

Zum Transportphänomen und Wirkungsmechanismus des 3.4-Benzopyrens in der Zelle

MANFRED WILK und HEINRICH SCHWAB *

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 23 b, 431—438 [1968]; eingegangen am 7. September 1967)

Mit äußerst fein dispergiertem 3.4-Benzopyren (=BP **) wurde seine Löslichkeit in Wasser und wäßrigen Nucleotidlösungen fluoreszenz-spektroskopisch neu bestimmt. Wir fanden, daß ATP deutlich größere lösungsvermittelnde Eigenschaften für BP besitzt als ADP oder AMP. Die gesättigte Lösung von BP in ATP-Lösung verliert bei Zugabe von ATP-ase ihre zusätzliche Lösungsvermittlung. Zwischen DNS und BP, jedoch nicht zwischen RNS und BP wird eine Energieübertragung nachgewiesen.

Wir versuchen, aus den Löslichkeitsunterschieden für BP in Nucleotidlösungen den gerichteten Transport des BP von den Mitochondrien zu den kernnahen Bereichen der Zelle über das ATP-Konzentrationsgefälle zwischen diesen Strukturen zu erklären. Die gelbgrüne Fluoreszenz, die sich nach Inkubation mit BP im endoplasmatischen Retikulum zeigt, wird auf kristallines oder dimerisiertes BP bzw. Reaktionsprodukte des Benzopyrenyl-Radikalkations mit nucleophilen Zellstrukturelementen zurückgeführt. Hieraus werden Blockierungs- und Störmodelle der DNS abgeleitet. Auf die Ähnlichkeit dieser Prozesse mit der carcinogenen Wirksamkeit indifferenter Phasengrenzflächen und alkylierender Agenzien wird hingewiesen und die Bedeutung der Symmetrieelemente der Carcinogene bei diesem Prozeß diskutiert.

Ermutigt durch Untersuchungen von MATSUYAMA und NAGAYO¹, wonach an mit NAD inkubierten Ratten die carcinogene Wirksamkeit aktiver Kohlenwasserstoffe überzeugend verzögert wird, scheinen uns die an isolierten Teilsystemen vorgenommenen Modellbetrachtungen² bekräftigt, weil der hier festgestellte LDH-BP-Komplex eine große Labilität gegenüber NADH besitzt. Es wurden daher weitere Modellreaktionen studiert, die für den von GRAFFI und HAMPERL³ gefundenen Transport des BP in der Zelle und dessen Wirkungsmechanismus weitere Aufschlüsse im Rahmen ihrer Aussagekraft geben sollen:

1. Die Löslichkeit von BP in Wasser wurde mit Hilfe mikrokristalliner Suspensionen neu bestimmt.
2. Die Löslichkeit von BP in äquivalenten, wäßrigen Lösungen von ATP, ADP und AMP sowie in Adenin- und RNS-Lösungen wurde gemessen und gefunden, daß beim ATP eine deutliche Steigerung der Löslichkeit auftritt.
3. Versetzt man eine BP-gesättigte ATP-Lösung mit ATP-ase, so kann fluoreszenz-spektroskopisch die Abnahme des gelösten Anteils von BP auf den „Wasserwert“ festgestellt werden.

4. In den Anregungsspektren der Fluoreszenz ist eine Energiekopplung zwischen den komplementären Basenpaaren der DNS und dem kondensierten BP zu beobachten, die beim Ersatz von DNS durch RNS ausbleibt.

1. Löslichkeit von 3.4-Benzopyren in Wasser

Obwohl von WEIL-MALHERBE⁴ schon Meßwerte über die Löslichkeit kompakter BP-Kristalle vorliegen, wurde an äußerst fein verteilten BP-Suspensionen eine neue Bestimmung durchgeführt, um einen Vergleichswert für unsere Versuche 2—4 zu erhalten. Die Erfassung des gelösten Anteils Kohlenwasserstoff erfolgte bei der Fluoreszenzwellenlänge $415 \text{ m}\mu^2$.

a) Staubfein zerriebenes BP in bidest. Wasser aufgeschlämmt und 8 Stdn. unter Stickstoff geschüttelt, zeigt eine Löslichkeit von $3,22 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/l}$ bei 20°C .

b) Der aus einer Suspension (hergestellt durch Zugabe einer kleinen Menge methanolischer BP-Lösung zu viel Wasser) bestimmte Anteil an gelösten BP beträgt bei 20°C $4,72 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/Liter}$.

* Die unter 1—3 beschriebenen Versuche sind Teile der Diplomarbeit von H. SCHWAB, Frankfurt a. M. 1963.

** Folgende Abkürzungen werden benutzt: BP = 3.4-Benzopyren, NADH = red. Diphosphopyridin-nucleotid, ATP = Adenosin-5-triphosphat, ADP = Adenosin-5-diphosphat, AMP = Adenosin-5-monophosphat, ATP-ase = ATP-Pyrophosphatase, DNS = Desoxyribonucleinsäure, RNS = Ribonucleinsäure, LDH = Milchsäure-dehydrogenase.

