

**Untersuchung der DNA-bindenden Eigenschaften neuer  
Nukleobasen-gekoppelter Pyrrolcarboxamide, Combilexine  
und Hetaren[a]carbazol-Derivate: Validierung und Etablierung von  
*in vitro*- und *in silico*-Methoden**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Medizinische / Pharmazeutische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Danielle Catherine Buckert

geboren in Idar-Oberstein

Mainz, 2007

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Buckert, D.; Benzschawel, K.; Pindur, U.; DNA Binding Studies of New Combilexines:  $T_m$ -Value-Measurements and Molecular Modelling; Posterpräsentation bei der Jahrestagung-Joint Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 4.-7. Oktober **2006** in Marburg

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AP	Adenosinmonophosphat
Å	Ångström
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> (Angiotensin-Konversionsenzym)
ADEPT	<i>Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
$a_i$	Beschleunigung, die das Atom $i$ zu einem bestimmten Zeitpunkt erfährt
AK	Antikörper
AM1	<i>Austin Model 1</i>
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
au	<i>atomic unit</i>
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar einer DNA oder einer doppelsträngigen RNA)
BPE-Puffer	Bisphosphat-EDTA-Puffer
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
C	Cytidin
CP	Cytidinmonophosphat
$C_{50}$ -Wert	Substanzkonzentration, die beim Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eine 50%ige Abnahme der Fluoreszenz bewirkt
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
CNDO	<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i> (Cambridge Strukturdatenbank)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTP	<i>Developmental Therapeutics Program</i> (Programm des NCI zur Entwicklung neuer antitumoraktiver Therapeutika)
e	<i>electrons</i>

$\Delta E$	Komplexbildungsenergie
ECEPP	<i>Empirical Conformational Energy Program for Peptides</i>
EDA-Komplex	Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$E_{\text{elec}}$	Energie eines molekularen Systems, die aus der Lösung der elektronischen <i>Schrödinger</i> -Gleichung resultiert
$\Delta E_{\text{elec}}$	Energiebetrag, der auf <i>Coulomb</i> -Interaktionen zurückzuführen ist
$\Delta E_{\text{H-Bonds}}$	Energiebetrag, der auf die Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zurückzuführen ist
$E_{\text{HOMO}}$	Energie des HOMO
$E_{\text{kin}}$	kinetische Energie eines molekularen Systems
$E_{\text{LUMO}}$	Energie des LUMO
$E_{\text{pot}}$	potentielle Energie eines molekularen Systems
EtdBr	Ethidiumbromid
$E_{\text{tot}}$	absolute Energie eines molekularen Systems
eV	Elektronenvolt
$\Delta E_{\text{vdW}}$	Energiebetrag, der auf van der Waals-Interaktionen zurückzuführen ist
F	Farad
$F_i$	Kraft, die auf ein Atom $i$ zu einem bestimmten Zeitpunkt einwirkt
fs	Femtosekunde(n)
G	Guanosin
GP	Guanosinmonophosphat
GI <sub>50</sub>	<i>50% Growth Inhibition</i> (Testsubstanzkonzentration, die eine 50%ige Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt)
$\hat{H}_{\text{elec}}$	elektronischer Hamilton-Operator
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2)
$\Delta H_f$	<i>Heat of Formation</i> (molare Bildungsenthalpie)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (höchstes besetztes Molekülorbital)
Hy	Hydroxypyrrrol
ICM	<i>Internal Coordinate Mechanics</i>



Im	Imidazol
INDO	<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>
INSERM	<i>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale</i>
IR	Infrarot (Spektroskopie)
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>
$J_n$ (R)	Term der <i>Schrödinger</i> -Gleichung, der die kinetische Energie der Kerne repräsentiert
K	Kelvin
$K_{app}$	<i>Apparent Binding Constant</i> (Bindekonstante)
k $\Omega$	Kiloohm
lat.	lateinisch
LC <sub>50</sub>	<i>Lethal Concentration, 50%</i> (Testsubstanzkonzentration, die 50% der Krebszellen abtötet)
LCAO	<i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i> (Linearkombination der Atomorbitale)
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital)
M	mol/l
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MC	Monte Carlo
MCM	<i>Monte Carlo Minimization</i> (Kombination aus einem Monte Carlo- und einem Geometrieoptimierungsverfahren zur Simulation von Rezeptor-Ligand-Komplexen)
MD	Moleküldynamik
MEP	Molekulares elektrostatisches Potential
MG_MID	<i>Mean Graph Midpoint</i> (Mittelwert des negativen dekadischen Logarithmus der Testsubstanzkonzentration, die einen bestimmten Effekt auf die Krebszellen ausübt; vom NCI unter Berücksichtigung aller getesteten Krebszelllinien berechnet)
MINDO	<i>Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>
MM	<i>Molecular Mechanics</i>
MMC	<i>Metropolis Monte Carlo</i> (spezielles Monte Carlo-Verfahren)
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i>

MNDO	<i>Modified Neglect of Differential Overlap</i>
MNDO/d	<i>Modified Neglect of Differential Overlap</i> , unter Einbeziehung von d-Orbitalen
MO	Molekülorbital
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Bethesda, MD, USA)
NDO	<i>Neglect of Differential Overlap</i>
Net.	Netropsin
ng	Nanogramm
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance (Spectroscopy)</i>
NTC	<i>Negative Temperature Coefficient</i> (negativer Temperaturkoeffizient; bei Widerständen: bessere Stromleitung bei höheren Temperaturen)
OPLS	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulation</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PDB	Proteindatenbank
PM3	<i>Parametric Method Number 3</i>
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
ps	Pikosekunde(n)
Py	Pyrrrol
QM	Quantenmechanik
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> (Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen)
Raf	<i>Ras-activated Factor</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i> (Kinase, die zum ersten Mal in von Ratten stammendem Sarkomgewebe entdeckt wurde)
$r_i$	Aufenthaltort des Atoms $i$ zu einem bestimmten Zeitpunkt
RMSD	<i>Root Mean Square Distance</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SCF	<i>Self Consistent Field</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SRB	Sulforhodamin B
t	Zeit
T	Thymidin

TP	Thyminmonophosphat
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i> (Testsubstanzkonzentration, die eine vollständige Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt)
$T_m$	<i>Melting Temperature</i> (Schmelztemperatur der DNA)
TNDO	<i>Typed Neglect of Differential Overlap</i>
TOPO	Topoisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
UV/Vis	<i>Ultraviolet/Visible (Spectroscopy)</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
$v_i$	Geschwindigkeit des Atoms $i$ zu einem bestimmten Zeitpunkt
$\vartheta_{nn}(R,R)$	Term der <i>Schrödinger</i> -Gleichung, der die potentielle Energie der Kern-Kern-Abstoßung repräsentiert
WW	Wechselwirkung
$\Psi_{elec}$	elektronische Wellenfunktion
ZINDO	<i>Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Soweit keine adäquate Übersetzung existiert, wurden in der vorliegenden Arbeit die in der englischsprachigen Literatur gebräuchlichen Fachausdrücke verwendet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	Krebs: Tumorgenese und Chemotherapie	1
1.2	Molecular Modelling in der Arzneimittelentwicklung	6
1.3	Zielsetzung	9
<b>2.</b>	<b>DNA und DNA-Ligand-Interaktionen</b>	<b>17</b>
2.1	<b>DNA</b>	<b>17</b>
2.1.1	Struktureller Aufbau der DNA	17
2.1.2	Topologie der DNA und Topologie-modifizierende Enzyme	20
2.2	<b>Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen</b>	<b>26</b>
2.2.1	Hydrophobe Bindung	26
2.2.2	van der Waals-Kräfte (= Dispersionskräfte)	27
2.2.3	Elektrostatische Wechselwirkungen	28
2.2.4	Wasserstoffbrücken-Bindung	30
2.2.5	Charge-Transfer-Komplexbildung	31
2.3	<b>DNA-Bindemodi der Liganden</b>	<b>33</b>
2.3.1	Interkalation und interkalierende Verbindungen	33
2.3.2	Minor Groove Binding, rinnenbindende Moleküle und Lexitropsine/Hairpins	40
2.3.3	Dualer Bindemodus und Hybrid-Moleküle/Combilexine	50
2.3.4	Hoogsteen-Basenpaarung und PNAs	55
<b>3.</b>	<b>Biophysikalische und biochemische Experimente</b>	<b>59</b>
3.1	<b>Angaben zu den verwendeten Geräten</b>	<b>59</b>
3.1.1	Spektroskopische Methoden	59
3.1.1.1	<i>Absorptionsspektroskopie</i>	59
3.1.1.2	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	60
3.1.2	Molekularbiologisch-analytische Methoden	60
3.2	<b>Reagenzien</b>	<b>61</b>
3.2.1	Puffersysteme	61

3.2.2	Molekularbiologisches Material	62
3.2.2.1	<i>DNA</i>	62
3.2.2.2	<i>Enzyme</i>	62
3.2.3	Referenzsubstanzen	62
3.2.4	Testsubstanzen	63
3.2.5	Sonstige Reagenzien	63
<b>3.3</b>	<b>Software zur Messung und Auswertung molekularbiologischer Daten</b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungsmethoden</b>	<b>64</b>
3.4.1	Thermische Denaturierung der DNA – $T_m$ -Wert-Messung	64
3.4.1.1	<i>Theorie</i>	64
3.4.1.2	<i>Praktische Durchführung</i>	66
3.4.2	Topoisomerase I-Hemmtest	70
3.4.2.1	<i>Theorie</i>	70
3.4.2.2	<i>Praktische Durchführung</i>	77
3.4.3	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay	80
3.4.3.1	<i>Theorie</i>	80
3.4.3.2	<i>Praktische Durchführung</i>	82
3.4.4	Zytotoxizitätstests des NCI	85
<b>4</b>	<b>Molecular Modelling: Theoretische Methoden, Software</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Theoretische Methoden</b>	<b>89</b>
4.1.1	Molekülmechanik/Kraftfeld	89
4.1.1.1	<i>AMBER</i>	91
4.1.2	Quantenmechanik	92
4.1.2.1	<i>AM1</i>	96
4.1.3	Geometrieoptimierung	97
4.1.4	Konformeranalyse	100
4.1.4.1	<i>Moleküldynamik</i>	101
4.1.4.2	<i>Monte Carlo</i>	104

<b>4.2</b>	<b>Software (Molecular Modelling-Programmpakete)</b>	<b>108</b>
4.2.1	SPARTAN	108
4.2.2	HYPERCHEM	109
4.2.3	ICM-PRO	111
<b>5.</b>	<b>Molecular Modelling-Studien zu DNA-Liganden und DNA-Ligand-Interaktionen</b>	<b>114</b>
<b>5.1</b>	<b>Konzept zur Durchführung der Molecular Modelling-Studien (Fließdiagramm)</b>	<b>114</b>
<b>5.2</b>	<b>Berechnungen mit SPARTAN</b>	<b>116</b>
5.2.1	Validierung des Programms unter Verwendung von Kristallstrukturen	116
5.2.2	Berechnung der potentiellen DNA-Liganden	122
<b>5.3</b>	<b>Berechnungen mit HYPERCHEM</b>	<b>128</b>
5.3.1	Auswahl geeigneter DNA-Rezeptoren aus der PDB-Datenbank	128
5.3.2	Berechnung der DNA-Rezeptoren	129
<b>5.4</b>	<b>Docking</b>	<b>134</b>
5.4.1	Docking-Studien mit ICM-PRO	134
5.4.1.1	<i>Validierung des Programms</i>	134
5.4.1.2	<i>DNA-Ligand-Docking</i>	140
5.4.2	Optimierung der DNA-Ligand-Komplexe mit HYPERCHEM (Refinement)	143
5.4.3	Untersuchung der Konformationen der DNA-gebundenen Liganden mit SPARTAN	145
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse der Computersimulationen und der biochemischen und biophysikalischen Experimente</b>	<b>147</b>
<b>6.1</b>	<b>Basis-Strukturen</b>	<b>147</b>
6.1.1	Interkalatoren	147
6.1.1.1	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	147
6.1.1.2	<i>T<sub>m</sub>-Wert-Messungen</i>	149

6.1.1.3	<i>Molecular Modelling-Studien</i>	149
6.1.1.4	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	156
6.1.2	Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide	157
6.1.2.1	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	157
6.1.2.2	<i>T<sub>m</sub>-Wert-Messungen</i>	159
6.1.2.3	<i>Molecular Modelling-Studien</i>	160
6.1.2.4	<i>Zytotoxizitätsstudien des NCI</i>	177
6.1.2.5	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	178
<b>6.2</b>	<b>Mono- und Bispyrrolcarboxamide mit N-terminal gekoppelten Nukleobasen</b>	<b>182</b>
6.2.1	Einleitung und Zielsetzung	182
6.2.2	T <sub>m</sub> -Wert-Messungen	185
6.2.3	Topoisomerase I-Hemmtests	187
6.2.4	Molecular Modelling-Studien	188
6.2.5	Zytotoxizitätsstudien des NCI	206
6.2.6	Diskussion der Ergebnisse	206
<b>6.3</b>	<b>Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide mit N-terminal gekoppelten Interkalatoren / Combilexine</b>	<b>212</b>
6.3.1	Einleitung und Zielsetzung	212
6.3.2	T <sub>m</sub> -Wert-Messungen	219
6.3.3	Topoisomerase I-Hemmtests	224
6.3.4	Ethidiumbromid-Verdrängungsassays	226
6.3.5	Molecular Modelling-Studien	228
6.3.6	Zytotoxizitätsstudien des NCI	254
6.3.7	Diskussion der Ergebnisse	256
<b>6.4</b>	<b>Hetaren[a]carbazol-Derivate</b>	<b>279</b>
6.4.1	Einleitung und Zielsetzung	279
6.4.2	T <sub>m</sub> -Wert-Messungen	282
6.4.3	Topoisomerase I-Hemmtests	283
6.4.4	Ethidiumbromid-Verdrängungsassays	285
6.4.5	Molecular Modelling-Studien	287
6.4.6	Zytotoxizitätsstudien des NCI	293
6.4.7	Diskussion der Ergebnisse	295

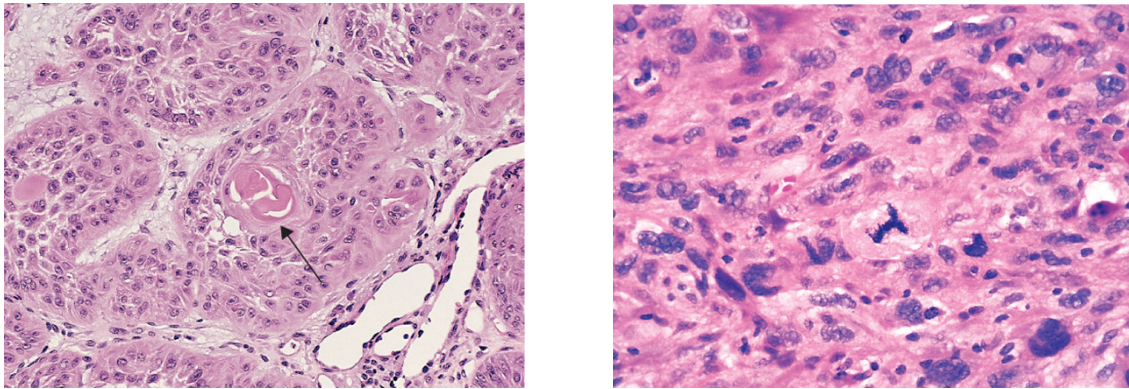
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>300</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>311</b>
<b>8.1</b>	<b>Strukturformeln</b>	<b>311</b>
8.1.1	Referenzsubstanzen	311
8.1.2	Testsubstanzen	312
<b>8.2</b>	<b>Dateiformate, die die Kompatibilität der verschiedenen Molecular Modelling-Programme ermöglichen</b>	<b>319</b>
8.2.1	Überführung der SPARTAN-Dateien in HYPERCHEM- und in ICM-PRO-Dateien	319
8.2.2	Überführung der ICM-PRO-Dateien in HYPERCHEM- und in SPARTAN-Dateien	320
<b>8.3</b>	<b>Winkel der als Rezeptoren verwendeten DNA-Oligomere vor und nach den zur Energieminimierung durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen</b>	<b>321</b>
8.3.1	Rezeptor „polyA“	322
8.3.2	Rezeptor „polyAT“	324
8.3.3	Rezeptor „polyG“	326
8.3.4	Rezeptor „polyGC“	328
8.3.5	Rezeptor „1G3X“	330
8.3.6	Rezeptor „102D“	334
<b>8.4</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>338</b>



# 1. Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Krebs: Tumorgenese und Chemotherapie

Den Angaben des Statistischen Bundesamtes zur Folge erlag 2005 etwa jeder 4. Verstorbene einer malignen Neoplasie (25,5%), die nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (44,2%) die zweithäufigste Todesursache darstellt <sup>[1]</sup>. Bei Männern führen vor allem Tumoren der Verdauungs- und der Atmungsorgane zum Tode, während Frauen ebenfalls insbesondere an bösartigen Tumoren der Verdauungsorgane, sowie an Mammakarzinomen versterben <sup>[1]</sup>.



**Abb. 1.1:** Mikroskopisch vergrößerte Darstellungen von bösartig entartetem Gewebe

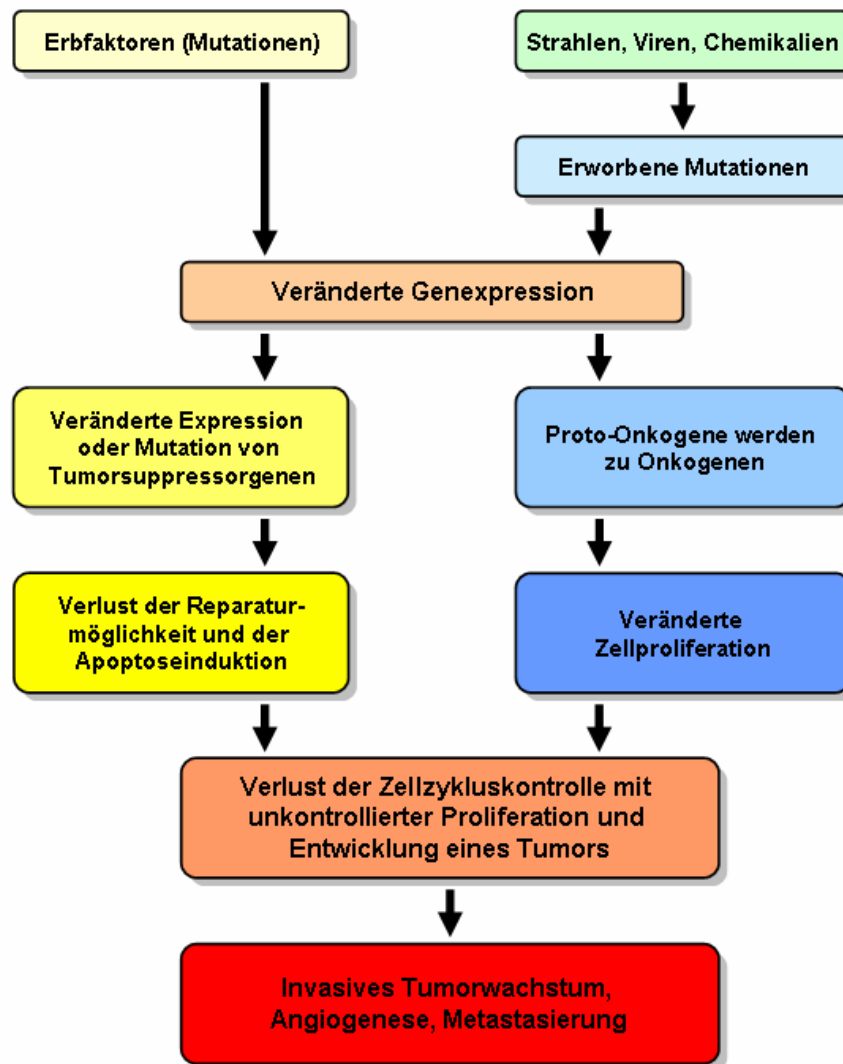
Links: Plattenepithelkarzinom der Haut; die Tumorzellen weisen interzelluläre Brücken und Nester aus Keratin-Perlen auf (durch den Pfeil gekennzeichnet) <sup>[2]</sup>

Rechts: Anaplastische Tumorzellen, die ebenso wie ihre Nuklei in Größe und Form variieren; die Zelle in der Mitte weist eine abnormale tripolare Spindel auf <sup>[2]</sup>

Die bei Tumoren entarteten Prozesse der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose werden unter physiologischen Bedingungen durch entsprechende Signalstoffe (→ Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, proapoptotische Signalstoffe) streng reguliert <sup>[3,4]</sup>. Die Gene, deren Produkte (z. B. Enzyme der Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade) an der Zellteilung, der Wachstumskontrolle und der Zelldifferenzierung beteiligt sind, werden als Proto-Onkogene bezeichnet <sup>[3-5]</sup>. Durch Mutationen, die Veränderungen der Basensequenzen oder gesteigerte Expressionsraten bedingen, werden diese Gene in die sog. Onkogene umgewandelt, deren Transkrip-

tion ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge hat <sup>[3-5]</sup>. Sowohl genetische Faktoren als auch exogene Noxen wie ionisierende Strahlen, chemische Karzinogene (z. B. aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, halogenierte aliphatische Verbindungen) oder onkogene Viren (z. B. humane Papillomaviren, Hepatitis C-Virus) können eine Schädigung der proliferationsfördernden Gene hervorrufen <sup>[4,5]</sup>. Die Tumorsuppressor-Gene (z. B. p53) codieren für Proteine (z. B. Caspasen), die den Zellzyklus kontrollieren, das Wachstum hemmen und bei einer Schädigung der Zelle oder des Genoms die Apoptose auslösen <sup>[3-5]</sup>. Demnach führt der Funktionsverlust der Tumorsuppressor-Gene, ebenso wie die Transformation von Proto-Onkogenen in Onkogene, zur Umwandlung einer normalen in eine maligne Zelle (Initiation) <sup>[3-5]</sup> (Abb. 1.2, Seite 3). Da der Stoffwechsel einer humanen Zelle von zahlreichen Kontroll- und Steuermechanismen reguliert wird, sind Mutationen in mehreren Tumorsuppressor- und/oder Proto-Onkogenen erforderlich, damit sich ein manifester Tumor entwickeln kann <sup>[4]</sup>.

Nach der Entartung der Zelle beginnt die Proliferationsphase (Promotion), für die die Angiogenese, d. h. die Bildung von Blutgefäßen zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors, von entscheidender Bedeutung ist <sup>[4,5]</sup>. Nachdem die Geschwulst eine gewisse Größe erreicht hat, beginnen die Krebszellen daher mit der Sezernierung verschiedene Wachstumsfaktoren (u. a. VEGF), die das umliegende Bindegewebe zur Gefäßneubildung veranlassen <sup>[4]</sup>. Neben ihrem unkontrollierten, invasiven und destruierenden Wachstum (Progression) zeichnen sich maligne Tumore auch durch ihre Neigung zur Metastasierung aus, die bei Krebspatienten häufig zum Tode führt <sup>[4,5]</sup>.



**Abb. 1.2:** Vereinfachte Darstellung der Tumorgenese <sup>[4]</sup>

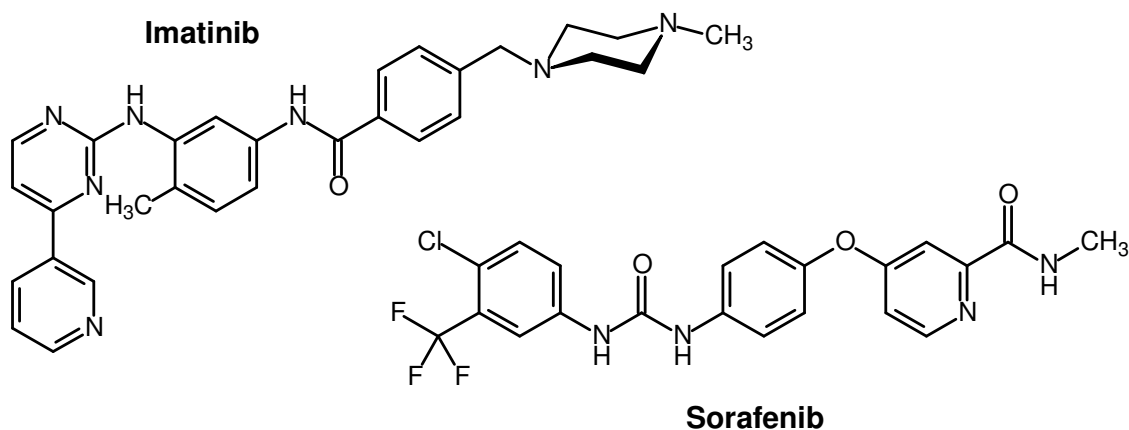
Da es sich bei der malignen Neoplasie um eine Erkrankung der Gene handelt, stellt die DNA ein wichtiges Target für antitumoraktive Substanzen dar <sup>[6-9]</sup>. So ruft die Majorität der Wirkstoffe, deren Einsatz sich in der Krebstherapie etabliert hat, direkte oder indirekte DNA-Schäden hervor, die auf ihre reversible oder irreversible DNA-Bindung (z. B. Interkalatoren wie die Anthrazykline; Kapitel 2.3.1, Seite 36 ff.), ihre Topoisomerase-inhibierenden Eigenschaften (Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.) oder auf ihre Interaktion mit Tubulin-Dimeren zurückzuführen sind <sup>[3-9]</sup>. Die Selektivität dieser mit DNA oder den DNA-assoziierten Enzymen interagierenden Chemotherapeutika beruht im Wesentlichen auf der verstärkten Proliferation und der veränderten Enzymexpression der Tumorzellen, so dass auch gesunde Gewebe, die durch eine physio-

logisch bedingte erhöhte Zellteilungsrate gekennzeichnet sind (v. a. das Knochenmark, das Epithel des Gastrointestinaltrakts und die Haarfollikel), von diesen Substanzen stark geschädigt werden <sup>[4,7,9,10]</sup>. Aus diesem Grund werden zur Tumorthherapie zunehmend auch Substanzen wie monoklonale Antikörper oder Kinase-Inhibitoren herangezogen, die aufgrund eines divergenten Wirkmechanismus eine höhere Tumorspezifität aufweisen und auf diese Weise eine gezielte und nebenwirkungsarme Behandlung verschiedener Krebserkrankungen ermöglichen <sup>[3,4,9,10]</sup>.

Bei der Entwicklung von zytostatisch aktiven Antikörpern wird die Beobachtung ausgenutzt, dass einige Tumorzellen bestimmte Oberflächenantigene überexprimieren <sup>[3,4,10]</sup>. So richtet sich der humanisierte, monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) gegen die extrazelluläre Domäne des Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), der von etwa 20-30% der Brustkrebszellen verstärkt ausgebildet wird <sup>[3,4,10]</sup>. Durch die Rezeptor-Bindung des Trastuzumab werden die HER2-vermittelten Wachstumssignale, die die Tumorzellen zur unkontrollierten Proliferation veranlassen, gehemmt <sup>[3,4]</sup>. Darüber hinaus aktiviert der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex das Komplementsystem und T-Killerzellen, die die markierten Brustkrebszellen lysieren und somit abtöten <sup>[3]</sup>. Trastuzumab wird zur Therapie des metastasierten, HER2-positiven Mammakarzinoms eingesetzt <sup>[3,4,10]</sup>. Der 2005 zugelassene Antikörper Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) stellt den ersten klinisch anwendbaren Angiogenesehemmer dar, der bei fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom indiziert ist <sup>[11]</sup>. Der Antikörper bindet an den Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und verhindert somit das Andocken des Botenstoffs an seinen Rezeptor <sup>[11]</sup>. VEGF wird von zahlreichen malignen Zellen sezerniert, um das umliegende Endothelgewebe zur Bildung tumorversorgender Blutgefäße anzuregen, so dass die Bevacizumab-vermittelte Inaktivierung des Wachstumsfaktors eine Hemmung der Tumorpheriferation und der Metastasenbildung zur Folge hat <sup>[11]</sup>.

Bei Imatinib (Glivec<sup>®</sup>; Abb. 1.3, Seite 5) handelt es sich um den ersten zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitor, der zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt wird <sup>[3,9]</sup>. Die oral verfügbare Substanz hemmt die nach einer Chromosomentranslokation überaktive Bcr-Abl-Kinase, die von Leukozytenstammzellen exprimiert wird und diese zu einer unkontrollierten Proliferation veranlasst <sup>[3,9]</sup>. Die Einlagerung des Imatinib in die ATP-Bindetasche des Enzyms bedingt eine Störung der Signaltransduktion und führt schließlich zur Apoptose der entarteten weißen Blutkörperchen <sup>[3]</sup>. Der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>; Abb. 1.3),

der bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom indiziert ist, weist einen dualen Wirkmechanismus auf <sup>[12]</sup>: Die Substanz unterbricht zum einen die Übertragung von Wachstumssignalen aus dem Extrazellularraum ins Innere der Zelle, indem sie die Raf-Kinase – ein Schlüsselenzym der Signalkaskade – hemmt <sup>[12]</sup>. Zum anderen greift Sorafenib die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne des VEGF-Rezeptors an, wodurch die Bildung von tumorversorgenden Blutgefäßen unterbunden wird <sup>[12]</sup>. Auf diese Weise werden sowohl die Proliferation der Tumorzellen, als auch die Angiogenese und die damit verbundenen Metastasierung inhibiert <sup>[12]</sup>.



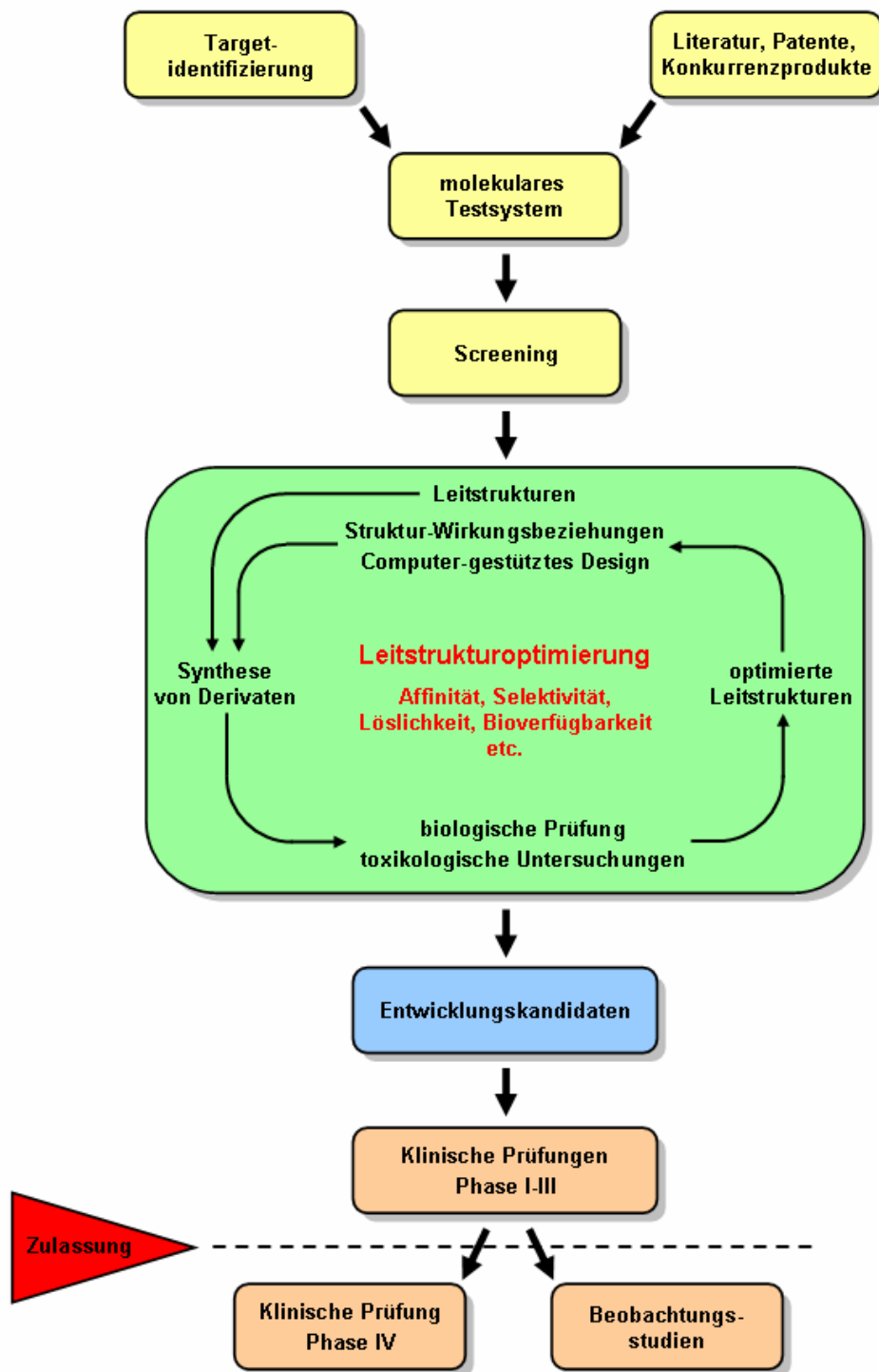
**Abb. 1.3:** Strukturformeln der Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Sorafenib

Trotz zahlreicher Fortschritte, die in der Tumorthherapie in den letzten Jahren gemacht wurden, sind immer noch viele maligne Erkrankungen gar nicht oder nur unzureichend behandelbar <sup>[6]</sup>. Aus diesem Grund beschäftigen sich derzeit zahlreiche Forschergruppen mit der Untersuchung neuer, potentiell krebstherapeutisch nutzbarer Targets (v. a. im Bereich der Apoptoseinduktion und der Angiogenesehemmung), sowie mit der Entwicklung innovativer, zytotoxisch wirkender Substanzen, die eine verstärkte Antitumoraktivität bei gleichzeitig reduzierter Nebenwirkungsrate aufweisen <sup>[7,9,13-17]</sup>. Viel versprechende Ergebnisse wurden zum Beispiel mit Helikase-Inhibitoren erzielt, die durch Hemmung des für viele zellbiologische Prozesse essentiellen Enzyms verschiedene DNA-Reparaturmechanismen und die Zellproliferation blockieren konnten <sup>[13,19]</sup>. Ein weiteres attraktives Target stellt die Telomerase dar, da dieses Enzym in normalen somatischen Zellen kaum detektierbar ist, während es von vielen Tumorzellen exprimiert wird, um durch die Stabilisierung der Telomerenlänge die Zellalterung aufzuhalten <sup>[4,15,19]</sup>.

## 1.2 Molecular Modelling in der Arzneistoffentwicklung

In der Pharmaforschung wurden neue Arzneistoffe bis vor wenigen Jahren hauptsächlich nach dem „Trial and Error“-Prinzip entwickelt <sup>[20]</sup>. Die aus diesen Arbeiten abgeleiteten Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen stellen die Basis für das heute präferierte rationale Wirkstoffdesign dar (Abb. 1.4, Seite 7), dass vor allem aufgrund der hohen Kosten (~150-300 Millionen Euro), die mit der Zulassung eines Arzneimittels verbunden sind, sehr schnell an Bedeutung gewann <sup>[20-23]</sup>. Das Konzept der rationalen und gezielten Entwicklung von Arzneistoffen zeichnet sich durch die Arbeit mit Pharmakophormodellen aus, die auf der Grundlage von gemeinsamen Merkmalen aktiver Verbindungen und den strukturellen Unterschieden zu unwirksamen Analoga erstellt werden <sup>[20,21]</sup>.

Im Rahmen des rationalen Wirkstoffdesigns werden zahlreiche struktur- und computergestützte Technologien wie die Röntgenkristallstrukturanalyse, NMR-Methoden, das Screening von 3D-Strukturdatenbanken, Molecular Modelling und QSAR-Verfahren (*Quantitative Structure Activity Relationship*) eingesetzt <sup>[20,24-26]</sup>, die der Identifizierung neuer Targets, sowie der Entdeckung und Optimierung neuer Leitstrukturen dienen <sup>[20,21,23]</sup>. Dabei leisten insbesondere die Kristallographie und die 2D-NMR-Spektroskopie einen wichtigen Beitrag zur gezielten Wirkstoffentwicklung, da diese Methoden die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen von Biopolymeren, niedermolekularen Verbindungen und Pharmakon-Rezeptor-Komplexen ermöglichen <sup>[20,23]</sup>. Darüber hinaus hat sich auch das *in silico*-Molecular Modelling als ein wertvolles Instrument der Pharmaforschung etabliert, was nicht zuletzt auf die stetig verbesserten Graphik- und Rechenleistungen der zur Verfügung stehenden Computer zurückzuführen ist <sup>[20,27,28]</sup>. Unter Molecular Modelling versteht man heutzutage die computergestützte Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von realistischen 3D-Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften <sup>[20]</sup>. Diese Technologie wird mit dem Ziel angewendet, die Effizienz der Leitstrukturoptimierung zu erhöhen, indem das pharmakologische Potential von Substanzen bereits vor der Durchführung von kosten- und zeitintensiven Synthesen und molekularbiologischen Assays abgeschätzt wird <sup>[20,23,25,26]</sup>. Zu diesem Zweck werden u. a. die in den Kapiteln 4 (Seite 89 ff.) und 5 (Seite 114 ff.) näher beschriebenen *in silico*-Verfahren eingesetzt <sup>[20,24,27]</sup>.



**Abb. 1.4:** Vereinfachte Darstellung der Stadien der rationalen Arzneimittelentwicklung<sup>[3]</sup>

Das computergestützte Molecular Modelling kann die experimentellen Arbeiten sinnvoll ergänzen und die Effizienz des rationalen Wirkstoffdesigns steigern <sup>[20,25]</sup>. Für den erfolgreichen Einsatz der Technologie ist jedoch von entscheidender Bedeutung, dass aus den zahlreichen zur Verfügung stehenden Simulationsmethoden diejenige ausgewählt wird, die für die Bearbeitung einer konkreten Problemstellung am besten geeignet ist <sup>[25]</sup>. Des Weiteren muss bei der Auswertung der aus Molecular Modelling-Studien resultierenden Daten beachtet werden, dass einige intermolekulare Wechselwirkungen (z. B. Solvatationseffekte, entropische Effekte, hydrophobe Interaktionen), die für die Rezeptorbindung eines Liganden wichtig sind, von *in silico*-Verfahren nicht korrekt erfasst werden können <sup>[20]</sup>. Zudem muss ein Wirkstoff neben einer optimalen Interaktion mit der Zielstruktur auch noch weitere, mit Computerprogrammen bislang noch nicht simulierbare Bedingungen erfüllen, wie beispielsweise eine hohe Selektivität, eine ausreichende metabolische Stabilität, eine adäquate Wirkdauer, ein niedriges Suchtpotential sowie eine geringe Toxizität, um für eine therapeutische Anwendung geeignet zu sein <sup>[20]</sup>.

Der ACE-Hemmer Captopril stellt den ersten zugelassenen Arzneistoff dar, der mit Hilfe von struktur- und computergestützten Verfahren entwickelt wurde <sup>[20,23]</sup>. Bei dem HIV-Protease-Inhibitor Saquinavir, dem Carboanhydrase-Hemmer Dorzolamid und dem Angiotensin II-Rezeptorantagonisten Losartan handelt es sich um weitere Beispiele für den erfolgreichen Einsatz des rationalen Wirkstoffdesign-Konzepts <sup>[20,23,27]</sup>. Auch in der Krebsforschung macht man sich die Molecular Modelling-Technologie zunutze, um Leitstrukturen zu finden, die mit den für die Tumorthherapie interessanten Targets (z. B. Wachstumsfaktoren, Tyrosinkinasen) interagieren <sup>[29]</sup>.



## 1.3 Zielsetzung

In den letzten Jahren wurden in der Therapie maligner Neoplasien durch die Entdeckung neuer antitumoraktiver Substanzen, durch die Entwicklung von Arzneistoffen zur Behandlung der Chemo- und Strahlentherapie-induzierten Nebenwirkungen, sowie durch die Etablierung innovativer Behandlungskonzepte erhebliche Fortschritte erzielt [3,4,10]. Dennoch sind viele Krebserkrankungen nach wie vor unheilbar [6], weshalb es sich bei der Suche nach antiproliferativ wirkenden Verbindungen immer noch um eines der bedeutendsten Betätigungsfelder der Medizinischen Chemie handelt [7,9,13-17]. Da die malignen Neoplasien durch Mutationen in Tumorsuppressor- und/oder Proto-Onkogenen ausgelöst werden, stellt die DNA ein attraktives und etabliertes Target für das Design neuer Zytostatika dar [6-9].

Im Arbeitskreis *Pindur* werden seit einigen Jahren DNA-Liganden mit potentiell antiproliferativer Aktivität entwickelt, die den Verbindungsklassen der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide, der Combilexine oder der Hetaren[a]carbazol-Derivate angehören (Abb. 1.5-1.7, Seiten 12-16). Bei der Entwicklung der Carbazole fungierte der Interkalator Ellipticin (Abb. 2.20, Seite 38) als Leitsubstanz, während sich die Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide – ebenso wie die einen dualen Bindemodus (→ Interkalation und Rinnenbindung) aufweisenden Combilexine – von den AT-selektiven *Minor Groove Bindern* Netropsin und Distamycin A (Abb. 2.23, Seite 42) ableiten. Um unter Anwendung des rationalen Wirkstoffdesign-Konzepts neue, stärker antitumoraktive Vertreter der beschriebenen Substanzklassen entwickeln zu können, sollten die Strukturelemente, die die antineoplastischen Eigenschaften der betrachteten Derivate beeinflussen, ermittelt werden [20,21].

Um das Ziel der vorliegenden Arbeit – das Aufstellen von systematischen Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Optimierung und Rationalisierung der Synthesepanung neuer, potentiell sequenzselektiv bindender DNA-Liganden der Combilexin-, der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamid- und der Hetaren[a]carbazol-Reihe – erreichen zu können, sollten verschiedene Strategien verfolgt werden:

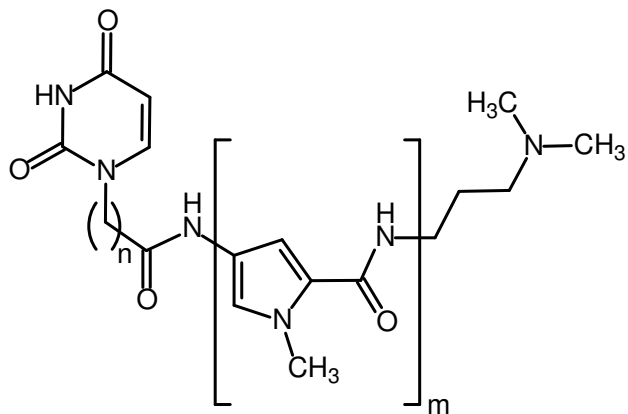
1. Zur Evaluierung der DNA-Affinitäten der Testverbindungen sollten  $T_m$ -Wertmessungen durchgeführt werden, die den Syntheseprozess der Substanzen aktiv begleiten sollten. Des Weiteren sollten auf der Grundlage der ermittelten

- Daten erste vororientierende Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden, die direkten Einfluss auf das Design neuer Derivate nehmen sollten. Um nicht nur Aussagen über die Stärke, sondern auch über die Sequenzselektivität der DNA-Bindung machen zu können, sollten sowohl ein synthetisches, nur aus AT-Basenpaaren aufgebautes Polynukleotid [ $\rightarrow$  poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA], als auch Kalbsthymus-DNA (~ 42% GC-Basenanteil <sup>[30,31]</sup>) als Matrize für die Denaturierungsexperimente verwendet werden. Aufgrund der hohen Temperaturen, die für das Schmelzen der GC-haltigen DNA erforderlich sind, musste die bereits bestehende T<sub>m</sub>-Wert-Messapparatur vollständig umgerüstet werden.
2. Unter Anwendung des Ethidiumbromid-Verdrängungsassay-Protokolls sollten die Bindekonstanten einiger ausgewählter Vertreter ermittelt werden, um zum einen die aus den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen resultierenden Daten zu verifizieren, und um zum anderen die DNA-Affinitäten der im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten neuen Substanzen mit der Bindungsstärke bekannter DNA-Liganden vergleichen zu können.
  3. Der bereits etablierte Topoisomerase I-Hemmassay sollte optimiert werden, um die Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu erhöhen. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die TOPO I neben der DNA ein weiteres potentiell Target für die neu synthetisierten Derivate der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamid-, der Combilexin-, sowie der Hetaren[a]carbazol-Reihe darstellt.
  4. Da bislang noch keine Kristallstruktur eines an ein Oligonukleotid gebundenen Combilexins publiziert wurde, sollte ein Konzept zur routinemäßigen *in silico*-Simulation von DNA-Ligand-Komplexen entwickelt werden. Die aus der graphischen Auswertung der gedockten Komplexe resultierenden Erkenntnisse bezüglich der Rezeptor-Ligand-Interaktionen sollten – ebenso wie die von den Molecular Modelling-Programmen ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> errechneten Bindedaten – in Korrelation zu den gemessenen T<sub>m</sub>-Werten gebracht werden, um weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen und die Molekülprofilierung neuer Verbindungen mit potentiell höherer DNA-Affinität optimieren zu können.

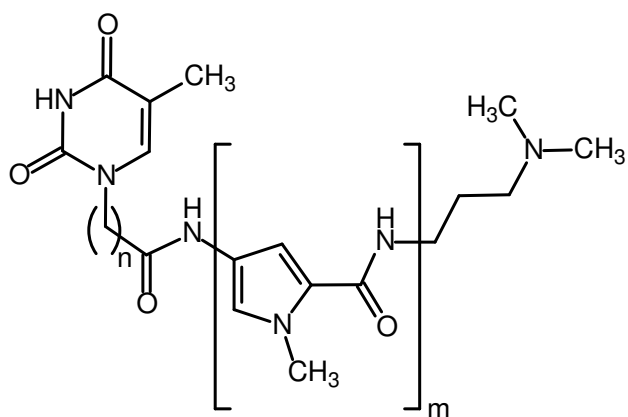
Die Verwendung von Oligonukleotiden als Rezeptoren für *in silico*-Experimente ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen kann auf dem Gebiet des DNA-Ligand-Dockings nur auf wenige Erfahrungsberichte zurückgegriffen werden, da sich nur wenige Arbeitsgruppen mit dieser Thematik befassen. Zum anderen stellt die DNA aufgrund ihres besonderen, regelmäßigen strukturellen Aufbaus ein wesentlich unspezifischeres Target dar, als ein Protein mit exakt definierbaren Bindetaschen.

Das für die Simulation von DNA-Ligand-Komplexen zu entwickelnde Konzept, das den erwähnten besonderen Anforderungen des DNA-Dockings Rechnung trägt, umfasst die folgenden zu bearbeitenden Aspekte:

- a) Validierung der Molecular Modelling-Programme SPARTAN<sup>[35]</sup> und ICM PRO<sup>[32,33]</sup>, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der ermittelten Datensätze sicherstellen zu können
- b) Etablierung von Methoden zur Simulation energieminimierter Konformationen der Testverbindungen auf der Basis bestehender Kristallstrukturen, sowie zur Berechnung einiger potentiell die DNA-Aktivität beeinflussender Moleküleigenschaften (u. a. Grenzorbitalenergien, molekulares elektrostatisches Potential)
- c) Entwicklung eines Verfahrens zur Geometrieoptimierung der Oligonukleotide gewünschter Basensequenz, die in Form von Kristallstrukturen aus der Proteindatenbank<sup>[36]</sup> entnommen und als Rezeptoren für das DNA-Ligand-Docking verwendet werden sollten
- d) Simulation von DNA-Ligand-Komplexen und Entwicklung einer Methode für das anschließende *Refinement* der generierten Docking-Komplexe, sowie für die Untersuchung der bioaktiven Konformationen der Testsubstanzen

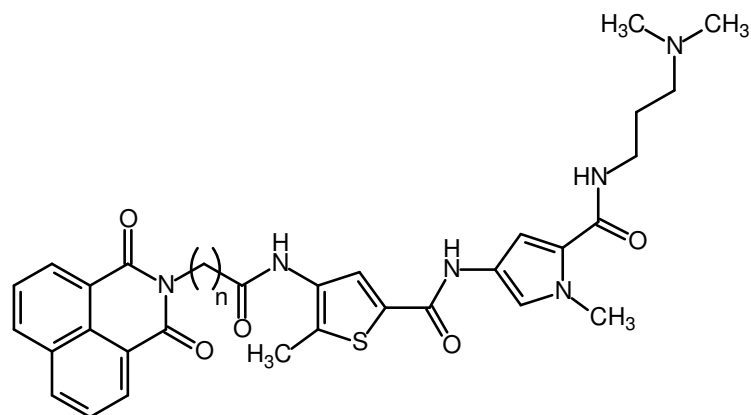


	m	n
<b>9</b> <sup>[37]</sup>	1	1
<b>10</b> <sup>[37]</sup>	1	2
<b>11</b> <sup>[37]</sup>	1	3
<b>12</b> <sup>[37]</sup>	2	1
<b>13</b> <sup>[37]</sup>	2	2
<b>14</b> <sup>[37]</sup>	2	3



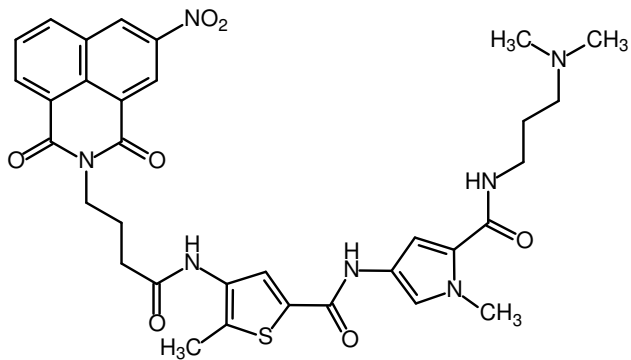
	m	n
<b>15</b> <sup>[37]</sup>	1	1
<b>16</b> <sup>[37]</sup>	1	2
<b>17</b> <sup>[37]</sup>	1	3
<b>18</b> <sup>[38]</sup>	2	1
<b>19</b> <sup>[37]</sup>	2	2
<b>20</b> <sup>[37]</sup>	2	3
<b>21</b> <sup>[38]</sup>	2	5

**Abb. 1.5:** Strukturformeln der untersuchten Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide

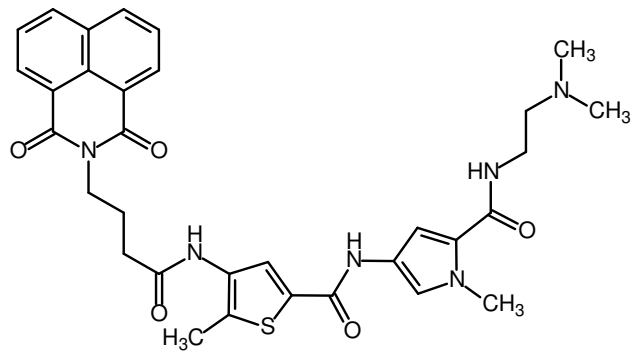


	n
<b>22</b> <sup>[38]</sup>	1
<b>23</b> <sup>[38]</sup>	2
<b>24</b> <sup>[38]</sup>	3
<b>25</b> <sup>[38]</sup>	4
<b>26</b> <sup>[38]</sup>	5

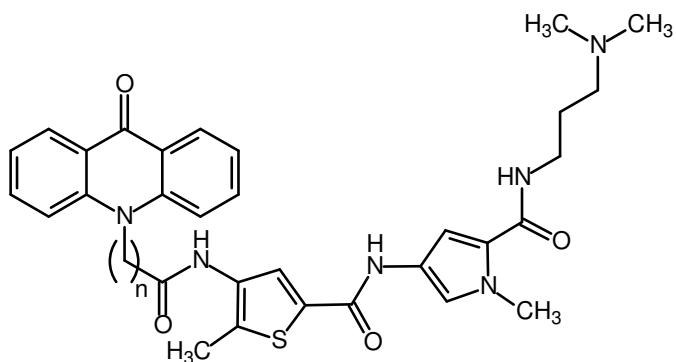
**Abb. 1.6A:** Strukturformeln der untersuchten Combilexine



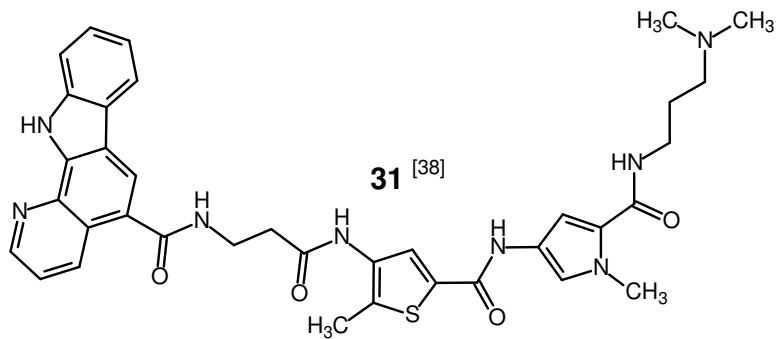
**27** [38]



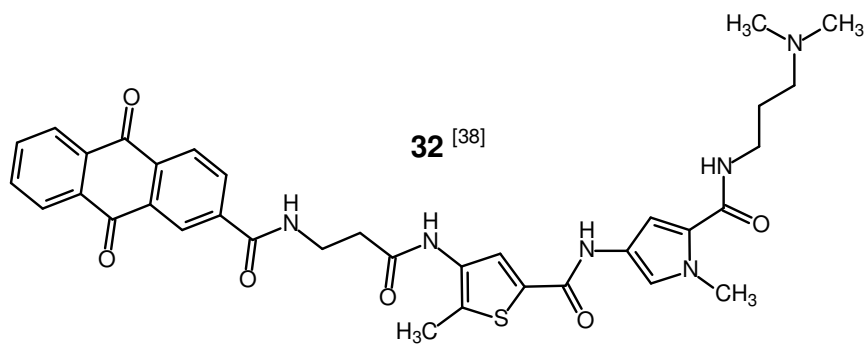
**28** [38]



	n
<b>29</b> [38]	2
<b>30</b> [38]	3

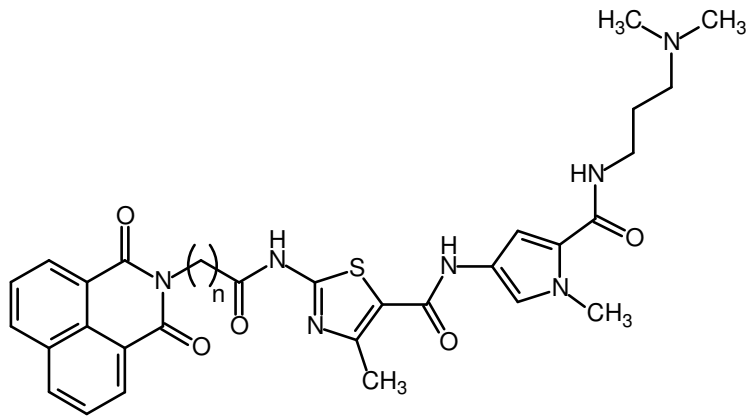


**31** [38]

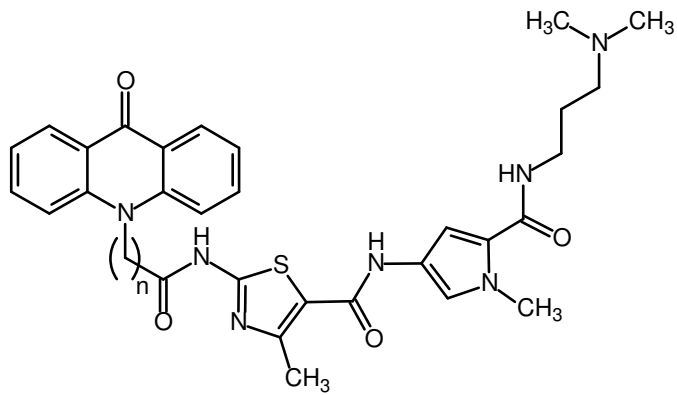


**32** [38]

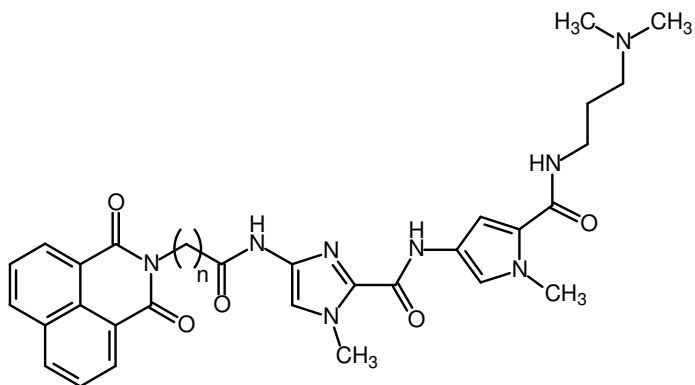
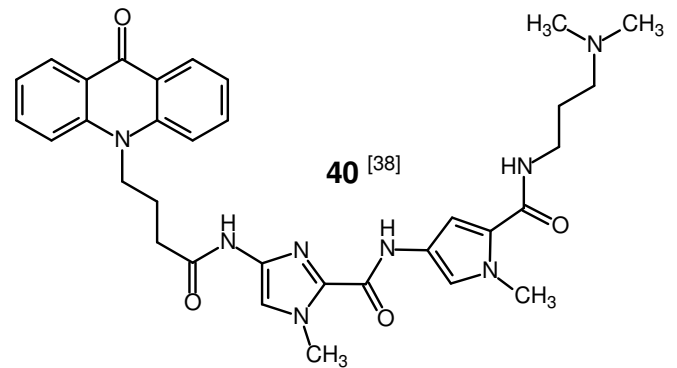
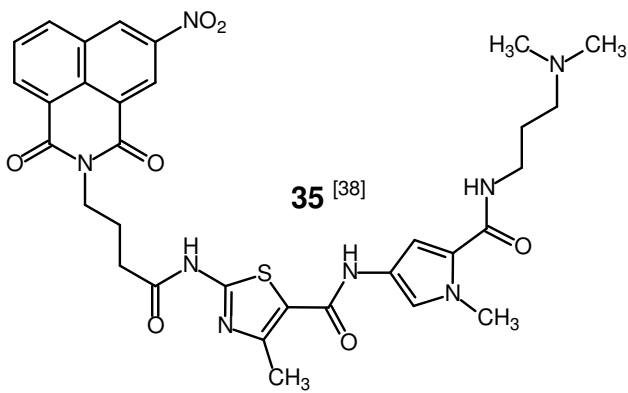
**Abb. 1.6B:** Strukturformeln der untersuchten Combilexine



	n
<b>33</b> [38]	2
<b>34</b> [38]	3

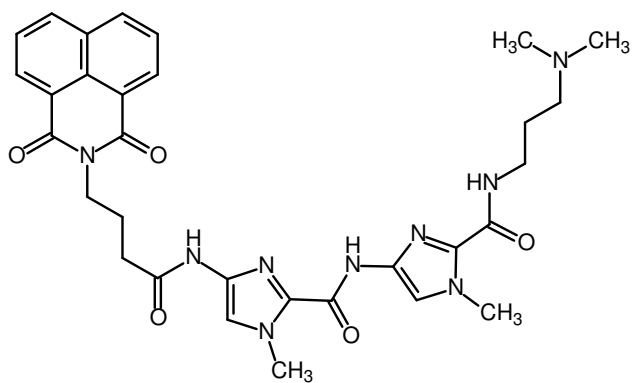


	n
<b>36</b> [38]	2
<b>37</b> [38]	3

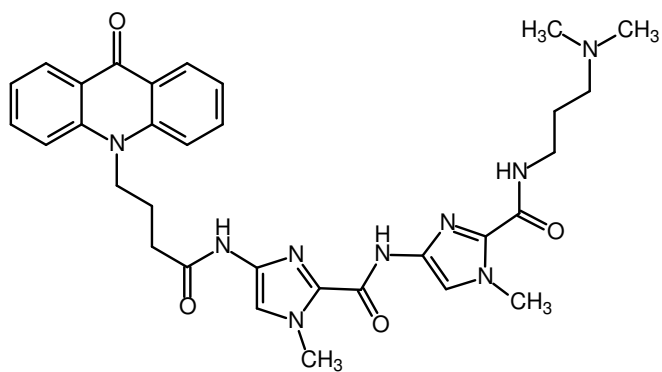


	n
<b>38</b> [38]	2
<b>39</b> [38]	3

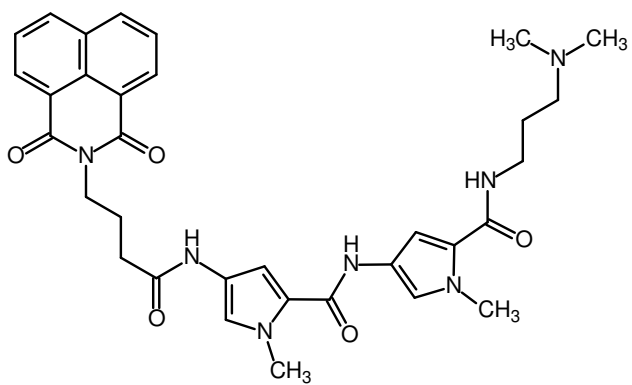
**Abb. 1.6C:** Strukturformeln der untersuchten Combilexine



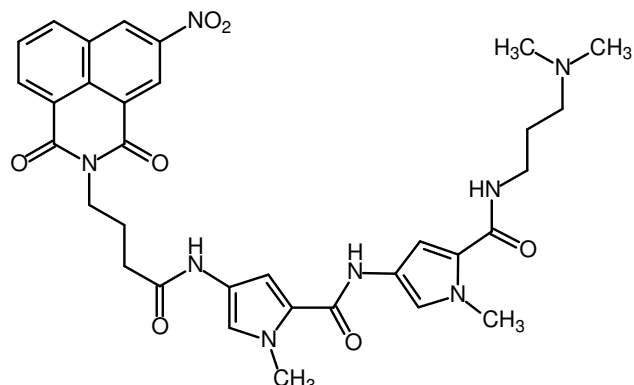
**41** [38]



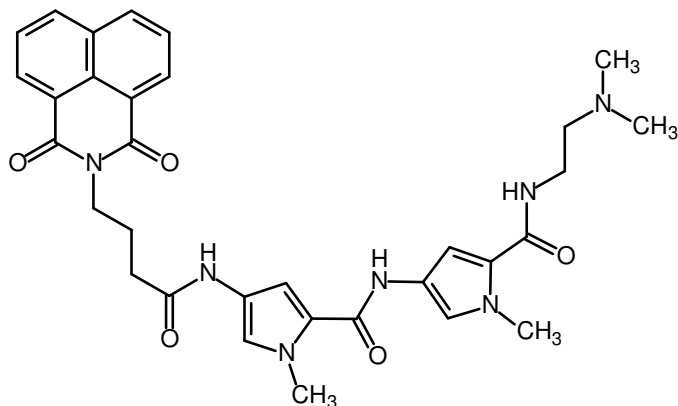
**42** [38]



**43** [37]

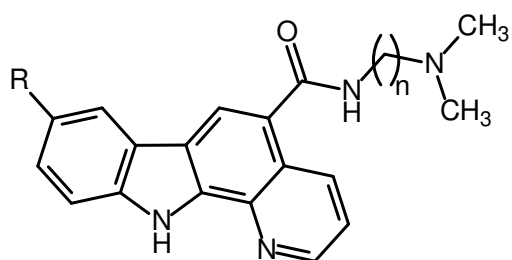
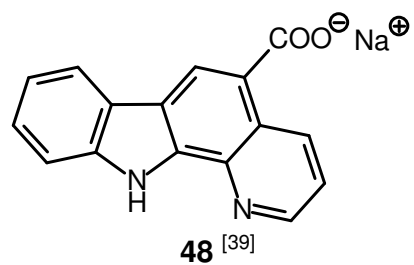
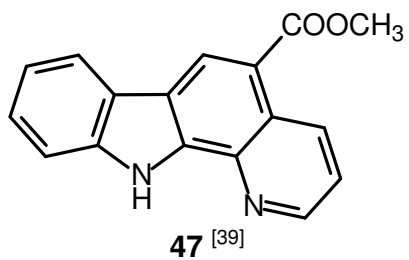
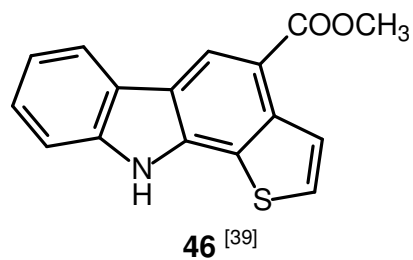


**44** [37]

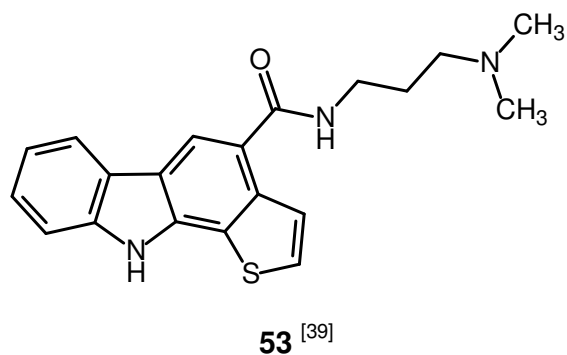


**45** [38]

**Abb. 1.6D:** Strukturformeln der untersuchten Combilexine



	n	R
<b>49</b> [39]	2	H
<b>50</b> [39]	3	H
<b>51</b> [39]	2	Cl
<b>52</b> [39]	3	Cl



**Abb. 1.7:** Strukturformeln der untersuchten Hetaren[a]carbazol-Derivate

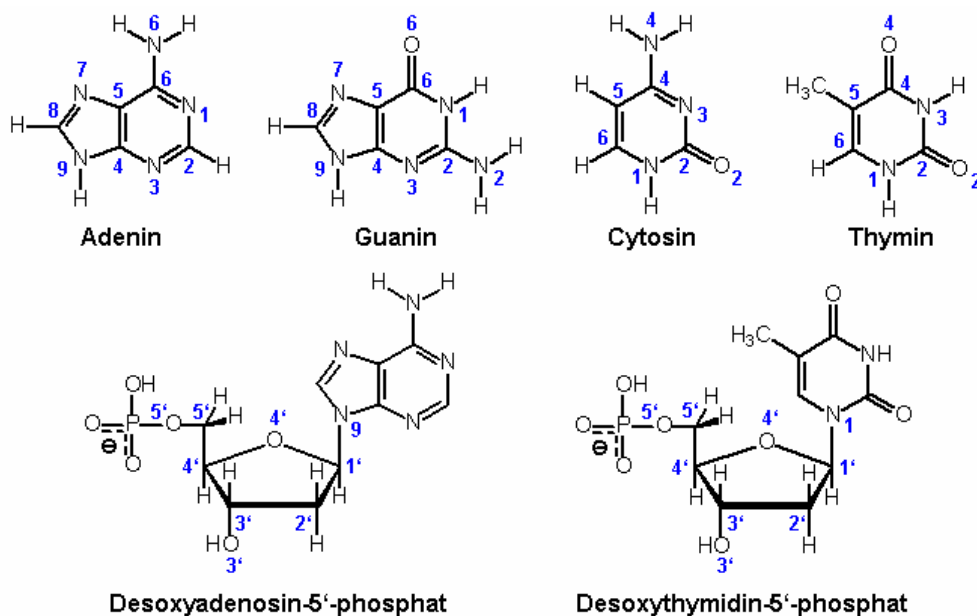


## 2. DNA und DNA-Ligand-Interaktionen

### 2.1 DNA

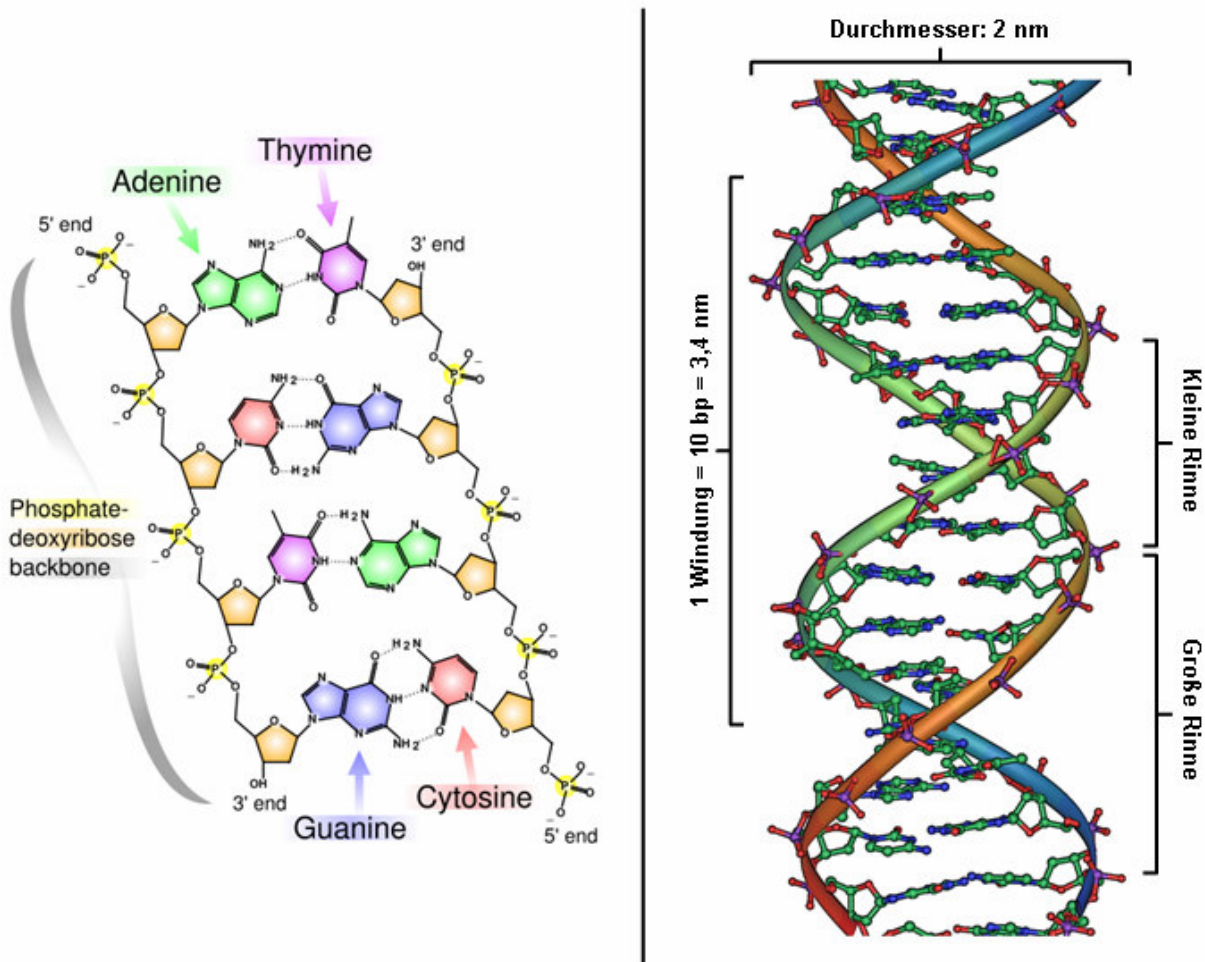
#### 2.1.1 Struktureller Aufbau der DNA

Die native DNA (Desoxyribonukleinsäure) stellt ein doppelsträngiges, lineares Polymer dar, das aus Desoxyribonukleotiden aufgebaut ist<sup>[40-42]</sup>. Jede dieser monomeren Einheiten besteht aus dem Zucker  $\beta$ -D-2'-Desoxyribose, die an Position 5' phosphoryliert und am Kohlenstoffatom C1'  $\beta$ -N-glykosidisch mit einem Adenin-, Guanin-, Thymin- oder Cytosin-Molekül verknüpft ist<sup>[40-42]</sup> (Abb. 2.1). In einer DNA-Doppelhelix paart Adenin mit einem in dem gegenüberliegenden Strang befindlichen Thymin unter der Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken, während zwischen dem Basenpaar Guanin und Cytosin drei intermolekulare H-Brücken vorliegen<sup>[40,41,43]</sup> (Abb. 2.3, Seite 19). Die einzelnen Desoxyribonukleotide der DNA sind über 3',5'-Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft<sup>[40-43]</sup>, d. h., dass ein Phosphat-Molekül die 3'-OH-Funktion eines Monomers mit der 5'-OH-Gruppe der nächsten Einheit verbindet<sup>[41]</sup> (Abb. 2.2, Seite 18).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der DNA-Basen und zweier Nukleotide mit ihren den IUPAC/IUB-Regeln folgenden Bezifferungen (nach Saenger<sup>[42]</sup>)

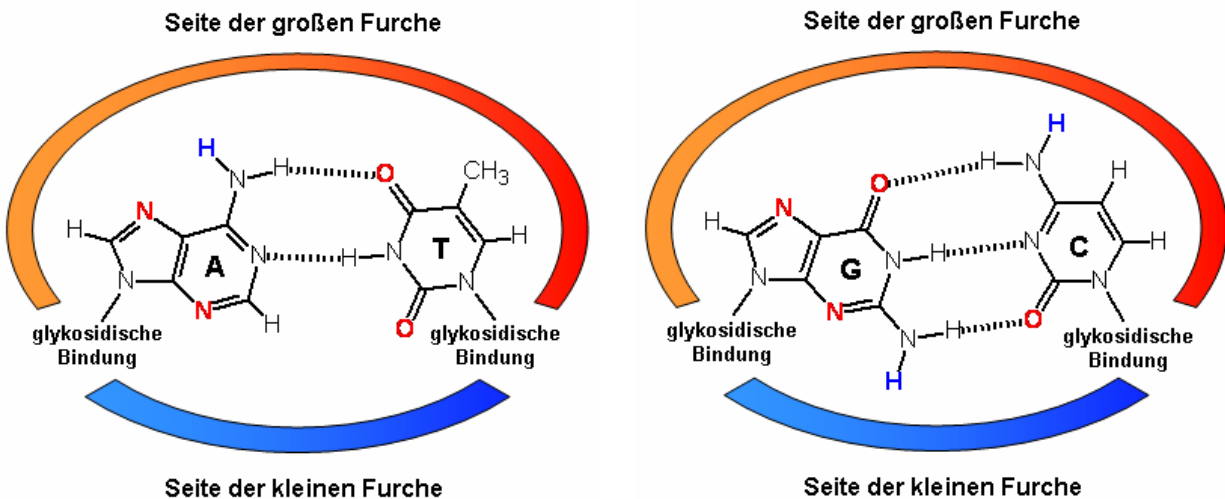
Ein DNA-Molekül, das aus zwei komplementären Polynukleotidsträngen mit entgegengesetzter Laufrichtung ( $\rightarrow$  antiparallele Orientierung) besteht, kann verschiedene Formen annehmen, wobei die erstmals von *James Watson* und *Francis Crick* beschriebene B-DNA die physiologisch bedeutendste Konformation darstellt <sup>[40-43]</sup>. Die Doppelhelix dieser DNA-Form besitzt einen Durchmesser von 2nm und weist eine rechtsgängige, schraubenförmig gewundene Struktur auf, wobei jede Windung 10 Basenpaare (bp) umfasst <sup>[40-43]</sup> (Abb. 2.2). Dies entspricht einer Ganghöhe von 3,4nm und einer helikalen Drehung von  $36^\circ$  pro bp <sup>[40-43]</sup>. Die planaren, basenpaarten Nukleotide, die nahezu senkrecht zur zentralen Achse angeordnet sind (Basenneigung zur Helixachse:  $1-6^\circ$ ), sind im Zentrum des Moleküls lokalisiert, während das Zucker-Phosphat-Gerüst, das das Rückrat der DNA darstellt, die Außenseite der Doppelhelix bildet <sup>[40-43]</sup>.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus (links) und der Doppelhelix-Struktur (rechts) der B-DNA

Die Konformation jeder Nukleotid-Einheit wird durch sieben Torsionswinkel spezifiziert, wobei die sechs Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\xi$  die dreidimensionale Struktur der Zucker-Phosphat-Kette beschreiben <sup>[40,42]</sup>; der siebte, mit  $\chi$  bezeichnete Winkel gibt die relative Orientierung der Base zur glykosidischen Bindung an <sup>[40,42]</sup> (Kapitel 8.3, Seite 321 ff.). Die Desoxyribose-Moleküle der B-DNA weisen eine sog. C2'-endo-Stellung auf <sup>[40-42]</sup>. Dies bedeutet, dass das Atom C2' aus der von den anderen vier Ringatomen gebildeten Ebene in Richtung des C5'-Atoms herausragt <sup>[40-42]</sup>.

Da sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüberstehen, werden bei der Windung der beiden Polynukleotidstränge um die Helixachse zwei unterschiedlich große Furchen, die als große (Breite: 11,7Å; Tiefe: 8,5Å <sup>[42]</sup>) und kleine (Breite: 5,7Å; Tiefe: 7,5Å <sup>[42]</sup>) Rinne bezeichnet werden, ausgebildet <sup>[40-43]</sup>. In der großen Furche, die aufgrund ihrer Breite leicht zugänglich ist, liegen im Vergleich zur kleinen Rinne mehr sequenzspezifische Erkennungsmerkmale, wie potentielle Donator- und Akzeptorgruppen für die Ausbildung von H-Brücken und Strukturelemente für van der Waals-Interaktionen, vor <sup>[40,41,44,45]</sup> (Abb. 2.3). Aus diesem Grund greifen vor allem große Moleküle und sequenzerkennende Proteine in der großen Rinne an, während die kleine Furche die bevorzugte Rezeptorbindestelle niedermolekularer Substanzen darstellt <sup>[40,41,44-46]</sup>.



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der die große und die kleine Furche säumenden Wasserstoffbrücken-Donatoren (blau) und H-Brücken-Akzeptoren (rot) in Abhängigkeit von der vorliegenden Basensequenz (links: Basenpaar Adenin/Thymin; rechts: Basenpaar Guanin/Cytosin; nach Stryer <sup>[41]</sup>)

Die Doppelstrangstruktur der DNA wird vor allem durch die aus der Stapelung der Purin- und Pyrimidin-Basen resultierenden van der Waals-Interaktionen, Charge-Transfer-Effekte ( $\pi$ - $\pi$ -Stacking) und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert [40-43]. Letztere sind dadurch bedingt, dass die im Inneren der Helix gelegenen, unpolaren Basen durch die hydrophilen Zucker-Phosphat-Ketten des DNA-Rückgrats von den umgebenden Wassermolekülen abgeschirmt werden [40-43]. Zudem tragen die zwischen den Basen der beiden komplementären Stränge ausgebildeten H-Brücken – ebenso wie die ionischen Interaktionen zwischen den negativ geladenen Phosphat-Gruppen und den positiv geladenen Gegenionen – zur Stabilisierung der DNA-Doppelhelix bei [40-42].

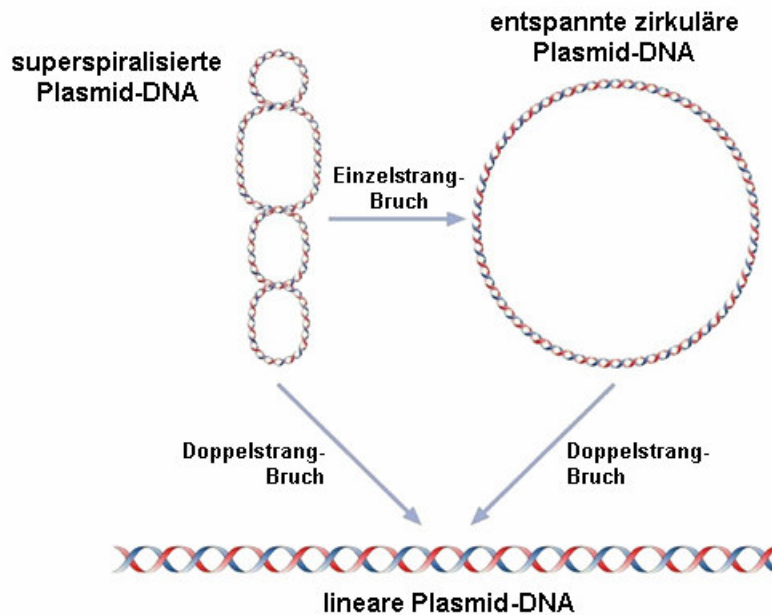
## 2.1.2 Topologie der DNA und Topologie-modifizierende Enzyme

Die doppelsträngige DNA der Bakterienchromosomen, der Plasmide ( $\rightarrow$  kleine, in zahlreichen Bakterien vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle, die nicht Bestandteil des Chromosoms sind [47,48]) und der eukaryotischen Chromosomen ( $\rightarrow$  die zirkuläre Struktur der chromosomalen DNA resultiert aus der Bindung der linearen Polynukleotidstränge an Histon-Proteine [40,41,49]) liegt in einer stark verdrillten, kompakten Konformation vor [40,41,47] (Abb. 2.4, Seite 21). Diese Tertiärstruktur der DNA, die auch als Superspiralisierung bezeichnet wird, ermöglicht es, dass das gesamte Genom eines Lebewesens in jede Zelle des jeweiligen Organismus hineinpasst [40,41,47]. Zur Beschreibung der Topologie eines DNA-Moleküls werden die Verwindungszahl  $L$ , die helikale Windungszahl  $T$  und die superhelikale Windungszahl  $W$  herangezogen [40-42]. Diese Kennzahlen stehen in der unten aufgeführten, mathematischen Beziehung zueinander [Gleichung (1)] und sind wie folgt definiert [40-42]:

$$(1) \quad L = T + W$$

- L:** Verwindungszahl; sie gibt die Anzahl der Rechtswindungen eines DNA-Strangs um die in eine Ebene gelegte Helixachse an
- T:** helikale Windungszahl; sie ist definiert als die Anzahl vollständiger Umdrehungen eines Polynukleotidstrangs um die Doppelstrangachse ( $\rightarrow$  Windungen der *Watson-Crick*-Helix);  $T$  nimmt für rechtsgängige Doppelstrangwindungen per Definition einen positiven Wert an
- W:** superhelikale Windungszahl; sie bezeichnet die Anzahl der Windungen der Doppelstrangachse um die Superhelixachse; liegen rechtsgängige superhelikale Windungen vor, so ist  $W$  per Definition negativ

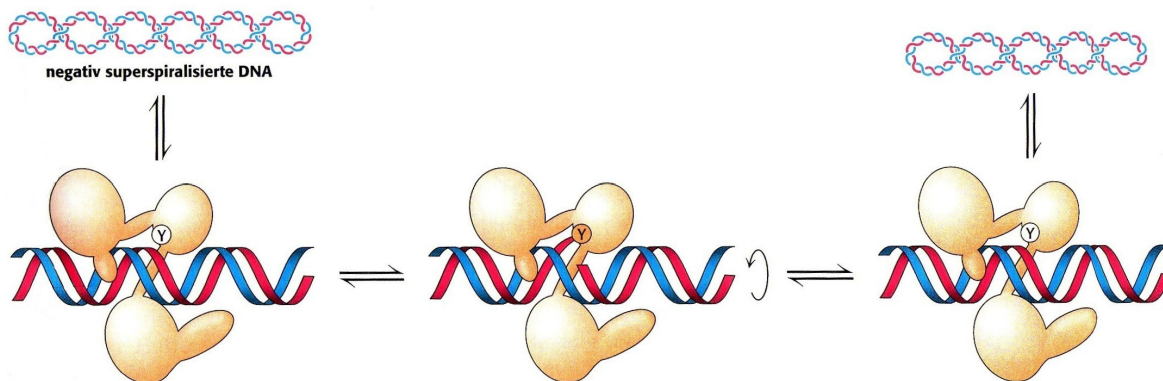
Solange beide Polynukleotidstränge intakt sind, bleibt die Verwindungszahl  $L$  eines zirkulären, doppelsträngigen DNA-Moleküls konstant <sup>[40-42,47,49]</sup>. Eine Änderung der helikalen Windungszahl  $T$  hat in diesem Fall immer auch eine entsprechende Modifikation der Superspiralität der DNA zur Folge <sup>[40-42,47,49]</sup> (Kapitel 3.4.2.1, Seite 72 ff.).



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Konformationen eines Plasmid-Moleküls

Bei Replikations-, Transkriptions- und Rekombinationsprozessen müssen die beiden von Wasserstoffbrücken zusammengehaltenen Polynukleotidstränge eines DNA-Duplexes partiell voneinander getrennt werden <sup>[40,41,50]</sup>. Die dafür erforderliche Entwindung der Doppelhelix-Struktur induziert Spannungen in den an die Strangseparierung angrenzenden Molekülbereichen, die durch die ubiquitär vorkommenden, nuklearen Topoisomerasen abgebaut werden <sup>[40-43,47,50-55]</sup>. Diese Enzyme relaxieren die DNA, indem sie Strangbrüche erzeugen, einen DNA-Abschnitt durch die entstandene Lücke schieben und die Enden der Polynukleotidstränge anschließend wieder religieren <sup>[40,41,47,50,51,54,55]</sup>. In Abhängigkeit von der Anzahl der enzymkatalysierten Bruchstellen unterscheidet man zwischen den Typ I-Topoisomerasen (TOPO I), die einen transienten Einzelstrangbruch hervorrufen, und den Typ II-Enzymen (TOPO II), die beide Stränge eines DNA-Moleküls schneiden <sup>[40-43,50,52,55,56]</sup>.

Im ersten Schritt des TOPO I-induzierten Abbaus negativer Superspiralisierungen greift ein Tyrosin-Molekül des aktiven Zentrums die Phosphodiesterbindung des Zucker-Phosphat-Gerüsts der DNA nukleophil an <sup>[40-42,50-54,56]</sup> (Abb. 2.5). Nach der Einführung der Bruchstelle kann der intakte Polynukleotidstrang ungehindert um den geschnittenen Strang rotieren, wobei das Enzym die Geschwindigkeit der Drehung kontrolliert <sup>[41,42,50-52,54,55]</sup>. Zur Beendigung der DNA-Enzym-Interaktion greift die freie Hydroxyl-Gruppe des geschnittenen Polynukleotidstrangs die zwischen dem Nukleinsäuremolekül und der Topoisomerase I ausgebildete, kovalente Bindung in einer zweiten Transesterifikationsreaktion an, wodurch die freien Enden des DNA-Rückgrats wieder miteinander verknüpft und das Enzym abgespalten wird <sup>[40-42,50-52,54-56]</sup>. Unter physiologischen Bedingungen sind der Einzelstrangbruch und die Religation so eng miteinander verbunden, dass der intermediär gebildete, binäre Komplex aus DNA und TOPO I ( $\rightarrow$  *Cleavable Complex*) kaum nachweisbar ist <sup>[51,52,54-56]</sup>.

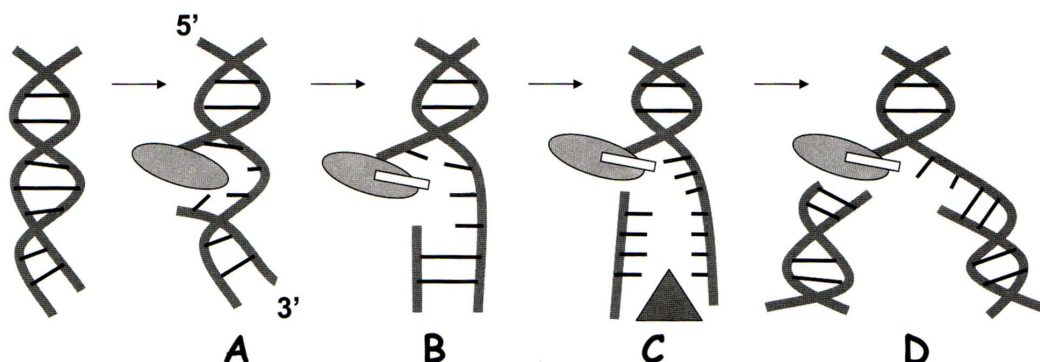


**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der Topoisomerase I-katalysierten Entwindung superspiralierter DNA (nach Stryer<sup>[41]</sup>)  
(Y = Tyrosin-Molekül des aktiven Zentrums)

In Analogie zur Topoisomerase I befinden sich auch bei den Typ II-Enzymen Tyrosin-Moleküle im aktiven Zentrum, die das Zucker-Phosphat-Gerüst beider Polynukleotidstränge an zwei versetzten Stellen unter Bildung von Phosphotyrosin-Zwischenprodukten spalten <sup>[40,41,43,50,55]</sup>. Für die Einführung der Doppelstrangbrüche und die Modifikation der DNA-Topologie benötigt die Topoisomerase II – im Gegensatz zu den TOPO I-Enzymen – die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie <sup>[40-43,50,55,56]</sup>.

