

7. Zusammenfassung

Heutzutage liegt das Hauptproblem der PCB-Belastung nicht mehr in spektakulären Chemieunfällen wie die der 60er und 70er Jahre, namentlich den Yu Sheng- oder Yusho-Unfällen mit tausenden Opfern, sondern in der „Hintergrund-Belastung“ dieser Chlororganika. Diese führt zu einer permanenten Aufnahme geringer Mengen an Schadstoffen, die aufgrund ihrer Lipophilie ein hohes Bioakkumulationspotential aufweisen. Zwar hat sich der Gesetzgeber 1989 dazu durchgerungen, die Verwendung und das Inverkehrbringen der PCB in Deutschland zu verbieten, trotzdem nehmen die PCB-Belastungen nur sehr langsam ab. Diese persistenten Umweltkontaminanten sind über die Jahre hinweg in unterschiedlichen Konzentrationen in jedem von uns über die Aufnahmewege der Muttermilch oder über die Nahrung, und zwar nahezu weltweit, angekommen. Ob wir diese unsichtbaren und geruchlosen Substanzen aus unserem Bewußtsein verdrängen oder nicht, wir sind die Erben vergangener oder aktueller Umweltsünden und sie betreffen uns täglich. Die PCB werden im Körper eingelagert oder metabolisiert. Auf ihrem Weg durch den Körper entfalten sie ihre vielfältigen Einflüsse auf den Organismus. Die toxischen Auswirkungen der in hohen Konzentrationen aufgenommenen PCB sind zahlreich und seit den Yu Sheng- und Yusho-Unfällen Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Das heißt aber keinesfalls, daß daraus die Schlußfolgerung gezogen werden darf, daß PCB in geringeren Konzentrationen, wie sie heutzutage als „Hintergrund-Belastung“ in der Umwelt auftreten, unschädlich sind. Gerade hier besteht noch ein großer Bedarf an weiteren Untersuchungen, und deshalb ist es so wichtig, näheres über die toxikologische Wirkung der PCB und vor allem auch seiner unzureichend beachteten Metaboliten zu erfahren.

Atropisomere PCB bzw. MeSO₂-PCB eignen sich besonders gut als chirale Umwelt-Indikatoren, weil viele Enzymsysteme derartige aktivierenden Substrate enantioselektiv erkennen können. Bei der Vielzahl möglicher Substrate ist es notwendig, daß sie über hochselektive Erkennungsmechanismen verfügen, damit nur das „richtige“ Substrat an das Enzym binden kann. Da atropisomere MeSO₂-PCB biomimetisch z.B. auf den Glucocorticoid-Rezeptor wirken können, sind sie prädestiniert für die Studien über ihren Metabolisierungs- und Wirkmechanismus im Körper, über den immer noch viel zu wenig bekannt ist.

Bereits von Kato *et al.* wurde aufgeklärt, daß einige 3-MeSO₂-PCB verschiedene Cytochrome signifikant induzieren können.^[63,144] Als Konsequenz ist es naheliegend, anzunehmen, daß ein Teil der toxischen Effekte, die von PCB induziert werden, von den MeSO₂-PCB stammen. Sowohl enantioselektive Transformation als auch differenzierte toxische Effekte der Enantiomere sind postuliert worden. Eine Verifizierung dieser Annahmen erforderte die enantioselektive HPLC-Trennung der MeSO₂-PCB-Enantiomere,

die Bestimmung der absoluten Strukturen und eine systematische Untersuchung der enantioselektiv bedingten toxischen Effekte der MeSO₂-PCB-Enantiomere. Das Wissen über die absoluten Strukturen wird einen tieferen Einblick in die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen bezüglich der PCB-Transformationsprozesse erlauben und nähere Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus der chiralen Substrat-Selektion einiger Enzyme liefern können.