¹ M. MATSUYAMA u. T. NAGAYO, Nature [London] 189, 673 [1961]; GANN 51, 265 [1960].

² M. WILK, Biochem. Z. 333, 166 [1960].

³ A. GRAFFI u. H. HAMPERL, Z. Krebsforschg. 52, 165, 185, 234 [1942].

⁴ H. WEIL-MALHERBE, Biochem. J. 40, 351 [1946].

c) Beide Ergebnisse liegen deutlich über dem Meßwert von WEIL-MALHERBE⁴, der bei 18–20 °C mit $2,4 \cdot 10^{-8}$ Mol/l angegeben wird. Offensichtlich hat sich bei c und etwas weniger bei a das Lösungsgleichgewicht infolge der größeren Kristalle noch nicht vollständig eingestellt. Bei c kann auch BP während der Aufarbeitung teilweise verlorengegangen sein. Der geringe Anteil an Methanol bei b hat auf die Löslichkeit des BP keinen nennenswerten Einfluß.

2. Löslichkeit von 3.4-Benzpyren in wäßrigen Nucleotidlösungen

WEIL-MALHERBE⁴ hatte schon an zahlreichen Purinbasen deren lösungsvermittelnde Eigenschaften für BP festgestellt; für die biologisch interessanten Nucleotide fehlten aber bisher derartige Messungen. Es lag daher die Vermutung nahe, das im Zuge der Atmungsketten-Phosphorylierung gebildete ATP für den Transport des Kohlenwasserstoffs verantwortlich zu machen. Aus fluoreszenz-mikroskopischen Beobachtungen³ ist die Ansammlung von BP in den ATP-verbrauchenden, kernnahen Zellregionen bekannt, nachdem es zunächst an den Mitochondrien einige Zeit angereichert war.

In wäßrigen Lösungen der Basen wurden durch fluoreszenz-spektroskopische Bestimmungen bei 20 °C folgende zusätzliche, über dem „Wasserwert“ liegende Löslichkeiten für BP gefunden:

[Mol/l]

$0,65 \cdot 10^{-3}$ ATP-5- lösen zusätzlich $2,97 \cdot 10^{-8}$ Mol/l BP,

$0,65 \cdot 10^{-3}$ ADP-5- lösen zusätzlich kein BP,

$0,65 \cdot 10^{-3}$ AMP-5- lösen zusätzlich kein BP,

$0,46 \cdot 10^{-3}$ AMP-3- lösen zusätzlich $0,93 \cdot 10^{-8}$ Mol/l BP,

$0,46 \cdot 10^{-3}$ Adenin lösen zusätzlich kaum erfaßbar BP,

$1,82 \cdot 10^{-6}$ sol. RNS lösen zusätzlich $0,57 \cdot 10^{-8}$ Mol/l BP.

Bei diesen Messungen muß die Fluoreszenz der Nucleotide im Bereich der BP-Emission abgezogen werden. Die Eichungen erfordern eine genaue Berücksichtigung der Konzentrations-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten beim BP und den Nucleotiden. Der Temperaturgang der Emission ist gering und kann vernachlässigt werden.

3. Ausfällung des 3.4-Benzpyrens aus ATP-Lösungen durch ATP-ase

Als Gegenversuch zu 2. wurde eine an BP gesättigte ATP-Lösung mit Schlangengift-ATP-ase (*crot. atrox*)^{***} versetzt und die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz des gelösten Anteils BP gemessen. Abb. 1 zeigt den durch Ausfällung bedingten Anteil der Fluoreszenzminderung mit ihrer Konvergenz zum „Wasserwert“ (hier gleich 0 gesetzt).

10^{-8} Mol/l

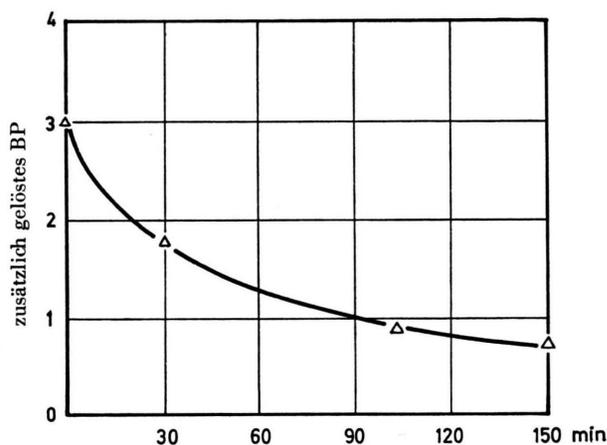


Abb. 1. Zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität des zusätzlich gelösten Anteils 3.4-Benzpyren in ATP-Lösung nach Zugabe von Schlangengift-ATP-ase.