Die Bedeutung der Topoisomerasen als therapeutisches Target antiproliferativ wirkender Substanzen nimmt stetig zu, da die für die Enzyme codierenden Gene in den Zellen einiger maligner Neoplasien (z. B. bei Darm-, Ovar- und Speiseröhrenkrebs [57,58]) überexprimiert werden und eine Inhibition der Enzymfunktion indirekt durch die Blockade lebenswichtiger biologischer Prozesse wie Replikation, Transkription und Rekombination zur Apoptose der Krebszellen führen kann [38,40,47,50,51,53,57-59].

Die Topoisomerase-Hemmstoffe werden in Abhängigkeit von ihrem Wirkmechanismus in Gifte und in Suppressoren eingeteilt [38,47,51]. Topoisomerase I-Gifte wie das erstmals aus *Camptotheca acuminata* isolierte Alkaloid Camptotecin (Abb. 2.7, Seite 24), stabilisieren den intermediär gebildeten, kovalenten Komplex aus DNA und Enzym [50-56] und unterbinden auf diese Weise die Religation des geschnittenen Polynukleotidstrangs [50-52,55,56] (Abb. 2.6). Durch die Kollision der Replikationsgabel mit den persistierenden Bruchstellen entstehen in der S-Phase des Zellzyklus irreversible Doppelstrangbrüche, die über verschiedene biochemische Prozesse – u. a. durch die Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 [50,60] – schließlich zur Apoptose der betroffenen Zellen führen [47,50-56] (Abb. 2.6).

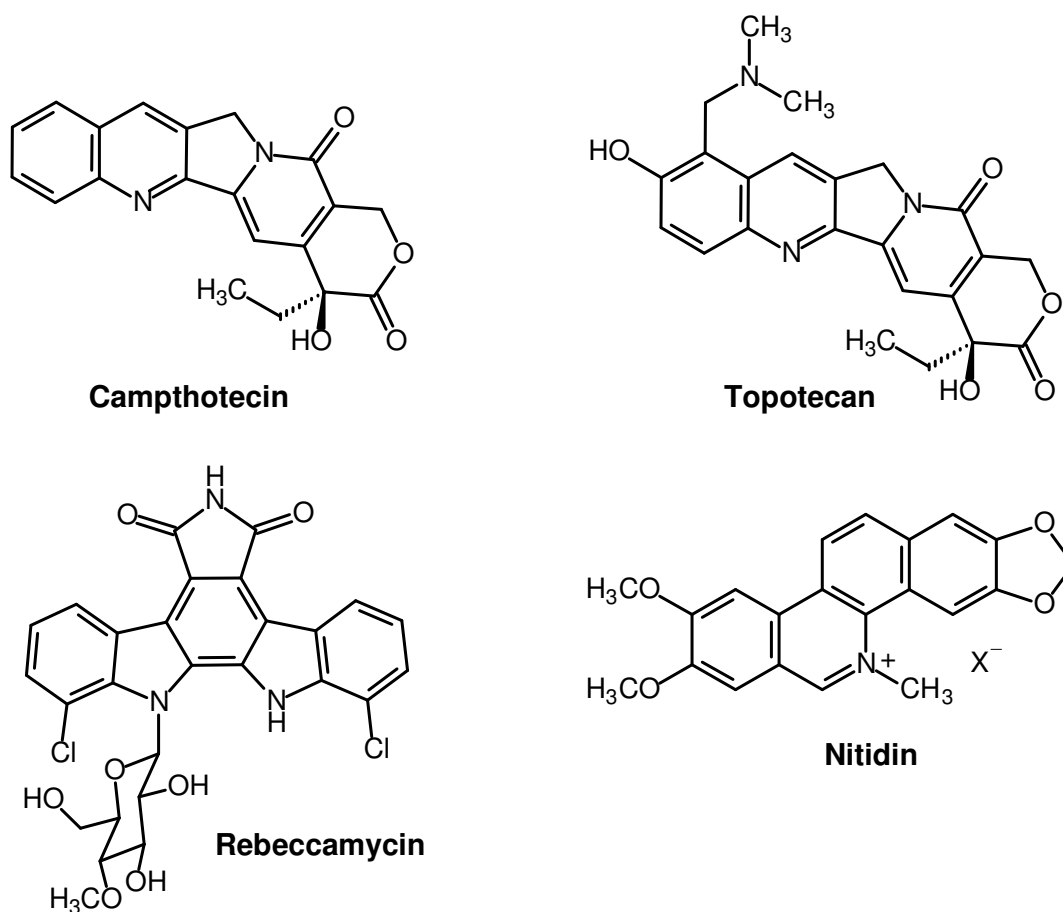


**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung des Wirkprinzips eines Topoisomerase I-Giftes (nach Beretta [54])  
**(A:** TOPO I-katalysierter Einzelstrangbruch unter Bildung eines 3'-Phosphotyrosyl-Addukts; **B:** Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Komplexes durch ein TOPO I-Gift; **C:** Kollision der Bruchstelle mit der Replikationsgabel; **D:** Bildung eines irreversiblen Doppelstrangbruchs)

Bei den von Camptotecin abgeleiteten Verbindungen Topotecan (Handelsname Hycamtin®) und Irinotecan (Handelsname Campto®) handelt es sich um klinisch verwendete, antineoplastisch wirkende Arzneistoffe [50,51,54,56] (Abb. 2.7, Seite 24). Topotecan wird zur Behandlung des fortgeschrittenen Ovarial- und des kleinzelligen



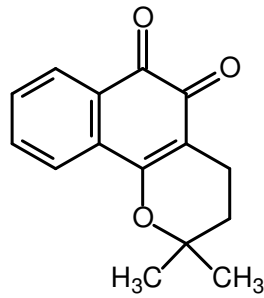
Lungenkarzinoms eingesetzt, während Irinotecan für die Therapie des refraktären Kolorektalkarzinoms indiziert ist <sup>[51,53,55]</sup>. Weitere Beispiele für Topoisomerase I-Gifte stellen die Benzo[*c*]phenanthridinium-Alkaloide Nitridin und Fagaronin sowie die glykosylierte Indolocarbazol-Verbindung Rebeccamycin dar <sup>[47,50,51,61,62]</sup> (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7:** Beispiele bekannter Topoisomerase I-Gifte

Im Gegensatz zu den Giften reduzieren die Topoisomerase I-Suppressoren die katalytische Aktivität des Enzyms, ohne mit dem *Cleavable Complex* zu interagieren <sup>[47,50,51]</sup>. Dabei unterscheidet man – in Abhängigkeit von dem zugrunde liegenden Hemmmechanismus – zwischen Substanzen, die direkt mit dem Enzym in Wechselwirkung treten (z. B.  $\beta$ -Lapachon, Abb. 2.8, Seite 25), und solchen, die infolge ihrer DNA-Bindung die Bildung des kovalenten Phosphotyrosyl-Zwischenproduktes verhindern <sup>[47,51]</sup> (z. B. Netropsin und Distamycin A; Abb. 2.23, Seite 42). Da die Suppressoren keine irreversiblen DNA-Schäden induzieren können, besitzen sie lediglich wachstumshemmende Eigenschaften, weshalb ihre antitumorale Wirkung im Vergleich zu den TOPO I-Giften wesentlich schwächer ausgeprägt ist <sup>[41,50]</sup>.

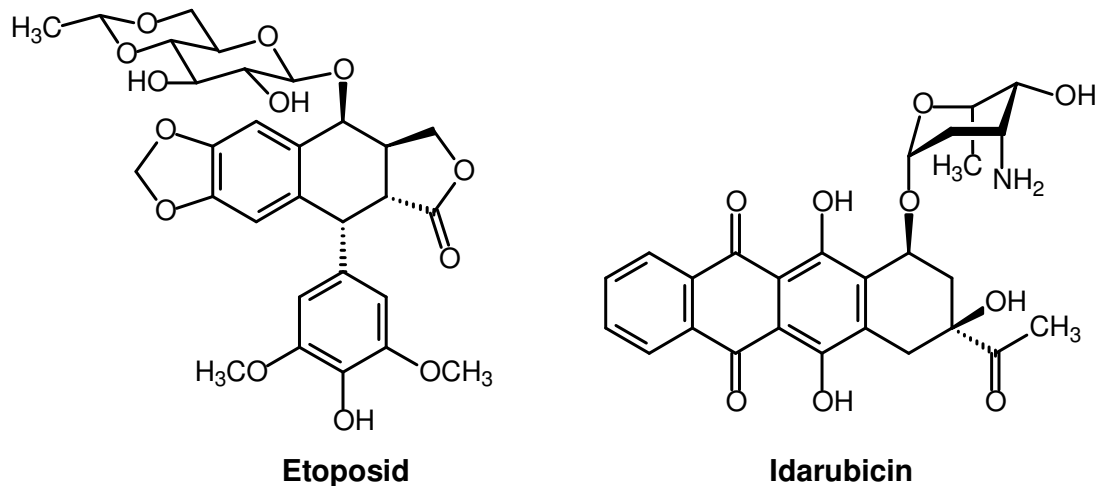




**β-Lapachon**

**Abb. 2.8:** Beispiel eines bekannter Topoisomerase I-Suppressors

Das Podophyllotoxin Etoposid, das zur Substanzklasse der Anthrazykline gehörende Idarubicin (Abb. 2.9) und das Pyridocarbazol-Derivat Ellipticin (Abb. 2.20, Seite 38) stellen Beispiele für Topoisomerase II-Gifte dar <sup>[40,47,50,51,59]</sup>. Derartige Verbindungen wirken zytotoxisch, indem sie durch Stabilisierung des binären, aus DNA und TOPO II bestehenden Komplexes die Bildung persistierender DNA-Doppelstrangbrüche und infolgedessen die Apoptose der betroffenen Zellen auslösen <sup>[40,47,51]</sup>.



**Etoposid**

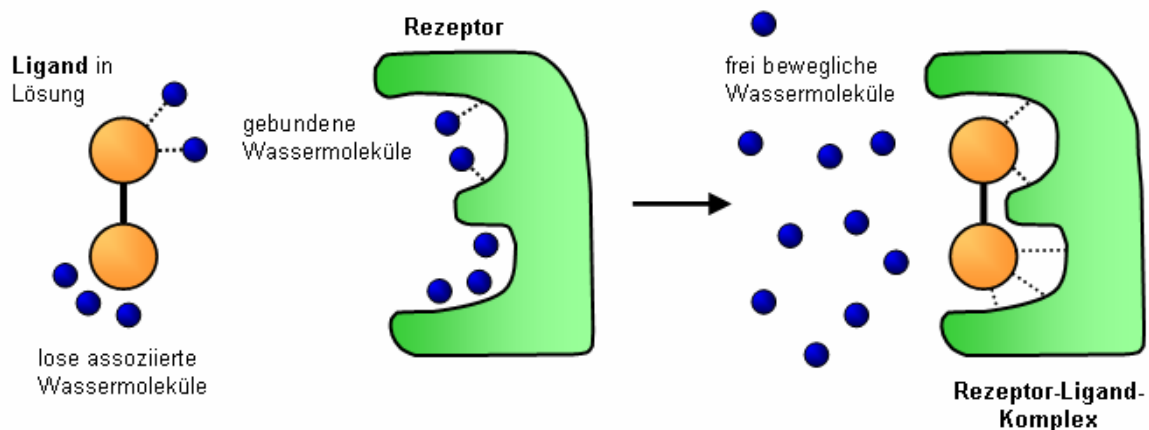
**Idarubicin**

**Abb. 2.9:** Beispiele bekannter Topoisomerase II-Gifte

## 2.2 Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

### 2.2.1 Hydrophobe Bindung

Die hydrophobe Bindung stellt eine ungerichtete, in einem wässrigen Medium auftretende Wechselwirkung der unpolaren Gruppen (z. B. aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Halogensubstituenten) des Rezeptors mit den entsprechenden Molekülbereichen des Liganden dar <sup>[20,63]</sup>. Diese lipophilen Strukturen aggregieren unter physiologischen Bedingungen, um die Kontaktfläche zu dem sie umgebenden Lösungsmittel zu minimieren <sup>[23,42,63,64]</sup>. Die Energie, die bei einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung infolge hydrophober Bindungen freigesetzt wird, ist vor allem auf den mit dieser Interaktion verbundenen entropischen Effekt zurückzuführen <sup>[20,23,63]</sup>: Bei der Komplexbildung werden strukturell gebundene und lose assoziierte Wassermoleküle aus der Bindetasche des Rezeptors, sowie aus der Hydrathülle des Liganden verdrängt, wodurch sich ihre Beweglichkeit erhöht <sup>[20,42,63,65]</sup> (Abb. 2.10). Dies hat – aufgrund der Zunahme der im System herrschenden Unordnung – eine Steigerung der Entropie zur Folge <sup>[20,23,42,63]</sup>.



**Abb. 2.10:** Schematische Darstellung des bei einer Rezeptor-Ligand-Interaktion auftretenden entropischen Effekts (nach *Kubinyi* <sup>[20]</sup>)

Dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik entsprechend wirkt sich eine derartige Entropiezunahme energetisch günstig auf die freie Komplexbildungsenthalpie  $\Delta G$  aus <sup>[20,66]</sup> [Gleichung (2)]:

$$(2) \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$\Delta G$ : freie Komplexbildungsenthalpie

$\Delta H$ : Komplexbildungsenthalpie

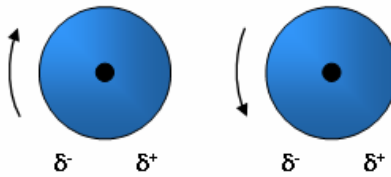
T: absolute Temperatur [K]

$\Delta S$ : Entropieänderung des Systems

Bei den hydrophoben Wechselwirkungen handelt es sich meist um die treibende Kraft für die Rezeptor-Bindung eines Liganden, da pro Å lipophiler Kontaktfläche eine Bindungsenergie von 100 bis 200J/Mol freigesetzt wird <sup>[20,64,65]</sup>. Zudem tragen die hydrophoben Interaktionen signifikant zur Stabilisierung der Sekundär- und der Tertiärstruktur biologischer Makromoleküle (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) bei <sup>[42,64]</sup>.

## 2.2.2 van der Waals-Kräfte (= Dispersionskräfte)

Bei den van der Waals-Wechselwirkungen (Synonym: London-, Dispersionskräfte <sup>[66]</sup>) handelt es sich gerichtete, attraktiv wirkende Bindungskräfte zwischen unpolaren Molekülen <sup>[42,63,66]</sup>. Diese Interaktionen liegen in der Tatsache begründet, dass sich der Aufenthaltsort der Elektronen ständig ändert, was geringfügige Verformungen der Elektronenwolke eines Moleküls und – damit verbunden – die Bildung momentaner Dipole zur Folge haben kann <sup>[42,63,66]</sup>. Diese schwachen, fluktuierenden Dipole induzieren durch die Polarisierung des Elektronensystems benachbarter Atome oder Moleküle die Entstehung weiterer, parallel ausgerichteter Dipolmomente <sup>[42,63,66]</sup>. Auf diese Weise treffen schließlich positive und negative Partialladungen aufeinander, die sich gegenseitig anziehen <sup>[42,63,66]</sup> (Abb. 2.11, Seite 28). Da die Elektronen eine sehr hohe Beweglichkeit besitzen, heben sich die momentanen Dipole im zeitlichen Mittel auf, so dass nach außen hin kein permanentes Dipolmoment messbar ist <sup>[63,66]</sup>.



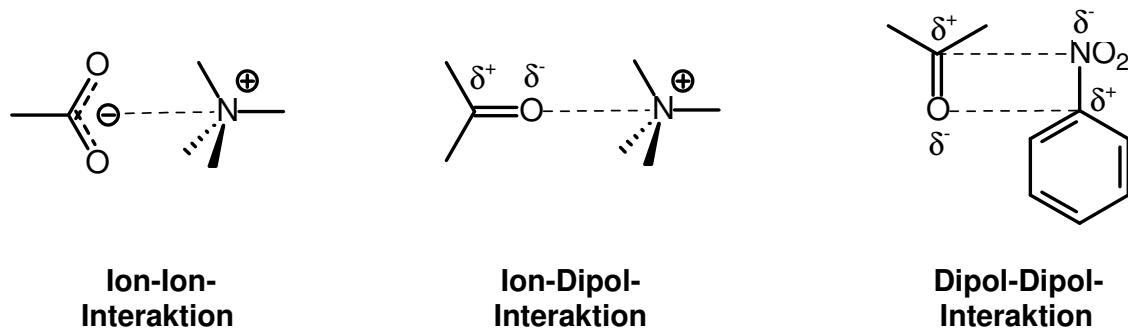
**Abb. 2.11:** Anziehungskräfte zwischen momentanen, fluktuierenden Dipolen benachbarter Teilchen (nach Mortimer<sup>[66]</sup>)

Der Energiebetrag, der bei der Rezeptor-Ligand-Komplexbildung aufgrund von van der Waals-Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülstrukturen freigesetzt wird, ist von der Größe der Verbindungen und der Zahl ihrer Elektronen abhängig<sup>[66]</sup>. Die stärksten Dispersionskräfte treten dabei bei der Interaktion von großen, vielatomigen Molekülen auf, da diese ausgedehnte und leicht polarisierbare Elektronenwolken aufweisen<sup>[66]</sup>.

Die auf ein Methylengruppenpaar entfallende Bindungsenergie beträgt im Mittel 2kJ/Mol<sup>[63]</sup>. Folglich handelt es sich bei den van der Waals-Wechselwirkungen lediglich um schwache Kräfte, die darüber hinaus auch nur eine sehr geringe Reichweite besitzen<sup>[42,63]</sup>: Die Stärke der Bindungen fällt mit der 6. Potenz des zwischen den interagierenden Atomgruppen vorliegenden Abstandes  $r$  ( $1/r^6$ ) ab<sup>[42,63]</sup>. Da sich die Dispersionskräfte jedoch additiv verhalten, können sie bei großflächigen Kontakten durch Summation der Teilbeträge einen erheblichen Beitrag zur Komplexbildungsenergie und zur Spezifität der Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung leisten<sup>[42,63]</sup>.

### 2.2.3 Elektrostatische Wechselwirkungen

Bei den elektrostatischen Wechselwirkungen handelt es sich um Bindungskräfte, die zwischen geladenen und/oder polarisierten Molekülbereichen auftreten, wobei sich konträre (Partial-)Ladungen anziehen, während sich gleichsinnig geladene bzw. polarisierte Teilchen abstoßen<sup>[63,66]</sup> (Abb. 2.12, Seite 29).



**Abb. 2.12:** Beispiele für elektrostatische Wechselwirkungen, die bei einer Rezeptor-Ligand-Komplexbildung auftreten können (nach *Auterhoff*<sup>[63]</sup>)

Die Bindungsenergie, die aus der Wechselwirkung dieser ionischen Teilchen resultiert, kann mit Hilfe des *Coulomb*-Gesetzes [Gleichung (3)] berechnet werden<sup>[63,65]</sup>:

$$(3) \quad E = \frac{1}{\epsilon} \frac{q_1 q_2}{r}$$

$\epsilon$ : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmediums  
 $q$ : Ladung eines Atoms oder einer funktionellen Gruppe  
 $r$ : Abstand zwischen den beiden Ladungen  $q_1$  und  $q_2$

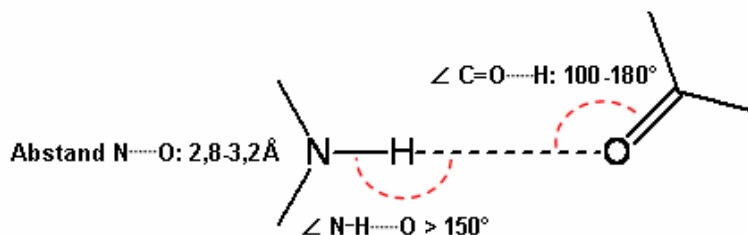
Dem *Coulombschen* Gesetz zur Folge bedingt die hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers ( $\epsilon \approx 80$  F/m) eine signifikante Abschwächung der in wässrigen Medien auftretenden elektrostatischen Interaktionen<sup>[23,63]</sup>. Da die Konstante in der Nähe einer molekularen Oberfläche oder im Innern eines Proteins allerdings auf bis zu 5 F/m absinken kann, handelt es sich bei den in Rezeptor-Ligand-Komplexen auftretenden Ion-Ion-Wechselwirkungen um starke Bindungskräfte, die eine durchschnittliche Energie von 5 kJ/Mol aufweisen<sup>[63]</sup>. Darüber hinaus besitzen sie eine sehr große Reichweite ( $\rightarrow$  Abhängigkeit vom Abstand:  $1/r$ ), was zur Aufstellung der Hypothese führte, dass der erste Kontakt zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor durch die Anziehung entgegengesetzt geladener Strukturen zustande kommt<sup>[63]</sup>.

Die Bindungsenergie der Ion-Dipol- sowie der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Abb. 2.12), die bis zu 30kJ/Mol betragen kann, nimmt mit der 2. Potenz der zwischen den interagierenden Gruppen vorliegenden Distanz  $r$  ab ( $1/r^2$ ), so dass diese Kräfte über eine geringere Reichweite als die Ion-Ion-Interaktionen verfügen<sup>[63]</sup>.

## 2.2.4 Wasserstoffbrücken-Bindung

An der Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, die eine besondere Form elektrostatischer Interaktionen darstellen, sind zum einen funktionelle Gruppen mit einem kovalent gebundenen H-Atom ( $\rightarrow$  Wasserstoffdonoren, zumeist OH- oder NH-Gruppen), und zum anderen elektronegative Atome mit mindestens einem nichtbindenden Elektronenpaar ( $\rightarrow$  Wasserstoffakzeptoren, zumeist O- oder N-Atome) beteiligt <sup>[20,23,42,48,63]</sup> (Abb. 2.13). Neben der zwischen dem Wasserstoffdonor und dem -akzeptor auftretenden Dipol-Dipol-Anziehung, die für die Entstehung einer H-Brücke von entscheidender Bedeutung ist, weist diese Bindungsart zudem einen geringen kovalenten Anteil auf, der aus der Überlappung des s-Orbitals des Wasserstoffs mit Orbitalen des Akzeptor-Atoms resultiert <sup>[63]</sup>.

Die Geometrie einer H-Brücken-Bindung ist innerhalb enger Grenzen definiert <sup>[20,23]</sup>: Das elektronegative Atom der als Wasserstoff-Donor fungierenden funktionellen Gruppe und das Akzeptor-Atom liegen in einem Abstand von 2,8 bis 3,2 Å zueinander vor und schließen dabei mit dem H-Atom einen Winkel von mehr als 150° ein <sup>[20,48]</sup> (Abb. 2.13).



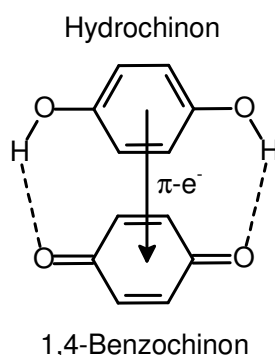
**Abb. 2.13:** Schematische Darstellung der Geometrie einer Wasserstoffbrücken-Bindung (nach Kubinyi <sup>[20]</sup>)

Die Stärke einer H-Brücken-Bindung ist von dem Ladungszustand der an ihrer Ausbildung beteiligten funktionellen Gruppen abhängig <sup>[20]</sup>: Eine Wasserstoffbrücke, die einen ionischen Donator (z. B. ein Ammonium-Kation) und/oder einen ionischen Akzeptor (z. B. ein Carboxylat-Anion) aufweist, besitzt eine Bindungsenergie von bis zu 16 kJ/Mol, während bei der Entstehung einer neutralen H-Brücke ein erheblich kleinerer Energiebetrag von nur 2 bis 6 kJ/Mol freigesetzt wird <sup>[20,48]</sup>. In beiden Fällen nimmt die Stärke der Bindung mit der zweiten Potenz der zwischen den elektronegativen Atomen vorliegenden Distanz  $r$  ( $1/r^2$ ) ab <sup>[63]</sup>.

Bei der Rezeptor-Ligand-Komplexbildung tragen die Wasserstoffbrücken-Bindungen wesentlich zur Positionierung der niedermolekularen Substanz in der Bindetasche des Biopolymers bei <sup>[45,67-69]</sup>. Darüber hinaus spielen sie bei der Stabilisierung der DNA-Doppelhelix sowie der Quartär- und der Tertiärstruktur von Proteinen eine Schlüsselrolle <sup>[23,42,48,63,66]</sup>.

## 2.2.5 Charge-Transfer-Komplexbildung

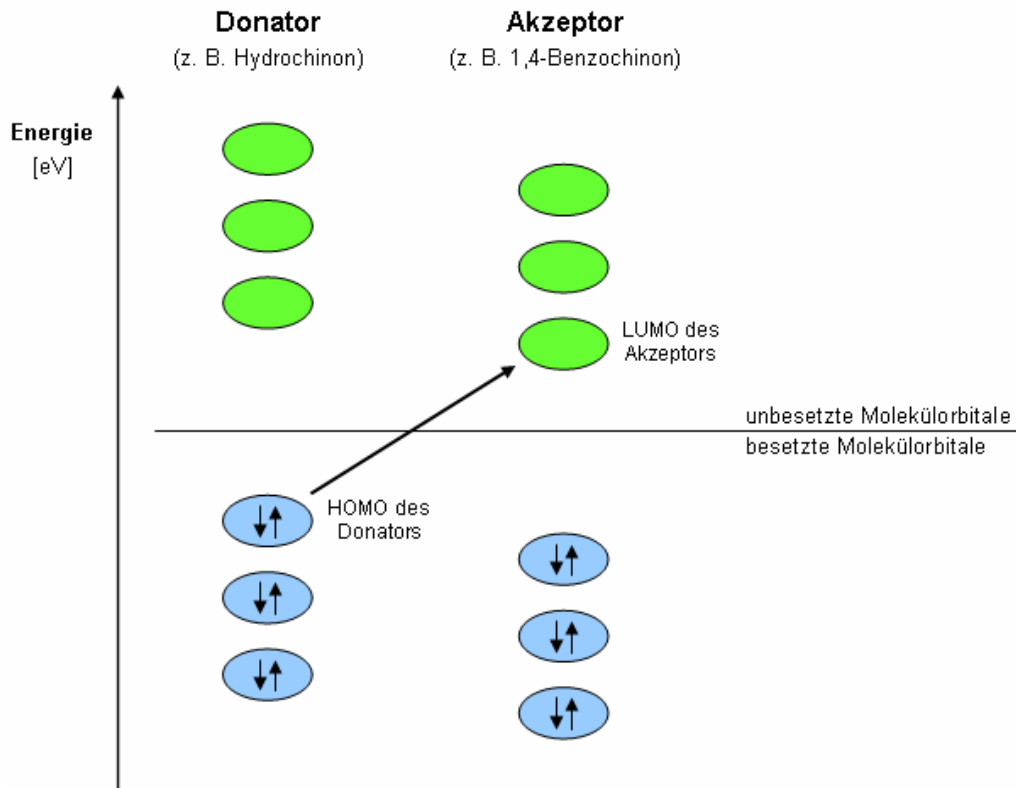
Die Entstehung eines Charge-Transfer-Komplexes (CT-Komplex) beruht auf der intra- bzw. intermolekularen Überführung von Elektronen aus den besetzten Orbitalen eines elektronenreichen Donators in die unbesetzten Orbitale eines elektronenarmen Akzeptors (Abb. 2.14; Abb. 2.15, Seite 32) <sup>[63,70,71]</sup>. Da dies die vorherige räumliche Überlappung der in den Transfer einbezogenen Orbitale erforderlich macht, weist ein CT-Komplex sowohl einen elektrostatischen, als auch einen kovalenten Bindungsanteil auf <sup>[63,70,71]</sup>.



**Abb. 2.14:** Darstellung eines Charge-Transfer-Komplexes

(Hydrochinon → Donator; 1,4-Benzochinon → Akzeptor; die gestrichelten Linien deuten die zusätzlich stabilisierend wirkenden H-Brücken an)

Obwohl noch weitaus mehr Orbitale an dem Elektronenübergang beteiligt sein können, werden oftmals nur die höchsten besetzten sowie die niedrigsten unbesetzten Molekülorbitale zur Beschreibung eines CT-Komplexes herangezogen <sup>[70]</sup>. Dabei kann ein Charge-Transfer-Komplex nur zustande kommen, wenn das LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) des Akzeptors gegenüber dem LUMO des Donators sowie das HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) des Donators gegenüber dem HOMO des Akzeptors energetisch begünstigt ist <sup>[71]</sup> (Abb. 2.15, Seite 32).



**Abb. 2.15:** Schematische Darstellung des bei der Bildung eines CT-Komplexes auftretenden Elektronentransfers (der Elektronenübergang erfolgt von dem HOMO des Donators zu dem LUMO des Akzeptors)

Die Stabilität eines Charge-Transfer-Komplexes hängt zum einen von der Energiedifferenz zwischen dem LUMO des Akzeptors und dem HOMO des Donators, und zum anderen von der Größe des Überlappungsintegrals dieser beiden Orbitale ab <sup>[72]</sup>: Während die Bindungsenergie proportional zu dem Quadrat des Überlappungsintegrals ansteigt, hat eine Zunahme der Energiedifferenz eine Reduktion der Bindungskräfte zur Folge <sup>[72]</sup>. Generell beträgt die Bindungsenergie eines CT-Komplexes bis zu 30 kJ/Mol und fällt mit der dritten Potenz des Abstandes zwischen dem Elektronendonator und dem Elektronenakzeptor ab  $(1/r^3)$  <sup>[63]</sup>.

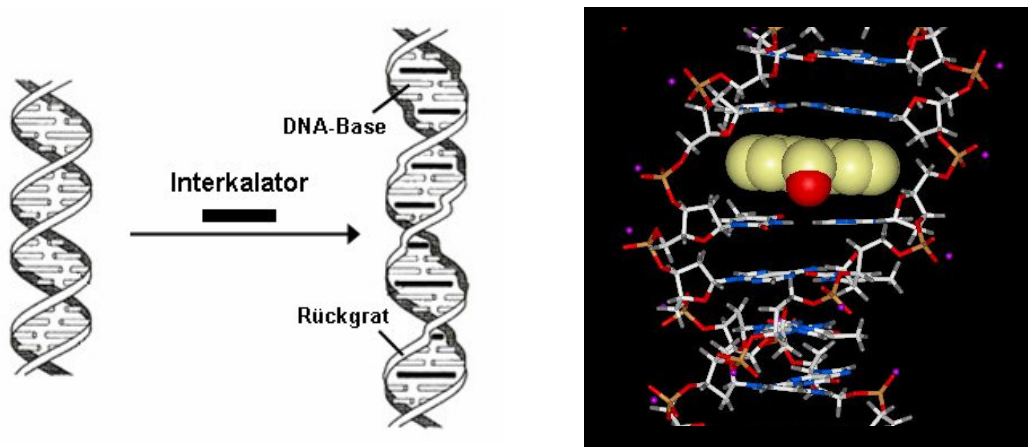
Neben den Wasserstoffbrücken-Bindungen (Kapitel 2.2.4, Seite 30 ff.) sind auch die Charge-Transfer-Wechselwirkungen für die Stabilisierung der DNA-Doppelhelix von großer Bedeutung <sup>[42]</sup>.



## 2.3 DNA-Bindemodi der Liganden

### 2.3.1 Interkalation und interkalierende Verbindungen

Als Interkalation (lat.: *intercalare* = dazwischen schieben) bezeichnet man die erstmals 1961 von *Lerman* <sup>[73]</sup> beschriebene Einlagerung eines planaren, polyzyklischen, aromatischen Chromophors zwischen zwei benachbarte Basenpaare der DNA <sup>[3,18,43,74-77]</sup>. Bei diesem nicht-kovalenten Bindemodus werden die Liganden ohne Zerstörung der *Watson-Crick*-Wasserstoffbrückenbindungen senkrecht zur Helixachse an der doppelsträngigen DNA fixiert <sup>[43,77]</sup>, wobei man zwei Orientierungen des Interkalators in der Kavität unterscheidet <sup>[49,78]</sup>: Bei der sog. „edge-on“-Ausrichtung bildet die Längsachse des Chromophors eine Parallele zur Basenpaarverbindungsline, während sie bei der „head-on“-Orientierung senkrecht zu dieser Trajektorie angeordnet ist <sup>[46,49,78]</sup>. Die Interkalation eines Moleküls ruft eine vertikale Separierung der Basenpaare hervor, die eine Modifikation der Torsionswinkel des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA, sowie eine Vergrößerung der Ganghöhe der Helix zur Folge hat (Abb. 2.16, Seite 34) <sup>[18,43,74-77]</sup>. Diese Entwindung und Streckung des Doppelstrangmoleküls bedingt eine Störung der Matrizenfunktion der DNA, da die Aktivität der für die Replikation, Rekombination und Transkription essentiellen Enzyme (u. a. DNA- und RNA-Polymerasen, Topoisomerasen und Helikasen) durch die Konformationsänderung des Biopolymers massiv beeinträchtigt wird <sup>[3,18,43,74,76,77]</sup>. Infolgedessen kommt die Zellproliferation zum Erliegen <sup>[43,74,77]</sup>. Zudem werden durch die Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus Topoisomerase (meist TOPO II) und DNA irreversible Strangbrüche induziert, die letztlich zur Apoptose führen und für die zytotoxische Wirkung vieler Interkalatoren verantwortlich sind (Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.) <sup>[3,43,74,76,79]</sup>.

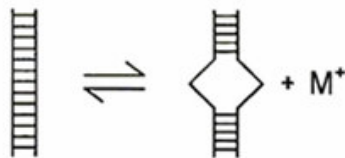


**Abb. 2.16:** Links: Schematische Darstellung der Konformationsänderung der DNA, die durch die Interkalation eines Moleküls bedingt ist (nach Silverman <sup>[43]</sup>)  
Rechts: Darstellung des Interkalationskomplexes aus B-DNA und 9-Formylacridin  
(PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1G3X <sup>[80]</sup>; Darstellung des Liganden als Kalottenmodell)

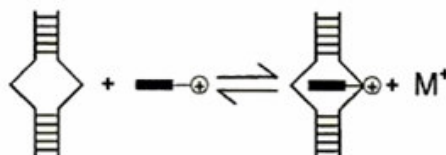
Den Theorien von *Chaires* zur Folge, verläuft die Bildung eines Interkalationskomplexes in drei Schritten <sup>[75]</sup> (Abb. 2.17, Seite 35): Zunächst kommt es zu einer Modifikation der DNA-Konformation, bei der die Doppelhelix aufgewunden und der mittlere Abstand zwischen zwei Basenpaaren von 3,4 Å auf ca. 7-8 Å erweitert wird, um eine Interkalationskavität für die DNA-Bindung des Liganden zu schaffen <sup>[74-77]</sup>. Die Entspiralisierung des DNA-Moleküls bedingt eine Separierung der negativ geladenen Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrats, was eine Reduktion der lokalen Ladungsdichte und – damit verbunden – eine Freisetzung der positiv geladenen Gegenionen ( $M^+$ ) zur Folge hat <sup>[75]</sup> (Abb. 2.17-1, Seite 35). Während es sich bei der Konformationsänderung der Doppelhelix um einen endothermen Prozess handelt, führt die Freisetzung der Kationen zu einer Steigerung der Entropie und ist demnach energetisch begünstigt <sup>[75,76]</sup>. Im zweiten Schritt der Komplexbildung findet eine Überführung des planaren, aromatischen Wirkstoffmoleküls aus dem wässrigen Lösungsmedium in das von den Purin- und Pyrimidin-Basen gebildete, lipophile Zentrum der DNA statt <sup>[18,43,75]</sup>. Aus diesem hydrophoben Transfer resultiert der größte Teil der bei der Interkalation freiwerdenden Bindungsenergie <sup>[18,43,77]</sup>. Trägt der Ligand eine positive Ladung, so werden bei diesem Vorgang darüber hinaus weitere Gegenionen freigesetzt <sup>[75]</sup> (Abb. 2.17-2, Seite 35). Durch die Ausbildung nicht-kovalenter, intermolekularer Wechselwirkungen wird der Interkalator schließlich in der Kavität verankert <sup>[75-77]</sup> (Abb. 2.17-3), wobei dem  $\pi$ - $\pi$ -Stacking und den Charge-Transfer-Kräften die größte Bedeutung zukommt <sup>[18,43,75]</sup>. Zudem tragen auch Wasserstoffbrückenbin-

dungen und elektrostatische Interaktionen zwischen der DNA und dem Liganden zur Stabilisierung des Interkalationskomplexes bei <sup>[43,75]</sup>.

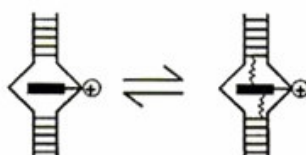
1. Konformationsänderung der DNA ( $\Delta G > 0$ )



2. Hydrophober Transfer ( $\Delta G < 0$ )



3. Molekulare Wechselwirkungen ( $\Delta G < 0$ )



**Abb. 2.17:** Konzeptuelles Modell der in drei Schritten ablaufenden, interkalativen DNA-Bindung eines Moleküls (nach *Chaires*<sup>[75]</sup>)

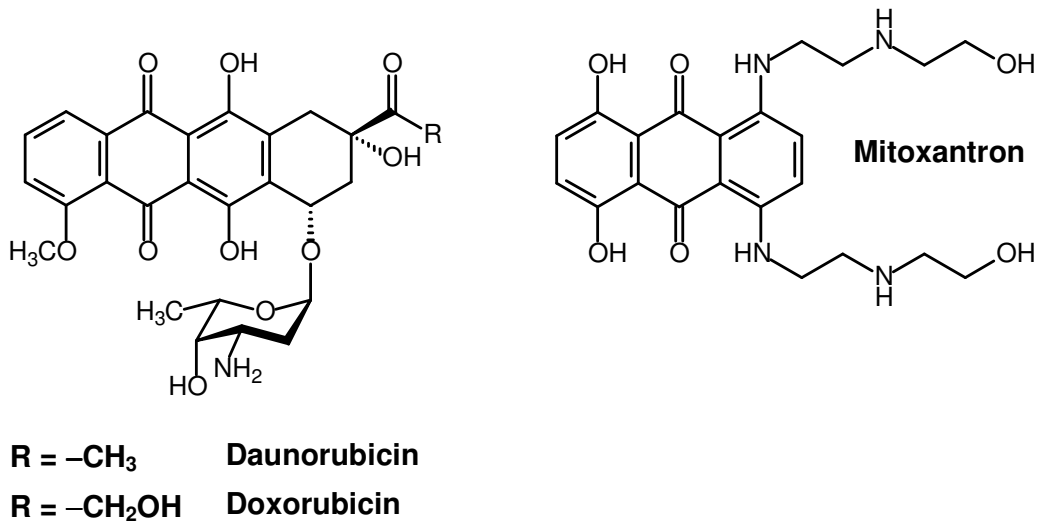
Für eine optimale Interkalation sind folgende strukturelle Voraussetzungen von Bedeutung <sup>[74,77]</sup>:

- a) Ein planares Chromophor, das aus anellierten, aromatischen Ringen aufgebaut ist und eine Fläche von mindestens  $28 \text{ \AA}^2$  aufweist <sup>[18,74,77,81]</sup>
- b) Positiv oder neutral geladene, elektronenziehende Substituenten, die die Elektronendichte des Chromophors reduzieren und infolgedessen die Interaktion zwischen dem Liganden und den elektronenreichen Purin-Basen der DNA verstärken <sup>[77]</sup>
- c) Seitenketten mit funktionellen Gruppen zur Ausbildung von H-Brücken und/oder positiven Ladungen (z. B. Zucker-Moleküle, peptidische Strukturen oder Polymethylenamin-Ketten), die zur Stabilisierung des Interkalationskomplexes mit den Furchen oder dem Rückgrat der DNA in Wechselwirkung treten <sup>[18,74,77,81]</sup>

Die Anthrazykline, die sich von den aus *Streptomyces*-Arten isolierten Substanzen Daunorubicin und Doxorubicin ableiten <sup>[3,43,82]</sup> (Abb. 2.18, Seite 37), stellen sehr potente Zytostatika dar, die häufig gegen ein breites Spektrum solider Tumore (u. a. gegen Gebärmutter- und Gebärmutterhalskrebs, Brustkrebs und Sarkome <sup>[18]</sup>), sowie zur Behandlung der Leukämie klinisch eingesetzt werden <sup>[74,77,82-85]</sup>. Strukturell weist diese Verbindungsklasse ein Anthrachinon-Ringsystem auf, das um einen gesättigten,  $\alpha$ -glykosidisch mit einem Aminozucker verknüpften Zyklus erweitert ist <sup>[3,74,77]</sup>.

Die zytotoxische Wirkung der Anthrazykline ist vor allem auf die eingangs erläuterte, bei der Interkalationskomplexbildung auftretende Konformationsänderung der DNA und die damit verbundene Hemmung der Funktion DNA-assoziiierter Enzyme zurückzuführen <sup>[3,4,18,43,74,82,83]</sup> (z. B. durch Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus TOPO II und DNA). Daneben bedingen die Redoxeigenschaften dieser Verbindungen, die in ihrer Anthrachinon-Struktur begründet sind, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die nicht nur weitere Doppelstrangbrüche verursachen, sondern vermutlich auch für die Kardiotoxizität dieser Substanzklasse verantwortlich sind <sup>[3,43,74,82]</sup>. Die schweren, dosislimitierenden Nebenwirkungen (z. B. Myokardschädigung, Knochenmarkstoxizität, Stomatitis), die mit einer Langzeittherapie verbunden sein können, schränken – ebenso wie die mitunter auftretenden, P-Glykoprotein-vermittelten Resistenzen – die klinische Anwendbarkeit der Anthrazykline ein <sup>[74,82,85]</sup>. Aus diesem Grund beschäftigen sich derzeit zahlreiche Forschergruppen mit der Entwicklung strukturell modifizierter oder als *Prodrugs* wirkender Anthrazyklin-Verbindungen, die eine starke Zytotoxizität bei gleichzeitig reduzierter Nebenwirkungsrate aufweisen sollen <sup>[82-87]</sup>.

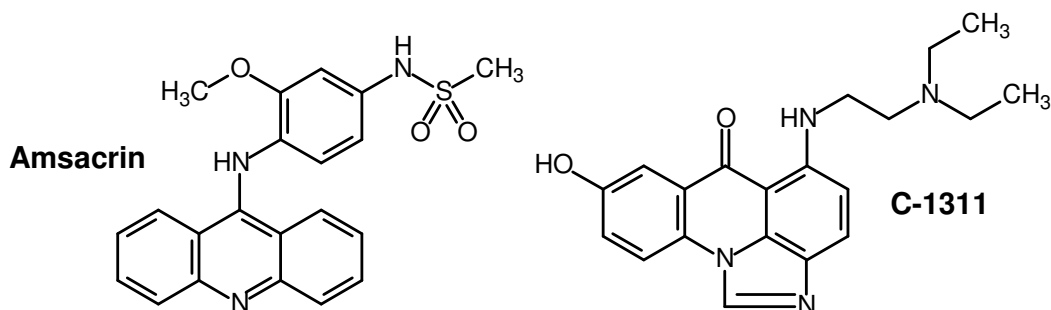
Bei Mitoxantron (Abb. 2.18, Seite 37) handelt es sich um ein synthetisches, basisch substituiertes Anthrachinon-Derivat, das vor allem zur Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms, des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und der Leukämie klinisch eingesetzt wird <sup>[3,18,77]</sup>. Mitoxantron, das als Topoisomerase II-Gift wirkt und auch Helikase-hemmende Eigenschaften aufweist, besitzt gegenüber Doxorubicin den Vorteil einer verlängerten Halbwertszeit und eines günstigeren Nebenwirkungsprofils <sup>[3,18,74]</sup>.



**Abb. 2.18:** Strukturformeln einiger Anthrazyklin-Derivate

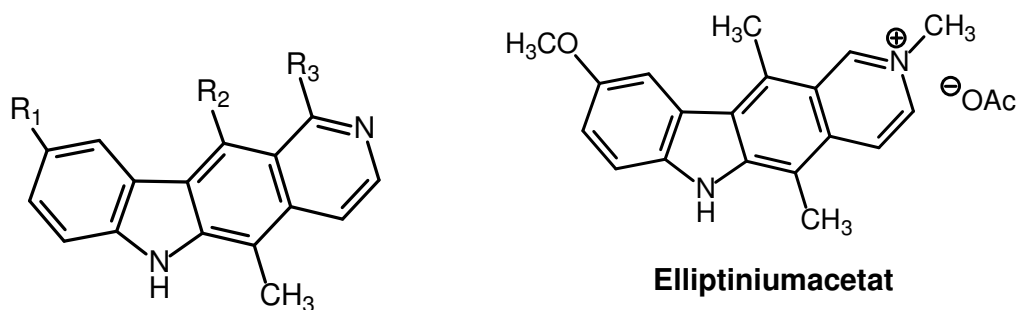
Die vollsynthetische Acridin-Verbindung Amsacrin (Abb. 2.19) wird erfolgreich zur Behandlung der akuten myeloischen und der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt <sup>[3,77,79,88]</sup>. In Analogie zu den Anthrazyklinen ist die Zytotoxizität des Amsacrins auf seine Wirkung als Topoisomerase II-Gift, sowie auf die interkalationsbedingte Funktionsbeeinträchtigung der für die DNA-Replikation, Transkription und Rekombination essentiellen Enzyme zurückzuführen <sup>[3,74,88]</sup>. Obwohl weitere Acridin-Derivate mit antibakteriellen, antiprotozoischen und antikanzerogenen Eigenschaften bekannt sind, wird der klinische Einsatz dieser Substanzklasse aufgrund von schweren Nebenwirkungen, Resistenzen und schlechten Bioverfügbarkeiten limitiert <sup>[43,88]</sup>.

Neben den Acridin-Verbindungen besitzen auch zahlreiche Acridon-Derivate eine antineoplastische Aktivität <sup>[60,89]</sup>. So befindet sich z. B. die Imidzoacridon-Verbindung C-1311 (Abb. 2.19) zurzeit in klinischer Testung, da sie in *in vivo*-Assays eine herausragende Wirksamkeit gegen Leukämiezellen zeigte <sup>[60]</sup>.



**Abb. 2.19:** Strukturformeln des Amsacrins und der Acridon-Verbindung C-1311

Da die Pyrido[4,3-*b*]carbazol-Derivate, die sich von den in *Apocynaceae*-Arten (z. B. *Ochrosia elliptica*, *Ochrosia moorei*) vorkommenden Verbindungen Ellipticin, 9-Methoxyellipticin und Olivacin (Abb. 2.20) ableiten, eine starke zytotoxische Aktivität gegenüber vielen verschiedenen Tumorzelllinien aufweisen, stellen sie viel versprechende Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer, klinisch einsetzbarer Zytostatika dar [74,77,90-93]. Dabei besitzen die Ellipticine pleiotrope biologische Effekte [92]: Neben der auf die Interkalation zurückzuführenden Interaktion mit DNA-bindenden Enzymen (v. a. Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus TOPO II und DNA, sowie Inhibition der Telomerase und der Polymerasen) [74,77,90-93], lagern sich die Pyridocarbazol-Derivate auch an zelluläre und mitochondriale Membranen an [92]. Dies hat die letztlich die Apoptose auslösende Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zur Folge [92]. Darüber hinaus werden die Ellipticine nach einer enzymatischen Oxidation an Position 9 in einem radikalischen Prozess in elektrophile Chinonimin-Derivate überführt, die mit zahlreichen Bionukleophilen (z. B. Aminosäuren, Polynukleotide, Glutathion) in einer Michael-Addition irreversible, kovalente Addukte bilden [77,91-93]. Da die Pyrido[4,3-*b*]carbazole einige toxische Nebenwirkungen (u. a. Granulozytopenie, Hämolyse, Nephrotoxizität) aufweisen und zudem schlecht wasserlöslich sind [91-93], hat bislang nur ein Ellipticin-Derivat, das Elliptiniumacetat (→ verbesserte Wasserlöslichkeit durch Quaternisierung des Stickstoffatoms N2; Abb. 2.20), die Zulassung als Arzneimittel erhalten [90,91,93]. Elliptiniumacetat wird in Frankreich unter dem Handelsnamen Celiptium® zur Therapie osteolytischer Metastasen bei Brustkrebs Erkrankungen eingesetzt [90,91,93].

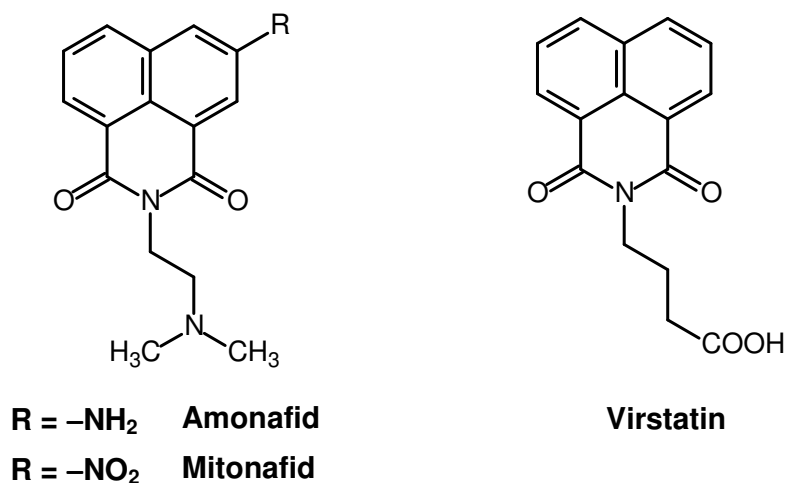


$R_1 = -H$	$R_2 = -CH_3$	$R_3 = -H$	<b>Ellipticin</b>
$R_1 = -OCH_3$	$R_2 = -CH_3$	$R_3 = -H$	<b>9-Methoxyellipticin</b>
$R_1 = -H$	$R_2 = -H$	$R_3 = -CH_3$	<b>Olivacin</b>

**Abb. 2.20:** Strukturformeln einiger Ellipticin-Derivate

Auch innerhalb der Substanzklasse der Naphthalimid-Verbindungen existieren Vertreter mit antikanzerogenen Eigenschaften, wie beispielsweise das Amonafid und das Nitro-Analogon Mitonafid (Abb. 2.21) [74,94,95]. Diese beiden Derivate sind darüber hinaus auch antibiotisch, antiparasitär und antiviral wirksam [95]. Im Gegensatz zu den Naphthalimid-Verbindungen ohne basisch substituierte Seitenkette, handelt es sich bei Amonafid und Mitonafid – wie bei der Majorität der zytotoxisch wirkenden Interkalatoren – um Topoisomerase II-Gifte, die durch die Hemmung der Religation der enzyminduzierten Doppelstrangbrüche die Apoptose der betroffenen Zellen auslösen [74,96]. Während das Amonafid, das in den Assays des NCI (*National Cancer Institute*) eine gute Aktivität gegenüber Leukämiezellen zeigte, sich derzeit noch in der klinischen Testung befindet, mussten dagegen die Mitonafid-Studien aufgrund zu starker Neurotoxizität abgebrochen werden [74,95].

In einem *High Throughput Screening* zeigte die als Virstatin bezeichnete Naphthalimidbuttersäure (Abb. 2.21) in Bezug auf den Erreger *Vibrio cholera* antibakterielle Eigenschaften [98]. Da die Verbindung einen Expressionsinhibitor des Cholera-Toxins sowie des Toxin-regulierten Pilus darstellt, verhindert sie die Toxin-induzierte Diarrhö und die Kolonisierung des Darms mit Cholera Bakterien [98].



**Abb. 2.21:** Strukturformeln einiger Naphthalimid-Derivate

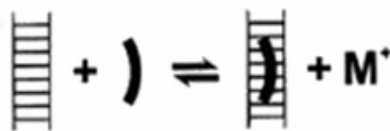
## 2.3.2 Minor Groove Binding, rinnenbindende Moleküle und Lexitropsine/Hairpins

Unter dem *Minor Groove Binding* versteht man die reversible und oftmals sequenz-selektive Einlagerung eines Moleküls in die kleine Rinne der B-DNA <sup>[44,99]</sup> (Kapitel 2.1.1, Seite 19; Abb. 2.24, Seite 45). Dieser Bindemodus, der erstmals 1974 von *Wartell* am Beispiel des Antibiotikums Netropsin (Abb. 2.23, Seite 42) beschrieben wurde, ruft – im Gegensatz zur Interkalation (Kapitel 2.3.1, Seite 33 ff.) – nur eine geringfügige Änderung der Tertiärstruktur der DNA hervor <sup>[69,75,76,99-102]</sup>, da die kleine Furche lediglich im Bereich der Ligandenbindestelle um ca. 0,5-2,0 Å aufgeweitet wird <sup>[69,75,76,99,100]</sup>. Das im Folgenden näher erläuterte konzeptuelle Modell zur DNA-Rinnenbindung sieht aus diesem Grund nur einen zweistufigen Prozess vor <sup>[75,103]</sup>:

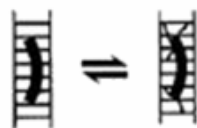
Im ersten Schritt findet ein hydrophober Transfer des Liganden aus dem wässrigen Lösungsmedium in die kleine Rinne der DNA statt (Abb. 2.22-1, Seite 41), was eine Reduktion der im System vorliegenden Rotations- und Translationsfreiheitsgrade zur Folge hat <sup>[75,103]</sup>. Die damit verbundene positive Reaktionsenthalpie wird jedoch durch den beträchtlichen Entropiegewinn, der aus der Verdrängung von strukturell gebundenen Wassermolekülen aus der kleinen Rinne der DNA resultiert, deutlich überkompensiert <sup>[75,103]</sup>. Handelt es sich bei dem *Minor Groove Binder* um ein kationisches Molekül, so werden bei der DNA-Komplexbildung darüber hinaus positiv geladene Gegenionen ( $M^+$ ) freigesetzt (Abb. 2.22-1, Seite 41), was sich über eine weitere Steigerung der Entropie ebenfalls energetisch günstig auf die DNA-Bindung des Liganden auswirkt <sup>[76,103]</sup>. Nach dem hydrophoben Transfer, der aufgrund des beschriebenen entropischen Effekts die treibende Kraft für die Rinnenbindung darstellt <sup>[18,45,75,76,100,102-104]</sup>, werden zur Fixierung des *Minor Groove Binders* in der kleinen Furche zahlreiche nicht-kovalente intermolekulare Wechselwirkungen ausgebildet <sup>[44,50,75,100,103]</sup> (Abb. 2.22-2, Seite 41). Dabei sind die van der Waals-Interaktionen sowie die intermolekularen Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem Liganden und den N3-Atomen der Purin- bzw. den O2-Atomen der Pyrimidin-Basen (Abb. 2.1, Seite 17) von besonderer Wichtigkeit <sup>[18,75,104]</sup>. Zudem tragen elektrostatische Wechselwirkungen zur Stabilisierung des DNA-Ligand-Komplexes bei <sup>[18,45,67,104]</sup>.



1. Hydrophober Transfer ( $\Delta G < 0$ )



2. Molekulare Wechselwirkungen ( $\Delta G < 0$ )

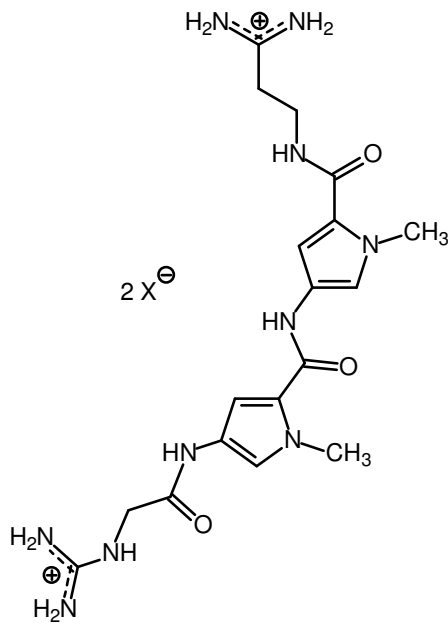


**Abb. 2.22:** Konzeptuelles Modell der in zwei Schritten ablaufenden Rinnenbindung eines Moleküls (nach *Chaires* <sup>[76,103]</sup>)

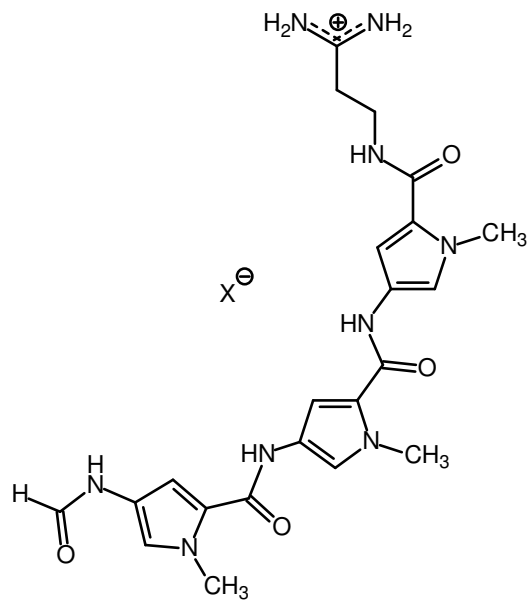
Der genaue Wirkmechanismus der *Minor Groove Binder*, die antitumorale, antivirale, fungizide und antimikrobielle Eigenschaften aufweisen können <sup>[45,46,105]</sup>, ist noch nicht vollständig aufgeklärt <sup>[102,105]</sup>. Es wird jedoch angenommen, dass die biologischen Effekte dieser Substanzklasse vor allem darauf zurückzuführen sind, dass die Verbindungen infolge ihrer DNA-Komplexbildung die Funktion vieler DNA-regulierender Enzyme beeinflussen <sup>[46,69,102,105]</sup>. So können die Rinnenbinder erwiesenermaßen nach ihrer aktiven Aufnahme in die Zelle eine Blockade der Genexpression herbeiführen, indem sie die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die zugehörigen Promotorregionen der DNA verhindern <sup>[46,69,104,105]</sup>. Obwohl diese Enzyme vornehmlich in der großen Furche der DNA binden, sind oftmals auch Atome der kleinen Rinne an der Stabilisierung des Protein-DNA-Komplexes beteiligt, was die entsprechenden Transkriptionsfaktoren dem Angriff durch *Minor Groove Binder* zugänglich macht <sup>[46]</sup>. Da einige Rinnenbinder zudem Topoisomerase I- und II- sowie Helikase-inhibierende Eigenschaften aufweisen, hemmen sie darüber hinaus auch die DNA-Reparatur, die Rekombination und die Replikation <sup>[18,45,46,69,104]</sup>.

Strukturell betrachtet setzen sich die meisten *Minor Groove Binder* aus aromatischen, planaren Ringen, die über amidische Linker oder aliphatische Einfachbindungen miteinander verknüpft sind, zusammen <sup>[18,46,67,69,104,106]</sup> (Abb. 2.23, Seite 42). Sie besitzen typischerweise eine zur Krümmung der kleinen Furche komplementäre Sichelform, die – ebenso wie ihre Fähigkeit, bei der DNA-Bindung eine isohelikale Konformation anzunehmen (*Induced-Fit*) – eine sterisch ungehinderte Einlagerung

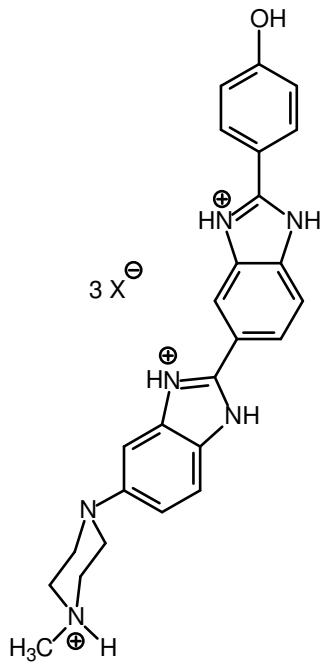
des Rinnenbinders zwischen die beiden Zucker-Phosphat-Ketten des DNA-Rückgrats ermöglicht [18,46,67,69,75,76,102,104,106].



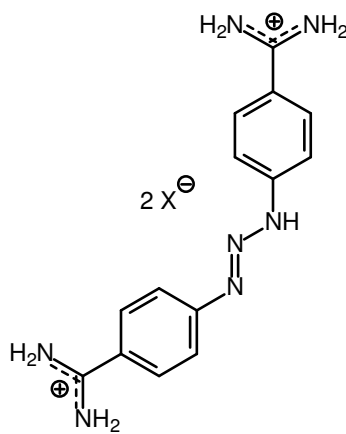
**Netropsin**



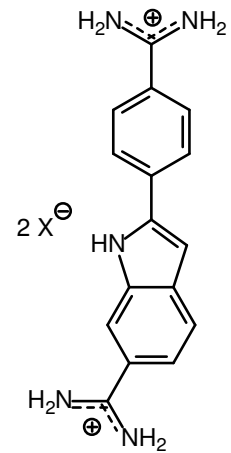
**Distamycin A**



**Hoechst 33258**



**Berenil**



**DAPI**

**Abb. 2.23:** Strukturformeln einiger bekannter *Minor Groove Binder*

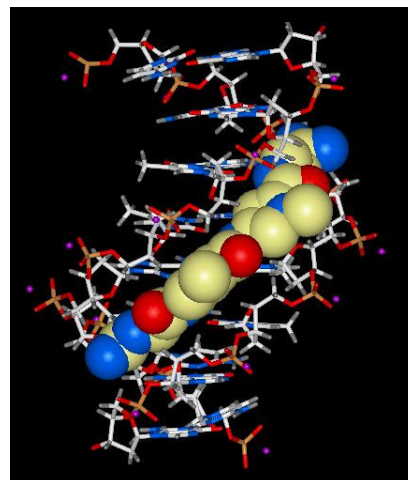
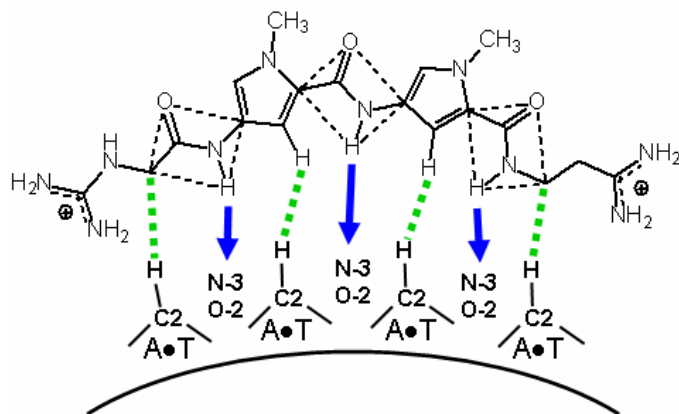
Die kationischen Strukturen, die wichtige Bestandteile zahlreicher *Minor Groove Binder* sind, stabilisieren den gebildeten DNA-Ligand-Komplex, indem sie mit der, ein negatives molekulares elektrostatisches Potential (MEP) aufweisenden, kleinen Rinne in Wechselwirkung treten <sup>[67,69,104,106]</sup>. Zudem weisen viele rinnenbindende Substanzen funktionelle Gruppen auf, die als Donatoren oder Akzeptoren Wasserstoffbrücken zu den DNA-Basen ausbilden können <sup>[69,99,100,104,106]</sup>; diese H-Brückenbindungen sind für die Positionierung des Liganden in der kleinen Furche von entscheidender Bedeutung <sup>[69,99,100,104,106]</sup>.

Die Majorität der derzeit bekannten Rinnenbinder – darunter Netropsin, Distamycin A und Hoechst 33258 <sup>[44-46,67,69,99,100,104,107]</sup> (Abb. 2.23, Seite 42) – interagiert bevorzugt mit AT-reichen Arealen der DNA <sup>[46,50,69,102,104,108]</sup>. Für diese Präferenz gibt es eine Reihe von Gründen, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen <sup>[46,50,69,102,104,108]</sup>.

Bedingt durch den stärker ausgeprägten *Propeller Twist* (→ DNA-Basenpaare sind wie die Blätter eines Propellers angeordnet <sup>[40-42]</sup>) der AT-Basenpaare ist die nur aus Adenin und Thymin aufgebaute kleine Rinne im Vergleich zu einer aus gemischten oder aus GC-Sequenzen bestehenden *Minor Groove* enger und schmaler, so dass die aromatischen, planaren Ringe des AT-selektiven Liganden intensive van der Waals-Wechselwirkungen mit den Wänden der kleinen Furche ausbilden können <sup>[45,50,69,99,102,109]</sup>. Die raumerfüllende, exozyklische Amino-Gruppe des Guanins hat dagegen eine deutliche Abschwächung der van der Waals-Bindungskräfte zur Folge, da die sterische Kollision dieser funktionellen Gruppe mit den Pyrrol-C3-H-Atomen, die bei einigen rinnenbindenden Derivaten vorhanden sind (z. B. bei Netropsin, Distamycin A), eine tiefe Einlagerung des Liganden in die kleine Furche verhindert <sup>[44,45,99,100,102,109]</sup> (Abb. 2.25, Seite 46). Des Weiteren besitzen die AT-reichen Abschnitte der DNA ein negativeres elektrostatisches Potential als die GC-Areale, was auf den Einfluss des sp<sup>2</sup>-hybridisierten N3-Atoms des Adenins zurückzuführen ist <sup>[44-46,69,99,102,108,109]</sup>. Dieses negative MEP ermöglicht starke Wechselwirkungen mit den positiv geladenen funktionellen Gruppen und/oder der elektronenarmen konkaven Seite der Rinnenbinder <sup>[44-46,69,99,108,109]</sup>. Im nativen Zustand weist die aus AT-Basen bestehende kleine Furche darüber hinaus ein hoch organisiertes Netzwerk aus über H-Brücken gebundenen Wasser-Molekülen auf, die bei der DNA-Ligand-Komplexbildung von der DNA verdrängt werden <sup>[69]</sup>. Auch dieser energetisch günstige, entropische Effekt bewirkt eine bevorzugte DNA-Bindung vieler *Minor Groove Binder* in AT-reichen Arealen <sup>[69]</sup>.

Die beiden aus *Streptomyces netropsis* bzw. *Streptomyces distallicus* isolierten Oligopyrrolcarboxamide Netropsin und Distamycin A (Abb. 2.23, Seite 42) besitzen antitumorale, antivirale und antiprotozoische Eigenschaften, da sie infolge ihrer Einlagerung in die kleine Rinne doppelsträngiger DNA, mit der Replikation und der Rekombination interferieren [44-46,67,69,99,100,104,107,108].

Es existieren zahlreiche, gut untersuchte Kristallstrukturen, die das mit vier AT-Basenpaaren eines Oligonukleotids interagierende Netropsin zeigen [100,108,109]. Aus diesen DNA-Ligand-Komplexen geht hervor, dass der intrinsische Twist, den der Naturstoff im nativen Zustand bezüglich der zentralen CO-Pyrrol-Bindung aufweist, infolge der DNA-Komplexbildung weiter verstärkt wird (→ die Rotation um die zentrale NH-Pyrrol-Bindung bedingt eine Vergrößerung des von den beiden Fünfring-Heterozyklen gebildeten Winkels von  $20^\circ$  auf  $> 33^\circ$  [100]), so dass beide Pyrrol-Ringe parallel zu den Wänden in die sehr enge kleine Rinne eingeschoben werden können [44,99,100,108] (Abb. 2.24, Seite 45). Demnach ermöglicht die isohelikale Konformation des Netropsins – ebenso wie dessen zur Krümmung der Doppelhelix komplementäre Sichelform – die exakte räumliche Anpassung des Liganden an die Struktur der kleinen Furche, was die DNA-Bindung des *Minor Groove Binders* sterisch begünstigt [46,75,76,100]. Die Dreizentrenwasserstoffbrücken, die von den amidischen Stickstoffatomen des Netropsins und den O2-Atomen der Thymin- sowie den N3-Atomen der nachfolgenden, im gegenüberliegenden Strang befindlichen Adenin-Basen ausgebildet werden, dienen der Positionierung des Oligopyrrolcarboxamids in der kleinen Rinne [45,67,69,99,104-109]. Die ausgeprägte AT-Selektivität, mit der Netropsin an die DNA bindet, ist dagegen weniger auf diese intermolekularen H-Brücken, sondern viel mehr auf die van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrol-C3-H- sowie den Seitenketten-CH<sub>2</sub>-Gruppen des Liganden und den C2-H-Atomen der Adenin-Moleküle zurückzuführen [45,99,100] (Abb. 2.24, Seite 45). Die unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen, endständigen Amidin- und Guanidin-Gruppen tragen durch ihre elektrostatische Interaktion mit den elektronenreichen Adenin-N3-Atomen ebenfalls zur Stabilisierung des DNA-Netropsin-Komplexes bei [69,100,108].



**Abb. 2.24:** DNA-Bindung des *Minor Groove Binders* Netropsin

Links: Schematische Darstellung der Interaktionspunkte zwischen Netropsin und einem AT-reichen DNA-Abschnitt

[die von der Waals-Interaktionen werden durch grüne, gestrichelte Bindungen repräsentiert, während blaue Pfeile die Dreizentrenwasserstoffbrückenbindungen andeuten (nach *Kopka* <sup>[100]</sup>)]

Rechts: Darstellung des an ein Oligonukleotid gebundenen Netropsins (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1Z8V <sup>[108]</sup>; Darstellung des Liganden als Kalottenmodell)

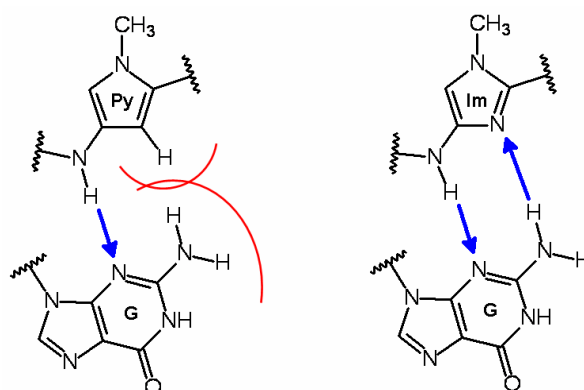
Das Bis-(benzimidazol)-Derivat Hoechst 33258 (Abb. 2.23, Seite 42) besitzt eine antineoplastische Wirksamkeit gegen murine Leukämie und gegen einige solide Tumoren, da es infolge seiner Rinnenbindung die Zellproliferation behindert <sup>[18,45]</sup>. Die Substanz befindet sich derzeit in der Phase I der klinischen Testung <sup>[18,45]</sup>.

Neben Hoechst 33258 und den Oligopyrrolcarboxamiden Netropsin und Distamycin A werden auch die antiprotozoisch aktiven Diaryldiamidine Berenil und DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (Abb. 2.23, Seite 42) oftmals als Leitstrukturen für das Design und die Synthese neuer, potentiell therapeutisch einsetzbarer *Minor Groove Binder* herangezogen <sup>[44,45]</sup>.

DNA-bindende Substanzen, die spezifisch mit definierten Basenabfolgen interagieren können, eröffnen die Möglichkeit, ohne Schädigung von gesundem Gewebe in die Genexpression von Tumorzellen oder Krankheitserregern einzugreifen, indem sie die Promotorregionen bestimmter Transkriptionsfaktoren gezielt blockieren <sup>[46,69,103,106]</sup>. Die Basis für die Entwicklung sequenzspezifisch bindender Liganden, zu denen auch die im Folgenden beschriebenen Lexitropsine gehören, bildet das in der kleinen Rinne in Abhängigkeit von der Basenabfolge vorliegende Muster an H-Brücken-Dona-

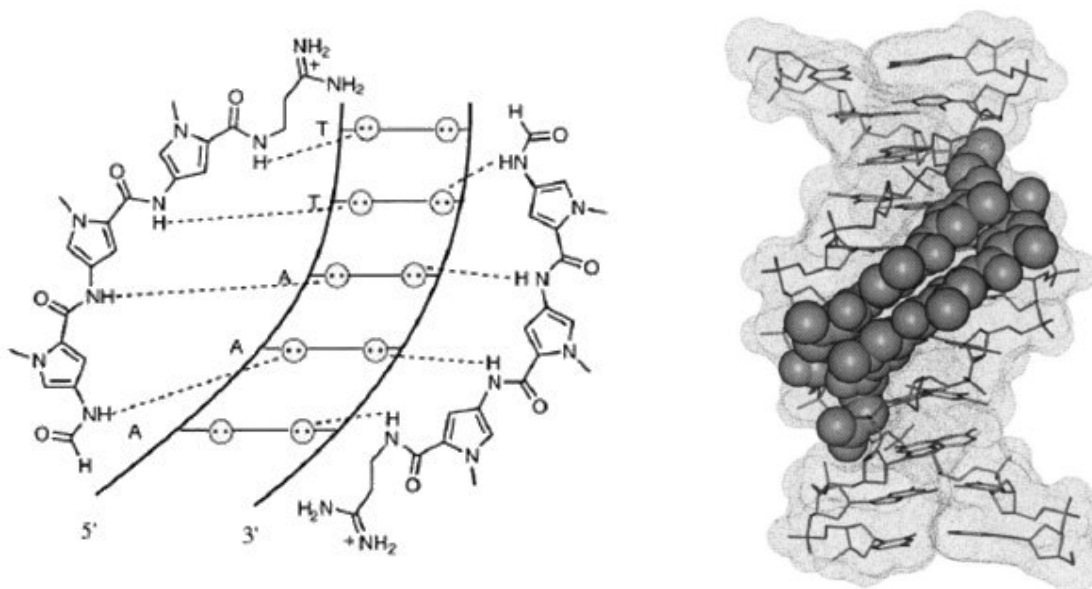
toren und Akzeptoren (Abb. 2.3, Seite 19), sowie das MEP, die Hydrophobizität und die für van der Waals-Interaktionen jeweils zur Verfügung stehenden Atome <sup>[69,99]</sup>.

Bei den erstmals von *Dickerson* namentlich erwähnten Lexitropsinen (lat.: legere = lesen) handelt es sich um Netropsin- bzw. Distamycin-analoge, eine Polyamid-Struktur aufweisende Moleküle, die an kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte jeder gewünschten Sequenz binden können <sup>[67,69,100,103,104,109]</sup>. Bei ihrer Entwicklung machte man sich die aus der Untersuchung kristalliner Netropsin-DNA-Komplexe resultierende Beobachtung zunutze, dass der Pyrrol-Ring bevorzugt mit AT-Basenpaaren interagiert, da Adenin und Thymin auf der der kleinen Rinne zugewandten Seite keine großvolumigen Substituenten aufweisen (Abb. 2.3, Seite 19) <sup>[45,67,100,108]</sup>. Bei der Einlagerung in GC-reiche Sequenzen kommt es dagegen zu einer van der Waals-Abstoßung zwischen der exozyklischen Amino-Gruppe des Guanins und dem C3-H-Atom des Fünfring-Heterozyklus, die jedoch durch den Austausch des Pyrrols gegen ein Imidazol-Molekül verhindert wird <sup>[67,110]</sup> (Abb. 2.25). Die GC-Toleranz, die durch diese bioisostere Fünfring-Heteraren-Substitution erreicht werden konnte, liegt zum einen in der räumlichen Struktur des Imidazols, die zu der der Purin-Base komplementär ist, begründet, sowie zum anderen in den H-Brücken-Akzeptor-Eigenschaften des  $sp^2$ -hybridisierten N3-Atoms, welches eine spezifische Wasserstoffbrückenbindung zu der Guanin-NH<sub>2</sub>-Gruppe ausbilden kann. (Abb. 2.25) <sup>[45,46,69,103,109-111]</sup>. Die Verschiebung der Sequenzselektivität der *Minor Groove Binder* von AT- zu GC-reichen Arealen wird zur Erhöhung ihrer Tumorspezifität angestrebt, da viele mit der Zellproliferation assoziierten Gene (u. a. Onkogene; Kapitel 1.1, Seite 1 ff.) einen erhöhten Anteil an GC-Basenpaaren aufweisen <sup>[7,112]</sup>.



**Abb. 2.25:** Schematische Darstellung der zwischen den Heterozyklen Pyrrol (Py, links) bzw. Imidazol (Im, rechts) und der Purin-Base Guanin jeweils auftretenden Interaktionen (blaue Pfeile repräsentieren H-Brücken; die roten Linien kennzeichnen eine van der Waals-Abstoßung; nach *Goodsell* <sup>[67]</sup>)

*Peltons* und *Wemmers* Entdeckung, dass sich zwei Distamycin-Moleküle nebeneinander in einer antiparallelen Orientierung in die kleine Rinne einlagern können (Abb. 2.26), war für die Entwicklung sequenzselektiv DNA-bindender Substanzen von sehr großer Bedeutung [67,69,103,104,113]. Während die Lexitropsine bei einer im Verhältnis 1:1 erfolgenden Komplexbildung im Zentrum der kleinen Furche lokalisiert sind und dementsprechend nur AT/TA- und GC/CG-Basenpaare auf der Grundlage der exozyklischen Amino-Gruppe des Guanins voneinander unterscheiden können, hat jedes der beiden Seite an Seite in der kleinen Rinne vorliegenden Moleküle nur Kontakt zu den DNA-Basen jeweils eines Polynukleotidstrangs [67]. Dieser 2:1 Bindemodus ermöglicht demzufolge die Differenzierung aller vier natürlich vorkommenden DNA-Basenpaare [67].



**Abb. 2.26:** Darstellung der im Verhältnis 2:1 erfolgenden DNA-Bindung des *Minor Groove Binders* Distamycin A (nach *Dervan* [114])

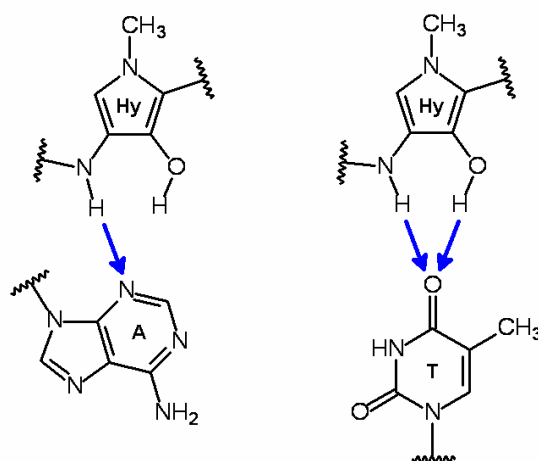
Links: Schematische Darstellung der Interaktionspunkte zwischen dem Liganden und der DNA

(H-Brücken werden durch gestrichelte Linien repräsentiert; die zwei Punkte aufweisenden Kreise symbolisieren die freien Elektronenpaare der Adenin-N3- bzw. der Thymin-O2-Atome)

Rechts: Aus NMR-Studien resultierender DNA-Ligand-Komplex (Darstellung des Distamycin A als Kalottenmodell)

Während die *Side-by-Side*-Einlagerung eines Pyrrol- und eines Imidazol-Rings die Separierung eines GC- von einem CG-Basenpaar erlaubt (→ die Kombination Py/Im erkennt CG; die Kombination Im/Py erkennt GC), verhalten sich zwei nebeneinander

liegende Pyrrol-Moleküle dagegen degenerativ, da sie nicht zwischen AT- und TA-Paarungen differenzieren können <sup>[46,69,103,110,111,115]</sup>. Diese Unterscheidung konnte jedoch durch die Einführung einer OH-Gruppe an Position 3 des Heterozyklus realisiert werden, da 3-Hydroxypyrrol die Interaktion mit Thymin präferiert <sup>[69,103]</sup>: Das O2-Atom der Pyrimidin-Base kann im Gegensatz zum N3-Atom des Purin-Moleküls zwei intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden, wobei zum einen die NH-Gruppe der Amidbindung, die zwei Heterozyklen eines Lexitropsins miteinander verknüpft, und zum anderen die Hydroxyl-Gruppe des Pyrrol-Derivats als Akzeptor fungiert <sup>[67,69,103,110,111]</sup> (Abb. 2.27). Des Weiteren behindert das C2-H-Atom des Adenins die Einlagerung der sterisch anspruchsvollen alkoholischen Funktion <sup>[69,103]</sup>.

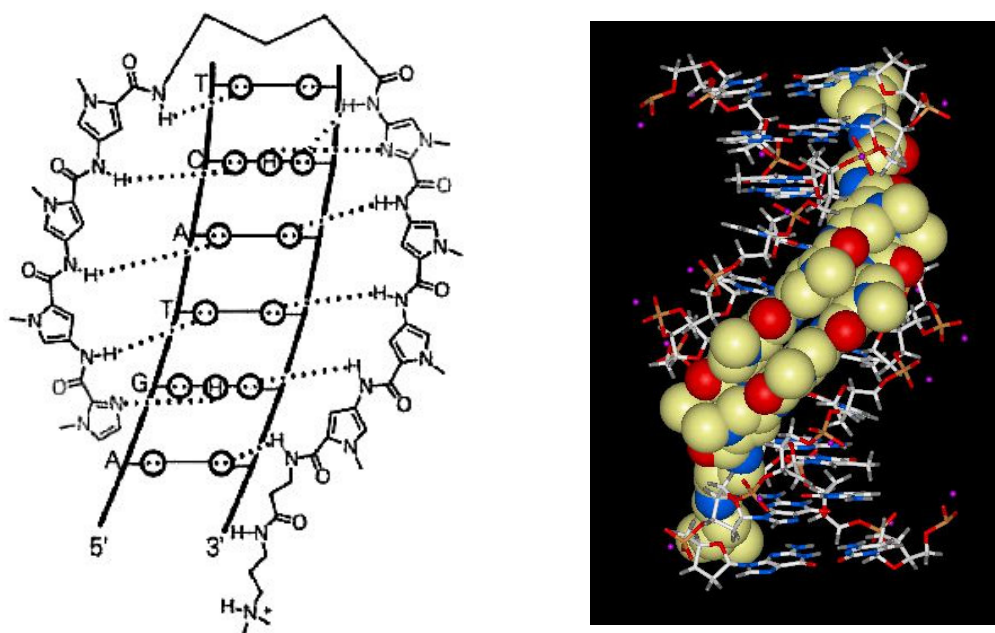


**Abb. 2.27:** Schematische Darstellung der zwischen den DNA-Basen Adenin (links) bzw. Thymin (rechts) und dem Hydroxypyrrol-Molekül (Hy) eines Lexitropsins jeweils auftretenden Interaktionen (blaue Pfeile repräsentieren H-Brücken; nach Goodsell <sup>[67]</sup>)

Aus der Erkenntnis, dass der 2:1 Bindemodus für die sequenzselektive DNA-Bindung der Lexitropsine von entscheidender Bedeutung ist, resultierte das Design der sog. Hairpin-Moleküle <sup>[67,69,103,104,110,111,114]</sup>. Bei den von Dervan entwickelten Vertretern dieser Substanzklasse werden zwei Netropsin-analoge *Minor Groove Binder* über einen flexiblen Linker (z. B.  $\gamma$ -Aminobuttersäure,  $\beta$ -Alanin) so miteinander verknüpft, dass sie in der kleinen Furche nebeneinander in einer antiparallelen Orientierung als kofaziale Paare vorliegen <sup>[67,69,103,104,110,111,114]</sup> (Abb. 2.28, Seite 49). Die Positionierung der Hairpin-Moleküle in der kleinen Rinne kann durch die Einführung einer N-terminalen Acetyl- oder einer C-terminalen Glycin-Gruppe beeinflusst werden <sup>[111]</sup>: Diese strukturellen Modifikationen haben beide eine Ausrichtung des Liganden in 5'-3'-Richtung zur Folge <sup>[111]</sup>.



Die der Entwicklung der Lexitropsine und der Hairpins zugrunde liegenden Theorien konnten z. B. durch die Synthese und die Testung des unten abgebildeten, aus N-Methylpyrrol- und N-Methylimidazol-Ringen bestehenden Polyamids bestätigt werden [115-116] (Abb. 2.28). Dieses Molekül, das trotz seines großen Molekulargewichts in die Zellen aufgenommen wurde, zeigte in mit *Xenopus*-Nierenzellen durchgeführten *in vitro*-Assays eine Inhibierung der Genexpression, da es sequenzspezifisch mit der Basenabfolge 5'-AGTACT-3' interagierte, die sich in der Promotorregion des Transkriptionsfaktors TFIIIA befand [114-116].



**Abb. 2.28:** Links: Schematische Darstellung der Interaktionspunkte zwischen der DNA und dem Hairpin-Molekül ImPyPyPy- $\gamma$ -ImPyPyPy- $\beta$ -Dp

( $\rightarrow$  Im: Imidazol; Py: Pyrrol;  $\gamma$ :  $\gamma$ -Aminobuttersäure;  $\beta$ :  $\beta$ -Alanin; Dp: Dimethylaminopropyl-Kette; nach *Dervan* [115])

(H-Brücken werden durch gestrichelte Linien repräsentiert; die zwei Punkte aufweisenden Kreise symbolisieren die freien Elektronenpaare der Purin-N3- bzw. der Pyrimidin-O2-Atome; die mit dem Buchstaben H versehenen Kreise symbolisieren die exozyklische Amino-Gruppe des Guanins)

Rechts: Darstellung des an ein Oligonukleotid gebundenen Hairpin-Moleküls (ImPyPyPy- $\beta$ -Dp)<sub>2</sub>

(PDB-Code [36]: 1CVY [117]; Darstellung des Liganden als Kalottenmodell)

Bei dem Design der Hairpin-Moleküle darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sie die *Lipinski's Rule of Five* [118] zumindest bezüglich des Molekulargewichts (>2000 Da) und der Anzahl an H-Brücken-Donatoren verletzen [107,116]. Aus diesem Grund ist die intrazellulär anflutende Substanzkonzentration oftmals zu gering, um einen physiologischen Effekt auszulösen [107]. Trotz der zahlreichen Fortschritte, die

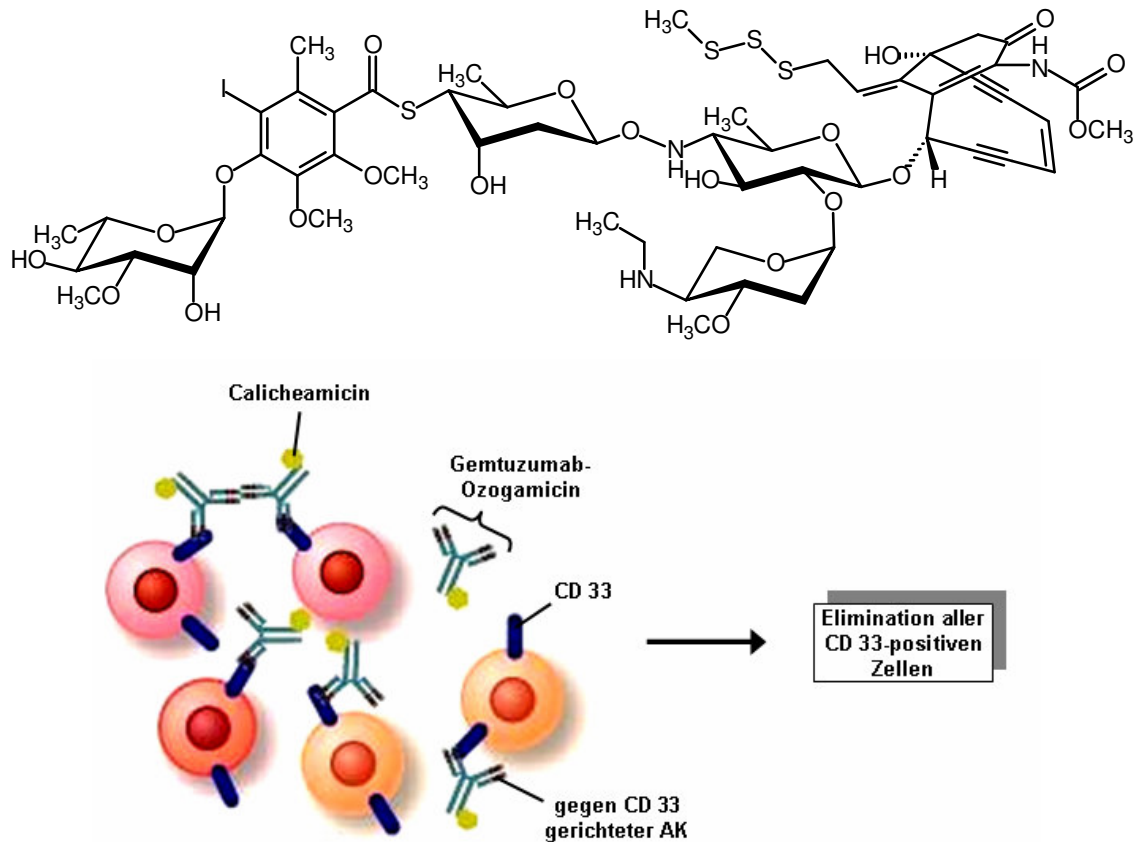
in der Entwicklung sequenzspezifisch DNA-bindender Liganden gemacht wurden, ist bislang noch kein Lexitropsin als antiviral oder antitumoral wirkendes Therapeutikum in klinischem Gebrauch <sup>[103]</sup>.