Zunächst mußten die racemischen MeSO₂-PCB quantitativ in ihre Enantiomere getrennt werden. Auf dieser Enantiomerentrennung aufbauend, sollte zunächst die absolute Struktur dieser Metaboliten aufgeklärt werden. Anschließend sollten die Enantiomere für toxikologische Untersuchungen verwendet werden. Deshalb befaßt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der quantitativen Enantiomerentrennung von MeSO₂-PCB mittels chiraler Trennphasen. Die HPLC ist für derartige Enantiomerentrennungen die chromatographische Methode der Wahl, weil bei optimierter Vorgehensweise in relativ kurzer Zeit die für weitergehende Experimente notwendigen Quantitäten enantioselektiv getrennt werden können. Zunächst mußten adäquate Trennsäulen gefunden werden. Die Wahl fiel auf eine permethylierte und eine unvollständig methylierte *b*-Cyclodextrinsäule. Generell haben sich bislang nur Cyclodextrinderivate für die Enantiomerentrennung der atropisomeren PCB als geeignet erwiesen. Mit kovalent gebundenen makrozyklischen Antibiotika als stationäre Phase gelang hingegen keine Enantiomerentrennung. Bemerkenswert ist, daß selbst geringe Unterschiede im Methylierungsgrad des Säulenmaterials zu völlig unterschiedlich guten Enantiomerentrennungen derselben MeSO₂-PCB führen können. Das zeigt einmal mehr, wie empfindlich enantioselektive Trennungen selbst auf kleinste Änderungen der Zusammensetzung des Säulenmaterials oder der Trennparameter reagieren.

Der erste Schritt in der Enantiomerentrennung bestand in der Optimierung der HPLC-Trennparameter. Im zweiten konnte durch Optimierung des Trennverfahrens und durch Einführung eines *peak*-Höhen-gesteuerten *autosamplers* der Zeit-, Kosten- und Lösungsmittelaufwand drastisch verringert werden. Das optimierte Verfahren erlaubt jetzt selbst dann eine quantitative Enantiomerentrennung, bei gleichzeitig hohen Ansprüchen an die Reinheit (> 99,x %), wenn die Enantiomere nur angetrennt sind (T >50 %). Quantitativ konnten die Enantiomere der MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149 und 3-174 in Mengen zwischen 0,3 und 3,1 mg erfolgreich getrennt werden.

Nach der polarimetrischen Bestimmung der Drehrichtung einiger MeSO₂-PCB sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Aufklärung der absoluten Strukturen dieser Metaboliten erfolgen. Bisher wurde die absolute Struktur meistens mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Da einige Substanzen nur schlecht oder gar nicht kristallisieren oder unter Standardbedingungen nicht in kristalliner Form vorliegen, mußte nach neuen Möglichkeiten

der Aufklärung der absoluten Konfiguration gesucht werden. Weil im vorliegenden Fall keine MeSO₂-PCB-Einkristalle zu erhalten waren, fiel die Entscheidung für die VCD (*vibrational circular dichroism*), in Verbindung mit quantenchemischen *ab initio* Berechnungen.

Die VCD ist eine IR-spektroskopische Polarisationsmethode. Verwendet wird zirkular polarisiertes Infrarotlicht, welches auf die chirale Probe trifft und zu einem Differenzspektrum führt, das erhalten wird, wenn die Absorption von rechts zirkular polarisiertem Licht von der Absorption des links zirkular polarisierten Lichts subtrahiert wird. Für achirale Substanzen oder racemische Mischungen ist diese Differenz gleich null, während bei chiralen Verbindungen für die reinen Enantiomere komplementäre Spektren erhalten werden. VCD-Spektren sind schwierig zu bekommen, weil die Differenz zwischen den Wechselwirkungen mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht im Bereich von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ Absorptions-Einheiten liegen, so daß nur sehr hochwertige und empfindliche Spektrometer in Frage kommen, wie sie vor allem in jüngster Zeit entwickelt worden sind.

Für jedes Enantiomer wurden spezifische VCD-Spektren erhalten, aber ein Rückschluß des Spektrums auf das respektive Enantiomer nur auf empirischer Basis war unmöglich, weil es schwierig ist, die Interaktionen von einer bestimmten Vibrationsschwingung mit zirkular polarisiertem Licht vorherzusagen. Somit mußten computersimulierte Spektren erzeugt werden, um die absolute Konfiguration der Enantiomere aus den experimentellen Daten zu folgern, z.B. mußten quantenchemische *ab initio*-Berechnungen angestellt werden, welche die Vibrationsschwingungen eines Moleküls und dessen Interaktion mit zirkular polarisiertem Licht im Computer simulieren konnten.^[145] Normalerweise kann eine Zuweisung der Banden in dem experimentellen Vibrationsspektrum zu den Normalschwingungen des Moleküls ausgeführt werden. In dem Fall der PCB-Derivate würde dies extrem schwierig sein, weil die Anzahl der Normalschwingungen für diese Moleküle sehr hoch ist. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit die Zuordnung der VCD-Spektren der Enantiomere durch Vergleich der experimentellen mit den berechneten Spektren erfolgt.