Die Reaktion verläuft hier sehr langsam, weil im ungepufferten System gemessen werden mußte, um das BP-Suspensionsgleichgewicht nicht noch durch zusätzliche Fremdionen zu stören. Im Parallelversuch ohne ATP-ase wurde in der Versuchszeit (150 min) keine Veränderung der Fluoreszenzintensität beobachtet. Eine Kontrolle durch quantitatives Verfolgen der Zunahme an kristallinem BP läßt sich fluoreszenz-spektroskopisch nicht durchführen, weil hier sehr komplizierte Zusammenhänge zwischen Konzentration, mittlerer Teilchengröße der BP-Mikrokristalle und Emissionsintensität vorliegen, die noch durch starke Streulichteffekte der getrübbten Lösungen erschwert werden. Auf die Fluoreszenzintensität des gelösten Anteils BP haben diese Faktoren nur geringen Einfluß, wenn unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen gemessen wird.

*** Für die Überlassung einer Probe sei Herrn Prof. Dr. G. PFLEIDERER auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

4. Energieübertragung zwischen DNS und mikrokristallinem 3.4-Benzopyren

Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Beeinflussungen durch kristallines BP an den kernnahen Zellstrukturen verursacht werden können, stellten wir folgendes Modellsystem her: An einer bei Gegenwart von Hefe-DNS sehr langsam bereiteten BP-Suspension wurde das Anregungsspektrum der Fluoreszenz bei der Emission des ungelösten BP ($519\text{ m}\mu$) registriert. Unter gleichen Bedingungen wurden die Einzelkomponenten der Mischung, eine wäßrige DNS-Lösung und die freie BP-Suspension, vermessen. In Abb. 2 ist das Ergebnis dargestellt. DNS besitzt in dem beobachteten Emissionsbereich keine Fluoreszenz. Um den Unterschied der Anregungsspektren von kristallisiertem und gelöstem BP zu demonstrieren, ist auch noch der Verlauf einer methanolischen BP-Lösung angegeben. Die punktierte Kurve ($\lambda_{\text{max.}} = 260\text{ m}\mu$) gibt die Absorption der DNS wieder.

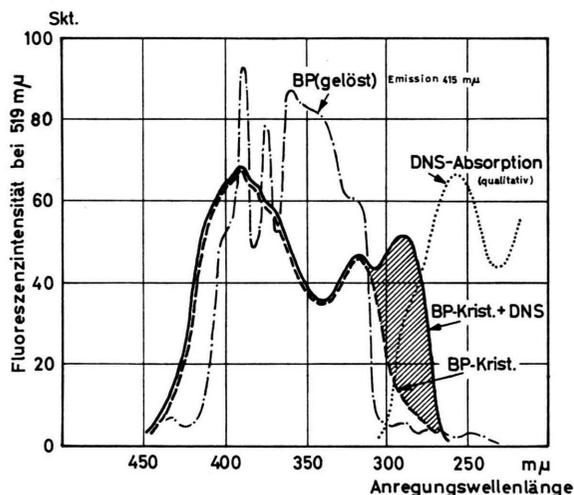


Abb. 2. Anregungsspektren der Lösungen. DNS+BP-Suspension in Wasser, Emission bei $519\text{ m}\mu$; BP-Suspension in Wasser, Emission bei $519\text{ m}\mu$; methanolische BP-Lösung, Emission bei $415\text{ m}\mu$; Absorption (qualitativ) der DNS (Konzentrationen vgl. experimenteller Teil).

Die Abweichungen des Anregungsspektrums vom bekannten Verlauf der Absorption einer methanolischen BP-Lösung resultieren aus der gegebenen Energieverteilung der verwendeten Strahlungsquelle

(Xenonlampe Osram XBO 162) und der spektralen Empfindlichkeits-Charakteristik des eingesetzten Strahlungsempfängers (1 P 28).

Im vereinten System DNS + krist. BP ist nach Abb. 2 im Bereich der schraffierten Fläche eine deutliche Energieübertragung von $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der langwelligen Schulter der DNS-Absorption (vgl. KASHA, EL-BYOUIMI und RHODES⁵) zum $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der mikrokristallinen BP-Einheiten vorhanden. Beim Ersatz von DNS durch RNS blieb dieser Energietransport in wiederholten Nachweisversuchen aus. Angeregte $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Basen tragen nicht zu dem beobachteten Effekt bei. Bei dieser Anregung wird lediglich die Fluoreszenz der Nucleotid-Einheiten emittiert ($395 - 415\text{ m}\mu$).

Aus der Kopplungsmöglichkeit der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der komplementären Basenpaare, die senkrecht zur Molekülebene polarisiert sind, mit den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen (1L_a und 1L_b) des BP, die in der Ebene des Kohlenwasserstoffs polarisiert sind, ist zu schließen, daß in unserem System DNS + krist. BP die Ebenen der BP-Einheiten parallel zur Hauptachse der DNS-Helix orientiert sind. Ein interkalärer Einbau von BP kann daher ausgeschlossen werden, weil hier der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang (Base) nicht mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des BP koppeln dürfte, aber eine Energieübertragung vom $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Base zum $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des BP zu erwarten wäre.