### 2.3.3 Dualer Bindemodus und Hybrid-Moleküle/Combilexine

Als Hybrid-Moleküle bezeichnet man Substanzen, die struktur- und wirkungsspezifische Eigenschaften verschiedener Arten biologisch aktiver Verbindungen in einem einzigen Molekül vereinen <sup>[38,47]</sup>. Die DNA-affinen Vertreter dieser Substanzklasse bestehen zumeist aus einem rinnenbindenden Strukturelement, das kovalent mit einem Alkylanz, einem interkalierenden Chromophor, einem photosensitiven Molekül (z. B. Psoralen-Derivate, Pyren-Verbindungen), einem Metallchelatkomplex oder einem Endiin-Antibiotikum verknüpft sein kann <sup>[103,119-123]</sup>. Diese DNA-Liganden, die folglich durch einen dualen Bindemodus und/oder einen dualen Wirkmechanismus gekennzeichnet sind, wurden mit dem Ziel entwickelt, durch die Kombination eines sequenzselektiven *Minor Groove Binders* mit einer hochreaktiven, jedoch oftmals unspezifisch bindenden Komponente, die Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen zu steigern und gleichzeitig die das gesunde Gewebe betreffenden Nebenwirkungen zu reduzieren <sup>[121]</sup>.

Bei dem Wirkstoff Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>) handelt es sich um ein antineoplastisch aktives Hybrid-Molekül, das sich aus einem humanisierten monoklonalen Antikörper (AK) und dem Bakterien-Toxin Calicheamicin zusammensetzt <sup>[124]</sup> (Abb. 2.29, Seite 51). Der Antikörper richtet sich gegen das Sialinsäure-abhängige Adhäsionsglykoprotein CD33, das von leukämischen Blasten – nicht jedoch von normalen, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen – auf der Zelloberfläche präsentiert wird <sup>[124]</sup>. Der Naturstoff Calicheamicin (Abb. 2.29, Seite 51), der zu der Familie der zytotoxisch wirkenden Endiin-Antibiotika gehört, bindet in der kleinen Rinne doppelsträngiger DNA an bestimmte, 4 Basenpaare umfassende Erkennungssequenzen [ $\rightarrow$  d(TCCT), d(TTTT), d(CTCT), d(TCCC) und d(ACCT)], wobei die Saccharid-Moleküle des Toxins zum 3'-Ende des Oligopyrimidinstrangs ausgerichtet sind <sup>[103,124-126]</sup>. Calicheamicin verursacht irreversible DNA-Schäden, indem die Thioether-Struktur, die infolge einer bioreduktiven Aktivierung durch z. B. exogene Thiole erzeugt wird, eine *Bergman*-Zykloaromatisierungsreaktion ermöglicht, die zur Bildung

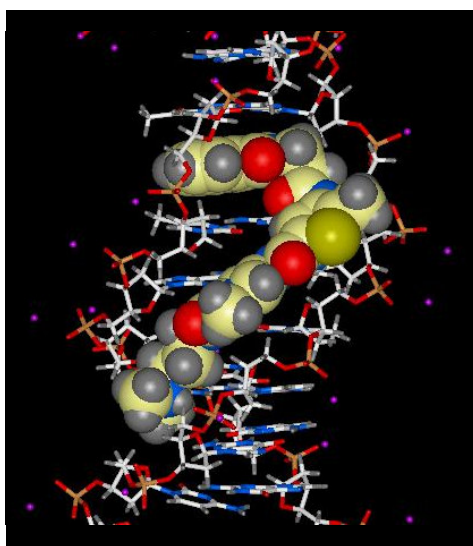
eines Benzenoid-Radikals führt <sup>[103,124-126]</sup>. Dieses Diradikal abstrahiert von jedem der beiden Zucker-Phosphat-Ketten des DNA-Rückgrats jeweils ein Wasserstoffatom, wodurch DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden, die letztlich die Apoptose der betroffenen Zellen auslösen <sup>[103,124-126]</sup>. Mylotarg<sup>®</sup> ist für die Behandlung von Rezidiven der akuten myeloischen Leukämie zugelassen <sup>[124]</sup>.



**Abb. 2.29:** Oben: Strukturformel des Endiin-Antibiotikums Calicheamicin  
Unten: Schematische Darstellung des Wirkprinzips von Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>), das einen gegen CD33 gerichteten Antikörper und das Bakterien-Toxin Calicheamicin in einem Molekül vereint  
(nach Zündorf <sup>[124]</sup>)

Die Hybrid-Moleküle, die sich aus einem DNA-*Minor Groove Binder* und einem interkalierenden Chromophor zusammensetzen, werden als Combilexine bezeichnet <sup>[6,103,119,122,123,127,128]</sup> (Abb. 2.30, Seite 52; Abb. 2.32, Seite 54). Diese einen dualen Bindemodus aufweisenden DNA-Liganden stellen eine sehr viel versprechende Substanzklasse auf der Suche nach neuen, stark wirksamen und gut verträglichen Zytostatika dar <sup>[103]</sup>: Das rinnenbindende Strukturelement, bei dem es sich meist um ein

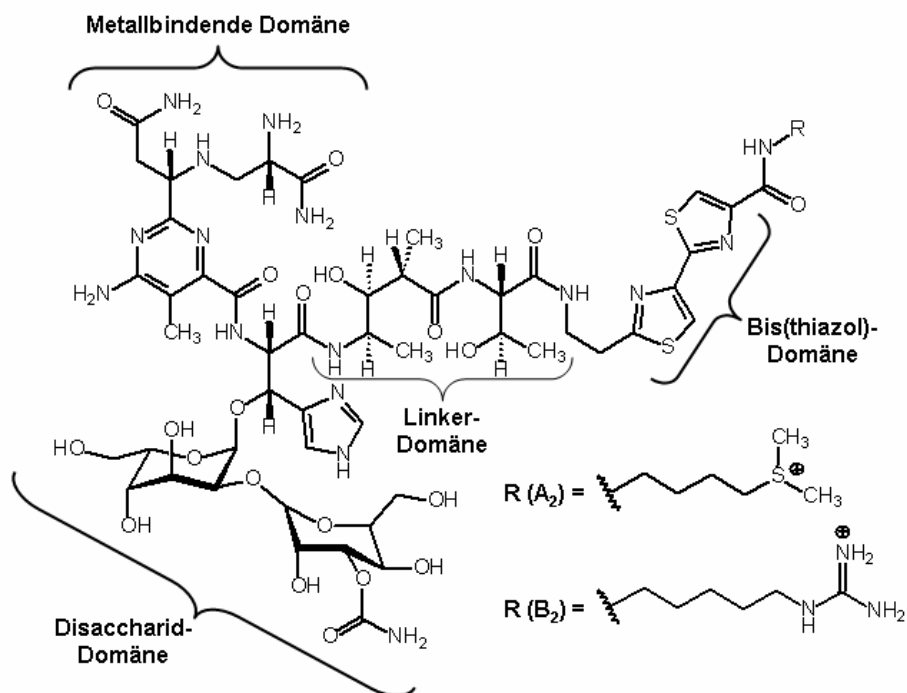
Netropsin- bzw. Distamycin-analoges Lexitropsin handelt (Kapitel 2.3.2, Seite 41 ff.), gewährleistet eine sequenzselektive DNA-Bindung der Combilexine, während der Interkalator den DNA-Ligand-Komplex stabilisiert und somit zu einer Verlängerung der Residualzeit des Hybrid-Moleküls an der DNA beiträgt <sup>[6,119,123,127]</sup>. Des Weiteren bedingt das Chromophor eine Steigerung der Zytotoxizität des Konjugats, indem es infolge seiner radikalbildenden Eigenschaften und/oder seiner Fähigkeit, den binären Komplex aus Topoisomerase II und DNA zu stabilisieren (→ Topoisomerase II-Gift, Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.), die Bildung von zur Apoptose führenden DNA-Doppelstrangbrüchen auslöst <sup>[6,103,119,123,127]</sup>. Darüber hinaus wird durch die Kombination eines Rinnenbinders mit einem Interkalator eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit der resultierenden Combilexine angestrebt, da sich die aromatischen, planaren Chromophore oftmals durch eine gute Zellmembranpenetration auszeichnen <sup>[6,123,127,129]</sup>.



**Abb. 2.30:** Darstellung eines DNA-Combilexin-Komplexes am Beispiel des Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Thiophen-Pyrrolcarboxamids **23** (Abb. 6.36, Seite 214)  
(Darstellung des Liganden als Kalottenmodell)

Bei den Bleomycinen (Abb. 2.31, Seite 53) handelt es sich um antiproliferativ wirkende Combilexine natürlichen Ursprungs, die erstmals in den 1960er Jahren aus *Streptomyces verticillus* isoliert wurden <sup>[130]</sup>. Das Bis(thiazol)-Strukturelement dieser antibiotisch aktiven Verbindungen interkaliert zwischen zwei AT-Basenpaaren, während sich der Linker – ebenso wie die metallbindende und die Disaccharid-Domäne – in die kleine Rinne doppelsträngiger DNA einlagert <sup>[130]</sup>. Der variable, aliphatische Rest,

mit dem der zweite Thiazol-Ring substituiert ist, interagiert dagegen mit Atomen der großen Furche <sup>[130]</sup>. Die Zytotoxizität der Bleomycine ist hauptsächlich auf ihre Eigenschaft zurückzuführen, in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup>-Ionen und Sauerstoff die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen zu induzieren <sup>[130]</sup>. Derzeit wird ein Gemisch verschiedener Bleomycin-Verbindungen klinisch zur Behandlung von Hodgkin-Lymphomen, Kopf-Hals-Tumoren und Hodenkrebs eingesetzt <sup>[130]</sup>.

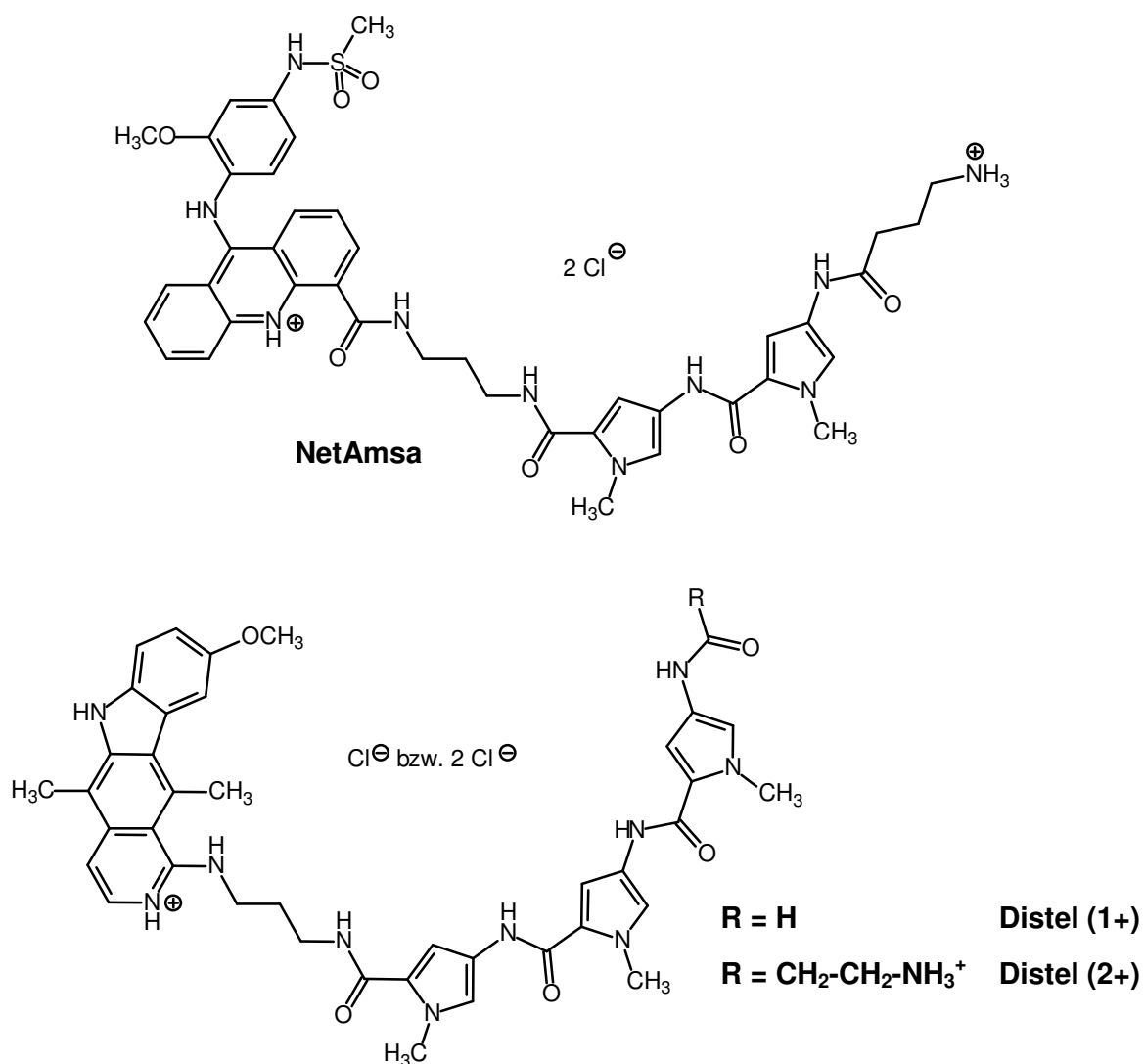


**Abb. 2.31:** Strukturformeln der beiden wichtigsten Bleomycin-Verbindungen A2 und B2

Die Verbindung NetAmsa (Abb. 2.32, Seite 54), bei der es sich im Gegensatz zu den Bleomycinen um ein synthetisches Hybrid-Molekül handelt, gehört zu den am besten untersuchten Combilexinen <sup>[6,103,127]</sup>. So wurden beispielsweise von *Bailly* et. al. zahlreiche Studien zu den DNA-bindenden Eigenschaften dieser Substanz durchgeführt, die zeigten, dass der Netropsin-analoge Molekülteil mit AT-reichen Arealen der kleinen Rinne in Wechselwirkung tritt, während der Anilin-Ring und dessen Substituenten infolge der Interkalation des Acridin-Trizyklus in die große Furche der DNA eingelagert werden <sup>[6,103,127]</sup>. NetAmsa besitzt Topoisomerase II-inhibierende Eigenschaften, wobei die Methoxy- und die Methansulfonamid-Gruppe sehr wahrscheinlich als Schlüsselemente für die Interaktion des Combilexins mit dem binären Enzym-DNA-Komplex fungieren <sup>[6,103,127]</sup>. Darüber hinaus kann die Amsacrin-analoge Struktur des

Hybrid-Moleküls nach einer metabolischen Aktivierung zu einem Chinonimin oxidiert werden, das über die Generierung von Sauerstoffradikalen ebenfalls irreversible, zytotoxische DNA-Strangbrüche verursacht <sup>[103,127]</sup>. In *in vitro*-Tests wies NetAmsa eine antiproliferative Wirksamkeit gegen murine Leukämie- und humane Lymphoblastenzelllinien auf <sup>[127]</sup>.

Bei den in Abb. 2.32 dargestellten Verbindungen Distel (1+) und Distel (2+) handelt es sich um weitere Beispiele für Combilexine synthetischen Ursprungs.



**Abb. 2.32:** Strukturformeln einiger Combilexine synthetischen Ursprungs

## 2.3.4 Hoogsteen-Basenpaarung und PNAs

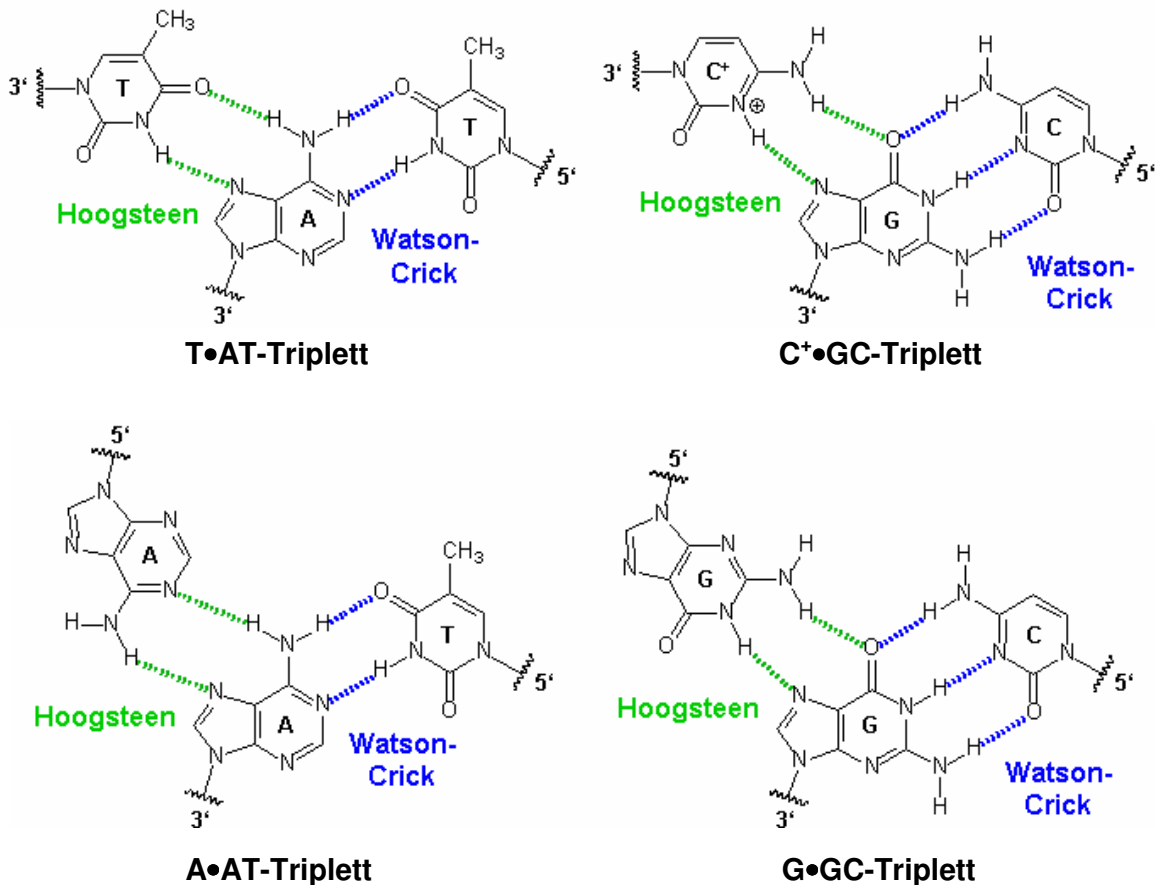
Oligonukleotide können mit der größtmöglichen Selektivität an bestimmte DNA-Sequenzen binden, weshalb sie in der Molekularbiologie zur Diagnostik, sowie zur Identifizierung und Etablierung neuer Targets eingesetzt werden <sup>[131,132]</sup>. Darüber hinaus besitzen synthetische, kurzkettige Nukleinsäuren das Potential, bei einigen Krankheiten (z. B. virale oder bakterielle Infektionen, Entzündungen, Tumorerkrankungen) als Therapeutika zu dienen, indem sie einen gezielten Eingriff in die Genexpression eines Organismus ermöglichen <sup>[50,123,132-134]</sup> (→ *Sequence-Selective Targeted Drugs*). So werden beispielsweise im Rahmen des Antisense-Konzepts 13 bis 25 Nukleotide umfassende DNA-Moleküle synthetisiert, die mit einer zu diesen Oligomeren komplementären m-RNA unter Ausbildung von *Watson-Crick*-Wasserstoffbrücken hybridisieren <sup>[104,131,133,135]</sup> (Abb. 2.3, Seite 19). Diese DNA-RNA-Komplexe lösen die Aktivierung der ubiquitär vorkommenden RNase H aus, die daraufhin mittels Hydrolyse einer oder mehrerer Phosphodiester-Bindungen den RNA-Einzelstrang jedes Hybrid-Moleküls abbaut <sup>[104,131-133,135]</sup>. Auf diese Weise wird die ribosomale Translation der als Target fungierenden m-RNA inhibiert <sup>[104,131-133,135]</sup>. Bei der Reaktion von synthetischen Nukleinsäuren mit doppelsträngiger, chromosomaler DNA können Triple-Helices entstehen (Abb. 2.33), die aufgrund der sterischen Blockade bestimmter DNA-Abschnitte eine Hemmung der Replikation, der Rekombination und der Transkription zur Folge haben können (→ Antigen-Konzept) <sup>[104,123,131,135,136]</sup>.



**Abb. 2.33:** Modell einer DNA-Triple-Helix (die beiden Stränge des DNA-Duplexes sind in weiß bzw. grau dargestellt; das schwarze Molekül repräsentiert das synthetische DNA-Oligonukleotid, das sich in die große Rinne der Doppelhelix eingeschoben hat; nach Fox <sup>[50]</sup>)

Intermolekulare DNA-Triplexe werden erzeugt, indem ein Oligonukleotid, das entweder nur aus Pyrimidin- oder nur aus Purin-Basen besteht, in der großen Furche doppelhelikaler DNA mit dem Homopurin-Areal der Zielsequenz in Wechselwirkung tritt <sup>[50,104,114,131,134-137]</sup>. Dabei richtet sich eine Oligopyrimidin-Nukleinsäure parallel zu

dem Purin-Strang der DNA aus, während ein in die große Rinne eingeschobenes Homopurin-Molekül eine antiparallele Orientierung besitzt <sup>[50,114,134-137]</sup>. Die DNA-Bindung der synthetischen, kurzkettigen Oligonukleotide erfolgt schließlich mittels *Hoogsteen-* (→ bei Homopyrimidin-Derivaten) bzw. reversen *Hoogsteen-*Wasserstoffbrücken (→ bei Homopurin-Derivaten) unter Bildung von T•AT- und C<sup>+</sup>•GC- bzw. A•AT- und G•GC-Basentriplets <sup>[50,14,134-137]</sup> (Abb. 2.34).



**Abb. 2.34:** Oben: Schematische Darstellung der *Hoogsteen*-Basenpaarung zwischen einem DNA-Duplett und einem parallel zur Purin-Base der DNA ausgerichteten Pyrimidin-Molekül (C<sup>+</sup>: am N3-Atom protoniert vorliegendes Cytosin; nach <sup>[50,114]</sup>)

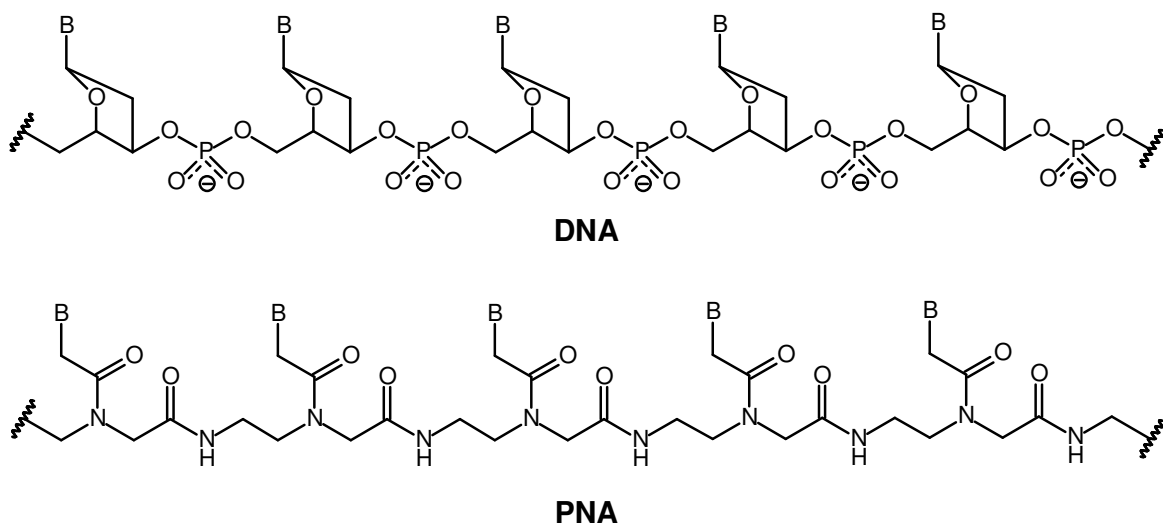
Unten: Schematische Darstellung der reversen *Hoogsteen*-Basenpaarung zwischen einem DNA-Duplett und einem antiparallel zur Purin-Base der DNA ausgerichteten Purin-Molekül (nach <sup>[50,114]</sup>)

Die Realisierung des Antigen-Konzepts wird durch die Tatsache erschwert, dass die *Hoogsteen*-Basenpaarung des Cytosins einen pH-Wert  $\leq 5,5$  erforderlich macht, damit das infolge des schwach sauren Milieus protoniert vorliegende N3-Atom der Pyri-



midin-Base als H-Brücken-Donator fungieren kann <sup>[50,134,135,137,138]</sup> (Abb. 2.34, Seite 56). Zudem weisen die Triplexse unter physiologischen Bedingungen eine im Vergleich zu doppelsträngiger DNA sehr viel geringere Stabilität auf <sup>[50,104,123,134-137]</sup>. Ein weiteres Problem liegt darin begründet, dass die durch die Bindung von Antigen-Oligonukleotiden induzierte Blockade von DNA-Abschnitten bislang auf die Homopurin/Homopyrimidin-Areale des Genoms limitiert ist <sup>[50,104,123,134-137]</sup>.

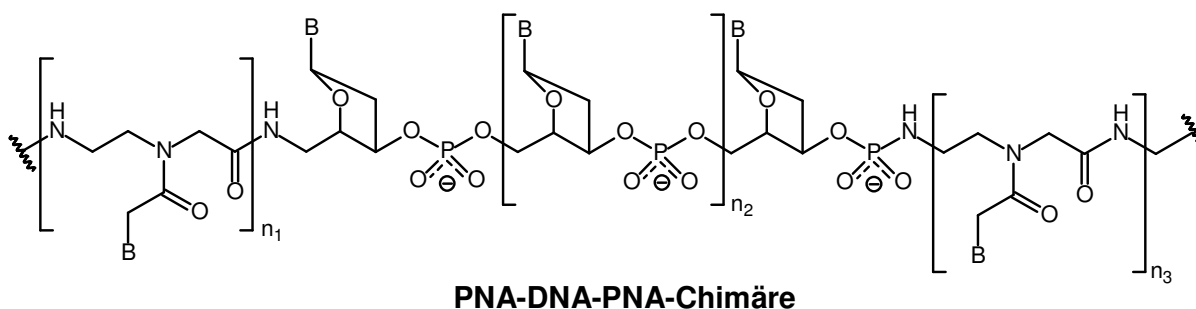
Da die Oligonukleotide intrazellulär nur in einer für einen physiologischen Effekt nicht ausreichenden Konzentration anfluten und zudem sehr schnell von Endo- und Exonukleasen abgebaut werden, wurden zahlreiche strukturell modifizierte Nucleinsäuren synthetisiert, um die therapeutische Anwendbarkeit des Antigen- und des Antisense-Konzeptes zu steigern <sup>[104,123,132,133,135,136]</sup>. Dabei stellen die von *Nielsen et. al.* <sup>[139-142]</sup> entwickelten *Peptide Nucleic Acids* (PNAs) sehr viel versprechende Substanzen dar, mit denen *in vitro* bereits antiproliferative, antivirale, antibakterielle und antiparasitäre Effekte erzielt werden konnten <sup>[135,138,143]</sup>. Bei den PNAs handelt es sich um Nucleinsäure-Analoga, bei denen ein achirales, ungeladenes Polyamid-Rückgrat das Zucker-Phosphat-Gerüst natürlicher Polynucleotide ersetzt <sup>[104,131,132,135,138,139,143,144]</sup>: Sie sind typischerweise aus N-(2-Aminoethyl)-glycin-Monomeren aufgebaut, wobei die Pyrimidin- und Purin-Basen über einen Acetyl-Linker mit dem Stickstoffatom der Glycin-Struktur verbunden sind <sup>[104,131,132,135,138,139,143,144]</sup> (Abb. 2.35).



**Abb. 2.35:** Struktureller Vergleich der DNA und der PNA (B = Pyrimidin- oder Purin-Base; nach <sup>[145]</sup>)

Ebenso wie die nativen Nucleinsäuren können auch die PNAs sequenzselektiv mit einzel- und doppelsträngiger DNA sowie mit RNA interagieren [104,132,135,138,143,144]. Dabei weisen sie eine im Vergleich zu unveränderten Oligonucleotiden gesteigerte Affinität auf, da es bei der Komplexbildung eines neutralen PNA-Moleküls mit einem negativ geladenen Nucleinsäurepolymer nicht zu elektrostatischen Abstoßungsreaktionen kommt [104,132,135,138,143,144]. Darüber hinaus können die *Peptide Nucleic Acids* im Gegensatz zu unmodifizierten Nucleinsäuren weder von Nucleasen noch von Peptidasen mittels hydrolytischer Spaltungen inaktiviert werden [104,131,132,135,138,143]. Nachteilig ist jedoch, dass die PNAs – ebenso wie die Oligonucleotide – von eukaryotischen Zellen nur in einem sehr geringen Ausmaß aufgenommen werden können [131,132,135,138,139,143,144]. Des Weiteren können die PNAs nach ihrer Komplexbildung mit m-RNA keine Aktivierung der RNase H auslösen, so dass die Translation ausschließlich aufgrund der sterischen Blockade der Target-m-RNA inhibiert wird [131,132,135,143]. Zudem besitzen die *Peptide Nucleic Acids* in physiologischen Pufferlösungen nur eine unzureichend Löslichkeit, was auf ihr ungeladenes Polyamid-Rückgrat und auf ihre Tendenz zur Selbstaggregation zurückzuführen ist [131,138,143,144].

Zur Beseitigung der Probleme, die sich bei dem therapeutischen Einsatz sowohl von Oligonucleotiden als auch von PNA-Molekülen ergeben, wurden PNA-DNA-Chimäre entwickelt, die die positiven Eigenschaften beider Substanzklassen vereinen [104,138] (Abb. 2.36): Aufgrund der Phosphodiester-Bindungen der DNA-Komponente sind diese Substanzen zum einen gut wasserlöslich und zum anderen dazu fähig, in einem Hybrid-Komplex mit m-RNA den RNase H-vermittelten Abbau des RNA-Einzelstrangs einzuleiten [131,132,135,138]. Der peptidische Teil bedingt dagegen die Nucleasestabilität der Chimäre, sowie ihre hoch affine und spezifische Bindung an komplementäre RNA- und DNA-Moleküle [131,132,138].



**Abb. 2.36:** Beispiel eines chimären DNA-PNA-Polymers (B = Pyrimidin- oder Purin-Base)

### **3. Biophysikalische und biochemische Experimente**

#### **3.1 Angaben zu den verwendeten Geräten**

##### **3.1.1 Spektroskopische Methoden**

###### **3.1.1.1 Absorptionsspektroskopie**

Die Apparatur, die zur Durchführung der  $T_m$ -Wert-Messungen verwendet wurde, setzte sich aus einem Thermostat der Firma Julabo (Typ: MW-4), einem Hitachi-U-3200 Spektralphotometer und einem PC (Betriebssystem: Windows ME) zusammen, die alle über einen Multiplexer miteinander verbunden waren. Das Thermostat wurde mit einer speziellen, aus Polydimethylsiloxan bestehenden Temperierflüssigkeit, die auf über 200 °C erhitzt werden kann (Herstellerefirma: Julabo; Produktbezeichnung: Thermal H<sup>®</sup>), betrieben. Die Temperaturmessung erfolgte mit einem Thermometer der Firma Beckmann (Typ: MD 3060), an das eine NTC-Elektrode (Widerstand: 5k $\Omega$ , Durchmesser: 2,4mm), die in die Referenzküvette eintauchte, angeschlossen war. Bei den verwendeten Küvetten handelte es sich um Hellma-Präzisionsküvetten, die aus Quarzglas Suprasil<sup>®</sup> bestanden und eine Schichtdicke von 10 mm aufwiesen; zwei Seiten dieser Küvetten waren schwarz gefärbt, um Streulichteffekte bei sehr niedrigen und sehr hohen Absorptionen zu reduzieren<sup>[146]</sup> (Typ: 114B-QS).

Am UV-Spektralphotometer wurden zur Spektrenaufnahme folgende Parameter eingestellt:

<b>Baseline:</b>	standard
<b>Scan Speed:</b>	30.0 nm/min
<b>Bandpass:</b>	1.00 nm
<b>Response:</b>	slow

### 3.1.1.2 Fluoreszenzspektroskopie

Beim Ethidiumbromid-Verdrängungsassay wurden die Proben nach jeder Reagenzienzugabe mit einem Laborrüttler der Marke Pilot-Shake RC 2 SP (Firma: B. Braun, Melsungen) geschüttelt, um eine Äquilibration der Reaktionsansätze zu erreichen. Die fluorimetrischen Messungen wurden anschließend mit einem Hitachi-F-2000 Fluoreszenzspektralphotometer durchgeführt. Bei den verwendeten Küvetten handelte es sich um Präzisionsküvetten der Firma Hellma, die aus Quarzglas Suprasil® bestanden und bei einer Schichtdicke von 10 mm vier polierte Seiten aufwiesen (Typ: 111-QS).

Die fluorimetrischen Messungen erfolgten unter Einstellung der folgenden Parameter:

<b>Program:</b>	Photometry
<b>Data Mode:</b>	Intensity
<b>Wavelength:</b>	1
<b>Test Setup:</b>	Sample Number 1
	$\lambda_{ex}$ 545 nm
	$\lambda_{em}$ 595 nm
	Replicate 3
	Initial Delay 2 sec
	Integration Time 2 sec
<b>Instrument Setup:</b>	Response 0.5
	Band Pass 10 nm in excitation and emission
	PM Voltage 700 V

### 3.1.2 Molekularbiologisch-analytische Methoden

Für den Topoisomerase I-Hemmtest wurden folgende Geräte verwendet:

- Für die Inkubation:*
- Thermomix 1480 Wasserbad der Firma B. Braun
  - Trockenschrank Ecocell der Firma MMM Medcenter
- Für die Zentrifugation:*
- Eppendorf 5415C Zentrifuge
- Für die Elektrophorese:*
- Gelelektrophoresekammer (14x15 cm) der Firma Biotec
  - GD 61D Sebia Power Supply

- Für die Dokumentation:*
- Transilluminator N90 (MW 312 nm) der Firma Konrad Benda
  - GelCam der Firma Polaroid mit Schwarzweißfilmen vom Typ 667
  - CanoScan Lide 20 der Firma Canon

## 3.2 Reagenzien

### 3.2.1 Puffersysteme

- BPE-Puffer  
Zusammensetzung: 6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA  
pH-Wert: 7,0 ± 0,2
- Ladepuffer  
Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCl mit pH 7,6; 0,03% Bromphenolblau;  
0,03% Xylencyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA  
pH-Wert: 7,6 ± 0,2  
Herstellerfirma: Fermentas
- Puffer nach Boger  
Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCl mit pH 7,4; 75 mM NaCl  
pH-Wert: 7,4 ± 0,2
- TAE-Puffer (10fach konzentriert)  
Zusammensetzung: 0,4 M Tris; 0,2 M Essigsäure; 0,01 M NA<sub>2</sub>EDTA  
pH-Wert: 8,5 ± 0,2  
Herstellerfirma: Applichem
- Tris-HCl (stock solution)  
Zusammensetzung: 1 M Tris-HCl mit pH 7,4  
pH-Wert: 7,4 ± 0,05  
Herstellerfirma: Applichem

- Topoisomerase I-Reaktionspuffer (10fach konzentriert)  
Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl mit pH 7,9; 10 mM EDTA; 1,5 M NaCl;  
1% BSA; 1 mM Spermidin; 50% Glycerol  
pH-Wert: 7,9 ± 0,2  
Herstellerfirma: TopoGen

### **3.2.2 Molekularbiologisches Material**

#### **3.2.2.1 DNA**

- [poly(dAdT)•poly(dAdT)], [→ im Folgenden als poly(dAdT)<sub>2</sub> bezeichnet];  
GE Healthcare (ehemals Amersham Biosciences)
- Kalbsthymus-DNA, Typ I (hochpolymerisiert, Natrium-Salz); Sigma
- pUC 19 (Plasmid-DNA); Fermentas

#### **3.2.2.2 Enzyme**

- Humane Topoisomerase I; TopoGen
- Proteinase K; Fermentas

### **3.2.3 Referenzsubstanzen**

Alle Referenzsubstanzen wurden in dem höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben.

- Camptothecin; TopoGen
- Ellipticin; Sigma
- Hoechst 33258; Applichem
- Netropsin Dihydrochlorid; Sigma

### 3.2.4 Testsubstanzen

Alle Verbindungen, die in dieser Arbeit mit biochemischen und biophysikalischen Methoden auf ihre DNA-Affinität und ihre Topoisomerase I-Hemmaktivität untersucht wurden, wurden im Arbeitskreis *Pindur* (Institut für Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) synthetisiert <sup>[37-39]</sup>. Identität und Reinheit der Testsubstanzen wurden mit Hilfe der NMR- und Massenspektroskopie, sowie mittels Elementaranalysen bestimmt. Für die verschiedenen Experimente wurden Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt, indem die entsprechenden Mengen der zu testenden Verbindungen in DMSO gelöst wurden.

### 3.2.5 Sonstige Reagenzien

- Agarose SeaKem<sup>®</sup> LE; Biozyme
- DMSO (Dimethylsulfoxid); Merck
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); Acros Organics
- Ethidiumbromid-Lösung 1% w/v in Wasser; Applichem
- NaCl für die Molekularbiologie; Applichem
- SDS (Natriumdodecylsulfat) für die Molekularbiologie; Applichem

## 3.3 Software zur Messung und Auswertung molekularbiologischer Daten

Zur Aufzeichnung der UV-Absorptionskurven bei der  $T_m$ -Wert-Messung:

- Programm „Messwert“ von *Dr. G. Schneider*

Zur Auswertung der UV-Absorptionskurven bei der  $T_m$ -Wert-Messung:

- Programm „Origin 5.0 Professional“ der Firma Microcal Software

Zum Scannen der bei den Topoisomerase I-Hemmtests angefertigten Gel-Fotografien:

- Programm „Photo Studio 5 – 5.0.0.53 for Canon“ der Firma ArcSoft

Zur Ermittlung der  $C_{50}$ -Werte bei den Ethidiumbromid-Verdrängungsassays:

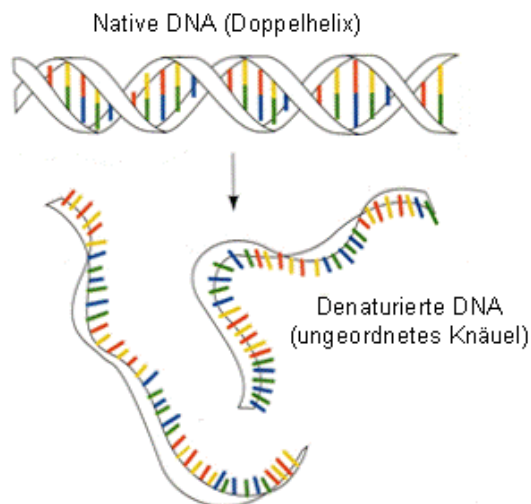
- Programm „Microsoft Office Excel 2003“ der Firma Microsoft

## 3.4 Untersuchungsmethoden

### 3.4.1 Thermische Denaturierung der DNA – $T_m$ -Wert-Messung

#### 3.4.1.1 Theorie

Unter dem Einfluss von thermischer Energie, Säuren oder Laugen werden die zwischen den komplementären Basen eines DNA-Doppelstrangs vorliegenden Wasserstoffbrückenbindungen zerstört, so dass die Doppelhelix in Einzelstränge aufgetrennt wird <sup>[40-42,47,146]</sup>. Diese ungepaarten Polynukleotide nehmen daraufhin ungeordnete, zufällige Konformationen an <sup>[40,41]</sup> (Abb. 3.1). Tritt dieser Prozess, der als Denaturierung bezeichnet wird, infolge der über einen kritischen Punkt hinausgehenden Erwärmung einer wässrigen DNA-Lösung auf, so spricht man – in Analogie zu den Proteinen und den Kristallen – auch vom Schmelzen der DNA <sup>[40-42,47,146]</sup>; dabei ist der Schmelzpunkt  $T_m$  als diejenige Temperatur definiert, bei der ein Gleichgewicht zwischen doppelsträngigen und einzelsträngigen DNA-Molekülen vorliegt <sup>[41,42,47,146]</sup>.

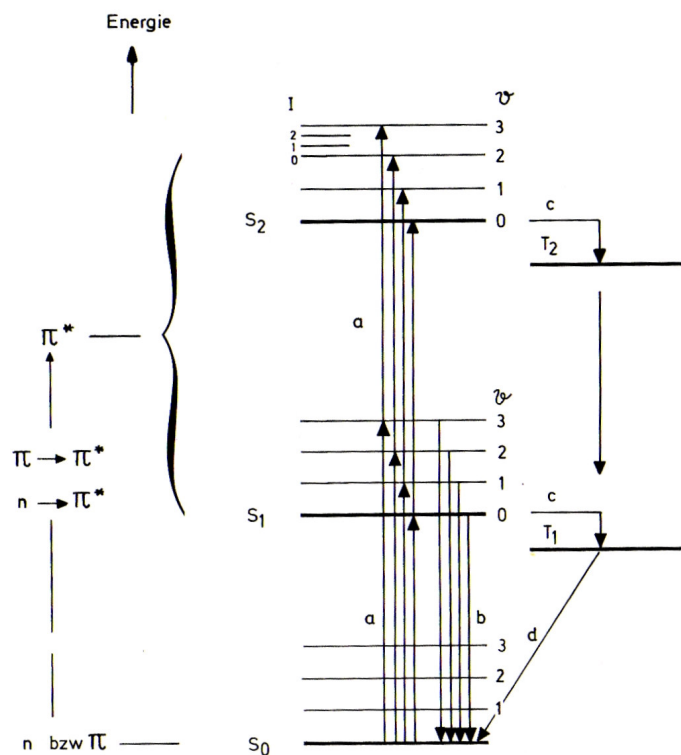


**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der DNA-Denaturierung (nach Voet<sup>[40]</sup>)

Der bei der Denaturierung auftretende Verlust der Helixstruktur hat, neben einer deutlichen Viskositätsabnahme, auch einen sprunghaften Anstieg der UV-Absorption der gelösten DNA zur Folge <sup>[40,42,47,146]</sup>. Dieser hyperchrome Effekt liegt darin begründet, dass die Basen, bedingt durch die beim Schmelzen eintretende Zerstörung der Wasserstoffbrücken und durch den ebenfalls stattfindenden Abbau der elektroni-



schen Wechselwirkungen der gestapelten Basenpaare ( $\pi$ - $\pi$ -Stacking), nicht mehr abgeschirmt im Innern der Doppelhelix liegen, sondern im Einzelstrang ungehindert mit dem UV-Licht interagieren können<sup>[40,41,146]</sup>. Dies führt dazu, dass der Übergangsmoment für  $n$ - $\pi^*$ - und  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergänge und somit die Anzahl der Valenzelektronen, die durch die UV-Strahlung soweit angeregt werden, dass sie aus  $n$ - und  $\pi$ -Orbitalen in die antibindenden  $\pi^*$ -Orbitale angehoben werden können (Abb. 3.2), zunimmt<sup>[147]</sup>. Aus diesem Grund absorbieren einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle mehr ultraviolettes Licht als DNA-Duplexe<sup>[147]</sup>.



**Abb. 3.2:** Jablonski-Termschema (nach<sup>[148]</sup>)

Der Schmelzpunkt eines DNA-Doppelstrangs wird bestimmt, indem man zunächst die bei UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm ( $\rightarrow$  das Absorptionsmaximum der Nukleotide liegt, je nach Zusammensetzung, zwischen 250 und 280 nm<sup>[40-42,47,149]</sup>) auftretende Absorption der wässrigen DNA-Probeklösung als Funktion der Temperatur aufzeichnet<sup>[40,41]</sup>. Anschließend wird die 1. Ableitung der aus diesen Messungen resultierenden, sigmoiden Schmelzkurve errechnet, wobei das Maximum der aus der Ableitung hervorgehenden Parabel den  $T_m$ -Wert der untersuchten DNA darstellt<sup>[40,146]</sup> (Abb. 3.3, Seite 69).

Bei der Majorität der derzeit bekannten, DNA-aktiven Verbindungen handelt es sich um Substanzen, die stärker mit der doppelhelikalen Form der DNA, als mit einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen interagieren <sup>[47,146]</sup>. Die DNA-Bindung dieser Liganden hat somit eine Stabilisierung der Doppelstrang-Struktur zur Folge, so dass im Vergleich zur DNA allein mehr Energie zur Separierung der einzelnen Polynukleotid-Stränge aufgebracht werden muss (→ Schmelzpunkterhöhung) <sup>[47,146,150]</sup>. Die Höhe des  $\Delta T_m$ -Wertes, der als Differenz des Schmelzpunktes des DNA-Ligand-Komplexes und des  $T_m$ -Wertes der reinen DNA definiert ist <sup>[47,119,146,151]</sup> [Gleichung (2), Seite 69], korreliert mit der freien Bindungsenthalpie  $\Delta G^0$  und der Bindekonstanten  $K_{app}$  und spiegelt somit die DNA-Bindungsstärke der getesteten Substanz wider <sup>[47,146,152]</sup>. Darüber hinaus existieren jedoch auch DNA-Liganden, wie z. B. die Alkylantien der Benzocronycin-Reihe oder Cisplatin, die über eine Destabilisierung der DNA-Duplexe zu einer Schmelzpunktdepression führen <sup>[146,150]</sup>. Derartige Verbindungen weisen folglich negative  $\Delta T_m$ -Werte auf <sup>[150]</sup>.

Die  $\Delta T_m$ -Wert-Bestimmung stellt ein einfaches, empfindliches und reproduzierbares Verfahren zur Ermittlung der DNA-Affinitäten potentieller DNA-Liganden dar <sup>[146]</sup>. Allerdings können mit dieser Methode nur solche Verbindungen untersucht werden, die über den gesamten getesteten Temperaturbereich thermostabil und in dem verwendeten, wässrigen Puffermedium ausreichend löslich sind <sup>[146]</sup>. Zudem lassen sich auf der Basis des Schmelzpunktes keinerlei weiterführende Aussagen, z. B. bezüglich des DNA-Bindemodus oder der molekularen Interaktionen der untersuchten Substanzen, machen <sup>[146]</sup>.

### 3.4.1.2 Praktische Durchführung

Die im Arbeitskreis *Pindur* von *Marotto* <sup>[47]</sup> erstmalig etabliert Messapparatur wurde – ebenso wie die zur Datenaufzeichnung verwendete Software – grundlegend modifiziert und erweitert (Kapitel 3.1.1.1, Seite 59), so dass, neben der bislang als Matrize dienenden poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA, nunmehr auch Denaturierungsexperimente mit der höher schmelzenden Thymus-DNA durchgeführt werden konnten. Das im Folgenden näher erläutere, von *Marotto* <sup>[47]</sup> validierte Testverfahren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal für das *Screening* eines breiten Substanzspektrums verwendet (Kapitel 6.2.2, Seite 185 ff.; Kapitel 6.3.2, Seite 219 ff.; Kapitel 6.4.2, Seite 282 ff.).

Die in den Schmelzpunktstudien eingesetzte, nur aus alternierend angeordneten AT-Basenpaaren aufgebaute poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA <sup>[153]</sup> wurde zur Ermittlung der DNA-Affinitäten der Testverbindungen verwendet. Außerdem wurden erstmals auch T<sub>m</sub>-Wertmessungen mit Kalbsthymus-DNA, welche einen ca. 42%igen Anteil an GC-Basen <sup>[30,31]</sup> aufweist, durchgeführt, um zusätzliche Aussagen über die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der untersuchten Substanzen machen zu können. Zu diesem Zweck konnte kein künstlich hergestelltes, nur aus Guanosin und Cytidin bestehendes Polymer herangezogen werden: Eine solche DNA weist aufgrund des großen Energieaufwands, der zum Auflösen der drei die GC-Basen verbindenden Wasserstoffbrücken erforderlich ist, einen Schmelzpunkt auf, der außerhalb der Erfassungsgrenzen des mit wässrigen Probelösungen arbeitenden Testverfahrens liegt <sup>[40,42,47,151]</sup> (T<sub>m</sub>-Wert >> 100 °C <sup>[47]</sup>).

Im ersten Schritt der Matrizenvorbereitung wurden die poly(dAdT)<sub>2</sub>- und die Kalbsthymus-DNA, die aus Stabilitätsgründen als Lyophilisat bzw. als hochpolymerisierter Feststoff gelagert wurden, in Wasser gelöst, wobei zunächst eine Konzentration von ca. 1 U/ml eingestellt wurde (→ 1 U entspricht einer DNA-Menge, die bei einer gegebenen Wellenlänge eine UV-Absorption von 1 zeigt; 1 U ≈ 50 µg doppelsträngige DNA <sup>[146,153]</sup>). Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes <sup>[148]</sup> [Gleichung (1)] wurden anschließend die exakten Konzentrationen dieser wässrigen DNA-Lösungen ermittelt <sup>[146]</sup>, so dass die genauen Volumina, welche in den Studien eingesetzt werden mussten, um in den Messküvetten (Fassungsvermögen: 1ml) die angestrebte Basenpaarkonzentration von 20 µM zu erhalten <sup>[47]</sup>, berechnet werden konnten. Die dazu erforderlichen T<sub>m</sub>-Wert-Messungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C und bei der Wellenlänge λ = 260 nm <sup>[47,119,146,150,151]</sup> unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ε(260 nm) = 6600 l/mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> · bp<sup>-1</sup> (für beide DNA-Polymere <sup>[147,153]</sup>) und der Schichtdicke b = 1 cm durchgeführt.

$$(1) \quad A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot b$$

A: Absorption der Lösung

ε(λ): bei der Wellenlänge λ vorliegender molarer Extinktionskoeffizient der untersuchten Substanz [l/mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]

c: molare Konzentration der Lösung [mol·l<sup>-1</sup>]

b: Schichtdicke der Lösung [cm]

Das für die Messreihen jeweils benötigte Volumen an DNA-Lösung variierte von Charge zu Charge und betrug für die poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA zwischen 7,8 und 11,4 µl und für die Thymus-DNA zwischen 12,5 und 13,0 µl. Bevor die Biopolymer-Lösungen in den thermischen Denaturierungsstudien als Matrizen für die Testsubstanzen eingesetzt werden konnten, wurden zudem die Schmelzpunkte der reinen Polynukleotide als Mittelwerte aus mindestens 10 unabhängig voneinander durchgeführten T<sub>m</sub>-Wert-Messungen bestimmt. In Abhängigkeit von der vorliegenden Charge wies die poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA Schmelzpunkte im Bereich von 45,0 bis 46,7°C auf (→ Literaturwert: <sup>[119,151]</sup>: 41-42°C), während für die Thymus-DNA T<sub>m</sub>-Werte zwischen 67,2 und 68,8°C (→ Literaturwert <sup>[151]</sup>: 66°C) ermittelt wurden.

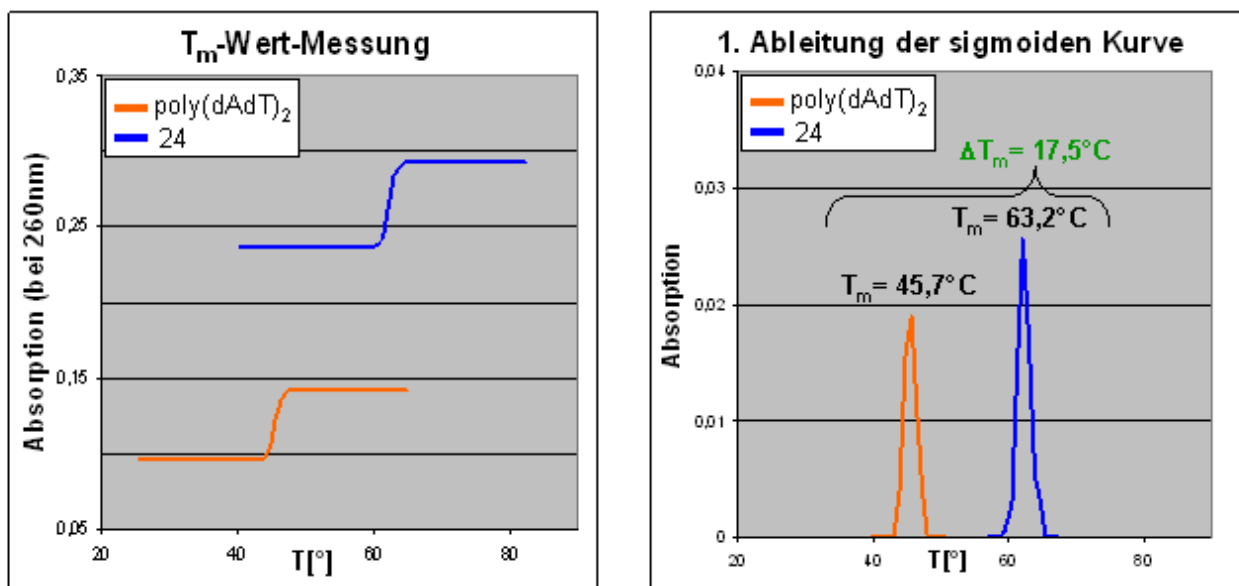
Die potentiell DNA-aktiven Testverbindungen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dabei erfolgte zunächst die Anfertigung hochkonzentrierter Stammlösungen (40 mM), die anschließend mit DMSO im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden. Um das zu Beginn als Rahmenbedingung für die Schmelzpunkt-Studien festgelegte, äquimolare Verhältnis von Testverbindung zu DNA-Basenpaaren zu erhalten <sup>[47]</sup> (→ die jeweilige Konzentration sollte 20 µM betragen), wurden bei jeder T<sub>m</sub>-Wert-Messung 5 µl der Substanzlösungen, die nach der oben beschriebenen Verdünnung eine Konzentration von 4 mM aufwiesen, eingesetzt.

Zur Herstellung der Proben wurden das zuvor berechnete, einer Basenpaarkonzentration von 20 µM entsprechende Volumen an poly(dAdT)<sub>2</sub>- bzw. Thymus-DNA-Lösung und 5 µl der Lösung der jeweils zu untersuchenden Testverbindung in die Messküvette einpipettiert, die anschließend bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml mit BPE-Puffer <sup>[47,119,150,151]</sup> versetzt wurde <sup>[47]</sup>. Dieser Puffer besteht aus 6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 1 mM EDTA <sup>[47,119,150,151]</sup> und weist einen physiologischen pH-Wert von 7,0 ± 0,2 auf <sup>[119,150]</sup>. Da es sich bei dem für die Schmelzpunkt-Bestimmungen verwendeten UV-Spektralphotometer um ein Zweistrahlmessgerät handelte, wurde neben der Mess- auch eine Referenzküvette benötigt. Diese Küvette, die zudem der Temperaturmessung diente, wurde ausschließlich mit 1 ml Puffer befüllt <sup>[47]</sup>.

Zur Bestimmung des T<sub>m</sub>-Wertes jedes DNA-Substanz-Gemisches wurde zunächst die bei der Wellenlänge λ = 260 nm auftretende Absorption der wässrigen Probelösung als Funktion der Temperatur (→ Aufheizrate: 1 °C/min <sup>[47,119,150,151]</sup>) aufgezeich-

net <sup>[47,119,146,150,151]</sup>. Zu diesem Zweck wurde die von *Schneider* entwickelte Software „Messwert“ eingesetzt, die das UV-Spektralphotometer, die Temperaturmessung in der Referenzküvette, sowie die Temperatureinstellung des Thermostats vollautomatisch steuert (Kapitel 3.1.1.1, Seite 59) und die erhobenen Daten speichert <sup>[47]</sup>. Mit Hilfe des Programms „Origin 5.0 Professional“ (Microcal Software) wurden daraufhin die 1. Ableitung der aus der Messung resultierenden, sigmoiden Schmelzkurve gebildet und der Extremwert der aus dieser Ableitung hervorgehenden Parabel berechnet <sup>[47]</sup>: Das Maximum der 1. Ableitung stellt den  $T_m$ -Wert des untersuchten DNA-Ligand-Komplexes dar <sup>[119,150,151]</sup> (Abb. 3.3). Um die DNA-Affinitäten der verschiedenen Testsubstanzen miteinander vergleichen zu können, wurde schließlich der  $\Delta T_m$ -Wert jeder untersuchten Verbindung als Differenz des Schmelzpunktes des Komplexes und des  $T_m$ -Wertes der DNA allein ermittelt <sup>[47,119,151]</sup> [Gleichung (2)]:

$$(2) \quad \Delta T_m^{\text{Testsubstanz}} = T_m^{\text{(DNA+Testsubstanz)}} - T_m^{\text{(DNA)}}$$



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der bei den  $T_m$ -Wert-Messungen erhaltenen Schmelzkurven und der weiteren Auswertung dieser Daten

Links: Schmelzkurven der poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA allein (orangefarbene Kurve) und der poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA im Gemisch mit dem Combilexin **24** (Abb. 6.36, Seite 214; blaue Kurve); diese sigmoiden Kurven resultieren direkt aus den  $T_m$ -Wert-Messungen

Rechts: Hyperbel-Kurven, die durch Ableitung der sigmoiden Schmelzkurven erhalten werden; die Maxima dieser Hyperbel stellen den  $T_m$ -Wert der poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA allein (orangefarbene Kurve) bzw. des mit dem Combilexin **24** gebildeten DNA-Ligand-Komplexes (blaue Kurve) dar; der  $\Delta T_m$ -Wert der Verbindung **24** wird berechnet, indem die Differenz dieser beiden Schmelzpunkte gebildet wird

Bei den in der Arbeit angegebenen  $\Delta T_m$ -Werten handelt es sich um Mittelwerte, die auf der Basis von mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführten  $T_m$ -Wertmessungen gebildet wurden.

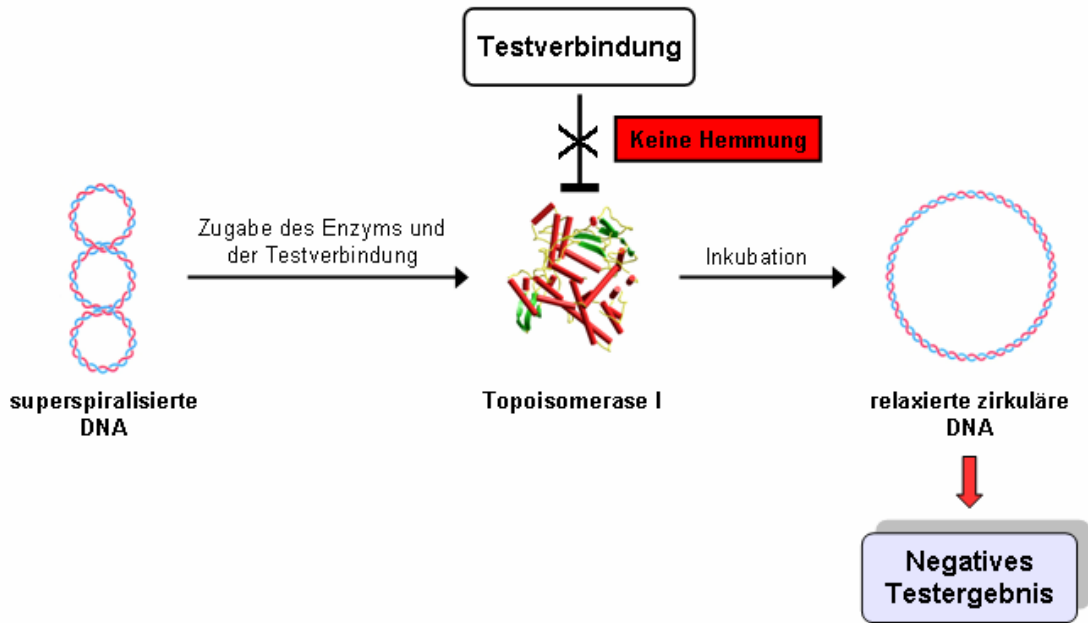
## 3.4.2 Topoisomerase I-Hemmtest

### 3.4.2.1 Theorie

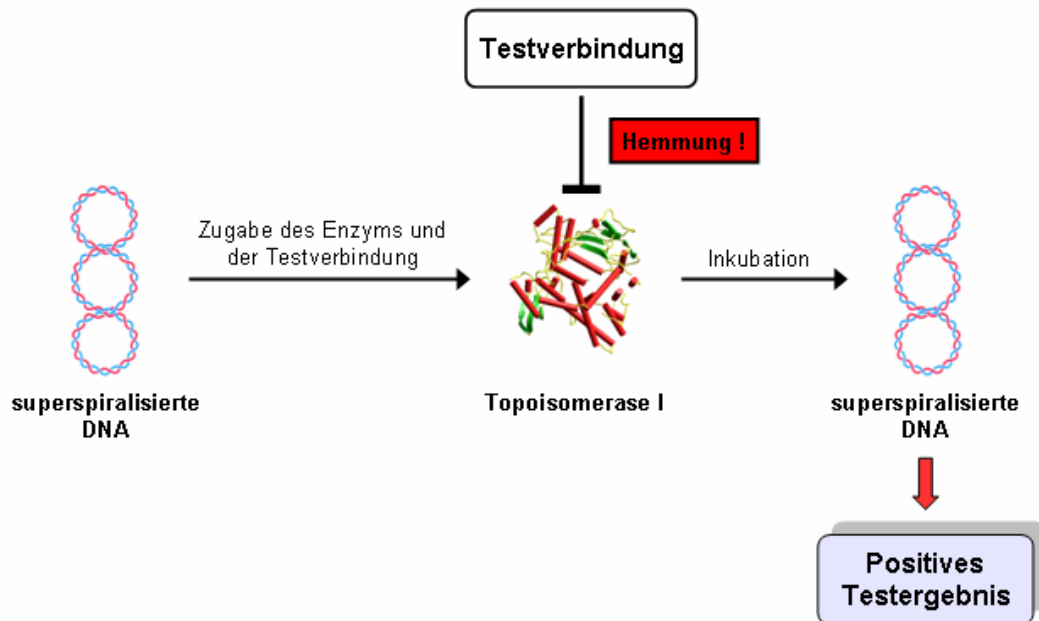
Da das für die Topoisomerase I (TOPO I) codierende Gen in den malignen Zellen verschiedener Krebsarten (z. B. bei Darm-, Ovar- und Speiseröhrenkrebs<sup>[57,58]</sup>) überexprimiert wird und die Enzymhemmung indirekt durch Blockade lebenswichtiger biologischer Prozesse wie Transkription und Replikation zur Apoptose der Krebszellen führen kann<sup>[38,40,47,50,51,57,58]</sup> (Kapitel 2.1.2, Seite 21 ff.), stellt die Topoisomerase I seit vielen Jahren ein attraktives Target für die Entwicklung antitumoraktiver Verbindungen dar<sup>[38,47,50,59]</sup>. Aus diesem Grund sollten auch einige Derivate der im Arbeitskreis *Pindur* designten und synthetisierten Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide (Kapitel 6.2, Seite 182 ff.), Combilexine (Kapitel 6.3, Seite 212 ff.) und Heteroaren[*a*]anellierten Carbazole (Kapitel 6.4, Seite 279 ff.) auf ihre potentiell vorhandenen, TOPO I-inhibierenden Eigenschaften untersucht werden<sup>[47,37,38,154]</sup>.

Zu diesem Zweck wurde ein Testverfahren angewendet, bei dem bakterielle Plasmid-DNA, die in nativem Zustand negativ superspiralisiert vorliegt<sup>[40,41,47,56]</sup> ( $\rightarrow$  superhelikale Windungszahl  $W < 0$ ; Abb. 3.6, Seite 75; Kapitel 2.1.2, Seite 20 ff.), zusammen mit humaner Topoisomerase I in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der zu analysierenden Substanzen inkubiert wird<sup>[47,54,56,59,61,155]</sup>. Besitzt die Testverbindung keine TOPO I-hemmenden Fähigkeiten, so wird die Gesamtmenge der im Assay eingesetzten, superhelikalen DNA mittels enzyminduzierter Einzelstrangbrüche in die zirkuläre Form überführt<sup>[40,47,50,56]</sup> (Abb. 3.4A, Seite 71). Handelt es sich bei der zugesetzten Substanz dagegen um einen Topoisomerase I-Inhibitor, so sind auch nach dem Ende der Inkubationszeit noch superspiralisierte Nucleinsäure-Moleküle in dem Reaktionsansatz nachweisbar, da das in seiner Aktivität beeinträchtigte Enzym nun nicht mehr jedes Plasmid relaxieren kann<sup>[47]</sup> (Abb. 3.4B; Seite 71; Abb. 3.8, Seite 79).

**A:** Testung einer Substanz ohne Topoisomerase I-hemmende Eigenschaften



**B:** Testung einer Substanz mit Topoisomerase I-hemmenden Eigenschaften



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung des Testprinzips des zur Untersuchung der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide, der Combilexine und der Hetaren[*a*]anellierten Carbazole eingesetzten Topoisomerase I-Hemm-assays

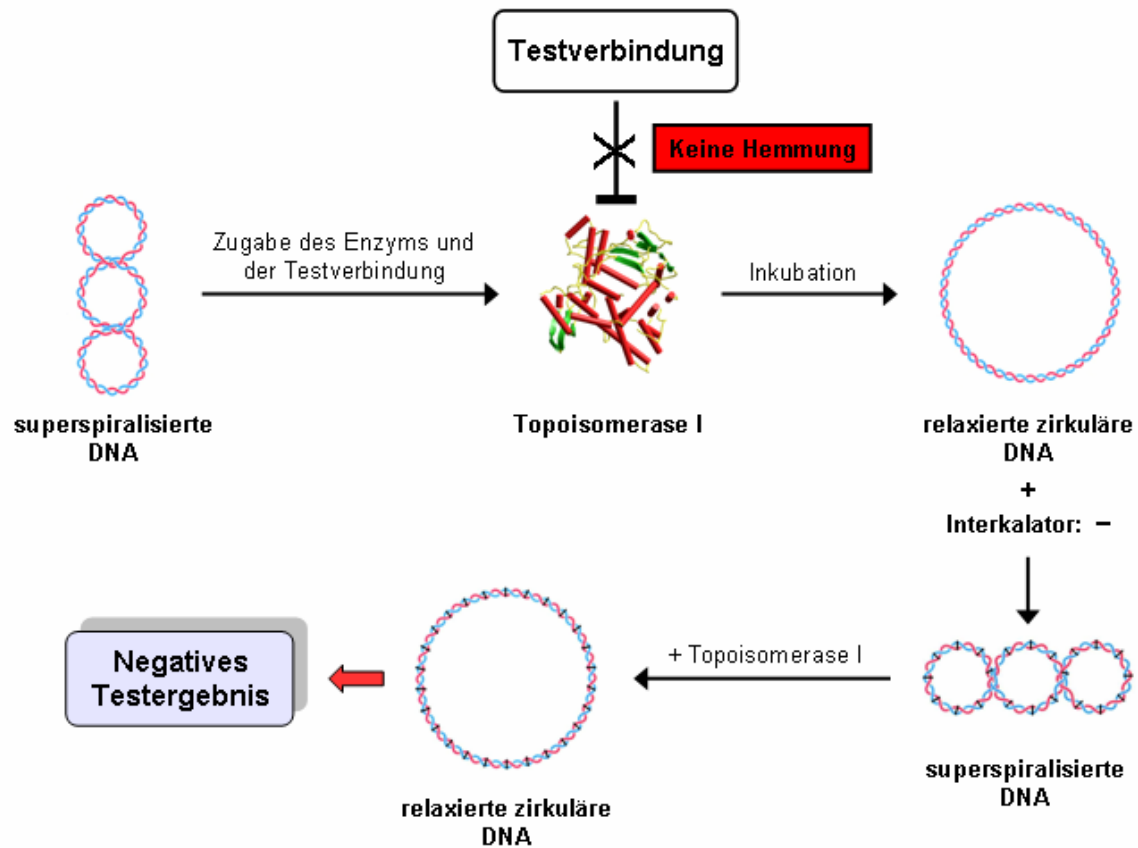
Zur Identifizierung der in den inkubierten Proben jeweils vorliegenden Plasmid-Konfigurationen macht man sich zunutze, dass sich die verschiedenen topologischen Formen des Polymers in ihrer elektrophoretischen Mobilität voneinander unterscheiden [41,47,49,56,61]: Die superspiralisierten DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer kompakteren Struktur schneller durch das dreidimensionale Gerüst eines Agarose-Gels zur Anode, als die eine größere Raumausdehnung aufweisenden, zirkulären Plasmide [41,47,49,56,61] (Abb. 3.8, Seite 79).

Bei der Auswertung des beschriebenen Topoisomerase I-Hemmassays muss beachtet werden, dass interkalierende Substanzen das Testergebnis verfälschen können, da ihre DNA-Bindung mit einer Veränderung der Helix-Struktur des Polynukleotids verbunden ist [47,49,56] (Kapitel 2.3.1, Seite 33 ff.): Die Interkalation eines Liganden führt über eine Vergrößerung des Basenpaarabstandes zu einer Verkleinerung des Helixdrehwinkels des Zucker-Phosphat-Gerüsts [47,49]. Demgemäß nimmt die Zahl der helikalen Windungen  $T$  eines DNA-Doppelstrangs bei der Bildung eines Interkalationskomplexes ab [42,47,49]. Da die Verwindungszahl  $L$  jedoch konstant bleiben muss, solange die beiden Polynukleotidstränge eines zirkulären DNA-Moleküls intakt bleiben [40,42,47,49], hat eine Reduktion von  $T$  einen Anstieg der superhelikalen Windungszahl  $W$  zu Folge [40,42,47,49] (Kapitel 2.1.2, Seite 20 ff.). Diese Liganden-induzierten, positiv superhelikalen Windungen bedingen eine Entspiralisierung der bei dem TOPO I-Hemmtest verwendeten, negativ superspiralisierten Plasmide [40,42,49], die durch eine ausreichend große Zahl zugesetzter Interkalator-Moleküle demnach in die zirkuläre Form ( $W = 0$ ) überführt werden können [40,42,49]. Die resultierenden, eine ringförmige Struktur aufweisenden DNA-Ligand-Komplexe unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität nur unzureichend von den relaxierten Plasmiden, die infolge enzymkatalysierter Einzelstrangbrüche aus der superhelikalen DNA hervorgehen [38,56]. Demgemäß kann es bei der Testung interkalierender Verbindungen in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration zu falsch negativen Ergebnissen kommen, da die superspiralisierten Plasmide, die aufgrund der Hemmung der Topoisomerase I-Aktivität nach der Inkubation noch im Reaktionsansatz vorliegen, durch die Interaktion mit der Testverbindung in ihrer Topologie soweit verändert werden können, dass sie nicht mehr nachweisbar sind [38,47,49] (Abb. 3.5B, Seite 74). Falsch positive Resultate können dagegen nicht auftreten, da die durch den Interkalator hervorgerufenen, positiven Superspiralisierungen durch die Topoisomerase I, die in Anwesenheit von Testverbindungen ohne enzyminhibierende Eigenschaften uneinge-



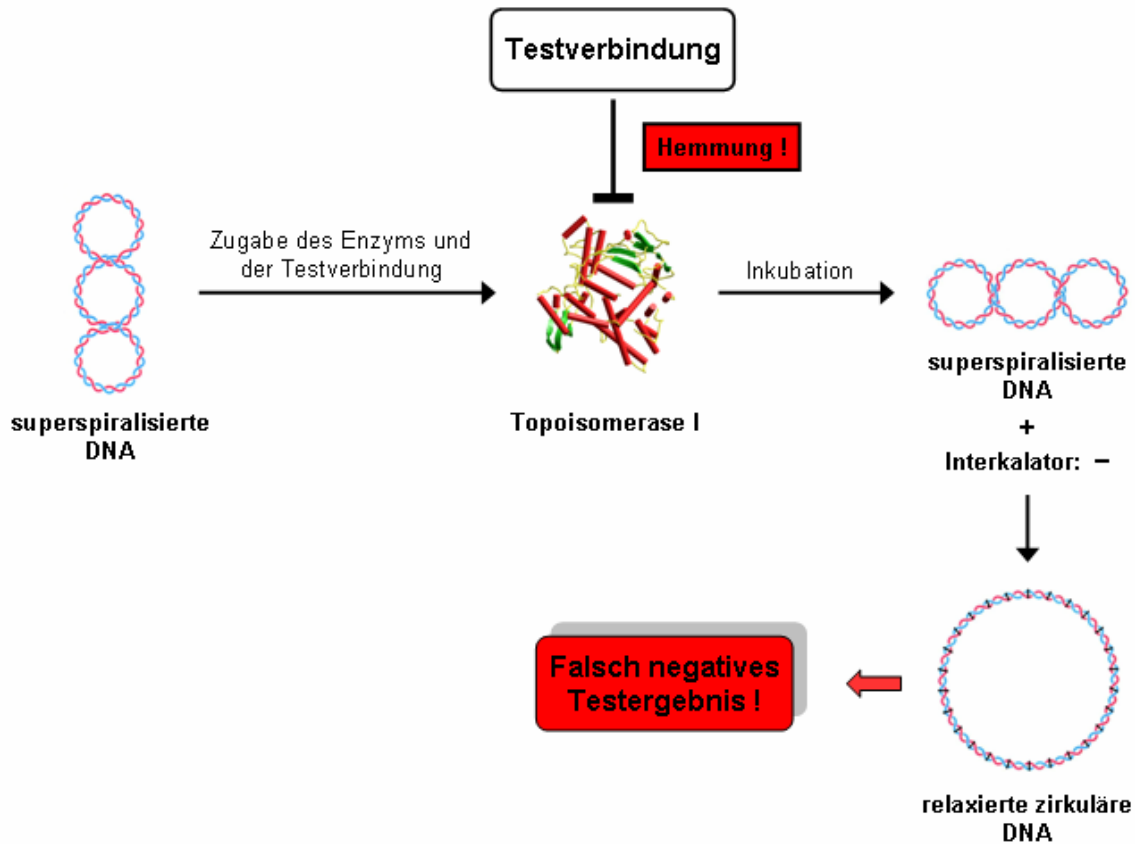
schränkt aktiv ist, immer wieder aufgehoben werden, so dass in der Probe ausschließlich relaxierte Plasmid-DNA vorhanden ist <sup>[47,49]</sup> (Abb. 3.5A).

**A:** Testung eines **Interkalators** ohne Topoisomerase I-hemmende Eigenschaften



**Abb. 3.5A:** Schematische Darstellung des Ergebnisses eines Topoisomerase I-Hemmassays, der mit einer interkalierenden Testverbindung ohne TOPO I-inhibierende Eigenschaften durchgeführt wird

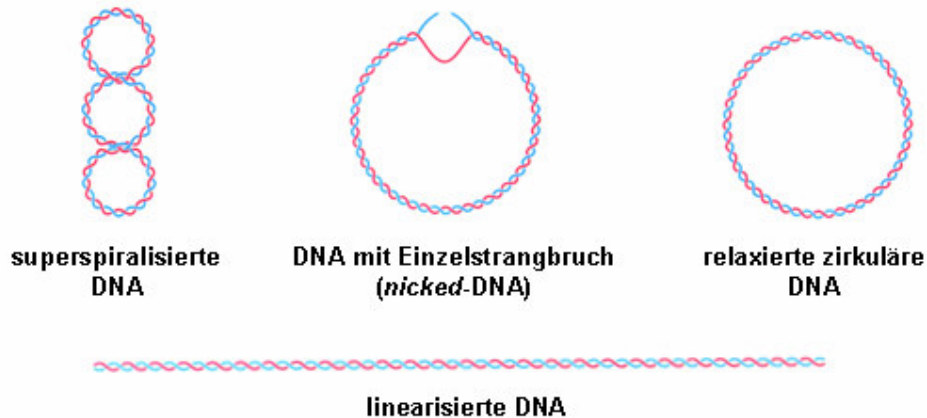
**B:** Testung eines **Interkalators** mit Topoisomerase I-hemmenden Eigenschaften



**Abb. 3.5B:** Schematische Darstellung des Ergebnisses eines Topoisomerase I-Hemmassays, der mit einer interkalierenden Testverbindung mit TOPO I-inhibierenden Eigenschaften durchgeführt wird

Zeigt eine Substanz in dem beschriebenen TOPO I-Hemmassay enzyminhibitorische Fähigkeiten, so handelt es sich bei dieser Verbindung entweder um ein Gift oder um einen Suppressor <sup>[47,56]</sup> (Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.). Topoisomerase I-Gifte wie Camptothecin stabilisieren den intermediär gebildeten, kovalenten Komplex ( $\rightarrow$  *Cleavable Complex*) aus Enzym und DNA und verhindern somit die Religation des TOPO I-katalysierten Einzelstrangbruchs <sup>[47,50,51,56]</sup> (Abb. 2.6, Seite 23). Die dadurch bedingte Störung der DNA-Replikation, Transkription und Rekombination löst letztlich die Apoptose der betroffenen Zellen aus <sup>[47,50,51,56]</sup>. Suppressoren dagegen besitzen keine zytotoxischen, sondern nur wachstumshemmende Eigenschaften, da sie keine irreversiblen DNA-Schäden induzieren können <sup>[47,50,51,56]</sup>. Über eine Reduktion der Enzymaktivität unterbinden diese Substanzen die Bildung des *Cleavable Complex*, was lediglich eine Verlangsamung der lebenswichtigen zellbiologischen Prozesse zur

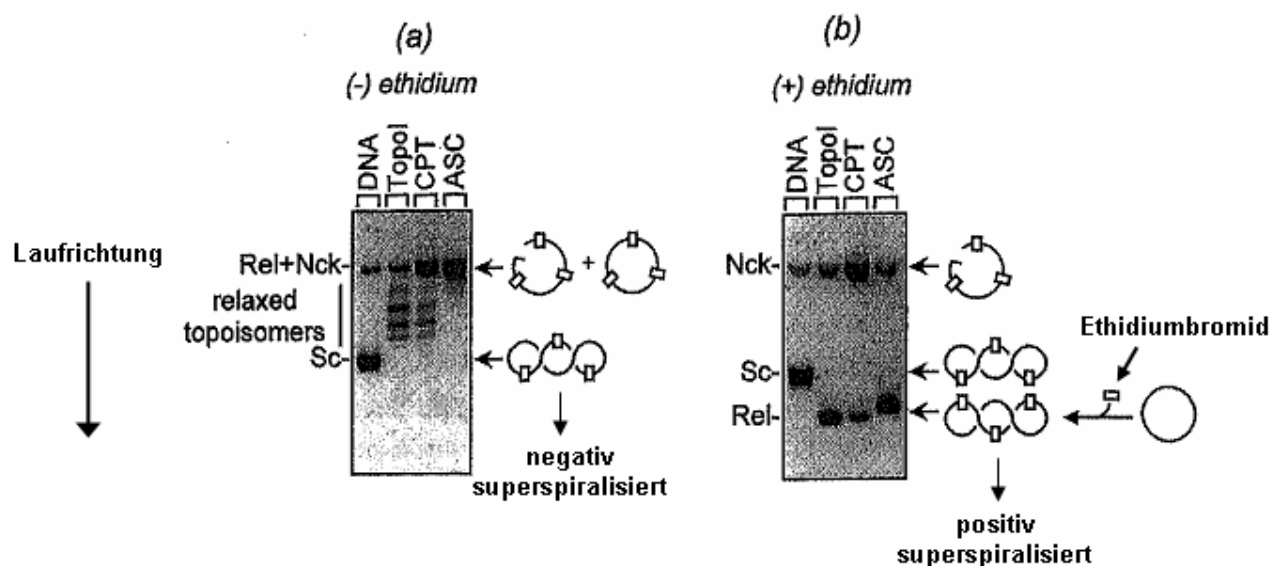
Folge hat <sup>[47,50,51,56]</sup>. Aus den beschriebenen Wirkmechanismen geht hervor, dass sich die beiden Typen von TOPO I-Inhibitoren anhand der Menge der in den Reaktionsansätzen jeweils vorliegenden *nicked*-DNA (→ DNA mit Einzelstrangbruch; Abb. 3.6) voneinander unterscheiden lassen, da diese Plasmid-Konfiguration nur in Anwesenheit eines Topoisomerase I-Giftes vermehrt gebildet wird <sup>[47,56]</sup>.



**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung der verschiedenen Plasmid-Konfigurationen (nach *Stryer*<sup>[41]</sup>)

Während die zirkuläre und die *nicked*-Form der Plasmid-DNA in einem herkömmlichen Agarose-Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen, ändert sich ihr Laufverhalten durch den Zusatz von Ethidiumbromid (0,5 – 1 µg/ml; Abb. 3.9, Seite 80) <sup>[47,56,59,61,155]</sup> (Abb. 3.7, Seite 76): Der im Gel befindliche Interkalator lagert sich zwischen die Basenpaare der zur Anode wandernden, intakten DNA ein und induziert auf diese Weise die Umwandlung der relaxierten in positiv superspiralisierte Plasmide ( $W > 0$ ) <sup>[40,49,56]</sup>. Diese kompakten Moleküle legen bei der Elektrophorese eine geringfügig längere Strecke zurück als die nativen, negativ superhelikalen Polymere, da letztere durch die Interaktion mit dem Ethidiumbromid etwas aufgewunden und somit in ihrer Mobilität eingeschränkt werden <sup>[56]</sup> (Seite 72). Aufgrund des vorliegenden Einzelstrangbruchs modifiziert der Interkalator die Topologie der *nicked*-DNA dagegen nicht <sup>[56]</sup>. Diese Plasmid-Form wandert – bedingt durch ihre große Raumausdehnung – nur sehr langsam durch das Agarose-Gel, so dass sie von den superspiralisierten Konfigurationen abgetrennt werden kann <sup>[56]</sup>.

Auf der Basis der Intensität, die die von der *nicked*-DNA gebildete Bande im Gel-elektropherogramm aufweist, lassen sich Aussagen darüber machen, ob es sich bei der untersuchten Substanz um ein Topoisomerase I-Gift (→ deutlich ausgeprägte Bande) oder um einen Suppressor (→ schwach ausgeprägte Bande) handelt <sup>[56]</sup>. Mit Hilfe Ethidiumbromid-haltiger Agarose-Gele können darüber hinaus auch Substanzen mit einem interkalierenden DNA-Bindemodus korrekt auf potentiell vorhandene, TOPO I-inhibierende Eigenschaften getestet werden <sup>[56]</sup>.



**Abb. 3.7:** Vergleich der elektrophoretischen Mobilität der verschiedenen, bei einem Topoisomerase I-Hemmtest auftretenden Plasmid-Topologien bei Verwendung eines Agarose-Gels (a) ohne und (b) mit Zusatz von Ethidiumbromid (nach Bailly <sup>[56]</sup>)

[DNA: Plasmid pKMp27; CPT: Camptothecin (→ TOPO I-Gift); ASC: Ascididemin (→ Interkalator) Rel: relaxierte zirkuläre DNA; Nck: *nicked*-DNA (→ DNA mit Einzelstrangbruch); relaxed topoisomers: Plasmide, die sich in der Anzahl der nach der Enzyminkubation noch im Molekül befindlichen superhelikalen Windungen unterscheiden; Sc: *supercoiled*-DNA (→ superspiralisierte DNA)]

Da die Auswertung der Agarose-Gele, denen Ethidiumbromid zugesetzt wurde, eine besondere apparative Ausstattung erforderlich macht, wurden derartige Tests – ergänzend zu den in dieser Arbeit beschriebenen Topoisomerase I-Hemmassays – am I.N.S.E.R.M. in Lille, Frankreich durchgeführt <sup>[37,38]</sup>.

### 3.4.2.2 Praktische Durchführung

Der in dieser Arbeit beschriebene Topoisomerase I-Hemmassay orientiert sich an den von *Marotto* <sup>[47]</sup> und *Bailly* <sup>[56]</sup> formulierten Vorschriften. Er enthält jedoch einige Modifikationen, die zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse eingeführt wurden. Das im Folgenden dargestellte, neu etablierte Verfahren kann nunmehr auch routinemäßig zum *Screening* von potentiell TOPO I-hemmenden Substanzen verwendet werden kann.

Zu Beginn der Testung wurde zunächst der sog. Master Mix hergestellt, indem das für die jeweilige Probenzahl erforderliche Volumen an Topoisomerase I-Puffer (10fach konzentriert) <sup>[156]</sup>, Plasmid-DNA pUC 19 ( $c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  <sup>[157]</sup>) und Aqua dest. in ein ausreichend großes Eppendorf-Cap pipettiert und gut durchmischt wurden.