Die Vorgehensweise war dabei wie folgt: Zuerst wurde eine rechnerische Geometrieoptimierung der MeSO₂-PCB durchgeführt. Diese ergab ein relativ flaches Energieminimum bei einem Winkel der beiden Phenylringe von 88° bis 90° zueinander. Daraufhin wurde das VCD-Spektrum für die optimierte Geometrie der MeSO₂-PCB berechnet, aber der Vergleich zu den experimentellen Spektren der beiden Enantiomere lieferte zunächst unbefriedigende Resultate. Erst die Einbeziehung der außerdem energieminimierten Energiehyperflächen der Methylsulfonylgruppe erbrachte eine gute Vergleichbarkeit der experimentellen und der berechneten Spektren in der Region zwischen 1400 cm⁻¹ und 1100 cm⁻¹. Dazu wurden die Energieminima für die Methylsulfonylgruppe, bei gleichzeitig fixierter Geometrie des restlichen Moleküls im Energieoptimum, berechnet. Insgesamt wies diese drei unterscheidbare Energieminima auf. Zwei der drei Strukturen waren bezüglich der Energieminima gleich, die dritte wies eine vergleichsweise hohe Energie

auf. Deshalb wurden die Spektren im Verhältnis 2:2:1 gewichtet und zu einem Spektrum verschmolzen. Aus dem Vergleich der kalkulierten und experimentellen Spektren konnte die absoluten Strukturen der MeSO₂-PCB 3-149, 3-132, 4-132 und 3-174 aufgeklärt werden. Zum ersten Mal konnte für relativ komplexe und flexible Moleküle, wie die PCB-Metaboliten, gezeigt werden, daß unsere experimentelle Herangehensweise eine wirkungsvolle Methode für die Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Substanzen eröffnet hat.

Der dritte Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der toxikologischen Wirkweise der MeSO₂-PCB im Körper. In vielen Fällen sind es gerade diese Metaboliten, die z.B. in die Hormonsynthese eingreifen. Erkenntnisse aus Untersuchungen von Johansson *et al.* belegen, daß verschiedene MeSO₂-PCB in der Lage sind, z.B. die in den Nebennierenrinden beherbergte Glucocorticoidsynthese zu inhibieren. Da dieser Effekt bei den Mutterverbindungen nicht festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß nur die Metaboliten dafür verantwortlich sind. Trotzdem werden die PCB-Metaboliten in Toxizitätsabschätzungen bislang nicht berücksichtigt.

Zwar ist bekannt, daß pharmakologische oder toxische Effekte von chiralen Pharmaka oft nur auf ein Enantiomer zurückzuführen sind, aber über chirale Umweltschadstoffe ist in dieser Hinsicht nur wenig bekannt, noch weniger über ihre Metaboliten. Deshalb ist es erforderlich, das Wissen über die Wirkweise und das toxikologische Potential der chiralen MeSO₂-PCB auszudehnen. In Zusammenarbeit mit C. Larsson und M. Johansson sollte der Einfluß der reinen MeSO₂-PCB-Enantiomere auf die Transkriptionsrate des Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-abhängigen Enzyms Tyrosinaminotransferase (TAT) untersucht werden. Binden MeSO₂-PCB kompetitiv stärker an den GR als Dexamethason, blockieren sie diesen und erniedrigen in der Folge die Transkriptionsrate des TAT-Enzyms.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß beide Enantiomere des 4-149 Auswirkungen auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad hatten, während dies bei beiden Enantiomeren des 3-149 nicht der Fall war. Diese Beobachtung befindet sich in Einklang mit einer Studie der gleichen Zelle, in der das racemische 3-149 ebenfalls keine Effekte zeigte (Johansson *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der GR nicht enantiopräferiert von den MeSO₂-PCB inhibiert wird, der GR somit über keine enantioselektive Erkennung bezüglich der MeSO₂-PCB verfügt. Allerdings unterschieden sich sehr wohl die Stellungsisomere 3-149 und 4-149 in ihren inhibitorischen Effekten. Die *para*-Position des 4-149 bewirkte eine stärkere Inhibierung des GR, vermutlich deshalb, weil dieses Molekül aufgrund seiner Linearität weniger sterische Hinderungen verursachte.