Diskussion

Die signifikanten Löslichkeitsunterschiede des BP in gleichkonzentrierten Lösungen von ATP, ADP und AMP legen es nahe, ein Arbeitsschema für den Transport des BP von den Mitochondrien (hohe ATP-Erzeugung) zu den kernnahen Zonen (hoher ATP-Verbrauch) zu formulieren. Hierdurch ließe sich gleichzeitig der von GRAFFI und HAMPERL³ beschriebene Farbumschlag der Fluoreszenz von blau (gelöstes BP im Cytoplasma und Granula) nach gelbgrün (kristallines BP in der Kernperipherie) deuten, wie er an lebenden Zellen während des BP-Transportes zu beobachten ist. Das allmähliche Auftreten der gelbgrünen Fluoreszenz um den Kern herum läßt sich auch auf die Bildung eines von uns beschriebenen^{6,7} 5.5'-Bis-benzopyrenyls oder eines

⁵ M. KASHA, A. EL-BAYOUMI u. W. RHODES, J. chem. Physics **58**, 916 [1961].

⁶ M. WILK, W. BEZ u. J. ROCHLITZ, Tetrahedron **22**, 2599 [1966].

⁷ M. WILK, G. WAGNER, J. ROCHLITZ u. W. GIRKE, Tetrahedron Letters [London] **47**, 5905 [1966].

Reaktionsproduktes des Benzpyrenyl-Radikalkations mit nucleophilen Zellbestandteilen zurückführen. Diese Radikalkationen werden sehr leicht bei niedrigem Oxydationspotential ($\sim +0,4$ V) gebildet, wenn der Kohlenwasserstoff an aktiven Grenzflächen adsorbiert ist. Ihre Reaktionsprodukte mit Nucleobasen und Nucleotiden sowie mit Tryptophan und Histidin werden zur Zeit näher untersucht. Sie zeigen wie das Bisbenzpyrenyl eine gelbgrüne bis gelbe Fluoreszenz.

An Hand eines Schemas soll in Abb. 3 versucht werden, die ersten Teilschritte der BP-Verteilung in der Zelle³ modellmäßig zu deuten.

Die natürliche Löslichkeit von BP in Wasser und Proteinlösungen² führt zunächst zu einer diffusen Verteilung des Kohlenwasserstoffs in der Zelle. Der Mechanismus des Zellwanddurchtritts ist unbekannt. Die erste selektive Fixierung – wir wollen sie die reversible nennen – erfolgt an den Mitochondrien und Lipochondrien. Wie wir früher an dieser Stelle berichteten⁸, werden auch durch isolierte Mitochondrien der Mäuseleber nur die carcinogenen Kohlenwasserstoffe spezifisch aus ihren wäßrigen Suspensionen gelöst, wobei eine beachtliche Verminderung

der Substratveratmung und der oxydativen Phosphorylierung auftritt. Da auch die Cocarcinogene des Crotonöls einen ähnlichen Effekt der Atmungsblockierung hervorrufen⁹, wurde von uns vorgeschlagen, diese Wirkung einer Promotor-Aktivität zuzuschreiben. Nach unseren oben erwähnten Befunden über die Labilität des LDH-BP-Komplexes gegen NADH², dessen Schutzwirkung bei Pinselungsversuchen¹ und der hohen Regenerierungsfähigkeit von Mitochondrien muß diese Störung von „außen“ oder „innen“ her reparabel sein. Das abgelöste BP wandert nun von den Mitochondrien im Konzentrationsgefälle des im Zuge der Atmungsketten-Phosphorylierung hier gebildeten ATP zu den Zellorten eines hohen Verbrauchs energiereichen Phosphates und fällt an diesen Stellen mikrokristallin an:



Obwohl der lösungsvermittelnde Effekt des ATP mit dem etwa doppelten „Wasserwert“ nur sehr gering ist, kann der Transport von BP sehr wirkungsvoll sein, denn die lebende Zelle produziert täglich fast ihr Eigengewicht an ATP. Nach GRAFFI und HAMPERL³ dauert die Überführung des Kohlenwas-