#### **Zusammensetzung des Master Mix (für N Proben):**

Gesamtvolumen:	$(N+1) \times 18 \mu\text{l}$
Topoisomerase I-Puffer:	$(N+1) \times 2 \mu\text{l}$
Plasmid-DNA pUC19:	$(N+1) \times 0,5 \mu\text{l}$
Aqua dest.:	$(N+1) \times 15,5 \mu\text{l}$

Nachdem der vorbereitete Master Mix in Aliquoten von  $18 \mu\text{l}$  auf die Probengefäße verteilt wurde, wurden die Reaktionsansätze 1 und 2 ( $\rightarrow$  Negativkontrolle) mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von jeweils  $20 \mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur Probe 3, die als Positivkontrolle diente, wurden  $2 \mu\text{l}$  Camptothecin-Lösung (Lösungsmittel: DMSO;  $c = 200 \mu\text{M}$   $\rightarrow$  Endkonzentration der Probe:  $20 \mu\text{M}$ ) zupipettiert, während die übrigen Ansätze (Probe 4 - Probe N) mit jeweils  $2 \mu\text{l}$  der in DMSO gelösten Testsubstanzen versetzt wurden. Dabei wiesen die drei pro Verbindung zur Probenherstellung verwendeten Lösungen Konzentrationen von  $500 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$  ( $\rightarrow$  Endkonzentration der Proben:  $50 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$  bzw.  $5 \mu\text{M}$  <sup>[47,59]</sup>) auf. Die komplettierten Reaktionsansätze wurden kurz zentrifugiert und anschließend in einem Wasserbad bei  $35^\circ\text{C}$  inkubiert. Mit Ausnahme der Probe 1 wurden alle Ansätze nach 15 min mit jeweils  $1 \mu\text{l}$  humaner Topoisomerase I (Aktivität:  $5 \text{ U}/\mu\text{l}$   $\rightarrow$  1U entspricht einer Enzymmenge, die bei  $37^\circ\text{C}$  in 30 min  $0,25 \mu\text{g}$  superspiralisiertes Plasmid relaxieren kann <sup>[156]</sup>) versetzt. Da eine Zentrifugation der Proben aufgrund der Instabilität des Enzyms nicht möglich war, wurden die Ansätze durch sorgfältiges Rühren mit der Pipettenspitze homogenisiert. Nach einer weiteren, bei  $35^\circ\text{C}$  im Wasserbad erfolgenden, 30 min andauernden

Inkubationsphase wurde die Reaktion gestoppt und die kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase I entfernt, indem in jedes Probengefäß 2 µl einer zu gleichen Teilen aus einer 25%igen, wässrigen SDS-Lösung (→ dient der Enzymdenaturierung [47]) und einer Proteinase K-Lösung (→ entfernt das Enzym von der DNA und verbessert dadurch die elektrophoretische Trennung der verschiedenen Plasmid-Formen [47]) bestehenden Mischung pipettiert wurden [47,59,61,119,155]. Die Ansätze wurden kurz zentrifugiert und anschließend für 35 min bei 55°C in einem Trockenschrank inkubiert, bevor jede Probe mit 2 µl Ladepuffer (Kapitel 3.2.1, Seite 61) versetzt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden 20 µl jedes Ansatzes in die Taschen eines 1%igen Agarose-Gels [→ hergestellt aus 1,3 g Agarose SeaKem® LE und 128,7 g TAE-Puffer (einfach konzentriert)] pipettiert [47,59,61,119,155]. Die anschließend durchgeführte, elektrophoretische Trennung erfolgte unter Verwendung von TAE (einfach konzentriert) als Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V [47,59,61,119,155].

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe N
18 µl Master Mix	18 µl Master Mix	18 µl Master Mix	18 µl Master Mix	18 µl Master Mix
2 µl H <sub>2</sub> O	2 µl H <sub>2</sub> O	2 µl Camptothecin- Lsg. 200 µM <b>(Positivkontrolle)</b>	2 µl Testsubstanz-Lsg. (500 µM; 200 µM; 50 µM)	2 µl Testsubstanz-Lsg. (500 µM; 200 µM; 50 µM)
—	1 µl TOPO I <b>(Negativkontrolle)</b>	1 µl TOPO I	1 µl TOPO I	1 µl TOPO I
2 µl SDS/Proteinase K (1:1)	2 µl SDS/Proteinase K (1:1)	2 µl SDS/Proteinase K (1:1)	2 µl SDS/Proteinase K (1:1)	2 µl SDS/Proteinase K (1:1)
2 µl Ladepuffer	2 µl Ladepuffer	2 µl Ladepuffer	2 µl Ladepuffer	2 µl Ladepuffer

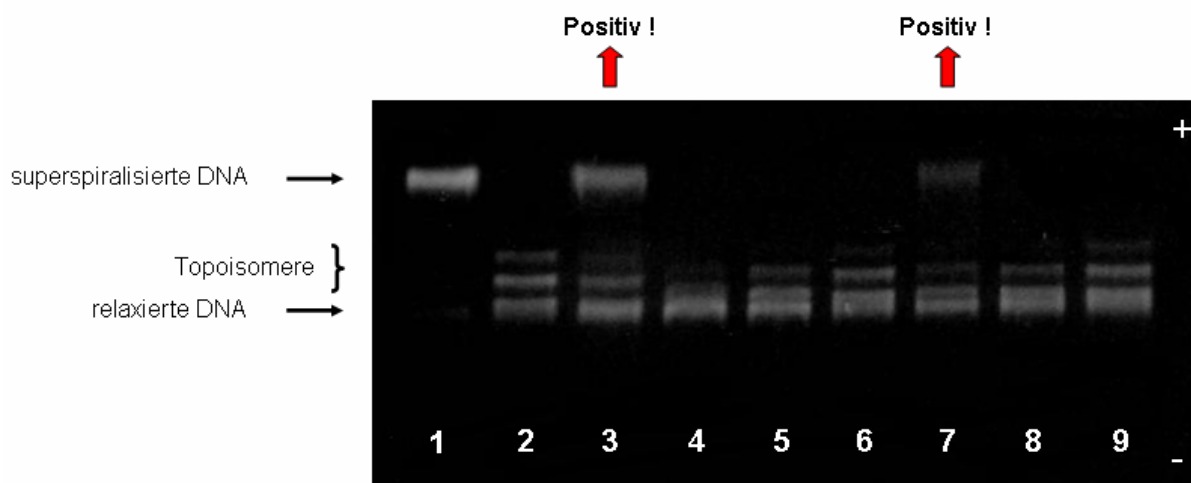
**Tab. 3.1:** Pipettierschema des beschriebenen Topoisomerase I-Hemmtests

Nach ca. 2 Stunden wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und zunächst für 15min in einem Ethidiumbromid-Bad entwickelt [56,59,61,119,155]. Zur Entfernung des nicht-interkalierten Chromophors wurde das Gel anschließend für 20 min in

ein Wasserbad gelegt, bevor es unter UV-Licht ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert wurde <sup>[119]</sup>. Zur Ergebnisverifizierung wurde der Topoisomerase I-Hemmtest mit jeder Verbindung mindestens dreimal durchgeführt.

Entscheidend für den Erhalt richtiger und reproduzierbarer Ergebnisse ist die Auswahl eines geeigneten Plasmid-Enzym-Verhältnisses, das an die Aktivität der Topoisomerase I, die von Charge zu Charge variieren kann, angepasst werden muss: In Abwesenheit eines TOPO I-Inhibitors muss das Enzym die in den Reaktionsansätzen jeweils vorliegenden, superspiralisierten Plasmide innerhalb der Inkubationszeit quantitativ relaxieren können, so dass die Topoisomerase I-hemmenden Eigenschaften einer Testsubstanz im Gel am Vorhandensein der von der superhelikalen DNA gebildeten Bande erkennbar wird (Abb. 3.8).

Die in Abb. 3.8 als Topoisomere bezeichneten Banden werden von partiell relaxierten Plasmiden gebildet, die sich in der Anzahl der nach der Enzyminkubation jeweils noch im Molekül verbliebenen, superhelikalen Windungen *W* voneinander unterscheiden <sup>[41,56]</sup>.



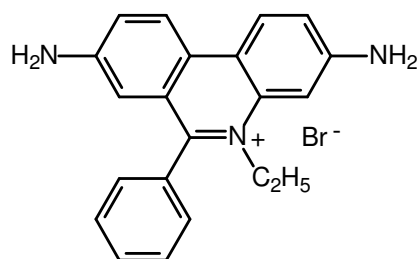
**Abb. 3.8:** Gelelektropherogramm eines Topoisomerase I-Hemmtests am Beispiel des Nucleobasen-gekoppelten Bispyrrolcarboxamids **18** und des Combilexins **33** (Abb. 6.16, Seite 184; Abb. 6.37, Seite 216)

(Spur 1: Plasmid-DNA pUC 19; Spur 2: Plasmid-DNA mit Topoisomerase I; Spur 3: Camptothecin 20  $\mu$ M; Spur 4: **18** 50  $\mu$ M; Spur 5: **18** 20  $\mu$ M; Spur 6: **18** 5  $\mu$ M; Spur 7: **33** 50  $\mu$ M; Spur 8: **33** 20  $\mu$ M; Spur 9: **33** 5  $\mu$ M)

### 3.4.3 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

#### 3.4.3.1 Theorie

Bei der DNA-aktiven Verbindung Ethidiumbromid (Abb. 3.9) handelt es sich um ein planares, heteroaromatisches Molekül, dessen Interkalation zwischen zwei benachbarte Basenpaare eines Polynukleotid-Doppelstrangs eine im Vergleich zur ungebundenen Form deutliche Verstärkung ( $\rightarrow$  etwa um das 50fache) der Fluoreszenzintensität zur Folge hat <sup>[6,47,158-161]</sup>. Diese Eigenschaft des Interkalators liegt darin begründet, dass die DNA-Ligand-Interaktion eine Reduktion des Austausches angeregter Protonen zwischen den Amino-Gruppen des Fluorophors und den Wassermolekülen des Lösungsmittels bewirkt <sup>[160,162,163]</sup>, was zu einer Verlängerung der Lebenszeit des angeregten Zustandes und – damit verbunden – zu einer Steigerung des von Ethidiumbromid emittierten Fluoreszenzlichts führt <sup>[148,160,162]</sup>.



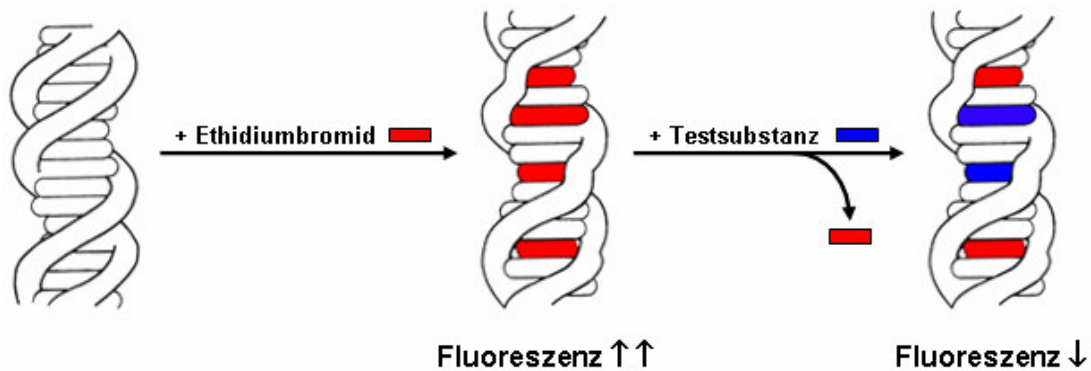
**Abb. 3.9:** Strukturformel des Interkalators und Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid

Aufgrund der stark ausgeprägten Fluoreszenz des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes kann der Interkalator dazu verwendet werden, z. B. auf einem Agarose-Gel auch kleinste DNA-Mengen (bis zu 50 ng), sichtbar zu machen <sup>[40,47]</sup> (Kapitel 3.4.2.2, Seite 78-79). Daneben wird Ethidiumbromid u. a. auch zur Untersuchung der Triplex-bildenden Eigenschaften von Nukleinsäure-Molekülen, zur Messung der Extinktionskoeffizienten von Polynukleotiden beliebiger Sequenzen, zur Ermittlung des DNA-Bindemodus von Liganden und zur Untersuchung der Topologie von DNA-Doppelsträngen eingesetzt <sup>[160,161]</sup> (Kapitel 3.4.2.1, Seite 72 ff.).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs stellt der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay dar, bei dem es sich um eine fluorimetrische Titration zur Bestimmung der Bindekonstanten DNA-aktiver Substanzen handelt



[47,94,97,106,158-161]. Im ersten Schritt dieses Verfahrens werden die als Matrize dienenden DNA-Moleküle mit Ethidiumbromid abgesättigt, so dass Komplexe mit maximaler Fluoreszenzintensität entstehen [47,164]. Durch Zugabe einer ebenfalls DNA-aktiven Testverbindung wird der Interkalator aus seinen DNA-Bindestellen verdrängt, was eine Fluoreszenzabnahme der Probelösung zur Folge hat [47,158,159,164,165] (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10:** Testprinzip des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays zur Bestimmung der Bindekonstanten DNA-aktiver Substanzen

Die Konzentration der Testsubstanz, die eine 50%-ige Reduktion der initial gemessenen Fluoreszenz bewirkt, wird als  $C_{50}$ -Wert bezeichnet [47,94,97,158,159]. Da sich dieser näherungsweise invers proportional zu der Bindekonstante des zu untersuchenden DNA-Liganden verhält [94,97,158,160], wurden verschiedene mathematische Gleichungen (z. B. *Wellman'sche* Gleichung [164], Gleichung nach *Boger* [165]) entwickelt, mit deren Hilfe man  $K_{app}$  [*Apparent Binding Constant*; Gleichung (3)] der DNA-aktiven Verbindungen auf der Basis der  $C_{50}$ -Werte berechnen kann [47,94,158,159,164,165].

$$(3) \quad K_{app} = \frac{[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}}{[\text{Ligand}]_{\text{frei}} [\text{DNA}]_{\text{frei}}}$$

- $K_{app}$ : Bindekonstante (*Apparent Binding Constant*)
- $[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}$ : Konzentration des an DNA gebundenen Liganden
- $[\text{Ligand}]_{\text{frei}}$ : Konzentration des sich ungebunden in Lösung befindlichen Liganden
- $[\text{DNA}]_{\text{frei}}$ : Konzentration der sich frei in Lösung befindlichen DNA

Bei den aus dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay resultierenden Bindekonstanten der Testsubstanzen handelt es sich zwar im Fall eines von Ethidiumbromid abweichenden DNA-Bindemodus lediglich um relative Werte <sup>[6,164,165]</sup>; dennoch können diese Konstanten sehr gut dazu herangezogen werden, ein Affinitäts-Ranking mehrerer DNA-Liganden, die untereinander alle einen ähnlichen Bindemodus aufweisen, zu erstellen <sup>[47,158]</sup>. Aufgrund des Testprinzips ist der Assay nicht zur Untersuchung schwach bindender Substanzen ( $\rightarrow K_{app} < 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ ) oder zur Testung von Liganden mit einer starken Eigenfluoreszenz geeignet <sup>[158]</sup>.

### 3.4.3.2 Praktische Durchführung

Das in dieser Arbeit verwendete Testverfahren beruht auf den Arbeiten von *Marotto* <sup>[47]</sup> und *Boger et. al.* <sup>[165]</sup> und wurde durch den Vergleich der aus der Literatur bekannten Bindekonstante des *Minor Groove Binders* Hoechst 33258 (Kapitel 8.1.1, Seite 311) mit dem Wert, der aus der Durchführung des hier beschriebenen Ethidiumbromid-Verdrängungsassays resultierte, erneut validiert (Abb. 3.11, Seite 84; Tab. 3.2, Seite 84). Dieses Testprotokoll, das im Folgenden näher erläutert wird, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals erfolgreich zur Bestimmung der Bindekonstanten ( $\rightarrow K_{app}$ -Werte) von Vertretern der Combilexin- (Kapitel 6.3.4, Seite 226 ff.) und der Hetaren[a]carbazol-Reihe (Kapitel 6.4.4, Seite 285 ff.) eingesetzt werden. Die ermittelten Konstanten dienen zum einen zum Vergleich der DNA-Affinitäten der neu synthetisierten Testsubstanzen mit der Bindeaktivität bereits etablierter Leitstrukturen, und zum anderen zur Verifizierung der aus den Denaturierungsexperimenten stammenden Daten, da in der Literatur eine Korrelation zwischen den  $K_{app}$ - und den  $\Delta T_m$ -Werten beschrieben wird <sup>[146]</sup>.

Zu Beginn der Messungen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  einer Ethidiumbromid-Lösung ( $c = 1 \text{ mM}$ ), die unter Verwendung des als Lösungsmittel fungierenden Puffers nach *Boger* (pH 7,4; Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 75 mM NaCl <sup>[165]</sup>) und einer 1%-igen, wässrigen Lösung des Chromophors hergestellt wurde <sup>[47]</sup>, in die bereitstehenden Fluoreszenzküvetten pipettiert und mit weiteren 1980  $\mu\text{l}$  der Pufferlösung nach *Boger* <sup>[165]</sup> versetzt. Die Fluoreszenz jeder vorbereiteten Probe wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 545 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm bestimmt <sup>[6,47,94,106,158,159,165,166]</sup> und als 0%-Wert definiert <sup>[47]</sup>. Anschließend wurden 10

$\mu\text{l}$  einer wässrigen Kalbsthymus-DNA-Lösung ( $c = 2 \text{ mM}$ )<sup>[94,158,164,165]</sup> in kleinen Anteilen von  $4 \times 2,5 \mu\text{l}$  in die Küvetten pipettiert<sup>[47,165]</sup> ( $\rightarrow$  Gesamtvolumen der Reaktionsansätze:  $2 \text{ ml}$ ). Das in jeder Probe vorliegende Konzentrationsverhältnis des Interkalators zu den DNA-Basenpaaren betrug – bei einer Ethidiumbromidkonzentration von  $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$  und einer Basenpaarendkonzentration von  $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  – folglich 1 zu 2<sup>[47,165]</sup>; mit dieser Relation konnte eine vollständige Besetzung aller Ethidiumbromid-Bindestellen an der DNA gemäß des *Neighbouring Site Exclusion Model*<sup>[159,161]</sup> sichergestellt werden, so dass die DNA-Bindung einer zugesetzten Testsubstanz direkt zur Verdrängung des Ethidiumbromids von der DNA und somit zu einer Reduktion des emittierten Fluoreszenzlichts führte. Die die Ethidiumbromid-DNA-Komplexe enthaltenden Reaktionsansätze wurden  $30 \text{ min}$  bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert, bevor erneut eine Fluoreszenzmessung durchgeführt wurde<sup>[47,165]</sup>: die Strahlungsintensität, die nun für jede Probe ermittelt wurde, stellte den 100%-Wert dar<sup>[47]</sup>. Anschließend wurde jeder Reaktionsansatz mit Aliquoten der in DMSO gelösten Testsubstanzen versetzt. Die zu diesem Zweck verwendeten Stammlösungen wiesen eine Konzentration von  $3 \text{ mM}$  auf und wurden – zur Verbesserung der Löslichkeit – mit den Hydrochloriden der zu untersuchenden DNA-Liganden hergestellt. Das Lösungsvolumen, das bei jedem Titrationsschritt zu den in den Küvetten befindlichen Proben hinzupipettiert wurde, orientierte sich an den zuvor ermittelten  $\Delta T_m$ -Werten der Testverbindungen und betrug zwischen  $2$  und  $9 \mu\text{l}$ . Nach jeder Substanzzugabe wurden die Reaktionsansätze zur Äquilibrierung  $30 \text{ min}$  bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor die Fluoreszenzen der Proben bestimmt und mit folgender Formel in einen sich auf den 100%-Wert beziehenden Betrag umgerechnet wurden<sup>[164]</sup>:

$$(4) \quad \%F = \frac{F - F_{0\%}}{F_{100\%} - F_{0\%}}$$

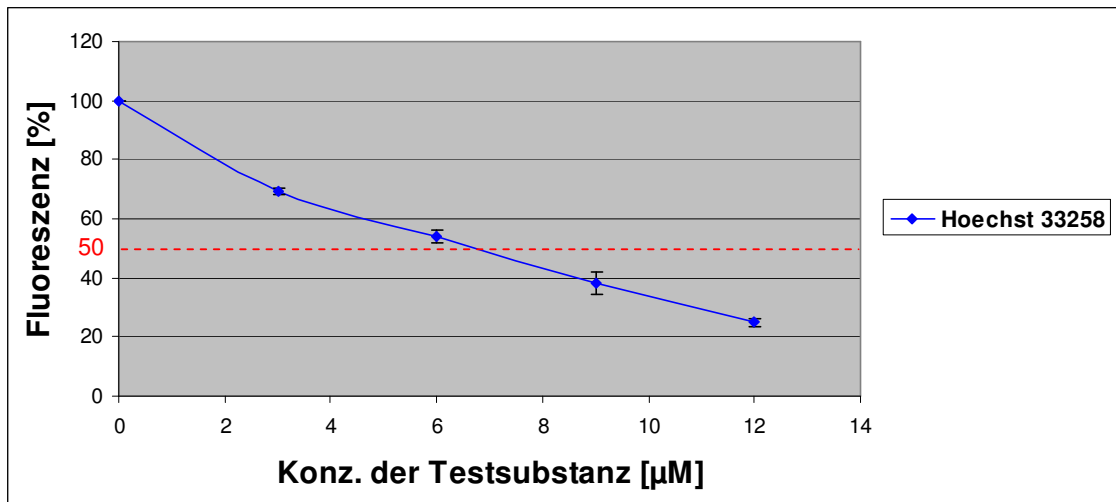
Betrag die von den Reaktionsansätzen emittierte Fluoreszenz nur noch  $20\text{-}45\%$  der initial gemessenen Strahlungsintensität ( $\rightarrow$  dieser Punkt wurde nach  $4 - 10$ -maliger Zugabe von Substanzlösung erreicht), so wurden die Titrations abgebrochen.

Mit jeder Testverbindung wurden  $3 - 5$  unabhängige Messreihen durchgeführt und die Mittelwerte der nach den einzelnen Titrationsschritten jeweils gemessenen Probenfluoreszenzen berechnet. Zur Auswertung der Testergebnisse wurden die Mittelwerte in  $\%$  gegen die in den Reaktionsansätzen jeweils vorliegenden Substanz-

konzentrationen aufgetragen <sup>[47]</sup> (Abb. 3.11). Auf der Basis der aus diesen Diagrammen resultierenden  $C_{50}$ -Werte erfolgte schließlich die Berechnung der Bindekonstanten der Testsubstanzen mit Hilfe der *Wellman'schen* Gleichung <sup>[47,97,106,164,166]</sup> [Gleichung (5)] (Tab. 3.2).

$$(5) \quad K_{\text{EtdBr}}[\text{EtdBr}] = K_{\text{app}}[\text{Ligand}]$$

- $K_{\text{EtdBr}}$ : Bindekonstante von Ethidiumbromid <sup>[164]</sup> ( $\rightarrow 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )
- $[\text{EtdBr}]$ : im Assay eingesetzte Ethidiumbromid-Konzentration <sup>[47,165]</sup> ( $\rightarrow 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
- $K_{\text{app}}$ : DNA-Bindekonstante der getesteten Verbindung (in  $\text{M}^{-1}$ )
- $[\text{Ligand}]$ : Konzentration des Liganden, die zu einer 50%-igen Fluoreszenzabnahme führt ( $C_{50}$ ; in M)



**Abb. 3.11:** Darstellung der bei der Testung des Rinnenbinders Hoechst 33258 (Kapitel 8.1.1, Seite 311) gemessenen, konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme, die zur Validierung des Testverfahrens ermittelt wurde

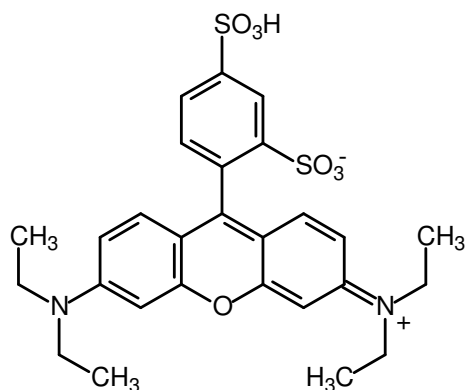
	$C_{50}^1$	$K_{\text{app}}^2$	$K_{\text{app}}^3$
<b>Hoechst 33258</b>	6,8 µM	$1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$7,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

**Tab. 3.2:**  $C_{50}$ -Wert und Bindekonstanten des *Minor Groove Binders* Hoechst 33258 (Kapitel 8.1.1, Seite 311) (der Vergleich der experimentell ermittelten mit der aus der Literatur entnommenen Bindekonstante wurde zur Validierung des Testverfahrens angestellt)

<sup>1</sup>:  $C_{50}$ -Wert, aus dem oben abgebildeten Diagramm (Abb. 3.11) ermittelt  
<sup>2</sup>:  $K_{\text{app}}$ , berechnet mit der *Wellman'schen* Gleichung <sup>[164]</sup>  
<sup>3</sup>:  $K_{\text{app}}$  aus Literatur <sup>[167]</sup>

### 3.4.4 Zytotoxizitätstests des NCI

Das *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) bietet im Rahmen des *Developmental Therapeutics Program* (DTP) die Möglichkeit, Substanzen synthetischen und pflanzlichen Ursprungs unentgeltlich auf potentiell vorhandene, antiproliferative Eigenschaften testen zu lassen<sup>[47,168]</sup>. Die Verbindungen, die vom *Biological Evaluation Comitee* des NCI für die Zytotoxizitätsuntersuchungen zugelassen worden sind, durchlaufen im ersten Schritt dieses Screening-Programms ein *in vitro*-Testsystem, das 60 humane Tumorzelllinien aus 9 typischen malignen Neoplasien (→ Leukämie, Melanom sowie Lungen-, Kolon-, ZNS-, Ovarial-, Nieren-, Prostata- und Brustkrebs) umfasst<sup>[47,168-170]</sup>. Zur Aktivitätsbestimmung der Substanzen wird in dieser Testphase der Sulforhodamin B (SRB) - Proteinassay eingesetzt<sup>[47,168,169,171]</sup>, wobei es sich bei SRB (Abb. 3.12) um einen Farbstoff aus der Gruppe der Aminoxanthere handelt, der spezifisch an basische Aminosäuren bindet<sup>[47,168,169,171]</sup>.

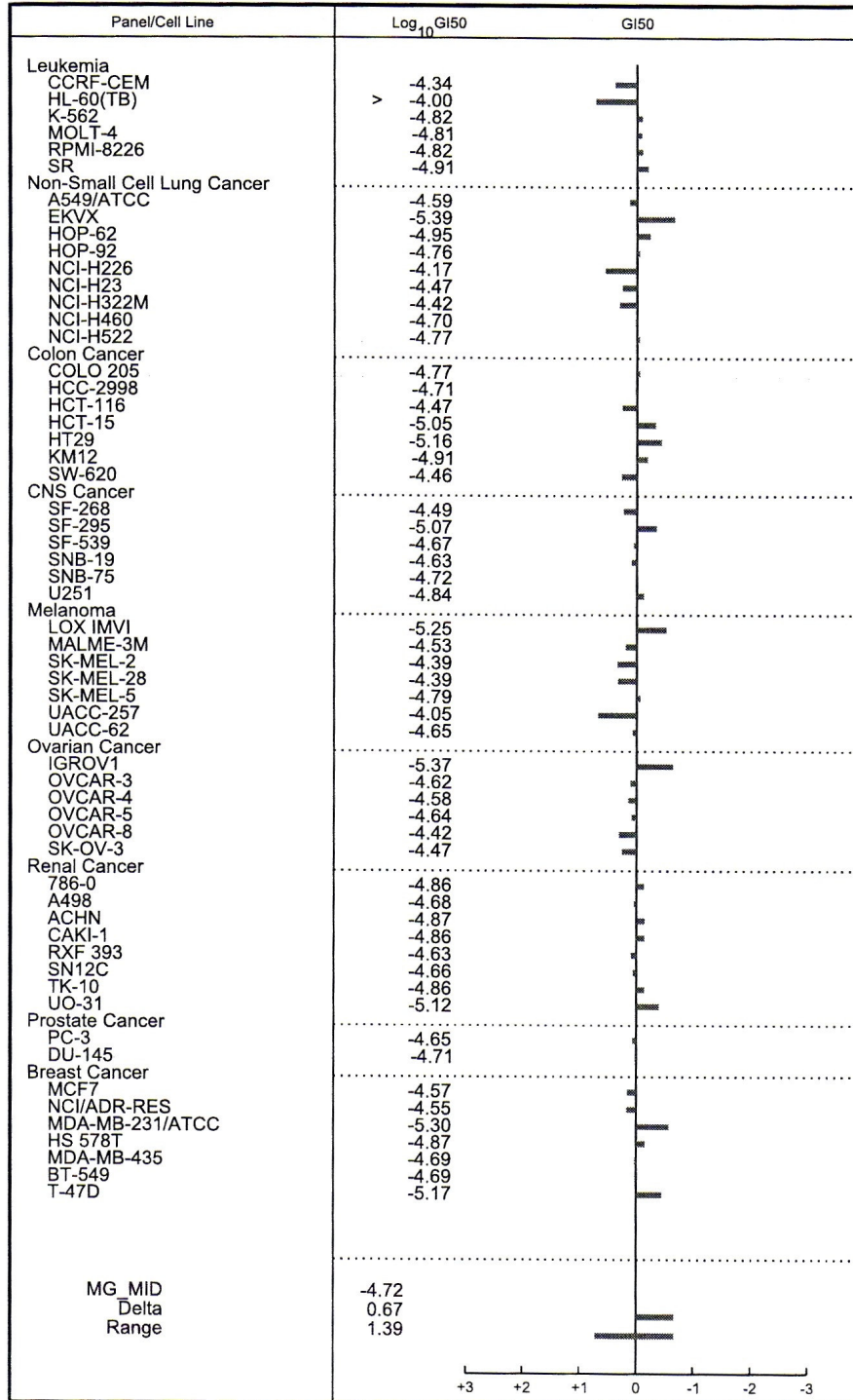


**Abb. 3.12:** Strukturformel des Aminoxanthen-Farbstoffs Sulforhodamin B

Bei diesem vom NCI angewandten Zytotoxizitätstest werden die Zellkulturen vor der Zugabe der in DMSO gelösten Testverbindungen zunächst in Mikrotiterplatten mit Trichloressigsäure fixiert<sup>[47,168,169,171]</sup>. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C erfolgt der Austausch der Substanzlösung und des Kulturmediums gegen eine Sulforhodamin B-Lösung<sup>[47,168,169,171]</sup>. Nach einer 10minütigen Einwirkzeit werden der überschüssige Farbstoff und die abgestorbenen Zellen durch fünfmaliges Waschen der Kulturen und anschließendes Lufttrocknen entfernt<sup>[47,168,171]</sup>, bevor der Anteil des Sulforhodamin B, der in den lebenden Zellen an Proteine gebunden vorliegt, mit Tris-Puffer extrahiert und spektralphotometrisch quantifiziert wird<sup>[47,168,171]</sup>. Auf der Basis

der ermittelten Farbstoffmenge, die die Proteinkonzentration der Zellkultur widerspiegelt, können schließlich Aussagen über das Zellwachstum und die Zellviabilität gemacht werden <sup>[47,168,171]</sup>.

Zeigen die Verbindungen in der ersten Testreihe, die mit einer Substanzkonzentration von 10 µM durchgeführt wird <sup>[168]</sup>, eine ausreichend starke, antiproliferative Wirkung, so werden sie in der zweiten Phase in fünf weiteren Konzentrationen (üblicherweise  $10^{-4}$  M bis  $10^{-8}$  M) in dem 60 verschiedene Zellkulturen umfassenden Assaysystem eingesetzt <sup>[47,168,169,171]</sup>. Die Aktivität einer Verbindung gegenüber jeder der im Test enthaltenen Tumorzelllinien wird durch die drei Parameter  $GI_{50}$  (→ *50% Growth Inhibition*: molare Substanzkonzentration, die eine 50%-ige Wachstumshemmung der Tumorzellen verursacht), TGI (→ *Total Growth Inhibition*: molare Substanzkonzentration, die eine 100%-ige Wachstumshemmung der Tumorzellen verursacht), und  $LC_{50}$  (→ *Lethal Concentration 50%*: molare Substanzkonzentration, die zu einer 50%-igen Letalität der Tumorzellen führt) dargestellt <sup>[47,90,168-171]</sup>. Um die Zytotoxizität verschiedener Verbindungen besser miteinander vergleichen zu können, werden zudem die Mittelwerte aller  $GI_{50}$ -, TGI- bzw.  $LC_{50}$ -Werte einer Substanz berechnet und in Form des dekadischen Logarithmus angegeben <sup>[47,90,169]</sup>. Darüber hinaus wird die selektive Aktivität, die die Testverbindung gegenüber jeder einzelnen der 60 Zelllinien ausübt, in Bezug zu diesen Mittelwerten gesetzt und als sog. *Mean Graphs* graphisch dargestellt <sup>[47,168]</sup> (Abb. 3.13, Seite 87).



**Abb. 3.13:** Darstellung der vom NCI mit dem Thienocarbazol-Derivat **46** (Abb. 6.73, Seite 280) ermittelten  $GI_{50}$ -Werte als sog. *Mean Graph  $GI_{50}$*  (nach rechts gerichtete Balken: Verbindung **46** zeigt gegenüber diesen Zelllinien eine im Vergleich zum Mittelwert gesteigerte zytotoxische Aktivität; nach links gerichtete Balken: Verbindung **46** zeigt gegenüber diesen Zelllinien eine im Vergleich zum Mittelwert erniedrigte zytotoxische Aktivität)

Diese Mittelwert-Diagramme, die auch als *Fingerprints* bezeichnet werden, geben die spezifischen Aktivitätsmuster der untersuchten Substanzen wieder und können zur Aufklärung des etwaigen Wirkmechanismus mit Hilfe des NCI-Programms COMPARE mit den in Datenbanken gespeicherten Profilen bekannter, antitumoraktiver Verbindungen verglichen werden <sup>[47,90,168]</sup>. Bei diesem Datenanalyse-Verfahren wird die Ähnlichkeit zweier *Fingerprints* mit dem Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* beurteilt, wobei ein Koeffizient  $> 0,6$  vermuten lässt, dass die beiden betrachteten Substanzen den gleichen Wirkmechanismus aufweisen <sup>[47,90,168]</sup>. Das Programm COMPARE konnte bereits erfolgreich zur Identifizierung neuer Antimetabolite, Topoisomerase II-Gifte, Alkylantien, Mitosehemmstoffen und Telomerase-Inhibitoren eingesetzt werden <sup>[172-175]</sup>.

Besitzt die Testverbindung ein neuartiges Aktivitätsprofil, ist sie gegen verschiedene Krebszelllinien der gleichen malignen Neoplasie hochselektiv wirksam oder zeigt sie schon im nanomolaren Konzentrationsbereich eine starke Zytotoxizität, so wird sie in der nächsten Phase des Antitumor-Screenings *in vivo* an Mäusen, denen humane Tumorzellen implantiert wurden, getestet <sup>[47]</sup>.



## 4. Molecular Modelling: Theoretische Methoden, Software

### 4.1 Theoretische Methoden

#### 4.1.1 Molekülmechanik/Kraftfeld

Molekülmechanische Rechnungen beruhen auf der Vorstellung, dass es sich bei einem Molekül um ein aus Oszillatoren bestehendes, mechanisches System handelt [78]. Bei diesem Strukturmodell werden die Atome einer chemischen Verbindung mit geladenen Massepunkten gleichgesetzt, die über gewichtlose, harmonische Federn – die kovalenten Bindungen – miteinander verknüpft sind [24,25,49,78,176]. Diesem theoretischen Ansatz folgend, können die Gesetze der klassischen Mechanik nach *Isaak Newton* zur Molekülcharakterisierung herangezogen werden [25,49,78,177,178].

Bei einer molekülmechanischen Simulation wird die potentielle Gesamtenergie  $E_{\text{pot}}$  einer molekularen Struktur durch Addition mehrerer Teilenergien, welche die verschiedenen, interatomaren mechanischen und elektrostatischen Kräfte widerspiegeln, ermittelt [24,25,27,49,78,176]. Die Anzahl der Partialenergie-Terme, die in die sog. Kraftfeld-Gleichung zur Berechnung von  $E_{\text{pot}}$  mit einbezogen werden, variiert – ebenso wie deren mathematische Formulierung – von Kraftfeldmethode zu Kraftfeldmethode [24,25,27]. Im Folgenden ist eine allgemein gültige Form der Kraftfeld-Gleichung [Gleichung (1)] aufgeführt [24,25,27,49,78,176].

$$(1) \quad E_{\text{pot}} = \underbrace{\sum E_{\text{bond}} + \sum E_{\text{angle}} + \sum E_{\text{dihedral}} + \sum E_{\text{oop}}}_{\text{Diagonalterme}} + \underbrace{\sum E_{\text{bo/an}} + \sum E_{\text{bo/di}}}_{\text{Kreuzterme}} + \underbrace{\sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{\text{elec}}}_{\text{nichtbin- dende WW}}$$

$E_{\text{pot}}$ :	potentielle Gesamtenergie eines Moleküls
$E_{\text{bond}}$ :	Energie einer Bindungslängendeformation
$E_{\text{angle}}$ :	Energie einer Bindungswinkeldeformation
$E_{\text{dihedral}}$ :	Energie einer Torsionswinkeldeformation
$E_{\text{oop}}$ :	Ringspannungsenergie; <i>Out-of-plane</i> -Energie
$E_{\text{bo/an}}$ :	Energieterm, der die Bindungslängenenergien $E_{\text{bond}}$ in einen Bezug zu den Bindungswinkelenergien $E_{\text{angle}}$ setzt
$E_{\text{bo/di}}$ :	Energieterm, der die Bindungslängenenergien $E_{\text{bond}}$ in einen Bezug zu den Torsionswinkelenergien $E_{\text{dihedral}}$ setzt

$E_{\text{vdW}}$ : Energie der van der Waals-Wechselwirkungen  
 $E_{\text{elec}}$ : Energie der elektrostatischen Wechselwirkungen (Coulomb-Energie)

Die aus einer Kraftfeldrechnung resultierende Gesamtenergie  $E_{\text{pot}}$  hat allerdings – im Gegensatz zu der mit quantenmechanischen Simulationen ermittelten molaren Bildungsenthalpie  $\Delta H_f$  – keinen physikalischen Bezug<sup>[24,78,178]</sup>; sie kann lediglich dazu herangezogen werden, mehrere Moleküle, deren Eigenschaften mit dem jeweils gleichen Kraftfeld berechnet wurden, miteinander zu vergleichen<sup>[178]</sup>.

Bei den molekülmechanischen Rechenverfahren werden die Partialenergien der bindenden Kräfte bestimmt, indem die in einem Molekül vorliegenden Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel mit Referenzwerten, welche Energieminima entsprechen, verglichen werden<sup>[24,25,27]</sup>. Diese sog. natürlichen Werte, die in programminternen Datenbanken gespeichert sind, stammen größtenteils aus quantenmechanischen Simulationen oder spektroskopischen Untersuchungen<sup>[25,27,78]</sup>. Unter Verwendung der Referenzwerte und der ebenfalls in den Datenbanken enthaltenen Kraftkonstanten, werden die Abweichungen der realen von den idealen Molekülgeometrien mit Hilfe mathematischer Gleichungen in Energiebeträge umgerechnet<sup>[24,25,27,49]</sup>.

Jedes Kraftfeld weist eine Vielzahl von Atomtypen auf, die dazu dienen, jedes Atom eines molekularen Systems auf der Grundlage der Ordnungszahl, des Hybridisierungsgrades und der chemischen Umgebung ( $\rightarrow$  Ordnungszahlen der mit dem betrachteten Atom verknüpften Atome) zu charakterisieren<sup>[27,178]</sup>. Die verschiedenen, in einem Molekül vorliegenden Atomtypen werden bei den Berechnungen der Partialenergien indirekt berücksichtigt, indem jedem Atomtyp jeweils unterschiedliche natürliche Werte und Konstanten zugeordnet werden<sup>[27,176]</sup>.

Die Kraftkonstanten und die Referenzwerte für Bindungen und Winkel bilden gemeinsam mit den Konstanten, die zur Ermittlung der aus den nichtbindenden Wechselwirkungen resultierenden Energien  $E_{\text{vdW}}$  und  $E_{\text{elec}}$  benötigt werden, den sog. Parametersatz eines Kraftfeldes<sup>[25,27,178]</sup>. Zusammen mit Art und Anzahl der in der Kraftfeld-Gleichung berücksichtigten Partialenergieterme, deren mathematischer Formulierung und den verwendeten Atomtypen, grenzt dieser Parametersatz die verschiedenen Kraftfeldverfahren voneinander ab<sup>[27,178]</sup>.

Im Gegensatz zur Quantenmechanik, bei der die erforderliche Rechenzeit, in Abhängigkeit von der Zahl  $n$  der Basisfunktionen eines Moleküls, mit  $n^3 - n^5$  ansteigt

[25,78] (Kapitel 4.1.2, Seite 97 ff.), nimmt der Rechenaufwand bei molekülmechanischen Simulationen lediglich mit dem Quadrat der Atomzahl ( $\rightarrow n^2$ ) zu [25,49]. Aus diesem Grund werden für die Kraftfeldrechnungen geringere Computerkapazitäten [25,78] ( $\rightarrow$  kürzere CPU-Zeiten, kleinere Arbeitsspeicher) benötigt, so dass mit dieser *in silico*-Methode auch größere Molekülsysteme untersucht und Moleküldynamik-Simulationen und Konformeranalysen (Kapitel 4.1.4, Seite 100 ff.) durchgeführt werden können [25,78]. Die molekülmechanischen Rechenverfahren sind allerdings – im Gegensatz zur Quantenmechanik – nicht zur Kalkulation von Übergangszuständen, sowie zur Untersuchung von Reaktionen, die mit der Auflösung und der Neubildung von Bindungen verbunden sind, einsetzbar [25,178].

#### 4.1.1.1 AMBER

Die molekülmechanische Rechenmethode AMBER [179,180] (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) wurde 1984 von Kollman et. al. speziell zur Simulation von Nucleinsäuren und Proteinen entwickelt [27,49,78,179,180]. Obwohl Kraftfeldrechnungen im Vergleich zur Quantenmechanik bedeutend geringeren Rechenaufwand erfordern [25] (Kapitel 4.1.1, Seiten 90-91), werden für die Simulationen von Biopolymeren – aufgrund der Vielzahl der in den Molekülen jeweils enthaltenen Atome – dennoch erhebliche Computerkapazitäten benötigt [25]. Aus diesem Grund enthält das Kraftfeld AMBER [179,180] keine Kreuzterme ( $\rightarrow$  Terme, die die Energien der Bindungslängendeformationen mit denen der Bindungswinkel- bzw. mit denen der Torsionswinkeldeformationen in Beziehung setzen; Kapitel 4.1.1, Seiten 89-90), wodurch die Rechnungen vereinfacht und somit beschleunigt werden können [25,178-180]. Die Gleichung (2) gibt die allgemeine Kraftfeld-Gleichung von AMBER [179,180] wider [24,25,178-180].

$$(2) \quad E_{\text{pot}} = \sum E_{\text{bond}} + \sum E_{\text{angle}} + \sum E_{\text{dihedral}} + \sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{\text{elec}} + \sum E_{\text{H-bond}}$$

$E_{\text{pot}}$ :	potentielle Gesamtenergie eines Moleküls
$E_{\text{bond}}$ :	Energie einer Bindungslängendeformation
$E_{\text{angle}}$ :	Energie einer Bindungswinkeldeformation
$E_{\text{dihedral}}$ :	Energie einer Torsionswinkeldeformation
$E_{\text{vdW}}$ :	Energie der van der Waals-Wechselwirkungen
$E_{\text{elec}}$ :	Energie der elektrostatischen Wechselwirkungen
$E_{\text{H-bond}}$ :	Energie der Wasserstoffbrückenbindungen

## 4.1.2 Quantenmechanik

Auf der Grundlage der 1924 von *Maurice Duc de Broglie* formulierten Gleichung des Welle-Teilchen-Dualismus des Lichts proklamierte *Schrödinger* 1926 die Existenz einer Wellenfunktion, die den Zustand eines Masseteilchens mit all seinen relevanten Eigenschaften zu einer beliebigen Zeit angibt <sup>[49,78,176]</sup>. Die aus *Schrödingers* Arbeiten resultierende Gleichung [→ *Schrödinger*-Gleichung (3)] stellt heutzutage die Basis aller quantenmechanischen Rechenmethoden dar <sup>[25,27,49,78,80,176,178,181]</sup>.

$$(3) \quad \hat{H} \Psi = E \Psi$$

- E: Energie des Systems  
Ψ: Wellenfunktion  
Ĥ: Hamilton-Operator, der sich aus verschiedenen Energietermen zusammensetzt [Gleichung (4) <sup>[178,181]</sup>]:

$$(4) \quad \hat{H}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = J_n(\mathbf{R}) + J_e(\mathbf{r}) + \vartheta_{nn}(\mathbf{R}, \mathbf{R}) + \vartheta_{ee}(\mathbf{r}, \mathbf{r}) + \vartheta_{ne}(\mathbf{R}, \mathbf{r})$$

- J<sub>n</sub>: totale kinetische Energie der Kerne  
J<sub>e</sub>: totale kinetische Energie der Elektronen  
ϑ<sub>nn</sub>: potentielle Energie der Kern-Kern-Abstoßung  
ϑ<sub>ee</sub>: potentielle Energie der Elektron-Elektron-Abstoßung  
ϑ<sub>ne</sub>: potentielle Energie der Kern-Elektron-Anziehung  
R: Vektor, der die Lage der Kerne mit den kartesischen Koordinaten X, Y und Z beschreibt  
r: Vektor, der die Lage der Elektronen mit den kartesischen Koordinaten x, y und z beschreibt

Die *Schrödinger*-Gleichung konnte bislang allerdings nur für Systeme, die lediglich ein einziges Elektron besitzen, wie beispielsweise für das Wasserstoffatom oder das He<sup>+</sup>-Kation, gelöst werden <sup>[27,78]</sup>. Aus diesem Grund wird die Gleichung in der Praxis durch die Vernachlässigung einiger rechenaufwändiger Integrale des Hamilton-Operators soweit vereinfacht, dass sie nunmehr auch zur Charakterisierung größerer molekularer Strukturen herangezogen werden kann <sup>[25,49,78,176]</sup>.

Die *Born-Oppenheimer*-Approximation, die eine sehr wichtige Näherung zur Simplifikation der *Schrödinger*-Gleichung darstellt <sup>[25,49,78,176,178,181]</sup>, basiert auf der Hypothese, dass die in einem molekularen System auftretenden Ortsveränderungen der

Atomkerne, im Falle eines sehr kleinen Beobachtungszeitintervalls, ignoriert werden können, da die Nuklei ein Vielfaches der Elektronenmasse aufweisen und infolgedessen sehr träge sind <sup>[25,27,49,78,178,181]</sup>. Diese Approximation erlaubt somit die Separierung der Kern- und der Elektronenbewegungen <sup>[27,49,178]</sup> und bedingt die Zeitunabhängigkeit der *Schrödinger*-Gleichung <sup>[49,78]</sup>. Als Folge der *Born-Oppenheimer*-Näherung fällt der Term  $J_n(\mathbf{R})$ , der die kinetische Energie der Kerne repräsentiert, aus dem Hamilton-Operator heraus <sup>[178]</sup>. Da der Term der Kern-Kern-Abstoßung  $\vartheta_{nn}(\mathbf{R},\mathbf{R})$  für eine fixierte Atomkonfiguration einen konstanten Wert annimmt, kann er zunächst ebenfalls vernachlässigt werden <sup>[27,178]</sup>. Diese Überlegungen führten zur Formulierung der elektronischen *Schrödinger*-Gleichung (5) mit dem elektronischen Hamilton-Operator  $\hat{H}_{\text{elec}}$  [Gleichung (6)] <sup>[25,78,178,181]</sup>:

$$(5) \quad \hat{H}_{\text{elec}} \Psi_{\text{elec}} = E_{\text{elec}} \Psi_{\text{elec}}$$

$$(6) \quad \hat{H}_{\text{elec}}(\mathbf{r}) = J_e(\mathbf{r}) + \vartheta_{ee}(\mathbf{r},\mathbf{r}) + \vartheta_{ne}(\mathbf{R},\mathbf{r})$$

Die unter Anwendung einer quantenmechanischen Rechenmethode ermittelte potentielle Gesamtenergie  $E_{\text{pot}}$  einer molekularen Struktur setzt sich schließlich aus der Energie  $E_{\text{elec}}$ , die aus der Lösung der elektronischen *Schrödinger*-Gleichung resultiert, und dem Term der Kern-Kern-Abstoßung,  $\vartheta_{nn}(\mathbf{R},\mathbf{R})$ , zusammen <sup>[178,181]</sup> [Gleichung (7)].

$$(7) \quad E_{\text{pot}} = E_{\text{elec}} + \vartheta_{nn}(\mathbf{R},\mathbf{R})$$

Nach *Max Born* stellt das Quadrat der elektronischen Wellenfunktion  $\Psi_{\text{elec}}$  ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, mit der ein Elektron in einem bestimmten Raumsegment zu finden ist, wobei die über den gesamten Raum erfolgende Integration von  $\Psi_{\text{elec}}$  eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 1 ergibt <sup>[27,49,78,178,181]</sup>. Diese Interpretation bedingt, dass die elektronische *Schrödinger*-Gleichung (5) nicht für alle Energiewerte  $E_{\text{elec}}$ , sondern nur für solche, bei denen die zugehörige Wellenfunktion endliche Werte annimmt, lösbar ist <sup>[49,78]</sup>.

Der *Hartree-Fock*-Approximation zur Folge lässt sich die Wellenfunktion  $\Psi_{\text{elec}}$ , die die Bewegungen und Eigenschaften aller Elektronen eines Moleküls umfasst, als Produkt zahlreicher Ein-Elektronen-Wellenfunktionen formulieren <sup>[178,181]</sup>. Auf diese

Weise wird das Verhalten eines jeden Elektrons isoliert von den übrigen in einem von den Atomkernen und den anderen Elektronen erzeugten Coulomb-Feld betrachtet [27,49]. Die Tatsache, dass sich die Elektronen eines Atoms oder Moleküls in der Realität in ihren Bewegungen gegenseitig beeinflussen, wird bei dieser Näherung demzufolge ignoriert [27].

Die Lösungen, die unter Berücksichtigung der *Hartree-Fock*-Approximation für ein unabhängiges Elektron aus der elektronischen *Schrödinger*-Gleichung resultieren, werden als Molekülorbitale bezeichnet [27,178]. Mit Hilfe der von *Roothaan* und *Hall* aufgestellten LCAO-Theorie [25,49,176] (*Linear Combination of Atomic Orbitals*) können diese Molekülorbitale in guter Näherung durch die lineare Kombination von Atomorbitalen beschrieben werden [27,49,78,176]. Die *Schrödinger*-Gleichung, die nach Anwendung dieser *Roothaan-Hall*-Approximation und der zuvor beschriebenen *Born-Oppenheimer*- und *Hartree-Fock*-Simplifikationen vorliegt, stellt die Basis aller vorhandenen quantenmechanischen Rechenmethoden dar [25,27].

In der Quantenmechanik werden die Energien molekularer Systeme oftmals unter Anwendung der von *Hartree* und *Fock* entwickelten SCF-Technik (*Self Consistent Field*) ermittelt [27,49,78,176,178]. Dabei handelt es sich um ein iteratives, aus zwei Teilschritten bestehendes Verfahren [49,176]: Im ersten Schritt erfolgt die Kalkulation der Hamilton-Matrix, die sich aus verschiedenen, aus der *Schrödinger*-Gleichung abgeleiteten Integralen zusammensetzt [177,178]. Im zweiten Verfahrensschritt werden die LCAO-MO-Koeffizienten der besetzten Molekülorbitale mittels Standardmethoden der Matrixdiagonalisierung berechnet [177,178]. Da der Wert der Hamilton-Matrix von diesen Koeffizienten abhängig ist, werden die beiden beschriebenen, einen sog. SCF-Zyklus bildenden Kalkulationsschritte solange wiederholt, bis sich die Werte der Matrix und die der Koeffizienten innerhalb zweier aufeinander folgender Iterationen nur noch innerhalb vorher festgelegter Grenzen, die auch als Konvergenzkriterien bezeichnet werden, ändern [49,177,178].

Basierend auf der Anzahl der Elektronen, die in die Berechnungen der Molekülenergien und -eigenschaften jeweils mit einbezogen werden, unterscheidet man in der Quantenmechanik zwischen den sog. *ab initio*- (lat.: „von Grund auf“ [27,49,78]) und den semiempirischen Verfahren [25,49,78,176].

Bei den *ab initio*-Simulationen werden alle Elektronen einer molekularen Struktur berücksichtigt [78], weshalb derartige Kalkulationsverfahren sehr recheninten-

siv und folglich sehr zeitaufwendig sind [24,25,78,178,181]. Die verschiedenen *ab initio*-Methoden, die für die Durchführung von Molecular Modelling-Studien zur Verfügung stehen, divergieren in der Anzahl und der mathematischen Formulierung der Basisfunktionen, die zur Beschreibung der in die *Roothaan-Hall*-Gleichung ( $\rightarrow$  LCAO-Theorie [25,49,176]) einfließenden Atomorbitale eingesetzt werden [24,178,181]. Oftmals werden die kernnahen Orbitale nur durch jeweils eine Basisfunktion repräsentiert, während man zur Charakterisierung der Valenzorbitale gewöhnlich mehrere Basisfunktionen verwendet, um den inneren und den äußeren Orbitalbereich getrennt berechnen zu können ( $\rightarrow$  *Split Valence*-Basissatz) [24,27,178,181]. Da die für die Kalkulationen benötigte Rechenzeit in Abhängigkeit von der Zahl der verwendeten Basisfunktionen mit der vierten bis fünften Potenz zunimmt [25,78], können die am weitesten entwickelten *ab initio*-Verfahren lediglich für die Ermittlung der Eigenschaften kleiner Moleküle, die nur 20-50 Schweratome umfassen, eingesetzt werden [181].

In Anbetracht der erheblichen Computerkapazitäten, die für die Durchführung von *ab initio*-Simulationen erforderlich sind, besitzen semiempirische Methoden eine größere praktische Bedeutung [49]. Bei diesen Verfahren werden nur die Valenzelektronen unter Verwendung des *Hartree-Fock-Roothaan-Hall*-Formalismus berechnet, während die anderen Elektronen als dem Kern zugehörig betrachtet werden [24,25,27,49,78,176,178,181]. Die verschiedenen semiempirischen Methoden, die bislang entwickelt wurden, unterscheiden sich unter anderem darin, wie die Elektron-Elektron-Interaktionen behandelt werden [178], d. h., welche Integrale des elektronischen Hamilton-Operators  $\hat{H}_{\text{elec}}$  bei den Kalkulationen vernachlässigt und welche durch Näherungen, die darüber hinaus in ihrer mathematischen Formulierung divergieren können, ersetzt werden (Kapitel 4.1.2.1, Seite 96 ff.) [24,25]. Die Ungenauigkeiten, die aus den Approximationen und Simplifikationen resultieren, werden durch den Einsatz von Parametern, die entweder empirisch ermittelt wurden oder aus *ab initio*-Rechnungen stammen, kompensiert [24,49,78,176,178,181]. Da die zur Ergebniskorrektur jeweils verwendete Parametrisierung von Verfahren zu Verfahren variieren kann, trägt sie ebenfalls dazu bei, die vorhanden semiempirischen Rechenmethoden voneinander abzugrenzen [25,178]. Im Gegensatz zu den *ab initio*-Kalkulationen steigt der für die semiempirischen Simulationen erforderliche Rechenaufwand – in Abhängigkeit von der Zahl der Basisfunktionen  $n$  – lediglich mit  $n^3$  an [25], so dass diese Verfahren auch zur Charakterisierung größerer Moleküle, die aus bis zu 200 Schweratomen aufgebaut sind, herangezogen werden können [24,49,181,182].

Der Einsatz quantenmechanischer Methoden ermöglicht die *in silico*-Berechnung von molaren Bildungsenthalpien, von molekularen elektrostatischen Potentialen (MEPs) von Orbitalenergien, von Dipolmomenten und von weiteren, auf der Elektronenverteilung basierenden Moleküleigenschaften [23,25,27,49,181].

Das MEP dient der Visualisierung der Ladungsverteilung in einem Molekül [24,25,27]. Es wird unter Berücksichtigung der Elektronendichteverteilung und der Kernladungen als Interaktionspotential zwischen einem als Sonde fungierenden Carbokation und dem zu untersuchenden Molekül berechnet [24,25,27].

#### 4.1.2.1 AM1

Die semiempirische Rechenmethode AM1 (*Austin Model 1*) wurde 1985 von *Dewar, Stewart et. al.* auf der Grundlage des zuvor etablierten MNDO-Verfahrens [183] (*Modified Neglect of Differential Overlap*) entwickelt [49,78,178,184,185]. Diese MNDO-Methode [183], die wie das AM1-Verfahren [184,185] auf dem *Hartree-Fock-Roothan-Hall-Formalismus* basiert [25,178,182], unterscheidet sich von der 1965 von *Pople et. al.* als erster Vertreter der NDO-Verfahren entwickelten CNDO-Methode [186-189] (*Complete Neglect of Differential Overlap*) darin, dass bei den MNDO-Simulationen [183] alle Terme, die die Interaktionen zwischen einem Elektron und zwei Atomkernen beschreiben, voll berechnet und nicht durch Atompaarparameter angenähert werden [50,178,181]. Alle übrigen Terme, die sich mit der Überlappung zweier zu unterschiedlichen Atomen gehörenden Orbitale befassen, werden dagegen auch bei dem MNDO-Verfahren [183] – in Analogie zu der CNDO-Methode [186-189] – gleich „Null“ gesetzt [182].

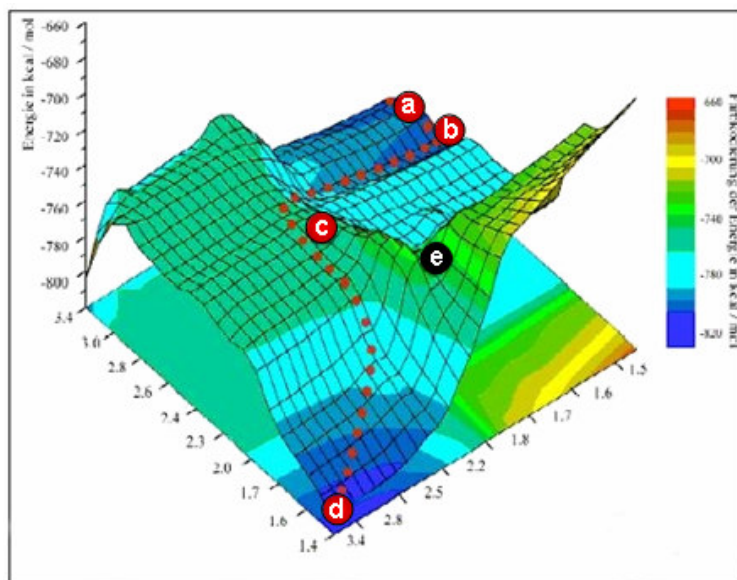
Bei der AM1-Methode [184,185], die als Weiterentwicklung des beschriebenen MNDO-Verfahrens [183] anzusehen ist, wurden die bei den MNDO-Simulationen [183] häufig überbewerteten Abstoßungen zwischen den positiv geladenen Atomkernen durch die Einführung eines erweiterten Kern-Kern-Abstoßungsintegrals korrigiert [25,27,49,178,182]. Dies hat zum einen eine Verbesserung der Korrelation der *in silico* berechneten molaren Bildungsenthalpien und Aktivierungsenergien mit den experimentell ermittelten Daten zur Folge [49,78,178]. Zum anderen erlaubt die im Vergleich zu der MNDO-Methode [183] überarbeitete Parametrisierung des AM1-Verfahrens [184,185] nun die Berücksichtigung von Wasserstoffbrückenbindungen [49,78,178]. Bei der AM1-



Methode <sup>[184,185]</sup> werden die Valenzorbitale jedes Atoms durch einen, im Vergleich zu den *ab initio*-Verfahren reduzierten Basissatz, der sich aus einer Basisfunktion für das s-Orbital und aus drei Basisfunktionen für das p-Orbital (jeweils eine für das p<sub>x</sub>-, das p<sub>y</sub>- und das p<sub>z</sub>-Orbital) zusammensetzt, repräsentiert <sup>[182]</sup>. Die AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> und das ebenfalls von *Stewart* entwickelte PM3-Verfahren <sup>[190]</sup> (*Parametric Method Number 3*) unterscheiden sich ausschließlich in ihrer Parametrisierung <sup>[25,49,177,178]</sup>, wobei die PM3-Methode <sup>[190]</sup> auch für die Untersuchung von Molekülen eingesetzt werden kann, die Elemente der zweiten Reihe des Periodensystems enthalten <sup>[49,178]</sup>. Zur Berechnung der Energien und Eigenschaften molekularer Systeme nutzen alle NDO-Methoden (CNDO <sup>[186-189]</sup>, MNDO <sup>[183]</sup>, AM1 <sup>[184,185]</sup>, PM3 <sup>[190]</sup>) das bereits in Kapitel 4.1.2 (Seite 94) beschriebene, iterative SCF-Verfahren <sup>[177,182]</sup>.

### 4.1.3 Geometrieoptimierung

Das Ziel einer Geometrieoptimierung ist es, eine vorhandene, energiereiche Konformation der zu untersuchenden molekularen Struktur dahingehend zu verändern, dass die Geometrie (→ wird durch interne, die Bindungslängen und -winkel widerspiegelnde Koordinaten beschrieben), die das Molekül nach der Beendigung der Simulation aufweist, einer Minimumskonformation entspricht <sup>[78,178]</sup>. Dies bedeutet, dass die Energiehyperfläche, die die Beziehung zwischen der potentiellen Energie und der Molekülgeometrie für alle theoretisch existierenden Konformationen des betrachteten molekularen Systems beschreibt <sup>[24]</sup>, ausgehend von einem Startpunkt P, nach einem Punkt P' abgesehen wird, an dem jede weitere Modifikation der Molekülkonformation einen erneuten Anstieg der potentiellen Energie zur Folge hat <sup>[178,182]</sup> (Abb. 4.1, Seite 98). Da keine Energiebarrieren überwunden werden können <sup>[178]</sup>, handelt es sich bei dem Minimumskonformer, welches aus einer Geometrieoptimierungssimulation resultiert, meist nicht um das globale Minimum, sondern nur um eines von mehreren lokalen Minima, die sich aus der Energiefunktion des bearbeiteten molekularen Systems ableiten lassen <sup>[24,78,177,178]</sup>.



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung einer Konformationsenergiehyperfläche: Ausgehend von der Startkonformation (a) erreicht man mit Hilfe eines Geometrieoptimierungsalgorithmus lediglich das nächstgelegene Minimum (b); die energetisch günstigere Konformation (d) kann dagegen nur im Rahmen einer Moleküldynamik-Studie (Kapitel 4.1.4.1, Seite 101 ff.) aufgefunden werden, da dieses Verfahren die Überwindung der Potentialbarriere (c) ermöglicht [Punkt (e): Übersichtspunkt]

Die verschiedenen, für die Durchführung einer Geometrieoptimierung zur Verfügung stehenden Algorithmen werden im Hinblick darauf, ob sie bei der Suche nach einer Minimumskonformation nur die molekularen Energiefunktionen oder auch deren Ableitungen berücksichtigen, in Such-, Gradienten- und *Newton-Raphson*-Verfahren eingeteilt [24,25,27,49,78]. Die Wahl der Optimierungsmethode, welcher man sich zur Bearbeitung einer konkreten Problemstellung bedienen sollte, richtet sich danach, wie weit die Startgeometrie des zu optimierenden Moleküls von dem nächstgelegenen Minimum entfernt ist, sowie nach der Flexibilität und der Größe des molekularen Systems [24,25,27].

Im Gegensatz zu den Suchmethoden setzen die Gradientenverfahren nicht nur die Potentialfunktionen, sondern auch die mit Bezug auf die Raumkoordinaten gebildeten ersten Ableitungen dazu ein, die Startgeometrien der zu untersuchenden Moleküle zu optimieren [25,27,49,78,177]. Die erste Ableitung der molekularen Energiefunktion, die auch als Gradient bezeichnet wird, gibt an jedem betrachteten Punkt der Energiehyperfläche die Steilheit des dort vorliegenden Potentialgefälles wieder [27,178] und nimmt bei Erreichen eines Minimums den Wert „Null“ an [25,27,78,177,178]. Die Gradientenberechnungen liefern demzufolge Informationen über das Aussehen der Poten-

tialoberfläche, welche die Suche nach der nächstgelegenen Minimumskonformation vereinfachen und somit beschleunigen <sup>[27]</sup>. Eine mit einem Gradientenverfahren durchgeführte Geometrieoptimierungssimulation wird gewöhnlich dann beendet, wenn der Gradient einen vorher festgelegten Wert, der meist zwischen 0,1 und  $10^{-3}$  kcal/mol liegt, unterschritten hat oder wenn die maximale Anzahl an Rechenzyklen (= Anzahl der Suchrichtungen) erreicht wird <sup>[177,178]</sup>. Im Gegensatz zu den einfachen Gradientenmethoden, zu denen beispielsweise der *Steepest Descent*-Algorithmus gehört, verwenden die konjugierten Gradientenverfahren nicht nur die zuletzt berechnete erste Ableitung, sondern auch all diejenigen Gradienten, die bereits in den vorangegangenen Zyklen ermittelt wurden, um die Richtung, in der auf der Energiehyperfläche als nächstes nach einer Minimumskonformation gesucht werden soll, zu bestimmen <sup>[24,49,177,178]</sup>. Aus diesem Grund benötigen diese Algorithmen eine im Vergleich zu den Suchmethoden und den einfachen Gradientenverfahren reduzierte Anzahl an Rechenschritten, um ein Energieminimum zu erreichen <sup>[24,25,49]</sup>. Nachteilig ist jedoch, dass die Berechnung und die Speicherung der Gradienten beträchtliche Computerkapazitäten erforderlich machen <sup>[24,25]</sup>. Die konjugierten Gradientenmethoden, zu denen das *Fletcher-Reeves*-Verfahren und der *Polak-Ribiere*-Algorithmus zählen <sup>[25,27,177,178,191,192]</sup>, werden meist für die Optimierung von Molekülgeometrien, die sich bereits in der Nähe eines Minimums befinden, eingesetzt <sup>[24,25,178]</sup>.

Bei dem *Newton-Raphson*-Verfahren handelt es sich um einen sehr präzisen Optimierungsalgorithmus, bei dem neben den molekularen Energiefunktionen und den Gradienten auch die zweiten Ableitungen berechnet und bei der Suche nach einer Minimumskonformation berücksichtigt werden <sup>[24,25,27,49,177,178]</sup>. Die zweite Ableitung spiegelt die Krümmung der Potentialfunktion an jeder betrachteten Position der Energiehyperfläche wider <sup>[27,177,178]</sup> und nimmt an einem Minimum einen positiven Wert an <sup>[27,78]</sup>. Das *Newton-Raphson*-Verfahren benötigt eine im Vergleich zu den konjugierten Gradientenmethoden geringere Anzahl an Suchschritten, um ein Energieminimum zu erreichen <sup>[25,49]</sup>; allerdings nehmen die Simulationen, die mit diesem Algorithmus durchgeführt werden, auch beträchtliche Computer- und Speicherkapazitäten in Anspruch <sup>[24,25,49]</sup>. Infolgedessen wird das *Newton-Raphson*-Verfahren vor allem dazu eingesetzt, die Geometrien kleinerer, nur etwa 100 Atome umfassender Moleküle zu optimieren, wobei die Startkonformationen der zu untersuchenden molekularen Systeme auf der Energiehyperfläche bereits in der Nähe eines Minimums liegen sollten <sup>[24,25,27]</sup>.

#### 4.1.4 Konformeranalyse

Da die in Kapitel 4.1.3 (Seite 97 ff.) beschriebenen Verfahren zur Geometrieoptimierung keine Potentialbarrieren überwinden können <sup>[178]</sup>, finden diese Methoden nur das Minimumskonformer, das auf der Energiehyperfläche des zu untersuchenden Moleküls der Startgeometrie am nächsten liegt <sup>[24,78,177,178]</sup> (Abb. 4.1, Seite 98). Um die Konformerensuche nun auf alle relevanten Bereiche der Potentialoberfläche ausdehnen zu können, wurden verschiedene Algorithmen, die zusammenfassend als Konformeranalysemethoden bezeichnet werden, entwickelt <sup>[27,49,177]</sup>. Neben der Moleküldynamik-Methode <sup>[193]</sup> und dem Monte Carlo-Algorithmus, die in den Kapiteln 4.1.4.1 (Seite 101 ff.) bzw. 4.1.4.2 (Seite 104 ff.) jeweils genauere Erwähnung finden, kann auch das im Folgenden kurz erläuterte Verfahren der „systematischen Suche“ für die Durchführung einer Konformeranalyse verwendet werden <sup>[24,25,27,178]</sup>.

Bei der „systematischen Suche“ wird der gesamte Konformationsfreiraum einer molekularen Struktur systematisch nach allen existenten Minima abgesucht, indem die Torsionswinkel des Moleküls methodisch in definierten Schritten variiert und die Energien der auf diese Weise erzeugten Konformationen mit einem molekülmechanischen (Kapitel 4.1.1, Seite 89 ff.) oder quantenmechanischen (Kapitel 4.1.2, Seite 92 ff.) Rechenverfahren ermittelt werden <sup>[24,25,27,49,78,194]</sup>. Dem Vorteil der Vollständigkeit der gefundenen Minimumskonformere steht jedoch der Nachteil gegenüber, dass dieser Algorithmus eine große Anzahl an Molekülkonformationen generiert <sup>[24,25,27]</sup>: Die Anzahl der zu untersuchenden Konformere  $N$  steigt exponentiell mit der Zahl der Torsionswinkel  $n$  an und ist zudem von dem Winkelinkrement „ $360/X$ “, welches die Schrittgröße der Torsionswinkeldrehung angibt, abhängig <sup>[24,25,27,49,78]</sup> [Gleichung (8)].

$$(8) \quad N = \left( \frac{360}{X} \right)^n$$

Aus diesem Grund kann das Verfahren der „systematischen Suche“ lediglich zur Erforschung des Konformationsfreiraums kleiner, flexibler Moleküle, die nur wenige Freiheitsgrade aufweisen, eingesetzt werden <sup>[78,179]</sup>.

#### 4.1.4.1 Moleküldynamik

Bei einer Moleküldynamik-Studie <sup>[193]</sup> (MD-Studie) wird die zeitabhängige Änderung der Molekülgeometrie untersucht <sup>[49]</sup>, indem die Wärmebewegung molekularer Strukturen bei vorgegebenen Werten für Temperatur und Druck über einen definierten, im Picosekundenbereich liegenden Zeitabschnitt simuliert wird <sup>[25,78,177,178,194]</sup>. Auf diese Weise wird die Energiehyperfläche eines Moleküls kontinuierlich abgefahren, wobei die im System enthaltene kinetische Energie die Überwindung von Potentialbarrieren und somit das Auffinden neuer Konformationsfamilien ermöglicht <sup>[78]</sup> (Abb. 4.1, Seite 98).

Den Moleküldynamik-Simulationen <sup>[193]</sup> liegt die Beobachtung zugrunde, dass sich die Atome einer molekularen Struktur bei Raumtemperatur permanent bewegen <sup>[24]</sup>, so dass das Molekül über eine Folge reversibler Geometrieänderungen zu einer Gleichgewichtskonformation finden kann <sup>[49,78,176]</sup>. Diese thermisch induzierten Atombewegungen werden *in silico* imitiert, indem dem zu untersuchenden Molekülsystem durch die Festlegung einer Temperatur, bei der die Konformeranalyse durchgeführt werden soll, kinetische Energie zugeführt wird <sup>[49,176]</sup>. Auf der Grundlage der zuvor definierten, frei wählbaren Simulationstemperatur wird jedem Atom des betrachteten Moleküls zu Beginn einer Moleküldynamik-Studie per Zufallsgenerator eine plausible Anfangsgeschwindigkeit zugesprochen, wobei diese randomisierte Zuordnung einer Gauss-Verteilung folgt <sup>[24,25,27,49,178]</sup>.

Ausgehend von der Startgeschwindigkeit  $v_i(t_0)$  und dem zu dem Zeitpunkt  $t_0$  ebenfalls bekannten Aufenthaltsort der Atome  $r_i(t_0)$  werden die nach Ablauf eines definierten Zeitabschnitts  $\Delta t$  (entspricht dem Simulationszeitpunkt  $t_0 + \Delta t$ ) vorliegenden Atomkoordinaten, -geschwindigkeiten und -beschleunigungen ermittelt <sup>[24,25,49,78,178]</sup>. Bei diesen Berechnungen werden zudem auch die Richtungen der an den Atomen angreifenden Kräfte und die Atommassen berücksichtigt <sup>[24,25,49,78,178]</sup>.

Im ersten Kalkulationsschritt wird die auf jedes Atom  $i$  einwirkende Kraft  $F_i(t_0)$  als Funktion der Zeit berechnet, wofür die erste Ableitung der Energiefunktion des Moleküls, sowie die Position des betrachteten Atoms im kartesischen Koordinatensystem herangezogen werden <sup>[24,178,193,194]</sup> [Gleichung (9), Seite 102].

$$(9) \quad F_i = - \frac{\partial V}{\partial r_i}$$

- $F_i$ : Kraft, die auf ein Atom zu einem bestimmten Zeitpunkt einwirkt  
 $V$ : Funktion der potentiellen Energie des Moleküls  
 $\partial V$ : Gradient (erste Ableitung der Energiefunktion des Moleküls)  
 $r_i$ : Aufenthaltsort des Atoms  $i$

Daraufhin wird das 2. *Newtonsche* Gesetz ( $\rightarrow$  klassische *Newtonsche* Bewegungsgleichung) gleichzeitig auf alle Atome des Moleküls angewandt, um die Beschleunigung, die jedes Atom erfährt, zu ermitteln <sup>[24,25,27,49,78,176,178,193,194]</sup> [Gleichung (10)]. Dieses Gesetz der klassischen Mechanik kann zur Beschreibung der atomaren Wärmebewegungen angewendet werden, da die Atome bei den Moleküldynamik-Simulationen <sup>[193]</sup> – in Analogie zu den Kraftfeldrechnungen (Kapitel 4.1.1, Seite 89 ff.) – mit Massepunkten gleichgesetzt werden <sup>[49,178,193]</sup>.

$$(10) \quad a_i = \frac{F_i}{m_i}$$

- $a_i$ : Beschleunigung des Atoms  $i$   
 $F_i$ : Kraft, die auf ein Atom zu einem bestimmten Zeitpunkt einwirkt  
 $m_i$ : Masse des Atoms  $i$

Mit Hilfe der auf die Zeit  $t$  bezogenen Ableitung der Beschleunigung  $a_i(t_0)$ , lässt sich die zu dem Zeitpunkt  $t_0 + \Delta t$  vorliegende Geschwindigkeit  $v_i(t_0 + \Delta t)$  berechnen. Des Weiteren wird für jedes Atom  $i$  der neue Aufenthaltsort  $r_i(t_0 + \Delta t)$  ermittelt, indem die erste Ableitung der Geschwindigkeit  $v_i(t_0)$  nach der Zeit gebildet wird <sup>[178,193]</sup>. Nach dem Abschluss dieser Berechnungen nehmen die Atome ihre neuen Positionen im Koordinatensystem ein, wodurch eine neue Molekülgeometrie generiert wird <sup>[24,27]</sup>. Mit der Berechnung der Kräfte, die auf die Atome des aus dem vorhergehenden Simulationsschritt stammenden Konformers einwirken, beginnt – bis zum Erreichen des Endpunkts der Moleküldynamik-Studie – nach Ablauf jedes weiteren Zeitabschnitts  $\Delta t$  ein neuer Rechenzyklus [Gleichung (9)] <sup>[24,27]</sup>. Auf diese Weise werden bei den MD-Simulationen Trajektorien, d. h. Aufzeichnungen der als Funktion der Zeit

betrachteten Geometrieänderungen des Moleküls, generiert <sup>[27,49,78,178,193]</sup> (Abb. 5.7, Seite 131; Abb. 5.10, Seite 144).

Da das Zeitintervall  $\Delta t$ , nach dessen Ablauf die Atomkoordinaten, -geschwindigkeiten, -beschleunigungen und Kräfte jeweils neu berechnet werden, kleiner sein muss als die Schwingung höchster Frequenz ( $\rightarrow$  normalerweise sind dies die Streck-schwingungen der X–H-Bindungen), um die numerische Stabilität des Moleküls zu erhalten, beträgt  $\Delta t$  oftmals 0,5-1fs (1fs =  $10^{-15}$ s) <sup>[25,27,177,193,194]</sup>.

Neben den physikalischen Größen  $F_i$ ,  $a_i$ ,  $v_i$  und  $r_i$ , die auf die Atome der betrachteten molekularen Struktur bezogen sind, werden in jedem Rechenzyklus darüber hinaus auch die Beträge der im System jeweils vorliegenden Gesamtenergie  $E_{tot}$ , der kinetischen Energie  $E_{kin}$  und der potentiellen Energie  $E_{pot}$  unter Anwendung der im Folgenden aufgeführten Gleichung (11) ermittelt <sup>[178]</sup>:

$$(11) \quad E_{tot}(R) = \underbrace{\sum_i \frac{1}{2} m_i \left( \frac{dR_i}{dt} \right)^2}_{\text{kinetische Energie}} + \underbrace{E_{elec}(R) + \vartheta_{nn}(R,R)}_{\text{potentielle Energie}}$$

- $E_{tot}$ : Gesamtenergie, klassische totale Energie eines molekularen Systems
- $R$ : Vektor, der die Lage der Kerne mit den kartesischen Koordinaten X, Y und Z beschreibt
- $m_i$ : Masse des Atoms i
- $R_i$ : Position des Atoms i
- $v_i$  ( $dR_i/dt$ ): Geschwindigkeit des Atoms i
- $E_{elec}$ : Energie des Elektronensystems des Moleküls, die aus der Lösung der elektronischen *Schrödinger*-Gleichung resultiert
- $\vartheta_{nn}$ : potentielle Energie der Kern-Kern-Abstoßung

Oftmals wird die totale Energie  $E_{tot}$  in einer Moleküldynamik-Studie <sup>[193]</sup> konstant gehalten <sup>[178]</sup>, so dass die simulierten Geometriemodifikationen gegenläufige Änderungen der kinetischen und der potentiellen Energie des untersuchten Molekülsystems bewirken <sup>[25,49,178]</sup>: Das Absinken der potentiellen Energie  $E_{pot}$  in der Nähe eines Minimums ist mit einem Anstieg der kinetischen Energie  $E_{kin}$  verbunden, wobei die Energiewerte jeweils um den gleichen Betrag ab- bzw. zunehmen <sup>[178]</sup>. Aus diesem Grund bewegen sich die Atome einer molekularen Struktur an energiearmen Stellen der

Energiehyperfläche so schnell, dass das Molekül Potentialbarrieren überwinden und aus Energietälern herausfinden kann. Dies ermöglicht das Auffinden neuer Konformationsfamilien <sup>[24,49,176,178]</sup>.

Im Gegensatz zu der Methode der „systematischen Suche“ (Kapitel 4.1.4, Seite 100) kann das Moleküldynamik-Verfahren <sup>[193]</sup> auch dazu verwendet werden, den Konformationsfreierraum von Peptiden und mittelgroßen Molekülen nach Minimumskonformeren abzusuchen <sup>[178]</sup>. Als Negativpunkte der MD-Studien <sup>[193]</sup> sind jedoch die Fehlerfortpflanzung innerhalb einer Simulation, die schwer kontrollierbare Vollständigkeit der erhaltenen Minima und die Tatsache, dass für aussagekräftige Berechnungen ein erheblicher Zeitaufwand und somit eine beträchtliche Speicherkapazität der verwendeten Rechner erforderlich sind, aufzufassen <sup>[24,25,78]</sup>.

#### 4.1.4.2 Monte Carlo

Im Gegensatz zu den Moleküldynamik-Simulationen <sup>[193]</sup> (Kapitel 4.1.4.1, Seite 101 ff.), die sich zur Generierung neuer Molekülkonformationen der *Newtonschen* Bewegungsgleichung bedienen <sup>[24,25,27,49,78,176,178,193,194]</sup>, handelt es sich bei der Monte Carlo-Methode (MC-Methode) um ein stochastisches Konformeranalysen-Verfahren <sup>[24,178,193]</sup>, das nach den Grundprinzipien der Thermodynamik arbeitet <sup>[25]</sup>. Die MC-Methode hat den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe viele verschiedene Molekülarten untersucht werden können <sup>[24]</sup>; nachteilig sind jedoch die erheblichen Computerkapazitäten, die für die Durchführung einer Monte Carlo-Studie oftmals erforderlich sind <sup>[24]</sup>.

Im ersten Schritt einer MC-Simulation werden neue Konformationen einer molekularen Struktur erzeugt <sup>[27]</sup>, indem – in Abhängigkeit von dem verwendeten Monte Carlo-Algorithmus – entweder neue Koordinaten für akzidentell ausgewählte Atome generiert oder die im Molekül vorliegenden Torsionswinkel nach dem Zufallsprinzip variiert werden <sup>[24,25,27,193,194,195]</sup>. Dabei lassen sich die verschiedenen MC-Methoden nicht nur bezüglich der Art, sondern auch auf der Basis der Anzahl der pro Rechenzyklus vorgenommenen Molekülmodifikationen voneinander unterscheiden <sup>[24,27,178,193,195]</sup>. Unmittelbar nach der Simulation eines neuen Konformers wird dessen potentielle Energie  $E_{\text{pot}}$  unter Verwendung der Energiefunktion des untersuchten molekularen Systems bestimmt <sup>[25,194]</sup>. Besitzt das neu generierte Konformer eine nie-



drigere Energie als die Molekülstruktur, die die initiale Konformation des betrachteten Rechenzyklus darstellt, so wird die zufällig vorgenommene Geometrieänderung akzeptiert und die Atomkoordinaten der neuen Molekülkonformation werden für weiterführende Studien gespeichert <sup>[194]</sup>. Ist das untersuchte Konformer dagegen energiereicher als die Bezugskonformation, so wird mit Hilfe eines speziellen Kriterien-satzes, der von MC-Algorithmus zu MC-Algorithmus unterschiedlich ist <sup>[194,195,196]</sup>, über die Annahme oder den Ausschluss der vorliegenden Molekülgeometrie entschieden <sup>[25,27,193,195]</sup>.

Bis zum Erreichen des Endpunkts einer Monte Carlo-Studie, der durch die Anzahl der zu simulierenden Konformere definiert ist, beginnt jeder neue Rechenzyklus mit einer weiteren, dem Zufallsprinzip folgenden Geometrieänderung <sup>[25]</sup>. In Abhängigkeit von dem eingesetzten MC-Verfahren fungiert dabei entweder das zuletzt generierte Konformer, die Molekülgeometrie, die bislang am seltensten verwendet wurde, oder die aktuelle Minimumskonformation als Ausgangspunkt des nachfolgenden Simulationsschritts <sup>[25,193,195]</sup>.

Bei der *Metropolis Monte Carlo*-Methode (MMC-Methode) handelt es sich um das zurzeit bedeutendste MC-Verfahren <sup>[27]</sup>, das auch in den in dieser Arbeit verwendeten Molecular Modelling-Programmen SPARTAN <sup>[35]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> implementiert ist <sup>[177,178,197,198]</sup>. Zur Simulation eines Konformerensemble nutzt dieser Algorithmus ein Energiekriterium, welches sicherstellt, dass die erzeugten Molekülkonformationen mit einer ihrem *Boltzmann*-Faktor <sup>[24,27,193]</sup> [Gleichung (18)] entsprechenden Wahrscheinlichkeit auftreten <sup>[27,178,193,194]</sup>.

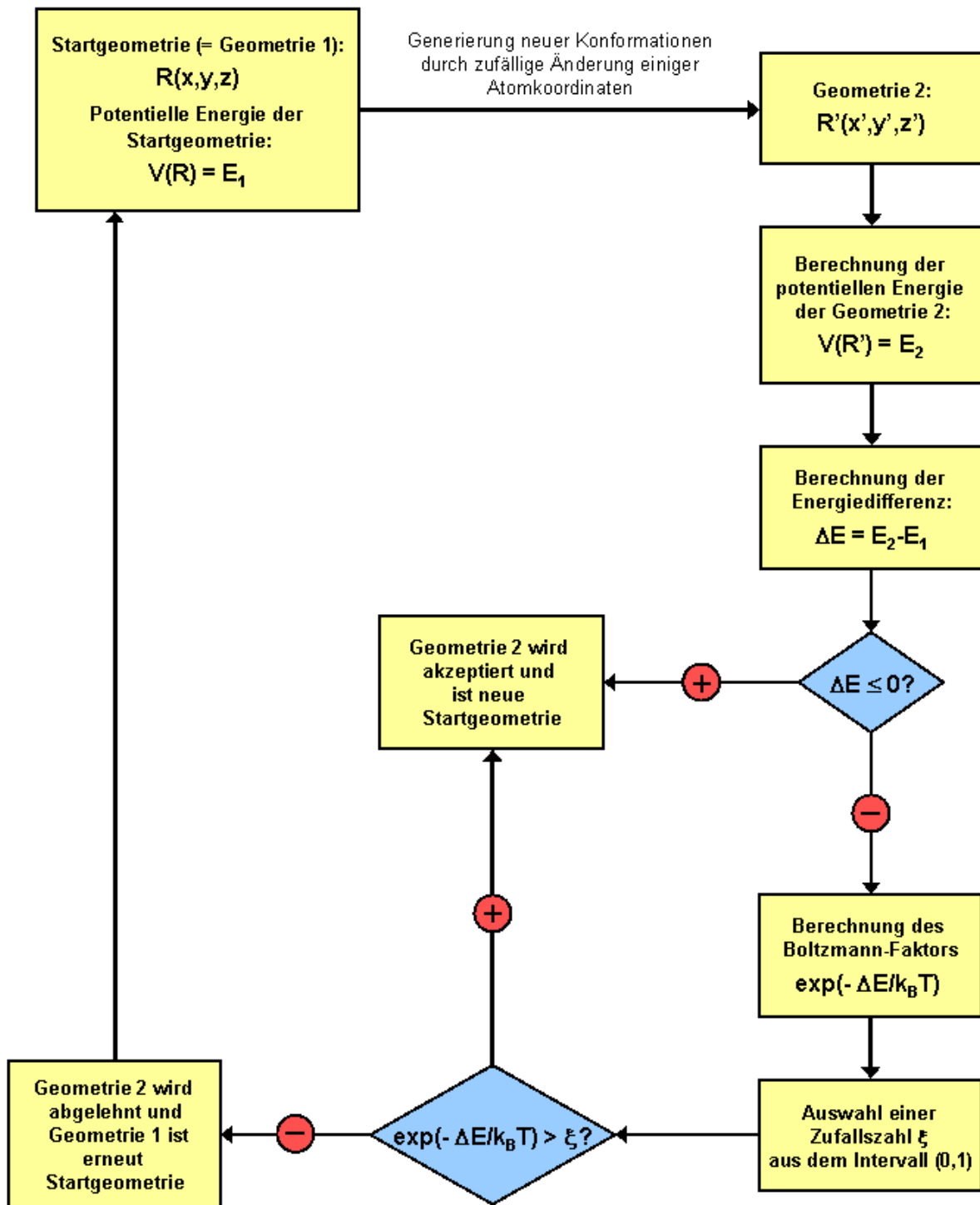
$$(12) \quad e^{-\left(\frac{V(r^n)}{k_B T}\right)}$$

- V(r<sup>n</sup>):      Energiefunktion des untersuchten molekularen Systems, gelöst für die Molekülgeometrie r<sup>n</sup>
- k<sub>B</sub>:          *Boltzmann*-Konstante
- T:             absolute Temperatur [K]

Jeder Rechenzyklus einer MMC-Studie beginnt damit, dass einige Atome der jeweils als Startkonformation dienenden Molekülgeometrie zufällig ausgewählt werden <sup>[27,178,196]</sup>. Anschließend wird jedes dieser Atome im kartesischen Koordinatensystem um einen akzidentellen Betrag in eine beliebige Richtung verschoben, um ein neues

Konformer zu generieren <sup>[27,178,196]</sup>. Dabei gibt der von dem Anwender anfänglich festgelegte Streckenabschnitt  $\Delta r$  an, wie weit ein Atom pro Zyklus maximal weiterbewegt werden darf <sup>[27,177,178]</sup>. Da sich die Länge dieser Distanz erheblich auf die Qualität der durchzuführenden Monte Carlo-Studie auswirkt, kommt der richtigen Wahl von  $\Delta r$  eine große Bedeutung zu <sup>[27,178]</sup>: Um gewährleisten zu können, dass bei einer Monte Carlo-Studie, die nahezu alle Bereiche des Konformationsfrei-raums einschließt, etwa 50% der nach dem Zufallsprinzip durchgeführten Atombewegungen zugelassen werden <sup>[27]</sup>, beträgt  $\Delta r$  üblicherweise zwischen 0,01 und 0,1 Å <sup>[177]</sup>.

