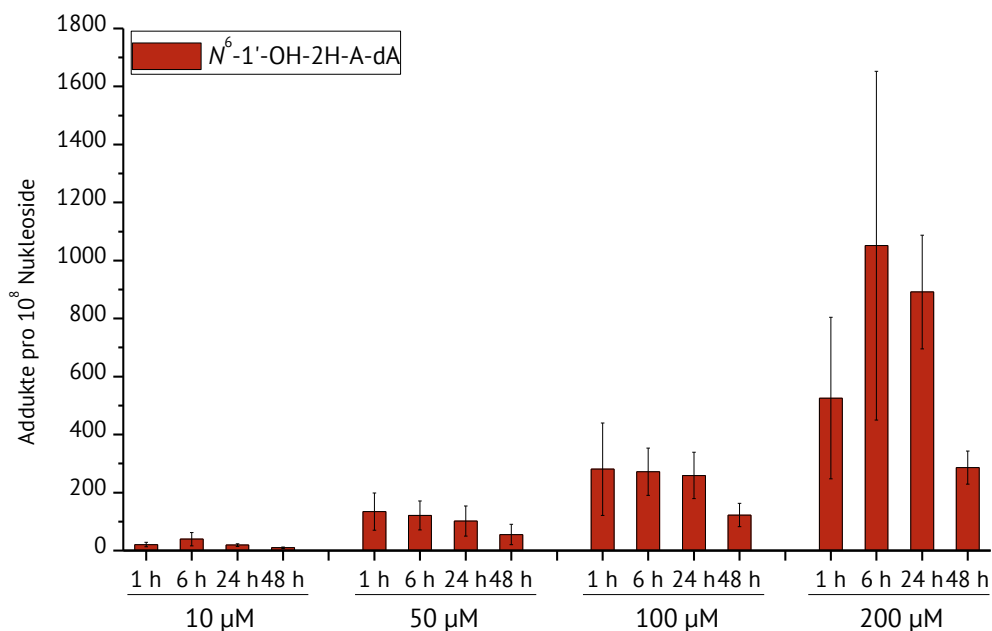


Abbildung 4-50: Kinetik der Adduktbildungsrate von N^6-1' -Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$, bzw. $n = 2$ für 1 h 200 μM).

Die Kinetik der Adduktbildung des N^2-1' -OH-2H-A-dG ist in Abbildung 4-51 abgebildet. Hier konnte beobachtet werden, dass für alle Inkubationskonzentrationen von α -Asaron die Adduktlevel bis 6 h anstiegen und anschließend bis 48 h auf etwa das Niveau der 1-stündigen Inkubation fielen. Diese Kinetik war mit zunehmender α -Asaron-Konzentration ausgeprägter.

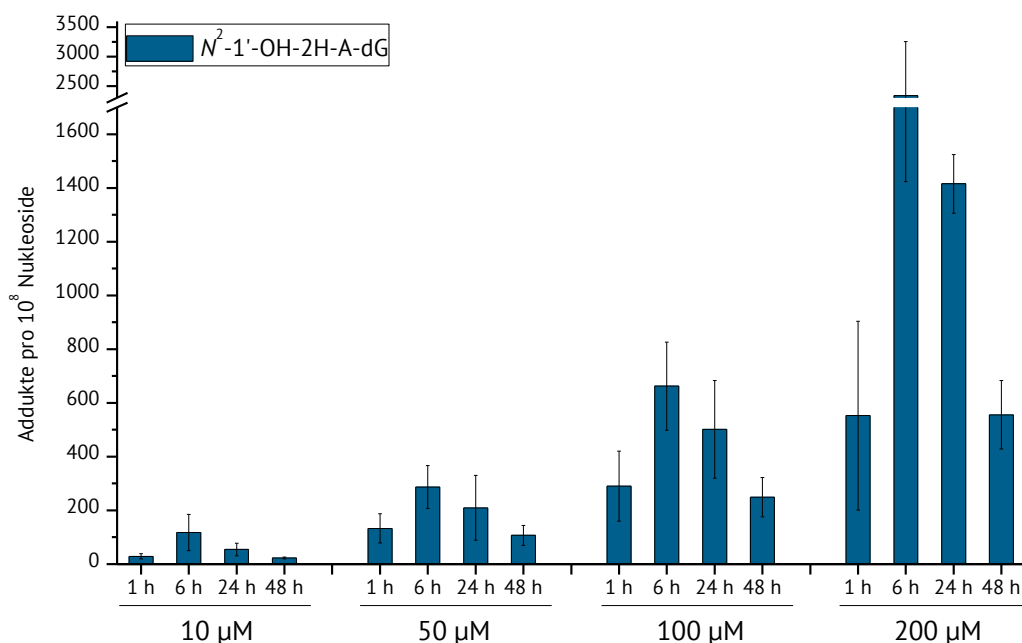


Abbildung 4-51: Kinetik der Adduktbildungsrate von N^2-1' -Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$, bzw. $n = 2$ für 1 h 200 μM).

Die Kinetiken der Adduktbildungsraten von N^6-1' -OH-2H-A-dA nach Inkubation mit β -Asaron zeigten in den Konzentrationen 10 μM , 50 μM und 100 μM jeweils einen Anstieg bis 6 h und einen

anschließenden Abfall der Adduktgehalte bis auf das Niveau der 1-stündigen Inkubation (Abbildung 4-52). Bei der Inkubation mit 200 μM liegen die Adduktlevel der 6- und 24-stündigen Behandlungsdauer im gleichen Bereich und weisen beide eine hohe Schwankung der Einzelbestimmungen auf. Nach 48 h wurde ein Rückgang der Adduktgehalte beobachtet, welche jedoch oberhalb des Niveaus der 1-stündigen Inkubation lag.

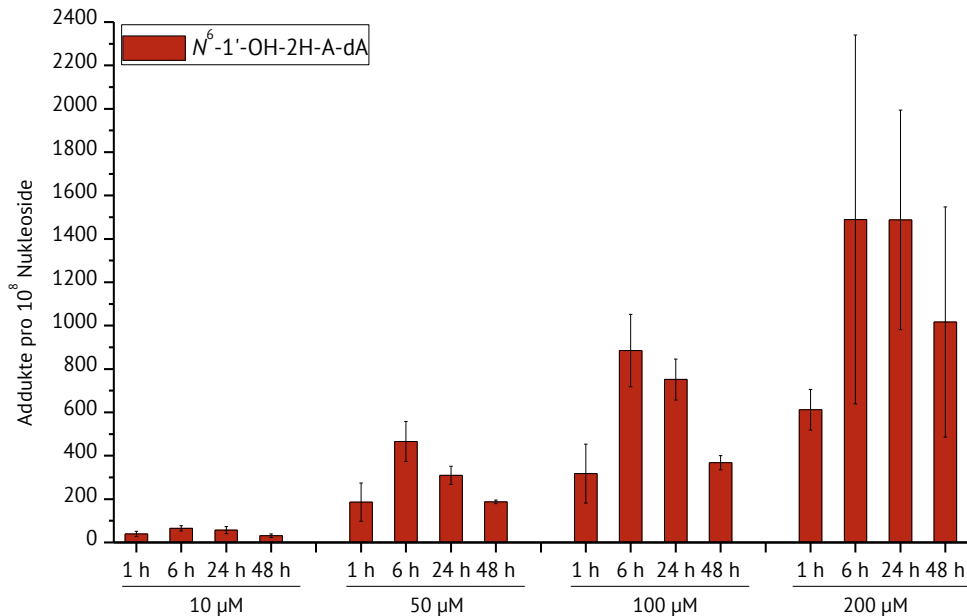


Abbildung 4-52: Kinetik der Adduktbildungsrate von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$).

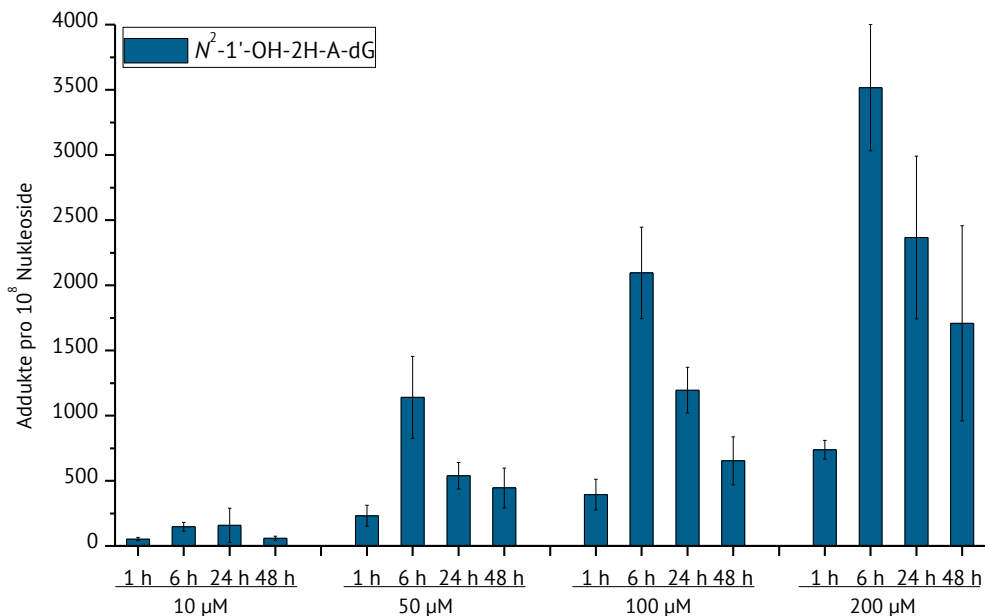


Abbildung 4-53: Kinetik der Adduktbildungsrate von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$).

Die Adduktlevel über die Zeit von N^2 -1'-2H-A-dG nach Inkubation mit β -Asaron sind in Abbildung 4-53 dargestellt und wiesen die ausgeprägteste Abhängigkeit von der Behandlungsdauer auf. Für die

Inkubationskonzentration 10 μM lässt sich ein Anstieg von einer Stunde auf 6 h Behandlung beobachten. Die Gehalte von 6 h und 24 h weisen ähnliche Werte auf und weiter ist ein Abfall des Adduktlevels nach 48 h in den Bereich der 1-stündigen Behandlung zu sehen. Die Inkubation mit 100 μM führte zu einem Anstieg des Adduktlevels bei 6 h und einer anschließenden Abnahme bis 24 h. Das Adduktlevel zum Zeitpunkt 48 h lag im Bereich des bei 24 h, es konnte also keine Abnahme von 24 h zu 48 h beobachtet werden. Die Kinetik des Adduktlevels von $N^2-1'-2\text{H-A-dG}$ nach Inkubation mit 100 μM β -Asaron zeigte einen starken Anstieg von 1 h zu 6 h mit anschließender Abnahme über 24 h und 48 h. Nach 48 h konnten Adduktgehalte gemessen werden, welche über denen der 1-stündigen Inkubation lagen. Für die Inkubation mit 200 μM zeigte sich ein ähnliches Bild mit ausgeprägterem Anstieg bis 6 h.

Die Untersuchungen zu Abhängigkeit der Adduktbildung von der Inkubationsdauer lieferten für die beiden Asaronaddukte widersprüchliche. Für die Inkubationen mit β -Asaron lässt sich mit Ausnahme der dA-Adduktbildungsrate bei 200 μM ableiten, dass ein Maximum der nachzuweisenden Addukte nach einer Inkubationsdauer von 6 h detektiert werden kann. Über 48 h findet dann eine Abnahme der Addukte statt. Die dA-Addukte sinken auf das Niveau der 1-stündigen Inkubation wohingegen die dG-Addukte diesen Wert nach 48 h noch übersteigen.

Die Inkubationen mit α -Asaron lassen sich nicht zu einem einheitlichen Bild zusammenfassen. Für $N^6-1'-\text{OH}-2\text{H-A-dA}$ konnte kein Unterschied der Adduktgehalte innerhalb der ersten 24 h bei den Inkubationskonzentrationen 10 μM , 50 μM und 100 μM festgestellt werden. Über 48 h fand eine geringe Abnahme der Adduktlevel statt. Der Zeitverlauf der dA-Adduktbildung nach Inkubation mit 200 μM zeigte hingegen eine Zunahme über 24 h und anschließende Abnahme unter das Niveau der 1-stündigen Inkubation. Für $N^2-1'-2\text{H-A-dG}$ konnten für alle Inkubationskonzentrationen von α -Asaron steigende Adduktlevel bis 6 h und anschließend fallende Adduktlevel bis 48 h auf etwa das Niveau der 1-stündigen Inkubation beobachtet werden.

4.5.3 Zusammenfassung und Diskussion der *in-vitro*-Studie

Die vorliegende *in-vitro*-Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt eine konzentrations- und zeitabhängigkeit der Adduktbildung in pRH nach Inkubation mit α - und β -Asaron zu untersuchen.

Die Abhängigkeit der Adduktbildungsraten von der eingesetzten Inkubationskonzentration konnte für alle durchgeführten Experimente gezeigt werden, wobei der untersuchte Konzentrationsbereich mit dem 20-fachen verhältnismäßig klein ist. Die kinetischen Daten der Inkubationen der Lebermikrosomen lassen jedoch darauf schließen, dass weder für α -Asaron noch für β -Asaron eine konzentrationsabhängige Stoffwechselverschiebung der CYP-vermittelten Biotransformation zu erwarten ist, so dass eine überproportionale Abnahme der Epoxidbildung und damit der Bildung von

DNA-Addukten als unwahrscheinlich angesehen wird (Cartus *et al.*, 2015; Cartus und Schrenk, 2016).

Hierbei konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Gehalte an N^2 -1'-2H-A-dG die Gehalte an N^6 -1'-OH-2H-A-dA, wenn auch nur gering, in alle Untersuchungen überstiegen. Weiter konnte nach 1-stündiger und 24-stündiger Inkubation ein linearer Zusammenhang zwischen Adduktlevel und Inkubationskonzentration für beide Isomere und beide Addukte bestätigt werden. Nach 6-stündiger Inkubation nahmen die Gehalte an N^2 -1'-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA nach Inkubation mit 200 μ M α -Asaron überlinear zu, wohingegen ein Abflachen des Zusammenhangs nach Inkubation mit 200 μ M β -Asaron zu beobachten war. Nach 48-stündiger Inkubation wurde recht hohe Schwankungen in den Adduktgehalten der höchsten Inkubationskonzentrationen beobachtet. Dies könnte eventuell auf einsetzende Zytotoxizität zurückzuführen sein. Die verwendeten Konzentrationen wurden auf ihre zytotoxischen Eigenschaften in pRH untersucht, jedoch wurde hier ein anderes Format (24-well Platten vs. 100-mm-Zellkulturschalen) verwendet bei gleicher Aussaatdichte und gleichen Inkubationsbedingungen. Weiter wurden die Untersuchungen zur Zytotoxizität nur mittels RRT bestimmt, welcher als Endpunkt das Vermögen der Zelle Reduktionsäquivalente zu generieren hat. Es ist also nicht auszuschließen, dass hier ein zytotoxischer Effekt der Inkubationssubstanzen auf die Zellen für die hohen Schwankungen verantwortlich waren. Obwohl Hinweise auf eine deutliche Abnahme der Zellviabilität über die Zeit wie das Ablösen von Zellen oder ein verminderter DNA-Gehalt der Zellen nicht beobachtet wurden, könnte jedoch ein gewisser Selektionsbias durch den Verlust von möglicherweise adduktreichen toten Zellen die Daten beeinflusst haben.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den Kinetiken der Adduktlevel weisen darauf hin, dass pRH in Kultur in der Lage sind, diese Addukte zu reparieren. Im Allgemeinen konnten maximale Adduktgehalte nach 6 h beobachtet werden und eine stetige Abnahme bis zum Zeitpunkt 48 h.

Im Vergleich zu anderen Phenylpropanoiden wie Methyleugenol fällt auf, dass die Adduktlevel des dA-Addukts nur etwas geringer ausfielen als die des dG-Addukts. Für Methyleugenol war sowohl in humanen Leberbiopsie-Proben als auch in Leberproben von transgenen Mäusen ein Faktor von etwa 50 zwischen den dG-Addukten und den dA-Addukten zu beobachten (Herrmann *et al.*, 2014, 2013). In pRH konnten nach 12-stündiger Inkubation mit 250 μ M Methyleugenol 193 ± 14 N^2 -MIE-dG pro 10^8 Nukleosiden nachgewiesen werden (A. T. Cartus *et al.*, 2012). Die 24-stündige Inkubation mit 200 μ M α -Asaron lieferte im Vergleich dazu 1415 ± 109 N^2 -1'-OH-2H-A-dG pro 10^8 Nukleoside in pRH. Damit übersteigt die α -Asaron Methyleugenol im Vermögen DNA-Addukte in pRH zu bilden um etwa das 7fache.

Im Gegensatz dazu überwog bei Estragol die Bildung der dA-Addukte. In einer *in-vivo*-Studie konnte gezeigt werden, dass männliche F344 Ratten nach oraler Aufnahme von 600 mg (kg KG)⁻¹ d⁻¹ (an 5

Tagen die Woche über 4 Wochen) DNA-Addukte in der Leber aufwiesen. Es wurden Adduktlevel von $3,5 \pm 0,4$ C8-3'-Estragol-2'-Desoxyguanosin pro 10^6 dG, $4,8 \pm 0,8$ N²-3'-Estragol-2'-Desoxyguanosin pro 10^6 dG und $20,5 \pm 1,6$ N⁶-3'-Estragol-2'-Desoxyadenosin pro 10^6 dA nachgewiesen (Ishii *et al.*, 2011). Diese Adduktgehalte lagen in etwa im Bereich der Gehalte, welche nach 1-stündiger Inkubation mit α - oder β -Asaron in pRH erhalten wurden.