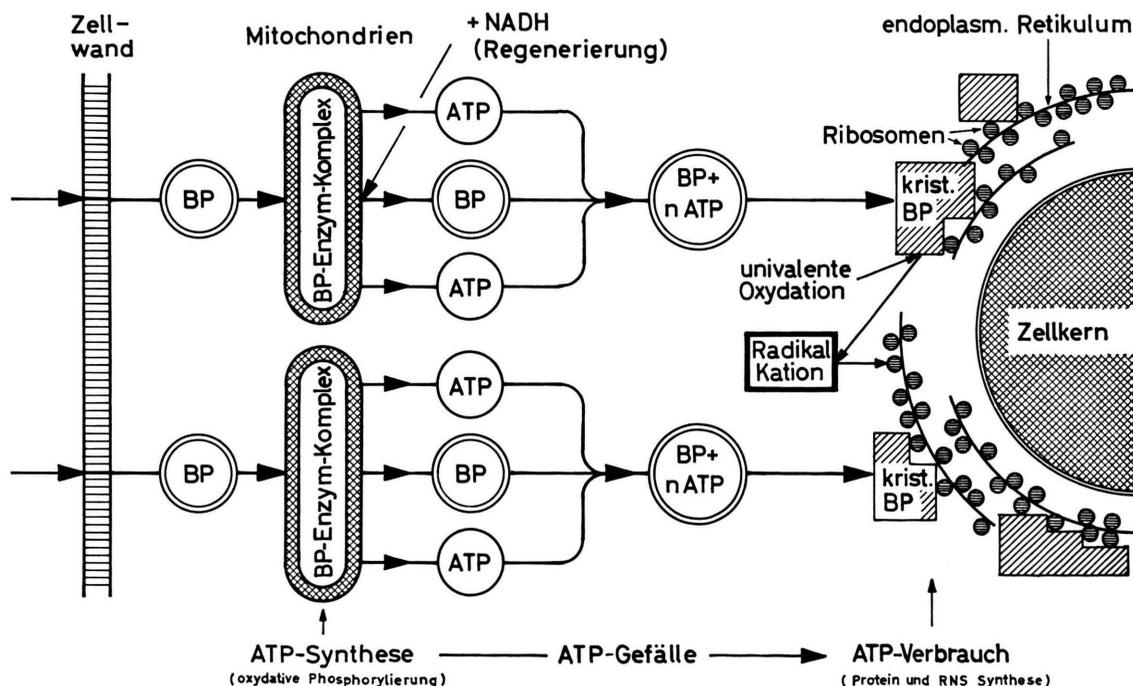


Abb. 3. Modell zum Transport des 3,4-Benzpyrens in der lebenden Zelle.

⁸ M. WILK u. E. L. WYNDER, Z. Naturforsch. **21 b**, 161 [1966].

⁹ M. WILK u. E. L. WYNDER, Z. Naturforsch. **21 b**, 972 [1966].

serstoffs einige Tage. Überschlägt man den Anteil BP, der in dieser Zeit allein über das ATP-Konzentrationsgefälle wandern könnte, so sind dies etwa 0,01% des Zellgewichts, eine Menge, die zur Erfahrung nicht in Widerspruch steht. Die von SETÄLÄ et al.¹⁰ entdeckten zusätzlichen Effekte bei der gleichzeitigen Einwirkung von ATP und 9.10-Dimethyl-1.2-benzanthracen auf die Mäusehaut beruhen wohl auf einem ähnlichen Löslichkeits-verändernden Einfluß des Nucleotids auf den Kohlenwasserstoff.

Mit dem Auskristallisieren des BP ist im Modell die reversible Phase der Atmungsstörung abgeschlossen. Nach der gut erfüllten DRUCKREYSCHEN Theorie¹¹ der additiven Schädigung durch kleinste Dosen carcinogener Verbindungen über lange Zeiträume müssen weitere BP-Wirkungen irreversibel sein. Sein Angriff muß daher an Zellstrukturen erfolgen, die keine günstigen Regenerierungsmöglichkeiten besitzen. Enzymproteine und Transfer-RNS können leicht nachgeliefert werden, solange die DNS-Matrix intakt bleibt. Es ist somit unwahrscheinlich, daß die endgültige Schädigung an diesen Einheiten ansetzt. Sehen wir einmal von der möglichen Blockierung der in Kernnähe verlaufenden Reaktionen durch unspezifisches „Verkleben“ oder Umhüllen der Ribosomen und ähnlicher Strukturelemente durch BP-Kristallite ab, obwohl sich hier eine interessante Parallele zur carcinogenen Wirksamkeit indifferenten, fester Phasengrenzflächen der bekannten Metalle und Kunststoffe abzeichnet, so verbleiben eigentlich nur die DNS und Messenger-RNS als weitere Angriffsorte. Die Parachromatine, variable Verknüpfungen der DNS mit Histonen, wollen wir in unser primitives Modell nicht mit einbeziehen, ungeachtet ihrer entscheidenden Rolle bei den zur Zelldifferenzierung führenden interzellulären Regelmechanismen, die bei der Ätiologie der Tumoren sicher von grundlegender Bedeutung sind.

Unser Modell enthält einen Hinweis zu diesen möglichen Angriffspunkten. Die beobachtete Energieübertragung von den Nucleotidbausteinen der DNS zum BP kann nur dann physikalisch sinnvoll gedeutet werden, wenn die Übergangsmomente der beiden Komponenten im Schwerpunkt etwa gleichgerichtet sind. Das ist nur dann der Fall, wenn die Kohlenwasserstoff-Aggregate flach, d. h. mit der Ebene der