Nachdem die zufällig ausgewählten Atome der initialen Konformation ihre neuen Positionen im Koordinatensystem eingenommen haben, wird die mit dieser Molekülmodifikation verbundene Änderung der Energie  $\Delta E$  berechnet, indem die potentielle Energie der Bezugskonformation von  $E_{\text{pot}}$  der soeben generierten molekularen Struktur subtrahiert wird <sup>[24,27,178,193,196]</sup> (Abb. 4.2, Seite 107). Nimmt die Energiedifferenz  $\Delta E$  einen Wert an, der negativ ist oder „Null“ beträgt, so wird das neue Konformer dem Konformerensemble hinzugefügt und somit für weiterführende Studien gespeichert <sup>[27,178,193,196]</sup>. Bei einem positiven  $\Delta E$ -Wert wird schließlich mit Hilfe des *Boltzmann*-Faktors [ $\rightarrow \exp(-\Delta E/k_B T)$ ] über die Annahme oder die Ablehnung der betrachteten Molekülgeometrie entschieden <sup>[27,193,196]</sup>. Ist der *Boltzmann*-Faktor größer als eine per Zufallsgenerator ausgewählte Zahl  $\xi$  aus einem gleichförmigen, die Zahlen von 0 bis 1 enthaltenden Intervall, so wird das neu generierte Konformer ebenfalls akzeptiert <sup>[27,178,193,194,196]</sup>. Es dient dann, ebenso wie eine Molekülgeometrie, die direkt – auf der Grundlage der potentiellen Energie – angenommen werden kann, als initiale Konformation des nachfolgenden Simulationsschritts <sup>[27,193,194]</sup>. Ist der *Boltzmann*-Faktor dagegen kleiner als die Zahl  $\xi$ , so wird die untersuchte Molekülmodifikation endgültig verworfen und die Bezugsgeometrie des betrachteten Rechenzyklus fungiert erneut als Ausgangspunkt für eine zufällig vorgenommene Änderung einiger Atomkoordinaten <sup>[27,193,194,196]</sup>. Die Einführung des *Boltzmann*-Faktors als zusätzliches, über die Akzeptanz oder die Ablehnung einer Konformation entscheidendes Energiekriterium hat eine Steigerung der Effizienz der zugrunde liegenden Monte Carlo-Methode zur Folge <sup>[27,178,193]</sup>: Mit Hilfe des *Metropolis* MC-Algorithmus werden vor allem energiearme Molekülgeometrien, die für die Charakterisierung des untersuchten molekularen Systems relevant sind, erzeugt <sup>[27,178,193]</sup>.



**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung der stochastischen Suchfunktion der *Metropolis Monte Carlo*-Methode <sup>[27,194,196]</sup>

Das Monte Carlo-Verfahren eignet sich insbesondere zur Simulation isolierter Moleküle, deren Minimumzustände durch hohe Energiebarrieren, die mit der Moleküldynamik-Methode <sup>[193]</sup> nicht überwunden werden können, voneinander getrennt sind <sup>[27]</sup>. Allerdings kann auch bei der Durchführung einer MC-Simulation nicht dafür garantiert werden, dass das generierte Konformerensemble alle existenten Minimumkonformationen des zu untersuchenden molekularen Systems enthält <sup>[24,25]</sup>.

## 4.2 Software (Molecular Modelling-Programmpakete)

### 4.2.1 SPARTAN

Die von der Firma *Wavefunction Inc.* (Irvine, CA) entwickelte Molecular Modelling-Software SPARTAN '04 (v 1.0.1 *for Windows*) <sup>[35]</sup> enthält viele verschiedene Module, die über eine graphische Benutzeroberfläche miteinander verknüpft sind <sup>[35,197]</sup>. Im Folgenden sind die wichtigsten der im Programmpaket enthaltenen Features aufgeführt <sup>[35,197]</sup>:

- Baukastensystem, bestehend aus dreidimensionalen *Templates* (u. a. Atome, funktionelle Gruppen, Ringsysteme, Aminosäuren, Nukleotide), zum Aufbau organischer, anorganischer und organometallischer Moleküle sowie zur Konstruktion von Polypeptiden und Polynukleotiden
- Untersuchung der Geometrien molekularer Strukturen mittels *Alignment*-Verfahren (→ graphischer Vergleich ähnlicher Verbindungen durch das Übereinanderlegen der Moleküle auf der Basis einiger, zuvor als Fixpunkte definierter Atome) und durch Messung der vorliegenden Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel
- Durchführung von Molecular Modelling-Studien unter Verwendung von Kraftfeldmethoden (SYBYL <sup>[199]</sup>, MMFF94 <sup>[200,201]</sup>), semiempirischen Algorithmen (MNDO <sup>[183]</sup>, MNDO/d <sup>[202]</sup>, AM1 <sup>[184,185]</sup>, PM3 <sup>[190]</sup>) und quantenmechanischen Rechenverfahren (*Hartree-Fock* <sup>[203]</sup>, *Density Functional* <sup>[203]</sup>, *Correlation Interaction* <sup>[203]</sup>)

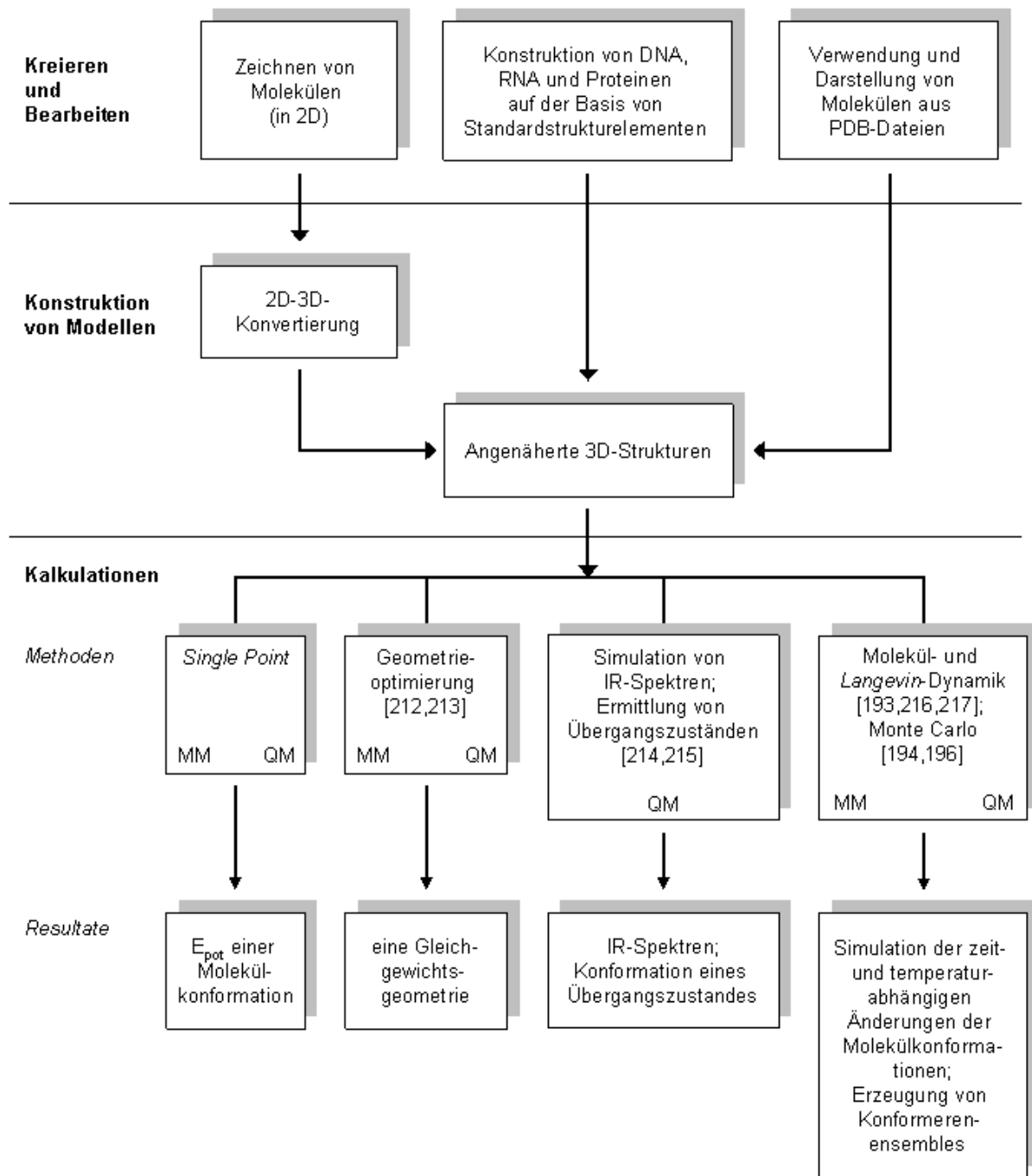
- Berechnung von Gleichgewichtsgeometrien (→ Erreichen des nächstgelegenen lokalen Minimums mittels Geometrieoptimierungsverfahren), Übergangszuständen und Konformerensembles (→ zu diesem Zweck stehen die Methode der „systematischen Suche“<sup>[198]</sup> und der *Metropolis Monte Carlo*-Algorithmus<sup>[194,196,198]</sup> zur Verfügung)
- Berechnung (und ggf. graphische Darstellung) einer Vielzahl von molekularen Eigenschaften, wie z. B. der Energieniveaus der verschiedenen Molekülorbitale, der Dipolmomente, der molaren Bildungsenthalpien, der Atomladungen, der Ladungsverteilungen, der Spindichten, der molekularen elektrostatischen Potentiale (Kapitel 4.1.2, Seite 96) und der lokalen Ionisierungspotentiale
- Simulation von IR-, <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR und UV/Vis-Spektren

Des Weiteren sei an dieser Stelle auf einige Publikationen verwiesen, die mit SPARTAN durchgeführte Molecular Modelling-Studien beschreiben<sup>[110,204-208]</sup>.

## 4.2.2 HYPERCHEM

Bei dem Programmpaket HYPERCHEM *release 7.5*<sup>[34]</sup> handelt es sich um eine von der Firma Hypercube Inc. (Gainesville, FL) für Windows-Betriebssysteme entwickelte Molecular Modelling-Software. Eine Übersicht über die wichtigsten der in HYPERCHEM<sup>[34]</sup> enthaltenen Module gibt das auf Seite 110 dargestellte Schaubild (Abb. 4.3)<sup>[34,177,178]</sup>.

*In silico*-Studien, die mit der Software HYPERCHEM durchgeführt wurden, sind Bestandteile einiger Publikationen, auf die an dieser Stelle hingewiesen werden soll<sup>[106,208-211]</sup>.



**MM:** Molekülmechanische Rechnungen mit den Kraftfeldmethoden MM2<sup>[218]</sup>, AMBER<sup>[179,180]</sup>, CHARMM<sup>[219,220]</sup> und OPLS<sup>[221,222]</sup>

**QM:** Semiempirische Simulationen mit den Algorithmen *Extended-Hückel*<sup>[223]</sup>, CNDO<sup>[187-189]</sup>, INDO<sup>[186]</sup>, MINDO/3<sup>[224-227]</sup>, MNDO<sup>[183]</sup>, MNDO/d<sup>[202]</sup>, AM1<sup>[184,185]</sup>, PM3<sup>[190]</sup>, ZINDO/1<sup>[228]</sup>, ZINDO/s<sup>[228]</sup>, TNDO<sup>[178,186-189]</sup> oder quantenmechanische *ab initio*-Kalkulationen<sup>[229-240]</sup>

**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der wichtigsten in dem Programmpaket HYPERCHEM<sup>[34]</sup> enthaltenen Module<sup>[177,178]</sup>

### 4.2.3 ICM-PRO

Bei dem von der Firma Molsoft L.L.C. (La Jolla, CA) entwickelten Programmpaket ICM-PRO (v 3.3-02a) <sup>[32]</sup> (ICM → *Internal Coordinate Mechanics*) handelt es sich um eine Molecular Modelling- und Docking-Software, die sowohl mit Linux- als auch mit Windows-Betriebssystemen kompatibel ist <sup>[32,241]</sup>. ICM-PRO <sup>[32]</sup> weist eine Vielzahl von Programmfeatures auf, von denen die wichtigsten im Folgenden aufgeführt sind <sup>[32,33,241]</sup>.

- Durchführung von Protein-Ligand-, DNA-Ligand- und Protein-Peptid-Docking-Studien
- Screening von Datenbanken, die mehrere Hundert Verbindungen umfassen können, zur Identifizierung von Leitstrukturen, die mit einem für die Arzneistoffentwicklung interessanten Target interagieren <sup>[242,243]</sup> (*Virtual Ligand Screening*)
- Simulation der dreidimensionalen Struktur eines Proteins auf der Basis seiner Aminosäuresequenz <sup>[244]</sup>
- Durchführung von *Homology Modelling*-Studien mit Polypeptiden und Proteinen <sup>[245,246]</sup>
- Optionen zur graphischen Darstellung und Animation von Molekülen und Rezeptor-Ligand-Komplexen

#### Details zu dem programmspezifischen Docking-Verfahren:

Bei ICM-PRO <sup>[32]</sup> wird das Biopolymer, welches als Docking-Rezeptor fungieren soll, durch ein dreidimensionales Gitternetz repräsentiert, wobei jedem Punkt dieses Gitters ein Interaktionspotential, das die energetischen Zustände, Polaritäten und räumlichen Zugänglichkeiten des Rezeptormoleküls widerspiegelt, zugeordnet ist <sup>[32,241,242]</sup>. Handelt es sich bei der einzusetzenden Docking-Matrize um ein Oligonucleotid, so wird obligat das sog. *Rigid Receptor Docking*-Verfahren angewandt <sup>[32,241]</sup>. Dies bedeutet, dass sich die Konformation des Rezeptors während einer Docking-Simulation nicht verändern kann, da die Matrize ein starres, unbewegliches Molekül

darstellt <sup>[32,33,241]</sup>. Dient dagegen ein Protein als Rezeptor, so bietet das Programm die Option, die die Ligandenbindestelle umgebenden Seitenketten zu kennzeichnen <sup>[32,33,241]</sup>. Diese sind dann bei der darauf folgenden Protein-Ligand-Komplexbildung flexibel, so dass sich der Rezeptor konformativ an das sich einlagernde Molekül anpassen kann <sup>[32,33,241]</sup>. Der Ligand selbst ist bei den mit ICM-PRO <sup>[32]</sup> durchgeführten Docking-Studien stets beweglich (*Flexible Ligand Docking*), wobei die drehbaren Bindungen des Moleküls vor Beginn der Simulation von der Software automatisch identifiziert werden <sup>[32,241]</sup>.

Bei der in ICM-PRO <sup>[32]</sup> implementierten Docking-Methode handelt es sich um ein kombiniertes Monte Carlo- und Geometrieoptimierungsverfahren (Kapitel 4.1.3, Seite 97 ff.; Kapitel 4.1.4.2, Seite 104 ff.), das zur Darstellung der Konformationen der vorliegenden Moleküle ein programminternes Koordinatensystem (enthält Parameter zur Beschreibung der Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel und dihedralen Phasenwinkel) verwendet <sup>[22,33,242,244,247]</sup>. Jeder Rechenzyklus einer Docking-Studie, die mit diesem, allgemein auch als *Monte Carlo Minimization*-Verfahren <sup>[33,244,248,249]</sup> (MCM-Verfahren) bezeichneten, Algorithmus durchgeführt wird, beginnt mit einer willkürlichen Modifikation der Struktur des zu untersuchenden molekularen Systems <sup>[22,33,244,247-249]</sup>. Da das Programm sowohl die *Pseudo-Brownian*- als auch die *Biased Probability Monte Carlo*-Methode enthält <sup>[22,32,33,241,244,247-249]</sup>, wird entweder die relative Lage des Liganden zum Rezeptor mittels *Pseudo-Brown*-Bewegungen (→ Translations- und Rotationsbewegungen des Gesamtmoleküls ohne Änderung der Molekülgeometrie) verändert <sup>[22,33,244,248]</sup>, oder es werden einige Torsionswinkel gemäß dem *Biased Probability* MC-Verfahren variiert, wobei auf diese Weise entweder die Konformation des Liganden oder die der eventuell vorliegenden, flexiblen Seitenketten des Rezeptors modifiziert wird <sup>[22,33,244,247,249]</sup>. Anschließend erfolgt die Energieminimierung des aus diesem Monte Carlo-Simulationsschritt resultierenden Rezeptor-Ligand-Komplexes, indem ein Geometrieoptimierungsverfahren mit einer konjugierten Gradientenmethode (→ lokale konjugierte Gradientenmethode nach *Powell* <sup>[250]</sup>; Kapitel 4.1.3, Seite 98 ff.) durchgeführt wird <sup>[22,33,244,247-249]</sup>. Während dieser Phase des Docking-Prozesses werden die Energien der fortlaufend generierten Komplex-Konformationen mit Hilfe der Kraftfeldmethode ECEPP/3 <sup>[251]</sup> ermittelt <sup>[33,244,249]</sup> (Kapitel 4.1.1, Seite 89 ff.). Bei diesen Berechnungen werden u. a. die auf Torsionswinkeldeformationen, van der Waals-Interaktionen und H-Brücken-Bindungen zurückzuführenden Partialenergien erfasst <sup>[33]</sup>.



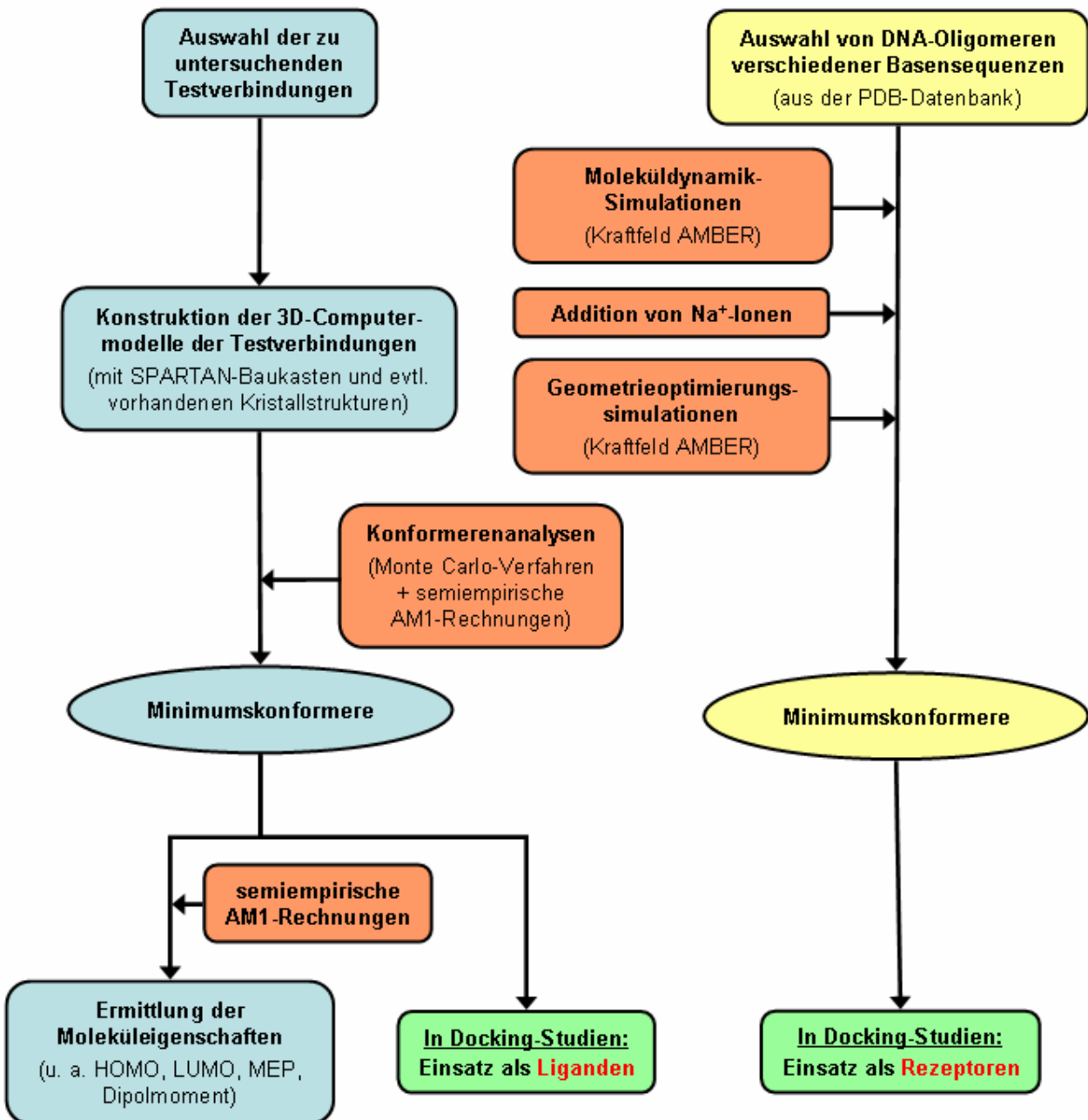
Die Bildungsenergie des nach der Geometrieoptimierung vorliegenden Komplexes wird ebenfalls mit ECEPP/3 <sup>[251]</sup> bestimmt, wobei die diesen Kalkulationen zugrunde liegende Kraftfeldgleichung nun zusätzliche Energieterme, z. B. Gleichungen zur approximativen Berechnung der intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen und der Solvatationseffekte, aufweist <sup>[33,247]</sup>. Diese Partialenergieterme werden bei den im Verlauf der Energieminimierung durchgeführten Kalkulationen nicht berücksichtigt, da sie sehr komplex und ihre Berechnungen folglich sehr zeitaufwändig sind <sup>[33]</sup>. Auf der Basis der Komplexbildungsenergien des aktuellen und des zuletzt akzeptierten Komplexes wird schließlich mit Hilfe des *Metropolis*-Kriteriums (→ *Boltzmann*-Faktor; Kapitel 4.1.4.2, Seite 105 ff.) über die Speicherung oder die Ablehnung des generierten Rezeptor-Ligand-Komplexes entschieden <sup>[33,244,247-249]</sup>.

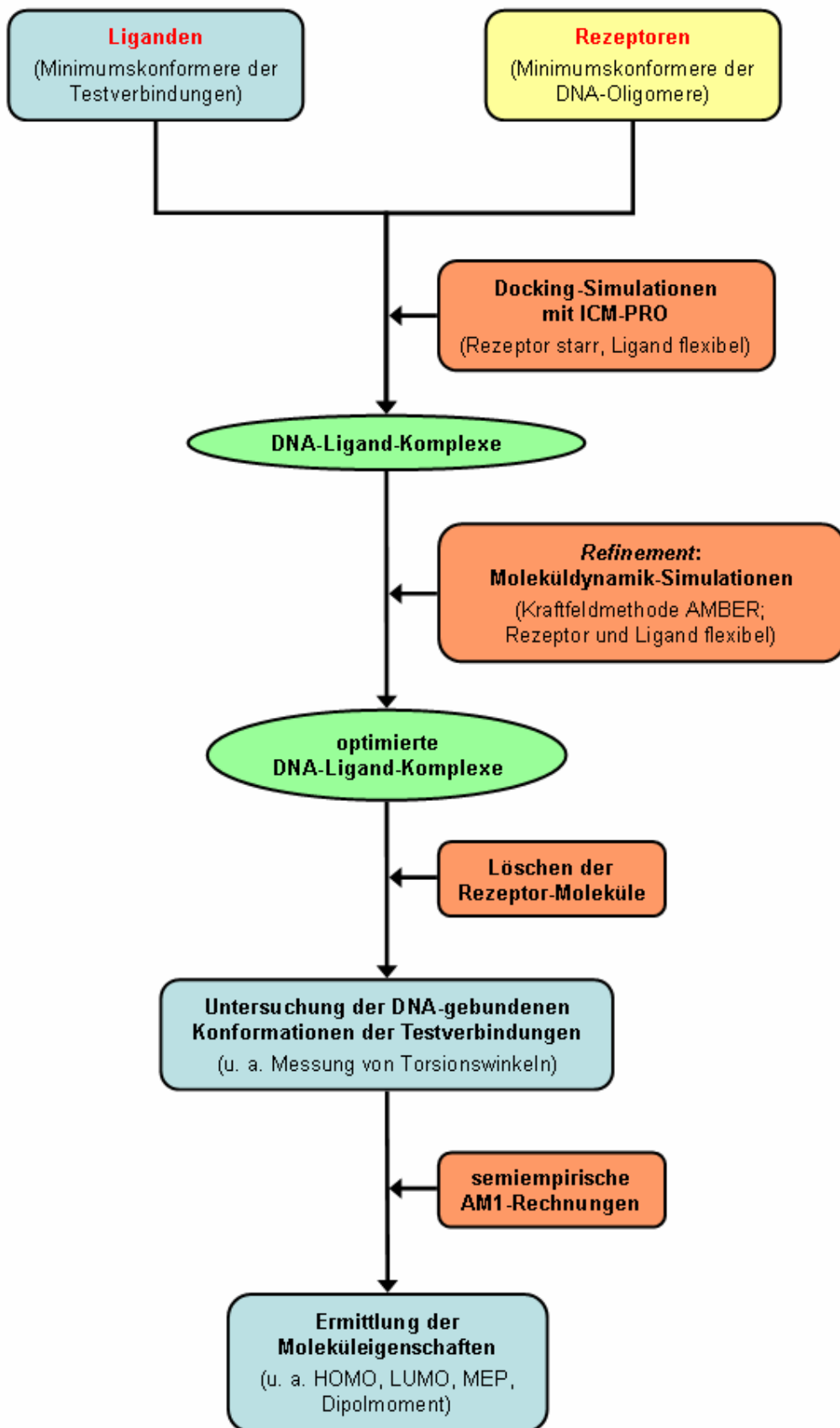
Bis zur Beendigung der Docking-Studie beginnt mit jeder weiteren, willkürlich erfolgenden Änderung der Struktur des untersuchten molekularen Systems, ein neuer Rechenzyklus <sup>[33]</sup>. Im Verlauf einer Simulation werden somit zahlreiche Komplex-Konformationen erzeugt, die im Anschluss an den Docking-Prozess in weiterführenden Studien genauer analysiert werden können <sup>[32,241]</sup>.

Abschließend sei noch auf einige Publikationen verwiesen, die Docking-Studien, die mit dem Programm ICM-PRO durchgeführt wurden, zum Inhalt haben <sup>[242,243,248,252-256]</sup>.

## 5. Molecular Modelling-Studien zu DNA-Liganden und DNA-Ligand-Interaktionen

### 5.1 Konzept zur Durchführung der Molecular Modelling-Studien (Fließdiagramm)

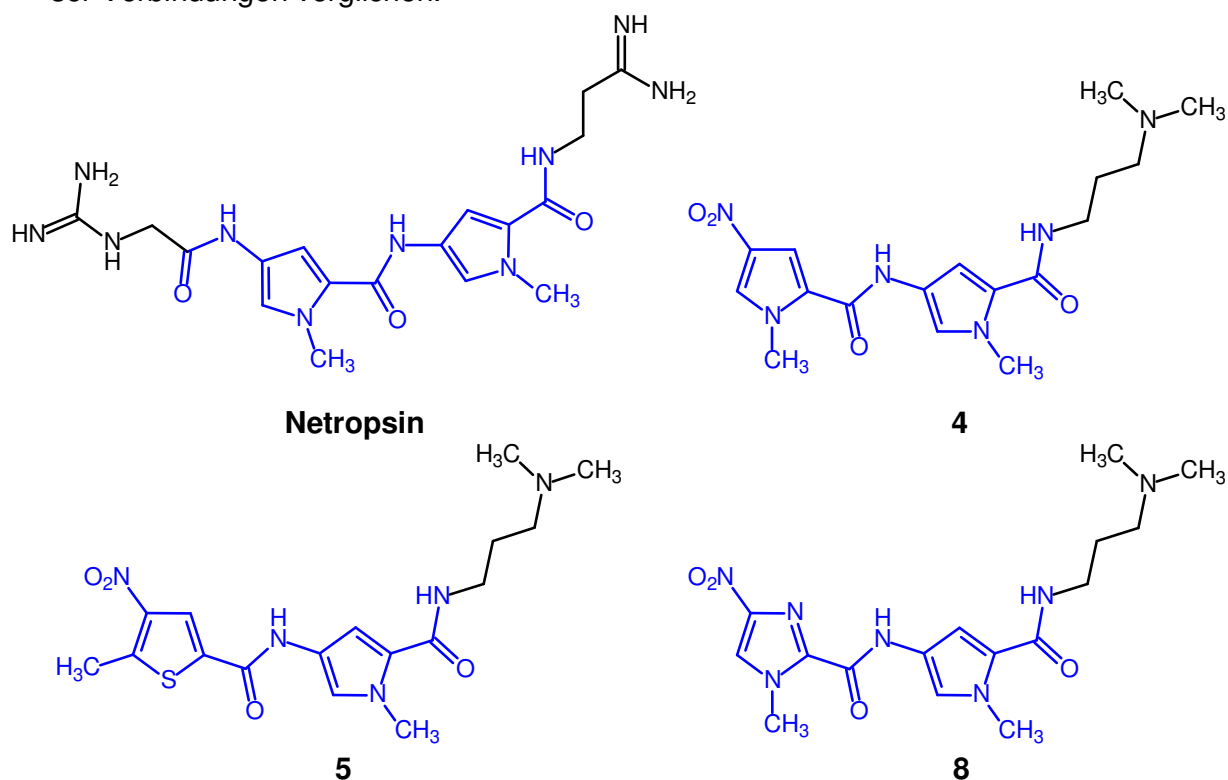




## 5.2 Berechnungen mit SPARTAN

### 5.2.1 Validierung des Programms unter Verwendung von Kristallstrukturen

Um sicherstellen zu können, dass das Molecular Modelling-Programm SPARTAN<sup>[35]</sup> (Kapitel 4.2.1, Seite 108 ff.) richtige und reproduzierbare Simulationen durchführt und somit für die Berechnungen der Minimumskonformere der zu untersuchenden DNA-Liganden geeignet ist, wurde zunächst eine Validierung des Programms vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Molekülkonformationen der Kristallstrukturen des Netropsins (aus der *Cambridge Structural Database*<sup>[257]</sup> stammend) und der bei der Synthese der Combilexine verwendeten Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **4**<sup>[258]</sup> (Bispyrrolcarboxamid), **5**<sup>[259]</sup> (Thiophen-pyrrolcarboxamid) und **8**<sup>[260]</sup> (Imidazol-pyrrolcarboxamid; Abb. 5.1) mit den mit SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Konformeren dieser Verbindungen verglichen.



**Abb. 5.1:** Strukturformeln der zur Validierung verwendeten Verbindungen

(bei den RMSD-Rechnungen, die zum Vergleich der Molekülkonformationen der Kristallstrukturen mit den mit SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Konformeren durchgeführt wurden, wurden zum einen die Gesamtmoleküle und zum anderen nur die hier blau gekennzeichneten Strukturen ohne aliphatische Seitenketten berücksichtigt; Tab. 5.1, Seite 121)

### Bearbeitung der Kristallstrukturen:

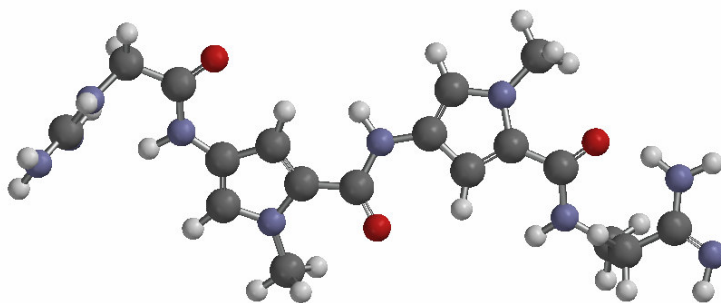
Bei den Molekülen der für die Validierung verwendeten Kristallstrukturen wurde zunächst überprüft, ob die jeweils vorhandenen Doppelbindungen in der richtigen Anzahl und an den richtigen Molekül-Positionen vorlagen, wobei – falls erforderlich – manuelle Korrekturen der Atom-Hybridisierungen vorgenommen wurden. Anschließend erfolgte die Relaxierung der zwischen den Wasserstoff- und den Schweratomen (→ alle Elemente außer Wasserstoff) bestehenden Bindungen, die bei Kristallstrukturen generell zu kurz und folglich sehr energiereich sind <sup>[24,197]</sup>.

Dieses Charakteristikum von Kristallstrukturen ist auf das der Röntgenstrukturanalyse zugrunde liegende Messprinzip zurückzuführen <sup>[24,197]</sup>: Die Röntgenstrahlen, die auf ein zu untersuchendes Kristall treffen, werden von den die Atomkerne umgebenden Elektronenwolken abgelenkt, wobei das Ausmaß der Beugung von der Anzahl der in den Hüllen der verschiedenen Elemente jeweils vorliegenden Elektronen abhängig ist <sup>[20,24]</sup>. Um die relativen Positionen der Schweratome im Kristall ermitteln zu können, werden die von diesen Atomen erzeugten Beugungsmuster mit Hilfe der Fouriertransformation ausgewertet <sup>[20,24]</sup>. Die Ablenkung der Röntgenstrahlen, die von dem einzigen Elektron eines Wasserstoffatoms hervorgerufen wird, ist nur schwach ausgeprägt, so dass die Lage der H-Atome oftmals nicht direkt aufgeklärt werden kann <sup>[20,24]</sup>. Üblicherweise werden die fehlenden Wasserstoffatome auf der Grundlage der vorliegenden Hybridisierung der Schweratome, deren Standardbindungszahlen und Standardbindungswinkel mittels Differenz-Fourier-Analyse automatisch addiert <sup>[20,24]</sup>.

Die X–H-Bindungen der vorliegenden Kristallstrukturen wurden relaxiert, indem Simulationen zur Energieminimierung der Moleküle unter Verwendung der Kraftfeldmethode MMFF94 <sup>[200,201]</sup> durchgeführt wurden (SPARTAN-Befehl: „Minimize“ <sup>[35,197]</sup>). Da hierbei ausschließlich die Positionen der Wasserstoffatome verändert werden sollten, wurden alle Schweratome vor Beginn der Simulationen in ihrer relativen Lage zueinander fixiert (SPARTAN-Befehl: „Freeze“ <sup>[35,197]</sup>). Die resultierenden *in silico*-Modelle der Kristallstrukturen wurden zur Programm-Validierung mit den mit SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformeren der Verbindungen verglichen.

### Berechnung der Minimumskonformere:

Nach der Konstruktion der dreidimensionalen Computermodelle des Rinnenbinders Netropsin und der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **4**, **5** und **8** (Abb. 5.1, Seite 116), die *de novo* unter Verwendung des in SPARTAN<sup>[35]</sup> enthaltenen Baukastensystems<sup>[197]</sup> erfolgte, wurden Minimumskonformere der Verbindungen simuliert. Bei der zu diesem Zweck eingesetzten Konformeranalyse handelt es sich um ein in SPARTAN<sup>[35]</sup> implementiertes Modul, das sich aus zwei verschiedenen Rechenoperationen zusammensetzt<sup>[198,261]</sup>: Die dreidimensionale Struktur der zu untersuchenden Moleküle wird mit einem Monte Carlo-Verfahren<sup>[194,196]</sup> (Kapitel 4.1.4.2, Seite 104 ff.) verändert, bevor die Energie der resultierenden Konformere mit einer vom Benutzer frei wählbaren Rechenmethode ermittelt wird<sup>[198]</sup>. Das von den Programmierern hierfür empfohlene Kraftfeld MMFF94<sup>[200,201,261]</sup> (Kapitel 4.1.1, Seite 89 ff.) konnte jedoch nicht für die Simulation der energiearmen *in silico*-Modelle der zu untersuchenden DNA-Liganden herangezogen werden: Das in Vorversuchen mit dieser Rechenmethode simulierte Minimumskonformer des Netropsins weist eine von der Kristallstruktur deutlich abweichende Stellung der Amidbindungen und der Heterozyklen auf (Abb. 5.2). Dieses Ergebnis ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Kraftfeld den Einfluss, den die zahlreichen Heteroatome des Rinnenbinders auf die Konformation eines Moleküls ausüben, nicht korrekt berücksichtigen kann<sup>[262]</sup>.



**Abb. 5.2:** Minimumskonformer des Netropsins, welches bei der mit der Kraftfeldmethode MMFF94<sup>[200,201]</sup> durchgeführten Konformeranalyse erhalten wurde

Eine quantenmechanische *ab initio*-Rechenmethode (Kapitel 4.1.2, Seite 92 ff.) konnte ebenfalls nicht verwendet werden, da die mit einer solchen Parametrisierung durchgeführten Konformeranalysen, aufgrund der Größe der zu untersuchenden Moleküle und der Vielzahl der geplanten Rechnungen, zu zeitintensiv und folglich zu

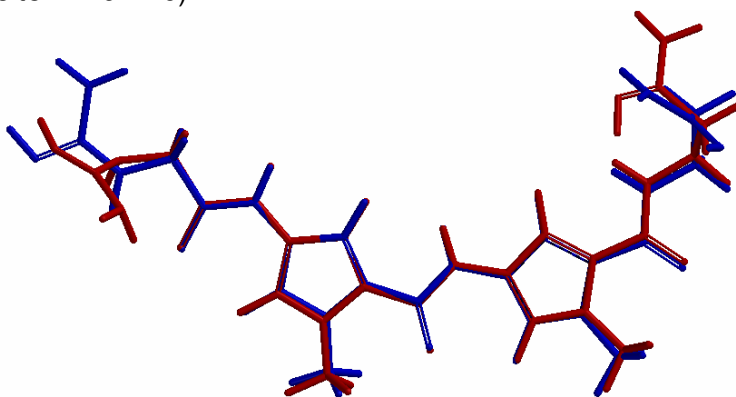
ineffizient gewesen wären <sup>[261]</sup>. Folglich wurde eine semiempirische Methode (Kapitel 4.1.2, Seite 95 ff.) für die Simulation der Minimumskonformere der Verbindungen, die für die Validierung herangezogen werden sollten, eingesetzt. Da ein Vergleich der verschiedenen in SPARTAN <sup>[35]</sup> enthaltenen semiempirischen Rechenmethoden (u. a. AM1 <sup>[184,185]</sup>, PM3 <sup>[190]</sup>, MNDO <sup>[183]</sup>) gezeigt hat, dass die mit AM1 <sup>[184,185]</sup> (Kapitel 4.1.2.1, Seite 96 ff.) berechneten molaren Bildungsenthalpien  $\Delta H_f$  der Konformere den experimentell ermittelten Werten am ähnlichsten sind <sup>[181]</sup>, wurden alle Konformeranalysen mit dieser semiempirischen Parametrisierung durchgeführt.

Für die Simulation der Minimumskonformere wurden folgende Parameter gewählt:

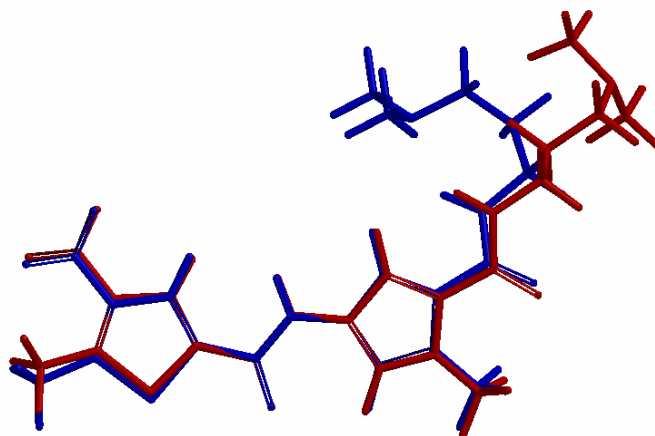
<b>Calculate:</b>	Equilibrium Conformer	at ground state
<b>With:</b>	Semi-Empirical	AM1
<b>Start from:</b>	Initial Geometry	
<b>Subject to:</b>	Symmetry	
<b>Total Charge:</b>	Neutral	
<b>Multiplicity:</b>	Singlet	

#### Vergleich der Kristallstrukturen mit den simulierten Minimumskonformeren:

In SPARTAN <sup>[35]</sup> wurden die Konformationen der Kristallstrukturen und die aus den Konformeranalysen resultierenden *in silico*-Modelle der Verbindungen zunächst graphisch miteinander verglichen, indem ein sog. *Alignment* ( $\rightarrow$  Übereinanderlegen mehrerer ähnlicher Moleküle auf der Basis einiger, zuvor als Fixpunkte ausgewählter Atome, die auch als *Alignment Center* bezeichnet werden <sup>[197]</sup>) durchgeführt wurde (Abb. 5.3, Seiten 119-120).



**Abb. 5.3A:** Vergleichende Darstellung der Kristallstruktur (blaues Molekül) und des mit der AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers (rotes Molekül) des Rinnenbinders Netropsin (*Alignment* durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)



**Abb. 5.3B:** Vergleichende Darstellung der Kristallstruktur (blaues Molekül) und des mit der AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers (rotes Molekül) des Thiophen-pyrrolcarboxamids **5** (*Alignment* durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)

In dem Molecular Modelling-Programm HYPERCHEM <sup>[34]</sup> (Kapitel 4.2.2, Seite 109 ff.; Überführung der SPARTAN-Dateien <sup>[35]</sup> in HYPERCHEM-Dateien <sup>[34]</sup>: Kapitel 8.2.1, Seite 319) wurden darüber hinaus die, ein Maß für die Ähnlichkeit zweier Molekülstrukturen darstellenden, RMSD-Werte <sup>[27,177]</sup> (*Root Mean Square Distance*) ermittelt [Gleichung (1)]. Hierbei werden, nach der Superposition der zu vergleichenden Moleküle, die Abstände zwischen den Raumkoordinaten jedes der in die RMS-Fit-Analyse mit einbezogenen Atompaaare berechnet <sup>[27]</sup>. Dabei ist ein kleiner RMSD-Wert gleichbedeutend mit einer hohen strukturellen Ähnlichkeit zweier Molekülkonformationen <sup>[27]</sup>.

$$(1) \quad \text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{Atome}}} d_i^2}{N_{\text{Atome}}}}$$

$N_{\text{Atome}}$ : Anzahl der Atome, die in die RMS-Fit-Analyse einbezogenen werden

$d_i$ : Abstand zwischen den Raumkoordinaten des Atoms  $i$  in den Strukturen der beiden zu vergleichenden Moleküle, nach deren Superposition  
(nach *Leach* <sup>[27]</sup>)

Die in SPARTAN <sup>[35]</sup> durchgeführten *Alignments* zeigen, dass sich die röntgenkristallographisch ermittelten und die computersimulierten Konformere der Fünfring-Heteraren-pyrrolcarboxamide – bei jeweils gleicher Konformation der beiden Heterozyklen



und der Amidbindungen [→ trans-(Z)-Konfiguration] – in der dreidimensionalen Struktur der aliphatischen Seitenkette partiell voneinander unterscheiden (Abb. 5.3B, Seite 120). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der bei den Kristallstrukturen vorhandene Einfluss des Lösungsmittels auf die Molekülkonformation bei den im Vakuum ablaufenden Molecular Modelling-Simulationen nicht berücksichtigt werden kann <sup>[20,241]</sup>. Aus diesem Grund wurden zum einen die Gesamtmoleküle, und zum anderen nur die in Abb. 5.1 (Seite 116) blau gekennzeichneten Molekülstrukturen ohne Berücksichtigung der aliphatischen Seitenketten in die RMSD-Rechnungen einbezogen. Die ermittelten RMSD-Werte sind in Tab. 5.1 aufgeführt.

	<b>RMSD<sup>1</sup></b> [Å]	<b>RMSD<sup>2</sup></b> [Å]
<b>Netropsin</b>	0,42	0,96
<b>4</b>	0,40	0,84
<b>5</b>	0,29	1,77
<b>8</b>	0,48	1,52

**Tab. 5.1:** Ergebnisse der RMSD-Rechnungen

<sup>1</sup>: Bei den RMSD-Rechnungen wurden nur die in Abb. 5.1 (Seite 116) blau gekennzeichneten Molekülstrukturen berücksichtigt (durchgeführt in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>).

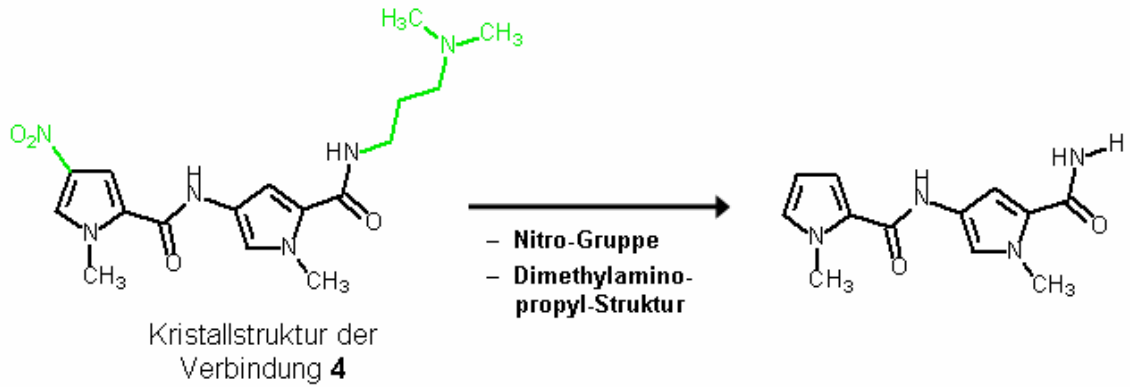
<sup>2</sup>: Die RMSD-Rechnungen wurden mit den Gesamtmolekülen durchgeführt (in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>).

Die zum Vergleich der Konformationen der Kristallstrukturen mit den *in silico*-Modellen der Verbindungen durchgeführten *Alignments* (Abb. 5.3, Seiten 119-120) und RMSD-Rechnungen (Tab. 5.1) zeigen eindeutig, dass die in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> implementierte Konformeranalyse, unter Verwendung der semiempirischen AM1-Parametrisierung <sup>[184,185]</sup>, dazu geeignet ist, die Minimumskonformere der zu untersuchenden DNA-Liganden zu simulieren.

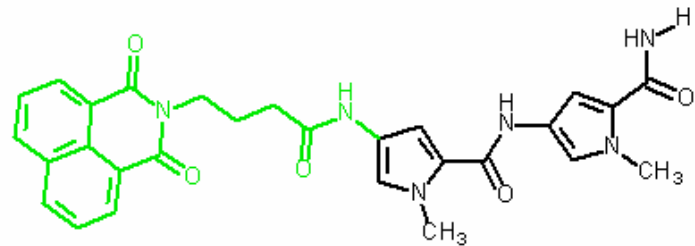
## 5.2.2 Berechnung der potentiellen DNA-Liganden

Zur Simulation der Minimumskonformere der zu untersuchenden Interkalatorcarbon-säuren (Verbindungen **1-3**; Abb. 6.1, Seite 148), des Amino-thiazol-pyrrolcarbox-amids **7** (Abb. 6.5, Seite 158), der Combilexine der Thiazol-pyrrol-Reihe (Verbin-dungen **33-35** und **37**; Abb. 6.37, Seite 216) und der Pyrido[a]carbazol-Derivate **50** und **52** (Abb. 6.73B, Seite 281) wurden zunächst dreidimensionale Computermodelle dieser Verbindungen erzeugt. Da keine Kristallstrukturen der Derivate existieren, wurden die *in silico*-Modelle *de novo* mit Hilfe des in dem Programm SPARTAN<sup>[35]</sup> enthaltenen Baukastensystems<sup>[197]</sup> konstruiert und anschließend, unter Verwendung der in Kapitel 5.2.1 (Seite 119) aufgeführten Rechenparameter (→ Konformeren-analyse, durchgeführt mit der semiempirischen AM1-Methode<sup>[184,185]</sup>), energiemini-miert. Dabei wurde jede Simulation mindestens zweimal wiederholt, um sicherzu-stellen, dass die Ergebnisse der Konformerenanalysen reproduzierbar waren. Die aus diesen Berechnungen resultierenden Minimumskonformere der Testverbindung-en wurden in den nachfolgenden Docking-Studien (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) als Liganden eingesetzt.

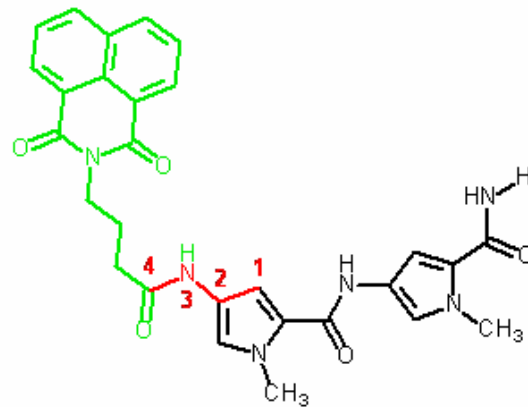
Der Aufbau der *in silico*-Modelle der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide **15-20** (Abb. 6.16, Seite 184), sowie der Combilexine der Bispyrrol- (Verbindungen **43, 44**; Abb. 6.39, Seite 218), der Thiophen-pyrrol- (Verbindungen **22-30**; Abb. 6.36, Seite 214) und der Imidazol-pyrrol-Reihe (Verbindungen **38-40**, Abb. 6.38, Seite 217) erfolgte auf der Basis der von den jeweiligen Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Strukturelementen (Verbindungen **4**<sup>[258]</sup>, **5**<sup>[259]</sup>, **8**<sup>[260]</sup>; Abb. 5.1, Seite 116) zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen. Für die Konstruktion dieser Computermo-delle wurde das auf den folgenden Seiten (Abb. 5.4, Seiten 123-124) dargestellte Konzept evaluiert.



+ Amidbindung  
 + Linker  
 + Interkalator  
 (bzw. Nukleobase)

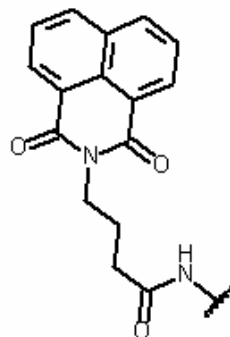


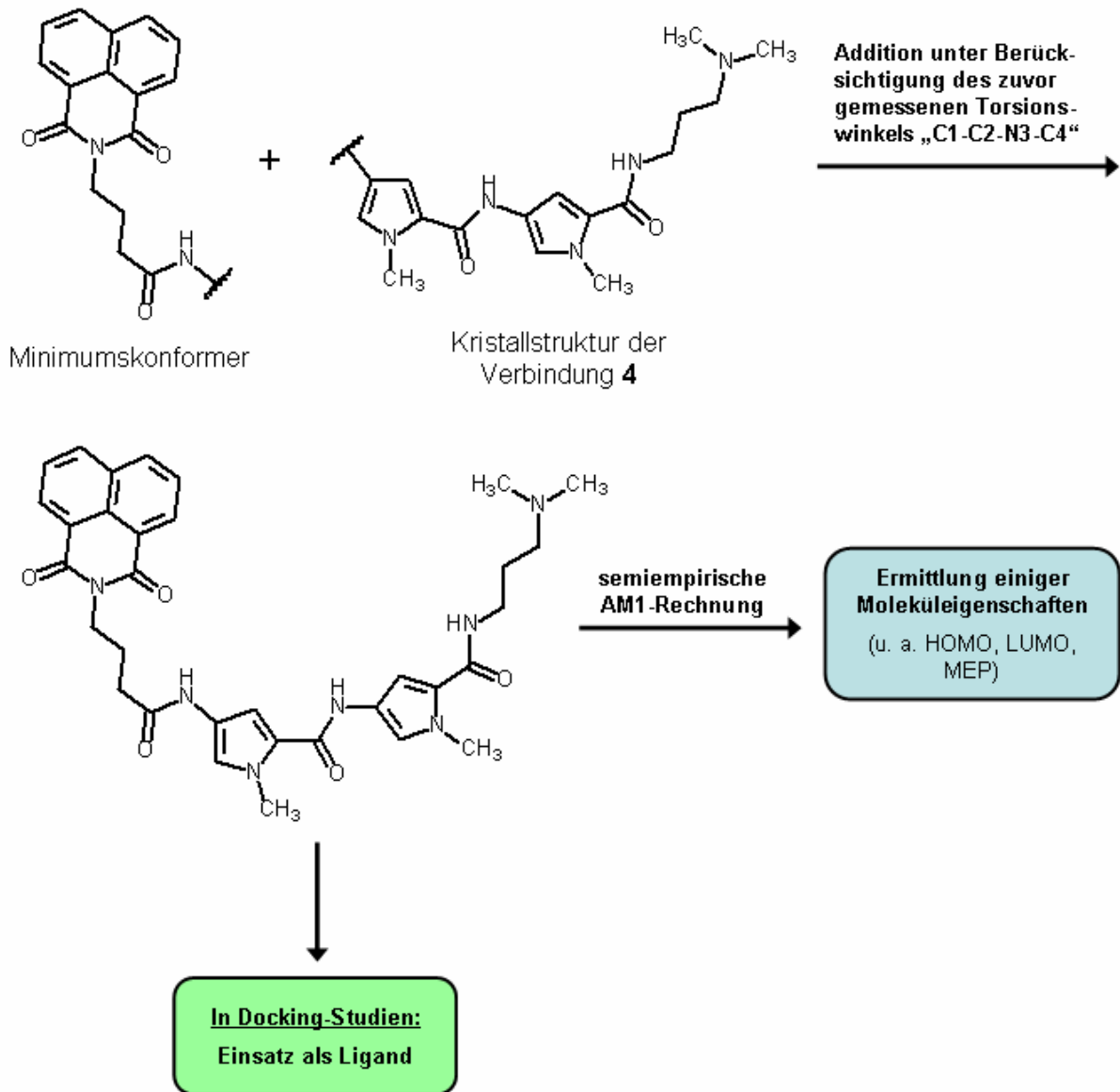
**Konformeranalyse**  
 (Monte Carlo-Verfahren  
 + semiempirische  
 AM1-Rechnungen)



Minimumskonformer

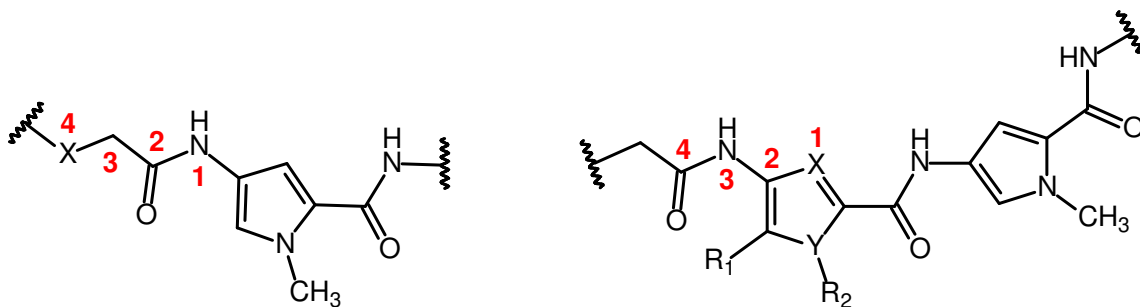
1. Messung des rot eingezeichneten Torsionswinkels „C1-C2-N3-C4“
2. Entfernung aller ursprünglich aus der Kristallstruktur stammenden Atome





**Abb. 5.4:** Schematische Darstellung des für die Simulation der Minimumskonformere der Combilexine und der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide evaluierten Konzepts am Beispiel der Verbindung **43**

Im ersten Schritt des zum Aufbau der *in silico*-Modelle der DNA-Liganden verfolgten Konzepts, wurden die Atome der C-terminalen Dimethylaminopropyl-Seitenkette der jeweils als Basis dienenden Kristallstruktur (Verbindung **4** → Aufbau der Combilexine der Bispyrrol-Reihe und der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide; Verbindung **5** → Aufbau der Combilexine der Thiophen-pyrrol-Reihe; Verbindung **8** → Aufbau der Combilexine der Imidazol-pyrrol-Reihe; Abb. 5.1, Seite 116) gelöscht (Abb. 5.4, Seite 123): Durch die mit der Entfernung der aliphatischen Kette verbundene Reduktion der Freiheitsgrade der Testverbindungen (die Seitenkette besitzt 51 Freiheitsgrade; mit SPARTAN<sup>[35]</sup> ermittelt) sollte die Simulation der Minimumskonformere vereinfacht werden. Die am N-terminalen Ende befindliche Nitro-Gruppe wurde durch die bei den Combilexinen und den Thymin-gekoppelten Bispyrrolcarboxamiden jeweils unterschiedlich aufgebauten Strukturen aus Nucleobase bzw. Interkalator, Linker und Amidbindung ersetzt, wobei diese Molekülteile mit Hilfe des SPARTAN-Baukastensystems<sup>[35,197]</sup> angefügt wurden. Zur Konstruktion der Computermodelle der Thymin-gekoppelten Monopyrrol-Derivate, die auf der Grundlage der Bispyrrolcarboxamid-Verbindung **4** (Abb. 5.1, Seite 116) erfolgte, wurden zusätzlich zur Nitro-Gruppe auch die Atome des N-terminalen Pyrrol-Rings der Kristallstruktur gelöscht, bevor die Pyrimidin-Base und der Linker addiert werden konnten. Die aus der variablen, N-terminalen- und der rinnenbindenden Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid- bzw. Monopyrrolcarboxamid-Struktur bestehenden Moleküle wurden anschließend energieminiert. Die zu diesem Zweck unter Verwendung der semiempirischen AM1-Methode<sup>[184,185]</sup> (Kapitel 4.1.2.1, Seite 96 ff.) durchgeführten Konformeranalysen (Kapitel 5.2.1, Seite 118 ff.; Rechenparameter: Seite 119) wurden dabei mindestens zweimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Nach Abschluss der Simulationen wurde der Torsionswinkel „N1-C2-C3-X4“ der Minimumskonformere der Thymin-gekoppelten Monopyrrol-Derivate ermittelt, während bei den Konformeren der Nucleobasen-gekoppelten Bispyrrol-Verbindungen und der Combilexine jeweils der Torsionswinkel „X1-C2-N3-C4“ gemessen wurde (Abb. 5.5, Seite 126). Anschließend wurden alle ursprünglich aus der Kristallstruktur stammenden Atome der Minimumskonformere entfernt.

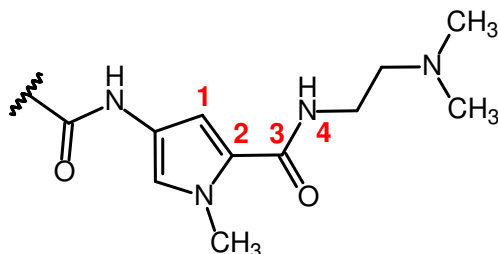


**Abb. 5.5:** Links: Darstellung der Atome, die den für die Konstruktion der Minimumskonformere der Monopyrrol-Derivate benötigten Torsionswinkel bilden  
Rechts: Darstellung der Atome, die den für die Konstruktion der Minimumskonformere der Combilexine und der Nucleobasen-gekoppelten Bispyrrol-Verbindungen jeweils benötigten Torsionswinkel bilden

Der verbliebene, *de novo* simulierte Teil der Minimumskonformere (bestand bei den Combilexinen und den Thymin-gekoppelten Bispyrrol-Verbindungen aus der Nucleobase bzw. dem Interkalator, dem Linker und der Amidbindung, bei den Monopyrrol-Derivaten dagegen nur aus der Nucleobase und dem Linker) wurde schließlich unter Berücksichtigung des zuvor ermittelten Torsionswinkels an die entsprechende Kristallstruktur, bei der die Nitro-Gruppe (zum Aufbau der Combilexine und der Bispyrrol-Verbindungen) bzw. der Nitro-Pyrrol-Ring (zum Aufbau der Monopyrrol-Derivate) entfernt wurde, angefügt (Abb. 5.4, Seite 124). Diese vervollständigten *in silico*-Modelle der Testverbindungen wurden in den geplanten Docking-Studien als Liganden eingesetzt (Kapitel 5.4.1, Seite 134).

Zur Simulation des Computermodells der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Verbindung **28** (Abb. 6.36, Seite 214), die am C-terminalen Ende eine Dimethylaminoethyl-Kette aufweist, wurde die bei der Kristallstruktur des Thiophen-pyrrolcarboxamids **5** (Abb. 5.1, Seite 116) vorliegende Propyl-Kette zunächst um eine Methylen-Gruppe verkürzt. Bei dem Minimumskonformer, welches aus der anschließend unter Anwendung der semiempirischen AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> durchgeführten Konformeranalyse (Kapitel 5.2.1, Seite 118 ff.; Rechenparameter: Seite 119) resultierte, wurde der Torsionswinkel „C1-C2-C3-N4“ (Abb. 5.6, Seite 127) gemessen, bevor alle Atome der beiden Heterozyklen und der sie verbindenden Amidbindung gelöscht wurden. Daraufhin wurde die verbliebene Dimethylaminoethylcarboxamid-Struktur an das C-

terminale Ende des Minimumskonformers des zur Verbindung **28** homologen Derivats **24** (Abb. 6.36, Seite 214), dessen Propylcarboxamid-Seitenkette zuvor entfernt wurde, unter Berücksichtigung des ermittelten Winkels angefügt.



**Abb. 5.6:** Darstellung der Atome, die den für die Konstruktion des Minimumskonformers der Verbindung **28** benötigten Torsionswinkel bilden

Im Anschluss an die Komplettierung der *in silico*-Modelle der DNA-Liganden sollten einige potentiell die DNA-Aktivität der Testverbindungen beeinflussende Moleküleigenschaften, wie das Dipolmoment, die Grenzorbitalenergien und das molekulare elektrostatische Potential (MEP; Kapitel 4.1.2, Seite 96) ermittelt werden. Dazu wurden weitere semiempirische AM1-Rechnungen <sup>[184,185]</sup> durchgeführt, wobei die Molekülkonformationen der in die Simulationen eingesetzten Minimumskonformere nicht verändert wurden (sog. *Single Point Energy*-Studien).

Für die Berechnung der Moleküleigenschaften wurden folgende Parameter gewählt:

<b>Calculate:</b>	Single Point Energy	at ground state
<b>With:</b>	Semi-Empirical	AM1
<b>Start from:</b>	Initial Geometry	
<b>Subject to:</b>	Symmetry	
<b>Total Charge:</b>	Neutral	
<b>Multiplicity:</b>	Singlet	
<b>Surface:</b>	HOMO	
	LUMO	
	Density ( <i>Property</i> : Potential)	

## 5.3 Berechnungen mit HYPERCHEM

### 5.3.1 Auswahl geeigneter DNA-Rezeptoren aus der PDB-Datenbank

Rezeptor für das DNA-Ligand-Docking der Interkalatorcarbonsäuren, der Combilexine und der Hetaren[a]carbazol-Derivate:

Das für die Docking-Simulationen eingesetzte Programm ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> (Kapitel 4.2.3, Seite 111 ff.) nutzt für die DNA-Ligand-Komplexbildung einen sog. *Rigid Receptor Docking*-Algorithmus, das heißt, dass die Konformationen der Rezeptormoleküle nicht verändert werden, während die Liganden flexibel sind. Da die für die DNA-Bindung eines interkalierenden Chromophors erforderliche Aufweitung der DNA-Basen folglich nicht während des Docking-Prozesses stattfinden kann, muss die Kristallstruktur der als Rezeptor verwendeten Matrize bereits eine Interkalationskavität besitzen. Für die mit den voraussichtlich eine interkalative DNA-Bindung aufweisenden Interkalatorcarbonsäuren (Kapitel 6.1.1.3, Seite 152 ff.), Combilexinen (Kapitel 6.3.5, Seite 231 ff.) und Hetaren[a]carbazol-Derivaten (Kapitel 6.4.5, Seite 289 ff.) geplanten Docking-Studien wurde daher das Undecanukleotid mit dem PDB-Code <sup>[36]</sup> 1G3X <sup>[80]</sup> [mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 2,70 Å; Sequenz: 5'-D(\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'] ausgewählt: Zwischen zwei AT-Basenpaaren dieses DNA-Moleküls liegt ein eingeschobenes Acridin-Derivat vor; zudem eignet sich der sich an die Kavität anschließende, ebenfalls aus AT-Basenpaaren aufgebaute Abschnitt des Rezeptors für die Rinnenbindung der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Strukturen der Combilexine. Ein Oligonukleotid, bei dem sich die Interkalationskavität in einem GC-reichen DNA-Abschnitt befindet (→ zur Untersuchung der DNA-bindenden Eigenschaften der potentiell eine GC-Toleranz besitzenden Combilexine der Imidazol-Pyrrol-Reihe <sup>[263]</sup>), stand in der PDB-Datenbank <sup>[36]</sup> dagegen nicht zur Verfügung.

Rezeptor für das DNA-Ligand-Docking der Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide:

Die mit den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrol-Derivaten geplanten Docking-Studien sollten mit einem Rezeptor durchgeführt werden, der einen aus



sechs AT-Basenpaaren gebildeten Abschnitt aufweist, um – neben der Rinnenbindung der AT-selektiven Pyrrolcarboxamid-Struktur – auch die dem Synthesekonzept entsprechende *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin-Moleküls der Testverbindungen mit einer Adenin-Base der DNA zu ermöglichen (Kapitel 6.2.1, Seite 182 ff.). Aus diesem Grund wurde das Dodecanukleotid mit dem PDB-Code <sup>[36]</sup> 102D <sup>[264]</sup> [mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 2,20 Å; Sequenz: 5'-D(\*CP\*GP\*CP\*AP\*AP\*AP\*TP\*TP\*TP\*GP\*CP\*G)-3'] als Docking-Matrize ausgewählt (Kapitel 6.2.4, Seite 189 ff.)

#### Rezeptoren für das DNA-Ligand-Docking der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide:

Für das Docking der Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamide sollten, zur Untersuchung der Sequenzselektivität ihrer DNA-Bindung, vier Rezeptoren verwendet werden, die jeweils einen Abschnitt von mindestens sechs Basenpaaren der gewünschten Basenabfolgen „polyA“, „polyAT“, polyG“ bzw. „polyGC“ aufweisen. Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide mit den PDB-Codes <sup>[36]</sup> 1JKQ <sup>[265]</sup> [→ Rezeptor „polyA“; mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 2,86 Å; Sequenz: 5'-D(\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*A)-3'], 473D <sup>[266]</sup> [→ Rezeptor „polyAT“; mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 1,58 Å; Sequenz: 5'-D(\*GP\*TP\*AP\*TP\*AP\*TP\*AP\*C)-3'], 1NVP <sup>[267]</sup> [→ Rezeptor „polyG“; mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 2,10 Å; Sequenz: 5'-D(\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*C)-3'] und 1CF7 <sup>[268]</sup> [→ Rezeptor „polyGC“; mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt; Auflösung: 2,60 Å; Sequenz: 5'-D(\*TP\*CP\*GP\*CP\*GP\*CP\*GP\*G)-3'] ausgewählt (Kapitel, 6.1.2.3, Seite 162 ff.)

### **5.3.2 Berechnung der DNA-Rezeptoren**

Bevor die aus der PDB-Datenbank <sup>[36]</sup> stammenden DNA-Moleküle in den geplanten Docking-Studien als Rezeptoren eingesetzt werden konnten, mussten Simulationen zur Energieminimierung der Oligonukleotide durchgeführt werden, um die bei Kristallstrukturen generell zu kurzen X–H-Bindungen zu verlängern (→ bedingt durch das Messprinzip der Röntgenstrukturanalyse; Kapitel 5.2.1, Seite 117) und die gelegentlich auftretenden, energiereichen Molekültorsionen zu relaxieren. Zu diesem Zweck wurden bei den ausgewählten PDB-Dateien <sup>[36]</sup> zunächst alle Atome der das DNA-

Ligand-Docking störenden Wassermoleküle, sowie die für die DNA-Bindung der Testsubstanzen nicht erforderlichen Nukleotide gelöscht (unter Verwendung von HYPERCHEM<sup>[34]</sup>; Kapitel 4.2.2, Seite 109 ff.), so dass jeweils nur ein Oligomer mit der gewünschten Basensequenz (Kapitel 5.3.1; Seite 128-129) und ein evtl. an der DNA gebundener Ligand übrig blieben. Während den anschließend zur Energieminimierung der Nukleinsäure-Moleküle durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen<sup>[193]</sup> (Kapitel 4.1.4.1, Seite 101 ff.) sollten diese Liganden an der DNA verbleiben, um eine strukturelle Änderung der für die DNA-Ligand-Komplexbildung der Testsubstanzen benötigten Bindestellen zu verhindern (v. a. sollte die bei dem Rezeptor „1G3X“<sup>[36,80]</sup> vorliegende Interkalationskavität konserviert werden). Um zu gewährleisten, dass sich die *in silico*-Studien nur auf das Oligonukleotid und nicht auch auf das gegebenenfalls vorhandene, DNA-gebundene Molekül beziehen, wurde der DNA-Doppelstrang vor Beginn der Simulationen markiert (HYPERCHEM-Befehl<sup>[34]</sup>: „Select Molecules“) und somit für die Rechnungen, die der Ermittlung der Minimumskonformere dienen, aktiviert. Die Moleküldynamik-Simulationen<sup>[193]</sup> wurden mit dem speziell für das Molecular Modelling von Biopolymeren entwickelten Kraftfeld AMBER<sup>[179,180]</sup> (Kapitel 4.1.1.1, Seite 91) durchgeführt, wobei die Parametrisierung AMBER3 verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um die am weitesten entwickelte Methode, die – im Gegensatz zu den später entstandenen Parametrisierungen AMBER94 und AMBER96 – die auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zurückzuführende Komplexbildungsenergie noch explizit berücksichtigt<sup>[177]</sup>.

Die für die Moleküldynamik-Simulationen<sup>[193]</sup> verwendete Kraftfeldmethode AMBER<sup>[179,180]</sup> wurde wie folgt konfiguriert (Standardeinstellung)<sup>[265]</sup>:

**a) Options**

<b>Dielectric:</b>	Distance Dependent	
	Scale Factor:	1
<b>1-4 Scale Factors:</b>	Electrostatic:	0,5
	van der Waals:	0,5
<b>Cutoffs:</b>	None	

**b) Components**

Bond: <input checked="" type="checkbox"/>	Non-Bonded: <input checked="" type="checkbox"/>
Angle: <input checked="" type="checkbox"/>	Electrostatic: <input checked="" type="checkbox"/>
Torsion: <input checked="" type="checkbox"/>	Hydrogen-Bonded: <input checked="" type="checkbox"/>

Für die Moleküldynamik-Simulationen <sup>[193]</sup> wurden folgende, experimentell evaluierte Parameter gewählt:

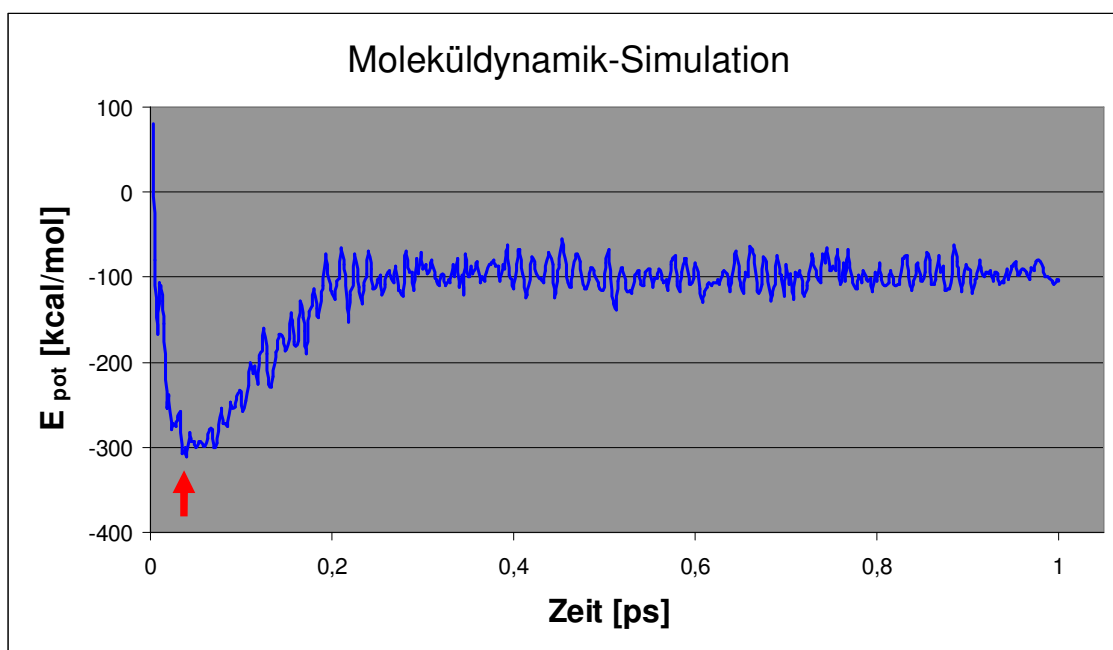
<b>Times</b>	Heat Time:	0,2 ps
	Run Time:	0,8 ps
	Cool Time:	0 ps
	Step Size:	0,0001 ps
<b>Temperature</b>	Starting Temperature:	100 K
	Simulation Temperature:	300 K
	Final Temperature:	/
	Temperature Step:	10 K
<b>Options</b>	In Vacuo:	✓
	Bath Relaxation Time:	0,1 ps

**Data Collection Period:** 5 time steps

**Screen Refresh Period:** 1 data step

**Snapshot:** ✓

**Averages:**  $E_{tot}$   
 $E_{pot}$



**Abb. 5.7:** Darstellung der im Verlauf einer Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> auftretenden, zeitabhängigen Änderung der potentiellen Energie, die die Konformationsmodifikationen des zu berechnenden Moleküls widerspiegelt; der Zeitpunkt des Erreichens des Minimumskonformers ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet  
(hier: Darstellung der mit dem Rezeptor „polyAT“ <sup>[36,266]</sup> durchgeführten Simulation)

Nach der Beendigung einer Moleküldynamik-Rechnung <sup>[193]</sup> musste das Minimumskonformer des jeweils untersuchten Oligonukleotids aus dem im Verlauf dieser Simulation gebildeten, mehrere Hundert Molekülgeometrien umfassenden Kollektiv isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde der Zeitpunkt der *in silico*-Studie, an dem das DNA-Molekül in der energieärmsten Konformation vorlag, mit Hilfe der während der Simulation erzeugten \*.csv-Datei (→ Excel-Tabelle, die die zu jedem Simulationszeitpunkt berechnete potentielle Energie enthält) ermittelt. Dieser Wert wurde, nachdem die abgeschlossene und als \*.snp-Datei gespeicherte Moleküldynamik-Rechnung <sup>[193]</sup> unter Verwendung der in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> enthaltenen „Playback“-Option erneut abgespielt wurde, als Endpunkt der zweiten Wiederholung der Simulation angegeben (bei der erstmaligen Anwendung der Option wird obligat die gesamte Simulation abgespielt), so dass diese mit dem Erreichen des Minimumskonformers abgebrochen wurde. Bei den energieminierten *in silico*-Modellen der Oligonukleotide wurde zunächst überprüft, ob zwischen jedem Basenpaar die dem *Watson-Crick*-Wasserstoffbrücken-Bindungsschema entsprechende Anzahl an H-Brücken vorlag. Die Basenpaare, die weniger als 2 (→ AT-Basenpaare) bzw. weniger als 3 (→ GC-Basenpaare) intermolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet hatten, wurden mittels Geometrieoptimierungsrechnungen <sup>[191,192]</sup> (→ dienen der Auffindung des nächstgelegenen lokalen Minimums; Kapitel 4.1.3, Seite 97 ff.), die unter Verwendung des *Polak-Ribiere*-Algorithmus <sup>[191,192]</sup> (→ zur Veränderung der Molekülkonformation; konjugierte Gradientenmethode) und der Kraftfeldmethode AMBER <sup>[179,180]</sup> (→ zur Berechnung der Energien der simulierten Konformere; Parametrisierung: AMBER3) durchgeführt wurden, erneut energieminiert. Da mit Hilfe dieser Simulationen ausschließlich die Basenpaare konformativ verändert werden sollten, bei denen intermolekulare Wasserstoffbrücken fehlten, wurden die entsprechenden Nukleotide vor Beginn der Rechnungen markiert (HYPERCHEM-Befehl <sup>[34]</sup>: „Select Residues“) und somit für die Simulationen zur Geometrieoptimierung aktiviert.

Für die Geometrieoptimierungssimulationen <sup>[191,192]</sup> wurden folgende, experimentell evaluierte Parameter gewählt:

**Algorithm:** Polak-Ribiere (Conjugate Gradient)

**Termination Condition:** RMS Gradient of 0,5 kcal/(Å•mol)  
Or 12000 maximum cycles

**In vacuo:** √

**Screen Refresh Period:** 1 cycle

Nach Abschluss der Simulationen zur Geometrieoptimierung <sup>[191,192]</sup> wiesen alle Basenpaare der als Docking-Rezeptoren ausgewählten DNA-Moleküle die dem *Watson-Crick*-Schema entsprechende Wasserstoffbrücken-Zahl auf.

Zu den einfach negativ geladenen Phosphat-Gruppen dieser Minimumskonformere wurden anschließend Natrium-Kationen hinzugefügt <sup>[49,270]</sup> (HYPERCHEM-Befehl <sup>[34]</sup>: „Add Counterions“), da diese Gegenionen für die korrekte Beurteilung der bei der Komplexbildung zwischen DNA und Ligand auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen erforderlich sind. Die Positionen der Natrium-Ionen wurden in Bezug auf den jeweiligen Nukleinsäure-Doppelstrang optimiert, indem eine weitere Geometrieoptimierungsrechnung <sup>[191,192]</sup> unter Verwendung des *Polak-Ribiere*-Algorithmus <sup>[191,192]</sup> (konjugierte Gradientenmethode) und der Kraftfeldmethode AMBER <sup>[179,180]</sup> (Parametrisierung: AMBER3) durchgeführt wurde <sup>[270]</sup>. Zu diesem Zweck wurden nur die Na<sup>+</sup>-Ionen markiert (HYPERCHEM-Befehl <sup>[34]</sup>: „Select Atoms“) und somit für die Simulationen aktiviert, um strukturelle Modifikationen des zuvor energieminierten Oligonukleotids zu verhindern. Nach der Beendigung der Geometrieoptimierungssimulationen <sup>[191,192]</sup> wurden die DNA-Moleküle zusammen mit den Gegenionen in den nachfolgenden Docking-Studien (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) als Rezeptoren eingesetzt.

Für die Simulationen zur Optimierung der Lage der Na<sup>+</sup>-Ionen wurden folgende, experimentell evaluierte Parameter gewählt:

**Algorithm:** Polak-Ribiere (Conjugate Gradient)

**Termination Condition:** RMS Gradient of 0,1 kcal/(Å•mol)  
Or 12000 maximum cycles

**In vacuo:** √

**Screen Refresh Period:** 1 cycle

Die zur Beschreibung der Konformationen der Oligonukleotide erforderlichen Winkel <sup>[42]</sup> wurden vor und nach den Moleküldynamik-Rechnungen <sup>[193]</sup> bestimmt, um die mit den Simulationen einhergehenden, strukturellen Modifikationen der Molekülgeometrien zu dokumentieren. Die ermittelten Werte sind in Kapitel 8.3 (Seite 321 ff.) tabellarisch aufgeführt.

## 5.4 Docking

### 5.4.1 Docking-Studien mit ICM-PRO

#### 5.4.1.1 Validierung des Programms

Vor Beginn der Docking-Studien, die mit den im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten, potentiell DNA-bindenden Substanzen durchgeführt werden sollten, sollte das Programm ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> (Kapitel 4.2.3, Seite 111 ff.) validiert werden, um gewährleisten zu können, dass die von diesem Programm berechneten DNA-Ligand-Komplexe rational evident und reproduzierbar sind. Zu diesem Zweck wurden zum einen eine interkalative DNA-Bindung unter Verwendung des DNA-Rezeptors „1G3X“ <sup>[36,80]</sup> und dem Liganden 9-Formylacridin, und zum anderen eine Rinnenbindung in der kleinen Furche der DNA mit Hilfe des DNA-Rezeptors „473D“ <sup>[36,266]</sup> und dem Liganden Netropsin simuliert, da es sich auch bei den zu untersuchenden Testverbindungen um mögliche Interkalatoren und/oder *Minor Groove Binder* handelt.

Im ersten Schritt der Validierung wurde das zuvor in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> berechnete Minimumskonformer des jeweils als Rezeptor dienenden DNA-Doppelstrangs (Kapitel 5.3, Seite 128 ff.), zusammen mit den Na<sup>+</sup>-Ionen und dem DNA-gebundenen Liganden, als \*.pdb-Datei in das Docking-Programm überführt. Da die Informationen über die Ladungszustände der Atome bei diesem Datentransfer verloren gingen, wurden zunächst alle Natriumatome manuell mit einer einfach positiven Ladung versehen. Die negativen Ladungen der Phosphat-Gruppen der DNA wurden dagegen automatisch bei der anschließend durchgeführten Konvertierung <sup>[241]</sup> der \*.pdb-Datei in das programmeigene ICM-Format ergänzt.

Für die Konvertierung wurde die folgende Programmeinstellung gewählt:

**Replace the original:** ✓

**Undisplay during conversion:** ✓

**Display the result:** ✓

Im Anschluss an die Konvertierung wurde der Ligand (→ 9-Formylacridin bzw. Netropsin) von dem sog. ICM-Objekt, welches aus der \*.pdb-Datei hervorging und somit zunächst aus dem DNA-Doppelstrang, den Natrium-Ionen und dem DNA-gebundenen Molekül bestand, getrennt. Mit Hilfe der zu diesem Zweck verwendeten Option „Move from object“ (→ erscheint bei dem mit der rechten Maustaste ausgeführten Anklicken des Ligandennamens im sog. „Workspace Panel“) entstanden auf diese Weise zwei Objekte (Objekt Nr. 1: Rezeptor, bestehend aus DNA und Na<sup>+</sup>-Ionen; Objekt Nr. 2: Ligand), die unabhängig voneinander bearbeitet werden konnten.

Daraufhin wurden bei dem Rezeptor „1G3X“<sup>[36,80]</sup> die beiden die Interkalationskavität umschließenden bzw. bei der Docking-Matrize „473D“<sup>[36,266]</sup> fünf AT-Basensepaare, die sich im Zentrum des DNA-Moleküls befinden [in den folgenden Sequenzen unterstrichen: „1G3X“<sup>[36,80]</sup> → 5'-D(GCGAATTCGCG)-3'; „473D“<sup>[36,266]</sup> → 5'-D(GTATATAC)-3'], markiert (ICM-PRO-Befehl<sup>[32,33]</sup>: „Select Residue“): Diese Nukleotide sollten als bevorzugte Bindestelle des jeweils zu dockenden Liganden dienen. Anschließend wurde mit der Durchführung der Docking-Simulationen begonnen, wobei das im Folgenden erläuterte, obligat einzuhaltende Schema<sup>[241]</sup> schrittweise abgearbeitet wurde:

### 1. Name Project

Das Programm ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> erstellt einen mit dem hier angegebenen Projektnamen bezeichneten Ordner, in dem alle im Verlauf der Docking-Simulation erzeugten Daten gespeichert werden.

### 2. Receptor Setup

Mit diesem Arbeitsschritt wird festgelegt, welches Molekül/welche Moleküle als Docking-Rezeptor(en) fungieren soll(en). Für das Rezeptor-Setup wurden die folgenden Angaben gemacht:

*Receptor molecule(s):* a\_\* (→ der Docking-Rezeptor besteht aus mehreren Molekülen, nämlich dem DNA-Doppelstrang und den zugehörigen Na<sup>+</sup>-Ionen)

*Binding site residues:* as\_graph (→ die zuvor markierten Nukleotide bilden die bevorzugte Bindestelle des Liganden)

*Display:* √

Anschließend erfolgt die Festlegung der Liganden-Position, mit der die Docking-Simulation beginnen soll (→ am Rezeptor durch ein gelbes Molekül-Modell verdeutlicht), und die Konfiguration der die Bindestelle umgebenden Box (→ durch einen lilafarbenen Quader symbolisiert), wobei die von ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> jeweils vorgegebene, initiale Positionierung des Liganden – ebenso wie die Lage und die Größe der Box – stets ohne Änderungen übernommen wurden.

Nach Beendigung des Rezeptor-Setups wurde die Datei, die das zuvor in SPARTAN <sup>[35]</sup> unter Verwendung des Baukastensystems <sup>[197]</sup> *de novo* konstruierte, sowie mittels Konformeranalyse (Kapitel 5.2.1, Seite 118 ff.) energieminierte *in silico*-Modell des zu dockenden Liganden enthielt und die nach mehrmaliger Umformatierung das ICM-PRO-eigene Dateiformat \*.ob <sup>[32,33]</sup> aufwies (Kapitel 8.2.1, Seite 319), geöffnet. Anschließend wurden die folgenden Setup-Schritte <sup>[241]</sup>, die ebenfalls zu dem eingangs erwähnten, obligat einzuhaltenden Docking-Schema des Programms gehören, durchgeführt:

### **3. Ligand Setup → From loaded ICM Object**

Hier wird festgelegt, welches Molekül bei der Docking-Simulation als Ligand dienen soll.