Sowohl Methyleugenol als auch Estragol zählen zu den allylischen Vertretern der Phenylpropanoide und welchen ein anderer DNA-Adduktbildungsmechanismus zu Grunde liegt. Ein Vergleich mit 1-propenylischen Phenylpropanoiden ist aufgrund fehlender Daten in der Literatur nicht möglich.

Der Vergleich mit ähnlichen Studien an humanen Hepatozyten oder pRH mit bekannten gentoxischen und kanzerogenen aromatischen Amininen lieferte Adduktlevel in gleicher Größenordnung (Nauwelaers *et al.*, 2011) wie die Asaron-DNA-Adduktlevel, bzw. bei Berücksichtigung der Inkubationskonzentration, höhere Werte (Williams *et al.*, 2016). Weiter konnten Williams *et al.* (2016) zeigen, dass der Grad der DNA-Schädigung durch 2-Acetylaminofluoren der Rattenleber *in vivo* mit dem Gehalt an DNA-Addukte in pRH *in vitro* korreliert, was den Nutzen solcher *in-vitro*-Studien belegt.

Anderen gentoxischen Verbindungen deren reaktiver Metabolit ein Epoxid darstellt zeigten *in vivo* Adduktgehalte in ähnlicher Größenordnung. Doerge *et al.* (2005) untersuchten die N⁷-Glycidamid-Guanin Gehalte in Fischer 344 Ratten (m+w; $n = 3-4$) nach einmaliger *i. p.* Applikation von 50 mg kg^{-1} Acrylamid und konnten, je nach Gewebe, nach 6 h 270–960 Addukte pro 10^8 Nukleoside nachweisen. Im Blut Styrol-exponierter Arbeiter ($n = 11$) konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erhöhte O⁶-styrol-guanin-Adduktgehalte festgestellt werden. Diese beliefen sich auf $5,9 \pm 4,9$ Addukte pro 10^8 Nukleoside (Vodička *et al.*, 1999).

Insgesamt ist auch bei der Bewertung der mutagenen und kanzerogenen Aktivität der gebildeten Asaronepoxide zu beachten, dass die DNA-Adduktbildung möglicherweise keine ausschließliche Rolle spielt. Für 2-Acetylaminofluoren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch nicht-gentoxische epigenetische Veränderungen am Prozess der Karzinogenese beteiligt sind (Bagnyukova *et al.*, 2008).

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit sollten drei aufeinander aufbauende Fragestellungen geklärt werden.

1. Die Darstellung der Asaronmetaboliten α - und β -Asaronepoxid, sowie deren Stabilität in verschiedenen Lösungsmitteln,
2. die Reaktivität der Asaronepoxide gegenüber 2'-Desoxynukleosiden und daraus abgeleitet die Charakterisierung der gebildeten Addukte, und
3. die Entwicklung einer sensitiven UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der Adduktgehalte in pRH nach Behandlung mit α - und β -Asaron, um deren konzentrations- und zeitabhängige Bildung *in vitro* zu untersuchen.

Nach der Anpassung der DMDO-Synthese konnte sowohl für α -Asaron als auch für β -Asaron erfolgreich eine Epoxidierung der Seitenkette durchgeführt werden. Die erhaltenen Produkte wiesen eine Reinheit von $\geq 96\%$ auf und konnten mit Ausbeuten von 84% und 74% reproduzierbar synthetisiert werden.

Mit Chloroform, Acetonitril und DMSO als Lösungsmittel konnten für beide Asaronepoxide eine Stabilität von mindestens 5 d bei RT bestätigt werden. Im wässrigen Milieu findet innerhalb von maximal 4 min eine vollständige Umsetzung der Epoxide zu *erythro*-Asarondioldiol, *threo*-Asarondioldiol und 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone statt. Das Verhältnis des Produktspektrums ist hierbei stark pH-Wertabhängig.

Die Untersuchungen zur Reaktivität von α - und β -Asaronepoxid gegenüber dG und dA zeigten in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer eine Adduktbildung. Nach Charakterisierung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte zweifelsfrei die Bildung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG bestätigt werden. Diese konnten im Anschluss in größeren Mengen synthetisch dargestellt werden und durch Modifikation der Syntheseroute konnten auch deren stabil-isotopenmarkierten Analoga synthetisiert werden.

Gegenüber den Pyrimidinbase dC und dT zeigten die Asaronepoxide keine Reaktivität. Die Inkubationen zeigten aber Produktpeaks, welche durch weitere massenspektrometrische

Untersuchungen als Bi-Addukte aus Asaronepoxiden und deren Hydrolyseprodukte identifiziert werden konnten. Weiter wurde sowohl für die Bildung der beiden Asaron-DNA-Addukte als auch für die Bildung der Bi-Addukte ein Reaktionsmechanismus postuliert.

Nach der Etablierung der (U)HPLC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung der Asaron-DNA-Addukte wurde eine *in-vitro*-Studie zu Bestimmung der Konzentrations- und zeitabhängigkeit der Adduktbildung an pRH durchgeführt. Hierbei konnte zu allen Zeitpunkten (1, 6, 24 und 48 h) eine Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden, welche nahezu bei allen Inkubationen einen linearen Zusammenhang aufwies. Im Vergleich zur Literatur lagen die beobachteten Adduktlevel in ähnlicher Größenordnung bzw. teilweise auch deutlich darüber.

Die Beobachtungen über die Zeit zeigten bei nahezu allen Inkubationen eine maximale Adduktkonzentration nach 6 h, welche bis 48 h auf etwa das Niveau der 1-stündigen Inkubationen abnahm. Abweichungen davon konnten v. a. bei der Bestimmung der Kinetik der Bildung von N⁶-1'-OH-2H-A-dA beobachtet werden. Insgesamt konnte aufgrund dieser Ergebnisse von einer Reparatur der gebildeten Addukte in pRH geschlossen werden.

Abschließend konnten alle eingangs aufgestellten Fragen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber auch die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um die nun neu aufgeworfenen Fragen zu beantworten.

In folgenden Studien sollte die Aufklärung des Reparaturmechanismus der Asaron-DNA-Addukte in pRH bearbeitet werden. Weiter sollte abgeklärt werden, ob die maximalen Adduktgehalte wirklich nach 6 h erreicht werden, oder ob es eventuell noch einen weiteren Anstieg der Adduktlevel im Zeitraum von 6–24 h gibt. Auch sollte der Konzentrationsbereich hin zu kleineren Inkubationskonzentrationen erweitert werden, um eventuell eine Konzentration zu erhalten, bei welcher die Adduktgehalte unterhalb der Nachweisgrenze liegen, bzw. um zu beobachten, ob der lineare Zusammenhang der Konzentrationsabhängigkeit auch über einen größeren Bereich besteht.

Um die Bildung der Asaron-DNA-Addukte *in vivo* zu untersuchen, wäre es notwendig eine Studie mit oraler Applikation von α - und β -Asaron an Ratten durchzuführen. Anhand einer solchen Studie könnten gleichzeitig auch die Adduktlevel in anderen Geweben bestimmt werden und verifiziert werden, dass die Leber das Hauptzielorgan der Asarone darstellt.

6 MATERIALIEN

6.1 Geräte

Tabelle 6-1: Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern/Lieferanten.

Gerät	Hersteller/Lieferant
Brutschrank	
Brutschrank, Heraeus Instruments	Thermo Scientific, Hanau, Deutschland
CB Typ 9040-0013	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eismaschine	
Wessamat Combi-Line	Wessamat Eismaschinenfabrik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
HPLC-MS/MS-System I	
HPLC: Serie 1100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
· 1100 Degasser G1379A	
· 1100 Quat Pump G1311A	
· 1100 Autosampler G1313A	
· 1100 TCC G1316A	
MS: API 2000	Applied Biosystems, Framingham, USA
HPLC-MS/MS-System II	
HPLC: Serie 1200	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
· 1200 Degasser G1379B	
· 1200 Bin Pump SL G1315C	
· 1200 FC/ALS Therm G1330B	
· 1200 Hip-ALS SL G1367C	
· 1200 TCC SL G1316B	
MS: API 3200	Applied Biosystems, Framingham, USA
HPLC-UV/VIS-System	
Waters HPLC-Anlage	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
· Pumpe Controller 600	
· Autosampler Waters 717 plus	
· Waters In-Line Degasser	
Jasco UV-975 intelligent UV/VIS-Detector	Jasco Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Kühl-Gefrierkombination	
	Liebherr GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop	
Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Leica DM IRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	
	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Fortsetzung **Tabelle 6-1:** Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern/Lieferanten.

NMR Spektrometer	
Avance-III, 400 MHz	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Avance-II, 600 MHz	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
pH-Meter	
HI 221	HANNA Instruments GmbH, Vöhringen, Deutschland
Pipetten	
Eppendorf Research Plus (10–1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
accu-jet pro	BRAND, Wertheim, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Rotationsverdampfer	
IKA RV 10 Digital	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Rotavapor R	BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Schlauchpumpe	
Schlauchpumpe BVP	Ismatec, Glattsbrugg-Zürich, Schweiz
Schüttelinkubator	
Shaker 54 ELMI	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Sicherheitswerkbank	
Steag MRF-B	Steag Reinraumtechnik, Pfullingen, Deutschland
Spektrophotometer	
Nano-Drop ND-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
UHPLC-MS/MS-System	
UHPLC: Serie 1200 Infinity	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
· 1290 Bin Pump G4220A	
· 1290 Thermostat G1330B	
· 1290 Autosampler G4226A	
· 1290 TCC G1316C	
MS: QTRAP 5500	AB Sciex, Framingham, USA
Vakuumpumpe	
Vaccubrand Drehschieber Ölpumpe	Vaccubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Vakuumentrifuge	
Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waagen	
Exellence Plus	Mettler-Toledo LLC., Columbus, USA
CP224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
BP 210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
BP 410S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbäder	
Termostat T MA 6	Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	
Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Microfuge® R	Beckman Coulter, Krefeld
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Multifuge 1L-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Rotina 35	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

6.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6-2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern/Lieferanten.

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Autosampler Vial mit Inserts und Deckel, 2 ml	WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland
Braunüle Vasocan 14G (orange)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Braunüle Vasocan 18G (grün)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dünnschichtchromatographieplatte	
Kieselgel 60 mit Fluoreszenz Indikator	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einmal-Injektionskanülen Sterican 26G 0,45 x 12 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Injektionsspritzen Omnifix-F 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
HPLC-Säulen	
LiChrospher® 100 RP 18, 125 mm x 4 mm, 5 µm	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
U-VDSpher PUR C18-E, 50 mm x 4 mm, 1,8 µm	VDS Optilab, Berlin, Deutschland
HPLC-Vorsäulen	
LiChrospher® 100 RP 18, 4 mm x 4 mm, 5 µm	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
U-VDSpher PUR C18-E, 4 mm x 4 mm, 1,8 µm	VDS Optilab, Berlin, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (V_{\max} 1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Präparative-Säulen	
ReproSil 100 C18, 250 mm x 10 mm, 5 µm	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland
VDSpher PUR C18-SE, 250 mm x 20 mm, 5 µm	VDS Optilab, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (V_{\max} 25 ml, 10 ml, 5 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

6.3 Chemikalien

Tabelle 6-3: Lister der verwendeten Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten.

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
¹⁵ N ₅ -2'-Desoxyadenosin	Silantes GmbH, München, Deutschland
¹⁵ N ₅ -2'-Desoxyguanosin	Silantes GmbH, München, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	VWR, Leuven, Belgien
2'-Desoxyadenosin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2'-Desoxycytidin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2'-Desoxyguanosin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2'-Desoxythymidin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Fisher Chemicals, Schwerte, Deutschland
Acetonitril	
HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade HPLC	VWR International LLC, Radnor, USA
Optigrade®, LC-MS	Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
Acetonitril- <i>d</i> ₅	C/D/N Isotopes, Pointe-Claire, USA
alkalische Phosphatase (CIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure MS-Grade	FisherScientific, Geel, Belgien
Ammoniumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) (30 %)	Gibco®, ThermoFischer, Dreieich, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	FisherScientific, Loughborough, England

Fortsetzung **Tabelle 6-3:** Lister der verwendeten Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten.

Chloroform- <i>d</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriummethylenediamintetraacetat (Na ₂ EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Corporation, Schnellendorf, Deutschland
DMEM <i>high glucose</i> ohne Phenolrot mit HEPES	Gibco®, ThermoFischer, Dreieich, Deutschland
DMEM <i>low glucose</i> mit Phenolrot	Gibco®, ThermoFischer, Dreieich, Deutschland
Essigsäure MS-Grade	FisherScientific, Geel, Belgien
Essigsäure p.a.	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol p.a.	ThGeyer, Renningen, Deutschland
Ethylacetat	FisherScientific, Loughborough, England
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck, Hohenbrunn, München, Deutschland
Kaliumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	
HPLC-Gradient Grade	Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
Optigrade®, LC-MS	Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
Micrococcal Nuklease	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsuccinat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>n</i> -Hexan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oxone®	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep 100x)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pentobarbital	Gibco®, ThermoFischer, Dreieich, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenol, equilibriert und stabilisiert	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden
Phosphodiesterase II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS-Lösung (20 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Typanblau 0,1 % Fertiglösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
α-Asaron	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Asaron	Isoliert aus Kalmusöl (<i>Oleum calami rectificatum</i>) der indischen Varietät <i>Acorus calamus</i> L.

7 METHODEN

7.1 Synthesen

Alle im Folgenden genannten Synthesen beschreiben die Syntheserouten und Aufarbeitungen, welche nach Optimierung zur besten Reinheit und höchsten Ausbeute des gewünschten Produktes geführt haben.

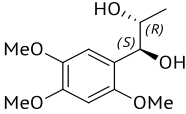
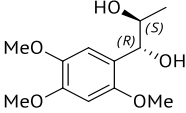
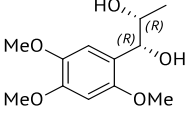
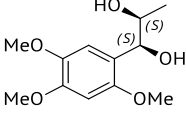
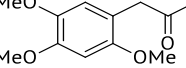
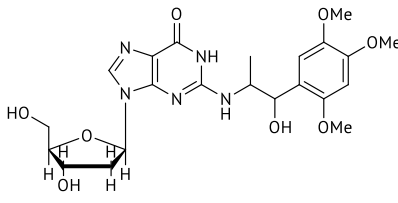
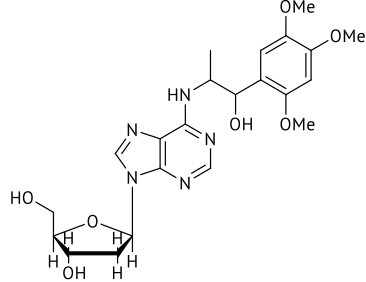
Die Hersteller bzw. Bezugsquellen sowie die Reinheit der verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 6.3 Chemikalien aufgeführt.

In Tabelle 7-1 sind den Strukturen der in der Arbeit synthetisierten Verbindungen, deren Ausgangsmaterialien und der in den Reaktivitätsstudien verwendeten Metaboliten den Trivialnamen, deren Abkürzungen und den IUPAC-Namen zu geordnet.

Tabelle 7-1: Zuordnung der Verbindungen, welche in der Arbeit synthetisiert wurden, bzw. deren Vorstufen und Metaboliten der Reaktivitätsstudien zu Struktur, Trivialname, Abkürzung und IUPAC-Namen.

Struktur	Trivialname	Abkürzung	IUPAC-Name
	α -Asaron	α A	1,2,4-Trimethoxy-5-[(1E)-1-propen-1-yl]-benzen
	β -Asaron	β A	1,2,4-Trimethoxy-5-[(1Z)-1-propen-1-yl]-benzen
	α -Asaronepoxid	α AE	(2R,3R)- bzw. (2S,3S)-2-methyl-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)oxiran
	β -Asaronepoxid	β AE	(2S,3R)- bzw. (2R,3S)-2-methyl-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)oxiran

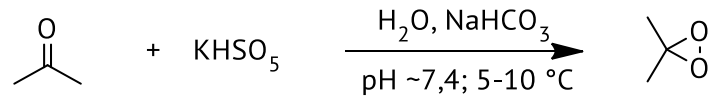
Fortsetzung **Tabelle 7-1:** Zuordnung der Verbindungen, welche in der Arbeit synthetisiert wurden, bzw. deren Vorstufen und Metaboliten der Reaktivitätsstudien zu Struktur, Trivialname, Abkürzung und IUPAC-Namen.

 	<i>erythro</i> -Asarondiol	eA-Diol	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- bzw. (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol
 	<i>threo</i> -Asarondiol	tA-Diol	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)- bzw. (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol
	2,4,5-Trimethoxyphenylacetone	Keton	1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)propan-2-on
	<i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasarosin-2'-desoxyguanosin	<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG	2-((1-hydroxy-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)propan-2-yl)amino)-9-((2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1H-purin-6(9H)-on
	<i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasarosin-2'-desoxyadenosin	<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(6-((1-hydroxy-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)propan-2-yl)amino)-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol

7.1.1 Epoxide

7.1.1.1 Synthese von Dimethyldioxiran (DMDO)

Syntheschema



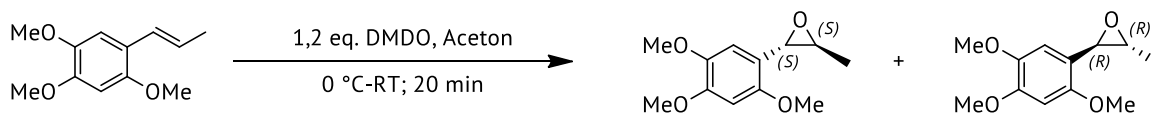
Synthesevorschrift nach Adam et al. (1991).