Aromaten, an der „Oberfläche“ der Wendel aufliegen. Das Ausbleiben einer Energieübertragung bei der RNS läßt vermuten, daß bei der DNS zusätzliche hydrophobe Wirkungen über die CH₂-Gruppe der Desoxyribose zum Zuge kommen. Der nach KASHA⁵ ablaufende Energieleitmechanismus über $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Basenpaare in Längsrichtung der Helix – mit einem komplizierten statistischen Wasserstoffbrückenbindungs-Modell der hydratisierten DNS läßt sich deren differenziertes chemisches und physikalisches Verhalten auf die Dauer sicher nicht deuten – wird durch die „angeklebten“ BP-Mikrokristalle tiefgreifend gestört, denn die in der Helix zu transportierende Energie kann dann außen über die Kopplung in „Fallen“ oder Leitfähigkeitsbänder geraten¹². Hier wird sie als Exciton oder Leitelektron im Kristall statistisch wandern, bis sie an einer passenden Stelle für Reaktionen verbraucht oder durch Umwandlung in Wärme vernichtet ist. Dieser Mechanismus läßt sich auch gleichzeitig zur Deutung der carcinogenen Wirksamkeit indifferenten Phasengrenzflächen heranziehen. Der schon aus sterischen Gründen wenig überzeugende interkalare Einbau der Kohlenwasserstoffe zwischen die dicht übereinandergepackten komplementären Basenpaare ist demnach nicht der einzige Weg, die Blockierung der Energieleitung in der DNS-Helix zu beschreiben. Hier wäre auch kein Unterschied im Verhalten von DNS und RNS zu erwarten.

Wird dagegen die gelbgrüne Fluoreszenz in Kernnähe nicht allein durch mikrokristallines BP hervorgerufen, sondern auch durch Reaktionsprodukte des Benzopyrenyl-Redikalkations, das sich besonders leicht an aktiven Grenzschichten^{6, 7} oder aus der kristallinen Phase¹³ bildet, so müssen im Modell noch zusätzliche Schritte für die irreversible Störung berücksichtigt werden:

a) *Dimere und oligomere Kohlenwasserstoffe*: Wie wir früher berichteten⁶ entstehen bei der Oligomerisierung carcinogener Kohlenwasserstoffe Racemate atropisomerer Verbindungen. Schon LETTRÉ¹⁴ wies auf das Vorhandensein von allerdings nur „planaren Asymmetrien“ in carcinogenen Kohlenwasserstoffen hin. Seine Ausnahmefälle lassen sich mit unserer erweiterten Hypothese deuten, denn die symmetrischen Moleküle mit carcinogener Wirksamkeit dimerisie-

¹⁰ K. SETÄLÄ, O. ÄYRÄPÄÄ u. E. E. NISKANAN, *Naturwissenschaften* **48**, 226 [1961].

¹¹ H. DRUCKREY, H. HAMPERL u. BROCK, *Z. Krebsforsch.* **50**, 431 [1940].

¹² M. WILK, *Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem.* **64**, 934 [1960].

¹³ A. CARRINGTON, F. DRAVNIKS u. M. C. R. SYMANS, *J. chem. Soc. [London]* 947 [1959].

¹⁴ H. LETTRÉ, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **280**, 28 [1944].

symmetrisch u. nicht carcinogen	A	
"planare Asymmetrie" carcinogen	B	
Ausnahmen: symmetrisch u. carcinogen	C	

Tab. 1. Molekülasymmetrie und Carcinogenität.

ren bevorzugt an den mit Pfeilen gekennzeichneten Positionen (Tab. 1), wobei dimere (bzw. oligomere) Atropisomere entstehen, deren Rotation um die Verknüpfungsstelle völlig blockiert ist, und somit keine Neigung zu Racemisierung vorliegt¹⁵.

Weitere Bestätigungen finden sich bei den Kohlenwasserstoffen A – C in Tab. 2.

Werden die wahrscheinlichsten Reaktionsorte bei A (Pos. 5 und 8) und B (Pos. 5 und 10) nacheinander durch Substituenten besetzt, so verschwindet

A	3,4,9,10-DBP		
B	3,4,8,9-DBP		
C	Anthanthren		
		R = CH ₃ -	R' = $\begin{matrix} \text{C=O} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$

Tab. 2. Symmetrische Carcinogene.

die Wirksamkeit, obwohl die sog. „K-Region“ unangetastet bleibt. Bei C ist im Grundkörper (inaktiv) nur geringe Asymmetrie vorhanden, die bei Monosubstitution in Pos. 4 gesteigert wird (aktiv). Die Einführung eines zweiten Substituenten in 12-Stellung führt zum völligen Verlust der Aktivität.

Diese spiegelbildlichen, unlöslichen und gegenüber oxydativem Angriff äußerst resistenten atropisomeren Kohlenwasserstoffe könnten über hydrophobe Wechselwirkungen mit DNS (oder Enzymen?) optisch einheitliche und spezifische Reaktion störend beeinflussen.

b) *Reaktionsprodukte des 3.4-Benzpyrenyl-Radikalkations mit nucleophilen Zellbestandteilen:* Nachdem feststand, daß die aus carcinogenen Kohlenwasserstoffen leicht gebildeten Radikalkationen⁶ mit nucleophilen Agenzien wie Pyridin leicht abgefangen werden können¹⁶, lag es nahe, diese Aromaten, in Analogie zu den alkylierend wirkenden Verbindungen, als „arylierende Agenzien“ einzustufen. So reagieren auch Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin im adsorbierten Zustand (auf SiO_2) glatt mit Radikalkationen des BP und anderer carcinogener Kohlenwasserstoffe zu zahlreichen Produkten¹⁷. In der Zelle können daher an nucleophilen Zentren

„planarer Asymmetrie“ auf diesem Wege neue optische Asymmetriezentren aufgebaut werden (Abb. 4), die Wirkungen wie unter a beschrieben hervorrufen könnten.