Neben der Studie über inhibitorische Einflüsse der MeSO₂-PCB auf das Hormonsystem war es von Interesse, weitere Erkenntnisse über das Abbauverhalten der PCB in der Leber zu erhalten. Da die Leber zu den aktivsten Organen im Stoffwechsel zählt, stehen die Hepatozyten im Zentrum der PCB-Forschung, wenn es darum geht, weitere Erkenntnisse über

den Abbaumechanismus der PCB zu erhalten. Bisher konnten schon einige Ergebnisse bezüglich des Abbauverhaltens der PCB festgestellt werden, z.B. daß in *para*-Position substituierte Metaboliten gegenüber den in *meta*-Position substituierten in Überzahl entstanden waren. In einer weiteren Untersuchung wurden Ratten die reinen radioaktiv markierten Enantiomere des 3-149 und das radioaktiv markierte 4-149 als Racemat i.V. injiziert. Das racemische 4-149 zeigte nur eine geringe Exkretion in die Galle bzw. Intestinaltrakt und bestätigte somit die in der vorhergehenden Untersuchung gefundene höhere Akkumulation der an 4-Position substituierten MeSO₂-PCB in der Leber. Ähnlich geringe Exkretionsraten zeigte auch das zweiteluierende 3-149 Enantiomer. Die in Galle und Intestinaltrakt gefundene Radioaktivität stammte nahezu vollständig von dem ersteluierenden Enantiomer. ^[133]

Die früheren Untersuchungen konnten allerdings nicht abschließend klären, ob entweder eine enantioselektive Bildung der MeSO₂-PCB aus den PCB erfolgt oder ob das ersteluierende Enantiomer verstärkt abgebaut wird. Die Vermutung lag nahe, daß letzteres zutreffen könnte. Um diese These zu beweisen, wurde von mir folgendes Experiment vorgenommen: Mit einer Nährlösung präparierte Rattenhepatozyten sollten mit dem PCB 149 und in einer zweiten Petrischale mit dem 3-149 Metaboliten versetzt werden und nach der Aufarbeitung mittels GC und GC/MS auf enantioselektives Metabolisierungsverhalten untersucht werden.

Die Untersuchung ergab, daß die Muttersubstanz, das PCB 149, nicht enantioselektiv abgebaut wurde, das Transformationsprodukt 3-149 aber sehr wohl. Wird davon ausgegangen, daß hauptsächlich MeSO₂-PCB aus den Muttersubstanzen gebildet wurden, muß daraus folglich geschlossen werden, daß die für den Metabolismus zum Methylsulfonyl-Abbauprodukt verantwortlichen Cytochrome und weiteren Enzyme keinen chiralen Diskriminierungsschritt enthalten. Sofern die racemischen 3-149 Metaboliten entstanden sind, werden sie entweder enantioselektiv weiter metabolisiert oder enantioselektiv transportiert. Experimente mit Hepatozyten sind diesbezüglich sehr sinnvoll, weil sie eine vom restlichen Organismus getrennte Betrachtung der Leber und somit Rückschlüsse auf die ihre spezifische Arbeitsweise erlauben. Im Falle der weiteren Metabolisierung der 3-149 Metaboliten würden spezifischere, d.h. enantioselektiv arbeitende Enzyme in den Prozeß eingreifen. In Anbetracht der Ergebnisse von Johansson *et al.* ist es auch denkbar, daß der enantioselektive Schritt in einem selektiven Transport zu den Ausscheidungsorganen liegen könnte. ^[133] Weitere Experimente werden diesen Sachverhalt aufklären müssen.