Es werden destilliertes Wasser (254 ml), Aceton (192 ml) und Natriumhydrogencarbonat (58 g) vorgelegt und unter Rühren auf 5–10 °C gekühlt. Oxone® (120 g), eine Mischung aus $\text{KHSO}_5 \times \frac{1}{2} \text{KHSO}_4 \times \frac{1}{2} \text{K}_2\text{SO}_4$, wird in fünf Portionen alle 3 min unter starkem Rühren zugegeben. Nach der letzten Zugabe und dem Abklingen der Reaktion, welches durch Abnahme der Gasbildung zu beobachten ist, wird ein Vakuum von 100–130 bar angelegt und die Kühlung beendet. Unter weiterem Rühren wird die Aceton-Dimethyldioxiran-Lösung in eine auf –78 °C gekühlte Vorlage destilliert. Die so erhaltene Lösung wird unter Schutzatmosphäre über K_2CO_3 getrocknet und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Konzentration der synthetisierten Lösung wird mittels Iodometrie bestimmt. Die Molarität der DMDO-Lösung lässt sich mit folgender Gleichung bestimmen.

$$\text{Molarität DMDO-Lösung} = \frac{(\text{Molarität des Titranten} \cdot V(\text{Titrant})[\text{ml}])}{V(\text{DMDO})[\text{ml}] \cdot 2}$$

7.1.1.2 Synthese von α -Asaronepoxid

Syntheschema



Synthesevorschrift modifiziert nach Kim et al. (1999).

Unter Argonschutzatmosphäre wird α -Asaron (884 mg; 4,24 mmol) in 2 ml über CaCl_2 getrocknetem Aceton gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden 52,5 ml der DMDO-Lösung (0,097 mol/l; 5,10 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 20 min. bei RT gerührt. Das Ende der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kontrolliert. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in *n*-Hexan aufgenommen. Nach Umkristallisation bei -20 °C können die entstandenen Kristalle isoliert werden und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit werden.

Ausbeute 798 mg (3,56 mmol, 84 %; hellgelber Feststoff)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4) = 224,25 \text{ g/mol}$

Reinheit >98 % ($^1\text{H-NMR}$)

Charakterisierung:

DC: $R_f = 0,31$ (Ethylacetat:Hexan 1:3)

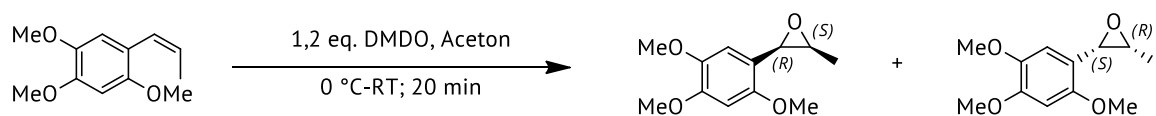
$^1\text{H-NMR}$: (400 Hz, CDCl_3 , ST-108) δ [ppm]: 1,43 (3H, d, $^3J = 5,15 \text{ Hz}$, CH_3), 2,92 (1H, dq, $^3J = 2,14 \text{ Hz}$, $^2J = 5,14 \text{ Hz}$, H^2), 3,79 (3H, s, OCH_3), 3,82 (3H, s, OCH_3), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,88 (1H, d, $^3J = 2,11 \text{ Hz}$, $\text{H}^{1'}$), 6,49 (1H, s, H^3), 6,63 (1H, s, H^6)

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ST-117-3) δ ppm 1,34 (d, $J = 4,99 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3) 3,03 (qd, $J = 5,04$, $^2J = 2,20 \text{ Hz}$, 1 H, H^2) 3,65 (s, 3 H, OCH_3) 3,78 (s, 4 H, OCH_3 , $\text{H}^{1'}$) 3,80 (s, 3 H, OCH_3) 6,55 (s, 1 H, H^3) 6,69 (s, 1 H, H^6)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Acetonitril- d_3 , ST-117-1) δ ppm 1,37 (d, $J = 5,14 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3) 2,98 (qd, $J = 5,12$, $^2J = 2,07 \text{ Hz}$, 1 H, H^2) 3,71 (s, 3 H, OCH_3) 3,81 (d, $J = 2,26 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{H}^{1'}$) 3,81 (s, 3 H, OCH_3) 3,82 (s, 3 H, OCH_3) 6,60 (s, 1 H, H^3) 6,64 (s, 1 H, H^6)

7.1.1.3 Synthese von β -Asaronepoxid

Syntheschema



Synthesevorschrift modifiziert nach Kim et al. (1999).

Unter Argonschutzatmosphäre wird β -Asaron (1,18 g; 5,67 mmol) in 2 ml über CaCl_2 getrocknetem Aceton gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden 75,7 ml der DMDO-Lösung (0,092 mol/l; 6,96 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 20 min bei RT gerührt. Das Ende der Reaktion wird mittels DC kontrolliert. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in *n*-Hexan aufgenommen. Nach Umkristallisation bei -20 °C können die entstandenen Kristalle isoliert werden und unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit werden.

Ausbeute 941,9 mg (4,20 mmol, 74 %, hellgelber Feststoff)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4) = 224,25\text{ g/mol}$

Reinheit >96 % ($^1\text{H-NMR}$)

Charakterisierung

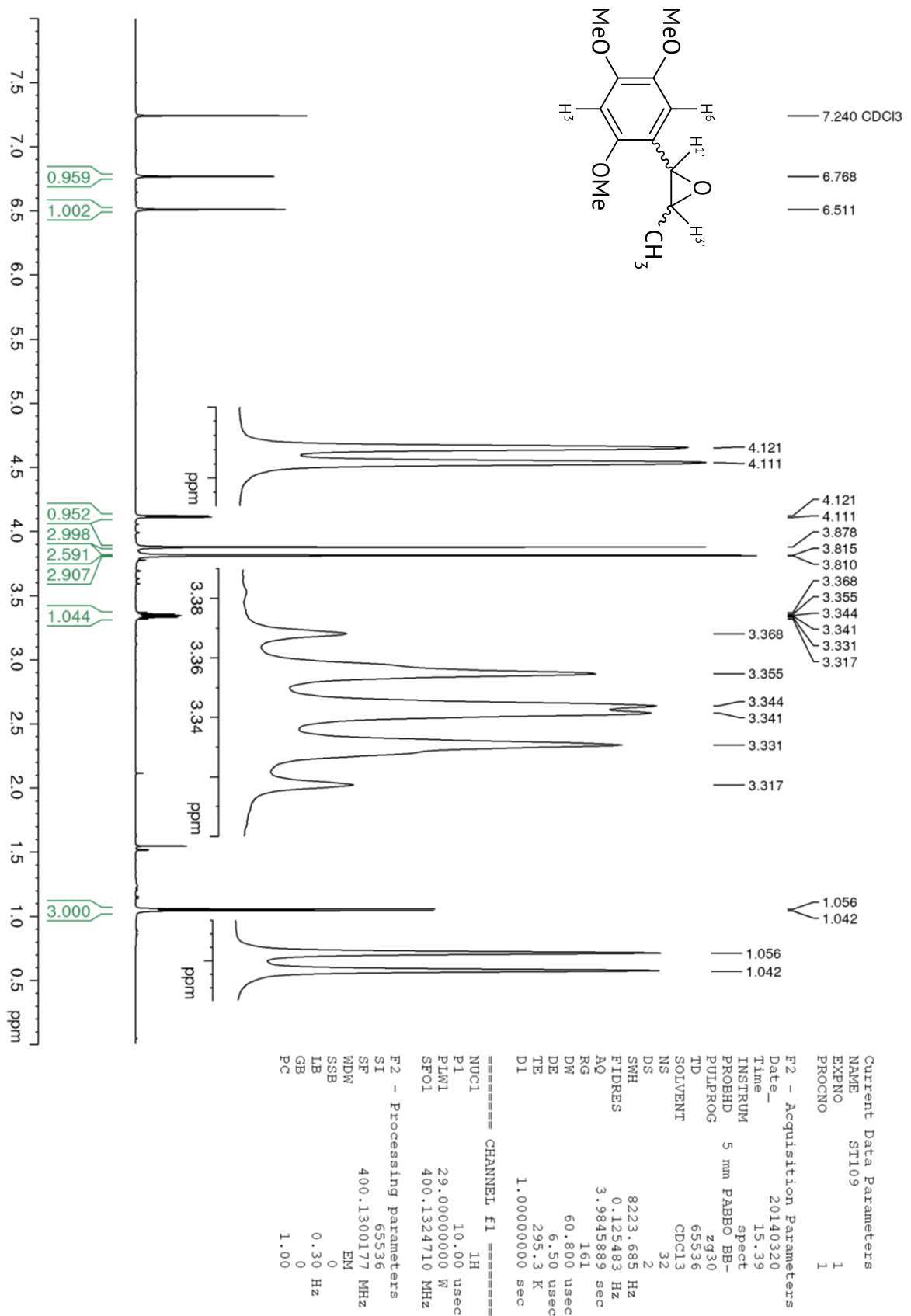
DC: $R_f = 0,23$ (Ethylacetat:Hexan 1:3)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , ST-109) δ [ppm]: 1,07 (d, $J = 5,37\text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 3,32–3,40 (m, 1 H, H^2), 3,83 (s, 3 H, OCH_3), 3,84 (s, 3 H, OCH_3), 3,90 (s, 3 H, OCH_3), 4,14 (d, $J = 4,20\text{ Hz}$, 1 H, H^1), 6,53 (s, 1 H, H^3), 6,79 (s, 1 H, H^6).

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ST-118-3) δ [ppm]: 0,96 (d, $J = 5,58\text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 3,29–3,35 (m, 1 H*, H^2), 3,67 (s, 3 H, OCH_3), 3,79 (s, 3 H, OCH_3), 3,80 (s, 3 H, OCH_3), 4,01 (d, $J = 4,11\text{ Hz}$, 1 H, H^1), 6,63 (s, 1 H, H^3), 6,72 (s, 1 H, H^6)

*eigentlich 2 H überlagert durch Wassersignal

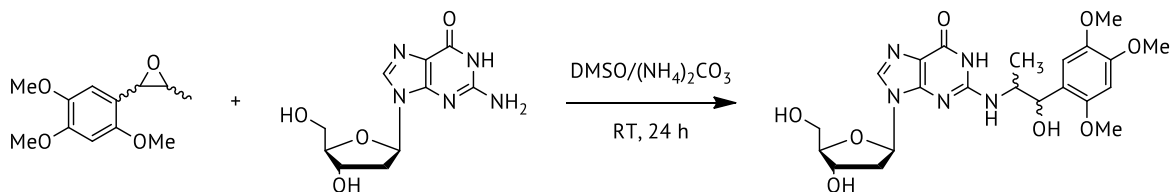
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Acetonitril- d_3 , ST-118-1) δ [ppm]: 1,00 (d, $J = 5,40\text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 3,26–3,32 (m, 1 H, H^2), 3,73 (s, 3 H, OCH_3), 3,81 (s, 3 H, OCH_3), 3,83 (s, 3 H, OCH_3), 4,04 (d, $J = 4,14\text{ Hz}$, 1 H, H^1), 6,67 (s, 1 H, H^3), 6,71 (s, 1 H, H^6)

Abbildung 7-2: ^1H -NMR-Spektrum von β -Asaroneperoxid aufgenommen in CDCl_3 .

7.1.2 Asaron-DNA-Addukte

7.1.2.1 Synthese von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyguanosin*(N*²-1'-OH-2H-A-dG)

Syntheschema



Synthesevorschrift modifiziert nach Herrmann et al. (2012).

2'-Desoxyguanosin-Monohydrat (74,0 mg; 0,26 mmol) wird in 9 ml einer wässrigen Ammoniumcarbonat-Lösung (10 mM, pH 9) gelöst. Unter Rühren wird in 1 ml DMSO gelöstes β -Asaronepoxid (96,0 mg; 0,43 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 24 h bei RT gerührt und anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode Kapitel 7.2.2). Aus den vereinigten Produktfraktionen wird von unter reduziertem Druck Methanol entfernt und diese mittels Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute 17,1 mg (34,8 μ mol; 13,4 %; weißer Feststoff)

$M(\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_8) = 491,49 \text{ g/mol}$

Charakterisierung

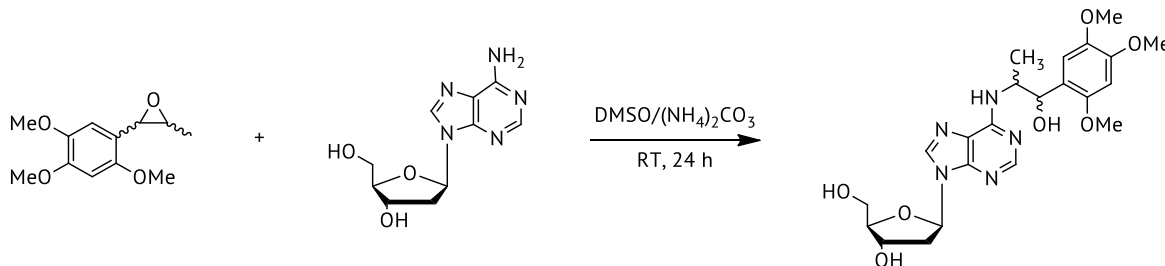
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, ST-141) δ [ppm]: 1,08 (d, 3 H, CH₃, H3'); 2,11 (m, 1 H, 2'dR); 2,62 (m, 1 H, 2'dR); 3,48 (m, 1 H); 3,53 (m, 1 H); 3,77 (m, 1 H); 3,66 (s, 3 H, OCH₃); 3,76 (s, 3 H, OCH₃); 3,84 (s, 3 H, OCH₃); 3,87 (m, 1 H); 4,32 (d, 1 H, 4'dR); 5,07 (m, 1 H, H1'); 6,06 (m, 1 H, 1'dR); 6,68 (s, 1 H, ArH); 6,80 (s, 1 H, ArH); 7,86 (s, 1 H, C8-dG); 10,57 (m, 1 H, NH1),

Retentionszeiten: HPLC: 22,4 min; UHPLC: 2,50 min

MS-Fragmentierung: [M+H]⁺ *m/z* 492,142, [M-Desoxyribose]⁺ *m/z* 376,100, [M-dG]⁺ *m/z* 225,000

7.1.2.2 Synthese von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin $(N^6$ -1'-OH-2H-A-dA)

Syntheschema



Synthesevorschrift modifiziert nach Herrmann et al. (2012).

2'-Desoxyadenosin-Monohydrat (71,5 mg; 0,27 mmol) wird in 9 ml einer wässrigen Ammoniumcarbonat-Lösung (10 mM, pH 9) gelöst. Unter Rühren wird in 1 ml DMSO gelöstes β -Asaronepoxid (121,2 mg; 0,54 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 24 h bei RT gerührt und anschließend mittel präparativer HPLC aufgereinigt (Methode Kapitel 7.2.2). Aus den vereinigten Produktfraktionen wird von unter reduziertem Druck Methanol entfernt und diese mittels Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute 10,8 mg (22,7 μ mol, 8,4 %, weißer Feststoff)

$M(C_{22}H_{29}N_5O_7) = 475,49$ g/mol

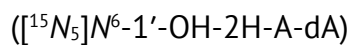
Charakterisierung

1 H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 1,02 (d, 3H, CH₃); 2,24 (m, 1 H, 2'dR); 2,71 (m, 1 H, 2'dR); 3,61 (s, 3 H, OCH₃); 3,74 (s, 3 H, OCH₃); 3,83 (s, 3 H, OCH₃); 3,86 (m, 1 H); 3,95 (m, 1 H); 4,39 (m, 1 H); 5,52 (m, 1 H); 6,34 (m, 1 H); 6,66 (s, 1 H, ArH); 6,99 (s, 1 H, ArH); 8,14 (s, 1 H, C2-dA); 8,36 (s, 1 H, C8-dA)

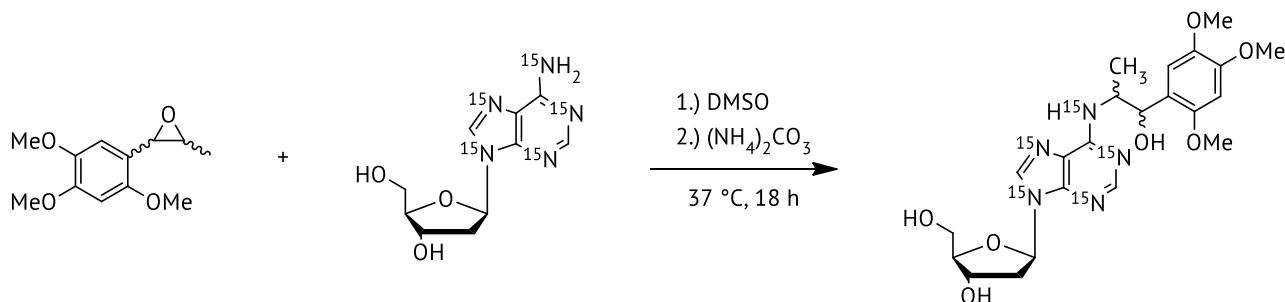
Retentionszeiten: HPLC: 23,6 min; UHPLC: 2,80 min

MS-Fragmentierung: $[M+H]^+$ m/z 476,083, $[M-\text{Desoxyribose}]^+$ m/z 360,000, $[M-dA]^+$ m/z 225,000

7.1.3 Stabil-isotopenmarkierten Asaron-DNA-Addukte

7.1.3.1 Synthese von [$^{15}\text{N}_5$] N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin

Syntheschema



$^{15}\text{N}_5$ -markiertes 2'-Desoxyadenosin ($[\text{}^{15}\text{N}_5]\text{dA}$) (1,335 mg; 5,21 μmol) wird zusammen mit 2,698 mg (12,0 μmol) β -Asaronepoxid eingewogen und mit 50 μl DMSO versetzt. Nach kurzem Durchmischen der Reaktionsmischung wird diese mit 500 μl einer 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 9) versetzt und bei 37 $^\circ\text{C}$ über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mittels semi-präparativer HPLC (Methode Kapitel 7.2.3) aufgereinigt und die vereinigten Produktfraktionen mittels Vakuumzentrifugation auf ein Volumen von 5–10 ml reduziert. Die Konzentration des erhaltenen $[\text{}^{15}\text{N}_5]N^6\text{-1'-OH-2H-A-dA}$ wird mittels HPLC-UV/VIS (Methode Kapitel 7.2.1) mit dem unmarkierten Addukt als Referenz bestimmt. Die Identität der Addukte wurde zusätzlich massenspektrometrisch bestätigt.