Der wahrscheinlichere Weg des weiteren Verlaufs irreversibler Störungen der DNS und RNS scheint uns jedoch folgender zu sein:

Die arylierende Wirkung etwa am Adenosin-Baustein der DNS (Adenin, Adenosin, AMP, ADP und ATP reagieren besonders gut mit dem Radikalkation¹⁷) liefert in Analogie zu den alkylierenden Agenzien¹⁸ (für RNS vgl. l. c.¹⁹) arylierte Nucleobasen, wobei ein Angriff am Stickstoff in 7-Position oder an der Aminogruppe in 6-Stellung erfolgt. (Beim 6-Acetaminopurin und 7-Methylpurin-Derivaten bleiben im chromatographischen Vergleich Reaktionsprodukte aus, die beim Adenin am deutlichsten hervortreten¹⁷.)

Das folgende Formelschema veranschaulicht die Konsequenzen unserer Modellbetrachtung für die entsprechenden komplementären Basenpaare:

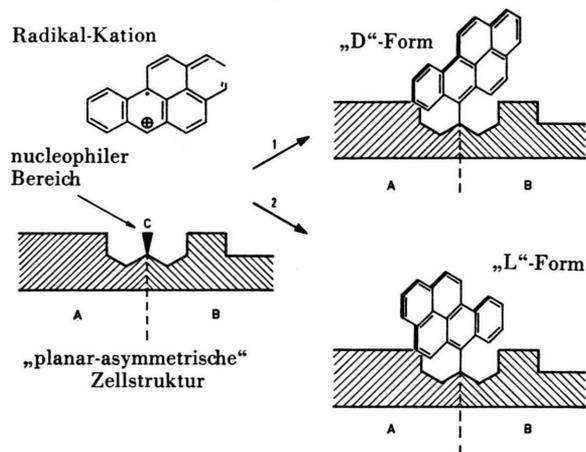
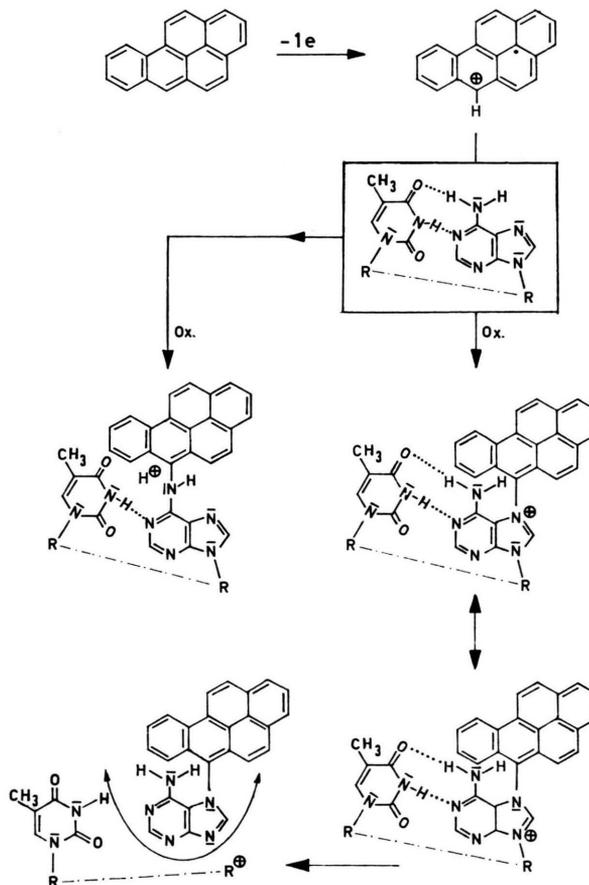


Abb. 4. Modell zur Bildung von optischen Asymmetriezentren in der Zelle durch Reaktion des 3.4-Benzpyrenyl-Radikalkations mit „planaren Asymmetrien“ nucleophiler Zellstrukturelemente.



¹⁵ R. KUHN u. P. GOLDFINGER, Liebigs Ann. Chem. **470**, 183, 190 [1929].

¹⁶ J. ROCHLITZ, Tetrahedron **23**, 3043 [1967].

¹⁷ M. WILK u. W. GIRKE, in Vorbereitung.

¹⁸ E. KRIEK u. P. EMMELLOT, Biochem. biophysic Acta **91**, 59 [1964].

¹⁹ E. FARBER u. P. N. MAGEE, Biochem. J. **76**, 58 P [1960].

Der elektrophile Angriff des Radikalkations auf den Stickstoff der Aminogruppe in 6-Stellung des Adenins löst durch die hiermit verbundene Basizitätsänderung eine Wasserstoffbrücke zum Thymin. Erfolgt jedoch die Reaktion am Stickstoff in 7-Position des Adeninteils, so kann die Nucleobase aus dem Großverband herausgelöst werden, und die DNS (RNS) enthält eine „Fehlstelle“.