Das abschließende Kapitel dieser Arbeit befaßt sich mit der Analyse verschiedener terrestrischer Biotaprobe n auf PCB und MeSO₂-PCB. Untersucht wurden Füchse aus Schleswig-Holstein, Rehe und Wildschweine aus der Region um Dessau und Humanproben aus Prag sowie ein Pelikan aus dem Prager Zoo. Neben dem Fettgewebe bei allen Biotaprobe n wurde bei den Wildschweinen und Rehen auch Leber- und Lungengewebe

analysiert. Verglichen mit anderen Chlororganika wurden PCB in den Fuchs- Wildschwein- und Rehproben in relativ geringer Konzentrationen gefunden (78 - 1566 ng/g EOM). Im Gegensatz dazu wurden im Humanfett hohe PCB-Konzentrationen festgestellt, übertroffen nur noch von der Pelikanfettprobe (137 µg/g EOM). Bei den Fuchs-, Wildschwein- und Rehproben lagen die Konzentrationen der MeSO₂-PCB unter und in den Humanproben leicht über der Bestimmungsgrenze. Tendenziell wurden die in *para*-Stellung substituierten Metaboliten in höheren Konzentrationen als die in *meta*-Stellung substituierten gefunden. Die Pelikanfettprobe war aufgrund der höheren Konzentration an MeSO₂-PCB-Metaboliten auch der enantioselektiven gaschromatographischen Analyse zugänglich. Die Enantiomerenverhältnisse ergaben eine Bevorzugung des ersteluiden Enantiomers der 4-MeSO₂-PCB und umgekehrte Verhältnisse der 3-MeSO₂-PCB und damit eine generelle Präferenz der *R*-Konfigurationen.

8. Summary

Nowadays, the main problem of PCB-contamination is not related to spectacular accidents as encountered in the 60ties and 70ties, in particular Yu Sheng or Yusho with thousands of victims, but it is connected to the “background-contamination” of these chlorinated compounds. This leads to a permanent uptake from little amounts of contaminants which exhibit a high bioaccumulation potential according to their lipophilic properties. Though the legislator restricted the usage of PCB in 1989, the PCB-burden is decreasing very slowly. These persistent environmental contaminants have arrived in everyone of us, world wide in different concentrations, via the uptake from mother milk or from food. Insofar, we are the heirs of past or present environmental sins and we have to cope with it daily. On their way through the body these substances show influences on various life processes. The toxicological effects of PCBs are manifold and since the Yu Sheng and Yusho accidents matter of countless investigations. Decreasing and relatively low concentrations as encountered nowadays, do not allow the conclusion that the PCB problem has been solved. On the contrary, special emphasis is now being placed on the toxicological effects of PCB and their metabolites. Possibly, PCB-metabolites exert an additional influence on the sensitised immune system of many people.

Atropisomeric PCB and MeSO₂-PCB, respectively, are assumed to represent good chiral indicators, because many enzyme systems can recognise these activating substrates enantioselectively. According to the numerous possible substrates it is necessary that they possess highly selective recognizing mechanisms, in order to allow the “right” substrate only to bind to the receptor of the enzyme. As atropisomeric MeSO₂-PCB can exert biomimetic effects on the glucocorticoid-receptor, they are predestined for studies about their metabolism- and effect-mechanisms in the body.

Kato *et al.* already reported that some 3-MeSO₂-PCBs can induce different cytochromes significantly.^[63,144] Consequently, it was assumed that part of the toxicological effects induced by PCBs actually are related to MeSO₂-PCB. Furthermore, differential toxic effects of the MeSO₂-PCB enantiomers have been postulated. A verification of these assumptions required the enantioselective separation of the MeSO₂-PCB-enantiomers by HPLC, the determination of the absolute structures and a systematic investigation of the different toxic effects of the MeSO₂-PCB-enantiomers. The knowledge about absolute structures will allow a deepened insight into the enzyme-substrate-interactions according to the PCB-transformation processes and a closer view related to the mechanism of the enantioselective substrate-selection of some enzymes.

First the racemic MeSO₂-PCB had to be separated into their enantiomers quantitatively, followed by the determination of the absolute structure as well as different toxic effects of

these enantiomers. Therefore, the first part of this work deals with the quantitative enantioselective separation of the MeSO₂-PCB with chiral stationary phases using HPLC which allowed to obtain sufficiently high amounts of pure enantiomers for further experiments in a short time. In the present case optimum separation was achieved by a permethylated and an incompletely methylated *b*-cyclodextrine-column, respectively. In general only cyclodextrine-derivates have been shown to be useful in the enantiomeric separation of the atropisomeric PCB. Covalently bound macrocyclic antibiotics did not allow any enantiomeric HPLC-separation. It is worth noting that even slight differences in the degree of methylation can give rise to totally different results in enantiomeric separation of the same MeSO₂-PCB. This emphasises how sensitively enantioselective separations are responding to very small variations in the composition of the column-material or the system parameters.