Ausbeute: 0,85 mg* (1,77 μmol , 34 %)

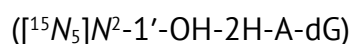
$$M(\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{}^{15}\text{N}_5\text{O}_7) = 480,46 \text{ g/mol}$$

*Die Ausbeute wurde aufgrund der berechneten Konzentration in der Lösung und deren Volumen bestimmt und nicht wie bei allen anderen Synthesen durch gravimetrische Bestimmung der Masse der Produkte.

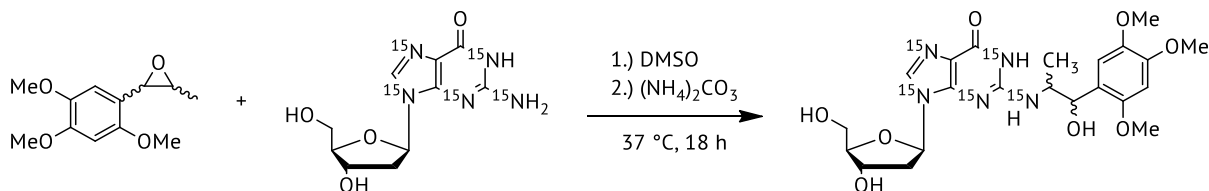
Charakterisierung:

Retentionszeiten: HPLC: 23,6 min; UHPLC: 2,80 min

MS-Fragmentierung: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 481,075, $[\text{M}-\text{Desoxyribose}]^+$ m/z 365,200,
 $[\text{M}-[\text{}^{15}\text{N}_5]\text{dA}]^+$ m/z 225,100

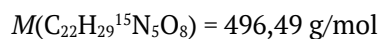
7.1.3.2 Synthese von [$^{15}\text{N}_5$]N²-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyguanosin

Syntheschema



$^{15}\text{N}_5$ -markiertes 2'-Desoxyguanosin ($[\text{}^{15}\text{N}_5]\text{dG}$) (1,192 mg; 4,38 μmol) wird zusammen mit 2,569 mg (11,5 μmol) β -Asaronepoxid direkt eingewogen und mit 50 μl DMSO versetzt. Nach kurzem Durchmischen der Reaktionsmischung wird diese mit 500 μl einer 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 9) versetzt und bei 37 °C über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mittels semi-präparativer HPLC (Methode Kapitel 7.2.3) aufgereinigt und die vereinigten Produktfraktionen mittels Vakuumzentrifugation auf ein Volumen von 5–10 ml reduziert. Die Konzentration des erhaltenen $[\text{}^{15}\text{N}_5]\text{N}^2\text{-1'-OH-2H-A-dG}$ wird mittels HPLC-UV/VIS (Methode Kapitel 7.2.1) mit dem unmarkierten Addukt als Referenz bestimmt. Die Identität der Addukte wurde zusätzlich massenspektrometrisch bestätigt.

Ausbeute: 1,15 mg* (2,32 μmol , 53 %)



*Die Ausbeute wurde aufgrund der berechneten Konzentration in der Lösung und deren Volumen bestimmt und nicht wie bei allen anderen Synthesen durch gravimetrische Bestimmung der Masse der Produkte.

Charakterisierung:

Retentionszeiten: HPLC: 22,4 min; UHPLC: 2,50 min

MS-Fragmentierung: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 497,091, $[\text{M}-\text{Desoxyribose}]^+$ m/z 381,200,
 $[\text{M}-[\text{}^{15}\text{N}_5]\text{dG}]^+$ m/z 225,100

7.2 Analytische Methoden

Alle im Folgenden genannten Methoden sind die für die gestellte Frage final entwickelten Methoden. Im Laufe der Promotion wurde eine Vielzahl an Methoden, sowohl für die analytische und präparative HPLC-UV/VIS als auch für die HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie an unterschiedlichen in der Fachrichtung vorhandenen Geräten entwickelt. Die Methodenentwicklung war wichtig, um die gewünschte chromatographische Trennung und die bestmögliche Detektion zu erlangen und ist in den Kapiteln 4.4.3 und 4.4.4 beschrieben.

7.2.1 HPLC-UV/VIS-Methode

Zur Untersuchung der Reaktivität der Asaronepoxide gegenüber Nukleosiden wurde ein HPLC-UV/VIS-Methode entwickelt und verwendet. Die Arbeiten an der analytischen HPLC gekoppelt mit einem UV/VIS-Detektor wurden mit einem Waters HPLC System bestehend aus einem Autosampler (717plus), einer quaternären Pumpe (600 Controller) und einem Jasco UV/VIS-Detektor (UV 975) durchgeführt. Die Parameter der Methode sind in Tabelle 7-2 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Clarity Lite Software (DataApex).

Tabelle 7-2: Parameter der HPLC-UV/VIS-Methode zur Untersuchung der Reaktivität von Asaronepoxiden gegenüber Nukleosiden.

Säule	LiChrospher® 100 RP 18, 125 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)					
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP 18, 4 mm x 4 mm, 5 µm (Merck KGaA)					
Injektionsvolumen	5–20 µl (je nach Analyse)					
Flussrate	600 µl min ⁻¹					
Fließmittel A	0,1%ige wässrige Ameisensäure					
Fließmittel B	Methanol, HPLC _{grade}					
Detektionswellenlänge	275 nm					
Zeit [min]	0	5	15	35	36	40
Fließmittel A [%]	99	99	30	30	99	99
Fließmittel B [%]	1	1	70	70	1	1

7.2.2 Präparative HPLC

Zur präparativen Aufarbeitung der synthetisierten Addukte N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG wurde eine präparative HPLC der 1200er Serie (Agilent Technologies) bestehend aus zwei präparativen Pumpen (G1361A), einem Multiwellenlängendetektor (MWD) (G1315A) und einem automatischen Fraktionensammler (G1346B) verwendet. Die Injektion erfolgte über einen manuellen Injektor mit einer 10 ml Probenschleife. Für die beiden Addukte mussten unterschiedliche Gradienten verwendet werden, deren Parameter aus den Tabellen Tabelle 7-3, Tabelle 7-4 und Tabelle 7-5 entnommen werden können.

Tabelle 7-3: Parameter der präparativen HPLC-Methode zur Isolierung der Synthesegemische von N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG.

Säule	VDSpher PUR C18-SE, 250 mm x 20 mm, 5 μ m (VDS Optilab)
Injektionsvolumen	10 ml
Fließmittel A	H ₂ O _{dd}
Fließmittel B	Methanol, HPLC _{grade}
Fließmittel C	Acetonitril, HPLC _{grade}
Detektionswellenlänge	275 nm (360 nm)

Tabelle 7-4: Gradient der präparativen Aufarbeitung von N^2 -1'-OH-2H-A-dG.

Zeit [min]	0	2	40	41	43	44	51
Fließmittel A [%]	90	90	30	5	5	90	90
Fließmittel B [%]	10	10	70	95	95	10	10
Flussrate [ml min⁻¹]	1	15	15	15	15	15	15

Tabelle 7-5: Gradient der präparativen Aufarbeitung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA.

Zeit [min]	0	1	30	40	45	46	52
Fließmittel A [%]	85	85	85	60	60	85	85
Fließmittel C [%]	15	15	15	40	40	15	15
Flussrate [ml min⁻¹]	1	15	15	15	15	15	15

Es wurden Fraktionen über die Dauer von einer Minute über den Bereich, in welchem die Addukte eluierten gesammelt. Die Messungen und Auswertungen wurden mit der Software „Chemstation for LC-Systems“ (Agilent Technologies) durchgeführt.

7.2.3 Semi-präparative HPLC

Zur präparativen Aufarbeitung der isotopenmarkierten Addukte $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^6\text{-1'-OH-2H-A-dA}$ und $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^2\text{-1'-OH-2H-A-dG}$ wurde ebenfalls mit dem obengenannten Agilent 1200 System gearbeitet. Der manuelle Injektor wurde für diese Aufarbeitung mit einer Probenschleife mit einem Volumen von 2 ml ausgestattet. Für die beiden Addukte mussten unterschiedliche Gradienten verwendet werden, deren Parameter aus den Tabellen Tabelle 7-6, Tabelle 7-7 und Tabelle 7-8 entnommen werden können. Es wurden Fraktionen über die Dauer von einer Minute über den Bereich, in welchem die Addukte eluierten gesammelt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 275 nm und einer Referenzwellenlänge von 360 nm. Die Messungen und Auswertungen wurde mit der Software „Chemstation for LC-Systems“ (Agilent Technologies) durchgeführt.

Tabelle 7-6: Parameter der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^6\text{-1'-OH-2H-A-dA}$ und $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^2\text{-1'-OH-2H-A-dG}$.

Säule	ReproSil 100 C18, 250 mm x 10 mm, 5 μm (Dr. Maisch GmbH)
Injektionsvolumen	2 ml
Fließmittel A	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
Fließmittel B	Methanol, HPLC _{grade}
Fließmittel C	Acetonitril, HPLC _{grade}
Detektionswellenlänge	275 nm (360 nm)

Tabelle 7-7: Gradient der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^2\text{-1'-OH-2H-A-dG}$.

Zeit [min]	0,00	1,00	3,16	46,26	46,38	53,07	53,18	60,18
Fließmittel A [%]	95	95	95	30	5	5	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	5	70	95	95	5	5
Flussrate [ml min^{-1}]	1	5	5	5	5	5	5	5

Tabelle 7-8: Gradient der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}\text{N}_5]\text{N}^6\text{-1'-OH-2H-A-dA}$.

Zeit [min]	0,00	0,57	22,32	29,82	33,57	34,32	38,32
Fließmittel A [%]	85	85	85	60	60	85	85
Fließmittel C [%]	15	15	15	40	40	15	15
Flussrate [ml min^{-1}]	1	5	5	5	5	5	5

7.2.4 HPLC-ESI_{pos}-MS/MS

Mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS wurde der Gehalt an 2'-Desoxyguanosin in den DNA-Hydrolysaten bestimmt. Hierfür wurde eine bestehende HPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode weiterentwickelt und hinsichtlich Messdauer und Injektionsvolumen optimiert. Zur Messung der *in-vitro*-Studie (Kapitel 4.5) wurde ein HPLC-MS/MS-System bestehend aus einer Agilent 1100 HPLC-Anlage, ausgestattet mit einem Autosampler (G1313A), einer quaternären Pumpe (G1311A) und einem Säulenofen (G1316A), gekoppelt mit einem API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet. Die Trennung erfolgte über eine LiChrospher® 100 RP 18 Säule (Merck KGaA) mit einer Partikelgröße von 5 µm und in den Dimensionen 4,0 x 125 mm sowie die korrespondierende Vorsäule in den Dimensionen 4,0 x 4,0 mm. Die mobile Phase bestand aus 0,2%iger wässriger Ameisensäure (Fließmittel A) und Methanol (Fließmittel B). Die Messung erfolgte bei einer konstanten Säulenofentemperatur von 20 °C, einem Injektionsvolumen von 5 µl und einer Flussrate von 0,75 ml min⁻¹. Der Gradient verlief von den Startbedingungen, 10 % Fließmittel B, innerhalb von 6 min linear auf 80 % Fließmittel B, gefolgt 7 Minuten isokratisch bei 95 % Fließmittel B und einem 5-minütigen Äquilibrierungsschritt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach Elektronenspray-Ionisierung im positiven Modus im MRM-Modus. Zur Datenerfassung und -auswertung wurde die *Analyst Software, Version 1.6.2*, (AB Sciex) verwendet. Folgende gerätespezifischen Parameter wurden ausgewählt: *ion spray voltage* 4200 V; *ion source temperature* 400 °C; *curtain gas* 20 psi; *nebulizer gas* 30 psi, *heater gas* 35 psi, *collisionally activated dissociation gas* 2 psi. Die substanzspezifischen Parameter von 2'-Desoxyguanosin und [¹⁵N₅]2'-Desoxyguanosin sind Tabelle 7-9 zu entnehmen.

Tabelle 7-9: Substanzspezifische MS-Parameter der Quantifizierung von dG und [¹⁵N₅]dG in DNA-Hydrolysaten. API 2000 (Applied Biosystems).

	Q1	Q3	DP	FP	EP	CEP	CE	CXP
dG	268,175	151,9 [#]	6	350	4,5	12	15	18
	268,175	134,9	6	350	4,5	12	47	20
[¹⁵ N ₅]dG	273,083	157,3 [#]	26	370	4,0	20	17	4
	273,083	138,9	26	370	4,0	20	49	4

Q1, Quadrupol 1 [m/z]; Q3, Quadrupol 3 [m/z]; DP declustering potential [V]; FP focusing potential; EP, entrance potential [V]; CEP collision cell entrance potential [V]; CE collision energy [eV]; CXP cell exit potential [V]

[#] Übergang, welcher als Quantifier verwendet wurde.

7.2.5 UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS

Zur Detektion und Quantifizierung der DNA-Addukte in pRH wurde folgende UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS Methode entwickelt und etabliert. Dies erfolgt an einer UHPLC-MS-Anlage bestehend aus einem Agilent 1290 infinity UHPLC System, ausgestattet mit einer binären Pumpe (G4220A), einem Autosampler (G4226A) und einem Säulenofen (G1316C), gekoppelt mit einem QTrap 5500

Massenspektrometer (AB Sciex). In Tabelle 7-10 sind die UHPLC-Parameter der Methode aufgeführt.

Tabelle 7-10: UHPLC-Parameter der Quantifizierung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG in DNA-Hydrolysaten.

Säule	U-VDSpher PUR C18-E, 50 mm x 4 mm, 1,8 µm (VDS Optilab)							
Vorsäule	U-VDSpher PUR C18-E, 4 mm x 4 mm, 1,8 µm (VDS Optilab)							
Injektionsvolumen	5 µl							
Säuleofentemperatur	25 °C							
Flussrate	800 µl min ⁻¹							
Fließmittel A	0,1%ige wässrige Essigsäure, LC-MS _{grade}							
Fließmittel B	Methanol, LC-MS _{grade}							
Zeit [min]	0,00	1,00	1,20	3,50	3,51	5,00	5,01	7,00
Fließmittel A [%]	90	90	50	20	5	5	90	90
Fließmittel B [%]	10	10	50	80	95	95	10	10

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus im MRM-Modus. Zur Datenerfassung und -auswertung wurde die *Analyst Software, Version 1.6.1* (AB Sciex) verwendet. Folgende gerätespezifischen Parameter werden ausgewählt: *ion spray voltage* 5500 V; *ion source temperature* 500 °C; *curtain gas* 25 psi; *nebulizer gas* 65 psi, *heater gas* 60 psi, *collisionally acitvated dissociation gas* medium. Die substanzspezifischen Parameter von N^2 -1'-OH-2H-A-dG und N^6 -1'-OH-2H-A-dA sowie deren stabile-isotopenmarkierten Analoga sind aus Tabelle 7-11 zu entnehmen.

Tabelle 7-11: Substanzspezifische Parameter der Quantifizierung von N^2 -1'-OH-2H-A-dG, N^6 -1'-OH-2H-A-dA, [¹⁵N₅] N^2 -1'-OH-2H-A-dG und [¹⁵N₅] N^6 -1'-OH-2H-A-dA in DNA-Hydrolysaten.

	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
N^2 -1'-OH-2H-A-dG	492,142	225,000	76	10	27	18
	492,142	367,100 [#]	76	10	17	20
N^6 -1'-OH-2H-A-dA	476,083	225,000 [#]	101	10	25	18
	476,083	360,200	101	10	23	18
[¹⁵ N ₅] N^2 -1'-OH-2H-A-dG	497,091	225,100	36	10	27	18
	497,091	381,200 [#]	36	10	15	18
[¹⁵ N ₅] N^6 -1'-OH-2H-A-dA	481,075	365,200 [#]	116	10	23	18
	481,075	225,100	81	10	23	16

Q1, Quadrupol 1 [*m/z*]; Q3, Quadrupol 3 [*m/z*]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; CE *collision energy* [eV]; CXP *cell exit potential* [V]

[#] Übergang, welcher als Quantifier verwendet wurde.

Mit dieser Methode konnte ein LOD von 1 bzw. 2 Addukten pro 10⁸ Nucleosiden, welches einer Konzentration von 20 pM und 40 pM entspricht, für N^2 -1'-OH-2H-A-dG bzw. N^6 -1'-OH-2H-A-dA erreicht werden. Das LOQ lag bei 2 bzw. 11 Addukten pro 10⁸ Nucleosiden für das dG- bzw. das dA-Addukt, entsprechend einer Konzentration von 40 pM und 200 pM.

7.3 Primäre Rattenhepatozyten

Alle Arbeiten mit pRH erfolgten mit sterilen Materialien in einer Sicherheitswerkbank. Alle verwendeten Lösungen wurden in autoklavierten Flaschen oder steril bezogenen Verbrauchsmaterialien angesetzt und gegebenenfalls vor Gebrauch membranfiltriert.