### **4. Make receptor maps**

Innerhalb der zuvor definierten, die Bindestelle umgebenden Box werden Karten der molekularen Oberfläche des Rezeptors angelegt, wobei u. a. Informationen über energetische Zustände, Polaritäten und räumliche Zugänglichkeiten berücksichtigt werden. Für diesen Arbeitsschritt wurde die folgende Programmeinstellung gewählt:

*Max VW repulsion:*            4,0 (Standardwert)

### **5. Interactive Docking → Loaded Ligand**

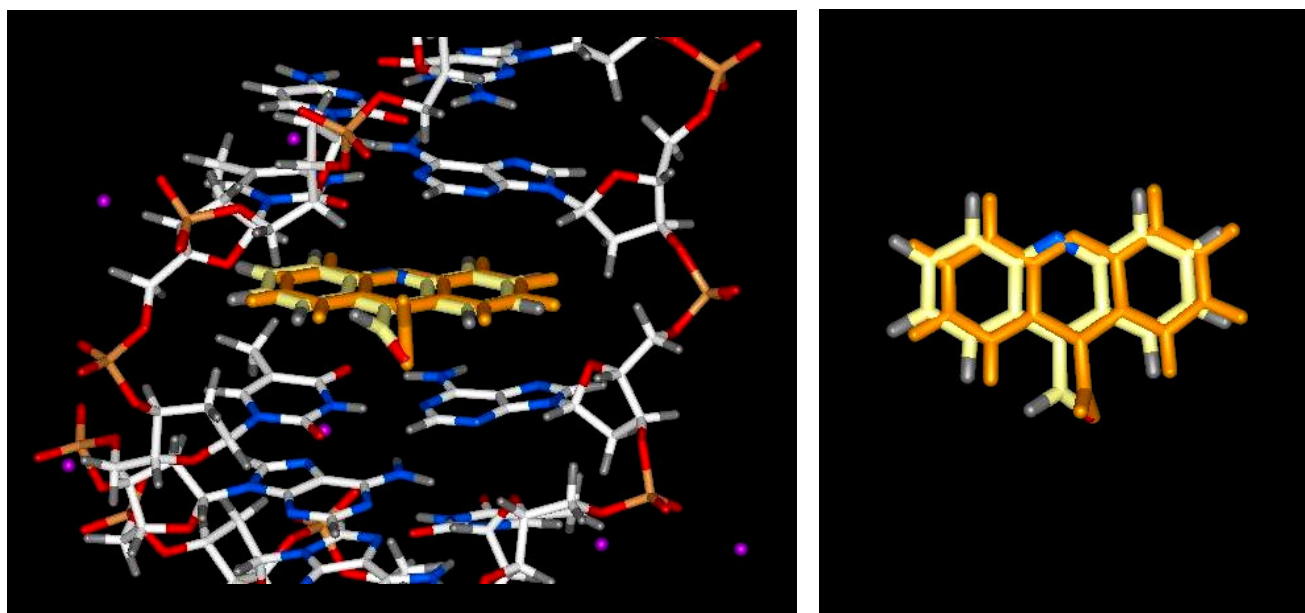
Die nun startende Docking-Simulation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

*Calc ICM score:* ✓

*Thoroughness:*            1 (→ dieser Parameter bestimmt die Dauer der Docking-Simulation)

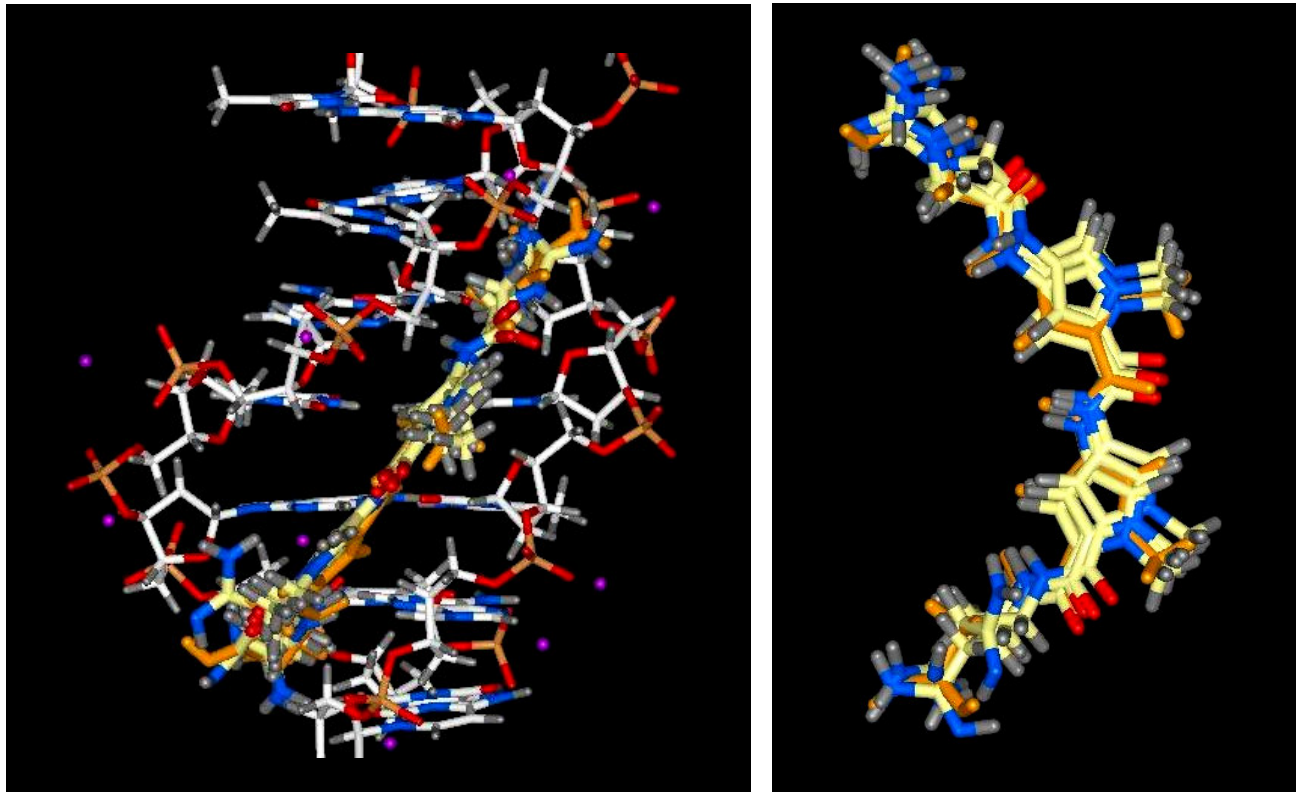


Nach der Beendigung der Docking-Simulation wurden die fünf besten DNA-Ligand-Komplexe (bewertet auf der Grundlage des bei der Komplexbildung jeweils freiwerdenden Energiebetrags) mit Hilfe der Option „Browse Stack Conformation“ nacheinander graphisch dargestellt, wobei bei jedem Komplex die von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierte DNA-Bindung des Liganden mit der bei der entsprechenden Kristallstruktur vorliegenden Positionierung des Interkalators bzw. Rinnenbinders verglichen wurde. Der Komplex, der eine DNA-Orientierung des gedockten Liganden aufwies, die mit der der Kristallstruktur am exaktesten übereinstimmte, wurde zunächst gespeichert (Abb. 5.8-5.9, Seiten 137-138) und anschließend zur weiteren Bearbeitung in das Programm HYPERCHEM<sup>[34]</sup> überführt (Umwandlung von ICM-PRO-Dateien<sup>[32,33]</sup> in HYPERCHEM-Dateien<sup>[34]</sup>: Kapitel 8.2.2, Seite 320). Um die Reproduzierbarkeit der simulierten DNA-Ligand-Komplexe sicherstellen zu können, wurden diese mit 9-Formylacridin bzw. mit Netropsin durchgeführten Docking-Studien jeweils dreimal wiederholt.



**Abb. 5.8:** Darstellung der Ergebnisse der mit 9-Formylacridin durchgeführten Docking-Studien: Zur Programmvalidierung wurden die verschiedenen mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-Positionierungen und die bei der Kristallstruktur „1G3X“<sup>[36,80]</sup> vorliegende DNA-Bindung des 9-Formylacridins mittels Superposition miteinander verglichen (orangefarbenes Molekül: Ligand der Kristallstruktur; die verschiedenen mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierten Liganden sind deckungsgleich)

(Links: Blick auf die kleine Rinne der DNA, Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse; Rechts: Blickrichtung parallel zur DNA-Helixachse)



**Abb. 5.9:** Darstellung der Ergebnisse der mit Netropsin durchgeführten Docking-Studien: Zur Programmvalidierung wurden die verschiedenen mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierte DNA-Positionierungen und die bei der Kristallstruktur „473D“ <sup>[36,266]</sup> vorliegende DNA-Bindung des Netropsins mittels Superposition miteinander verglichen (orangefarbenes Molekül: Ligand der Kristallstruktur)

(Links: Blick auf die kleine Rinne der DNA, Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse; Rechts: Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Um die von ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierte DNA-gebundene Konformere des Interkalators bzw. des Rinnenbinders mit der bei der entsprechenden Kristallstruktur vorliegenden Bindekonformation des Liganden vergleichen zu können, wurden in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> RMS-Fit-Analysen (Kapitel 5.2.1, Seite 120) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Rechnungen sind für 9-Formylacridin in Tab. 5.2 (Seite 139) und für Netropsin in Tab. 5.3 (Seite 139) dargestellt.

	<b>Simuliertes Konformer</b> ↔ <b>Simuliertes Konformer<sup>1</sup></b>	<b>Simuliertes Konformer</b> ↔ <b>Konformer der Kristallstruktur<sup>2</sup></b>
<b>RMSD</b> [Å]	3,37 x 10 <sup>-5</sup>	0,27

**Tab. 5.2:** Ergebnisse der RMSD-Rechnungen, die mit den verschiedenen mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-gebundenen Konformeren und der bei der Kristallstruktur „1G3X“ <sup>[36,80]</sup> vorliegenden Bindekonformation des 9-Formylacridins durchgeführt wurden

<sup>1</sup>: Vergleich zweier mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter Konformere

<sup>2</sup>: Vergleich eines mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten Konformers mit der bei der Kristallstruktur „1G3X“ <sup>[36,80]</sup> vorliegenden Bindekonformation

	<b>Simuliertes Konformer des Komplexes Nr. 1</b> ↔ <b>Konformer der Kristallstruktur<sup>1</sup></b>	<b>Simuliertes Konformer des Komplexes Nr. 2</b> ↔ <b>Konformer der Kristallstruktur<sup>1</sup></b>
<b>RMSD</b> [Å]	0,40	0,71
	<b>Simuliertes Konformer des Komplexes Nr. 3</b> ↔ <b>Konformer der Kristallstruktur<sup>1</sup></b>	<b>Simuliertes Konformer des Komplexes Nr. 4</b> ↔ <b>Konformer der Kristallstruktur<sup>1</sup></b>
<b>RMSD</b> [Å]	0,69	0,92

**Tab. 5.3:** Ergebnisse der RMSD-Rechnungen, die mit den verschiedenen mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-gebundenen Konformeren und der bei der Kristallstruktur „473D“ <sup>[36,266]</sup> vorliegenden Bindekonformation des Netropsins durchgeführt wurden

<sup>1</sup>: Vergleich des mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten Konformers des Komplexes Nr. X mit der bei der Kristallstruktur „473D“ <sup>[36,266]</sup> vorliegenden Bindekonformation

Die mittels Superposition erstellten graphischen Vergleiche der simulierten DNA-Ligand-Komplexe mit der Kristallstruktur „1G3X“ <sup>[36,80]</sup> bzw. „473D“ <sup>[36,266]</sup> (Abb. 5.8-5.9, Seiten 137-138) zeigen, ebenso wie die Ergebnisse der RMSD-Rechnungen (Tab. 5.2-5.3), dass ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> sowohl eine interkalative als auch eine Rinnenbindung rational evident und reproduzierbar simulieren kann. Folglich kann dieses Docking-Programm dazu verwendet werden, DNA-Ligand-Komplexe mit den im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten, potentiell DNA-bindenden Substanzen zu berechnen.

### 5.4.1.2 DNA-Ligand-Docking

Bei den Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 162 ff.; Abb. 6.13, Seite 176; Abb. 6.5, Seite 158), den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seite 189 ff.; Abb. 6.29, Seite 204; Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) und den Combilexinen (Kapitel 6.3.5, Seite 231 ff.; Abb. 6.60, Seite 253; Abb. 6.36-6.39, Seiten 214-218) liegt das tertiäre Stickstoffatom der aliphatischen Dimethylaminoalkyl-Seitenkette bei physiologischem pH-Wert (→ pH-Wert der bei den biochemischen und biophysikalischen Experimenten eingesetzten Pufferlösungen) protoniert vor. Aus diesem Grund wurden auch die Minimumskonformere (Kapitel 5.2.2, Seite 122 ff.) bzw. die Kristallstrukturen (→ für das Docking der Verbindungen **4**, **5** und **8**; Kapitel 5.2.1, Seite 116 ff.) der für die *in silico*-Studien ausgewählten Vertreter dieser Verbindungsklassen durch die jeweilige Addition eines Wasserstoffatoms an das tertiäre N-Atom (unter Verwendung des SPARTAN-Baukastensystems <sup>[35,197]</sup>) in die kationische Form überführt, bevor sie in den Docking-Studien als Liganden eingesetzt wurden.

Da bei pH 7,1 nicht nur die Protonierung des Stickstoffatoms der Seitenkette, sondern auch des zyklischen Heteroatoms des Pyridin-Rings erfolgt, wurden die mit den Pyrido[a]anellierten Carbazolen **50** und **52** geplanten *in silico*-Studien dagegen mit den biskationischen Formen dieser Derivate durchgeführt (Kapitel 6.4.5, Seite 289 ff.; Abb. 6.76, Seite 288; Abb. 6.73, Seite 281).

Zur Simulation der DNA-Ligand-Komplexe der Interkalatorcarbonsäuren **1-3** wurden die undissoziierten Neutalmoleküle dieser Testverbindungen verwendet (Kapitel 6.1.1.3, Seite 152 ff.; Abb. 6.1, Seite 148).

Für die mit den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden durchzuführenden Docking-Studien wurden – zur Untersuchung der Sequenzselektivität ihrer DNA-Bindung – vier unterschiedlich aufgebaute, mit „polyA“ (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1JKQ <sup>[265]</sup>), „polyAT“ (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 473D <sup>[266]</sup>), „polyG“ (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1NVP <sup>[267]</sup>) bzw. „polyGC“ (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1CF7 <sup>[268]</sup>) bezeichnete DNA-Moleküle als Rezeptoren verwendet (Kapitel 5.3.1, Seite 129). Bei jeder dieser Matrizen diente ein im Zentrum des jeweiligen Oligonukleotids gelegener, aus vier Basenpaaren bestehender Abschnitt [→ in den folgenden Sequenzen jeweils unterstrichen: Rezeptor „polyA“ → Sequenz: 5'-D(TTTTTTA)-3'; Rezeptor „polyAT“ → Sequenz: 5'-D(GTATATAC)-3'; Rezeptor

„polyG“ → Sequenz: 5'-D(GGGGGGC)-3'; Rezeptor „polyGC“ → Sequenz: 5'-D(TCGCGCGG)-3'] als bevorzugte Bindestelle der zu dockenden Liganden.

Die mit den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden geplanten Bindestudien wurden mit dem Rezeptor „102D“<sup>[36,264]</sup> durchgeführt (Kapitel 5.3.1, Seiten 128-129), wobei auch bei diesem DNA-Doppelstrang eine Sequenz von vier Basenpaaren [→ in der folgenden Sequenz unterstrichen: 5'-D(CGCAAATTTGCG)-3'] als bevorzugte Bindestelle der zu testenden Rinnenbinder ausgewählt wurde.

Zur Untersuchung der DNA-bindenden Eigenschaften der Interkalatorcarbonsäuren, der Pyrido[*a*]anellierten Carbazole und der Combilexine wurde der Rezeptor „1G3X“<sup>[36,80]</sup> herangezogen (Kapitel 5.3.1, Seite 128). Bei den mit den Interkalatorcarbonsäuren und den Carbazol-Derivaten durchgeführten Docking-Simulationen bildeten dabei nur die beiden die Interkalationskavität umschließenden Basenpaare [→ in der folgenden Sequenz unterstrichen: 5'-D(GCGAATTCGCG)-3'] die bevorzugte Bindestelle der Liganden, während für das Docken der Combilexine ein aus vier Basenpaaren bestehender, im Zentrum der Matrize gelegener Abschnitt [→ in der folgenden Sequenz unterstrichen: 5'-D(GCGAATTCGCG)-3'] ausgewählt wurde.

Zur Durchführung der mit Vertretern der Interkalatorcarbonsäuren, der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide, der Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide, der Combilexine und der Pyrido[*a*]anellierten Carbazole geplanten Docking-Studien wurde das bereits zur Programmvalidierung evaluierte Konzept (Kapitel 5.4.1.1, Seite 134 ff.) verwendet, wobei die dort beschriebene Reihenfolge der Arbeitsschritte und die Konfiguration der Programmparameter – abgesehen von den im Folgenden dargestellten Ausnahmen – beibehalten wurden:

- Vor der Konvertierung der \*.pdb-Dateien der als Rezeptoren fungierenden Kristallstrukturen „473D“<sup>[36,266]</sup>, „102D“<sup>[36,264]</sup> und „1G3X“<sup>[36,80]</sup> in das programmeigene ICM-Format wurden die vorhandenen, DNA-gebundenen Liganden (Propamidin, Netropsin bzw. 9-Formylacridin) gelöscht.
- Der Parameter „Thoroughness“ (⇒ „Interactive Docking → Loaded Ligand“; Seite 136), der die Dauer einer Docking-Simulation bestimmt, wurde – in Abhängigkeit von der Molekülgröße der zu untersuchenden Verbindung – bei dem Docking der Interkalatorcarbonsäuren, der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide und der Hetaren[*a*]anellierten Carbazole auf einen Wert von 1, bei

den mit den Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamiden und den Combi-lexinen durchgeführten Bindestudien dagegen auf einen Wert von 2 eingestellt.

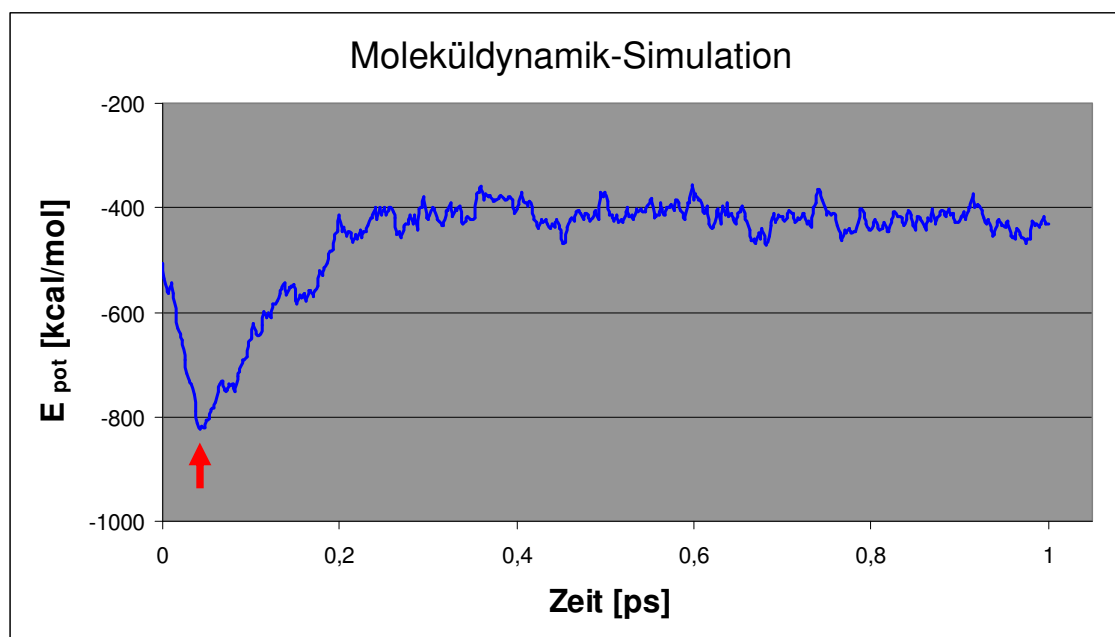
Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> berechneten Komplexe wurde jede Testverbindung, die in den geplanten *in silico*-Studien als Ligand eingesetzt werden sollte, zehnmal an den für die Simulation der DNA-Bindung jeweils ausgewählten Rezeptor gedockt. Nach der Beendigung jeder einzelnen Docking-Simulation wurden die fünf besten Komplexe (bewertet auf der Grundlage des bei der Komplexbildung jeweils freiwerdenden Energiebetrags) mit Hilfe der Option „Browse Stack Conformation“ zunächst graphisch dargestellt. Dabei bewirkte der gemeinsam mit dieser Option verwendete ICM-PRO-Befehl <sup>[32,33]</sup> „Display H-Bonds“, dass in den betrachteten Komplexen auch die bei der DNA-Bindung des Liganden ausgebildeten, intermolekularen Wasserstoffbrücken – mit zusätzlichen Informationen über die Länge der H-Brücken sowie die an deren Aufbau jeweils beteiligten Akzeptoren und Donatoren – abgebildet wurden. Unter den fünf besten Komplexen wurde stets derjenige ausgewählt und gespeichert, bei dessen Bildung ein möglichst hoher Energiebetrag freigesetzt wurde und der gleichzeitig eine plausible, rational nachvollziehbare DNA-Bindung des Liganden aufwies. Nach dem Abschluss der mit einer Testverbindung durchgeführten Docking-Studie lagen folglich zehn DNA-Komplexe dieses Liganden vor, wobei der energetisch günstigste zunächst graphisch ausgewertet und anschließend zur weiteren Bearbeitung in das Programm HYPERCHEM <sup>[34]</sup> (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) überführt wurde (Kapitel 8.2.2, Seite 320).

## 5.4.2 Optimierung der DNA-Ligand-Komplexe mit HYPERCHEM (*Refinement*)

Wie bereits in den Kapiteln 4.2.3 (Seite 111 ff.) und 5.3.1 (Seite 128) erwähnt, handelt es sich bei ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> – in Analogie zur Majorität der zurzeit zur Verfügung stehenden Docking-Programme – um eine Software, die zur DNA-Ligand-Komplexbildung einen sog. *Rigid Receptor Docking*-Algorithmus verwendet<sup>[241]</sup>. Dies bedeutet, dass sich die Konformation des Rezeptors im Verlauf der Docking-Studie nicht verändert, während der Ligand flexibel ist<sup>[241]</sup>. Zur Beseitigung der energiereichen van der Waals-Abstoßungen, die – bedingt durch die Unbeweglichkeit der Docking-Matrize – bei der Einlagerung des Liganden in die Bindetasche des Rezeptors auftreten können, werden üblicherweise Geometrieoptimierungs-<sup>[191,192]</sup> oder Moleküldynamik-Rechnungen<sup>[106,193]</sup> (Kapitel 4.1.3, Seite 97 ff.; Kapitel 4.1.4.1, Seite 101 ff.) an die Docking-Simulationen angeschlossen<sup>[204,271-273]</sup>. Diese konformative Anpassung des Rezeptor-Moleküls an den eingelagerten Liganden wird auch als *Refinement* bezeichnet.

Auch die Konformationen der DNA-Ligand-Komplexe, die mit den im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten, potentiell DNA-aktiven Testverbindungen simuliert und für eine weitere Bearbeitung ausgewählt wurden (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.), sollten optimiert werden, wobei zu diesem Zweck Moleküldynamik-Rechnungen<sup>[193]</sup> (Kapitel 4.1.4.1, Seite 101 ff.) durchgeführt werden sollten. Nach der Überführung der mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> gebildeten Komplexe in das für das *Refinement* verwendete Programm HYPERCHEM<sup>[34]</sup> (Kapitel 4.2.2, Seite 109 ff.; Kapitel 8.2.2, Seite 320) wurden zunächst die Ladungen der Na<sup>+</sup>-Ionen, der Phosphat-Gruppen des DNA-Doppelstrangs und der bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegenden Stickstoffatome der Testverbindungen, sowie die Ladungsverteilung der bei den Liganden miteinander vorhandenen Nitro-Gruppen manuell korrigiert (→ bei dem Datentransfer gehen die Informationen über die Ladungszustände der Atome verloren). Zudem wurden die lokalisierten Doppelbindungen, die nach dem Transfer der ICM-PRO-<sup>[32,33]</sup> in HYPERCHEM-Dateien<sup>[34]</sup> zwischen den Phosphor- und den Sauerstoffatomen der Phosphat- bzw. zwischen den Stickstoff- und den Sauerstoffatomen der Nitro-Gruppen vorlagen, manuell in delokalisierte Doppelbindungen umgewandelt. Anschließend wurden die der Optimierung der DNA-Ligand-Komplexe dienenden Moleküldynamik-Simulationen<sup>[199]</sup> mit der Kraftfeldmethode AMBER<sup>[179,180]</sup> (Kapitel 4.1.1.1,

Seite 91 ff.) unter Verwendung der in Kapitel 5.3.2 (Seiten 130-131) beschriebenen Rechenparameter durchgeführt (Abb. 5.10).



**Abb. 5.10:** Darstellung der zeitabhängigen Änderung der potentiellen Energie einer zu Optimierung der gedockten DNA-Ligand-Komplexe durchgeführten Moleküldynamik-Simulation<sup>[199]</sup>; der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem der Komplex in der energieärmsten Konformation vorliegt [hier: *Refinement* des Komplexes, den das Combilexin **23** (Abb. 6.36, Seite 214) mit dem Rezeptor „1G3X“<sup>[36,80]</sup> bildet]

Nach der Beendigung einer Moleküldynamik-Rechnung<sup>[193]</sup> wurde das Minimumskonformer des jeweils zu optimierenden DNA-Ligand-Komplexes aus dem mehrere Hundert Konformationen umfassenden Kollektiv, welches im Verlauf jeder Simulation gebildet wurde, isoliert (Kapitel 5.3.2, Seite 132). Anschließend erfolgten die Berechnungen der Energien dieser nach dem *Refinement* vorliegenden Komplexe, der Liganden und der Rezeptor-Moleküle (DNA-Doppelstrang + Na<sup>+</sup>-Ionen), wobei zu diesem Zweck in HYPERCHEM<sup>[34]</sup> *Single Point Energy*-Rechnungen (→ Energieberechnungen ohne Änderung der Molekülgeometrien<sup>[178]</sup>) unter Verwendung des Kraftfeldes AMBER<sup>[179,180]</sup> (Parametrisierung: AMBER3) durchgeführt wurden. Die bei der Komplexbildung jeweils freiwerdenden Energien  $\Delta E$  konnten daraufhin mit der unten aufgeführten Formel ermittelt werden<sup>[49,271]</sup> [Gleichung (2)]:

$$(2) \quad \Delta E = E_{\text{Komplex}} - (E_{\text{DNA}} + E_{\text{Ligand}})$$



Auf die gleiche Weise wurden auch die auf van der Waals-Interaktionen, elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen zurückzuführenden Komplexbildungsenergien  $\Delta E_{\text{vdW}}$ ,  $\Delta E_{\text{elec}}$  und  $\Delta E_{\text{H-Bonds}}$  <sup>[178,209]</sup> bestimmt, wobei die Komponenten des Kraftfeldes AMBER <sup>[179,180]</sup>, die bei den *Single Point Energy*-Rechnungen jeweils berücksichtigt werden sollten (Kapitel 5.3.2, Seite 130), entsprechend geändert wurden.

### 5.4.3 Untersuchung der Konformationen der DNA-gebundenen Liganden mit SPARTAN

Nach dem *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) wurden die DNA-Doppelstränge und die Na<sup>+</sup>-Ionen der optimierten DNA-Ligand-Komplexe gelöscht und die DNA-gebundenen Konformere der Testverbindungen zur weiteren Untersuchung in das Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> überführt (Kapitel 4.2.1, Seite 108 ff.; Kapitel 8.2.2, Seite 320). Dort erfolgte die Ermittlung einiger potentiell die DNA-Aktivität der Liganden beeinflussenden Moleküleigenschaften, wie das molekulare elektrostatische Potential (Kapitel 4.1.2, Seite 96), die Grenzorbitalenergien und das Dipolmoment. Zu diesem Zweck wurden *Single Point Energy*-Rechnungen (→ Energieberechnungen ohne Änderung der Molekülgeometrien <sup>[178]</sup>) mit der semiempirischen AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> (Kapitel 4.1.2.1, Seite 96) unter Berücksichtigung der in Kapitel 5.2.2 (Seite 127) beschriebenen Parameter durchgeführt (dabei wurde die Einstellung „Total Charge“ bei der Berechnung der Konformere der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide, der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide und der Combilexine von „Neutral“ auf „Cation“, bei der Berechnung der Konformere der Pyrido[a]carbazol-Derivate von „Neutral“ auf „Dication“ geändert). Die Testverbindungen, die eine Nitro-Gruppe im Molekül aufwiesen, wurden vor diesen Simulationen zunächst noch bearbeitet, indem die lokalisierten Doppelbindungen, die – bedingt durch den Datentransfer – zwischen dem Stickstoffatom und den Sauerstoffatomen vorlagen, in delokalisierte Doppelbindungen umgewandelt wurden.

Zudem wurden einige, in den Kapiteln 6.1.2.3 (Seite 172 ff.), 6.2.4 (Seite 198 ff.) und 6.3.5 (Seite 246 ff.) detailliert beschriebene Torsionswinkel der DNA-gebundenen Liganden gemessen und, mit Hilfe der in SPARTAN <sup>[35]</sup> implementierten *Alignment*-Option, graphische Vergleiche der Binde- und der Minimumskonformation der

Testverbindungen angestellt (Abb. 6.12, Seite 175; Abb. 6.26, Seite 200; Abb. 6.59, Seite 251), um Aussagen über einen bei der Komplexbildung evtl. auftretenden Induced-Fit machen zu können.

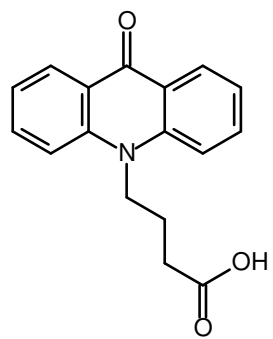
## 6. Ergebnisse der Computersimulationen und der biochemischen und biophysikalischen Experimente

### 6.1 Basis-Strukturen

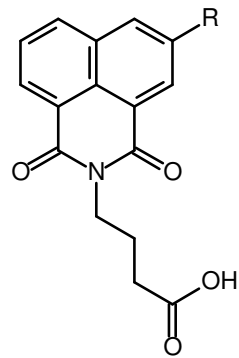
#### 6.1.1 Interkalatoren

##### 6.1.1.1 Einleitung und Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 (Seite 37 ff.) näher erläutert, weisen einige Acridon- und Naphthalimid-Verbindungen antivirale, antiproliferative und zytotoxische Aktivitäten auf <sup>[60,74,98]</sup>. Aus diesem Grund sollten die bei der Synthese der Combilexine (Kapitel 6.3, Seite 212 ff.) eingesetzten Interkalator-Derivate Acridon-, Naphthalimid- und 5-Nitronaphthalimidbuttersäure <sup>[38]</sup> (Abb. 6.1, Seite 148) auf ihre DNA-bindenden Eigenschaften untersucht werden. Mittels  $T_m$ -Wert-Messungen wurde überprüft, ob die Interkalatoren allein, d. h. ohne Verknüpfung mit der rinnenbindenden Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Struktur, schon eine detektierbare DNA-Affinität zeigen. Ergänzend zu diesen biophysikalischen Experimenten wurden Molecular Modelling-Studien durchgeführt. Hierbei sollten einige Moleküleigenschaften (u. a. das molekulare elektrostatische Potential und die Grenzorbital-Energien  $E_{HOMO}$  und  $E_{LUMO}$ ), die für die Beurteilung der Stärke der bei der DNA-Interkalation der Testverbindungen gebildeten Charge-Transfer-Komplexe wichtig sind <sup>[72,78,274]</sup> (Kapitel 2.2.5, Seite 31 ff.) berechnet und DNA-Ligand-Komplexe simuliert werden. Durch Korrelation der *in vitro*- und *in silico*-Daten sollten Begründungen für die unterschiedlichen DNA-Affinitäten der Combilexine, die die verschiedenen Interkalator-Moleküle enthalten, gefunden werden.



**1**



R = -H: **2**

R = -NO<sub>2</sub>: **3**

**Abb. 6.1:** Strukturformeln der untersuchten Interkalatorcarbonsäuren

### 6.1.1.2 T<sub>m</sub>-Wert-Messungen

Die mit poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA durchgeführten T<sub>m</sub>-Wert-Messungen (Kapitel 3.4.1, Seite 64 ff.) zeigen, dass die untersuchten Interkalatoren keine bzw. eine nur sehr geringe DNA-Affinität besitzen (Tab. 6.1). Da die natürliche Kalbsthymus-DNA (~42% GC-Basen-Anteil <sup>[30,31]</sup>) eine geringere Sensitivität gegenüber DNA-Liganden besitzt als die routinemäßig eingesetzte, nur aus AT-Basenpaaren bestehende DNA <sup>[119,275]</sup> – mit letzterer werden stets größere ΔT<sub>m</sub>-Werte ermittelt – wurde auf ergänzende Messungen mit Thymus-DNA verzichtet.

	1	2	3
ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	n. a.	n. a.	1,5 ± 0,36

**Tab. 6.1:** ΔT<sub>m</sub>-Werte der untersuchten Interkalatorcarbonsäuren  
(ΔT<sub>m</sub>-Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)  
n. a.: Substanz bindet nicht an die DNA, ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] ≤ 1 °C

### 6.1.1.3 Molecular Modelling-Studien

Für die Beurteilung der Stärke des bei einer interkalativen DNA-Bindung gebildeten Charge-Transfer-Komplexes sind die HOMO-Energien (E<sub>HOMO</sub>) der als Elektronendonatoren fungierenden Purin-Basen Adenin und Guanin, die LUMO-Energien (E<sub>LUMO</sub>) der Interkalator-Moleküle (→ Elektronenakzeptoren) und die Differenzen dieser beiden Werte wichtig <sup>[72,78,274]</sup> (Kapitel 2.2.5, Seite 31 ff.). Aus diesem Grund wurden die Grenzorital-Energien der Minimumskonformationen der Testverbindungen **1-3** (Abb. 6.1, Seite 148) und die der Purin-Basen unter Anwendung einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> im Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> ermittelt. Die erwähnten Minimumskonformere sind das Resultat der mit den Interkalatorcarbonsäuren und den DNA-Basen Adenin und Guanin zuvor durchgeführten Konformeranalysen (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.). Da die Buttersäure-Derivate in dem für die T<sub>m</sub>-Wert-Messungen eingesetzten Puffermedium (→ physiologischer pH-Wert von 7,1) teilweise deprotoniert vorliegen, wurden die Grenzorital-Energien sowohl für die undissoziierten Säuren als auch für die korrespondierenden Carboxylat-Anionen

berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Die Pyrimidin-Basen weisen mit -9,61 eV (→ Thymin) bzw. -9,38 eV (→ Cytosin) jeweils niedrigere  $E_{\text{HOMO}}$ -Werte auf als Adenin und Guanin, so dass der Einfluss von Thymin und Cytosin auf das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking vernachlässigt werden kann [72,78,274].

	$E_{\text{HOMO}}^1$ [eV]	$E_{\text{LUMO}}^1$ [eV]	Differenz $ E_{\text{HOMO}}(\text{A}) - E_{\text{LUMO}} ^2$ [eV]	Differenz $ E_{\text{HOMO}}(\text{G}) - E_{\text{LUMO}} ^3$ [eV]
<b>Adenin</b>	-8,77	-0,11	-	-
<b>Guanin</b>	-8,52	-0,12	-	-
<b>1</b>	-8,36	-0,39	8,38	8,13
<b>2</b>	-9,54	-1,52	7,25	7,0
<b>3</b>	-10,15	-2,18	6,59	6,34
<b>1 (Anion)</b>	-4,67	1,79	-	-
<b>2 (Anion)</b>	-4,0	0,59	-	-
<b>3 (Anion)</b>	-4,12	-0,06	-	-

**Tab. 6.2:**  $E_{\text{HOMO}}$ - und  $E_{\text{LUMO}}$ -Werte der Testverbindungen und der Purin-Basen der DNA

<sup>1</sup>: Unter Anwendung einer semiempirische AM1-Rechnung [184,185] in SPARTAN [35] ermittelt

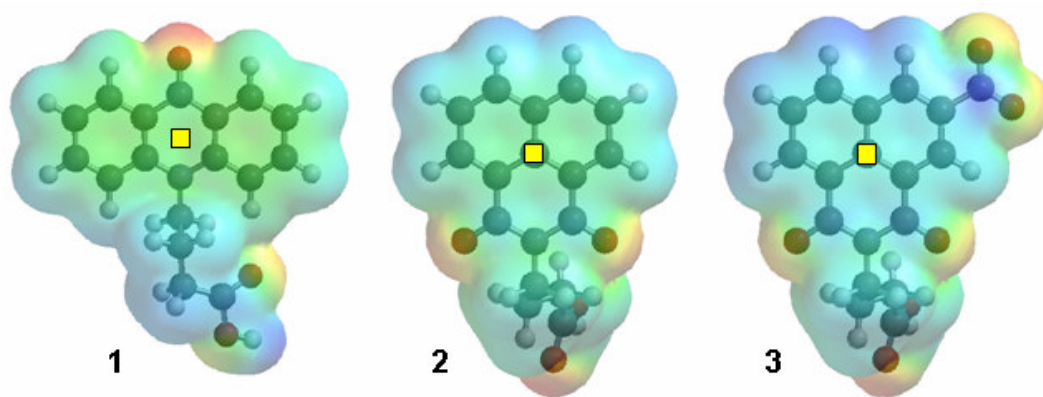
<sup>2</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung)

<sup>3</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Guanin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung)

Aus den in SPARTAN [35] durchgeführten Molecular Modelling-Studien geht hervor, dass jedes der drei untersuchten Interkalator-Derivate in undissoziierter Form die Voraussetzungen für die Bildung eines Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexes (EDA-Komplex) mit der DNA erfüllt [72,78,274] (Kapitel 2.2.5, Seite 31 ff.): Den ermittelten Koeffizientengrößen zur Folge ist das LUMO stets über dem interkalierenden Chromophor (Acridon, Naphthalimid bzw. 5-Nitronaphthalimid) lokalisiert und die berechneten LUMO-Energien der Testverbindungen sind erheblich niedriger als die der Purin-Basen (Tab. 6.2).

Im Gegensatz dazu ist ein  $\pi$ - $\pi$ -Stacking der korrespondierenden Carboxylat-Anionen mit der DNA nicht möglich. Sie können in einem Charge-Transfer-Komplex aufgrund ihrer im Vergleich zu Adenin und Guanin höheren  $E_{\text{LUMO}}$ -Werte und der Lokalisation des HOMO – das höchste besetzte Molekülorbital liegt über der Carboxylat-Gruppe und nicht über dem jeweiligen trizyklischen Ringsystem – weder als Elektronenakzeptoren noch als Elektronendonatoren fungieren.

Neben den LUMO-Energien wirkt sich auch die Ladungsverteilung im chromophoren System auf die Elektronenakzeptoreigenschaften der Interkalatorcarbonsäuren und somit auf die Stabilität der mit der DNA gebildeten Charge-Transfer-Komplexe aus. Mit Hilfe des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP), bei dessen Berechnung die Elektronendichteverteilungen und die Kernladungen <sup>[25]</sup> berücksichtigt werden, kann die Ladungsverteilung in einem Molekül visualisiert werden (Kapitel 4.1.2, Seite 96). Das MEP im Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen elektrostatischen Potentials (hohe Elektronendichte) wieder, während blaue Felder das Vorhandensein eines positiven elektrostatischen Potentials (niedrige Elektronendichte) anzeigen <sup>[197]</sup>. Die für die undissoziierten Formen der Testverbindungen **1-3** (Abb. 6.1, Seite 148) mit Hilfe einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> ermittelten MEPs (Kapitel 5.2.2, Seite 127) sind in Abb. 6.2 graphisch dargestellt; die in der Mitte der trizyklischen Chromophore jeweils gemessenen Potential-Werte sind in Tab. 6.3 (Seite 152) aufgeführt.



**Abb. 6.2:** Molekulares elektrostatisches Potential der drei Interkalatorcarbonsäuren

[Berechnung des MEP in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von -70,0 kcal/mol bis +40,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an <sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (Lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht <sup>[25,197]</sup>]

	1	2	3
<b>Elektrostatisches Potential<sup>1</sup></b> <b>[kcal/mol]</b>	-13,93	-5,41	8,26

**Tab. 6.3:** Molekulares elektrostatisches Potential der drei Interkalatorcarbonsäuren

<sup>1</sup>: Messung des MEP in der Mitte des trizyklischen Chromophors [Messpunkte: in Abb. 6.2 (Seite 151) durch kleine gelbe Quadrate markiert] nach einer in SPARTAN<sup>[35]</sup> durchgeführten semiempirischen AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup>

Die durchgeführten Berechnungen zeigen, dass die Nitronaphthalimid-Verbindung **3**, im Gegensatz zu dem Naphthalimid-Analogen **2**, ein positives molekulares elektrostatisches Potential besitzt. Dies ist auf den -I/-M-Effekt der Nitro-Gruppe zurückzuführen, der – neben einer Absenkung der LUMO-Energie (Tab. 6.2, Seite 150) – auch eine Abnahme der Ladungsdichte im interkalierenden Trizyklus zur Folge hat. Das Acridon-Derivat **1** weist dagegen die höchste Elektronendichte der drei untersuchten Testverbindungen auf (Tab. 6.3).

Da die Berechnungen der LUMO-Energien gezeigt haben (Seiten 150-151), dass die Carboxylat-Anionen der Interkalator-Derivate keine Charge-Transfer-Komplexe mit der DNA bilden können, wurden die Testverbindungen **1-3** (Abb. 6.1, Seite 148) in Form der undissoziierten Säuren in den anschließenden Docking-Studien eingesetzt. Das DNA-Oligonukleotid mit dem PDB-Code<sup>[36]</sup> 1G3X<sup>[80]</sup> [Sequenz: 5'-D(\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'] diente als Rezeptor. Die für die Interkalation eines Moleküls erforderliche Aufweitung der DNA-Basen kann wegen der im Programm ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> vorliegenden Unbeweglichkeit eines Nukleinsäure-Rezeptors (*Rigid Receptor Docking*) nicht während des Docking-Prozesses erfolgen<sup>[241]</sup> (Kapitel 4.2.3, Seite 111 ff.; Kapitel 5.3.1, Seite 128; Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.). Aus diesem Grund müssen die für Interkalationsstudien verwendeten Matrizen bereits vor der DNA-Ligand-Komplexbildung eine Interkalationskavität aufweisen, welche im hier verwendeten Oligomer „1G3X“<sup>[36,80]</sup> zwischen zwei AT-Basenpaaren lokalisiert ist.

Nach den Docking-Studien wurden die DNA-Ligand-Komplexe in dem Programm HYPERCHEM<sup>[34]</sup> mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen<sup>[193]</sup> (MD-Simulationen) optimiert, wobei das Kraftfeld AMBER<sup>[179,180]</sup> als Rechenmethode verwen-



det wurde (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.). Die nach diesem als *Refinement* bezeichneten Prozess errechneten Komplexbildungsenergien sind zusammen mit den mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> ermittelten Docking-Energien in Tab. 6.4 aufgeführt.

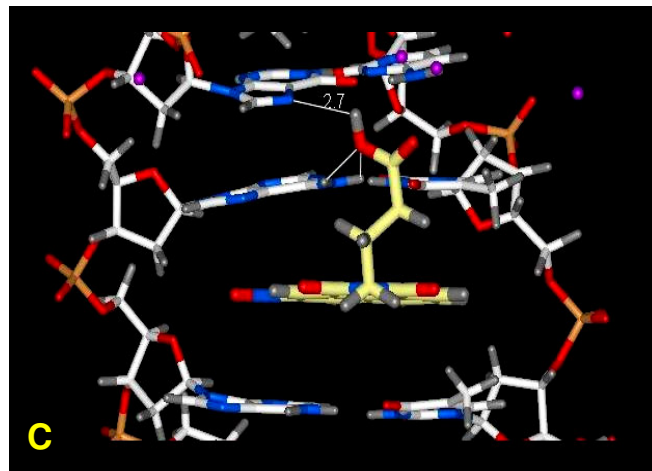
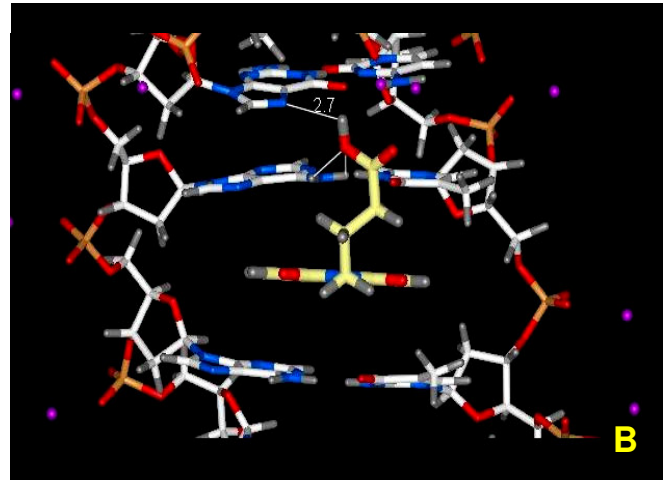
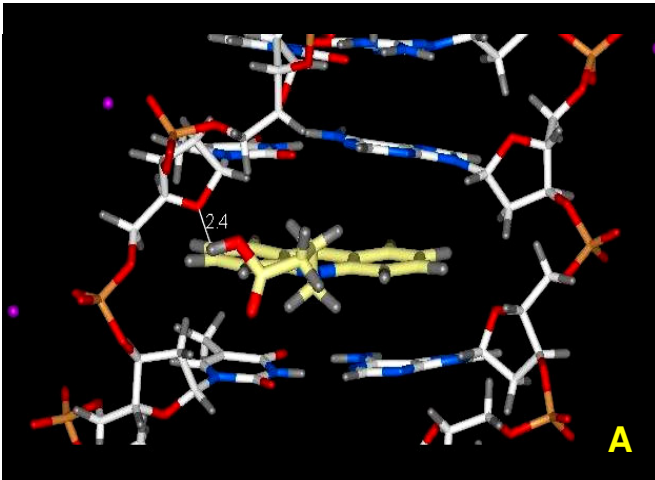
	1	2	3
<b>Komplexbildungsenergie ICM-PRO<sup>1</sup> [kcal/mol]</b>	-54,9	-55,4	-59,6
<b>Komplexbildungsenergie HYPERCHEM<sup>2</sup> [kcal/mol]</b>	-43,9	-39,2	-44,7

**Tab. 6.4:** Komplexbildungsenergien der mit den Interkalatorcarbonsäuren simulierten DNA-Ligand-Komplexe

<sup>1</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> nach dem DNA-Ligand-Docking

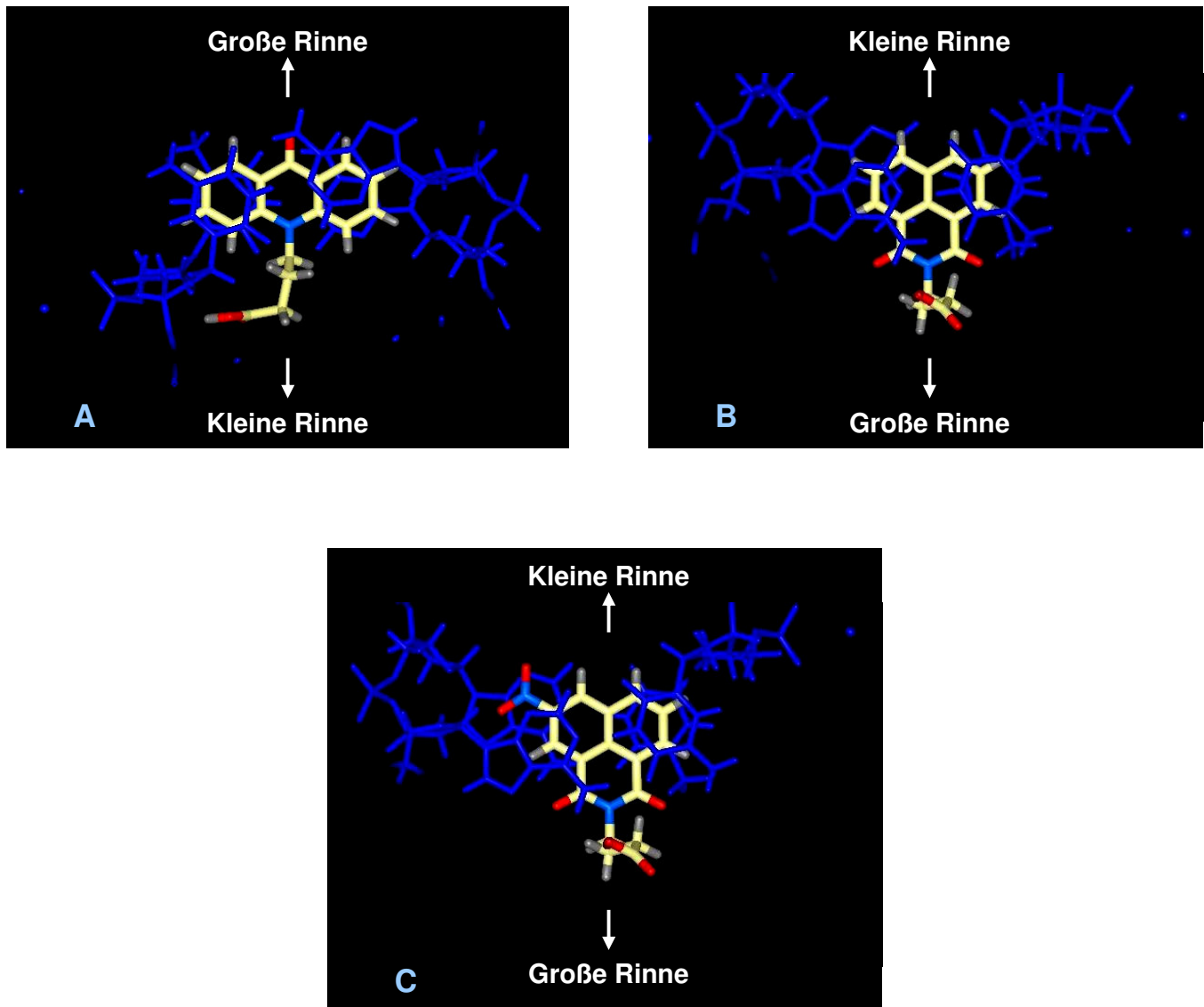
<sup>2</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit HYPERCHEM<sup>[34]</sup> nach dem *Refinement* (→ Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup>, durchgeführt mit der Kraftfeld-Methode AMBER<sup>[179,180]</sup>)

In den mit den Interkalatorcarbonsäuren (Abb. 6.1, Seite 148) simulierten Komplexen ist der chromophore Teil der Liganden jeweils in die Interkalationskavität eingelagert, während die Buttersäure-Partialstruktur bei dem Acridon-Derivat **1** in die kleine Rinne, bei dem Naphthalimid-Molekül **2** und dem Nitronaphthalimid-Analogon **3** dagegen in die große Furche ragt (Abb. 6.3-6.4, Seiten 154-155). Die Acridonbuttersäure baut im DNA-Ligand-Komplex eine H-Brücke zu dem Ringsauerstoff (O-4\*) der Desoxyribose eines Thymin-Nukleotids auf, wobei die Hydroxyl-Gruppe der Säure als Donator fungiert (Abb. 6.3A, Seite 154). In den beiden mit den Derivaten **2** und **3** simulierten Komplexen liegen dagegen jeweils zwei intermolekulare H-Brücken vor. Eine Dreizentren-Wasserstoffbrücken-Bindung wird zwischen den beiden Wasserstoffatomen der Amino-Gruppe (N-6) einer Adenin-Base und dem Sauerstoffatom der Hydroxyl-Gruppe der Liganden ausgebildet. In der zweiten H-Brücke dient dieses Sauerstoffatom als Donator; das der großen Rinne zugewandte, zyklische Stickstoffatom einer Guanin-Base (N-7) stellt den zugehörigen H-Brücken-Akzeptor dar (Abb. 6.3B und 6.3C, Seite 154; Atombezeichnung der Nukleotide: Abb. 2.1, Seite 17).



**Abb. 6.3:** Darstellung der mit den Interkalator-Derivaten simulierten DNA-Ligand-Komplexe: **A:** Acridonbuttersäure **1**; **B:** Naphthalimidbuttersäure **2**; **C:** 5-Nitronaphthalimidbuttersäure **3**

(Docking-Studien mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> durchgeführt; Rezeptor: „1G3X“ <sup>[36,80]</sup>; H-Brücken zwischen DNA und Ligand sind als weiße Linien dargestellt; Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)



**Abb. 6.4:** Ausschnitt aus den mit den Interkalator-Derivaten simulierten DNA-Ligand-Komplexen: **A:** Acridonbuttersäure **1**; **B:** Naphthalimidbuttersäure **2**; **C:** 5-Nitronaphthalimidbuttersäure **3**

(Docking-Studien mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> durchgeführt; Rezeptor: „1G3X“ <sup>[36,80]</sup>; die beiden AT-Basenpaare, die die Interkalationskavität bilden, sind in blau dargestellt; Blickrichtung parallel zur DNA-Helixachse)

#### 6.1.1.4 Diskussion der Ergebnisse

Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass das Acridon-Derivat **1** und das Naphthalimid-Analogon **2** keine DNA-Aktivität besitzen (Tab. 6.1, Seite 149). Dagegen führt die Nitrierung des chromophoren Ringsystems, bedingt durch den -I/-M-Effekt des Substituenten, bei der 5-Nitronaphthalimid-Verbindung **3** zu einer deutlichen Absenkung der LUMO-Energie und, damit verbunden, zu einer Verringerung der Elektronendichte im Molekül (Tab. 6.2, Seite 150; Tab. 6.3, Seite 152). Aus diesem Grund sind die Differenzen zwischen den  $E_{\text{HOMO}}$ -Werten der Purin-Basen und dem  $E_{\text{LUMO}}$ -Wert der undissoziierten Säure bei der Verbindung **3** kleiner als bei den beiden anderen Interkalatorcarbonsäuren, so dass das Nitronaphthalimid-Derivat den stärksten Charge-Transfer-Komplex mit der DNA bilden kann (Tab. 6.2, Seite 150). Zum einen äußert sich dies in einer schwachen, aber dennoch messbaren DNA-Affinität. Außerdem wurde mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> ein um etwa 4 kcal/mol höherer Energiebetrag für die DNA-Bindung dieses Moleküls ermittelt, als für die mit den analogen Derivaten simulierten DNA-Ligand-Komplexe (Tab. 6.4, Seite 153).

Die bei der Acridon- und bei der Naphthalimid-Buttersäure jeweils fehlende bzw. bei der Nitronaphthalimid-Verbindung nur sehr schwach ausgeprägte DNA-Aktivität ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ein Teil der Buttersäure-Moleküle bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vorliegt. Diese Carboxylat-Anionen können aufgrund der im Vergleich zu den Purin-Basen höheren  $E_{\text{LUMO}}$ -Werte kein  $\pi$ - $\pi$ -Stacking mit der DNA eingehen (Tab. 6.2, Seite 150).

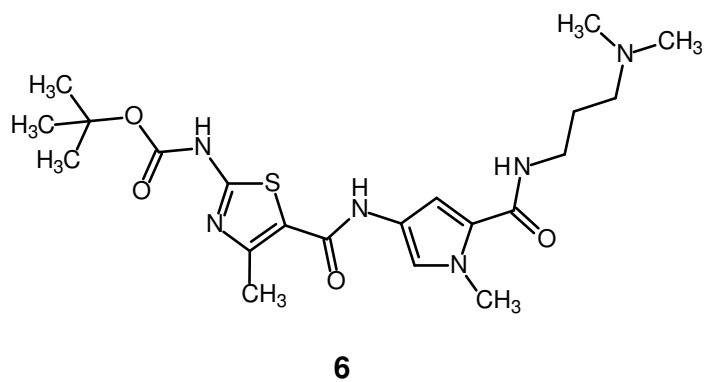
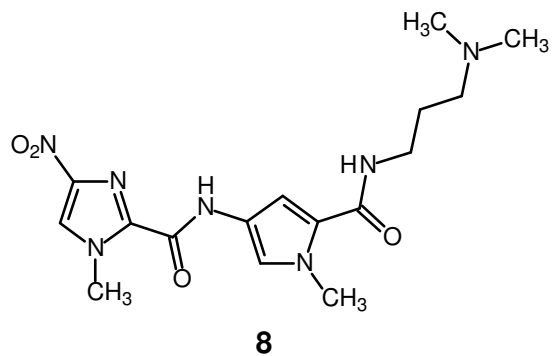
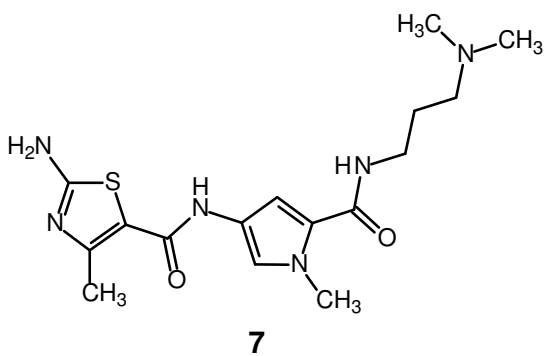
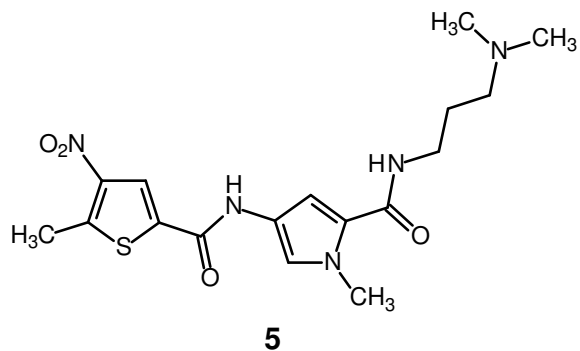
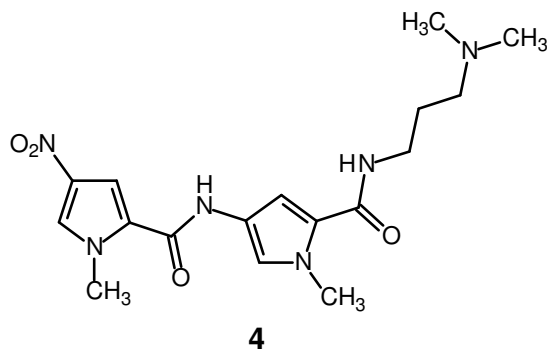
Die nach dem *Refinement* der gedockten DNA-Ligand-Komplexe mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup> errechneten Energien weichen von den mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> erhobenen Daten teilweise ab. Für die DNA-Bindung der 5-Nitronaphthalimidbuttersäure **3** wird eine im Vergleich zu dem mit dem Acridon-Analogon **1** simulierten DNA-Ligand-Komplex nur geringfügig höhere Energie ermittelt. Die schwächste DNA-Aktivität wird dagegen dem Naphthalimid-Derivat **2** zugesprochen (Tab. 6.4, Seite 153).

Mit den Interkalatorcarbonsäuren wurden aufgrund ihrer fehlenden oder nur schwach ausgeprägten DNA-Affinitäten keine weiteren Tests wie z. B. Ethidiumbromid-Verdrängungsassays, Topoisomerase I-Hemmtests oder Zytotoxizitätsstudien des NCI (*National Cancer Institute*) durchgeführt.

## 6.1.2 Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamide

### 6.1.2.1 Einleitung und Zielsetzung

Durch Röntgenstrukturanalysen konnten die Konfigurationen der bei der Synthese der Combilexine als rinnenbindende Strukturen eingesetzten Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **4-6** und **8** (Abb. 6.5, Seite 158) aufgeklärt werden <sup>[38,258-260,276]</sup>. Die daraus resultierenden Kristallstrukturen dieser Verbindungen sollten zunächst dazu genutzt werden, die verwendeten Molecular Modelling-Methoden zur Konformeranalyse und zur Berechnung der Moleküleigenschaften der im Arbeitskreis *Pindur* synthetisierten Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184), Combilexine (Abb. 6.36-6.39, Seiten 214-218) und [a]anellierten Carbazole (Abb. 6.73, Seiten 280-281) zu validieren (Kapitel 5.2.1, Seite 116 ff.). Ergänzend zu den mit den Interkalatorcarbonsäuren **1-3** durchgeführten  $T_m$ -Wert-Messungen (Kapitel 6.1.1.2, Seite 149) wurden außerdem die DNA-Affinitäten des Bispyrrol-Derivats **4** und der bioisosteren Hetaren-pyrrolcarboxamide **5-8** ermittelt. Hierbei sollte überprüft werden, welche DNA-Aktivitäten diese Verbindungen schon vor der Verknüpfung mit einem Interkalator aufweisen. Dabei stellte sich heraus, dass das Derivat **6**, bedingt durch die großvolumige BOC-Schutzgruppe, nur schwach an die DNA binden kann, während das durch Abspaltung der BOC-Gruppe aus der Verbindung **6** hervorgehende Aminothiazol-pyrrolcarboxamid **7** (Abb. 6.5, Seite 158) eine gute DNA-Affinität besitzt. Da keine Kristallstruktur des Derivats **7** zur Verfügung stand, wurde mit Hilfe einer in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> durchgeführten Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) eine Minimumskonformation dieses Derivats simuliert. Die so gewonnene Molekül-Konformation der Aminothiazol-Verbindung **7** wurde anschließend, neben den Kristallstrukturen der Derivate **4** <sup>[258]</sup>, **5** <sup>[259]</sup> und **8** <sup>[260]</sup>, als Ligand in den geplanten Docking-Studien eingesetzt. Dabei sollten die hier aufgeführten Derivate an Oligonukleotide unterschiedlicher Basensequenzen gedockt werden, um Aussagen bezüglich der Stärke der DNA-Affinität und der Sequenzselektivität der DNA-Bindung der verschiedenen Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide, die den rinnenbindenden Strukturteil der Combilexine (Kapitel 6.3, Seite 212 ff.) bilden, machen zu können.



**Abb. 6.5:** Strukturformeln der untersuchten Fünfring-Heteren-pyrrolcarboxamide

### 6.1.2.2 T<sub>m</sub>-Wert-Messungen

Die DNA-Affinitäten der Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamide **4-8** (Abb. 6.5, Seite 158) wurden mittels T<sub>m</sub>-Wert-Messungen bestimmt (Tab. 6.5; Kapitel 3.4.1, Seite 64 ff.). Für diese biophysikalischen Studien wurde neben der synthetischen, nur aus alternierend angeordneten AT-Basenpaaren aufgebauten DNA [hier „poly(dAdT)<sub>2</sub>“ genannt] auch natürliche Kalbsthymus-DNA eingesetzt, wobei letztere einen ca. 42%-igen Anteil an GC-Basen im Molekül aufweist<sup>[30,31]</sup>. Setzt man die mit diesen beiden DNA-Polymeren ermittelten ΔT<sub>m</sub>-Werte in Relation zueinander (verwendete Rechenformel: {ΔT<sub>m</sub>(Thymus) / ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>]} x 100), so lassen sich Aussagen über die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der Testsubstanzen machen.

	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	1,9 ± 0,08	3,2 ± 0,75	2,1 ± 0,61	13,4 ± 0,22	1,4 ± 0,23
ΔT <sub>m</sub> (Thymus-DNA) [°C]	1,2 ± 0,21	0,7 ± 1,10	n. b.	2,8 ± 0,14	n. a.

**Tab. 6.5:** ΔT<sub>m</sub>-Werte der untersuchten Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamid-Derivate

(ΔT<sub>m</sub>-Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)

n. a.: Substanz bindet nicht an die DNA, ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] ≤ 1 °C

n. b.: ΔT<sub>m</sub>-Wert wurde nicht bestimmt

Aus den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen geht hervor, dass das Aminothiazol-pyrrolcarboxamid **7** nur mit einer geringen Aktivität an Thymus-DNA bindet, während die Affinität für AT-reiche DNA mit einem ΔT<sub>m</sub>-Wert von >10 °C als vergleichsweise hoch zu bezeichnen ist (Tab. 6.5). Die mit oben aufgeführter Formel berechnete Relation der mit den beiden DNA-Polymeren erhaltenen Werte liegt bei 20,9% (zum Vergleich: für Netropsin, ein hoch AT-selektiv bindender *Minor Groove Binder*, wurde ein Verhältnis von 41,1% ermittelt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Aminothiazol-Derivat bei der DNA-Bindung AT-reiche Abschnitte bevorzugt.

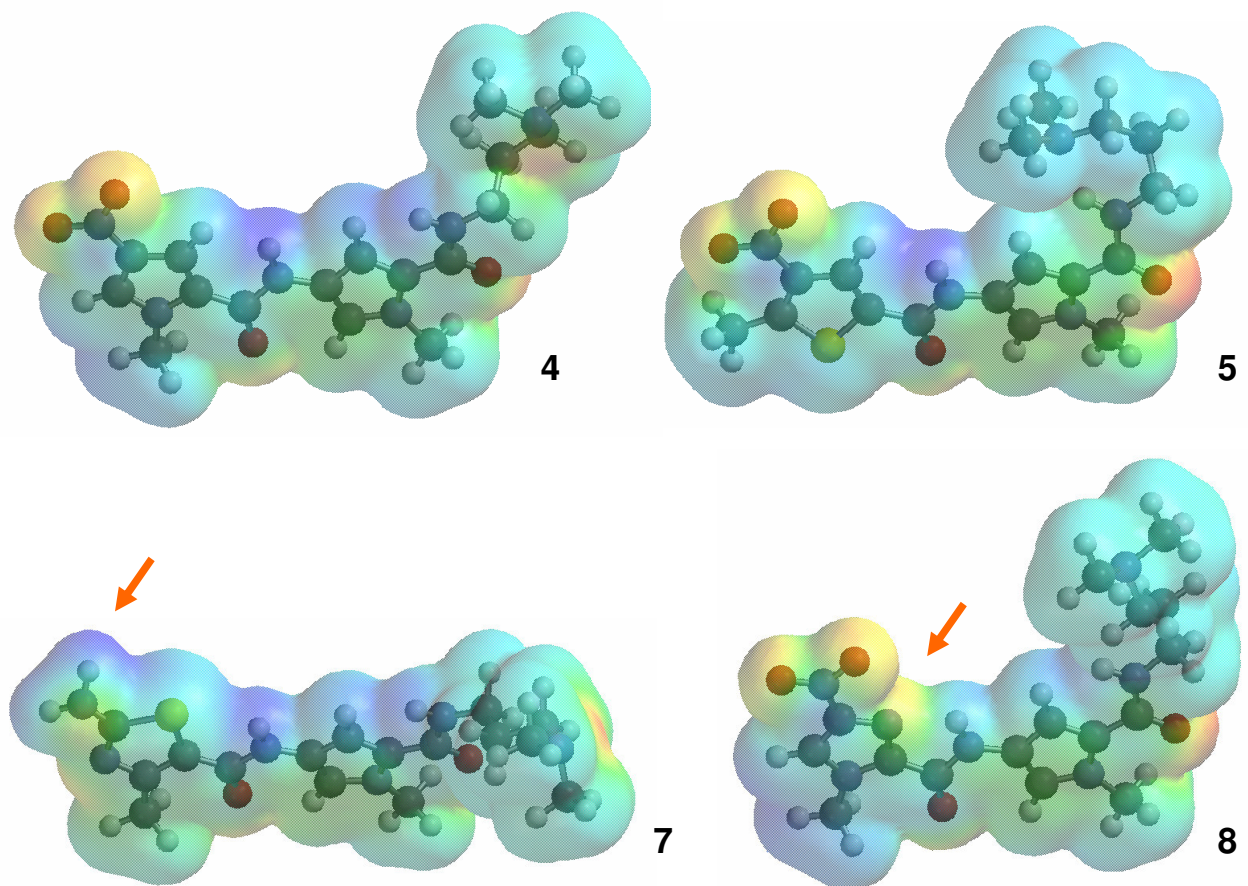
Die Hetaren-Pyrrolcarboxamid-Derivate **4-6** und **8** weisen eine im Vergleich zur Verbindung **7** nur sehr schwach ausgeprägte DNA-Affinität auf. Die jeweils mit Thymus-DNA und poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA errechneten ΔT<sub>m</sub>-Werte sind zu niedrig, um bei

diesen Molekülen Aussagen bezüglich der Sequenzselektivität der DNA-Bindung machen zu können.

### 6.1.2.3 Molecular Modelling-Studien

Die aus AT-Basenpaaren bestehende kleine Rinne unterscheidet sich von der nur aus GC-Nukleotiden aufgebauten kleinen Furche nicht nur in dem Profil der jeweils für H-Brücken-Bindungen zur Verfügung stehenden Donator- und Akzeptorgruppen (AT-Basen: Adenin N-3 und Thymin O-2 als Akzeptoren; GC-Basen: Guanin N-2 als Donator, flankiert von Guanin N-3 und Cytosin O-2 als Akzeptoren <sup>[42,44]</sup>; Atombezeichnung der Nukleotide: Abb. 2.1, Seite 17), sie ist auch tiefer, schmaler und weist ein stärker negatives elektrostatisches Potential auf <sup>[42,109]</sup> (Kapitel 2.3.2 Seite 43). Die Ladungsverteilung eines *Minor Groove Binder* beeinflusst folglich die Affinität und die Sequenzselektivität, mit der die Substanz an die DNA bindet. Aus diesem Grund wurde das MEP (molekulares elektrostatisches Potential; Kapitel 4.1.2, Seite 96) des untersuchten Bispyrrol-Derivats **4** und der bioisosteren Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **5**, **7** und **8** (Abb. 6.5, Seite 158) in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> unter Anwendung einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> ermittelt (Kapitel 5.2.2, Seite 127). Hierbei wurde vor allem die Ladungsverteilung der jeweils dem Rezeptor zugewandten, konkaven Molekülseite untersucht. Die für die Testverbindungen errechneten MEPs sind in Abb. 6.6 (Seite 161) graphisch dargestellt.





**Abb. 6.6:** Molekulares elektrostatisches Potential der untersuchten Fünfring-Hetero-pyrrolicarboxamide

[Berechnung des MEP in SPARTAN<sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von -80,0 kcal/mol bis +40,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an<sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht<sup>[25,197]</sup>; die orangefarbenen Pfeile weisen auf Besonderheiten des MEP hin, auf die im Text näher eingegangen wird]

Bei der Betrachtung der kalkulierten MEPs der untersuchten Verbindungen fallen zwei Besonderheiten auf, die in Abb. 6.6 durch orangefarbene Pfeile markiert sind. Die synthesebedingte Substitution des Thiazol-Derivats **7** mit einer Amino-, statt der sonst üblicherweise N-terminal gebundenen Nitro-Gruppe (Abb. 6.5, Seite 158), hat eine Zunahme des positiven elektrostatischen Potentials der konkaven Molekülseite zur Folge. Dadurch wird die Bindung in der von AT-Basenpaaren gebildeten, elektronenreichen kleinen Rinne verstärkt, was an dem vergleichsweise hohen  $\Delta T_m$ -Wert zu erkennen ist, der für diese Verbindung ermittelt wurde (Tab. 6.5, Seite 159). Bei dem Imidazol-Derivat **8** dagegen wird das positive MEP des dem Rezeptor zugewandten

Molekülteils durch das sp<sup>2</sup>-hybridisierte Stickstoffatom des Imidazol-Rings herabgesetzt. Dies resultiert in einer Abnahme der mittels T<sub>m</sub>-Wert-Messung detektierbaren DNA-Affinität.

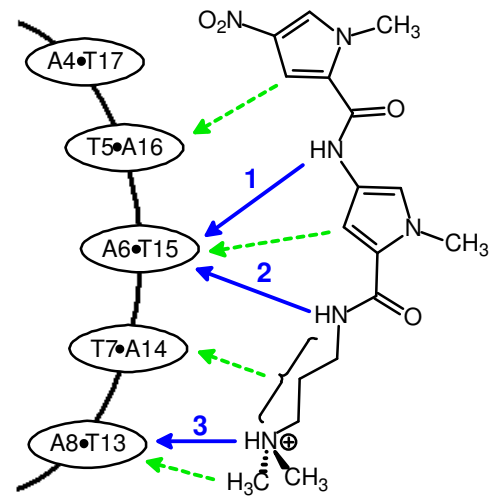
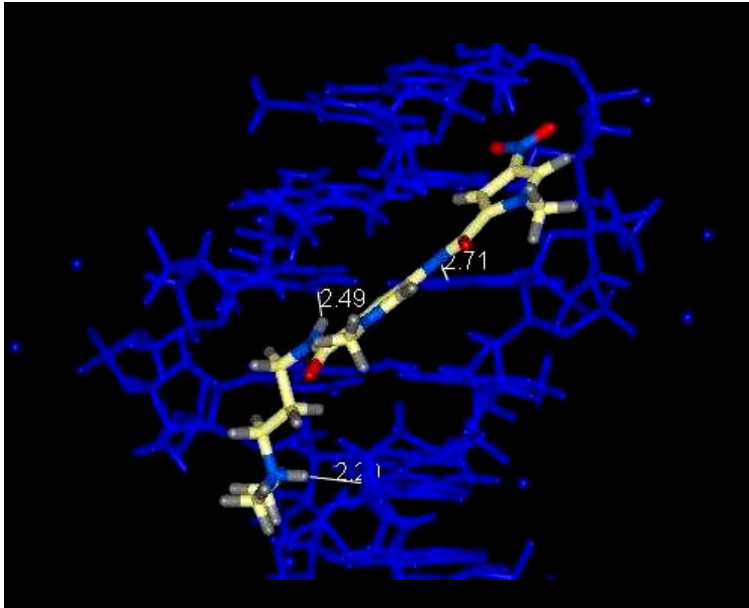
In den anschließenden Docking-Simulationen wurden die zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **4** [258], **5** [259] und **8** [260] ebenso wie das in SPARTAN [35] errechnete Minimumskonformer des Aminothiazol-Derivats **7** (Abb. 6.5, Seite 158) an Oligonukleotide unterschiedlicher Basensequenzen gedockt, um neben der Stärke auch die Sequenzselektivität der DNA-Bindung untersuchen zu können. Da das tertiäre Stickstoffatom der C-terminalen Seitenkette bei physiologischem pH-Wert (→ pH-Wert des bei den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen eingesetzten Puffermediums) protoniert vorliegt, wurden die Testverbindungen in kationischer Form als Liganden eingesetzt (Abb. 6.13, Seite 176). Als Docking-Matrizen dienten vier verschiedene DNA-Oligomere, die hier als Rezeptor „polyA“ [PDB-Code [36]: 1JKQ [265]; Sequenz: 5'-D(\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*A)-3'], Rezeptor „polyAT“ [PDB-Code [36]: 473D [266]; Sequenz: 5'-D(\*GP\*TP\*AP\*TP\*AP\*TP\*AP\*C)-3'], Rezeptor „polyG“ [PDB-Code [36]: 1NVP [267]; Sequenz: 5'-D(\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*C)-3'] und Rezeptor „polyGC“ [PDB-Code [36]: 1CF7 [268]; Sequenz: 5'-D(\*TP\*CP\*GP\*CP\*GP\*CP\*GP\*G)-3'] bezeichnet werden (Kapitel 5.3, Seite 129).

Die mit ICM-PRO [32,33] unmittelbar nach dem Docking-Prozess errechneten Komplexbildungsenergien (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) sind zusammen mit den Energiewerten, die nach dem *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) in HYPERCHEM [34] ermittelt wurden, in Tab. 6.6 (Seite 163) aufgeführt. Die mit den beiden Rezeptoren „polyAT“ und „polyGC“ jeweils simulierten DNA-Ligand-Komplexe der Testverbindungen sind in den Abb. 6.7-6.10 (Seiten 164-171) dargestellt (Atombezeichnung der Nukleotide: Abb. 2.1, Seite 17).

	4	5
	Komplexbildungsenergien (ICM-PRO <sup>1</sup> / HYPERCHEM <sup>2</sup> ) [kcal/mol]	Komplexbildungsenergien (ICM-PRO <sup>1</sup> / HYPERCHEM <sup>2</sup> ) [kcal/mol]
Rezeptor „polyA“ <sup>3</sup>	-72,7 / -54,9	-70,2 / -52,0
Rezeptor „polyAT“ <sup>4</sup>	-78,2 / -55,1	-74,5 / -55,9
Rezeptor „polyG“ <sup>5</sup>	-68,9 / -41,8	-64,1 / -42,5
Rezeptor „polyGC“ <sup>6</sup>	-68,2 / -43,0	-66,7 / -42,8
	7	8
	Komplexbildungsenergien (ICM-PRO <sup>1</sup> / HYPERCHEM <sup>2</sup> ) [kcal/mol]	Komplexbildungsenergien (ICM-PRO <sup>1</sup> / HYPERCHEM <sup>2</sup> ) [kcal/mol]
Rezeptor „polyA“ <sup>3</sup>	-78,8 / -51,5	-67,8 / -46,6
Rezeptor „polyAT“ <sup>4</sup>	-81,0 / -54,2	-73,2 / -55,0
Rezeptor „polyG“ <sup>5</sup>	-69,7 / -44,9	-67,3 / -45,0
Rezeptor „polyGC“ <sup>6</sup>	-69,0 / -43,1	-67,3 / -46,0

**Tab. 6.6:** Komplexbildungsenergien der verschiedenen Hetaren-pyrrolcarboxamid-Oligonukleotid-Komplexe

- 1: Komplexbildungsenergie, berechnet mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> nach dem DNA-Ligand-Docking  
2: Komplexbildungsenergie, berechnet mit HYPERCHEM<sup>[34]</sup> nach dem *Refinement* (→ Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup>, durchgeführt mit der Kraftfeld-Methode AMBER<sup>[179,180]</sup>)  
3: Rezeptor „polyA“: Sequenz: 5'-D(\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*A)-3'; PDB-Code<sup>[36]</sup>: 1JKQ<sup>[265]</sup>  
4: Rezeptor „polyAT“: Sequenz: 5'-D(\*GP\*TP\*AP\*TP\*AP\*TP\*AP\*C)-3'; PDB-Code<sup>[36]</sup>: 473D<sup>[266]</sup>  
5: Rezeptor „polyG“: Sequenz: 5'-D(\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*C)-3'; PDB-Code<sup>[36]</sup>: 1NVP<sup>[267]</sup>  
6: Rezeptor „polyGC“: Sequenz: 5'-D(\*TP\*CP\*GP\*CP\*GP\*CP\*GP\*G)-3'; PDB-Code<sup>[36]</sup>: 1CF7<sup>[268]</sup>



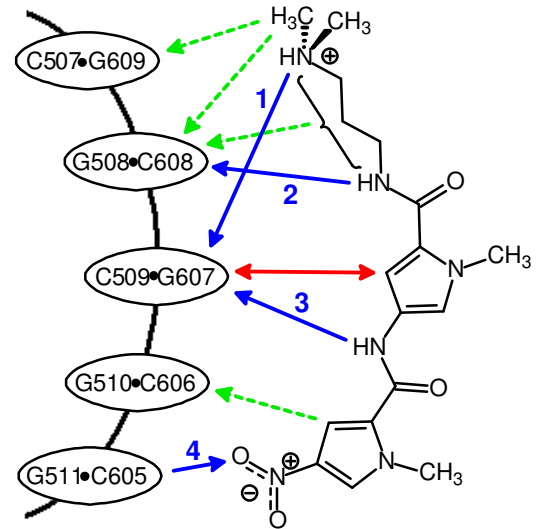
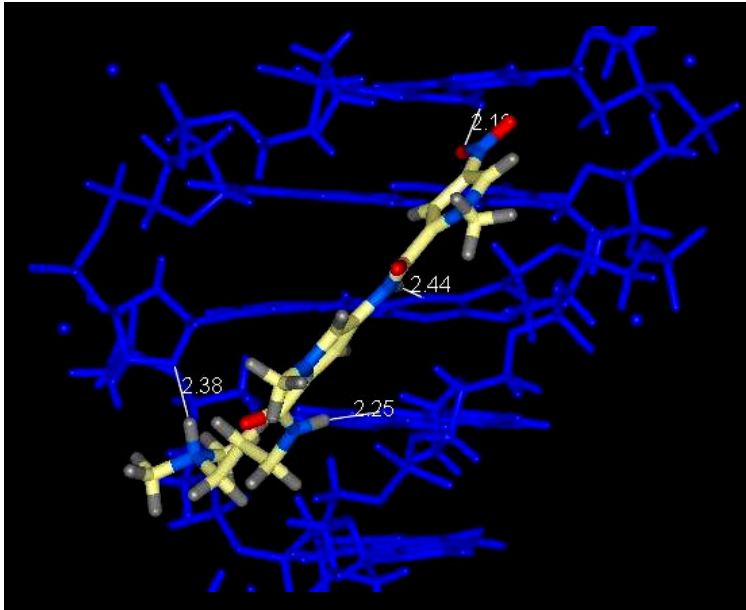
**Abb. 6.7A:** Nitrobispyrrolcarboxamid **4**, gebunden an den Rezeptor „polyAT“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Adenin 6 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Thymin 15 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Adenin 8 N-3 als Akzeptor)



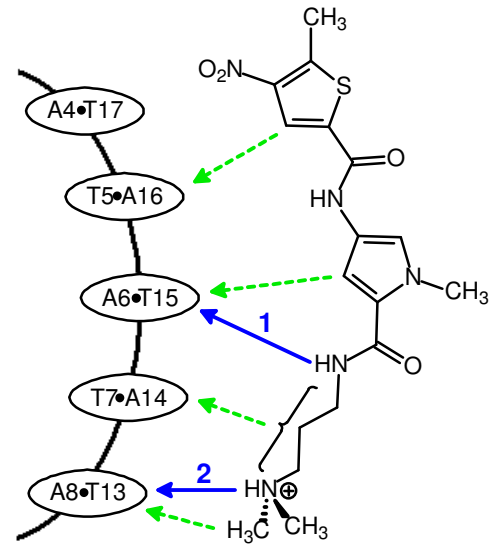
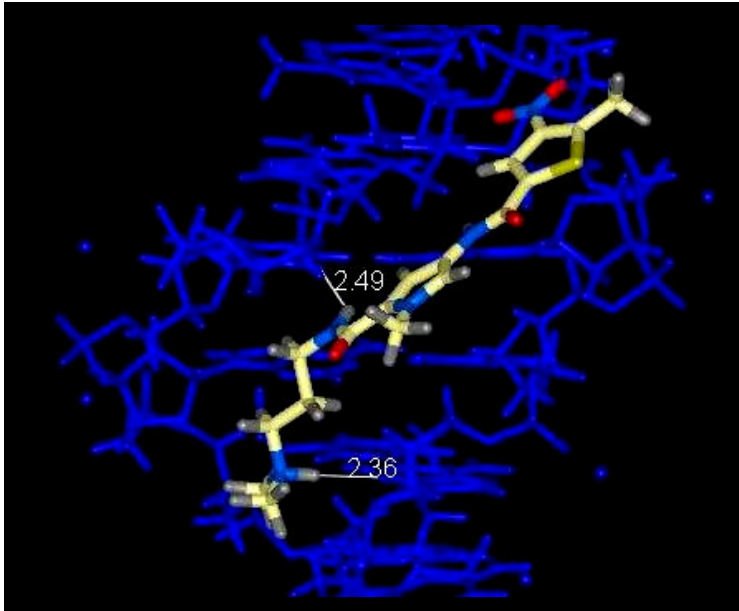
**Abb. 6.7B:** Nitrobispyrrolcarboxamid **4**, gebunden an den Rezeptor „polyGC“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

[grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-Atomen der Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; der rote Pfeil stellt eine van der Waals-Abstoßung zwischen den H-Atomen der Amino-Gruppe von Guanin 607 und dem der kleinen Rinne zugewandten H-Atom des Pyrrol-Rings dar (Atomabstand: < 2 Å); blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 509 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Cytosin 608 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Guanin 607 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 4 mit Guanin 511 H-22 als Donator]



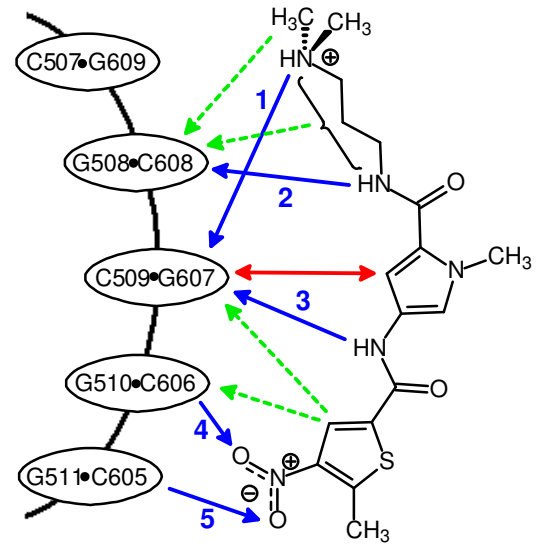
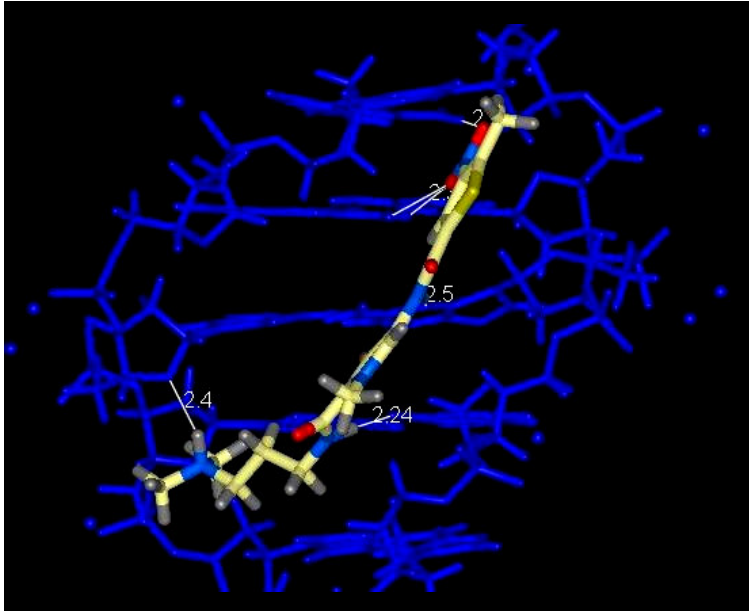
**Abb. 6.8A:** Nitrothiophen-pyrrolcarboxamid **5**, gebunden an den Rezeptor „polyAT“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 15 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 8 N-3 als Akzeptor)



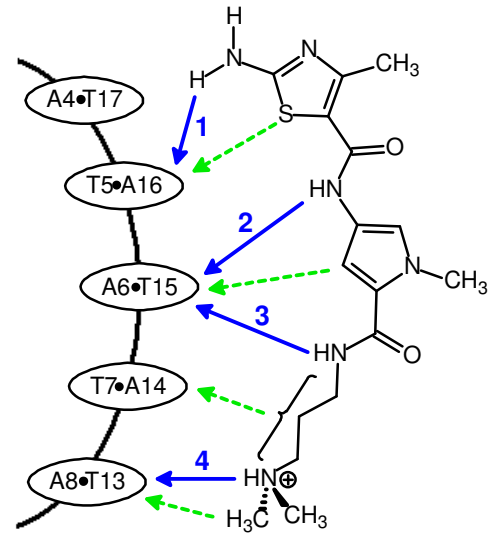
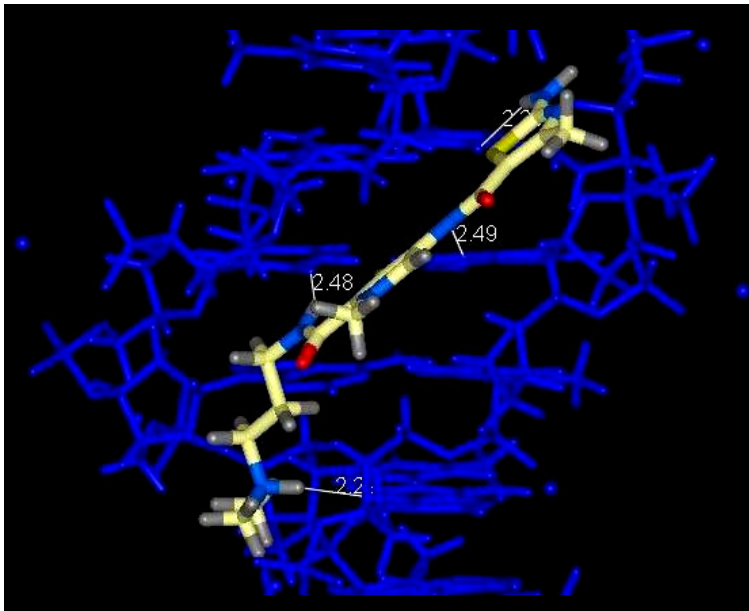
**Abb. 6.8B:** Nitrothiophen-pyrrolcarboxamid **5**, gebunden an den Rezeptor „polyGC“  
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

[grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-Atomen der Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; der rote Pfeil stellt eine van der Waals-Abstoßung zwischen den H-Atomen der Amino-Gruppe von Guanin 607 und dem der kleinen Rinne zugewandten H-Atom des Pyrrol-Rings dar (Atomabstand: < 2 Å); blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 509 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Cytosin 608 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Guanin 607 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 4 → Dreizentren-H-Brücke mit Guanin 510 H-21 und Guanin 510 H-22 als Donatoren, H-Brücke 5 mit Guanin 511 H-22 als Donator]





**Abb. 6.9A:** Aminothiazol-pyrrolcarboxamid **7**, gebunden an den Rezeptor „polyAT“

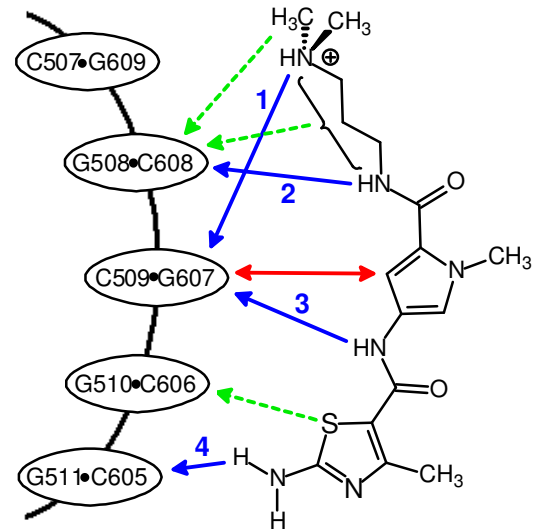
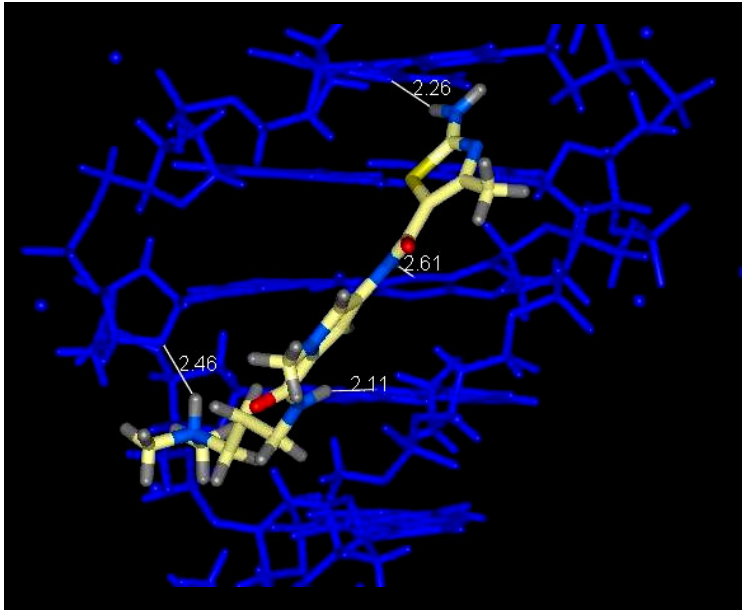
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 5 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 6 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Thymin 15 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 4 mit Adenin 8 N-3 als Akzeptor)



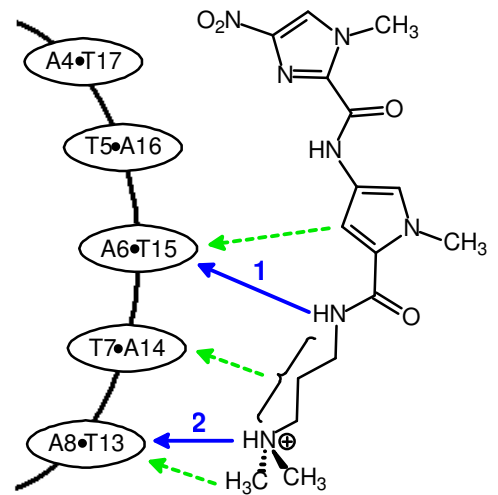
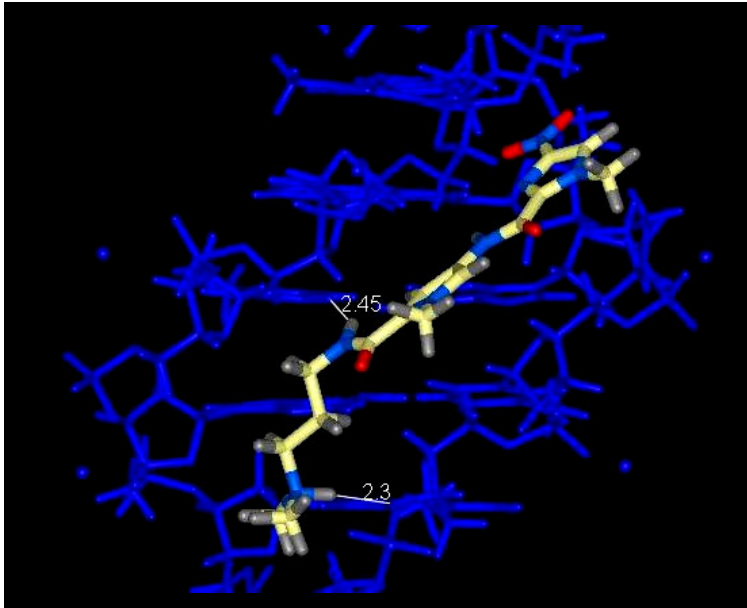


**Abb. 6.9B:** Aminothiazol-pyrrolcarboxamid **7**, gebunden an den Rezeptor „polyGC“  
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

[grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-Atomen der Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; der rote Pfeil stellt eine van der Waals-Abstoßung zwischen den H-Atomen der Amino-Gruppe von Guanin 607 und dem der kleinen Rinne zugewandten H-Atom des Pyrrol-Rings dar (Atomabstand: < 2 Å); blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 509 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Cytosin 608 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Guanin 607 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 4 mit Guanin 511 N-3 als Akzeptor]



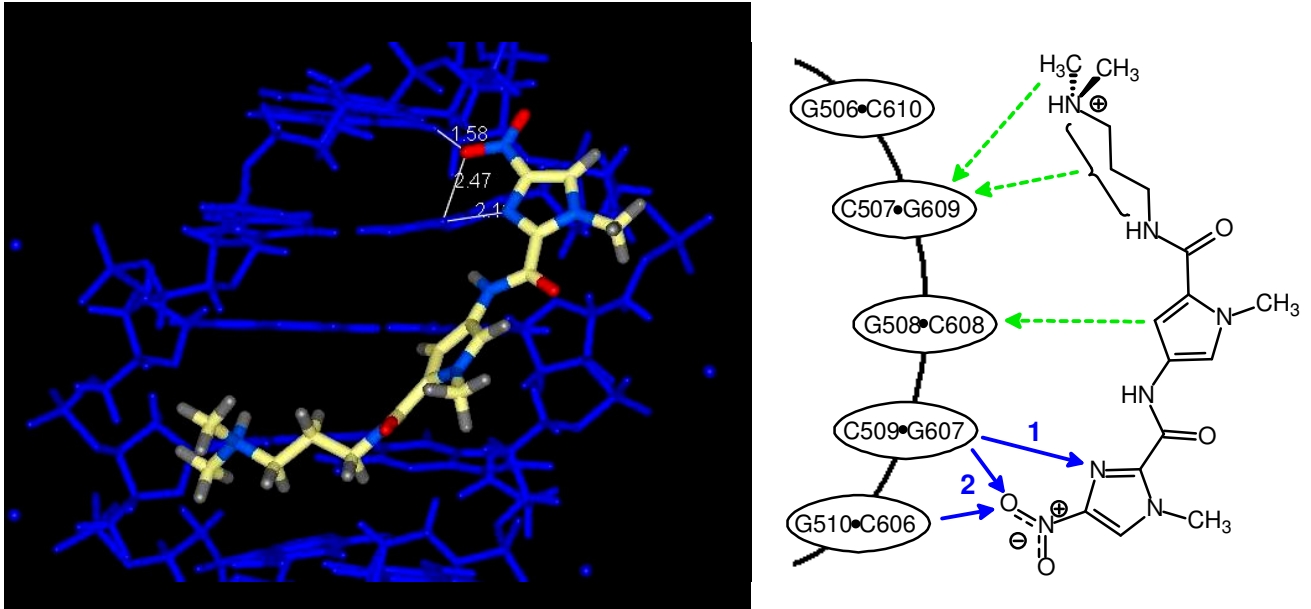
**Abb. 6.10A:** Nitroimidazol-pyrrolcarboxamid **8**, gebunden an den Rezeptor „polyAT“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 15 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 8 N-3 als Akzeptor)



**Abb. 6.10B:** Nitroimidazol-pyrrolcarboxamid **8**, gebunden an den Rezeptor „polyGC“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

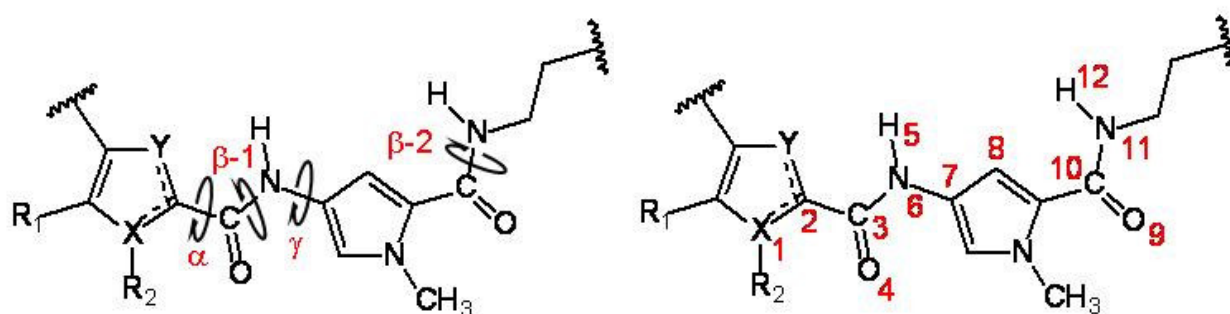
(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-Atomen der Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Guanin 607 H-22 als Donator, H-Brücke 2 → Dreizentren-H-Brücke mit Guanin 607 H-21 und Guanin 510 H-22 als Donatoren)

Nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.), wurden die DNA-gebundenen Konformere des Bispyrrol-Derivats **4** und der bioisosteren Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **5**, **7** und **8** (Abb. 6.5, Seite 158) auf einen bei der Komplexbildung möglicherweise auftretenden Induced-Fit untersucht.