The first step of the study on the enantioselective separation consisted of the optimisation of the HPLC-parameters. In a second step the system was further optimised by introducing a peak-high-controlled autosampler, thus reducing the time-, cost and solvent-expense drastically. The optimised process allowed a quantitative enantiomeric separation with high purity (> 99,x %), even when the enantiomers are not baseline separated (T > 50 %). The enantiomers of the MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149 and 3-174 were separated successfully in amounts between 0,3 and 3,1 mg.

After polarimetric determination of the sense of rotation for MeSO₂-PCB 3-132 and 4-132 the second part of this work aimed at the determination of the absolute structures of 3-132, 4-132, 3-149 and 3-174. As these congeners did not crystallise sufficiently well-shaped for x-ray investigations, new possibilities to determine the absolute molecular structure had to be found. It turned out that VCD (vibrational circular dichroism) in combination with *ab initio* calculations in the present case was an appropriate approach.

VCD is an IR spectroscopic polarisation method, where circular polarised infrared light in present of a chiral sample leads to a difference spectrum, which is obtained when the absorption of the right circularly polarised light is subtracted from the absorption of the left polarised light. For achiral substances this difference is zero, while pure enantiomers lead to complementary spectra. VCD-spectra are difficult to obtain because the difference between the interactions of left and right circularly polarised light are in a range from 10⁻⁴ to 10⁻⁶ absorption units, so only very few valuable and sensitive spectrometers which were developed in the last years are able to cope with these strict requirements.

For every enantiomer specific VCD spectra were obtained, but an assignment of the spectrum to the respective enantiomer on empirical basis only was impossible, because it is difficult to predict the interactions of a certain vibration mode with circularly polarised light. So it was necessary to produce computer simulated spectra to infer the absolute configuration

of the enantiomers from the experimental data. Therefore, quantum chemical *ab initio* computer calculations had to be performed which were able to simulate the vibration modes of a molecule and its interactions with circularly polarised light. Usually, an assignment of the bands in the experimental vibration spectrum to the normal mode of the molecule can be achieved. However, in the case of the PCB derivatives this would be extremely difficult, because the number of normal modes for these molecules is very high. As a consequence, the assignment of the VCD-spectra in this work was accessible only by comparison of the experimental with the calculated spectra.

The approach was as follows: First a calculated geometric optimisation of the MeSO₂-PCB was performed. The result was a relatively flat energy minimum of the phenyl rings at an angle of 88° to 90°. Thereafter, the VCD-spectrum was calculated for the optimised geometry of the MeSO₂-PCB, but the comparison with the experimental spectra of both enantiomers was still unsatisfactory. Then, the energy minimised potential energy surface scans of the methylsulfonyl group were also included into the calculation. This was leading to a good comparability of the experimental and calculated spectra in the region between 1400 cm⁻¹ and 1100 cm⁻¹. Therefore, the energy minima for the methylsulfonyl group with fixed geometry in the rest of the molecule were calculated. In total three distinguishable energy minima were obtained. Two of the three structures were the same regarding the energy minima while the third structure showed a relatively high energy. Therefore, the spectra were weighed in the relationship 2:2:1 and fused to one spectrum. Comparison of the calculated with the experimental spectra allowed the determination of the absolute structures of the MeSO₂-PCB 3-149, 3-132, 4-132 and 3-174. Thus it was shown that our experimental approach represents a powerful method for the determination of the absolute configuration of relatively complex and flexible chiral substances such as the MeSO₂-PCBs.

The third part of this work deals with the toxicological effects of the MeSO₂-PCB on living beings. Results from joint investigations of Johannsson *et al.* and the present author prove that different MeSO₂-PCB are able to inhibit the glucocorticoid synthesis in the cortex of suprarenal gland. As this effect was not observed for the respective parent compounds, it can be safely assumed that inhibition effects of this kind that may be found in extracts of environmental samples have to be rather attributed to the action of the metabolite than to the parent PCB. Furthermore, these results stress the necessity of including the transformation products in toxicological studies of environmental contaminants.