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten, welche beim Versuch ein Körpergewicht (KG) zwischen 160 g und 240 g aufwiesen. Alle verwendeten Ratten stammten vom Züchter Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) und wurden von der Anlieferung bis zur Organentnahme im Tierhaus der Technischen Universität Kaiserslautern gehalten.

7.3.1 Kollagenaseperfusion, Kultivierung und Inkubation

Chemikalien und Lösungen

EGTA-Lösung (100 mM)	EGTA	3,80 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml; pH = 7
Heparin-Lösung	1000 U ml ⁻¹ in 0,9 % NaCl-Lösung	
HEPES-Lösung (1 M)	HEPES	23,83 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml; pH = 7,4
Kollagenase	100 CDU ml ⁻¹	Einwaage je nach Aktivität der Charge
Kulturmedium	DMEM low glucose mit Phenolrot	500 ml
	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
Pentobarbital-Lösung (ab Jan. 2015)	hergestellt nach Priest und Geisbuhler (2015)	
Pentobarbital-Lösung (vor Jan. 2015)	Pentobarbital	33 mg
	H ₂ O _{dd}	ad 1 ml
Percoll®-Lösung	Percoll®	27,8 ml
	Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)	4,2 ml
Perfusionspuffe II	DMEM low glucose mit Phenolrot	500 ml
	1 M HEPES-Lösung	5 ml
Perfusionspuffer I	Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	500 ml
	1 M HEPES-Lösung	5 ml
	100 mM EGTA-Lösung	500 µl
Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)	NaCl	81,82 g
	KCl	3,73 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,63 g
	Na ₂ HPO ₄	2,85 g
	KH ₂ PO ₄	0,544 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l; pH = 7,4
Rattenschwanzkollagen-Lösung	0,5 g l ⁻¹ in 0,1%iger wässriger Essigsäure	

Trypanblau	0,1%ige Fertiglösung	
	DMEM high glucose ohne Phenolrot mit HEPES	500 ml
Waschpuffer	BSA (30 %)	3,5 ml
	Pen/Strep	5,2 ml

Durchführung

Die zur Kultivierung verwendeten pRH wurden durch Kollagenaseperfusion der Leber einer männlichen Wistar-Ratte (160–240 g KG) gewonnen (modifiziert nach Seglen, 1976). Zu Beginn wurden die Perfusionspuffer, der Waschpuffer und das Kulturmedium im Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Das Tier wurde durch eine *i. p.*-Injektion mit Pentobarbital ($0,1 \mu\text{g (g KG)}^{-1}$) betäubt. Nach Sicherstellung einer tiefen Narkose mit chirurgischer Toleranz, welche durch Aussetzen des Schwanzwurzelreflexes bestätigt wurde, wurde das Abdomen so geöffnet, dass keine Organe beschädigt wurden und die Öffnung in Kopfrichtung nur bis kurz vor das Zwerchfell erfolgte. Zunächst wurden alle störenden Organe wie Magen, Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm vorsichtig auf die Seite bewegt, um eine freie Sicht auf die Leber und deren zu- und abführenden Blutgefäße zu erhalten. Nach Legen einer lockeren Ligatur um die Pfortader (*vena porta hepatica*) und die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) wurden unterhalb der Ligatur 0,1 ml der Heparin-Lösung in die Hohlvene injiziert, womit ein Gerinnen des Blutes während der Perfusion verhindert werden sollte. Im Anschluss wurde über eine Venenverweilkanüle (Braunüle, Vasofix), welche mit der zuvor gelegten Ligatur stabilisiert wurde, der Perfusionspuffer 1 mit einer Flussrate von $3,6 \text{ ml min}^{-1}$ über die Pfortader in die Leber geleitet. Die Hohlvene wurde unterhalb der Ligatur eröffnet und die Leber wurde bei einer Flussrate von 40 ml min^{-1} blutfrei gespült. Während des Spülens der Leber mit Perfusionspuffer 1 wurde das Zwerchfell eröffnet und eine weitere Ligatur um die Hohlvene zwischen Leber und Herz gelegt. Die untere Ligatur der Hohlvene wurde verschlossen und durch Eröffnen des rechten Atriums und Legen einer zweiten Venenverweilkanüle durch das Atrium in die Hohlvene, welche mit einem Rückflussschlauch verbunden war, wurde eine zirkulierende Perfusion erreicht. Dem Perfusionspuffer 2 wurde Kollagenase zugesetzt und zur zirkulierenden Perfusion der Leber eingesetzt. Dies erfolgte für 7–10 min bis eine netzartige Oberfläche der Leberlappen zu erkennen war. Die Leber wurde daraufhin vorsichtig freipräpariert, die Leberkapsel unter bestmöglich sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank über einem Nylonnetz ($250 \mu\text{m}$) geöffnet und die Leberzellen mit Waschpuffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers, hindurchgespült. Hierbei wurden Bindegewebe und Leberkapselbestandteile entfernt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig durch ein zweites Nylonnetz ($100 \mu\text{m}$) gespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde auf vier Zentrifugenröhrchen (50 ml) verteilt und mit Waschpuffer aufgefüllt. Das Abtrennen der toten Zellen aus der Zellsuspension erfolgte durch Sedimentation für 3 min bei 300 rpm und 25 °C. Bei der Aufarbeitung entstandene Zellfragmente sind leichter als intakte Hepatozyten und sedimentieren unter diesen Bedingungen nicht ins Pellet und konnten daher mit

dem Überstand entfernt werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet vorsichtig in frischem Waschpuffer (30 ml) gelöst und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde erneut in 30 ml Waschpuffer resuspendiert und bei 500 rpm für 3 min zentrifugiert. Nachdem die so gewonnenen Zellpellets in ein Zentrifugenröhrchen vereinigt wurden, erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll® bei 2100 rpm (Dalet, Fehlmann, und Debey, 1982). Hierbei erfolgte eine Trennung der lebenden Hepatozyten von Zellfragmenten und freien Enzymen, die später die Kultivierung beeinträchtigen könnten. Das Sediment der Percoll®-Zentrifugation wurde in 20 ml Waschpuffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert.

Die Gesamtzellzahl und die Vitalität wurde lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau bestimmt. Hierbei wurden nur die toten Zellen blau angefärbt, da hier der Farbstoff durch die beschädigte Zellmembran in die Zellen eindringen kann. Nach dem Auszählen ergab sich der Vitalitätsfaktor aus dem Quotienten zwischen Lebendzellzahl und Gesamtzellzahl. Durch Multiplikation der Gesamtzellzahl pro ml mit dem Vitalitätsfaktor wird die Anzahl vitaler Zellen pro ml erhalten.

Die so gewonnenen Zellen wurden im Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturschalen ausgesät. Die verwendeten 100-mm-Zellkulturschalen wurden zuvor mit Rattenschwanzkollagenlösung benetzt und über Nacht in der unter UV-Licht getrocknet. Pro Zellkulturschale wurden 7 Mio. Zellen in 7 ml Kulturmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % für 3–4 h anwachsen gelassen.

Nach einem Mediumwechsel erfolgte die Inkubation der pRH mit α - und β -Asaron in den Endkonzentrationen 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M. Weiter wurde eine Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) und eine Mediumkontrolle mitgeführt. Die Inkubationen erfolgten immer in Triplikaten und wurden für die Zeitpunkte 1 h, 6 h, 24 h und 48 h durchgeführt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturschalen auf Eis rasch mit eisgekühlter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und die Zellkulturschalen möglichst trocken und schnell bei –80 °C eingefroren und dort bis zur Aufarbeitung gelagert.

7.3.2 DNA-Isolierung

Chemikalien und Lösungen

TAE-Puffer	TRIS	4,844 g
	Na ₂ EDTA	186 mg
	Essigsäure p.a.	1,144 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
SDS-Lösung (10 %)	SDS-Lösung (20 %)	20 ml
	H ₂ O _{dd}	20 ml
Triton-X-100-Lösung (10 %)	Triton-X-100	2 ml
	H ₂ O _{dd}	18 ml
Lysepuffer	TAE-Puffer	400 ml
	SDS-Lösung (10 %)	40 ml
	Triton-X-100-Lösung (10 %)	20 ml
Extraktionslösung 1	Phenol	25 ml
	Chloroform	24 ml
	Isoamylalkohol	1 ml
Extraktionslösung 2	Chloroform	48 ml
	Isoamylalkohol	2 ml
Ethanol (99,8 %)		
Ethanol (70 %)	Ethanol (99,8 %)	70 ml
	H ₂ O _{dd}	30 ml
Isopropanol <i>p. a.</i>		
Natriumacetat-Lösung (3M)		
Proteinase-K-Lösung (10 mg ml ⁻¹)	Proteinase-K	
	H ₂ O _{dd}	
RNaseA-Lösung	RNaseA	
	H ₂ O _{dd}	

Durchführung

Zur Vorbereitung der DNA-Isolierung wurde ein Wasserbad auf 55 °C vorgewärmt und in die vorbereiteten 2 ml-Reaktionsgefäße wurde 15 µl Proteinase-K-Lösung vorgelegt. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gelagert und die Zellen mit 800 µl Lysepuffer und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst und in das 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 5 µl RNase A-Lösung und vorsichtigem Durchmischen wurde die Lösung für 2–4 h bei 55 °C im Wasserbad belassen, bis ein klares Lysat vorzufinden war. Das klare Lysat wurde auf RT abkühlen gelassen, mit 800 µl Extraktionslösung 1 versetzt und für 10 s gevortext. Der nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und RT resultierende wässrige Überstand wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, in welchem zuvor 5 µl RNase A-Lösung vorlegt wurden. Nach Inkubation für 20 min bei RT wurden 700 µl der Extraktionslösung 2 hinzugefügt und 10 s gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde der wässrige Überstand in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Zum Fällen der DNA wurden 1,2 ml –20 °C kaltes Ethanol (99,5 %) hinzugegeben. Das entstandene DNA-Pellet

wurde nach Zentrifugation (14000 rpm für 10 min bei 4 °C) vollständig vom Überstand befreit und in 250 µl autoklaviertem H₂O_{dd} gelöst. Wenn sich diese nicht bei RT lösten wurden die Proben auf 42 °C im Thermomix (600 rpm) erwärmt. Die so erhaltenen DNA-Lösungen wurden mit 25 µl Natriumacetatlösung (3 M) und 250 µl Isopropanol versetzt, um die DNA erneut auszufällen. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4 °C für 10 min wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT trocknen gelassen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 50 µl autoklaviertem H₂O_{dd} resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die DNA-Konzentration wurde im Anschluss spektrophotometrisch mit einem NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) bestimmt. Hierbei wurde über die Absorption bei 260 nm die Konzentration der DNA-Probe berechnet. Weiter gab das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm Aufschluss über die Reinheit der DNA. Im Allgemeinen wurde ein Wert von 1,8 für reine DNA angenommen. Alle Proben, die weiter zur Hydrolyse eingesetzt wurden, mussten einen 260/280-Verhältnis zwischen 1,75 und 1,84 aufweisen. War das nicht der Fall, wurde mit einer erneuten Isopropanol-Fällung eine Aufreinigung durchgeführt. Probe, die dadurch nicht eine 260/280-Verhältnis von 1,75–1,84 erreichten wurden verworfen. Weiter wurde der 260/230-Absorptionsquotient bestimmt, welcher Hinweise auf organische Verunreinigungen gibt. Er sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,2 aufweisen. Alle Proben mussten einen 260/230-Quotienten von 1,8–2,2 aufweisen, andernfalls wurden diese nicht zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzt.

7.3.3 Enzymatische Hydrolyse und Probenvorbereitung

Die enzymatische Hydrolyse der DNA-Proben erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Schumacher *et al.* (2013). Hierfür wurde aus den DNA-Proben 30 µg DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in welches die isotopenmarkierten Standards [¹⁵N₅]N²-1'-OH-2H-A-dG (50 fmol), [¹⁵N₅]N⁶-1'-OH-2H-A-dA (50 fmol) und [¹⁵N₅]dG (2 nmol) vorgelegt wurden. Die Differenz zu 135 µl wurde mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Im Anschluss wurden 39 µl Pufferlösung (100 mM Natriumsuccinat, 50 mM CaCl₂, pH 6,0) hinzugegeben und für 10 s durchmischt. Nach der Zugabe von 7,95 µl micrococcaler Nuklease (1 U/5 µl) und 12,6 µl Phosphodiesterase II (5 mU/µl) wurde der Ansatz leicht durchmischt und bei 37 °C für 18 h inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf RT wurde die Probe mit 93 µl TRIS-Puffer (0,5 M, pH 10,9) versetzt. Die Inkubation mit alkalischer Phosphatase (18 µl, 1 mU/µl) erfolgte unter den gleichen Bedingungen für weiter 24 h.

Nach abgeschlossener Hydrolyse wurde das Hydrolysat auf Eis mit 500 µl eisgekühltem Ethanol (99,5 %) versetzt, um Proteine zu fällen. Nach Zentrifugation (10 min, 22000 g, 4 °C) wurde der

Überstand vorsichtig in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und das Lösungsmittel mittels Vakuumzentrifuge (Concentrator Plus, Eppendorf) vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in 50 µl 75 % Methanol versetzt mit 0,1%iger wässriger Essigsäure aufgenommen und resuspendiert. Nach Zentrifugation (10 min, 22000 g, 4 °C) wurde der Überstand direkt zur Messung mittels UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS (vgl. Kapitel 7.2.5) eingesetzt. Der dG-Gehalt der Probe wurde anschließend mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS bestimmt (vgl. Kapitel 7.2.4).

War es aus organisatorischen Gründen nicht möglich die aufgearbeiteten Proben direkt zu vermessen, so wurden die trockenen Rückstände bei 4 °C gelagert und ebenfalls unmittelbar vor der Messung gelöst.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, W., Bialas, J., Hadjarapoglou, L. (1991). Kurzmitteilung / Short Communication A Convenient Preparation of Acetone Solutions of Dimethyldioxirane. *Chemische Berichte*, 124(10), 2377–2377. <https://doi.org/10.1002/cber.19911241036>
- Asha Devi, S., Babu, S., Premkumar, K. (2014). In vivo genotoxic studies of β -asarone in mice bone marrow. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(3), 128–132.
- Asha Devi, S., Mali, A. L., Rahee, M. A., Belinda, E. D. S. (2014). Antioxidant Properties of Alpha Asarone. *Asian Journal of Biochemistry*, 9(2), 107–113. <https://doi.org/10.3923/ajb.2014.107.113>
- Bagnyukova, T. V., Tryndyak, V. P., Montgomery, B., Churchwell, M. I., Karpf, A. R., James, S. R., Pogribny, I. P. (2008). Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis*, 29(3), 638–646. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm303>
- Berg, K., Bischoff, R., Stegmüller, S., Cartus, A., Schrenk, D. (2016). Comparative investigation of the mutagenicity of propenyl and allylic asarone isomers in the Ames fluctuation assay. *Mutagenesis*, 31(4). <https://doi.org/10.1093/mutage/gew007>
- Berg, Kerstin. (2016). *In vitro Untersuchungen zur Genotoxizität der Alkenylbenzene α -, β - und γ -Asaron sowie ausgewählter oxidativer Metaboliten*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
- Cartus, A. T. (2014). *Metabolismus der Phenylpropene Methyleugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie α -, β - und γ -Asaron*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
- Cartus, A. T., Herrmann, K., Weishaupt, L. W., Merz, K. H., Engst, W., Glatt, H., Schrenk, D. (2012). Metabolism of methyleugenol in liver microsomes and primary hepatocytes: Pattern of metabolites, cytotoxicity, and DNA-adduct formation. *Toxicological Sciences*, 129(1), 21–34. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs181>
- Cartus, A. T. und Schrenk, D. (2016). Metabolism of the carcinogen α -asarone in liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology*, 87, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.021>
- Cartus, A. T., Stegmüller, S., Simson, N., Wahl, A., Neef, S., Kelm, H., Schrenk, D. (2015). Hepatic Metabolism of Carcinogenic β -Asarone. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1760–1773. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00223>
- Cassani-Galindo, M., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro, G., Díaz, F., Tamariz, J., Espinosa-Aguirre, J. J. (2005). In vitro genotoxic evaluation of three α -asarone analogues. *Toxicology in Vitro*, 19(4), 547–552. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233305000263>
- Chamorro, G., Garduño, L., Martínez, E., Madrigal, E., Tamariz, J., Salazar, M. (1998). Dominant lethal study of α -asarone in male mice. *Toxicology Letters*, 99(2), 71–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817077>