Die bei der DNA-Bindung der Leitsubstanz Netropsin zu beobachtende, Rezeptor-induzierte Konformationsänderung ist auf eine Rotation um die zentrale NH-Pyrrol-Bindung zurückzuführen<sup>[100]</sup>. Dieser Twist tritt zusätzlich zu den bereits in der Kristallstruktur vorliegenden Torsionen um die beiden CO-Pyrrol-Bindungen auf, wodurch der Winkel, der die relative Lage der beiden Pyrrol-Ringe beschreibt (hier  $\delta$  genannt), vergrößert wird<sup>[100]</sup>. Aus diesem Grund wurden bei den DNA-gebundenen Konformeren der Testverbindungen unter anderem die Torsionswinkel  $\alpha$  ( $\angle = X1-C2-C3-O4$ ) und  $\gamma$  ( $\angle = H5-N6-C7-C8$ ) (Abb. 6.11) gemessen. Durch Kombination dieser beiden Winkel mit dem Torsionswinkel der mittleren Amidbindung ( $\beta-1$ ;  $\angle = O4-C3-N6-H5$ ) lässt sich der Winkel  $\delta$  berechnen. Dazu bestimmt man zunächst für jeden der drei genannten Winkel die jeweilige Differenz zu  $0^\circ$  bzw.  $\pm 180^\circ$ , um die Differenzen anschließend unter Beachtung der Vorzeichen zu addieren<sup>[100]</sup>. Ergänzend wurde noch der Torsionswinkel der C-terminalen Amidbindung ( $\beta-2$ ;  $\angle = O9-C10-N11-H12$ ) ermittelt, um untersuchen zu können, ob die trans-(Z)-Konfiguration der peptidischen Bindungen, die bei den Kristallstrukturen bzw. bei dem in SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformer des Aminothiazol-Derivats **7** vorliegt, bei der DNA-Ligand-Komplexbildung erhalten bleibt. Die gemessenen und errechneten Winkel sind in Tab. 6.7 (Seiten 173-174) aufgeführt.



**Abb. 6.11:** Schematische Darstellung der betrachteten Torsionswinkel und der für die Winkelmessungen benötigten Atome mit ihrer Nummerierung

<b>4</b>	<b>Kristallstruktur<sup>1</sup></b>	<b>Rezeptor „polyA“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyAT“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyG“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyGC“<sup>2</sup></b>
<b>α</b> (∠ = N1-C2-C3-O4)	-10,6°	24,2°	12,6°	-26,1°	24,1°
<b>β-1</b> (∠ = O4-C3-N6-H5)	-178,6°	-176,9°	-174,9°	170,6°	174,6°
<b>γ</b> (∠ = H5-N6-C7-C8)	4,9°	15,5°	-0,7°	4,6°	10,7°
<b>δ</b> (berechnet aus α, β-1 und γ)	<b>-7,1°</b>	<b>36,6°</b>	<b>6,8°</b>	<b>-12,1°</b>	<b>40,2°</b>
<b>β-2</b> (∠ = O9-C10-N11-H12)	-175,6°	-174,5°	175,5°	175,5°	176,2°
<b>5</b>	<b>Kristallstruktur<sup>1</sup></b>	<b>Rezeptor „polyA“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyAT“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyG“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyGC“<sup>2</sup></b>
<b>α</b> (∠ = S1-C2-C3-O4)	7,4°	15,2°	17,3°	-16,5°	4,3°
<b>β-1</b> (∠ = O4-C3-N6-H5)	-176,8°	-171,7°	-179,7°	174,4°	-171,4°
<b>γ</b> (∠ = H5-N6-C7-C8)	-1,4°	10,1°	7,6°	-1,0°	-20,5°
<b>δ</b> (berechnet aus α, β-1 und γ)	<b>2,8°</b>	<b>17,0°</b>	<b>24,6°</b>	<b>-11,9°</b>	<b>-24,8°</b>
<b>β-2</b> (∠ = O9-C10-N11-H12)	-177,9°	-176,6°	-175,0°	175,7°	-177,5°

**Tab. 6.7A:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Fünfring-Heteraren-pyrrolcarboxamide

<sup>1</sup>: Winkel der jeweiligen Kristallstrukturen <sup>[258,259]</sup>

<sup>2</sup>: Winkel der nach Docking (in ICM-PRO <sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>) vorliegenden Konformationen der Testverbindungen

<b>7</b>	<b>simulier. Molekül<sup>1</sup></b>	<b>Rezeptor „polyA“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyAT“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyG“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyGC“<sup>2</sup></b>
<b><math>\alpha</math></b> ( $\angle = \text{C1-C2-C3-O4}$ )	8,3°	22,8°	2,5°	-40,7°	33,6°
<b><math>\beta-1</math></b> ( $\angle = \text{O4-C3-N6-H5}$ )	-176,7°	-178,4°	-177,9°	177,5°	-178,4°
<b><math>\gamma</math></b> ( $\angle = \text{H5-N6-C7-C8}$ )	-0,7°	0,6°	1,8°	-19,6°	4,2°
<b><math>\delta</math></b> (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>4,3°</b>	<b>21,8°</b>	<b>2,2°</b>	<b>-57,8°</b>	<b>36,2°</b>
<b><math>\beta-2</math></b> ( $\angle = \text{O9-C10-N11-H12}$ )	-169,1°	-177,7°	177,3°	179,6°	-172,3°
<b>8</b>	<b>Kristallstruktur<sup>3</sup></b>	<b>Rezeptor „polyA“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyAT“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyG“<sup>2</sup></b>	<b>Rezeptor „polyGC“<sup>2</sup></b>
<b><math>\alpha</math></b> ( $\angle = \text{N1-C2-C3-O4}$ )	-3,3°	-2,0°	5,3°	-12,0°	14,5°
<b><math>\beta-1</math></b> ( $\angle = \text{O4-C3-N6-H5}$ )	179,5°	-178,3°	-177,5°	174,3°	-171,4°
<b><math>\gamma</math></b> ( $\angle = \text{H5-N6-C7-C8}$ )	-1,0°	6,4°	10,9°	-24,7°	25,2°
<b><math>\delta</math></b> (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>-3,8°</b>	<b>2,7°</b>	<b>13,7°</b>	<b>-30,0°</b>	<b>31,1°</b>
<b><math>\beta-2</math></b> ( $\angle = \text{O9-C10-N11-H12}$ )	-176,7°	177,4°	-179,6°	-176,6°	-176,0°

**Tab. 6.7B:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Fünfring-Heteraren-pyrrolcarboxamide

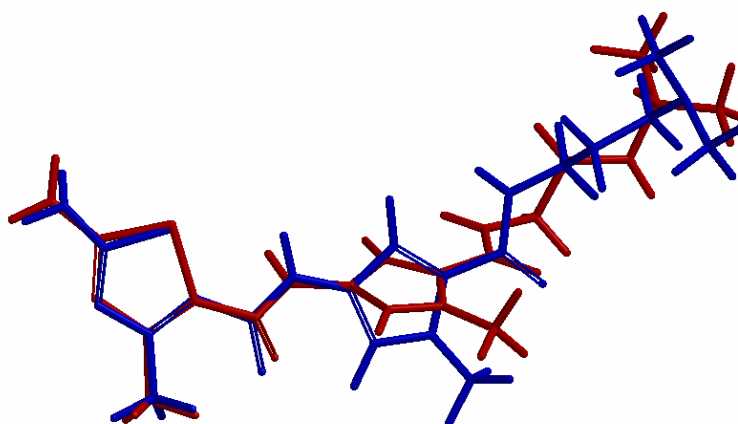
<sup>1</sup>: Winkel des in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers

<sup>2</sup>: Winkel der nach Docking (in ICM-PRO <sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>) vorliegenden Konformationen der Testverbindungen

<sup>3</sup>: Winkel der Kristallstruktur <sup>[260]</sup>

Die Kristallstrukturen der Verbindungen **4** <sup>[258]</sup> (Bispyrrolcarboxamid), **5** <sup>[259]</sup> (Thiophen-pyrrolcarboxamid) und **8** <sup>[260]</sup> (Imidazol-pyrrolcarboxamid) weisen, ebenso wie das in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierte Minimumskonformer des Amino-thiazol-Derivats **7**, Coplanarität auf, d. h., die beiden Fünfring-Heterozyklen der Verbindungen liegen in einer Ebene ( $\delta < 10^\circ$ ; Tab. 6.7, Seiten 173-174). Binden diese Heteraren-pyrrolcarboxamide an die DNA, so tritt, mit Ausnahme von jeweils einem der mit den Verbindungen **4**, **7** und **8** gebildeten Komplexe, ein Induced-Fit auf (Abb. 6.12). Durch Rotationen um die Bindungen „C2-C3“ und „N6-C7“ (Abb. 6.11, Seite 172) werden die beiden fünfgliedrigen Ringe gegeneinander verdreht ( $\delta > 10^\circ$ ), so dass die Moleküle eine isohelikale Konformation annehmen. Dies hat eine bessere Anpassung der Testverbindungen an die Topologie der kleinen Rinne und, daraus resultierend, eine Verstärkung der DNA-Ligand-Wechselwirkungen zur Folge.

Auch die im Vergleich zur E-Konfiguration energetisch günstigere trans-(Z)-Konfiguration, die die Amidbindungen der Fünfring-Heteraren-pyrrolcarboxamide bei allen betrachteten DNA-Ligand-Komplexen – unabhängig von dem Auftreten des beschriebenen Induced-Fit – aufweisen ( $\beta-1$  und  $\beta-2 > 170^\circ$ ; Tab. 6.7, Seiten 173-174), führt zu einer Verstärkung der DNA-Bindung: Bedingt durch die Z-Konfiguration der peptidischen Bindungen nehmen die Derivate eine Sichelform an, die die Einlagerung in die kleine Rinne der DNA erleichtert.

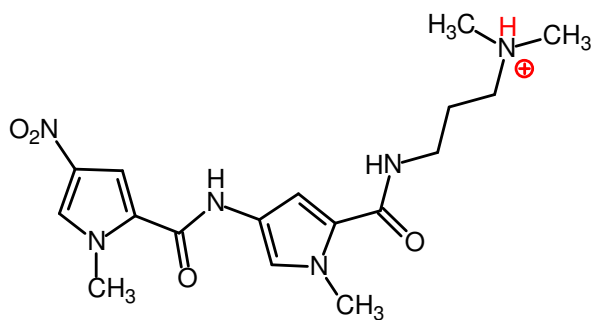


**Abb. 6.12:** Darstellung des beobachteten Induced-Fit am Beispiel des Amino-thiazol-Derivats **7**: Vergleich des Minimumskonformers (blaues Molekül) mit dem an den Rezeptor „polyG“ gebundenen Konformer (rotes Molekül)

(Alignment durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)

Die C-terminale, bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegende Dimethylamino-propyl-Seitenkette (Abb. 6.13) ist für die DNA-Bindung der Hetaren-pyrrolcarboxamid-Derivate von großer Bedeutung. Zum einen werden die Verbindungen, bedingt durch die auf die Salzbildung zurückzuführende, gute Wasserlöslichkeit, biochemischen und biophysikalischen Experimenten (wie z. B.  $T_m$ -Wert-Messungen und Zytotoxizitätstests) zugänglich <sup>[277]</sup>. Ferner wird die DNA-Ligand-Komplexbildung durch die über große Distanzen erfolgende Anziehung des kationischen Liganden von der negativ geladenen DNA eingeleitet <sup>[277]</sup>, auch wenn das quartäre Ammonium-Ion im Komplex selbst nicht in der Nähe der Phosphat-Gruppen, sondern in der Mitte der elektronegativen kleinen Rinne gebunden vorliegt (Abb. 6.7-6.10, Seiten 164-171). Dort fungiert das quartäre Stickstoffatom bei 14 der 16 betrachteten DNA-Ligand-Komplexe als H-Brücken-Donator. Dies beeinflusst die Kinetik der Komplexbildung im Sinne einer längeren Residualzeit des Liganden in der kleinen Rinne der DNA <sup>[278]</sup> und führt somit zu einer Zunahme der DNA-Bindungsstärke. Auch sind die meisten der für die DNA-Bindung des Liganden wichtigen van der Waals-Interaktionen auf die Methylene- und Methyl-Gruppen der aliphatischen Kette zurückzuführen (Kapitel 6.3.5, Seite 251 ff.).

Es wird berichtet, dass eine Substitution der Testverbindungen mit einer aminischen Seitenkette auch bei zahlreichen anderen Substanzklassen eine Verstärkung der DNA-Bindung und teilweise auch eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität zur Folge hat <sup>[81,90,166]</sup>.



**Abb. 6.13:** Beispiel eines Hetaren-pyrrolcarboxamids mit protoniert vorliegendem Stickstoffatom in der Seitenkette (hier: Verbindung **4**)



#### 6.1.2.4 Zytotoxizitätstudien des NCI

Das Aminothiazol-pyrrol-Derivat **7**, welches den höchsten  $\Delta T_m$ -Wert aller untersuchten Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide aufweist (Tab. 6.5, Seite 159), wurde in dem vom NCI (*National Cancer Institute*) durchgeführten Zytotoxizitätsassay (Kapitel 3.4.4, Seite 85 ff.) auf potentiell vorhandene, anticancerogene Eigenschaften untersucht. Hierbei zeigte die Testsubstanz keine relevante zytostatische oder zytotoxische Aktivität (Tab. 6.8). Wie schon von *Hotzel* <sup>[154]</sup> und *Keuser* <sup>[37]</sup> beschrieben, ist dieses Ergebnis sehr wahrscheinlich auf eine unzureichende Zellmembranpenetration der Testverbindung zurückzuführen, so dass in der Tumorzelle keine für einen biologischen Effekt ausreichende Substanzkonzentration erreicht wird <sup>[128]</sup>.

	<b>MG_MID LOG<sub>10</sub> GI<sub>50</sub><sup>1</sup></b>	<b>MG_MID LOG<sub>10</sub> TGI<sup>2</sup></b>	<b>MG_MID LOG<sub>10</sub> LC<sub>50</sub><sup>3</sup></b>
<b>7</b>	-4,02	> -4,0	> -4,0

**Tab. 6.8:** Ergebnisse der vom NCI durchgeführten Zytotoxizitätstests

<sup>1</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine 50%-ige Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>

<sup>2</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine totale Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>

<sup>3</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils bei 50% der Krebszellen zum Zelltod führt <sup>[90]</sup>

### 6.1.2.5 Diskussion der Ergebnisse

Der bei den Docking-Experimenten verwendete Rezeptor „polyAT“ besitzt mit den sechs alternierend angeordneten AT-Basenpaaren im Zentrum des Oligomers die gleiche Basensequenz wie die zur  $T_m$ -Wert-Messung eingesetzte, synthetische poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA. Die in dem Programm ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> mit diesem Rezeptor simulierten DNA-Ligand-Komplexe wurden aus diesem Grund genauer betrachtet, um durch Gegenüberstellung der *in silico*-Daten mit den experimentell ermittelten DNA-Affinitäten ( $\rightarrow \Delta T_m$ -Werte; Tab. 6.5, Seite 159) Erklärungen für die unterschiedlichen DNA-Aktivitäten der verschiedenen Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide (Abb. 6.5, Seite 158) zu finden. Die Ergebnisse dieses Datenvergleichs werden nun im Folgenden näher erläutert.

In Übereinstimmung mit den für die Verbindungen ermittelten  $\Delta T_m$ -Werten wurde das Aminothiazol-pyrrolcarboxamid **7** von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> als aktivster Ligand eingestuft ( $\rightarrow$  niedrigste errechnete Komplexbildungsenergie; Tab. 6.6, Seite 163). Diese relativ hohe DNA-Affinität ist unter anderem auf die nur bei dem Derivat **7** vorhandene, am N-terminalen Ende befindliche Amino-Gruppe zurückzuführen – die Verbindungen **4**, **5** und **8** sind, synthesebedingt, N-terminal mit einer Nitro-Gruppe substituiert. Die Wasserstoffatome der Amino-Funktion erhöhen zum einen das positive molekulare elektrostatische Potential (MEP) der konkaven Molekülseite und verstärken somit die Bindung in der von AT-Basen aufgebauten, elektronenreichen kleinen Rinne der DNA (Abb. 6.6, Seite 161). Zum anderen baut das aminische Stickstoffatom – neben den N-Atomen der Amidbindungen und dem quartären Ammonium-Ion der C-terminalen Seitenkette, als Donator H-Brücken zu den DNA-Basen auf (Abb. 6.9A, Seite 168), wodurch die Positionierung des Liganden in der kleinen Furche beeinflusst wird<sup>[101]</sup> (Kapitel 2.3.2, Seite 43 ff.).

Im Gegensatz zu dem Aminothiazol-Derivat **7** weist das Imidazol-pyrrolcarboxamid **8** nur eine sehr geringe DNA-Affinität auf (Tab. 6.5, Seite 159). Dies wird durch den vergleichsweise niedrigen Energiebetrag widerspiegelt, der von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> für die Komplexbildung der Verbindung **8** mit dem Rezeptor „polyAT“ berechnet wurde (Tab. 6.6, Seite 163). Die nur schwach ausgeprägte DNA-Aktivität dieser Verbindung ist wahrscheinlich durch die negative Partialladung des  $sp^2$ -hybridisierten Stickstoffatoms des Imidazol-Rings bedingt, die das ansonsten positive MEP der dem Rezeptor zugewandten Molekülseite unterbricht und sich somit störend

auf die Bindung in der elektronenreichen kleinen Rinne auswirkt (Abb. 6.6, Seite 161).

Beim Ranking der beiden mit den Derivaten **4** (Bispyrrolcarboxamid) und **5** (Thiophen-pyrrolcarboxamid) gebildeten DNA-Ligand-Komplexe weichen die experimentell ermittelten und die computersimulierten Ergebnisse voneinander ab: Die Verbindung **5**, die einen etwas höheren  $\Delta T_m$ -Wert als das Bispyrrolcarboxamid **4** aufweist (Tab. 6.5, Seite 159), wurde von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> als schwächerer Ligand eingestuft (Tab. 6.6, Seite 163).

Die von HYPERCHEM<sup>[34]</sup> errechneten Energien für die Komplexbildung der Hetaren-pyrrolcarboxamide mit dem Rezeptor „polyAT“ liegen zu dicht beieinander (Tab. 6.6, Seite 163), um weitere Erklärungsansätze für die unterschiedlichen DNA-Affinitäten der Derivate liefern zu können.

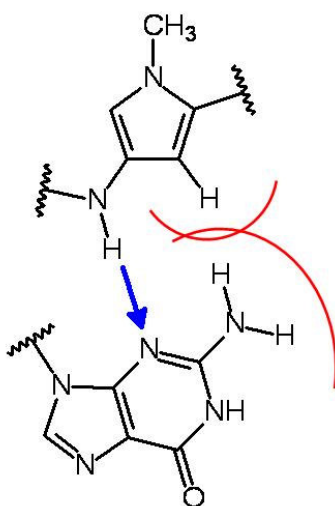
Neben der DNA-Affinität sollte auch die Sequenzselektivität der DNA-Bindung des Bispyrrolcarboxamids **4**, sowie der bioisosteren Derivate **5**, **7** und **8** untersucht werden (Abb. 6.5, Seite 158). Die zu diesem Zweck mit Thymus-DNA durchgeführten  $T_m$ -Wert-Messungen lieferten, aufgrund der bei den Verbindungen **4** und **5** nur schwach ausgeprägten und bei dem Imidazol-pyrrolcarboxamid **8** nicht nachweisbaren DNA-Aktivitäten, nur für das Aminothiazol-Derivat **7** ein auswertbares Ergebnis (Kapitel 6.1.2.2, Seite 159 ff.): Die für diese Verbindung ermittelte Relation von  $\Delta T_m(\text{Thymus})$  zu  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$  beträgt 20,9%, was auf eine AT-Selektivität der DNA-Bindung hindeutet. Die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> ausgeführten Molecular Modelling-Simulationen unterstützen diese Annahme, da der für die Komplexbildung des Derivats **7** mit dem Rezeptor „polyAT“ errechnete Energiebetrag deutlich größer ist als der für die Bindung an den Rezeptor „polyGC“ ermittelte Wert (Tab. 6.6, Seite 163).

Ein Vergleich der Differenzen der Energien, die bei der Komplexbildung der verschiedenen Hetaren-pyrrolcarboxamide mit den beiden genannten Rezeptoren „polyAT“ und „polyGC“ freigesetzt wurden ( $\Delta E = E_{(„\text{polyAT}“)} - E_{(„\text{polyGC}“)}$ ); Tab. 6.9, Seite 179), lässt vermuten, dass nicht nur das Aminothiazol-Derivat **7**, sondern auch die Bispyrrol-Verbindung **4** und das Thiophen-Analogon **5** bei der DNA-Bindung AT-reiche Abschnitte bevorzugen. Dieser Sachverhalt ist sehr wahrscheinlich auf die van der Waals-Abstoßungen zurückzuführen, die bei den mit dem Rezeptor „polyGC“ gebildeten Komplexen der Verbindungen **4**, **5** und **7** jeweils zu beobachten sind. Hier

liegen die Wasserstoffatome der Amino-Gruppe einer Guanin-Base, und das auf der konkaven Molekülseite gelegene Wasserstoffatom des C-terminalen Pyrrol-Rings, jeweils so dicht beieinander (Atomabstände < 2 Å; Abb. 6.7B, Seite 165; 6.8B, Seite 167 und 6.9B, Seite 169), dass sich ihre van der Waals-Radien überschneiden (Abb. 6.14). Die daraus resultierende Abstoßungsreaktion hat eine Schwächung der DNA-Bindung zur Folge <sup>[45,67,100,110]</sup>.

	Differenz der Komplexbildungsenergien: $\Delta E = E_{(„polyAT“)} - E_{(„polyGC“)}$ [kcal/mol]	
	Berechnet mit ICM-PRO	Berechnet mit HYPERCHEM
4	10,0	12,1
5	7,8	13,1
7	12,0	11,1
8	5,9	9,0

**Tab. 6.9:** Differenzen der errechneten Komplexbildungsenergien zur Untersuchung der Sequenzselektivität der DNA-Bindung



**Abb. 6.14:** Schematische Darstellung der van der Waals-Abstoßung zwischen H-3 des Pyrrol-Rings und der Amino-Gruppe der Guanin-Base  
 (H-Brücke zwischen dem amidischen H-Atom und N-3 der Guanin-Base ist als blauer Pfeil dargestellt nach *Goodsell* <sup>[67]</sup>)

Im Gegensatz zu den Hetaren-pyrrolcarboxamiden **4**, **5** und **7** bindet das Nitroimidazol-Derivat **8** ohne erkennbare Präferenz für eine bestimmte Basensequenz an die DNA (Tab. 6.6, Seite 163): Die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> errechneten Differenzen der bei der Komplexbildung mit den Rezeptoren „polyAT“ und „polyGC“ freiwerdenden Energien sind bei dem Derivat **8** deutlich kleiner als bei den anderen betrachteten Testverbindungen (Tab. 6.9, Seite 180). Die negative Partialladung des zur konkaven Molekülseite orientierten, sp<sup>2</sup>-hybridisierten Stickstoffatoms des Imidazol-Rings führt dazu, dass dieses Derivat nur mit einer vergleichsweise geringen Affinität in der von den AT-Basen gebildeten, elektronenreichen kleinen Rinne bindet<sup>[45,67,69,109-111]</sup>. Bei dem mit dem Rezeptor „polyGC“ gebildeten DNA-Ligand-Komplex fungiert dieses Stickstoffatom dagegen als H-Brücken-Akzeptor für die Amino-Gruppe einer Guanin-Base<sup>[45,67,69,109-111]</sup> (Abb. 6.10B, Seite 171). Dies verändert die Positionierung des Moleküls in der kleinen Rinne, so dass die oben beschriebene van der Waals-Abstoßung zwischen Oligonukleotid und Ligand nicht auftritt. Die von der Lage der anderen Testverbindungen abweichende Position des Imidazol-pyrrolcarboxamids **8** in der kleinen Furche verhindert allerdings die Wasserstoff-Brückenbildung zwischen den DNA-Basen und den amidischen Stickstoffatomen, sowie dem in der Seitenkette befindlichen Ammoniumion des Liganden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass das Derivat **8** mit vergleichbarer Affinität an AT- und GC-reiche Sequenzen der DNA und demzufolge unselektiv bindet.

Da die Hetaren-pyrrolcarboxamide **4**, **5** und **8** nur geringe DNA-Affinitäten aufweisen und die Aminothiazol-Verbindung **7** trotz des hohen  $\Delta T_m$ -Wertes keine zytotoxischen Eigenschaften besitzt (Kapitel 6.1.2.4, Seite 177), wurden keine Topoisomerase I-Hemmtests und Ethidiumbromid-Verdrängungsassays mit diesen Derivaten durchgeführt.

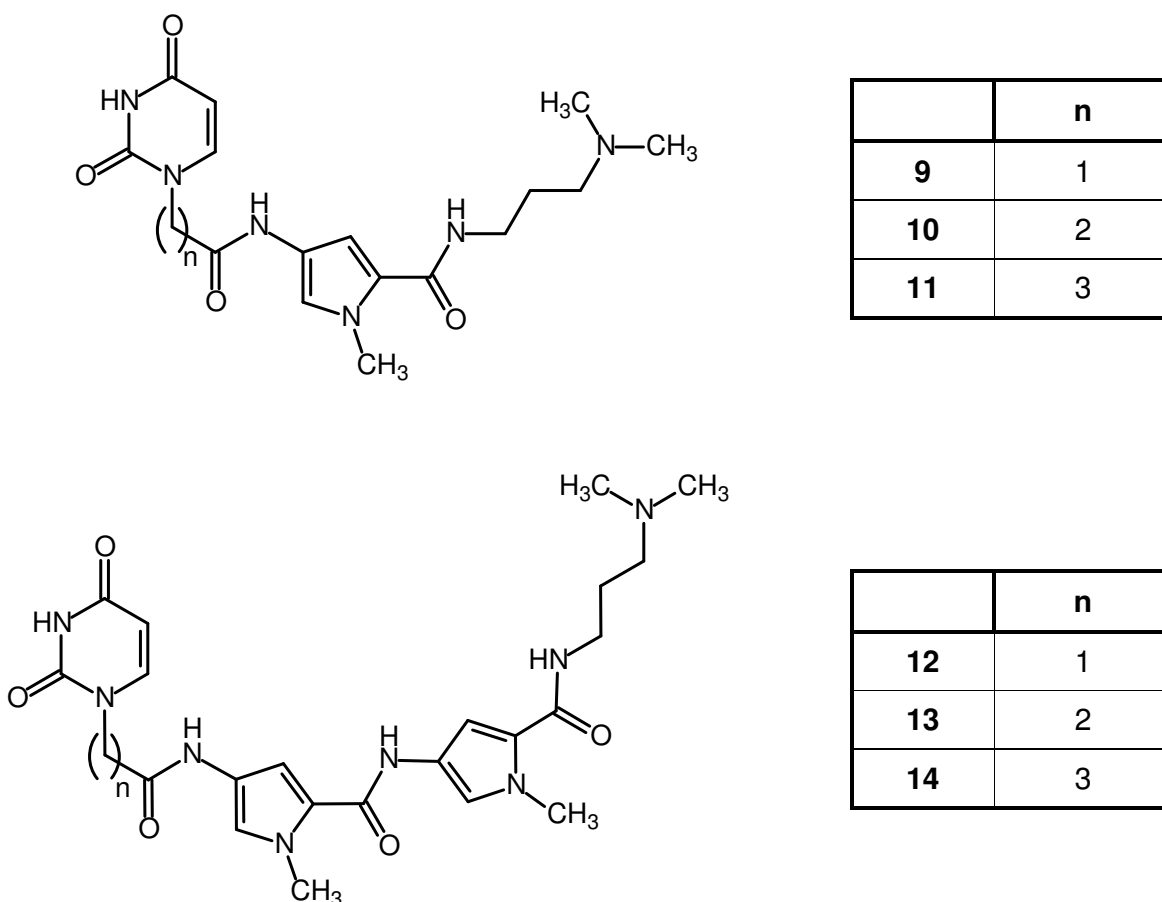
## 6.2 Mono- und Bispyrrolcarboxamide mit N-terminal gekoppelten Nucleobasen

### 6.2.1 Einleitung und Zielsetzung

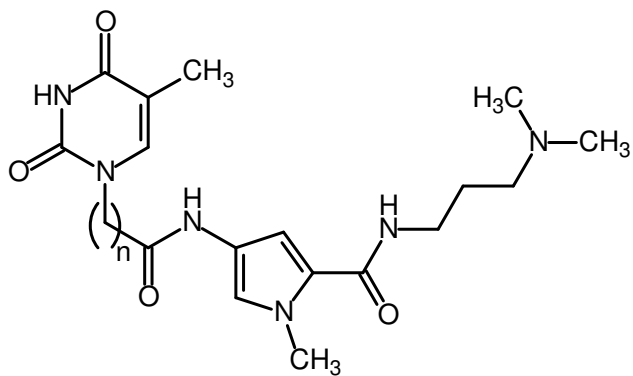
Bei den im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden mit N-terminal gekoppelten Nucleobasen (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) handelt es sich um Struktur-Analoga der in Kapitel 2.3.4 (Seite 55 ff.) vorgestellten PNAs<sup>[37,145]</sup> (*Peptide Nucleic Acids* → DNA-Mimetika, bei denen das Zucker-Phosphat-Gerüst der natürlichen Nucleinsäuren durch eine Peptidkette ersetzt worden ist<sup>[131,134,139-142]</sup>). Für die DNA-Ligand-Komplexbildung dieser Verbindungsklasse wurde angenommen, dass sich das Pyrrolcarboxamid-Strukturelement in die kleine Furche der DNA einlagert, während die mit dem Rinnenbinder verknüpfte Nucleobase – übereinstimmend mit der DNA-Bindung der PNAs – mit der DNA in Form einer *Hoogsteen*-Basenpaarung (Abb. 6.30, Seite 204) interagiert<sup>[35,50,114,139-142,144,145]</sup>. Durch diesen dualen Bindemodus sollten eine Steigerung der DNA-Affinität, eine Verbesserung der Sequenzselektivität der DNA-Bindung und eine Hemmung der für die Replikation und Transkription essentiellen Enzyme (u. a. Topoisomerase I und Telomerase) erreicht werden<sup>[37,145]</sup>.

Alle zur Verfügung stehenden Vertreter der Thymin- und der Uracil-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide<sup>[37,38]</sup> (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) sollten auf ihre DNA-bindenden Eigenschaften untersucht werden mit dem Ziel, Struktur-Wirkungsbeziehungen für diese potentiell viel versprechende Substanzklasse aufstellen zu können. Um Aussagen bezüglich der Stärke der DNA-Affinität und der Sequenzselektivität der DNA-Bindung machen zu können, wurden  $T_m$ -Wert-Messungen durchgeführt, die durch Molecular Modelling-Studien ergänzt werden sollten. Dazu wurde für jede Testverbindung unter Anwendung der in dem Programm SPARTAN<sup>[35]</sup> implementierten Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) eine Minimumskonformation simuliert. Auf der Grundlage dieser Energieminima wurden anschließend einige Moleküleigenschaften, darunter das MEP (molekulares elektrostatisches Potential; Kapitel 4.1.2, Seite 96), die Energien der Grenzorbitale ( $E_{\text{HOMO}}$  und  $E_{\text{LUMO}}$ ) und der Durchmesser der konkaven Molekülseite (→ Abstand der C-terminalen Seitenkette zum N-terminalen Linker; Abb. 6.27, Seite 201) ermittelt, da diese die DNA-Aktivität der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide möglicher-

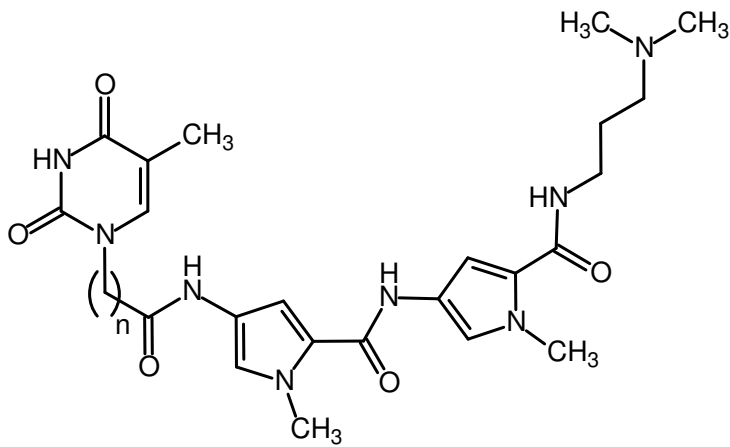
weise beeinflussen können. Des Weiteren wurden sechs Vertreter der Thymin-Reihe (Verbindungen **15-20**; Abb. 6.16, Seite 184) an ein Dodekanukleotid gedockt, um anhand der simulierten DNA-Ligand-Komplexe den DNA-Bindemodus der Testverbindungen untersuchen zu können. Aufgrund der bereits erwähnten, potentiell möglichen *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin-Rings mit einem Adenin-Molekül in der großen Rinne des Oligomers, galt dabei der Positionierung der Pyrimidin-Base an der DNA ein besonderes Interesse. Abschließend wurden einige Topoisomerase I-Hemmtests durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide die Aktivität dieses für die DNA-Replikation bedeutenden Enzyms (Kapitel 2.1.2, Seite 21 ff.) herabsetzen können.



**Abb. 6.15:** Strukturformeln der Mono- und Bispyrrolcarboxamide der Uracil-Reihe



	n
15	1
16	2
17	3



	n
18	1
19	2
20	3
21	5

**Abb. 6.16:** Strukturformeln der Mono- und Bispyrrolcarboxamide der Thymin-Reihe



## 6.2.2 T<sub>m</sub>-Wert-Messungen

Zur Untersuchung der DNA-Affinitäten der Nucleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) wurden zunächst T<sub>m</sub>-Wert-Messungen mit der routinemäßig eingesetzten poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA durchgeführt (Kapitel 3.4.1, Seite 64 ff.). Ergänzend erfolgte für die Testsubstanzen **13**, **14**, **18**, **20** und **21**, die mit diesem, nur aus AT-Basen aufgebauten Polymer eine detektierbare DNA-Aktivität zeigten, auch die Bestimmung der ΔT<sub>m</sub>-Werte unter Verwendung von Thymus-DNA (~42% GC-Basen-Anteil <sup>[30,31]</sup>). Wie bereits bei den Hetaren-pyrrolcarboxamiden beschrieben (Kapitel 6.1.2.2, Seite 159 ff.), sollten auch bei dieser Substanzklasse, anhand der jeweils errechneten Relationen der mit den beiden DNA-Molekülen erhaltenen ΔT<sub>m</sub>-Werte (verwendete Rechenformel: {ΔT<sub>m</sub>(Thymus) / ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] x 100), Aussagen bezüglich der Sequenzselektivität der DNA-Bindung gemacht werden (Abb. 6.17, Seite 187). Die ΔT<sub>m</sub>-Werte der Pyrrolcarboxamide der Uracil-Reihe sind in Tab. 6.10, die der Thymin-gekoppelten Testverbindungen in Tab. 6.11 (Seite 186) aufgeführt.

	Anzahl der Pyrrolringe	Länge des N-terminalen Linkers	ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	ΔT <sub>m</sub> (Thymus-DNA) [°C]
<b>9</b>	1	C-2	n. a.	n. b.
<b>10</b>	1	C-3	n. a.	n. b.
<b>11</b>	1	C-4	n. a.	n. b.
<b>12</b>	2	C-2	--- <sup>1</sup>	--- <sup>1</sup>
<b>13</b>	2	C-3	6,9 ± 0,35	1,3 ± 0,11
<b>14</b>	2	C-4	8,8 ± 0,34	2,3 ± 0,35

**Tab. 6.10:** ΔT<sub>m</sub>-Werte der Mono- und Bispyrrolcarboxamide der Uracil-Reihe  
(ΔT<sub>m</sub>-Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)

n. a.: Substanz bindet nicht an die DNA, ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] ≤ 1 °C

n. b.: ΔT<sub>m</sub>-Wert wurde nicht bestimmt

<sup>1</sup>: ΔT<sub>m</sub>-Wert konnte nicht bestimmt werden, da nicht mehr genug Substanz zur Verfügung stand

	Anzahl der Pyrrolringe	Länge des N-terminalen Linkers	$\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ [°C]	$\Delta T_m(\text{Thymus-DNA})$ [°C]
15	1	C-2	n. a.	n. b.
16	1	C-3	n. a.	n. b.
17	1	C-4	n. a.	n. b.
18	2	C-2	$7,7 \pm 0,15$	$2,4 \pm 0,32$
19	2	C-3	$2,9 \pm 0,79$	--- <sup>1</sup>
20	2	C-4	$6,3 \pm 0,30$	$1,4 \pm 0,53$
21	2	C-6	$6,9 \pm 0,11$	$2,7 \pm 0,24$

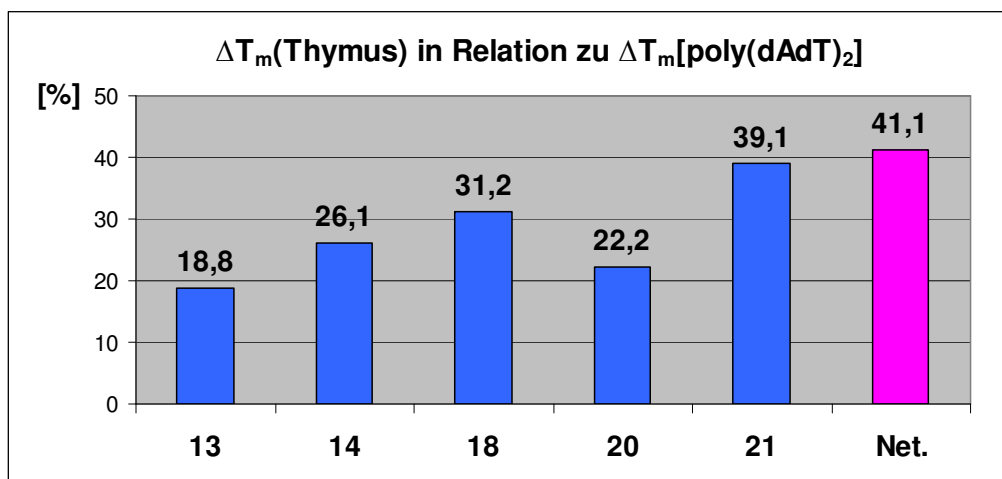
**Tab. 6.11:**  $\Delta T_m$ -Werte der Mono- und Bispyrrolcarboxamide der Thymin-Reihe  
( $\Delta T_m$ -Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen  $\pm$  Standardabweichung)

n. a.: Substanz bindet nicht an die DNA,  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2] \leq 1^\circ\text{C}$

n. b.:  $\Delta T_m$ -Wert wurde nicht bestimmt

<sup>1</sup>:  $\Delta T_m$ -Wert konnte nicht bestimmt werden, da nicht mehr genug Substanz zur Verfügung stand

Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass die Monopyrrol-Derivate – unabhängig von der Linkerlänge und der Art der N-terminal gekoppelten Nukleobase – keine DNA-Aktivität aufweisen (Tab. 6.10-11, Seiten 185-186). Im Gegensatz dazu ist bei den aus zwei Pyrrol-Ringen aufgebauten Testsubstanzen zwar eine DNA-Bindung zu beobachten, die detektierbaren Affinitäten sind jedoch, vor allem im Vergleich zu Netropsin ( $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2] = 40,4^\circ\text{C} \pm 1,06^\circ\text{C}$ ) und der Substanzklasse der Combilexine (Kapitel 6.3.2, Seite 219 ff.), nur schwach ausgeprägt.



**Abb. 6.17:** Verhältnis der  $\Delta T_m(\text{Thymus})$ -Werte zu den  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werten; Angabe in %  
(verwendete Rechenformel:  $\{\Delta T_m(\text{Thymus}) / \Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]\} \times 100$ ; Net. = Netropsin)

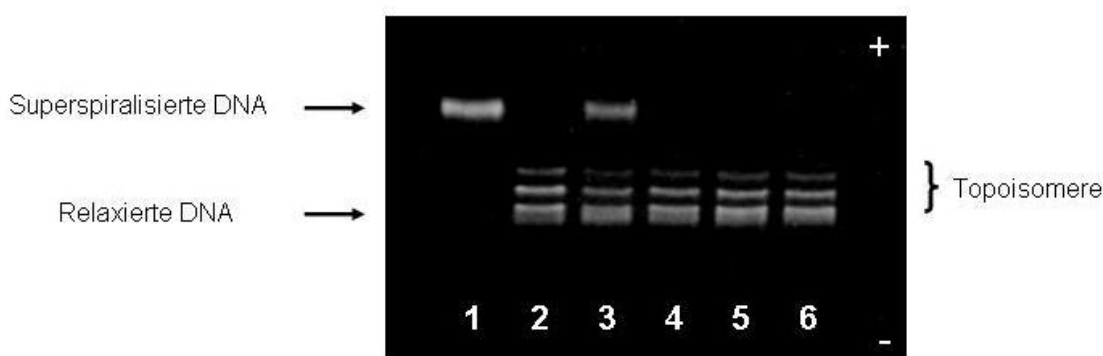
Das für die Bispyrrol-Derivate **13**, **14**, **18**, **20** und **21** (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) jeweils errechnete Verhältnis des  $\Delta T_m(\text{Thymus})$ - zu dem  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Wert (Abb. 6.17) lässt vermuten, dass die Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide, in Analogie zu Netropsin, bevorzugt an AT-reiche Abschnitte der DNA binden.

### 6.2.3 Topoisomerase I-Hemmtests

Ergänzend zu den mit den Substanzen **9-11**, **13-17**, **19** und **20** (Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) am I.N.S.E.R.M. in Lille, Frankreich, bereits durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests<sup>[37,145]</sup>, wurde auch die Verbindung **18** – das Essigsäure-Derivat, das die höchste DNA-Affinität aller Bispyrrolcarboxamide der Thymin-Reihe aufweist (Tab. 6.11, Seite 186) – auf seine Topoisomerase I-hemmenden Eigenschaften untersucht (Kapitel 3.4.2, Seite 70 ff.). Dabei zeigte sich, dass die Verbindung **18**, ebenso wie die anderen getesteten Vertreter der Nucleobasen-gekoppelten Rinnenbinder<sup>[37,145]</sup>, keine Abnahme der Enzymaktivität bewirken konnte (Abb. 6.18, Seite 188). Im Gegensatz zu dem Topoisomerase I-Gift Camptothecin, das durch Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus DNA und Enzym (*Cleavable Complex*) eine vollständige Relaxation der Plasmid-DNA unterbindet<sup>[47,50-56]</sup> (Spur 3; Abb. 6.18), ist

bei den Reaktionsansätzen 4-6, die das Thyminessigsäure-Derivat enthaltenen, keine Bande für superspiralisierte DNA mehr erkennbar (Kapitel 3.4.2, Seite 70 ff.).

Die bei den Spuren 2-6 auftretenden, als Topoisomere bezeichneten Banden werden von partiell relaxierten DNA-Molekülen gebildet, die sich in der Anzahl der jeweils noch im Plasmid verbliebenen, superhelikalen Windungen unterscheiden <sup>[164]</sup>.



**Abb. 6.18:** Gelelektropherogramm des mit der Verbindung **18** durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests

(*Spur 1:* Plasmid-DNA pUC19; *Spur 2:* Plasmid-DNA+Topoisomerase I → vollständige Relaxierung des Plasmids; *Spur 3:* Camptothecin 20  $\mu\text{M}$  → konzentrationsabhängige Hemmung der TOPO I; *Spur 4:* **18** 50  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung, da vollständige Relaxierung des Plasmids; *Spur 5:* **18** 20  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung; *Spur 6:* **18** 5  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung)

## 6.2.4 Molecular Modelling-Studien

Da keine Kristallstrukturen der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide zur Verfügung standen, mussten für die geplanten Molecular Modelling-Studien zunächst dreidimensionale Computermodelle der Testsubstanzen erzeugt werden. Dazu wurden die Derivate zuerst mit dem in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> enthaltenen Baukastensystem <sup>[197]</sup> auf der Basis der Kristallstruktur des Nitro-bispyrrolcarboxamids **4** <sup>[258]</sup> (Abb. 6.5, Seite 158) konstruiert und anschließend unter Anwendung der ebenfalls in SPARTAN <sup>[35]</sup> implementierten Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) energieminiert.

Neben anderen Moleküleigenschaften (Kapitel 6.2.1, Seite 182 ff.) wurden die Grenzorbital-Energien der simulierten Minimumskonformere ermittelt, da diese die DNA-Aktivität der Testverbindungen potentiell beeinflussen können. Die  $E_{\text{HOMO}}$ - und  $E_{\text{LUMO}}$ -Werte der Nukleobasen-gekoppelten *Minor Groove Binder* stehen jedoch in

keinem erkennbaren Zusammenhang zu ihrer DNA-Affinität, weshalb auf die errechneten Energien an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Sechs Vertreter der Thymin-gekoppelten Pyrrolcarboxamide (Verbindungen **15-20**, Abb. 6.16, Seite 184) wurden für die geplanten Docking-Studien als Liganden ausgewählt. Da die Derivate, ebenso wie die Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide (Kapitel 6.1.2.3, Seite 162 ff.), bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegen (Abb. 6.29, Seite 204), wurden sie in den Simulationen in Form ihrer quartären Ammonium-Verbindungen eingesetzt (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.). Ein Dodecanukleotid [PDB-Code <sup>[36]</sup>: 102D <sup>[264]</sup>, Sequenz: 5'-D(\*CP\*GP\*CP\*AP\*AP\*AP\*TP\*TP\*TP\*GP\*CP\*G)-3'], welches im zentralen Teil des Oligomers sechs statt der sonst für das Docken von *Minor Groove Bindern* üblichen vier AT-Basenpaaren aufweist <sup>[6,106]</sup>, diente als Rezeptor (Kapitel 5.3.1, Seiten 128-129). Die beiden zusätzlichen AT-Basenpaare sollten – neben der Rinnenbindung des Mono- bzw. Bispyrrolcarboxamid-Strukturelements – eine *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin-Rings mit einem Adenin-Molekül in der großen Furche der DNA ermöglichen (Abb. 6.30, Seite 204).

Mit jeder Testverbindung konnte ein DNA-Ligand-Komplex simuliert werden. Dabei wurden für das Derivat **16** zwei energetisch nahezu gleichwertige Stellungen an der DNA ermittelt, die bei den Auswertungen beide berücksichtigt werden (im Folgenden als Komplex A bzw. Komplex B bezeichnet). Die mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> nach dem Docking errechneten Komplexbildungsenergien sind, ebenso wie die Energiewerte, die nach dem *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> ermittelt wurden, in Tab. 6.12 (Seite 190) aufgeführt. Die simulierten Komplexe sind in den Abb. 6.19-6.24 (Seiten 191-197) graphisch dargestellt (Atombezeichnung der Nukleotide: Abb. 2.1, Seite 17).

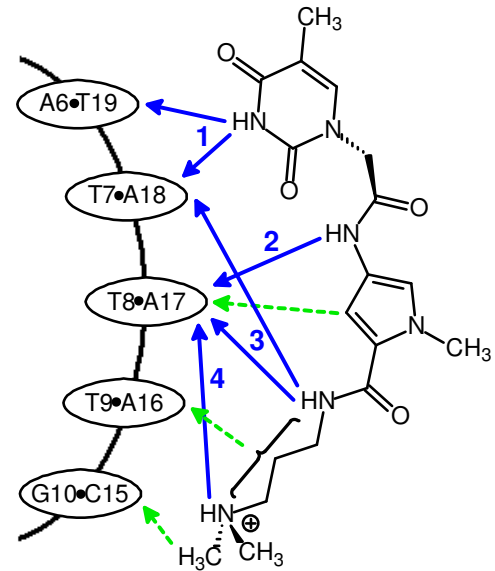
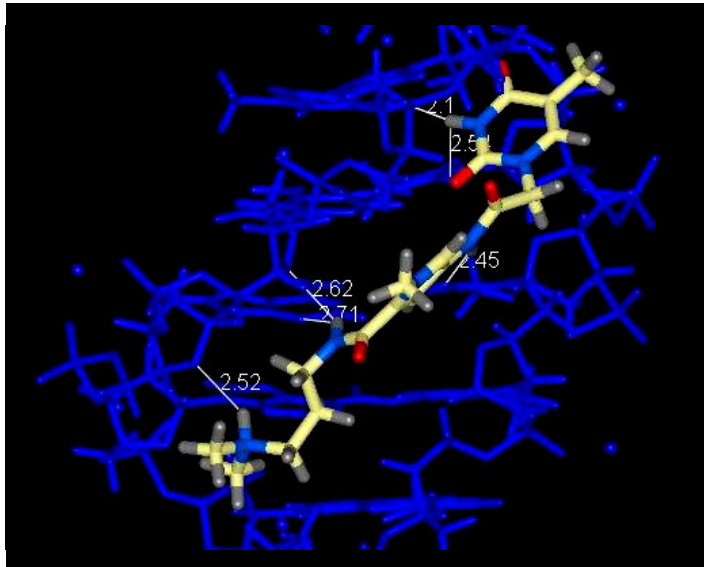
	Komplexbildungsenergie ICM-PRO <sup>1</sup> [kcal/mol]	Komplexbildungsenergie HYPERCHEM <sup>2</sup> [kcal/mol]
<b>15</b>	-79,0	-57,0
<b>16A</b>	-89,2	-59,2
<b>16B</b>	-89,0	-57,1
<b>17</b>	-87,7	-61,4
<b>18</b>	-100,8	-72,1
<b>19</b>	-107,5	-76,7
<b>20</b>	-110,8	-75,9

**Tab. 6.12:** Komplexbildungsenergien der mit den Thymin-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden simulierten DNA-Ligand-Komplexe

<sup>1</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> nach dem DNA-Ligand-Docking

<sup>2</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup> nach dem *Refinement* (→ Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup>, durchgeführt mit der Kraftfeld-Methode AMBER <sup>[179,180]</sup>)

Aus Tab. 6.12 lässt sich ersehen, dass es beim Übergang von den inaktiven Monopyrrol-Derivaten (Verbindungen **15-17**) zu den DNA-bindenden Bispyrrol-Analoga (Verbindungen **18-20**; Abb. 6.16, Seite 184;  $\Delta T_m$ -Werte: Tab. 6.11, Seite 186) zu einem signifikanten Anstieg der mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und der mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup> errechneten Komplexbildungsenergien kommt. Diese beiden Molecular Modelling-Programme können folglich dazu eingesetzt werden, bei den Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamiden die Derivate mit einer detektierbaren DNA-Bindung von den Testverbindungen ohne DNA-Aktivität zu separieren.



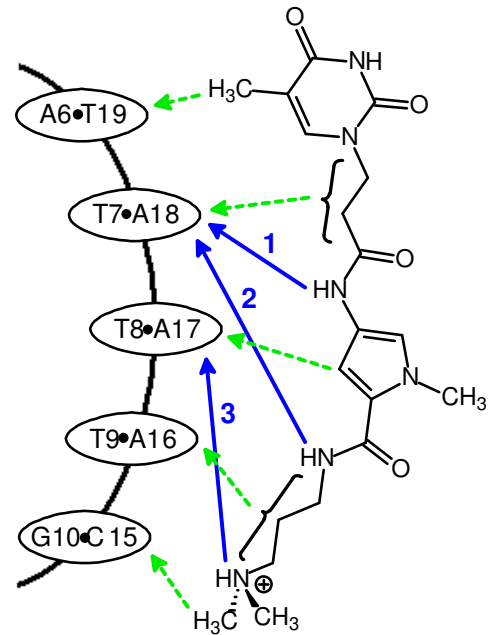
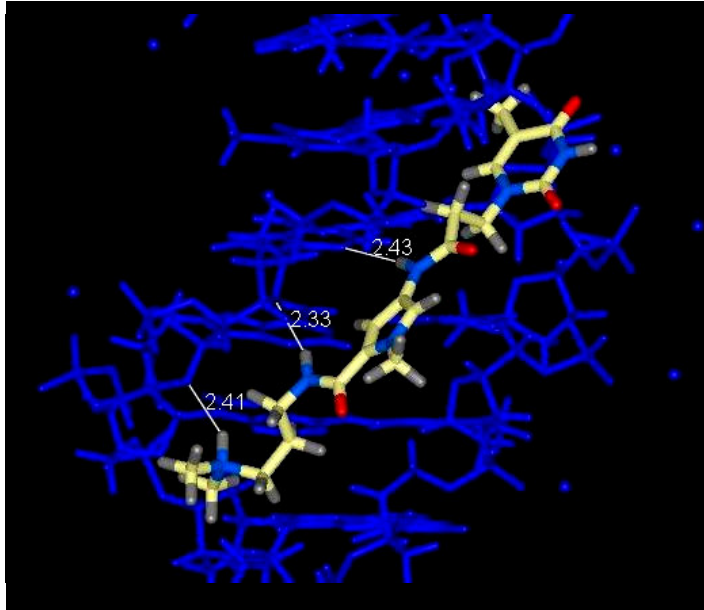
**Abb. 6.19:** Verbindung 15, gebunden an den Rezeptor „102D“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den H-Atomen der Amino-Gruppe der Guanin-Base mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 19 O-2 und Thymin 7 O-2 als Akzeptoren, H-Brücke 2 mit Thymin 8 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 3 → Dreizentren-H-Brücke mit Adenin 18 O-4\* und Adenin 17 N-3 als Akzeptoren, H-Brücke 4 mit Adenin 17 O-4\* als Akzeptor)



**Abb. 6.20A:** Verbindung **16**, gebunden an den Rezeptor „102D“ (Komplex A)

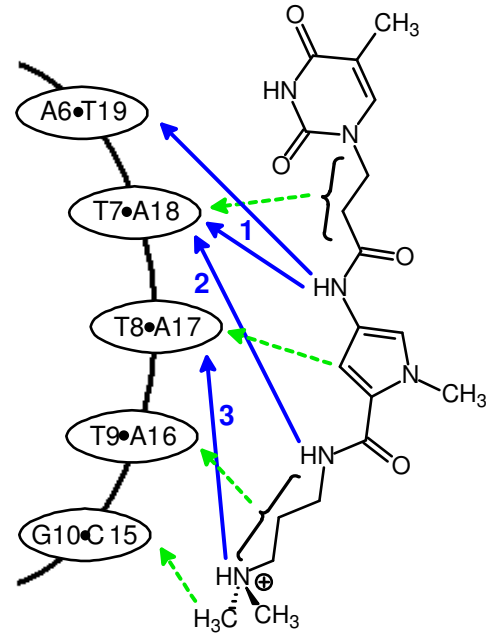
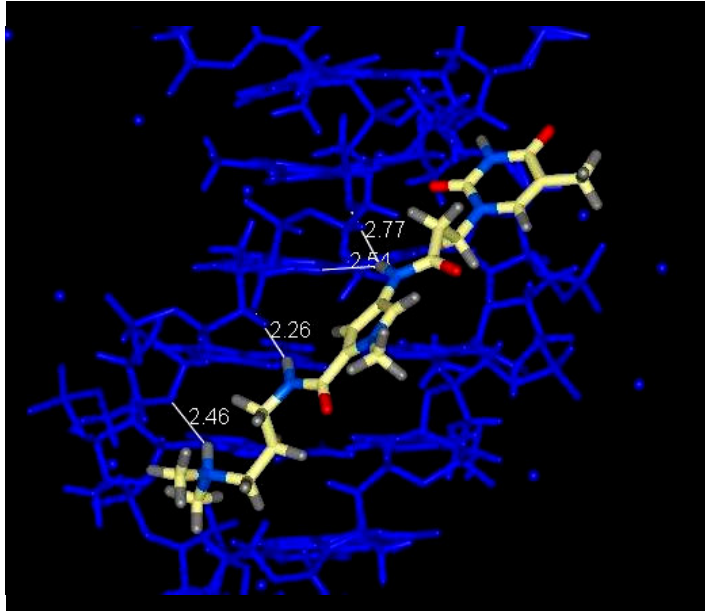
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den H-Atomen der Amino-Gruppe der Guanin-Base mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Adenin 18 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 18 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Adenin 17 O-4\* als Akzeptor)





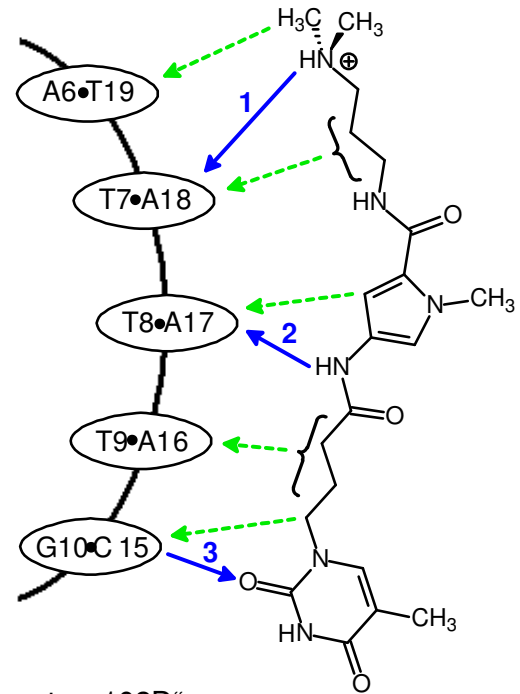
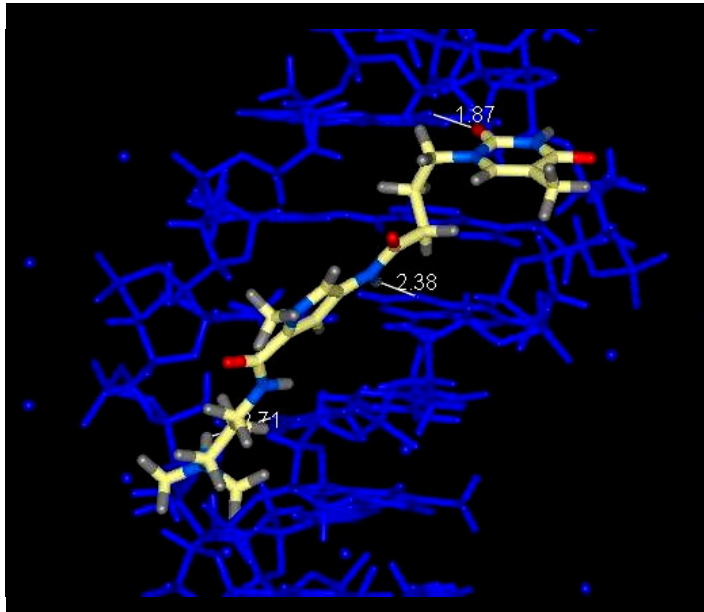
**Abb. 6.20B:** Verbindung **16**, gebunden an den Rezeptor „102D“ (Komplex B)

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den H-Atomen der Amino-Gruppe der Guanin-Base mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 19 O-4\* und Adenin 18 N-3 als Akzeptoren, H-Brücke 2 mit Adenin 18 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Adenin 17 O-4\* als Akzeptor)



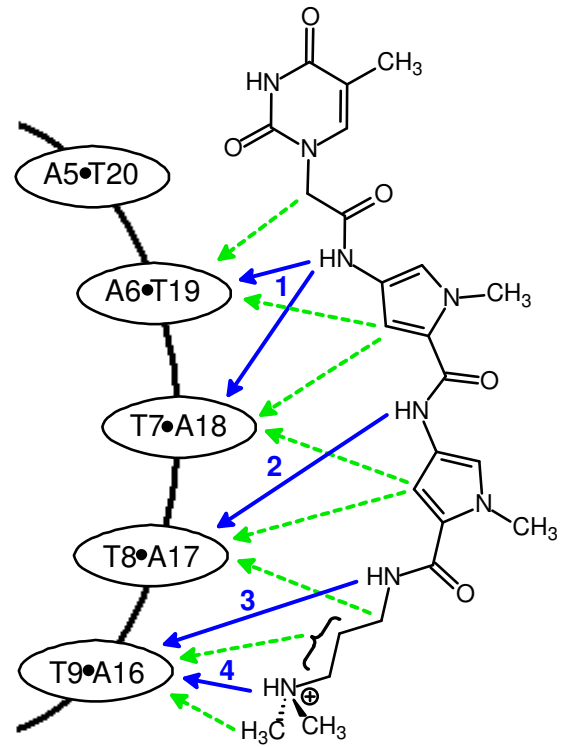
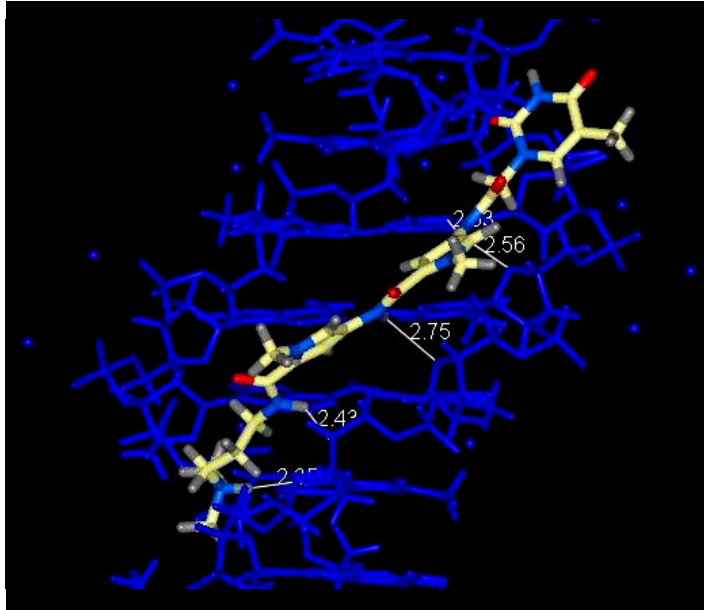
**Abb. 6.21:** Verbindung 17, gebunden an den Rezeptor „102D“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den H-Atomen der Amino-Gruppe der Guanin-Base mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 7 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 17 N-3 als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Guanin 10 H-22 als Donator)



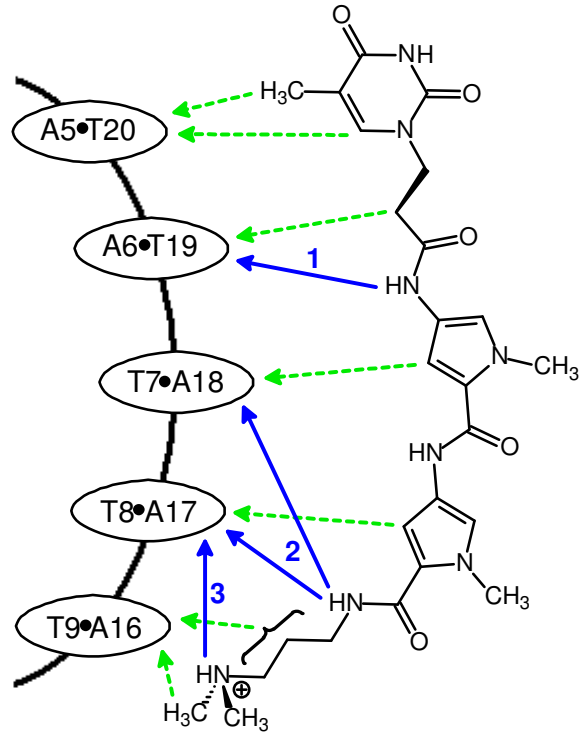
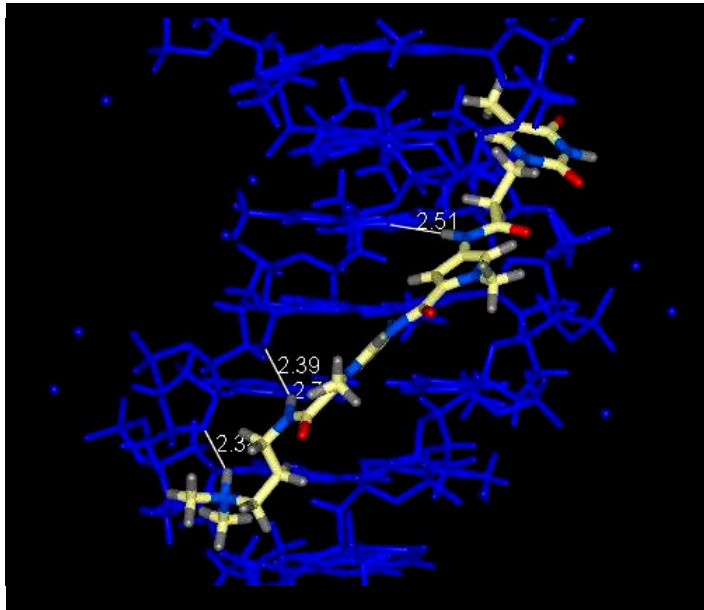
**Abb. 6.22:** Verbindung **18**, gebunden an den Rezeptor „102D“

Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

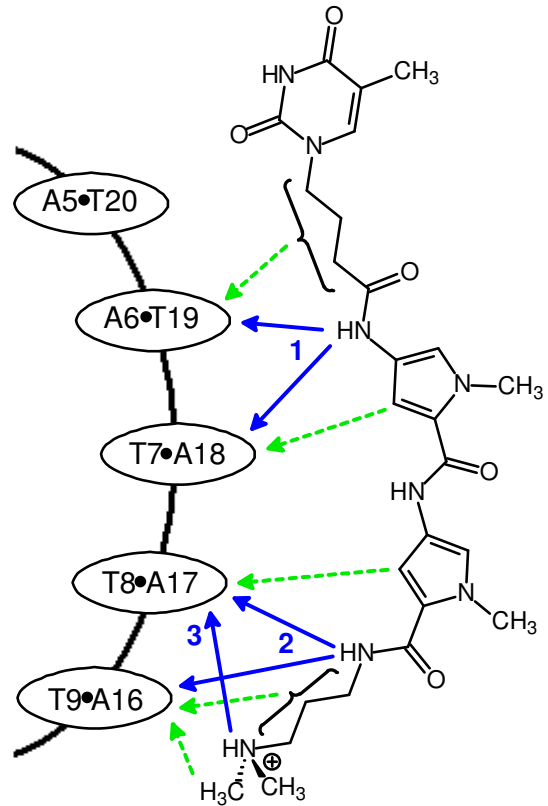
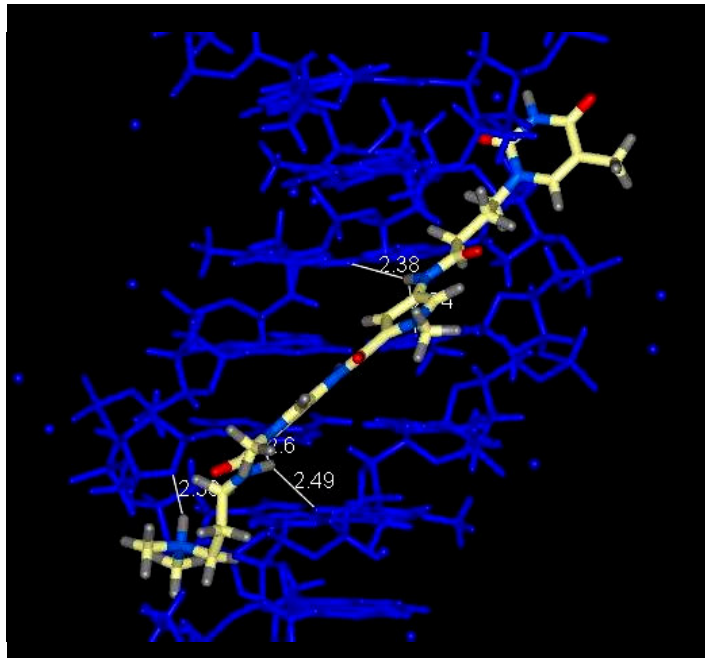
(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helichachse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Adenin 6 N-3 und Thymin 7 O-4\* als Akzeptoren, H-Brücke 2 mit Thymin 8 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Thymin 9 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 4 mit Thymin 9 O-2 als Akzeptor)



**Abb. 6.23:** Verbindung **19**, gebunden an den Rezeptor „102D“  
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex  
 (DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)  
Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung  
 (grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 19 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 → Dreizentren-H-Brücke mit Adenin 18 O-4\* und Adenin 17 N-3 als Akzeptoren, H-Brücke 3 mit Adenin 17 O-4\* als Akzeptor)



**Abb. 6.24:** Verbindung **20**, gebunden an den Rezeptor „102D“

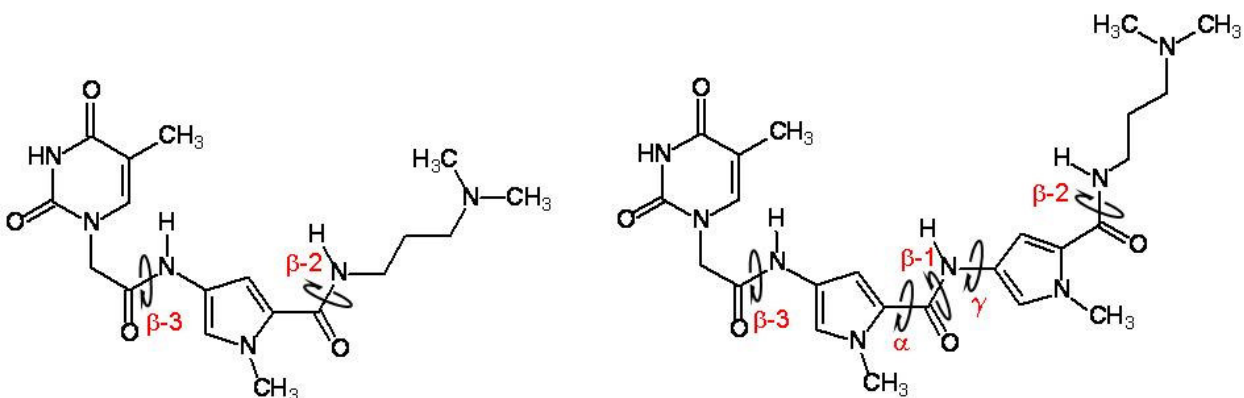
Links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

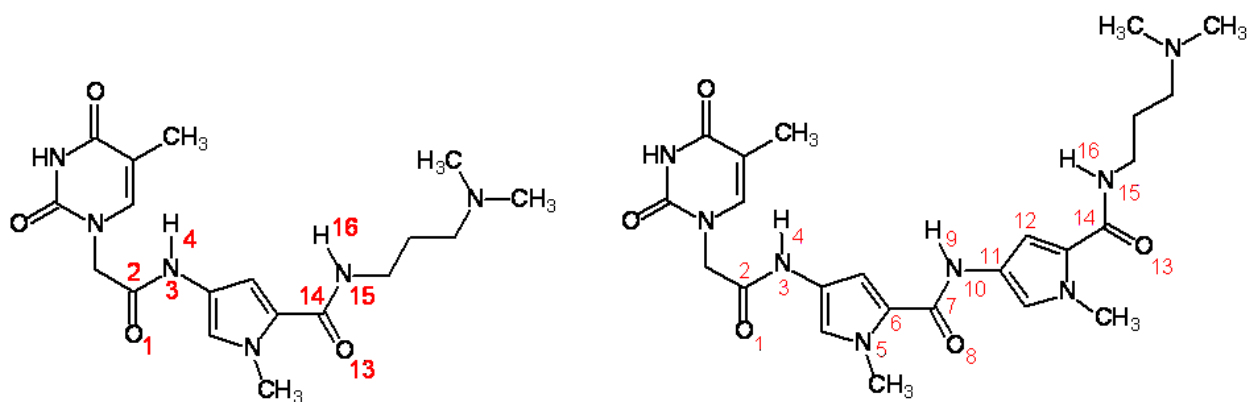
Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 19 O-2 und Thymin 7 O-2 als Akzeptoren, H-Brücke 2 → Dreizentren-H-Brücke mit Adenin 17 N-3 und Thymin 9 O-2 als Akzeptoren, H-Brücke 3 mit Adenin 17 O-4\* als Akzeptor)

Wie bereits bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 172 ff.) detailliert dargestellt, wurden auch die DNA-gebundenen Konformere der Thymingekoppelten Bispyrrol-Derivate **18-20** (Abb. 6.16, Seite 184) nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) auf einen bei der DNA-Ligand-Komplexbildung möglicherweise auftretenden Induced-Fit untersucht. Dazu wurden zunächst die Torsionswinkel  $\alpha$  ( $\angle = \text{N5-C6-C7-O8}$ ),  $\beta-1$  ( $\angle = \text{O8-C7-N10-H9}$ ) und  $\gamma$  ( $\angle = \text{H9-N10-C11-C12}$ ) (Abb. 6.25, Seiten 198-199) gemessen, um anhand der erhaltenen Werte den Winkel  $\delta$  berechnen zu können<sup>[100]</sup>. Dieser Winkel beschreibt die relative Lage der beiden Pyrrol-Ringe zueinander und spiegelt somit die Stärke der bei der DNA-Bindung der Liganden auftretenden Rotationen um die beiden zentralen NH-Pyrrol- und CO-Pyrrol-Bindungen wider. Ergänzend wurden sowohl bei den Mono-, als auch bei den Bispyrrol-Verbindungen die Winkel der C-terminalen Amidbindungen ( $\beta-2$ ;  $\angle = \text{O13-C14-N15-H16}$ ) und die der N-terminalen Amidbindungen ( $\beta-3$ ;  $\angle = \text{O1-C2-N3-H4}$ ) (Abb. 6.25, Seiten 198-199) ermittelt, um Aussagen über die E/Z-Konfiguration der peptidischen Bindungen bei den DNA-gebundenen Konformeren machen zu können. Die gemessenen und errechneten Winkel sind in Tab. 6.13 (Seite 199) aufgeführt.



**Abb. 6.25A:** Schematische Darstellung der betrachteten Torsionswinkel



**Abb. 6.25B:** Schematische Darstellung der für die Winkelmessungen benötigten Atome mit ihrer Nummerierung

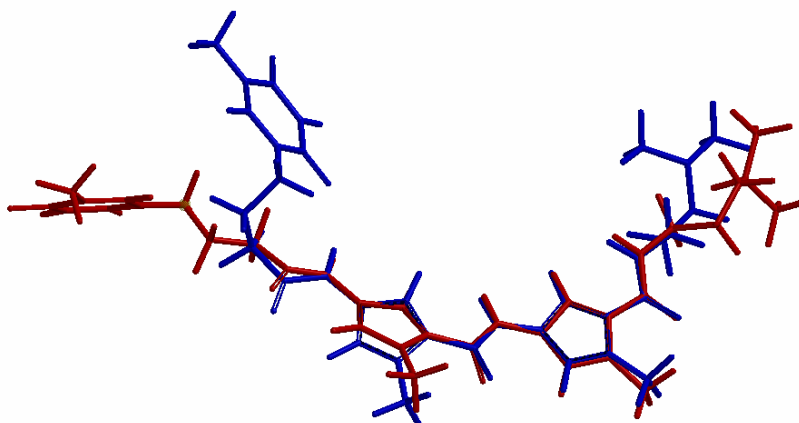
	<b>4</b> (Kristallstruktur <sup>1</sup> )	<b>18<sup>2</sup></b>	<b>19<sup>2</sup></b>	<b>20<sup>2</sup></b>
<b>α</b> (∠ = N5-C6-C7-O8)	-10,6°	17,5°	15,8°	26,6°
<b>β-1</b> (∠ = O8-C7-N10-H9)	-178,6°	-179,2°	-178,3°	172,0°
<b>γ</b> (∠ = H9-N10-C11-C12)	4,9°	3,8°	11,0°	10,6°
<b>δ</b> (berechnet aus α, β-1 und γ)	<b>-7,1°</b>	<b>20,5°</b>	<b>25,1°</b>	<b>45,2°</b>
<b>β-2</b> (∠ = O13-C14-N15-H16)	-175,6°	169,7°	-177,4°	-180,0°
<b>β-3</b> (∠ = O1-C2-N3-H4)	-	-171,3°	172,4°	-171,1°
	<b>15<sup>2</sup></b>	<b>16<sup>2</sup></b> (Komplex A)	<b>16<sup>2</sup></b> (Komplex B)	<b>17<sup>2</sup></b>
<b>β-2</b> (∠ = O13-C14-N15-H16)	177,3°	177,8°	-175,9°	174,7°
<b>β-3</b> (∠ = O1-C2-N3-H4)	-176,7°	177,2°	174,4	164,8°

**Tab. 6.13:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Thymin-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide

<sup>1</sup>: Winkel der Kristallstruktur <sup>[258]</sup>

<sup>2</sup>: Winkel der nach Docking (in ICM-PRO <sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>) vorliegenden Konformationen der Testverbindungen

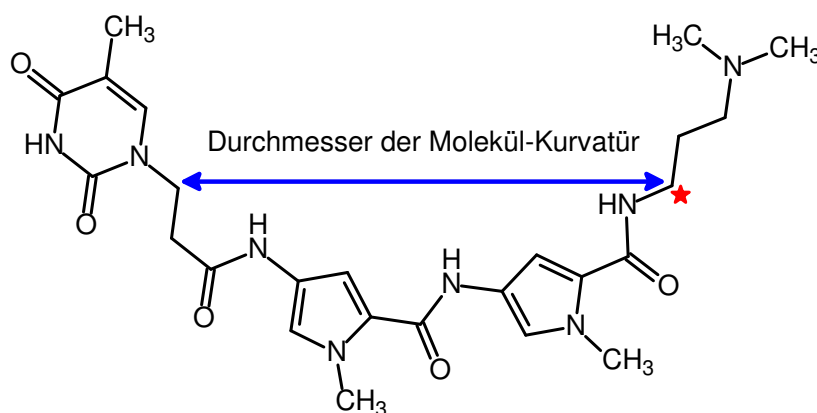
Im Gegensatz zur Kristallstruktur des Nitrobispyrrolcarboxamids **4** (→ Basis für die in SPARTAN<sup>[35]</sup> durchgeführten Konstruktionen der Minimumskonformere der Nukleobasen-gekoppelten Testverbindungen; Abb. 6.5, Seite 158; Kapitel 5.2.2, Seite 122 ff.), weisen die DNA-gebundenen Konformere der Derivate **18-20** keine Coplanarität im Molekül auf: Bei der DNA-Ligand-Komplexbildung dieser Verbindungen wurden die beiden Pyrrol-Ringe, bedingt durch Rezeptor-induzierte Rotationen um die beiden Bindungen „C6-C7“ und „N10-C11“, gegeneinander verdreht ( $\delta > 10^\circ$ ; Tab. 6.13; Seite 199; Abb. 6.26). Die daraus resultierende isohelikale Konformation führt, ebenso wie die von der trans-(Z)-Konfiguration der Amidbindungen hervorgerufene Sichel-form der Moleküle, zu einer besseren Anpassung der Nukleobasen-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide an die Topologie der kleinen Rinne. Dies hat eine Verstärkung der DNA-Bindung der *Minor Groove Binder* zur Folge.