Differential pharmaceutical as well as toxic effects are well documented for chiral pharmaceuticals, but the knowledge on enantioselective toxic effects of chiral environmental contaminants is scarce. Therefore, it was another aim of the present work to extend the knowledge about receptor interaction mechanisms and the toxicological potential of the chiral MeSO₂-PCB. In co-operation with C. Larsson and M. Johansson the influence of the pure MeSO₂-PCB enantiomers on the transcription rate of the glucocorticoid receptor (GR)

dependent enzyme tyrosinaminotransferase (TAT) was investigated. If the MeSO₂-PCBs bind competitively stronger to the GR than dexamethasone they block it and lower, as a consequence, the transcription rate of the TAT-enzyme.

Our results have shown that both enantiomers of the 4-149 exert an impact on the glucocorticoid dependent signalling pathway, while this was not the case for both enantiomers of the 3-149. This observation was in agreement with a study of the same type of cells, where the racemic 3-149 was not exerting any effects (Johansson *et al.* in preparation). The results have shown that the GR is not inhibited enantioselectively by the MeSO₂-PCB, and that the GR has no enantioselective recognition with regard to these MeSO₂-PCBs. But the isomers 3-149 and 4-149 possess significantly different effects regarding the inhibitory effects. The *para*-position of the 4-149 caused a stronger inhibition of the GR, possibly because this linear molecule causes less steric hindrance.

In addition to the study about the inhibitory influences of the MeSO₂-PCB on the hormone system the transformation of PCBs in the liver was of particular interest, because the liver is one of the most active metabolising organs. Laboratory investigations with hepatocytes showed that in *para*-position substituted metabolites were preferentially formed as compared with the respective *meta*-derivative. In a further study the pure radioactive labelled enantiomers of the 3-149 as well as the radioactive labelled 4-149 racemate were injected into the veins of rats. The racemic 4-149 showed a lower excretion rate into the bile and the intestinal tract, respectively. This is in line with higher accumulation rates of 4-MeSO₂-PCB in the liver reported in the literature. Similar low excretion rates also showed the second eluting enantiomer. The radioactivity found in bile and intestinal tract stemmed nearly completely from the first eluting enantiomer.^[133]

These observations can be based on an enantioselective formation of the second-eluting 4-MeSO₂-PCB, or, alternatively on a preferential transformation of the first-eluting enantiomer. Clarification of this problem was expected by the following experimental approach: Rat hepatocytes, treated with a liquid fertilizer, were mixed with PCB 149 and in a second petri dish with the 3-149 metabolite. After cleanup of the samples enantioselective transformation was analysed using GC-ECD and GC-MS.

The investigation showed that the parent PCB 149 was not transformed enantioselectively in contrast to its metabolite 3-149. If it is assumed that mainly the 3-149 is formed by transformation of the parent compound, it can be concluded that the cytochromes and enzymes which are responsible for the transformation process do not include a chiral discrimination information. It should be noted that in addition to enantioselective formation and transformation processes also enantioselective transport processes may play a role. This can only be settled by further experiments.

The last chapter of this work is dealing with the organ-specific analysis of PCB and MeSO₂-PCB in terrestrial biota-samples. Foxes from Schleswig-Holstein, boars and deer from the Dessau-region close to the former chemistry plant Bitterfeld and human samples from Prague, as well as a pelican from the zoo Prague were selected for these analyses. In all biota-samples fat tissue was investigated, while lung- and liver-tissues were analysed in boars and deers only. Compared to other chlorinated compounds PCB have been detected in fox-, boar- and deer-samples in relatively low concentrations (78 – 1566 ng/g EOM). However, in human samples high amounts of PCB were detected, exceeded by the pelican fat sample only (137 µg/g EOM). For the fox-, boar- and deer samples the MeSO₂-PCB concentrations ranged below and the human samples slightly above the limit of quantitation. In general the *para*-substituted metabolites were found in higher concentrations than the *meta*-substituted ones. The pelican fat sample was accessible to enantioselective gas chromatographic analysis due to higher MeSO₂-PCB concentrations. The enantiomeric ratios showed a preference of the first-eluting enantiomer for the 4-MeSO₂-PCB and of the second-eluting enantiomer for the 3-MeSO₂-PCB, which in both cases is consistent with a preference of the *R*-configuration.