- Chamorro, Germán, Salazar, M., Tamariz, J., Diaz, F., Labarrios, F. (1999). Dominant lethal study of alpha-asarone in male and female mice after sub-chronic treatment. *Phytotherapy Research*, 13(4), 308–311. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199906\)13:4<308::AID-PTR449>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<308::AID-PTR449>3.0.CO;2-X)
- Chellian, R., Pandey, V., Mohamed, Z. (2017). Pharmacology and toxicology of α - and β -Asarone: A review of preclinical evidence. *Phytomedicine*, 32, 41–58. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711317300533>
- Chen, Q.-X., Miao, J.-K., Li, C., Li, X.-W., Wu, X.-M., Zhang, X. (2013). Anticonvulsant Activity of Acute and Chronic Treatment with α -Asarone from *Acorus gramineus* in Seizure Models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(1), 23–30. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00376>
- Chen, Y., Wei, G., Nie, H., Lin, Y., Tian, H., Liu, Y., Chen, D. F. (2014). β -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in senescence-accelerated prone 8 mice. *Brain Research*, 1552, 41–54. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.01.005>
- COE. (2005). *Committee of Experts on Flavouring Substances of the Council of Europe (Europarat); „The 1st report on active principles (constituents of toxicological concern) contained in natural sources of flavouring“*
- Da Costa, G. G., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Von Tungeln, L. S., Beland, F. a., Marques, M. M., Doerge, D. R. (2003). DNA Adduct Formation from Acrylamide via Conversion To Glycidamide in Adult and Neonatal Mice. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1328–1337. <https://doi.org/10.1021/tx034108e>
- Dalet, C., Fehlmann, M., Debey, P. (1982). Use of Percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability. *Analytical Biochemistry*, 122(1), 119–123. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90259-7)
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 371–390. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>
- Doerge, D. R., Gamboa Da Costa, G., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Beland, F. A. (2005). DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1–2), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.10.013>
- Dong, H., Gao, Z., Rong, H., Jin, M., Zhang, X., Dong, H., ... Zhang, X. (2014). β -Asarone Reverses Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression-Like Behavior and Promotes Hippocampal Neurogenesis in Rats. *Molecules*, 19(5), 5634–5649. <https://doi.org/10.3390/molecules19055634>
- Enríques, R. G., Chávez, M. A., Jáuregui, F. (1980). Propenylbenzenes from *Guatteria gaumeri*. *Phytochemistry*, 19(9), 2024–2025. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)83029-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)83029-9)
- Fahrer, J., und Kaina, B. (2017). Chemische Kanzerogenese. In *Das Toxikologiebuch* (pp. 149–171). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527695447.ch7>
- Fang, Y. Q., Shi, C., Liu, L., Fang, R. M. (2012a). Analysis of transformation and excretion of β -asarone in rabbits with GC-MS. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 37(3), 187–190. <https://doi.org/10.1007/s13318-012-0083-z>
- Fang, Y. Q., Shi, C., Liu, L., Fang, R. M. (2012b). Pharmacokinetics of β -asarone in rabbit blood, hippocampus, cortex, brain stem, thalamus and cerebellum. *Pharmazie*, 67(2), 120–123. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1100>
- Farrell, R. E. (2010). *RNA Methodologies*. RNA Methodologies. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01850-9>

- Garduño-Siciliano, L., Labarrios, F., Tamariz, J., Moreno, M. G., Chamorro, G., Muriel, P. (2007). Effect of a-asarone and a derivative on lipids, bile flow and Na⁺/K⁺ -ATPase in ethinyl estradiol-induced cholestasis in the rat. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(1), 81–88. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00453.x>
- Geng, Y., Li, C., Liu, J., Xing, G., Zhou, L., Dong, M., ... Niu, Y. (2010). Beta-Asarone Improves Cognitive Function by Suppressing Neuronal Apoptosis in the Beta-Amyloid Hippocampus Injection Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 836–843. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.836>
- Göggelmann, W. und Schimmer, O. (1983, September). *Mutagenicity testing of β-asarone and commercial calamus drugs with Salmonella typhimurium*. *Mutation Research Letters*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(83\)90202-6](https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90202-6)
- Gross-Bellard, M., Oudet, P., Chambon, P. (1973). Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Cells. *European Journal of Biochemistry*, 36(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02881.x>
- Hansen, J. N. (1974). Preparative Biochemistry Isolation of Higher Molecular Weight DNA from Bacillus Cereus T Using Proteinase K ISOLATION OF HIGHER MOLECULAR WEIGHT DNA FROM BACILLUS CEREUS T USING PROTEINASE K. *PREPARATIVE BIOCHEMISTRY*, 4(6), 473–488. <https://doi.org/10.1080/00327487408061549>
- Hasheminejad, G. und Caldwell, J. (1994). Genotoxicity of the alkenylbenzenes α- and β-asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 32(3), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90194-5](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90194-5)
- Hauk, A. (2013). Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in Unserer Zeit*, 43(5), 278–278. <https://doi.org/10.1002/biuz.201390093>
- Hauptenthal, S., Berg, K., Gründken, M., Vallicotti, S., Hemgesberg, M., Sak, K., ... Esselen, M. (2017). In vitro genotoxicity of carcinogenic asarone isomers. *Food & Function*, 8(3), 1227–1234. <https://doi.org/10.1039/C6FO01701K>
- Herrmann, K., Engst, W., Appel, K. E., Monien, B. H., Glatt, H. (2012). Identification of human and murine sulfotransferases able to activate hydroxylated metabolites of methyleugenol to mutagens in Salmonella typhimurium and detection of associated DNA adducts using UPLC-MS/MS methods. *Mutagenesis*, 27(4), 453–462. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges004>
- Herrmann, K., Engst, W., Meinel, W., Florian, S., Cartus, A. T., Schrenk, D., ... Glatt, H. (2014). Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: Drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2. *Carcinogenesis*, 35(4), 935–941. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt408>
- Herrmann, K., Schumacher, F., Engst, W., Appel, K. E., Klein, K., Zanger, U. M., Glatt, H. (2013). Abundance of DNA adducts of methyleugenol, a rodent hepatocarcinogen, in human: Liver samples. *Carcinogenesis*, 34(5), 1025–1030. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt013>
- Hu, J., und Feng, X. (2000). Phenylpropanes from Acorus tatarinowii. *Planta Medica*, 66(7), 662–664. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8628>
- IARC. (1976). (*International Agency for Research on Cancer*), *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Safrole, isosafrole and dihydrosafrole*, 10, 231–244, Lyon, France,
- Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A. (2011). Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chemical Research in Toxicology*, 24(4), 532–541. <https://doi.org/10.1021/tx100410y>
- Jansohn, M. und Rothhämel, S. (Eds.). (2012). *Gentechnische Methoden. Gentechnische Methoden* (5. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3>

- JECFA. (1981). *Monograph on beta-asarone*. WHO Food Additives Series No. 16. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je04.htm>
- Kevekordes, S., Mersch-Sundermann, V., Burghaus, C. M., Spielberger, J., Schmeiser, H. H., Arlt, V. M., Dunkelberg, H. (1999). SOS induction of selected naturally occurring substances in *Escherichia coli* (SOS chromotest). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445(1), 81–91. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00141-2)
- Kim, S. G., Liem, A., Stewart, B. C., Miller, J. (1999). New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide. *Carcinogenesis*, 20(7), 1303–1307. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.7.1303>
- Koskinen, M., und Plná, K. (2000, December 15). Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00206-4)
- Lee, B., Sur, B., Cho, S.-G., Yeom, M., Shim, I., Lee, H., Hahm, D.-H. (2015). Effect of Beta-Asarone on Impairment of Spatial Working Memory and Apoptosis in the Hippocampus of Rats Exposed to Chronic Corticosterone Administration. *Biomolecules & Therapeutics*, 23(6), 571–581. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.027>
- Li, L., Yang, Y., Wu, M., Yu, Z., Wang, C., Dou, G., ... Xu, X. (2018). β -Asarone Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Human Glioma U251 Cells via Suppression of HnRNP A2/B1-Mediated Pathway In Vitro and In Vivo. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051072>
- Liu, L., Wang, J., Shi, L., Zhang, W., Du, X., Wang, Z., Zhang, Y. (2013). β -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression. *Phytomedicine*, 20(6), 512–520. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2012.12.008>
- Liu, S.-J., Yang, C., Zhang, Y., Su, R.-Y., Chen, J.-L., Jiao, M.-M., ... Wang, Q. (2016). Neuroprotective effect of β -asarone against Alzheimer's disease: regulation of synaptic plasticity by increased expression of SYP and GluR1. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1461–1469. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93559>
- Lohs, K., Elstner, P., Stephan, U. (1999). *Fachlexion Toxikologie* (4., Überar.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-27337-0>
- Lu, J., Fu, T., Qian, Y., Zhang, Q., Zhu, H., Pan, L., ... Zhang, M. (2014). Distribution of α -asarone in brain following three different routes of administration in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2014.06.006>
- Marczewska, J., Drozd, E., Anuszevska, E., Chilmonczyk, Z., Łozowicka, B. (2013). Assessment of the genotoxic activity of alpha-asarone and its derivatives in the comet assay. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(2), 349–354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614293>
- Marquardt, H. (2013). *Toxikologie* (3. Auflage). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Meng, X., Zhao, X., Wang, S., Jia, P., Bai, Y., Liao, S., Zheng, X. (2013). Simultaneous Determination of Volatile Constituents from *Acorus tatarinowii* Schott in Rat Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Selective Ion Monitoring and Application in Pharmacokinetic Study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 949830. <https://doi.org/10.1155/2013/949830>
- Miller, E. C., Swanson, A. B., Phillips, D. H., Fletcher, T. L., Liem, A., Miller, J. A. (1983). Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research*, 43(3), 1124–1134. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825084>
- Mohan, R. S., Gavardinas, K., Kyere, S., Whalen, D. L. (2000). Spontaneous hydrolysis reactions of cis- and trans- α -methyl-4-methoxystyrene oxides (anethole oxides): Buildup of trans-anethole oxide as an intermediate in the spontaneous reaction of cis-anethole oxide. *Journal of Organic Chemistry*, 65(5), 1407–1413. <https://doi.org/10.1021/jo991521b>

- Monien, B. H., Herrmann, K., Florian, S., Glatt, H. (2011). Metabolic activation of furfuryl alcohol: formation of 2-methylfuryl DNA adducts in *Salmonella typhimurium* strains expressing human sulfotransferase 1A1 and in FVB/N mice. *Carcinogenesis*, 32(10), 1533–1539. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr126>
- Morales-Ramírez, P., Madrigal-Bujaidar, E., Mercader-Martínez, J., Cassani, M., González, G., Chamorro-Cevallos, G., Salazar-Jacobo, M. (1992). Sister-chromatid exchange induction produced by in vivo and in vitro exposure to alpha-asarone. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 279(4), 269–273. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90243-S](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90243-S)
- Mukherjee, P. K., Rai, S., Kumar, V., Mukherjee, K., Hylands, P. J., Hider, R. C. (2007). Plants of Indian origin in drug discovery. *Section Title: Pharmaceuticals*, 2(5), 633–657. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.5.633>
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* (7., aktual). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>
- Nauwelaers, G., Bessette, E. E., Gu, D., Tang, Y., Rageul, J., Fessard, V., ... Turesky, R. J. (2011). DNA adduct formation of 4-aminobiphenyl and heterocyclic aromatic amines in human hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 24(6), 913–925. <https://doi.org/10.1021/tx200091y>
- Oprean, R., Tamas, M., Roman, L. (1998). Comparison of GC-MS and TLC techniques for asarone isomers determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(1–2), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00161-7)
- Pages, N., Maurois, P., Delplanque, B., Bac, P., Stables, J. P., Tamariz, J., ... Vamecq, J. (2010). Activities of α -asarone in various animal seizure models and in biochemical assays might be essentially accounted for by antioxidant properties. *Neuroscience Research*, 68(4), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.NEURES.2010.08.011>
- Pandit, S., Mukherjee, P. K., Ponnusankar, S., Venkatesh, M., Srikanth, N. (2011). Metabolism mediated interaction of α -asarone and *Acorus calamus* with CYP3A4 and CYP2D6. *Fitoterapia*, 82(3), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.009>
- Patel, D. N., Ho, H. K., Tan, L. L., Tan, M.-M. B., Zhang, Q., Low, M.-Y., ... Koh, H.-L. (2015). Hepatotoxic potential of asarones: in vitro evaluation of hepatotoxicity and quantitative determination in herbal products. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00025>
- Priest, S. M. und Geisbuhler, T. P. (2015). Journal of Pharmacological and Toxicological Methods Injectable sodium pentobarbital: Stability at room temperature. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 76, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.07.012>
- Purchase, R., Ford, G. P., Creasy, D. M., Brantom, P. G., Gangolli, S. D. (1992). A 28-day feeding study with methyl isoeugenol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 30(6), 475–481. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(92\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(92)90098-6)
- Rajput, S. B., Tonge, M. B., Karuppaiyil, S. M. (2014). An overview on traditional uses and pharmacological profile of *Acorus calamus* Linn. (Sweet flag) and other *Acorus* species. *Phytomedicine*, 21(3), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.PHYMED.2013.09.020>
- Ramos-Ocampo, V. R. und Hsia, M. T. S. (1988). Mutagenicity and DNA damaging activity of *calamus* oil, asarone isomers and dimethoxypropenylbenzene analogues in *Salmonella typhimurium* mutants and isolated rat hepatocytes. *The Philippine Entomologist*, 7(3), 275–291.
- Rana, T. S., Mahar, K. S., Pandey, M. M., Srivastava, S. K., Rawat, A. K. S. (2013). Molecular and chemical profiling of “sweet flag” (*Acorus calamus* L.) germplasm from India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0164-8>

- Rodríguez-Páez, L., Juárez-Sánchez, M., Antúnez-Solís, J., Baeza, I., Wong, C. (2003). Alpha-asarone inhibits HMG-CoA reductase, lowers serum LDL-cholesterol levels and reduces biliary CSI in hypercholesterolemic rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(5), 397–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834005>
- Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., Mendoza, T., Pages, N., Chamoro, G. (1992). Teratogenic action of alpha-asarone in the mouse. *Journal de Toxicologie Clinique et Experimentale*, 12(3), 149–154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1453351>
- Satyal, P., Paudel, P., Poudel, A., Dosoky, N. S., Moriarity, D. M., Vogler, B., Setzer, W. N. (2013). Chemical compositions, phytotoxicity, and biological activities of *Acorus calamus* essential oils from Nepal. *Natural Product Communications*, 8(8), 1179–1181. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079199>
- Schrader, W. und Linscheid, M. (1997). Styrene oxide DNA adducts: In vitro reaction and sensitive detection of modified oligonucleotides using capillary zone electrophoresis interfaced to electrospray mass spectrometry. *Archives of Toxicology*, 71(9), 588–595. <https://doi.org/10.1007/s002040050431>
- Schumacher, F., Herrmann, K., Florian, S., Engst, W., Glatt, H. (2013). Optimized enzymatic hydrolysis of DNA for LC-MS/MS analyses of adducts of 1-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate and methyleugenol. *Analytical Biochemistry*, 434(1), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.001>
- Segerbäck, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G., Faustman, E. M. (1995). Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [14 C]acrylamide. *Carcinogenesis* (Vol. 16). Retrieved from <https://academic.oup.com/carcin/article-abstract/16/5/1161/305154>
- Seglen, P. O. (1976). Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells. *Methods in Cell Biology*, 13, 29–85. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61797-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61797-5)
- Shin, J.-W., Cheong, Y.-J., Koo, Y.-M., Kim, S., Noh, C.-K., Son, Y.-H., ... Sohn, N.-W. (2014). α -Asarone Ameliorates Memory Deficit in Lipopolysaccharide-Treated Mice via Suppression of Pro-Inflammatory Cytokines and Microglial Activation. *Biomolecules & Therapeutics*, 22(1), 17–26. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.102>
- Stephen Hsia, M. T., Adamovics, J. A., Kreamer, B. L. (1979). Microbial mutagenicity studies of insect growth regulators and other potential insecticidal compounds in *Salmonellatyphimurium*. *Chemosphere*, 8(8), 521–529. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(79\)90099-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(79)90099-7)
- Strauss, W. M. (1993). Preparation of Genomic <scp>DNA</scp> from Mammalian Tissue. *Current Protocols in Immunology*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1002s08>
- Unger, P. und Melzig, M. (2012). Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of alpha- and Beta-asarone. *Scientia Pharmaceutica*, 80(3), 663–668. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1204-21>
- Vodička, P., Tvrdik, T., Osterman-Golkar, S., Vodičková, L., Peterková, K., Souček, P., ... Hemminki, K. (1999). An evaluation of styrene genotoxicity using several biomarkers in a 3- year follow-up study of hand-lamination workers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445(2), 205–224. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00127-8)
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Vohr, H.-W. (2010). *Toxikologie. Band 1, Grundlagen der Toxikologie*. (H.-W. Vohr, Ed.). Wiley-VCH.
- Williams, G. M., Duan, J.-D., Iatropoulos, M. J., Perrone, C. E. (2016). Sex differences in DNA damage produced by the carcinogen 2-acetylaminofluorene in cultured human hepatocytes compared to rat liver and cultured rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 90(2), 427–432. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1415-3>

- Wiseman, R. W., Miller, E. C., Miller, J. a, Male, P., Hej, C. B. L. C. H., Liem, A. (1987). *Structure-Activity Studies of the Hepatocarcinogenicities of Alkenylbenzene Derivatives Related to Estragole and Safrole on Administration to Preweanling Male C57BL / 6J × C3H / HeJ F 1 Mice Structure-Activity Studies of the Hepatocarcinogenicities of Alk.*
- Wu, J., Zhang, X.-X., Sun, Q.-M., Chen, M., Liu, S.-L., Zhang, X., ... Zou, X. (2015). β -asarone inhibits gastric cancer cell proliferation. *Oncology Reports*, 34(6), 3043–3050. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4316>
- Yabiku, H. K. (1980). *Calamus oil - Toxicological aspects and their control in alcoholic beverages*. Sao Paulo, Brazil.
- Yang, Q.-Q., Xue, W.-Z., Zou, R.-X., Xu, Y., Du, Y., Wang, S., ... Chen, X.-T. (2016). β -Asarone Rescues Pb-Induced Impairments of Spatial Memory and Synaptogenesis in Rats. *PloS One*, 11(12), e0167401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167401>
- Yang, Q., Deng, Z., Zhang, F., Sun, P., Li, J., Zheng, W. (2018). Development of an LC-MS/MS method for quantification of two isomeric phenylpropenes and the application to pharmacokinetic studies in rats. *Biomedical Chromatography*, 32(3), e4115. <https://doi.org/10.1002/bmc.4115>
- Zhang, S., Gui, X.-H., Huang, L.-P., Deng, M.-Z., Fang, R.-M., Ke, X.-H., ... Fang, Y.-Q. (2016). Neuroprotective Effects of β -Asarone Against 6-Hydroxy Dopamine-Induced Parkinsonism via JNK/Bcl-2/Beclin-1 Pathway. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8950-z>
- Zuba, D. und Byrska, B. Alpha- and beta-asarone in herbal medicinal products. A case study, 223 *Forensic Science International §* (2012). Elsevier. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073812003787>