Auf den heuristischen Charakter dieser Vorstellungen braucht nicht besonders hingewiesen werden. Das Modell scheint uns jedoch geeignet zu sein, bisher isolierte Hypothesen zusammenzuführen und Anregungen für weitere gezielte Versuche zu geben.

Teile dieser Arbeit wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, wofür wir vielmals danken.

Beschreibung der Versuche

1. *Löslichkeit von 3.4-Benzpyren in Wasser:* Zur Herstellung der BP-Suspension legt man 100 ml bidest. Wasser in einem Dreihalskolben vor und rührt (Turborührer) bei 0 °C nach kräftigem Durchleiten von Reinst-Stickstoff (15 min) innerhalb 15 sec 4 ml einer methanolischen 3.4-Benzpyren-Lösung (Konz. = $5,25 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) ein. Unter schwachem Stickstoffstrom wird noch 90 sec nachgerührt. Bei 3–5 °C ist die Suspension über mehrere Tage stabil. Für die Verwendung bei Zimmertemperatur darf sie nur langsam, innerhalb 2–3 Std., auf 20 °C gebracht werden, sonst stellt sich das Lösungsgleichgewicht nicht konstant ein. Durch Vermessen der Emission bei 415 m μ und 439 m μ bei einer Anregung mit 296 m μ wird mit Hilfe einer Eichkurve der gelöste Anteil von BP bestimmt. Löslichkeit bei 20 °C = $4,72 \cdot 10^{-8}$ Mol/Liter.

2. *Löslichkeit von 3.4-Benzpyren in wäßrigen Nucleotidlösungen:* Man fügt zu der unter 1. beschriebenen Suspension steigende Mengen einer definierten Nucleotidlösung (maximale Konzentration an Nucleotid $0,65 \cdot 10^{-3}$ Mol/l im Mischungssystem) und mißt die zunehmende Fluoreszenz-Intensität wie unter 1. Zur Kompensation der Eigenfluoreszenz der Nucleotide wird

der Konzentrationsverlauf ihrer Fluoreszenzintensität unter gleichen Bedingungen ermittelt und von dem Wert der Mischung abgezogen. Im Bereich von $0,5 \cdot 10^{-9}$ Mol/l bis $5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l tritt beim BP keine Konzentrationslöschung auf.

3. *Ausfällung von 3.4-Benzpyren aus seinen wäßrigen ATP-Lösungen durch ATP-ase:* Eine nach 1. und 2. hergestellte, an 3.4-Benzpyren gesättigte ATP-Lösung (20 °C) wird ungepuffert mit ATP-ase versetzt und die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz des gelösten Anteils BP wie unter 1. verfolgt. Die Ausgangskonzentration des zusätzlich gelösten (über dem „Wasserwert“) BP betrug $2,95 \cdot 10^{-8}$ Mol/l, Anteil nach 30 min: $1,78 \cdot 10^{-8}$ Mol/l, nach 120 min: $0,9 \cdot 10^{-8}$ Mol/l und nach 150 min: ca. $0,7 \cdot 10^{-8}$ Mol/Liter. In einem Vergleichsversuch erwies sich die reine BP-Suspension bei 20 °C gegen ATP-ase als stabil*.

4. *Energieleitung von der DNS zum 3.4-Benzpyren:* Nach 1. wird bei Gegenwart von Hefe-DNS ($2,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) ein langsames Ausfällen von BP vollzogen (über ca. 2 Std.). Dabei werden 2 ml einer methanolischen BP-Lösung ($5,2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) in 100 ml DNS-Lösung eingerührt. Von diesem Ansatz wird das Anregungsspektrum bei einer feststehenden Emission von 519 m μ aufgenommen. Unter den gleichen Bedingungen vermißt man die Komponenten des Systems (BP-Suspension und ATP-Lösung). Zum Vergleich wurde noch eine methanolische BP-Lösung vermessen, wobei die Emission auf 415 m μ festgelegt war. Ergebnisse vgl. Abb. 2.

Der zusätzliche Emissionsanteil bei einer Anregung von etwa 290 m μ bleibt aus, wenn in einer analogen Messung DNS durch RNS ersetzt wird. Aus den fertigen Suspensionen, die nach 1. hergestellt wurden, resultiert nach Zugabe von DNS und RNS ebenfalls kein Energietransport.

Zur Vermessung der Fluoreszenz-Spektren diente ein sorgfältig justiertes Aminco-Bowman-Fluoreszenz-Fluoreszenz-Spektralphotometer, welches durch Anbau von Synchronmotoren zur genaueren Selbstregistrierung abgeändert wurde. Die Absorptionsmessung der DNS erfolgte auf einem Cary 14-Spektralphotometer.

* Ein beobachteter, geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität ($\sim 1\%$) ist wohl auf die übliche Lösungsvermittlung durch Proteine zurück zu führen.