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 2-1:** Diversifizierung von Phenylpropanoiden basierend auf dem allgemeinen Phenylpropanoid-Weg. Die Metaboliten des Shikimatwegs und der zentrale Metabolit *p*-Cumaryl-CoA sind hervorgehoben. PEP: Phosphoenolpyruvat, PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (modifiziert nach *Vogt, 2010*)..... 5
- Abbildung 2-2:** Strukturen der Phenylpropan-Grundstruktur (links), von Sinapinsäure (mitte) und Coniferylalkohol (rechts)..... 6
- Abbildung 2-3:** Strukturen der bekanntesten Vertreter der Phenylpropene. Allylische Phenylpropene in blau, 1-propenylische Phenylpropene in schwarz..... 7
- Abbildung 2-4:** Metabolische Aktivierung von allylischen Phenylpropenen am Beispiel von Methyleugenol. CYP: Cytochrom P 450 Enzyme, SULT: Sulfotransferase..... 7
- Abbildung 2-5:** Strukturformeln von α -Asaron (links), β -Asaron (mitte) und γ -Asaron (rechts)..... 10
- Abbildung 2-6:** Mikrosomaler Metabolismus von α -Asaron modifiziert nach Cartus und Schrenk 2016..... 15
- Abbildung 2-7:** Konzentration der Metaboliten in Inkubationen verschiedener SupersomesTM (jeweils 120 nM) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von 200 μ M α -Asaron (1 % Acetonitril). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen SupersomesTM-Charge. α A: α -Asaron, (E)-3'-OH-A: (E)-3'-Hydroxyasaron, (E)-3'-Oxo-A: (E)-3'-Oxoasaron, Dirole: Summe aus *erythro*- und *threo*-Asarondioldiol, Epoxide: Summe der Asaronepoxide, Demethyl-A: Summe der demethylierten Asaronmetaboliten (aus Cartus, 2014). 17
- Abbildung 2-8:** Mikrosomaler Metabolismus von β -Asaron, modifiziert nach Cartus *et al.* (2015). 18
- Abbildung 2-9:** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener SupersomesTM (jeweils 120 nM) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von 200 μ M β -Asaron (1 % Acetonitril). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen SupersomesTM-Charge β A: β -Asaron, Seitenkettenalkohole: Summe aus 1'-Hydroxyasaron, (E)-3'-Hydroxyasaron und (Z)-3'-Hydroxyasaron, 3'-Oxo-A: 3'-Oxoasaron, Dirole: Summe aus *erythro*- und *threo*-Asarondioldiol, Epoxide: Summe der Asaronepoxide, Demethyl-A: Summe der demethylierten Asaronmetaboliten (aus Cartus, 2014)..... 19
- Abbildung 4-1:** ¹H-NMR-Spektrum von α -Asaronepoxid in CDCl₃. ¹H-NMR (400 Hz, CDCl₃) δ [ppm]: 1,43 (3H, d, ³J = 5,15 Hz, CH₃), 2,92 (1H, dq, ³J = 2,14 Hz, 5,14 Hz, H²), 3,79 (3H, s, OCH₃), 3,82 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,88 (1H, d, ³J = 2,11 Hz, H¹), 6,49 (1H, s, H³), 6,63 (1H, s, H⁶)..... 33
- Abbildung 4-2:** ¹H-NMR-Spektrum von β -Asaronepoxid in CDCl₃. ¹H-NMR (400 Hz, CDCl₃) δ [ppm]: 1,05 (3H, d, ³J = 5,36 Hz, CH₃), 3,34 (1H, m, H²), 3,81 (3H, s, OCH₃), 3,82 (3H, s, OCH₃), 3,88 (3H, s, OCH₃), 4,12 (1H, d, ³J = 4,20 Hz, H¹), 6,51 (1H, s, H³), 6,77 (1H, s, H⁶)..... 34

Abbildung 4-3:	Überlagerte $^1\text{H-NMR}$ von β -Asaron (schwarz) und β -Asaronepoxid (rot) aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$.	35
Abbildung 4-4:	Überlagerte $^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid (rot) und β -Asaronepoxid (schwarz) aufgenommen in CDCl_3 400 MHz.	37
Abbildung 4-5:	$^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl_3 , $t = 0$ h (rot) und $t = 123$ h (schwarz)...	39
Abbildung 4-6:	$^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid aufgenommen in Acetonitril- d_3 $t = 0$ h oben und $t = 123$ h unten.	40
Abbildung 4-7:	$^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$; Überlagerte Signale der Messung bei $t = 0$ h (rot) und $t = 123$ h (schwarz).	41
Abbildung 4-8:	$^1\text{H-NMR}$ von α -Asaronepoxid aufgenommen in 50 μl Acetonitril und 550 μl D_2O . Messung direkt nach der Zugabe von D_2O .	42
Abbildung 4-9:	Hydrolyse von α -Asaronepoxid im wässrigen Milieu.	42
Abbildung 4-10:	$^1\text{H-NMR}$ der Halbwertszeit Messungen von α -Asaronepoxid in 50 μl Acetonitril und 550 μl D_2O nach 0 h (rot) und nach 61 h (schwarz).	43
Abbildung 4-11:	$^1\text{H-NMR}$ von β -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl_3 ; Überlagerte Signale der Messung bei $t = 0$ h (rot) und $t = 123$ h (schwarz).	44
Abbildung 4-12:	$^1\text{H-NMR}$ von β -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$. Überlagerte Signale der Messung bei $t = 0$ h (rot) und $t = 123$ h (schwarz).	44
Abbildung 4-13:	$^1\text{H-NMR}$ von β -Asaronepoxid aufgenommen in Acetonitril- d_3 $t = 0$ h oben und $t = 123$ h unten.	45
Abbildung 4-14:	Strukturformeln der DNA-Basen 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxythymidin (von links nach rechts).	46
Abbildung 4-15:	HPLC-UV/VIS-Chromatogramm einer 2 mM β -Asaronepoxid-Lösung in DMSO bei einer Wellenlänge von 275 nm. Mit 1: <i>threo</i> -Asarondiol bei $t_R = 21,1$ min, 2: <i>erythro</i> -Asarondiol bei $t_R = 21,8$ min und 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone bei $t_R = 23,4$ min.	47
Abbildung 4-16:	Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM α -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyadenosin in Dimethylsulfoxid (rot), Methanol : 0,1%ige Ameisensäure (50:50) (schwarz) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: <i>threo</i> -Asarondiol, 2: <i>erythro</i> -Asarondiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 4: 2'-Desoxyadenosin, 5: Reaktionsprodukt.	48
Abbildung 4-17:	Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM β -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyadenosin in DMSO (schwarz), Methanol:0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: <i>threo</i> -Asarondiol, 2: <i>erythro</i> -Asarondiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 4: 2'-Desoxyadenosin, 5: Reaktionsprodukt.	48
Abbildung 4-18:	HPLC-ESI _{pos} -MS-Chromatogramm des Reaktionsansatzes von α -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer. HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: <i>Extracted ion chromatogram</i> (XIC) der Q1 Massen 476,0–476,2 amu. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,951–16,094 min.	49
Abbildung 4-19:	Strukturformeln der hypothetischen Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin. A: <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin, B: <i>N</i> 1-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin und C: <i>N</i> 3-1'-Hydroxy-dihydroasarone-2'-desoxyadenosin.	50

- Abbildung 4-20:** $^1\text{H-NMR}$ von des Produktes der Reaktion von 2'-Desoxyadenosin mit β -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ST-144) δ [ppm]: 1,03 (d, $J = 6,31$ Hz, 3H, CH_3); 2,25 (m, 1 H, H^1); 2,71 (m, 1 H, H^2); 3,62 (s, 3 H, OCH_3); 3,75 (s, 3 H, OCH_3); 3,84 (s, 3 H, OCH_3); 3,87 (m, 1 H, H^3 oder 4); 3,96 (m, 1 H, H^5); 4,40 (m, 1 H, H^6); 6,34 (t, $J = 6,93$ Hz, 1 H, H^7); 6,67 (s, 1 H, H^8); 7,00 (s, 1 H, H^9); 8,15 (s, 1 H, H^{10}); 8,37 (s, 1 H, H^{11}). 52
- Abbildung 4-21:** $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}^2$ -Spektrum von N^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin, ESI-MS/MS -System: Qtrap 5500 (AB Sciex), MS/MS -Parameter gemäß UHPLC-ESI-MS/MS-Methode (vgl. Kapitel 7.2.5), Scanrate: 200 Da/s, MCA 150 Scans, Flussrate: $10 \mu\text{l min}^{-1}$ (Spritzenpumpe), m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis..... 53
- Abbildung 4-22:** Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM α -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyguanosin in DMSO (schwarz), Methanol:0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 6: 2'-Desoxyguanosin, 7: Reaktionsprodukt 54
- Abbildung 4-23:** Überlagerung der HPLC-UV/VIS-Chromatogramme bei 275 nm der Reaktionsansätze von 20 mM β -Asaronepoxid mit 10 mM 2'-Desoxyguanosin in DMSO (schwarz), Methanol : 0,1%ige Ameisensäure (50:50) (rot) und 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (blau). 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 6: 2'-Desoxyguanosin, 7: Reaktionsprodukt 55
- Abbildung 4-24:** HPLC- $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}$ -Scan des Reaktionsansatzes von α -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: *Extracted ion chromatogram* (XIC) der Q1 Massen 492,0–492,2 amu. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,226–15,529 min..... 55
- Abbildung 4-25:** Strukturformeln der hypothetischen Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxyguanosin. A: N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin; B: O^6 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin, C: N^7 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und D: N^7 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-guanin..... 56
- Abbildung 4-26:** $^1\text{H-NMR}$ von der Produktfraktion der Reaktion von 2'-Desoxyguanosin mit β -Asaronepoxid aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ST-141) δ [ppm]: 1,08 (d, 3 H, CH_3); 2,11 (m, 1 H, H^1); 2,62 (m, 1 H, H^2); 3,48 (m, 1 H, H^3); 3,53 (m, 1 H, H^4); 3,66 (s, 3 H, OCH_3); 3,76 (s, 3 H, OCH_3); 3,77 (m, 1 H, OH^5); 3,84 (s, 3 H, OCH_3); 3,87 (m, 1 H, H^6); 4,32 (d, 1 H, H^7); 5,07 (m, 1 H, H^8); 6,06 (m, 1 H, H^9); 6,68 (s, 1 H, H^{10}); 6,80 (s, 1 H, H^{11}); 7,86 (s, 1 H, H^{12}); 10,57 (m, 1 H, H^{13}). 58
- Abbildung 4-27:** $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}^2$ -Spektrum von N^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin, ESI-MS/MS -System: Qtrap 5500 (AB Sciex), MS/MS -Parameter gemäß UHPLC-ESI-MS/MS-Methode (vgl. Kapitel 7.2.5), Scanrate: 200 Da/s, MCA 200 Scans, Flussrate: $10 \mu\text{l min}^{-1}$ (Spritzenpumpe), m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis 59
- Abbildung 4-28:** HPLC-UV/VIS-Chromatogramme der Reaktionen von 2'-Desoxycytidin mit α -Asaronepoxid (links) und β -Asaronepoxid (rechts) in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer bei einer Wellenlänge von 275 nm. 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylacetone, 8: 2'-Desoxycytidin und 10: Reaktionsprodukt. 60
- Abbildung 4-29:** Hypothetische Addukte von Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin. A: N^4 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin, B: O^2 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin und C: N^3 -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxycytidin..... 61
- Abbildung 4-30:** HPLC- $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{-MS}$ -Spektrum des Reaktionsansatzes von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxycytidin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies)

und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: Extrahiertes Massenspektrum von 15,285–15,647 min. C: Extrahiertes Massenspektrum von 17,172–17,719 min. 61

Abbildung 4-31: HPLC-UV/VIS-Chromatogramme des Reaktionsansatzes von 2'-Desoxythymidin mit α -Asaronepoxid (links) und mit β -Asaronepoxid (rechts) in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer bei einer Wellenlänge von 275 nm. 1: *threo*-Asarondioldiol, 2: *erythro*-Asarondioldiol, 3: 2,4,5-Trimethoxyphenylaceton, 9: 2'-Desoxythymidin und 11 und 12: Reaktionsprodukte. 62

Abbildung 4-32: Hypothetisches Addukt von Asaronepoxid mit 2'-Desoxythymidin. N³-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxythymidin. 62

Abbildung 4-33: HPLC-ESI_{pos}-MS-Spektrum des Reaktionsansatzes von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxythymidin in 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, HPLC-MS-System: 1100 Series (Agilent Technologies) und API 2000 (Applied Biosystems). A: UV/VIS-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 275 nm. B: Extrahiertes Massenspektrum von 17,256–17,500 min. C: Extrahiertes Massenspektrum von 15,243–15,403 min. 63

Abbildung 4-34: Reaktionsmechanismen der Reaktionen von A: Asarondioldiol mit Asaronepoxid im Basischen, B: Asaronepoxid mit Asaronepoxid im Basischen und C: Asaronketon mit Asaronepoxid im Basischen. 65

Abbildung 4-35: Postulierte Reaktionsmechanismen der Bildung der Hauptprodukte für die Reaktionen von β -Asaronepoxid mit 2'-Desoxyadenosin (oben) und 2'-Desoxyguanosin (unten) unter schwach basischen Bedingungen. 66

Abbildung 4-36: DNA-Adduktbildungsrate von N²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin in primären Rattenhepatozyten nach 24stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 1$). HPLC-ESI-MS/MS-System: 1200 Series (Agilent Technologies), API 3200 (Applied Biosystems). LOQ: *limit of quantification*, Bestimmungsgrenze. 72

Abbildung 4-37: UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Messung) eines Standards aus N²-1'-OH-2H-A-dG, N⁶-1'-OH-2H-A-dA, [⁵N₁₅]N²-1'-OH-2H-A-dG und [⁵N₁₅]N⁶-1'-OH-2H-A-dA, jeweils 1 nM gemessen mit der optimierten UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (Kapitel 7.2.5). 74

Abbildung 4-38: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (N²-1'-OH-2H-A-dG) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 0,67294 x$, Bestimmtheitsmaß: 1,00. 77

Abbildung 4-39: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (N⁶-1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 1,21227 x$. Bestimmtheitsmaß: 1,00. 78

Abbildung 4-40: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Messung) eines dG-Standards (25 μ M) mit [⁵N₁₅]dG (20 μ M), gemessen mit der optimierten HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (Kapitel 7.2.4). 80

Abbildung 4-41: Kalibriergerade zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten. Geradengleichung: $y = 2,51631 x$, Bestimmtheitsmaß: 1,00. 81

Abbildung 4-42: Adduktbildungsraten von N²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die angegebenen Signifikanzen wurde mittels einseitigem Students *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). 82

Abbildung 4-43: Adduktbildungsraten von N²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und N⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die angegebenen Signifikanzen wurde mittels einseitigem Students *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). 83

- Abbildung 4-44:** Gegenüberstellung der Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 24-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit..83
- Abbildung 4-45:** Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 1-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$) mit der Ausnahme α -Asaron 200 μ M ($n = 2$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, bzw. mit Range (für α -Asaron 200 μ M). Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μ M auf DMSO und wurden mittels Students *t*-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant). 84
- Abbildung 4-46:** Gegenüberstellung der Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 1-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$) mit der Ausnahme α -Asaron 200 μ M ($n = 2$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit..... 85
- Abbildung 4-47:** Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 6-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μ M auf DMSO und wurden mittels Students *t*-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant). 85
- Abbildung 4-48:** Gegenüberstellung der Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 6-stündiger Inkubation mit α - und β -Asaron ($n = 3$). Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung für eine bessere Übersichtlichkeit..86
- Abbildung 4-49:** Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin und *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in pRH nach 48-stündiger Inkubation mit α -Asaron und β -Asaron ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils nächstkleinere Konzentration, bei 10 μ M auf DMSO und wurden mittels Students *t*-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant). 87
- Abbildung 4-50:** Kinetik der Adduktbildungsrate von *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$, bzw. $n = 2$ für 1 h 200 μ M)..... 88
- Abbildung 4-51:** Kinetik der Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit α -Asaron ($n = 3$, bzw. $n = 2$ für 1 h 200 μ M)..... 88
- Abbildung 4-52:** Kinetik der Adduktbildungsrate von *N*⁶-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$)..... 89
- Abbildung 4-53: Kinetik der Adduktbildungsrate von *N*²-1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanin in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit β -Asaron ($n = 3$)..... 89
- Abbildung 7-1:** ¹H-NMR-Spektrum von α -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl₃. 103
- Abbildung 7-2:** ¹H-NMR-Spektrum von β -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl₃..... 105

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1:	Zusammenstellung der EC ₅₀ -Werte des zytotoxischen Effektes von α - und β -Asaron in verschiedenen Zellsystemen sowie die untersuchte Behandlungsdauer und der verwendete Assay.....	21
Tabelle 4-1:	Vergleich der ¹ H-NMR-Daten von α -Asaronepoxid mit Kim <i>et al.</i> (1999). Aufgenommen in CDCl ₃	33
Tabelle 4-2:	Gegenüberstellung der Auswertung der ¹ H-NMR-Spektren von β -Asaron und β -Asaronepoxid aufgenommen in DMSO- <i>d</i> ₆	36
Tabelle 4-3:	Gegenüberstellung der Auswertung der ¹ H-NMR-Spektren von α -Asaronepoxid und β -Asaronepoxid aufgenommen in CDCl ₃	37
Tabelle 4-4:	HPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung der DNA-Addukte in DNA-Hydrolysaten (System: 1200 Series, Agilent Technologies).....	72
Tabelle 4-5:	UHPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG) und <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. System: Series 1290 infinity (Agilent Technologies).....	73
Tabelle 4-6:	ESI _{pos} -MS/MS-Parameter der Methode zur Quantifizierung von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG) und <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten. MS-System: Qtrap 5500 (AB Sciex).	74
Tabelle 4-7:	Pipettierschema zur Herstellung der Zwischenverdünnungen der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in DNA-Hydrolysaten.	75
Tabelle 4-8:	Pipettierschema zur Herstellung der Messlösungen der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin und <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin in DNA-Hydrolysaten.	75
Tabelle 4-9:	Messwerte zur Kalibriergeraden zur Quantifizierung von <i>N</i> ² -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyguanosin (<i>N</i> ² -1'-OH-2H-A-dG) in DNA-Hydrolysaten.....	76
Tabelle 4-10:	Messwerte zur Kalibriergeraden zur Quantifizierung von <i>N</i> ⁶ -1'-Hydroxy-dihydroasaron-2'-desoxyadenosin (<i>N</i> ⁶ -1'-OH-2H-A-dA) in DNA-Hydrolysaten.....	78
Tabelle 4-11:	HPLC-Parameter der Methode zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten (System: 1100 Series, Agilent Technologies).....	79
Tabelle 4-12:	ESI _{pos} -MS/MS-Parameter der Methode zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten (MS-System: API 2000, Applied Biosystems).....	80
Tabelle 4-13:	Messwerte der Kalibriergeraden zur Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin (dG) in DNA-Hydrolysaten.	81
Tabelle 6-1:	Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern/Lieferanten.....	95
Tabelle 6-2:	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern/Lieferanten.....	97

Tabelle 6-3:	Lister der verwendeten Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten.....	97
Tabelle 7-1:	Zuordnung der Verbindungen, welche in der Arbeit synthetisiert wurden, bzw. deren Vorstufen und Metaboliten der Reaktivitätsstudien zu Struktur, Trivialname, Abkürzung und IUPAC-Namen.....	99
Tabelle 7-2:	Parameter der HPLC-UV/VIS-Methode zur Untersuchung der Reaktivität von Asaronepoxiden gegenüber Nucleosiden.....	110
Tabelle 7-3:	Parameter der präparativen HPLC-Methode zur Isolierung der Synthesegemische von N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG.....	111
Tabelle 7-4:	Gradient der präparativen Aufarbeitung von N^2 -1'-OH-2H-A-dG.....	111
Tabelle 7-5:	Gradient der präparativen Aufarbeitung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA.....	111
Tabelle 7-6:	Parameter der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}N_5]N^6$ -1'-OH-2H-A-dA und $[^{15}N_5]N^2$ -1'-OH-2H-A-dG.....	112
Tabelle 7-7:	Gradient der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}N_5]N^2$ -1'-OH-2H-A-dG.....	112
Tabelle 7-8:	Gradient der semi-präparativen Aufarbeitung von $[^{15}N_5]N^6$ -1'-OH-2H-A-dA.....	112
Tabelle 7-9:	Substanzspezifische MS-Parameter der Quantifizierung von dG und $[^{15}N_5]dG$ in DNA-Hydrolysaten. API 2000 (Applied Biosystems).....	113
Tabelle 7-10:	UHPLC-Parameter der Quantifizierung von N^6 -1'-OH-2H-A-dA und N^2 -1'-OH-2H-A-dG in DNA-Hydrolysaten.....	114
Tabelle 7-11:	Substanzspezifische Parameter der Quantifizierung von N^2 -1'-OH-2H-A-dG, N^6 -1'-OH-2H-A-dA, $[^{15}N_5]N^2$ -1'-OH-2H-A-dG und $[^{15}N_5]N^6$ -1'-OH-2H-A-dA in DNA-Hydrolysaten.....	114

Anhang

Zur Ressourceneinsparung befinden sich alle aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren, Chromatogramme und MS-Spektren im digitalen Anhang auf beiliegender Daten CD. Weiter befinden sich dort alle Rohdaten und alle Berechnungen der *in-vitro*-Studie.

Genehmigungen

Abbildung 2-1 wiedergegeben (modifiziert) aus „Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>“, Copyright (2010) mit Genehmigung von Elsevier.

Abbildung 2-6 wiedergegeben (modifiziert) aus „Cartus, A. T. und Schrenk, D. (2016). Metabolism of the carcinogen alpha-asarone in liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology*, 87, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.021>“ Copyright (2016) mit Genehmigung von Elsevier.

Abbildung 2-8 wiedergegeben (modifiziert) mit Genehmigung aus „Cartus, A. T., Stegmüller, S., Simson, N., Wahl, A., Neef, S., Kelm, H., & Schrenk, D. (2015). Hepatic Metabolism of Carcinogenic β -Asarone. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1760 – 1773. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00223>“. Copyright (2015) American Chemical Society.

Abbildungen 2-7 und 2-9 abgedruckt aus „Cartus, A. T. (2014). Metabolismus der Phenylpropene Methyleugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron. Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie“ mit freundlicher Genehmigung von Jun.-Prof. Dr. Alexander Cartus.

Lebenslauf

Simone Stegmüller

BERUFLICHER WERDEGANG

- seit Okt. 2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Chemie Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Richling
- Jan. 2017–Sept. 2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Chemie Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
- Jan. 2014–Jan. 2017 Promotionsstudium am Fachbereich Chemie Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk in der mit dem Thema „Bildung von DNA-Addukten durch α - und β -Asaron in primären Rattenhepatozyten“
- Apr. 2013–Dez. 2013 Volontariat in der Abteilung „Non-Clinical Drug Savety Germany“ Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Standort Biberach an der Riss

AUSBILDUNG

- Okt. 2008–März 2013 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abschluss: Diplom in Lebensmittelchemie und erste Staatprüfung in Lebensmittelchemie
- Okt. 2012–März 2013 Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk mit dem Thema „Synthese von DNA-Addukten ausgewählter Phenylpropanoid-Metaboliten“
- Jan. 2012–Apr. 2012 Forschungsarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk mit dem Thema „Zytotoxizität von Asaronen und Asaronmetaboliten in primären Rattenhepatozyten“
- Sept. 2005–März 2008 Leininger Gymnasium Grünstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

- Nov. 2000–Mai 2005 Carl-Orff-Realschule Bad Dürkheim
Abschluss: Mittlere Reife (Jahrgangsbeste)
- Aug. 1999–Nov. 2000 Integrierte Haupt- und Realschule Wachenheim/ Deidesheim
- Aug. 1995–Juli 1999 Pestalozzi Grundschule Bad Dürkheim

WEITERBILDUNGEN

Seit 2014 Teilnahme am Weiterbildungsprogramm der Gesellschaft für Toxikologie in der DGPT zur Fachtoxikologin DGPT; Bereits absolvierte Kurse:

- Chemische Kanzerogenese und Mutagenese
- Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik
- Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I
- Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II
- Klinische Toxikologie
- Lebensmitteltoxikologie
- Molekulare Zelltoxikologie
- Reproduktionstoxikologie
- Versuchstierkunde I/Biostatistik (theoretischer Teil)

Teilnahme an folgenden Kursen:

- FELASA Kurs Kategorie B (DKFZ Heidelberg)
- Advanced QTrap 5500 Training (Sciex, Darmstadt)

LEHRERFAHRUNG

Seit Sommersemester 2017/18 eigenverantwortliche Vorlesung im Rahmen des Masterstudiengangs Toxikologie „Biomolekulare Analytik“ 1 SWS

Tagungsbeiträge

Poster, als Erstautor:

- 3rd Pharm-Tox Summit 2018 (Göttingen): Ten years Master Program in Toxicology at the University of Kaiserslautern
- Eurotox 2017 (Bratislava): Formation of DNA adducts of α - and β -asarone *in vitro*
- 2nd Pharm-Tox Summit 2017 (Heidelberg): DNA-adducts of alpha- and beta-asarone in primary rat hepatocytes
- 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2016 (München): Metabolismus, Mutagenität und DNA-Adduktbildung von α - und β -Asaron
- German Pharm-Tox Summit 2016 (Berlin): DNA adduct formation with α - and β -asarone-epoxide
- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2015 (Karlsruhe): DNA-Adduktbildung mit alpha- und beta-Asaronepoxid
- DGPT Jahrestagung 2015 (Kiel): Cytotoxicity of alpha- and beta-asarone and their metabolites

Vorträge:

- BioComp Symposium 2020 (Alsenz): Identification of biomarkers of food intake using HPLC-MS
- 3rd Pharm-Tox Summit 2018 (Göttingen): Formation of DNA adducts of α - and β -asarone *in vitro*
- Regionalverbandstagung der LChG 2016 (Freiburg): Metabolismus, Mutagenität und DNA-Adduktbildung von α -Asaron und β -Asaron
- Symposium DNA-damage response, genetic instability and cancer 2016 (Mainz): Metabolism, mutagenicity and DNA adduct formation of α - and β -asarone

Publikationen

- Kobets, T., Cartus, A. T., Fuhlbrueck, J. A., Brengel, A., Stegmüller, S., Duan, J. D., Brunnemann, K. D., & Williams, G. M. (2019). Assessment and characterization of DNA adducts produced by alkenylbenzenes in fetal turkey and chicken livers. *Food Chem. Toxicol.* 129, 424–433. doi:10.1016/j.fct.2019.05.010
- Buckel, L., Kremer, J. I., Stegmüller, S., Richling, E. (2019). Fast, Sensitive and Robust Determination of Nicotinic Acid (Vitamin B3) Contents in Coffee Beverages Depending on the Degree of Roasting and Brewing Technique. *Proceedings* 11, 13. doi:10.3390/proceedings2019011013
- Stegmüller, S., Schrenk, D., Cartus, A.T. (2018). Formation and fate of DNA adducts of alpha- and beta-asarone in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 116, 138–146. doi:10.1016/j.fct.2018.04.025
- Mungalpara, D., Stegmüller, S., Kubik, S. (2017). A neutral halogen bonding macrocyclic anion receptor based on a pseudocyclopeptide with three 5-iodo-1,2,3-triazole subunits. *Chem. Commun.* 53, 5095–5098. doi:10.1039/C7CC02424J
- Berg, K., Bischoff, R., Stegmüller, S., Cartus, A., Schrenk, D. (2016). Comparative investigation of the mutagenicity of propenylic and allylic asarone isomers in the Ames fluctuation assay. *Mutagenesis* 31, 443–451. doi:10.1093/mutage/gew007
- Cartus, A.T., Stegmüller, S., Simson, N., Wahl, A., Neef, S., Kelm, H., Schrenk, D. (2015). Hepatic Metabolism of Carcinogenic β -Asarone. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1760–1773. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00223

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank allen aussprechen, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt und gefördert haben.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen zu dürfen. Besonders möchte ich Ihnen danken, für die vielen Freiheiten eigene Ideen zu verwirklichen, aber auch für die fachliche Unterstützung und die zahlreichen Gelegenheiten Teile dieser Arbeit auf Fachtagungen, national und international, zu präsentieren. Weiter möchte ich Ihnen dafür danken, dass Sie mir schon in einem frühen Stadium meiner Promotionsarbeit auch administrative Aufgaben – u.a. die Betreuung des Masterstudiengangs Toxikologie – übertragen haben und dadurch viel Vertrauen in mich gesetzt haben, wodurch ich mich auch in dieser Richtung weiterentwickeln konnte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Elke Richling für die Bereitschaft der Übernahme des Zweitgutachtens. Ein weiterer Dank gilt Ihnen für die Möglichkeit die, von Ihrer Arbeitsgruppe betreuten, HPLC-MS-Systeme nutzen und die Unterstützung dazu von Ihren Mitarbeitern in Anspruch nehmen zu dürfen. Für die fachlich Diskussion im Bereich Analytik danke ich Ihnen ebenso.

Herrn Professor Dr. Werner Thiel danke ich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Katharina Goerke und Herrn Juniorprofessor Dr. Alexander Cartus danke ich für das ausführliche Korrekturlesen und die hilfreichen Kommentare und Anmerkungen.

Herrn Juniorprofessor Alexander Cartus möchte ich weiter danken für die zahlreichen hilfreichen Gesprächen und die permanente fachliche Unterstützung. Schon als Du mich in Forschungspraktikum und Diplomarbeit betreut hast, durfte ich viel von Dir lernen und Du hast mich mit deiner Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten angesteckt. Auch während der Promotion waren die Diskussionen, bei dem ein oder anderen Kaffee, sehr hilfreich und haben mich vor manchem Verrennen in eine Richtung bewahrt. Danke!

Herrn Dr. Karl-Heinz Merz danke ich für Rat und Tat bei allem, was sich im Syntheselabor abgespielt hat. Sei es die Interpretation von NMR-Spektren, Ideen zur Modifikation von Synthesen oder einfach das Öffnen von Kolben, die mal wieder nicht so wollten, wie ich.

Meinen lieben Kolleginnen Dr. Meike Rünz und Katharina Goerke danke ich für gute Büronachbarschaft und vor allem für die konstruktiven Diskussionen im Bereich LC-MS-Analytik.

Frau Dr. Kerstin Bach und Frau Dr. Sabrina Hauptenthal danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und den regen Austausch über die in den einzelnen Projekten erhaltenen Ergebnisse.

Frau Melanie Abel-Beckmann danke ich für die Unterstützung bei der Präparation der primären Rattenhepatozyten und der folgenden Aufarbeitung.

Für die Anfertigung der NMR-Spektren danke ich Frau Christine Müller und Herrn Dr. Harald Kelm.

Ich dank Frau Heinke Balzulat, Frau Eva Gorgus, Frau Ingrid Hemm und Frau Anita Strohauer für die Unterstützung in allen administrativen Fragen.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Schrenk, Richling und Cartus danke ich für die sehr angenehme und freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei allen, die regelmäßig die Mittagspausen mit mir im Kaffeezimmer verbracht haben.

Neben der Unterstützung an der Uni, möchte ich mich bei Anabel und Stephanie für unsere Jahrzehnte lange Freundschaft bedanken. Wer solche Freundinnen, die in jeder Lebenslage zu einem stehen, kann sich einfach nur glücklich schätzen. Dankeschön. Auch Patrick, Tina, Antje und Frank danke ich für die großartige Freundschaft und die Ablenkung, die ihr mir in den letzten Jahren auch mal verordnet habt.

Von tiefsten Herzen möchte ich den Menschen danken, die mich mit ihrer bedingungslosen Liebe zu dem Menschen haben werden lassen, der ich heute sein darf. **Danke Mama, danke Papa!** Ihr habt mich immer unterstützt, wart immer da und habt alles in eurer Macht Stehende getan, damit ich meinen Traum zu studieren und dann auch noch zu promovieren umsetzen konnte.

Meinen Schwestern Yvonne und Désirée danke ich, dass ihr immer für mich da wart und seid – side by side or miles a part, Sisters will always be connected by the heart.

Meinen Schwiegereltern Eva und Gerhard danke ich für die liebevolle Aufnahme in die Familie und Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, ihr seid die besten Schwiegereltern, die man sich wünschen kann. Ortrud, dir danke ich für viele schöne Stunden.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann danken. Du bist mein bester Freund, mein engster Vertrauter, aber auch mein größter Kritiker. Ich danke dir dafür, dass du bist, wie du bist und mich immer unterstützt, auch wenn du dafür einige Abstriche machen musstest. Einfach nur DANKE.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Simone Stegmüller, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Bildung von DNA-Addukten durch α - und β -Asaron in primären Rattenhepatozyten“

selbstständig verfasst und dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor der Erstellung dieser Dissertation auf Kongressen oder in Printmedien veröffentlicht (siehe Tagungsbeiträge und Publikationen).

Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 25. März 2014 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den 22.07.2020

Simone Stegmüller

*Am Ende wird alles gut!
Und wenn es noch nicht gut ist,
dann ist es noch nicht das Ende.*

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial statements. This includes not only sales and purchases but also expenses, income, and transfers between accounts.

The second part of the document provides a detailed breakdown of the accounting cycle. It outlines the ten steps involved in the process, from identifying the accounting entity to preparing financial statements. Each step is explained in detail, with examples provided to illustrate the concepts.

The third part of the document focuses on the classification of accounts. It discusses the different types of accounts, such as assets, liabilities, equity, revenue, and expense accounts, and how they are used to record and summarize business transactions.

The fourth part of the document covers the process of journalizing and posting. It explains how transactions are recorded in the journal and then posted to the ledger accounts. This process is essential for maintaining the double-entry system and ensuring that the books are balanced.

The fifth part of the document discusses the preparation of financial statements. It outlines the steps involved in calculating the net income, preparing the income statement, balance sheet, and statement of equity. It also discusses the importance of comparing the results of the current period with those of the previous period.

The sixth part of the document covers the closing process. It explains how the temporary accounts (revenue, expense, and dividend accounts) are closed to the permanent accounts (assets, liabilities, and equity accounts) at the end of the accounting period. This process is necessary to reset the temporary accounts for the next period.

The seventh part of the document discusses the importance of internal controls. It outlines the various measures that can be taken to prevent and detect errors and fraud, such as segregation of duties, authorization, and independent checks.

The eighth part of the document covers the use of accounting software. It discusses the benefits of using computerized accounting systems, such as increased accuracy, efficiency, and ease of use. It also provides an overview of the different types of accounting software available.

The ninth part of the document discusses the role of the accountant. It outlines the various responsibilities of an accountant, such as recording transactions, preparing financial statements, and providing financial advice to management. It also discusses the different types of accountants and the skills and qualifications required for the profession.

The tenth part of the document covers the future of accounting. It discusses the impact of new technologies, such as artificial intelligence and blockchain, on the accounting profession. It also discusses the importance of continuing education and staying up-to-date on the latest developments in the field.