**Abb. 6.26:** Darstellung der isohelikalen Konformation des DNA-gebundenen Konformers der Verbindung **20**: Vergleich des in SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers (blaues Molekül) mit dem Konformer nach Docking und *Refinement* (rotes Molekül)  
(*Alignment* durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)



Ergänzend zu den oben aufgeführten Torsionswinkeln, wurde im Hinblick auf einen bei der DNA-Komplexbildung der Testverbindungen potentiell auftretenden Induced-Fit untersucht, ob bei der DNA-Bindung der Thymin-gekoppelten Pyrrolcarboxamide eine Rezeptor-induzierte Aufweitung der Liganden im Sinne einer Vergrößerung des Kurvatür-Durchmessers zu beobachten ist. Dazu wurden bei den in SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformeren, ebenso wie bei den nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) vorliegenden, DNA-gebundenen Konformeren der Testsubstanzen **15-20** die Abstände zwischen der C-terminalen Seitenkette und dem N-terminalen Linker bestimmt<sup>[99]</sup>. Als Bezugspunkte der Messungen dienten dabei stets das mit einem roten Stern markierte C-Atom der Dimethylaminopropyl-Kette (Fixpunkt), sowie das jeweils genau gegenüberliegende Linker-Atom (von der Konformation der jeweiligen Testverbindung abhängiger Messpunkt) (Abb. 6.27). Die ermittelten Durchmesser sind in Tab. 6.14 (Seite 202) aufgeführt.



**Abb. 6.27:** Bezugspunkte der Messung des Kurvatür-Durchmessers der *Minor Groove Binder*

	Anzahl der Pyrrol-Ringe	Länge des N-terminalen Linkers	Durchmesser des Minimumskonformers <sup>1</sup> [Å]	Durchmesser des DNA-gebundenen Konformers <sup>2</sup> [Å]
<b>15</b>	1	C-2	9,11	9,48
<b>16</b>	1	C-3	10,39	10,03 / 10,05 <sup>3</sup>
<b>17</b>	1	C-4	9,11	9,32
<b>18</b>	2	C-2	13,42	13,32
<b>19</b>	2	C-3	14,80	14,85
<b>20</b>	2	C-4	13,42	16,11

**Tab. 6.14:** Durchmesser der Molekül-Kurvatur der Minimums- und der DNA-gebundenen Konformere der Thymin-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide

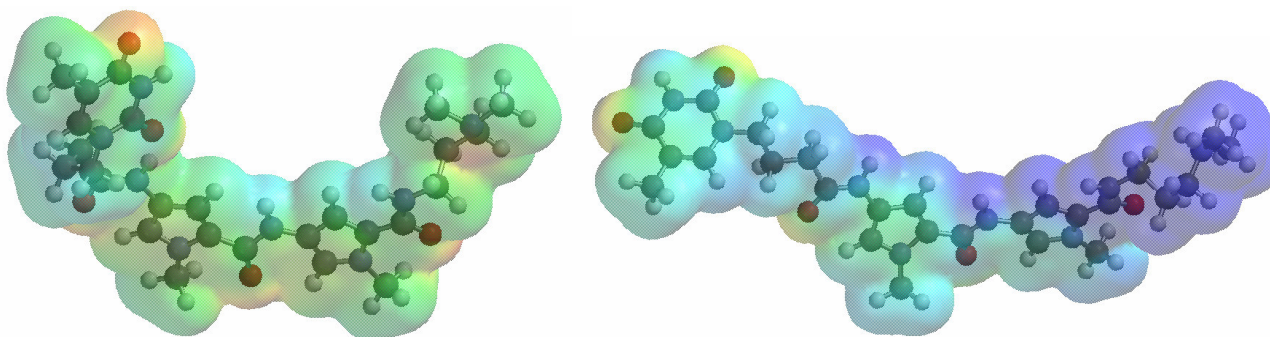
<sup>1</sup>: Minimumskonformer, berechnet in SPARTAN<sup>[35]</sup> unter Verwendung der Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.)

<sup>2</sup>: Konformer nach Docking (in ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM<sup>[34]</sup>)

<sup>3</sup>: Durchmesser des Liganden in Komplex A/Durchmesser des Liganden in Komplex B

Eine signifikante, durch die DNA-Bindung hervorgerufene Aufweitung des Moleküls tritt nur bei dem Derivat **20** auf (Tab. 6.14; Abb. 6.28, Seite 203). Hier nimmt der Kurvatür-Durchmesser der komplexierten Form im Vergleich zum Minimumskonformer um mehr als 2 Å zu. Bei den anderen Testsubstanzen unterscheiden sich die Minimums- und die DNA-gebundenen Konformere dagegen nur geringfügig voneinander. Folglich ist eine Molekül-Aufweitung für eine erfolgreiche DNA-Ligand-Komplexbildung der Thymin-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide nicht generell notwendig.

Aus den in SPARTAN<sup>[35]</sup> mit der semiempirischen AM1-Methode<sup>[184,185]</sup> (Kapitel 5.2.2, Seite 127) durchgeführten Berechnungen des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP; Kapitel 4.1.2, Seite 96) der Nucleobasen-gekoppelten Testverbindungen geht hervor, dass – ebenso wie bei den Fünfring-Heteren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 160 ff.) – die der elektronenreichen kleinen Rinne zugewandte, konkave Molekülseite der Liganden ein positives MEP aufweist (Abb. 6.28, Seite 203). Dies wirkt sich auf die DNA-Bindung im Sinne einer Verstärkung der DNA-Ligand-Interaktionen aus.



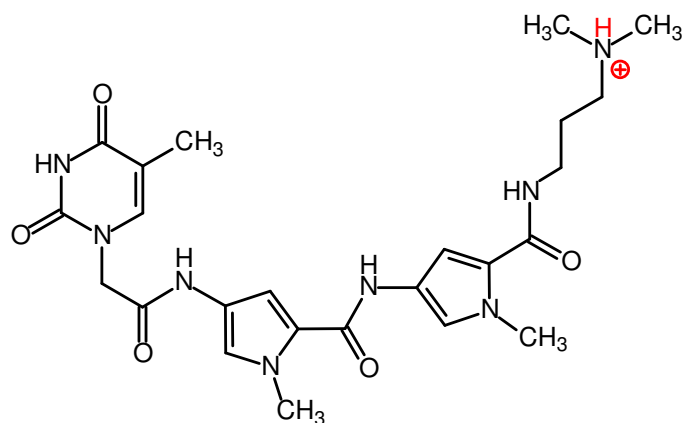
**Abb. 6.28:** Molekulares elektrostatisches Potential der Thymin-gekoppelten Pyrrol-carboxamide (hier: Verbindung **20**)

Links: Minimumskonformer (in SPARTAN <sup>[35]</sup> simuliert)

Rechts: DNA-gebundenes Konformer (nach Docking in ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und *Refinement* in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>)

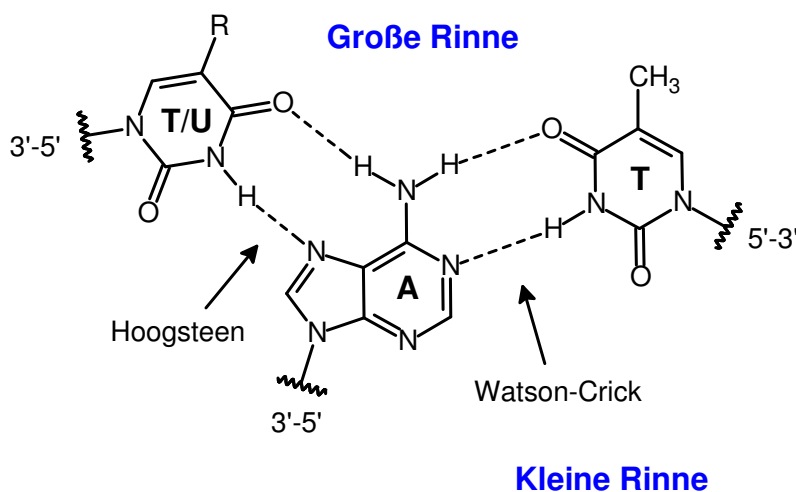
[Berechnung des MEP in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von -80,0 kcal/mol bis +70,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an <sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht <sup>[25,197]</sup>]

Wie bereits bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden zu beobachten war (Kapitel 6.1.2.3, Seite 176), spielt die bei pH 7 protoniert vorliegende, C-terminale Dimethylaminopropyl-Seitenkette (Abb. 6.29, Seite 204) auch bei der DNA-Bindung der Nucleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrol-Derivate eine wichtige Rolle. In jedem der sieben untersuchten Komplexe (Abb. 6.19-6.24, Seiten 191-197) ist das quartäre Ammonium-Ion als Donor an der Ausbildung einer Wasserstoff-Brücke zu einer DNA-Base beteiligt. Dadurch wird, neben der Positionierung des Liganden am Rezeptor, die Kinetik der Komplexbildung im Sinne einer längeren Residualzeit der Testsubstanz an der DNA beeinflusst <sup>[278]</sup>. Dies hat, ebenso wie die zahlreichen van der Waals-Wechselwirkungen, die die Methyl- und Methylen-Gruppen der aliphatischen Seitenkette zur DNA ausbilden (Kapitel 6.3.5, Seite 251 ff.), eine Verstärkung der DNA-Bindung zur Folge.



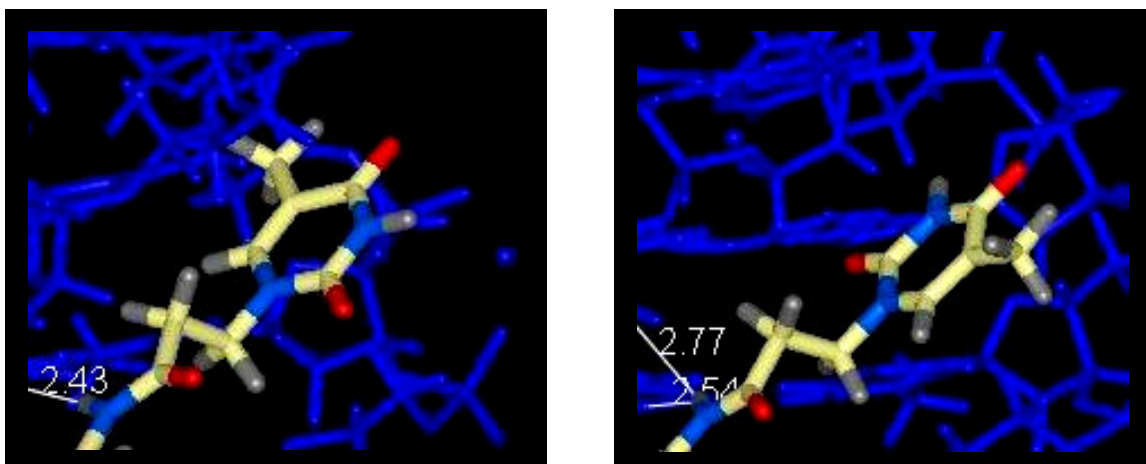
**Abb. 6.29:** Beispiel eines Thymin-gekoppelten Pyrrolcarboxamids mit protoniert vorliegendem Stickstoffatom in der Seitenkette (hier: Verbindung **18**)

Die Nucleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide wurden mit dem Ziel synthetisiert, eine Erhöhung der DNA-Affinität durch eine zusätzlich zur Rinnenbindung auftretende *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin- bzw. Uracil-Moleküls mit einer Adenin-Base der DNA zu erreichen (Abb. 6.30). Aus diesem Grund wurde die jeweilige Stellung des Thymin-Rings in den mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-Ligand-Komplexen (Abb. 6.19-6.24, Seiten 191-197) genauer betrachtet.



**Abb. 6.30:** Schematische Darstellung der *Hoogsteen*-Basenpaarung eines Thymin- (R = -CH<sub>3</sub>) bzw. Uracil- (R = -H) Moleküls mit einer Adenin-Base in der großen Rinne der DNA (nach *DaRos*<sup>[135]</sup> und *Nielsen*<sup>[139-142]</sup>)

Eine *Hoogsteen*-Basenpaarung zwischen dem Thymin-Molekül des Liganden und einem AT-Basenpaar in der großen Rinne der DNA tritt bei keinem der untersuchten Komplexe auf (Abb. 6.19-6.24, Seiten 191-197). Die Nukleobase liegt, wie auch die Pyrrolcarboxamid-Struktur mit der C-terminal verknüpften Dimethylaminopropyl-Seitenkette, in der kleinen Furche des Oligonukleotids eingelagert vor. Dabei lassen sich zwei Stellungen des Pyrimidin-Rings an der DNA unterscheiden: Bei den mit den Verbindungen **15**, **17**, **18** und **20** gebildeten Komplexen – ebenso wie bei Komplex B des Propionsäure-Derivats **16** – ragt die Methyl-Gruppe des Thymins aus der kleinen Rinne heraus; bei der DNA-Bindung des Bispyrrolcarboxamids **19** und bei dem im Vergleich zu Komplex B etwas energieärmeren Komplex A des Derivats **16**, ist sie dagegen dem Inneren der Rinne zugewandt (Abb. 6.31; Abb. 6.16, Seite 184).



**Abb. 6.31:** Darstellung der zwei unterscheidbaren Positionen des Thymin-Rings an der DNA

Links: Die Methyl-Gruppe des Thymins ist dem Inneren der kleinen Rinne zugewandt (Ausschnitt aus dem mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierten Komplex A der Verbindung **16**)

Rechts: Die Methyl-Gruppe des Thymins ragt aus der kleinen Rinne heraus (Ausschnitt aus dem mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> simulierten Komplex B der Verbindung **16**)

## 6.2.5 Zytotoxizitätsstudien des NCI

In dem mit drei Krebszelllinien durchgeführten *Präscreening* des *National Cancer Institute* (NCI) zeigte keine der getesteten Verbindungen **9-11**, **13-17**, **19** und **20** zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften <sup>[37,145]</sup>.

## 6.2.6 Diskussion der Ergebnisse

Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass das gesamte Kollektiv der untersuchten Nukleobasen-gekoppelten Bispyrrol-Verbindungen (Verbindungen **13**, **14** und **18-21**) eine, wenn auch nur schwach ausgeprägte, DNA-Affinität besitzt, während keines der getesteten Monopyrrol-Derivate (Verbindungen **9-11** und **15-17**; Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184) an die DNA bindet (Kapitel 6.2.2, Seite 185 ff.; Abb. 6.32, Seite 208).

Die erhobenen *in silico*-Daten lassen vermuten, dass dieses Resultat nicht, wie ursprünglich angenommen, auf der bei den Bispyrrolcarboxamiden zusätzlich vorhandenen, als potentieller H-Brücken-Donor fungierenden, dritten Amidbindung zurückzuführen ist: Bei der Majorität der mit den Bispyrrol-Derivaten **18-20** simulierten Komplexe sind nicht 3, sondern nur 2 amidische Stickstoffatome an der Ausbildung von H-Brücken-Bindungen zwischen Ligand und Rezeptor beteiligt (Tab. 6.15, Seite 207). [Da das DNA-Ligand-Docking zwecks Ergebnisvalidierung mit jeder Testverbindung mehrfach durchgeführt wurde (Kapitel 5.4.1.2, Seite 142 ff.), basiert diese Aussage nicht allein auf den 3 hier dargestellten, jeweils energetisch günstigsten, sondern auf insgesamt 30 simulierten Komplexen.] Diese Beobachtung korreliert mit den in dem Programm HYPERCHEM <sup>[34]</sup> mit der Kraftfeldmethode AMBER <sup>[179,180]</sup> berechneten Energien, die bei der Komplexbildung infolge des Aufbaus intermolekularer Wasserstoff-Brücken freigesetzt wurden (Kapitel 5.4.2, Seiten 144-145), und die bei den Bispyrrolcarboxamiden nicht größer (sprich: negativer) sind als bei den Monopyrrol-Derivaten (Tab. 6.15, Seite 207).

Die nur bei den Testsubstanzen der Bispyrrol-Reihe messbaren DNA-Affinitäten lassen sich vielmehr dadurch erklären, dass die für die DNA-Bindung wichtigen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor, als Folge der

durch die Einführung des zweiten Pyrrol-Rings bedingten Molekülgrößen-Zunahme verstärkt werden (Tab. 6.15).

Des Weiteren geht aus den Docking-Studien hervor, dass die Monopyrrol-Derivate bei der Komplexbildung nur 4 bis 5, die Bispyrrol-Analoga dagegen 6 Basenpaare umschließen (Abb. 6.19-6.24, Seiten 191-197). Indem sich die Bispyrrolcarboxamide somit in einen größeren Abschnitt der kleinen Rinne einlagern, können sie auch mehr Wassermoleküle von der DNA verdrängen, was über eine Entropie-Steigerung zu einer Verstärkung der DNA-Bindung führt <sup>[20]</sup>. Dieser aus den hydrophoben DNA-Ligand-Interaktionen resultierende Effekt wird allerdings bei den im Vakuum ablaufenden Molecular Modelling-Simulationen nur unzureichend berücksichtigt, so dass er in die mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> berechneten Komplexbildungsenergien nicht in einem der Realität entsprechenden Ausmass einbezogen wird <sup>[20,241]</sup>.

	Anzahl der an den H-Brücken-Bindungen beteiligten Amidbindungen	durch H-Brücken-Bindungen freiwerdende Komplexbildungsenergie <sup>1</sup> [kcal/mol]	Durchmesser des DNA-gebundenen Konformers <sup>2</sup> [Å]	durch van der Waals-WW freiwerdende Komplexbildungsenergie <sup>3</sup> [kcal/mol]
<b>15</b>	2	-0,84	9,48	-45,3
<b>16</b>	2 / 2 <sup>4</sup>	-0,63 / -0,72 <sup>4</sup>	10,03 / 10,05 <sup>4</sup>	-47,3 / -43,7 <sup>4</sup>
<b>17</b>	1	-0,93	9,32	-46,0
<b>18</b>	3	-0,65	13,32	-59,1
<b>19</b>	2	-0,57	14,85	-65,0
<b>20</b>	2	-0,70	16,11	-64,1

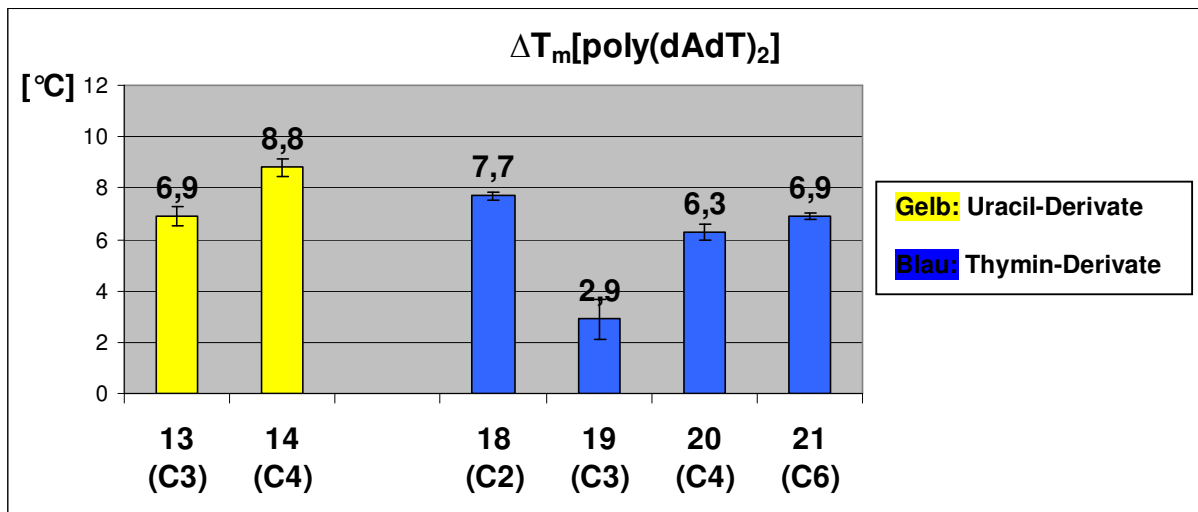
**Tab. 6.15:** Eigenschaften der DNA-Ligand-Komplexe und der DNA-gebundenen Konformere der Thymin-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamide

<sup>1</sup>: Energie, die auf die Bildung von H-Brücken zurückzuführen ist (nach dem *Refinement* in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> berechnet; verwendete Rechenmethode: AMBER <sup>[179,180]</sup>)

<sup>2</sup>: Konformer nach Docking (in ICM-PRO <sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM <sup>[34]</sup>); Messung des Kurvatür-Durchmessers: Abb. 6.27 (Seite 201)

<sup>3</sup>: Energie, die auf van der Waals-Wechselwirkungen zurückzuführen ist (nach dem *Refinement* in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> berechnet; verwendete Rechenmethode: AMBER <sup>[179,180]</sup>)

<sup>4</sup>: Angaben bezogen auf Komplex A / Komplex B



**Abb. 6.32:**  $\Delta T_m[\text{poly(dAdT)}_2]$ -Werte der Thymin- und Uracil-gekoppelten Bispyrrol-carboxamide

Neben der Bedeutung des zweiten Pyrrol-Rings für die DNA-Bindung sollte auch der Einfluss der Linkerlänge auf die DNA-Affinität der Nucleobasen-gekoppelten Pyrrol-carboxamide untersucht werden.

Dabei zeigte sich, dass für die beiden Testverbindungen, bei denen der Uracil- bzw. der Thymin-Ring über einen Propionsäure-Linker mit dem Bispyrrolcarboxamid-Strukturelement verknüpft ist (Verbindung **13** bzw. **19**), niedrigere  $\Delta T_m$ -Werte ermittelt wurden als für die entsprechenden homologen Derivate mit einem N-terminalen C-4-Linker (Verbindung **14** bzw. **20**; Abb. 6.32; Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184). Diese Beobachtung korreliert mit den Energien, die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> für die mit den Thymin-gekoppelten Verbindungen **19** und **20** simulierten Komplexe berechnet wurden (Tab. 6.12, Seite 190). Vermutlich ist die in den *in vitro*-Studien nachgewiesene, gesteigerte DNA-Aktivität der Derivate mit Buttersäure-Linker eine Folge der durch die zusätzliche Methylene-Gruppe des Linkers verstärkten van der Waals-Wechselwirkungen zwischen DNA und Ligand, auch wenn diese Hypothese durch die mit HYPERCHEM<sup>[34]</sup> (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) durchgeführten Berechnungen der Komplexbildungsenergien, die als Folge von van der Waals-Interaktionen freigesetzt wurden, nicht bestätigt werden konnte (Tab. 6.15, Seite 207). Darüber hinaus ermöglicht der Buttersäure-Linker sehr wahrscheinlich eine im Vergleich zu dem C-3-Linker spannungsfreiere Einlagerung der entsprechenden Derivate in die kleine Rinne der



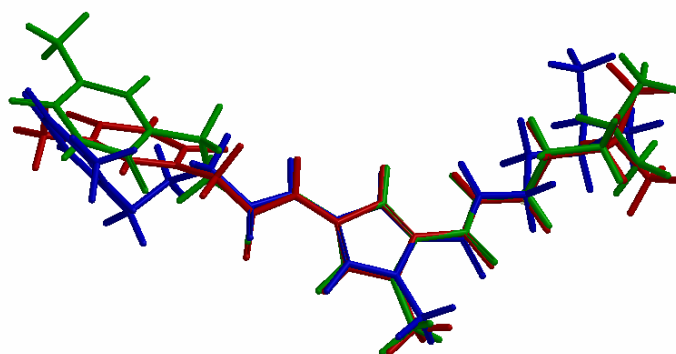
DNA, was sich ebenfalls energetisch günstig auf die DNA-Ligand-Interaktionen der Thymin-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide auswirken könnte.

Die bei der Synthese der Verbindung **21** realisierte, weitere Verlängerung der N-terminalen Seitenkette auf insgesamt 6 C-Atome führte nur zu einem minimalen Anstieg der gemessenen DNA-Affinität (Abb. 6.32, Seite 208). Möglicherweise wird hier die durch die Molekülvergrößerung bedingte Zunahme der van der Waals-Wechselwirkungen durch eine Abnahme der Entropie kompensiert, die auf den bei der DNA-Bindung auftretenden Verlust der bei dem Derivat **21** zahlreich vorhandenen Freiheitsgrade zurückzuführen ist <sup>[20]</sup> (im Molekül der Verbindung **21** treten 237, bei dem Derivat **20** dagegen nur 219 Freiheitsgrade auf; in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit der semiempirischen AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> berechnet). Zudem lässt der im Vergleich zu der Buttersäure-Verbindung **20** nur geringfügig höhere  $\Delta T_m$ -Wert des Derivats **21** vermuten, dass trotz des längeren Linkers auch hier keine *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin-Rings mit einer Adenin-Base in der großen Rinne der DNA zustande kommt.

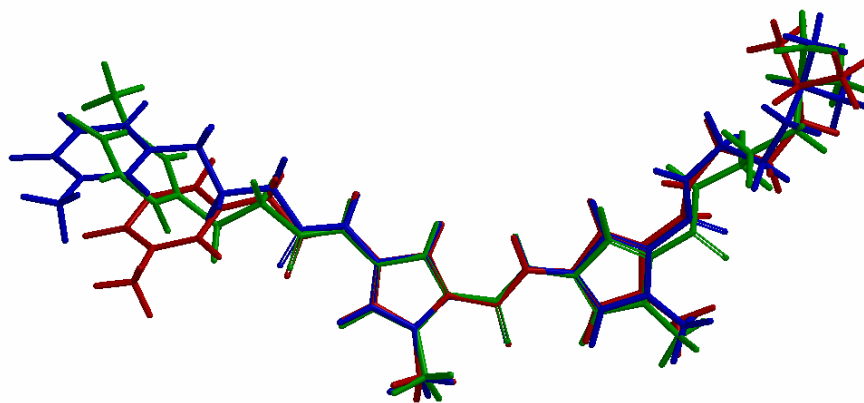
Die größte DNA-Affinität der getesteten Thymin-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide weist das Derivat **18** auf, bei dem die Nukleobase über einen Essigsäure-Linker mit dem N-terminalen Pyrrol-Ring verknüpft ist (Abb. 6.32, Seite 208). Ein Erklärungsansatz für diesen Sachverhalt lässt sich weder aus der graphischen Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe, noch aus den mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> errechneten Komplexbildungsenergien ableiten (Abb. 6.22-6.24, Seiten 195-197; Tab. 6.12, Seite 190). Dies macht die Grenzen der Leistungsfähigkeit und der Aussagekraft von Molecular Modelling-Studien deutlich. Es ist jedoch denkbar, dass bei der DNA-Bindung des Essigsäure-Derivats **18** ein im Vergleich zu den homologen Verbindungen mit Propionsäure- bis Hexansäure-Linkern energetisch günstigeres Verhältnis der von dem Molekül zur DNA aufgebauten van der Waals-Wechselwirkungen zu der Entropieabnahme, die durch den Verlust von Molekül-Freiheitsgraden bedingt ist, vorliegt: Da eine Verkürzung des Linkers nicht nur eine Verminderung der zwischen DNA und Ligand ausgebildeten van der Waals-Interaktionen, sondern auch eine Reduktion der im Molekül vorhandenen Freiheitsgrade zur Folge hat (mit SPARTAN <sup>[35]</sup> werden für die Verbindung **18** nur 201 Freiheitsgrade ermittelt), ist der bei der DNA-Bindung auftretende Entropieverlust bei dem Derivat **18** kleiner als bei den anderen Bispyrrolcarboxamiden. Dies könnte der Grund für die unerwartet gute DNA-Affinität des Essigsäure-Derivats sein. Zur Be-

stätigung dieser Hypothese müssten allerdings weiterführende kalorimetrische Messungen wie z. B. isothermale Titrations durchgeführt werden <sup>[68]</sup>.

In den beiden folgenden Abbildungen sind jeweils die nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) vorliegenden Konformere der Thymin-gekoppelten Monopyrrol-Derivate **15-17** (Abb. 6.33) und die der Bispyrrol-Analoga **18-20** (Abb. 6.34) graphisch dargestellt. Der Vergleich der DNA-gebundenen Konformere zeigt, dass das Mono- bzw. Bispyrrolcarboxamid-Strukturelement und die aliphatische Dimethylaminopropyl-Seitenkette bei allen Testverbindungen in sehr ähnlicher Weise in die kleine Rinne eingelagert sind. Die bei den verschiedenen Derivaten jeweils unterschiedlich langen N-terminalen Linker haben jedoch variable Position des Thymin-Rings an der DNA zur Folge.

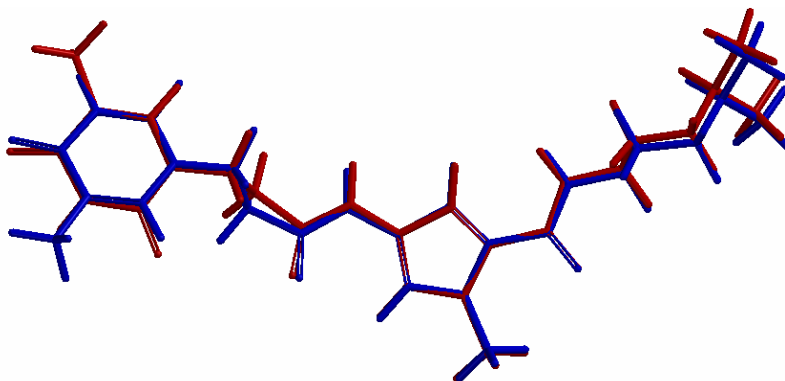


**Abb. 6.33:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Monopyrrol-Derivate **15** (rotes Molekül), **16** (grünes Molekül; Ligand des Komplexes A) und **17** (blaues Molekül)  
(*Alignment* durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)



**Abb. 6.34:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Bispyrrol-Derivate **18** (rotes Molekül), **19** (grünes Molekül) und **20** (blaues Molekül)  
(*Alignment* durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)

Die  $T_m$ -Wert-Messungen zeigen, dass die Uracil-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide höhere DNA-Affinitäten aufweisen als die analogen Thymin-Verbindungen (Vergleich der Derivate **13** und **19**; Vergleich der Verbindungen **14** und **20**; Abb. 6.32, Seite 208; Abb. 6.15-6.16, Seiten 183-184). Die Hypothese, dass diese unterschiedlichen DNA-Aktivitäten auf eine durch die Methyl-Gruppe des Thymin-Rings bedingte, sterische Hinderung der DNA-Bindung zurückzuführen sind, lässt sich auf der Basis der durchgeführten Docking-Studien nicht bestätigen. So existieren, wie bereits in Kapitel 6.2.4 (Seite 189 ff.) erwähnt, bei der Verbindung **16** zwei energetisch weitgehend gleichwertige DNA-Ligand-Komplexe, wobei die Methyl-Gruppe der Nukleobase des einen DNA-gebundenen Konformers aus der kleinen Rinne herausragt (Komplex B; Abb. 6.20B, Seite 193), während sie bei dem anderen untersuchten Komplex dem Inneren der kleinen Furche zugewandt ist (Komplex A; Abb. 6.20A, Seite 192; Abb. 6.35). Auch bei der DNA-Bindung des Derivats **19** ist der Thymin-Ring so an der DNA orientiert, dass die Methyl-Gruppe zum Rinnenboden hin ausgerichtet ist (Abb. 6.23, Seite 196), wodurch zusätzliche van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor zustande kommen. Um die höhere DNA-Affinität der Uracil-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide erklären zu können, sind folglich Kristallstrukturen der mit Vertretern der Uracil- und der Thymin-Reihe gebildeten DNA-Ligand-Komplexe notwendig.



**Abb. 6.35:** Darstellung der beiden DNA-gebundenen Konformere der Verbindung **16**:

Vergleich des in Komplex A vorliegenden Konformers (rotes Molekül; die Methyl-Gruppe des Thymin-Rings ist der kleinen Rinne zugewandt) mit dem Konformer des Komplexes B (blaues Molekül; die Methyl-Gruppe des Thymin-Rings ragt aus der kleinen Rinne heraus)

(Alignment durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

## 6.3 Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide mit N-terminal gekoppelten Interkalatoren/ Combilexine

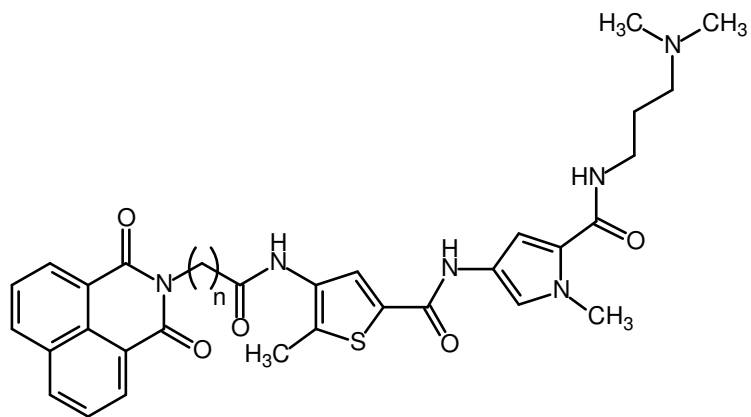
### 6.3.1 Einleitung und Zielsetzung

Bei den bereits in Kapitel 2.3.3 (Seite 50 ff.) detailliert beschriebenen, DNA-bindenden Combilexinen handelt es sich um sog. Hybrid-Verbindungen, die einen – zumeist von den natürlichen Antibiotika Netropsin und Distamycin A abgeleiteten – *Minor Groove Binder* aufweisen, welcher mit einem interkalierenden, polyzyklischen Chromophor kovalent verknüpft ist <sup>[6,119,127]</sup>. Die Combilexine wurden mit dem Ziel entwickelt, eine durch den rinnenbindenden Molekülteil bedingte Zunahme der Sequenzselektivität mit einer Interkalator-vermittelten Steigerung der DNA-Affinität zu verbinden <sup>[6]</sup>. Außerdem wird eine Hemmung der für die DNA-Replikation und Transkription wichtigen Topoisomerasen angestrebt, die ebenfalls auf die Beteiligung des Interkalators zurückzuführen ist <sup>[6]</sup>. Der bei diesen Hybrid-Molekülen vorliegende, duale DNA-Bindemodus soll folglich die Zytotoxizität der Verbindungen verstärken. Die chemotherapeutische Anwendbarkeit dieser viel versprechenden Substanzklasse soll schließlich durch die ebenfalls verfolgte Verbesserung der Zellmembranpenetration, mit der in der Tumorzelle das Anfluten einer für einen biologischen Effekt ausreichenden Substanzkonzentration erreicht werden soll, ermöglicht werden <sup>[6]</sup>.

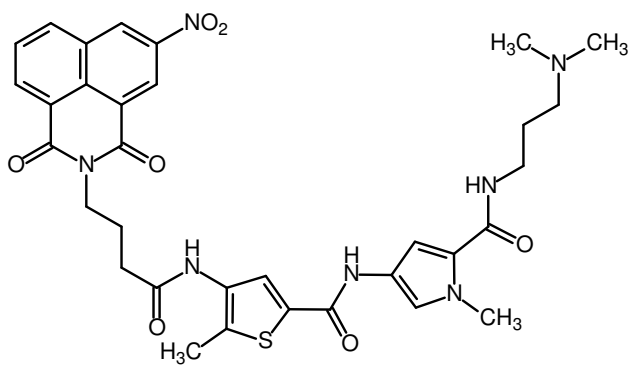
Die im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten Combilexine weisen eine Netropsin-analoge, heterozyklische Polyamid-Struktur auf. Neben Hybrid-Molekülen mit Bispyrrolcarboxamid als rinnenbindendem Strukturelement <sup>[37,128,154]</sup>, wurden dabei auch bioisostere Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Derivate (Thiophen-, Thiazol- und Imidazol-pyrrolcarboxamide) und Bisimidazolcarboxamid-Verbindungen synthetisiert <sup>[38]</sup>. Das interkalierende, chromophore System – oftmals ein Trizyklus wie Naphthalimid, 5-Nitronaphthalimid oder Acridon – wurde über einen Linker variabler Kettenlänge N-terminal mit dem *Minor Groove Binder* verknüpft <sup>[37,38,128,154]</sup> (Abb. 6.36-6.39, Seiten 214-218).

Unter Einsatz der durch die vorangegangenen Studien bereits etablierten biophysikalischen, biochemischen und computergestützten Verfahren, wurden die DNA-bindenden Eigenschaften der Combilexine der Bispyrrol-Reihe ebenso wie die der bioisosteren Analoga untersucht. Zunächst sollten die Stärke der DNA-Affinität und die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der Hybrid-Moleküle mit Thiophen-pyrrol-,

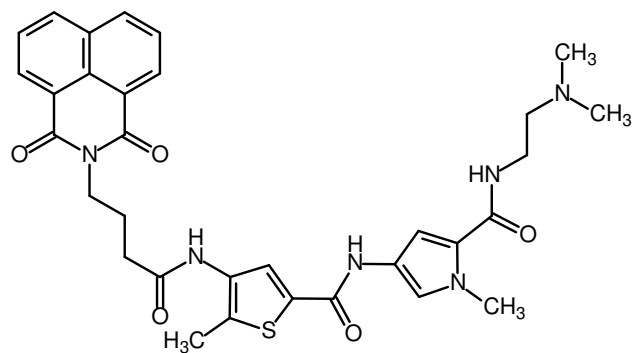
Thiazol-pyrrol-, Imidazol-pyrrol- und Bisimidazol-Struktur im Anschluss an ihre Darstellung mit Hilfe von  $T_m$ -Wert-Messungen ermittelt werden. Die aus diesen Daten resultierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sollten das Design neuer, potentiell aktiverer Derivate dieser viel versprechenden Verbindungsklasse beeinflussen. Zur Verifizierung der berechneten  $\Delta T_m$ -Werte sollten für einige Combilexine mit hoher DNA-Affinität zusätzlich die DNA-Bindekonstanten mittels Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bestimmt werden. Ergänzend zu den *in vitro*-Studien wurden mit einigen ausgewählten Vertretern Molecular Modelling-Simulationen durchgeführt, um den zu erwartenden dualen DNA-Bindemodus ( $\rightarrow$  Interkalation und Rinnenbindung) bestätigen und den Einfluss verschiedener Strukturelemente ( $\rightarrow$  Länge der C-terminalen, aliphatischen Seitenkette, Aufbau des Hetaren-pyrrolcarboxamid-Grundkörpers, Länge des N-terminalen Linkers und Aufbau des interkalierenden Chromophors) auf die DNA-Bindung der Hybrid-Moleküle untersuchen zu können. Auf der Basis der von den Verbindungen **4** <sup>[258]</sup> (Bispyrrolcarboxamid), **5** <sup>[259]</sup> (Thiophen-pyrrolcarboxamid) und **8** <sup>[260]</sup> (Imidazol-pyrrolcarboxamid) existierenden Kristallstrukturen und unter Verwendung des in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers des Aminothiazol-Derivats **7** (Abb. 6.5, Seite 158) wurden zunächst dreidimensionale Computermodelle der Testverbindungen mit dem in SPARTAN <sup>[35]</sup> implementierten Baukastensystem <sup>[197]</sup> konstruiert und mittels Konformeranalysen (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) energieminiert. Anschließend sollten einige, die DNA-Bindung potentiell beeinflussende Moleküleigenschaften (u. a. Grenzorbitalenergien, molekulares elektrostatisches Potential) der aus den Konformeranalysen resultierenden Minimumskonformere der Testverbindungen berechnet werden (Kapitel 5.2.2, Seite 127). In den darauf folgenden Docking-Studien wurden DNA-Ligand-Komplexe der energiearmen Konformere mit einem Undekanukleotid mit Interkalationskavität simuliert. Durch graphische Auswertung der Komplexe und anhand der mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und der mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup> (mit der Kraftfeldmethode AMBER <sup>[179,180]</sup>) errechneten Komplexbildungsenergien sollten die aus den  $T_m$ -Wert-Messungen resultierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen bestätigt und erweitert werden. Ergänzend wurden schließlich einige Topoisomerase I-Hemmtests durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Combilexine eine Aktivitätsminderung dieses Enzyms bewirken können.



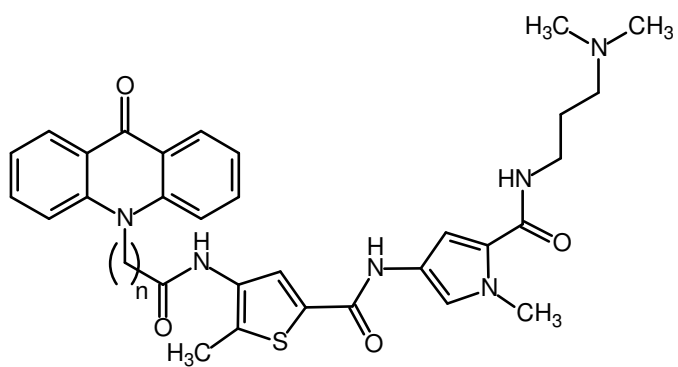
	n
<b>22</b>	1
<b>23</b>	2
<b>24</b>	3
<b>25</b>	4
<b>26</b>	5



**27**

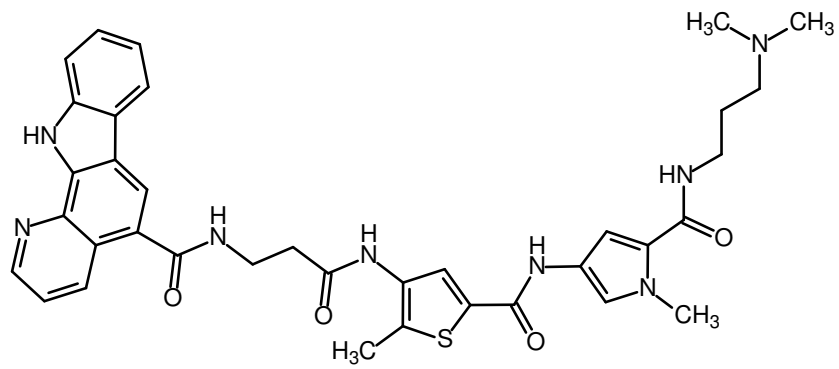


**28**

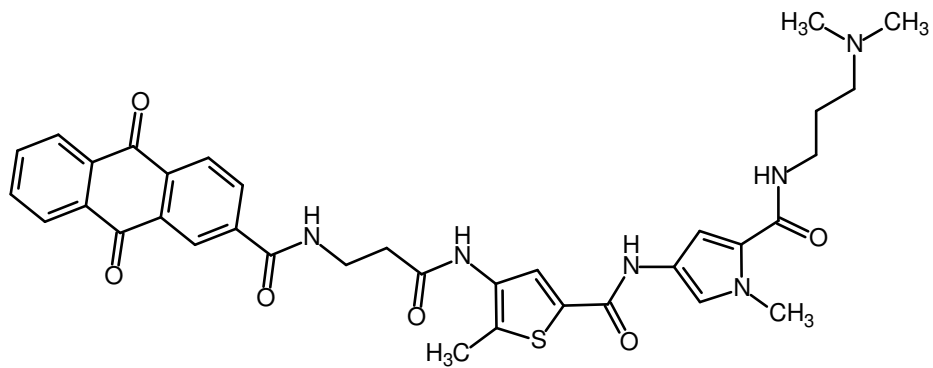


	n
<b>29</b>	2
<b>30</b>	3

**Abb. 6.36A:** Strukturformeln der Combilexine der Thiophen-pyrrol-Reihe

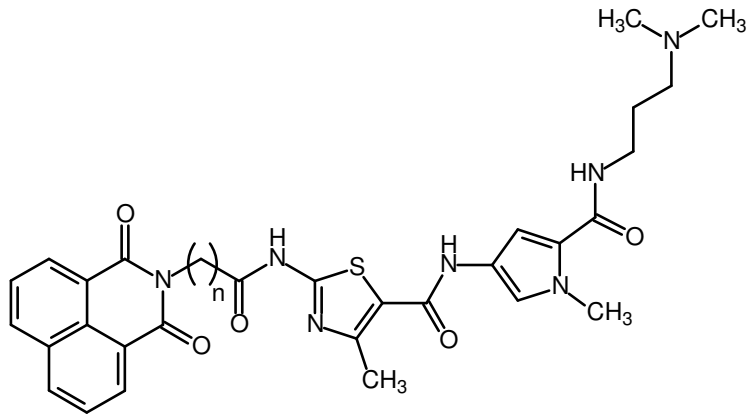


**31**

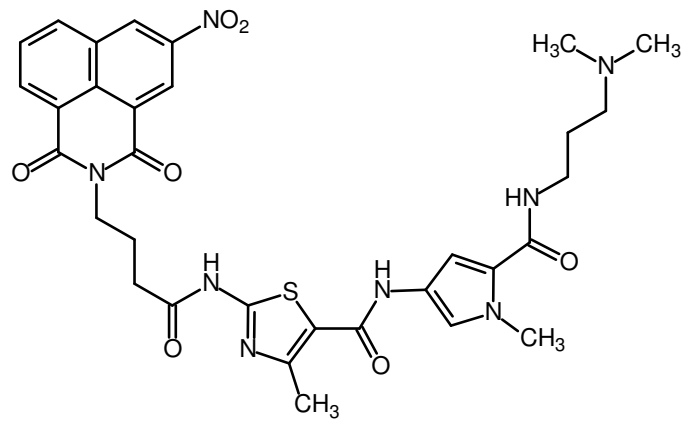


**32**

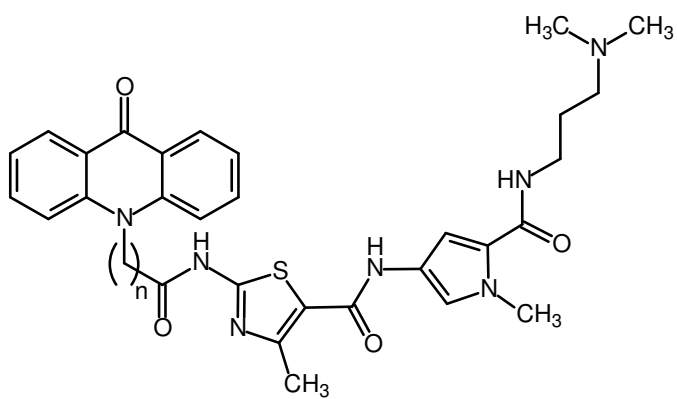
**Abb. 6.36B:** Strukturformeln der Combilexine der Thiophen-pyrrol-Reihe



	n
<b>33</b>	2
<b>34</b>	3



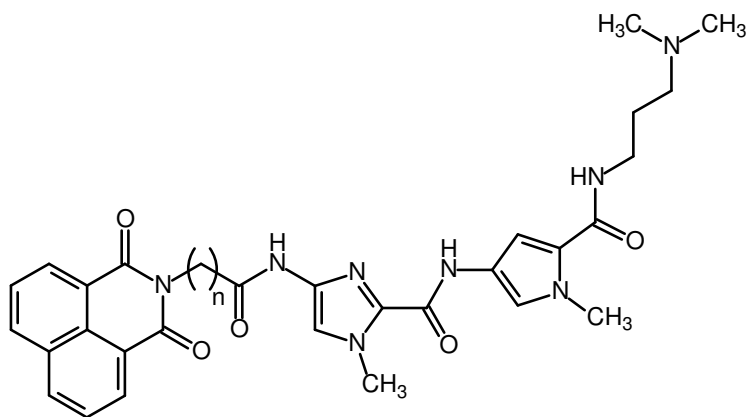
**35**



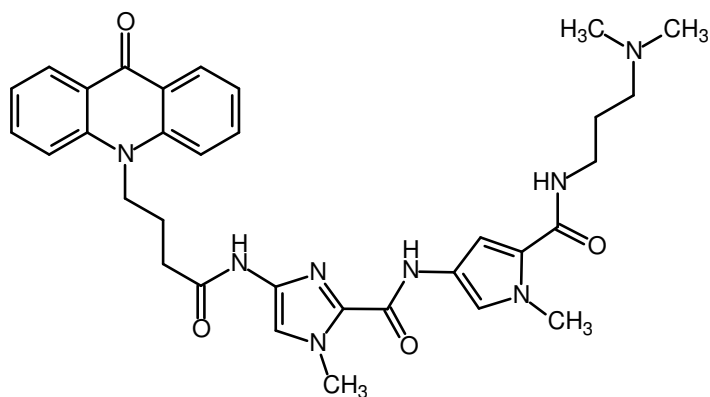
	n
<b>36</b>	2
<b>37</b>	3

**Abb. 6.37:** Strukturformeln der Combilexine der Thiazol-pyrrol-Reihe

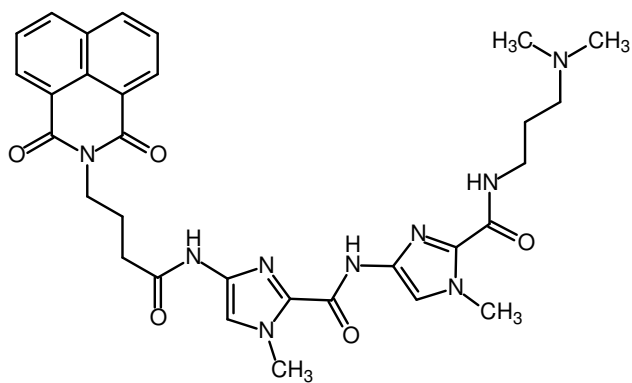




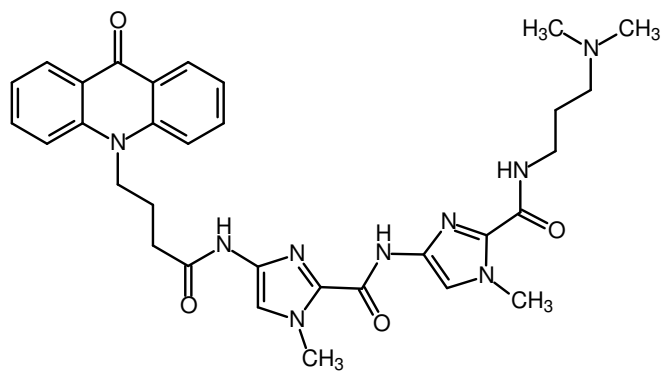
	n
<b>38</b>	2
<b>39</b>	3



**40**

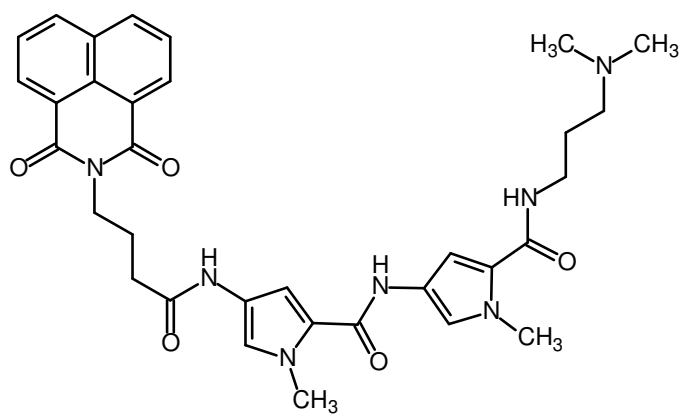


**41**

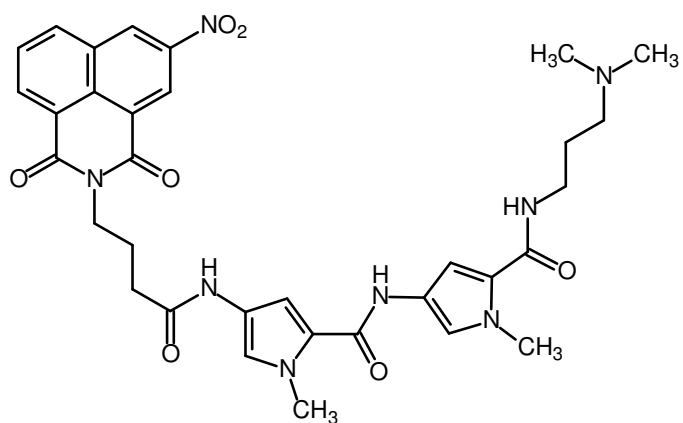


**42**

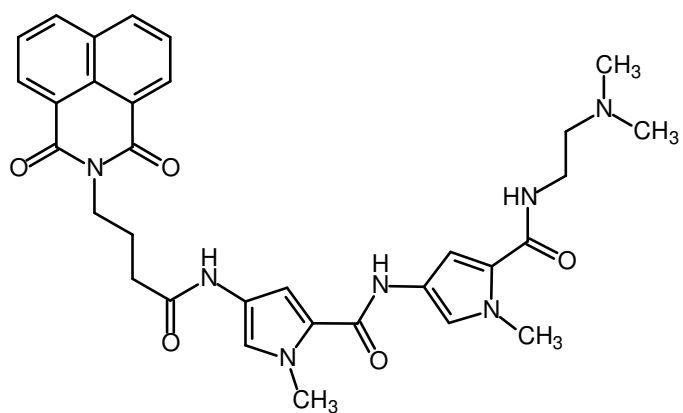
**Abb. 6.38:** Strukturformeln der Combilexine der Imidazol-pyrrol- und der Bisimidazol-Reihe



43



44



45

Abb. 6.39: Strukturformeln der Combilexine der Bispyrrol-Reihe

### 6.3.2 T<sub>m</sub>-Wert-Messungen

Die DNA-Affinitäten der Combilexin-Derivate (Abb. 6.36-6.39, Seiten 214-218) wurden unmittelbar nach ihrer Darstellung bestimmt, wobei für die zu diesem Zweck durchgeführten T<sub>m</sub>-Wert-Messungen poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA verwendet wurde (Kapitel 3.4.1, Seite 64 ff.). Die aus diesen Daten resultierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sollten direkt in das Design neuer Combilexin-Verbindungen mit potentiell höherer DNA-Aktivität mit einbezogen werden. Um neben der Stärke der DNA-Affinität auch die Sequenzselektivität der DNA-Bindung untersuchen zu können, wurden anschließend die ΔT<sub>m</sub>-Werte unter Einsatz von Thymus-DNA (~42% GC-Basen-Anteil <sup>[30,31]</sup>) ermittelt. Wie bereits bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.2, Seite 159 ff.) und den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.2, Seite 185 ff.) beschrieben, wurden die mit den beiden unterschiedlich aufgebauten DNA-Polymeren erhaltenen ΔT<sub>m</sub>-Werte in Bezug zueinander gesetzt (verwendete Rechenformel: {ΔT<sub>m</sub>(Thymus) / ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>]} × 100). Anhand dieser jeweils errechneten Relationen sollten, durch Vergleich mit dem für Netropsin ermittelten Verhältnis, Aussagen über die für die DNA-Bindung bevorzugte Basensequenz der Combilexine gemacht werden (Abb. 6.40, Seiten 221-222). Die mit poly(dAdT)<sub>2</sub>- und die mit Thymus-DNA ermittelten ΔT<sub>m</sub>-Werte sind in Tab. 6.16 (Seiten 219-220) aufgeführt.

	ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	ΔT <sub>m</sub> (Thymus-DNA) [°C]
<b>22</b>	21,2 ± 0,33	6,8 ± 1,46
<b>23</b>	22,6 ± 0,31	8,4 ± 0,40
<b>24</b>	17,4 ± 0,30	2,5 ± 0,34
<b>25</b>	15,1 ± 0,38	5,4 ± 0,51
<b>26</b>	9,9 ± 0,25	2,4 ± 0,28
<b>27</b>	12,6 ± 0,35	4,4 ± 0,39
<b>28</b>	12,2 ± 0,23	4,1 ± 1,06

**Tab. 6.16A:** ΔT<sub>m</sub>-Werte der untersuchten Combilexine  
(ΔT<sub>m</sub>-Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)

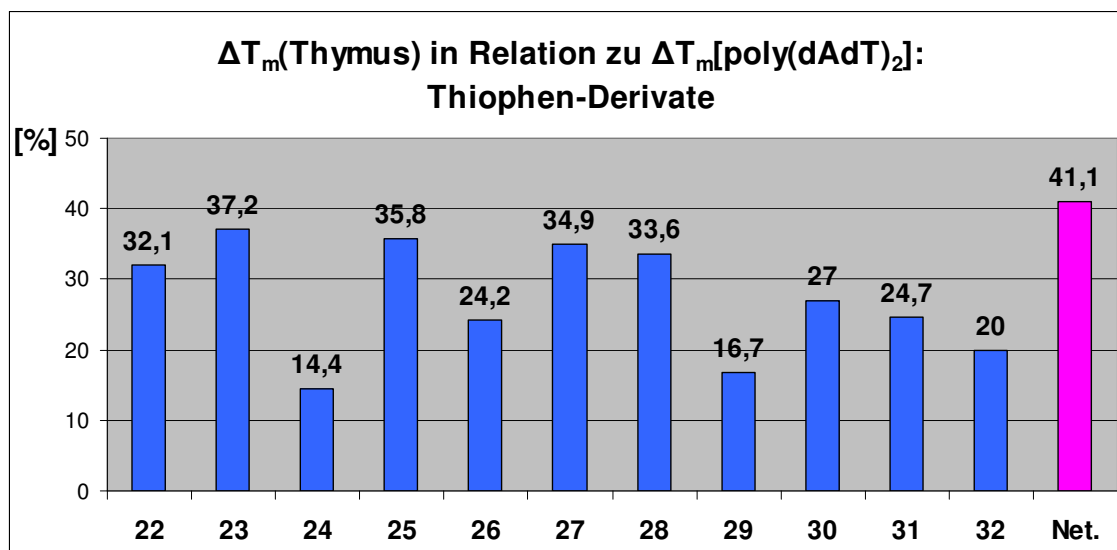
	$\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ [°C]	$\Delta T_m(\text{Thymus-DNA})$ [°C]
<b>29</b>	20,3 ± 0,41	3,4 ± 0,50
<b>30</b>	23,3 ± 0,38	6,3 ± 0,78
<b>31</b>	18,2 ± 0,71	4,5 ± 0,15
<b>32</b>	12,0 ± 0,18	2,4 ± 0,11
<b>33</b>	26,5 ± 0,22	9,1 ± 0,48
<b>34</b>	4,7 ± 0,18	1,1 ± 0,42
<b>35</b>	6,9 ± 0,27	2,7 ± 0,53
<b>36</b>	9,6 ± 0,26	1,8 ± 0,58
<b>37</b>	13,9 ± 0,20	5,7 ± 0,90
<b>38</b>	18,1 ± 0,17	12,1 ± 0,09
<b>39</b>	12,8 ± 0,57	4,5 ± 0,25
<b>40</b>	18,0 ± 0,62	6,0 ± 0,49
<b>41</b>	7,2 ± 0,21	1,1 ± 0,23
<b>42</b>	11,3 ± 0,66	6,3 ± 0,51
<b>43</b>	21,5 ± 0,05	6,2 ± 0,47
<b>44</b>	18,9 ± 0,16	5,5 ± 0,68
<b>45</b>	18,5 ± 0,58	8,2 ± 1,13

**Tab. 6.16B:**  $\Delta T_m$ -Werte der untersuchten Combilexine

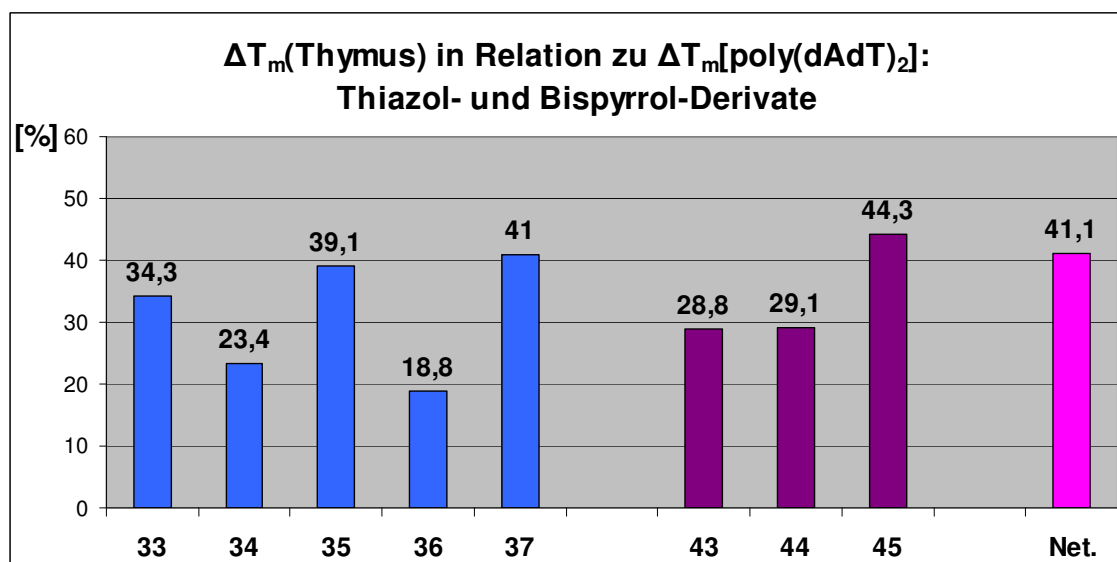
( $\Delta T_m$ -Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)

Abgesehen von den Verbindungen **26**, **34-36** und **41** (Abb. 6.36-6.38, Seiten 214-217) weisen die untersuchten Combilexine mit Bispyrrolcarboxamid-Struktur ebenso wie die bioisosteren Derivate der Thiophen-, der Thiazol-, der Imidazol- und der Bisimidazol-Reihe, gute ( $\Delta T_m$ -Werte >10°C) bzw. sehr gute ( $\Delta T_m$ -Werte >20°C) DNA-Affinitäten auf. Ein Vergleich der für diese Verbindungen ermittelten  $\Delta T_m$ -Werte mit den DNA-Bindungsstärken der bei der Combilexin-Synthese eingesetzten Interkalatorcarbonsäuren (Kapitel 6.1.1.2, Seite 149) und der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide (Kapitel 6.1.2.2, Seite 159 ff.) zeigt, dass der bei den Hybrid-Molekülen vorlie-

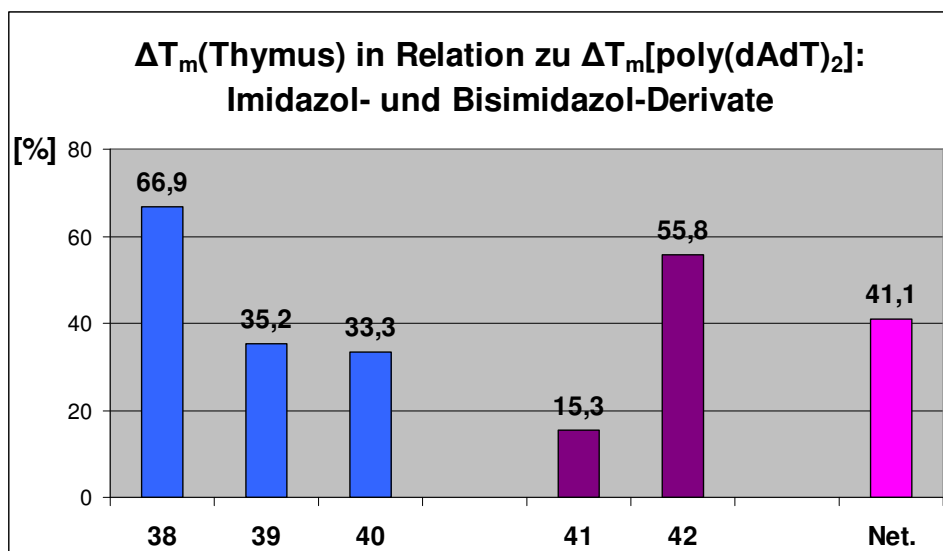
gende, duale Bindemodus wie erwartet zu einer deutlichen Steigerung der DNA-Aktivität führt (Kapitel 6.3.1, Seite 212 ff.).



**Abb. 6.40A:** Verhältnis der  $\Delta T_m(\text{Thymus})$ -Werte zu den  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werten der Combilexine der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Reihe; Angabe in %  
(verwendete Rechenformel:  $\{\Delta T_m(\text{Thymus}) / \Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]\} \times 100$ ; Net. = Netropsin)



**Abb. 6.40B:** Verhältnis der  $\Delta T_m(\text{Thymus})$ -Werte zu den  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werten der Combilexine der Thiazol-pyrrolcarboxamid-Reihe (blaue Balken) und der Bispyrrolcarboxamid-Reihe (lilafarbene Balken); Angabe in %  
(verwendete Rechenformel:  $\{\Delta T_m(\text{Thymus}) / \Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]\} \times 100$ ; Net. = Netropsin)

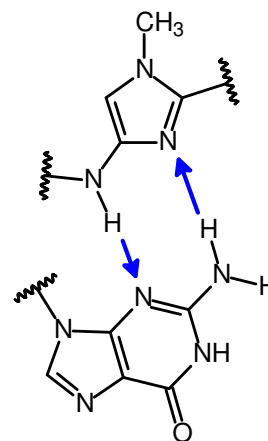
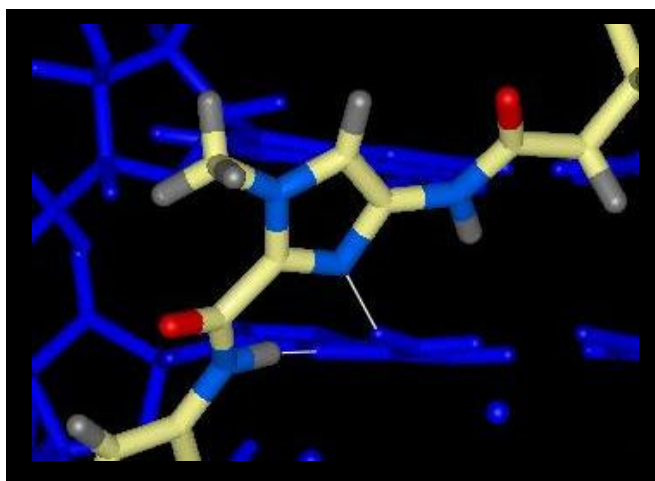


**Abb. 6.40C:** Verhältnis der  $\Delta T_m(\text{Thymus})$ -Werte zu den  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werten der Combilexine der Imidazol-Pyrrolcarboxamid-Reihe (blaue Balken) und der Bisimidazolcarboxamid-Reihe (lilafarbene Balken); Angabe in % (verwendete Rechenformel:  $\{\Delta T_m(\text{Thymus}) / \Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]\} \times 100$ ; Net. = Netropsin)

Die berechneten Verhältnisse der mit Thymus-DNA ermittelten  $\Delta T_m$ -Werte zu den Werten, die aus den Messungen mit  $\text{poly}(\text{dAdT})_2$ -DNA resultieren, zeigen, dass die Combilexine mit Thiophen-, mit Thiazol- und mit Bispyrrolcarboxamid-Struktur, in Analogie zu Netropsin, bevorzugt an AT-reiche Abschnitte der DNA binden (Abb. 6.36-6.37, Seiten 214-216; Abb. 6.39, Seite 218): Mit Ausnahme des Bispyrrol-Derivats **45** erreichen die Prozent-Werte der für die genannten Testverbindungen errechneten Relationen nicht das bei Netropsin vorliegende Verhältnis (Abb. 6.40A-6.40B, Seite 221). Im Gegensatz dazu weist jeweils ein Vertreter der Imidazol-pyrrol- und der Bisimidazol-Reihe – neben einer mit  $\text{poly}(\text{dAdT})_2$ -DNA detektierbaren DNA-Bindung – auch eine gewisse Affinität zu GC-Basen auf: Bei den Derivaten **38** und **42** (Abb. 6.38, Seite 217) ist die Relation von  $\Delta T_m(\text{Thymus})$  zu  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$  mit 66,9% bzw. 55,8% deutlich größer als bei der Bezugssubstanz Netropsin (Abb. 6.40C).

Zur weiterführenden Untersuchung der Sequenzselektivität der DNA-Bindung wurden die beiden Imidazol-pyrrolcarboxamide **38** und **39** (Abb. 6.38, Seite 217) an den sich an die Interkalationskavität anschließenden GC-Bereich des Rezeptors 1G3X<sup>[80]</sup> ( $\rightarrow$  PDB-Code<sup>[36]</sup>) gedockt. Die aus diesen *in silico*-Studien resultierenden Komplexe zeigen, dass, dem Synthesekonzept entsprechend<sup>[38,45,67,69,109-111]</sup>, eine

Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen der Amino-Gruppe eines Guanins und dem  $sp^2$ -hybridisierten Stickstoffatom des Imidazol-Rings des Liganden aufgebaut werden kann. Bei einer weiteren intermolekularen H-Brücke fungiert das N-terminale, amidische Stickstoffatom des Liganden als Donor, während das der kleinen Rinne zugewandte, zyklische N-Atom (N-3) der zuvor erwähnten Guanin-Base den zugehörigen Akzeptor darstellt (Abb. 6.41). Die beiden beschriebenen Bindungen, die zu einer GC-Toleranz Imidazol-haltiger *Minor Groove Binder* führen sollen <sup>[45,67,69,109-111,263]</sup>, treten jedoch nicht nur in dem mit der Derivat **38**, sondern auch in dem mit der homologen Verbindung **39** simulierten Komplex auf. Auf der Basis der durchgeführten Molecular Modelling-Studien kann somit nicht erklärt werden, warum das Naphthalimidpropion-säure-Derivat **38** eine wesentlich größere Affinität für GC-reiche Abschnitte der DNA besitzt als die Verbindung **39** (Abb. 6.40C, Seite 222). Außer dem  $sp^2$ -hybridisierten N-Atom und der damit verbundenen Wasserstoff-Brücken-Akzeptor-Funktion sind folglich noch andere Moleküleigenschaften und Strukturelemente für die angestrebte Toleranz der Testsubstanzen gegenüber GC-Basen erforderlich. Kristallisationsexperimente mit Combilexinen der Imidazol-pyrrol- oder der Bisimidazol-Reihe und poly(dGdC)<sub>2</sub>-DNA könnten möglicherweise neue Hinweise auf die die Sequenzselektivität bestimmenden Faktoren liefern.



**Abb. 6.41:** Darstellung der zwischen dem Imidazol-Ring des Liganden und der Guanin-Base des Rezeptors beobachteten Interaktionen

Links: Ausschnitt aus dem mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-Ligand-Komplex der Verbindung **39** (Rezeptor: 1G3X <sup>[36,80]</sup>)

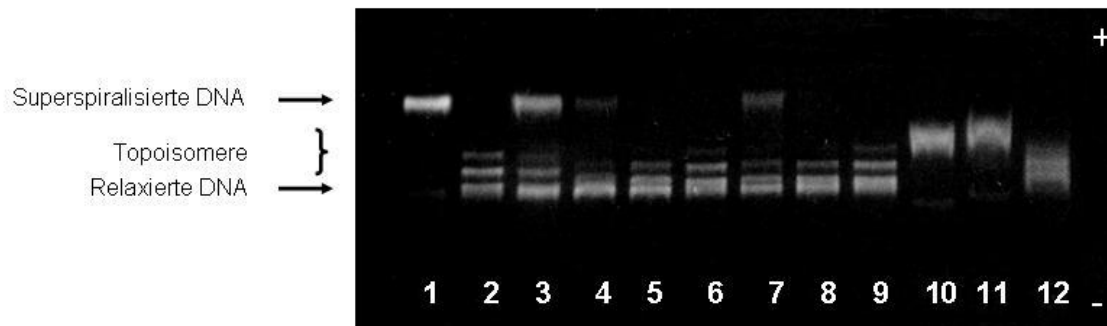
(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blickrichtung senkrecht zur Helix-Achse)

Rechts: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(Blaue Pfeile geben intermolekulare H-Brücken wieder; nach *Goodsell* <sup>[67]</sup>)

### 6.3.3 Topoisomerase I-Hemmtests

Die potentiell vorhandenen Topoisomerase I-hemmenden Fähigkeiten der Combi-lexine sollten am Beispiel jeweils eines Vertreters der Thiophen-, der Thiazol- und der Imidazol-pyrrol-Reihe untersucht werden (Kapitel 3.4.2, Seite 70 ff.). Da die zu testenden Verbindungen eine gute DNA-Affinität besitzen und – abgesehen von dem N-terminalen Fünfring-Heterozyklus – den gleichen strukturellen Aufbau aufweisen sollten, wurden die Naphthalimidpropionsäure-Derivate **23** (Thiophen-pyrrolcarboxamid), **33** (Thiazol-pyrrolcarboxamid) und **38** (Imidazol-pyrrolcarboxamid) (Abb. 6.36-6.38, Seiten 214-217; Tab. 6.16, Seiten 219-220) als Testsubstanzen für die geplanten Topoisomerase I-Hemmassays ausgewählt.



**Abb. 6.42:** Gelelektropherogramm des mit den Verbindungen **23**, **33** und **38** durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests

(Spur 1: Plasmid-DNA pUC 19; Spur 2: Plasmid-DNA+Topoisomerase I → vollständige Relaxierung des Plasmids; Spur 3: Camptothecin 20  $\mu\text{M}$  → konzentrationsabhängige Hemmung der TOPO I; Spur 4: **23** 50  $\mu\text{M}$  → Positiv !; Spur 5: **23** 20  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung, da vollständige Relaxierung des Plasmids; Spur 6: **23** 5  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung; Spur 7: **33** 50  $\mu\text{M}$  → Positiv !; Spur 8: **33** 20  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung; Spur 9: **33** 5  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung; Spur 10: **38** 50  $\mu\text{M}$  → keine Aussage mgl.; Spur 11: **38** 20  $\mu\text{M}$  → keine Aussage mgl.; Spur 12: **38** 5  $\mu\text{M}$  → keine Aussage mgl.)

Aus den durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests geht hervor, dass das Thiophen-Derivat **23** und das Thiazol-Analogon **33** ab einer Substanzkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine Reduktion der Enzymaktivität bewirken können (Abb. 6.42): In Analogie zu dem potenten Topoisomerase I-Gift Camptothecin (Spur 3) ist im Gelelektropherogramm sowohl bei der Verbindung **23** (Spur 4), als auch bei dem Derivat **33** (Spur 7) die Bande für superspiralisierte DNA erkennbar, deren Auftreten das Vorhandensein von enzymhemmenden Fähigkeiten einer Testverbindung anzeigt<sup>[47]</sup> (Kapitel 3.4.2.1, Seite 70 ff.). Während der Inkubationszeit wurde die Topoisomerase I von



den beiden genannten Combilexin-Derivaten (ebenso wie von der Referenzsubstanz Camptothecin) in ihrer Aktivität folglich soweit eingeschränkt, dass das Enzym die eingesetzte Plasmid-DNA nicht mehr vollständig mittels Einzelstrangbruch relaxieren konnte (zum Vergleich: Negativkontrolle, Spur 2). Die Thiazol-Verbindung **33** besitzt dabei stärker ausgeprägte Topoisomerase I-hemmende Eigenschaften als das Thiophen-Derivat **23**, da die Bande für superspiralisierte DNA in Spur 7 (Verbindung **33**; 50 µM) eine wesentlich größere Intensität aufweist als in Spur 4 (Verbindung **23**; 50 µM): Die Inkubation mit der Substanz **23** führt folglich nur zu einer geringgradigen Aktivitätsabnahme des Enzyms. Dennoch ist die beschriebene Topoisomerase I-Hemmung der Thiophen-Verbindung reproduzierbar, da sie bei jedem der drei durchgeführten Tests auftrat. Eine Beurteilung der enzymhemmenden Fähigkeiten des Imidazol-Derivats **38** ist nicht möglich, da die Verbindung das Laufverhalten der DNA im Agarose-Gel soweit verändert, dass die Banden für relaxierte und für superspiralisierte DNA nicht mehr unterscheidbar sind (Spur 10 - 12).

Die im Gelelektropherogramm sichtbaren, als Topoisomere bezeichneten Banden (Spur 2 - 9) werden von DNA-Plasmiden gebildet, die partiell relaxiert sind und sich in der Anzahl der jeweils noch im Molekül verbliebenen, superhelikalen Windungen unterscheiden <sup>[56]</sup>.

Mit Hilfe des hier durchgeführten Hemmassays kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei den Testsubstanzen **23** und **33** um Topoisomerase I-Gifte oder um Suppressoren handelt <sup>[47,56]</sup>. Während ein Topoisomerase I-Gift wie Camptothecin, durch Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus DNA und Enzym (*Cleavable Complex*) und der damit verbundenen Störung der DNA-Replikation, letztlich zu einer Apoptose der Zelle führt, setzen Enzymsuppressoren die Aktivität der Topoisomerase I herab, ohne sich auf den Zellzyklus auszuwirken <sup>[47,50-56]</sup> (Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.). Um den bei der Thiophen-Verbindung **23** und bei dem Thiazol-Analogen **33** vorliegenden Mechanismus der Enzymhemmung genauer untersuchen zu können, wurden am I.N.S.E.R.M. in Lille, Frankreich, weiterführende Tests durchgeführt. Bei dem dort etablierten Topoisomerase I-Hemmassay wird, im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Testsystem, ein 1%-iges Agarose-Gel verwendet, das Ethidiumbromid (0,5-1µg/ml) enthält <sup>[56,59,155]</sup>. Bedingt durch eine Veränderung des Laufverhaltens der relaxierten und der superhelikalen DNA erlaubt der Interkalator die Separierung von sog. *nicked*-DNA (→ DNA mit Einzelstrangbruch) <sup>[47,56,61]</sup>, die nur dann in einer höheren Konzentration im Inkubationsansatz vorliegt,

wenn es sich bei den getesteten Verbindungen um Topoisomerase I-Gifte handelt [47,56] (Kapitel 3.4.2.1, Seite 74 ff.). Da die beiden Combilexin-Derivate **23** und **33** in den in Frankreich durchgeführten Assays keinen Anstieg der *nicked*-DNA-Konzentration bewirken konnten [38], ist folglich zu vermuten, dass es sich bei der Thiophen-Verbindung **23** und dem Thiazol-Analogon **33** nicht um Topoisomerase I-Gifte sondern um Suppressoren handelt.

### 6.3.4 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Zur Verifizierung der aus den  $T_m$ -Wert-Messungen resultierenden Aussagen über die DNA-Aktivitäten der Combilexine sollten die Bindekonstanten einiger ausgewählter Derivate mit Hilfe des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays ermittelt werden (Kapitel 3.4.3, Seite 80 ff.). Da die zu testenden Verbindungen eine sehr gute DNA-Affinität ( $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2] > 20^\circ\text{C}$ ) aufweisen sollten, wurden die geplanten Bindestudien mit den beiden Naphthalimidpropionsäure-Derivaten der Thiophen-pyrrol- bzw. der Thiazol-pyrrol-Reihe (Verbindung **23** bzw. **33**), sowie mit dem Thiophen-pyrrolcarboxamid mit N-terminal gekoppelter Acridonbuttersäure **30** durchgeführt (Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.37, Seite 217; Tab. 6.16, Seiten 219-220). Die ausgewählten Combilexine wurden dabei in Form ihrer Hydrochloride in den Ethidiumbromid-Verdrängungsassays eingesetzt, um eine ausreichende Löslichkeit der Verbindungen in dem für die Messungen verwendeten, wässrigen Puffermedium (pH-Wert: 7,4) sicherstellen zu können.

Zur Bestimmung der Bindekonstanten  $K_{\text{app}}$  (*Apparent Binding Constants* [164]) wurde zunächst für jedes der drei Derivate **23**, **30** und **33** die Reduktion der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz jeweils vorliegenden Substanzkonzentration ermittelt (Abb. 6.43, Seite 227). Anhand der aus diesen Kurven resultierenden  $C_{50}$ -Werte ( $\rightarrow$  Konzentrationen der Testverbindungen, die eine 50%-ige Abnahme der messbaren Fluoreszenz bewirken) wurden dann mit Hilfe der sog. *Wellman'schen* Gleichung [47,164] (Seite 227) die in Tab. 6.17 (Seite 227) aufgeführten Bindekonstanten berechnet.

Wellman'sche Gleichung <sup>[47,164]</sup>:

$$K_{\text{EtdBr}}[\text{EtdBr}] = K_{\text{app}}[\text{Ligand}]$$

- Mit:  $K_{\text{EtdBr}}$ : Bindekonstante von Ethidiumbromid <sup>[164]</sup> ( $\rightarrow 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )  
 $[\text{EtdBr}]$ : im Assay eingesetzte Ethidiumbromid-Konzentration <sup>[47,165]</sup>  
 ( $\rightarrow 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ )  
 $K_{\text{app}}$ : DNA-Bindekonstante der getesteten Verbindung (in  $\text{M}^{-1}$ )  
 $[\text{Ligand}]$ : Konzentration des Liganden, die zu einer 50%-igen Fluoreszenzabnahme führt ( $C_{50}$ ; in M)

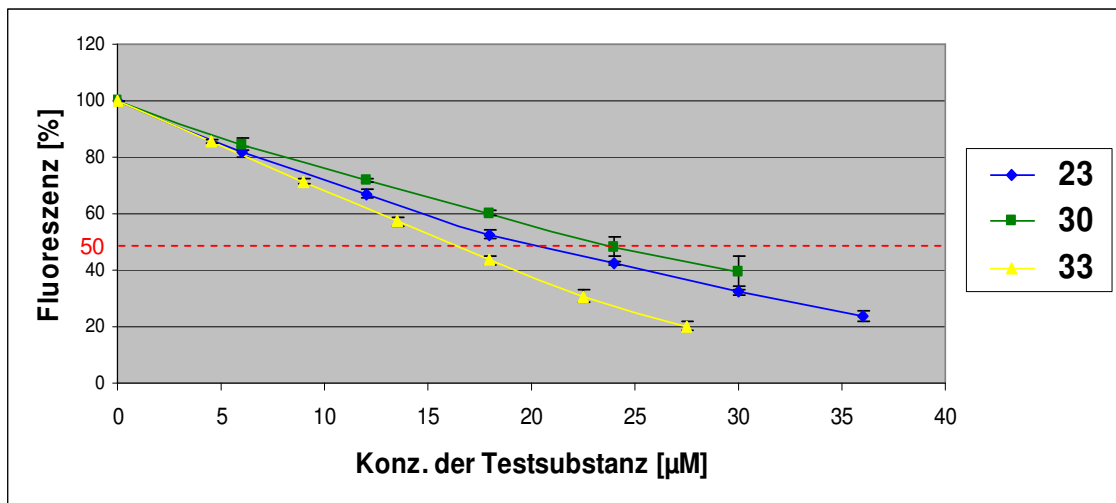


Abb. 6.43: Darstellung der bei der Testung der Combilexine **23**, **30** und **33** jeweils gemessenen, konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme

	Hoechst 33258	23	30	33
$C_{50}$ [µM]	6,8 <sup>1</sup>	18,7	23,5	16,3
Bindekonstante $K_{\text{app}}$ <sup>2</sup> [M <sup>-1</sup> ]	$1,8 \times 10^6$	$6,7 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$

Tab. 6.17:  $C_{50}$ -Werte und Bindekonstanten der Combilexine **23**, **30** und **33** sowie der Referenzsubstanz Hoechst 33258

<sup>1</sup>: Kurve der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme: Kapitel 3.4.3.2 (Seite 84)

<sup>2</sup>:  $K_{\text{app}}$  berechnet mit der Wellman'schen Gleichung <sup>[164]</sup>

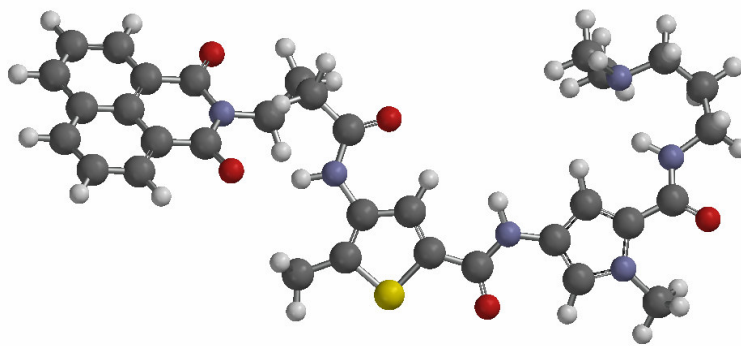
Ein Vergleich der Bindekonstante der Combilexine **23**, **30** und **33** mit den zuvor bestimmten  $\Delta T_m$ -Werten zeigt, dass die Ergebnisse der Ethidiumbromid-Verdrängungsassays und die der  $T_m$ -Wert-Messungen miteinander korrelieren: Die guten DNA-Affinitäten der Testverbindungen gehen sowohl aus den berechneten Bindekonstanten ( $K_{app}$ :  $5-8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; Tab. 6.17, Seite 227), als auch aus den ermittelten  $\Delta T_m$ -Werten ( $\Delta T_m[\text{poly(dAdT)}_2] > 20^\circ\text{C}$ ; Tab. 6.16, Seiten 219-220) hervor. Dieses Resultat verdeutlicht den Wert der  $T_m$ -Wert-Messung als effiziente Methode zur Untersuchung der Bindestärke DNA-aktiver Verbindungen: Durch Einsatz dieses schnellen, zuverlässigen und kostengünstigen Testsystems kann der Syntheseprozess von DNA-Liganden begleitet und das Design neuer, potentiell aktiverer Derivate beeinflusst werden. Des Weiteren zeigt der mit der Referenzsubstanz Hoechst 33258 (Kapitel 8.1.1, Seite 311) durchgeführte Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, dass es sich bei den Combilexinen um eine Erfolg versprechende Substanzklasse auf der Suche nach neuen, antitumoraktiven Verbindungen handelt: Die Bindekonstante von Hoechst 33258 – ein Rinnenbinder mit hoher DNA-Affinität – ist nur etwa 2x so groß wie die der getesteten Combilexin-Derivate **23**, **30** und **33** (Tab. 6.17, Seite 227).

### 6.3.5 Molecular Modelling-Studien

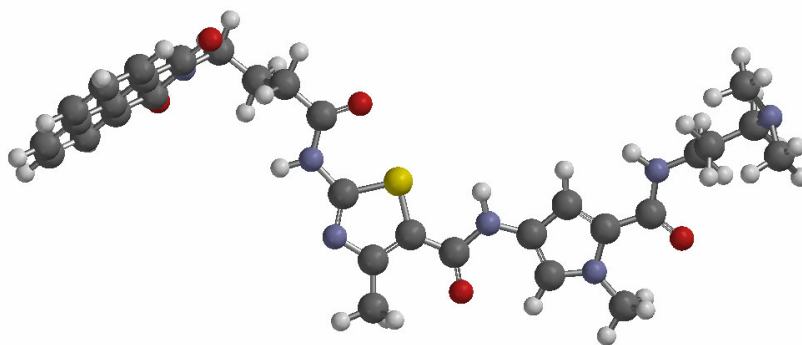
Da keine Kristallstrukturen der Combilexine existieren, wurden – in Analogie zu den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seite 188 ff.) – dreidimensionale Computermodelle der zu untersuchenden Hybrid-Moleküle simuliert, mit denen die geplanten Molecular Modelling-Studien durchgeführt werden sollten. Auf der Basis der Kristallstrukturen der bei der Combilexin-Synthese eingesetzten Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide **4** <sup>[258]</sup>, **5** <sup>[259]</sup> und **8** <sup>[260]</sup> (Abb. 6.5, Seite 158), wurden die Verbindungen mit Bispyrrol-Struktur, ebenso wie die bioisosteren Analoga der Thiophen-pyrrol- und der Imidazol-pyrrol-Reihe, zunächst mit Hilfe des in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> enthaltenen Baukastensystems <sup>[197]</sup> konstruiert (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.). Der Aufbau der Thiazol-haltigen Derivate erfolgte dagegen *de novo*, da von der rinnenbindenden Thiazol-Pyrrolcarboxamid-Struktur keine verwendbare Kristallstruktur zur Verfügung stand (Kapitel 6.1.2.1, Seite 157). Die auf diese Weise erzeugten, dreidimensionalen Modelle der Testverbindungen wurden anschließend unter Verwendung der in SPARTAN <sup>[35]</sup> implementierten

Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 f.) energieminiert. Nach den ebenfalls in SPARTAN <sup>[35]</sup> ausgeführten Berechnungen einiger potentiell die DNA-Affinität der Testverbindungen beeinflussenden Moleküleigenschaften [u. a. Grenzorbitalenergien, molekulares elektrostatisches Potential (Kapitel 4.1.2, Seite 96); Kapitel 5.2.2, Seite 127), wurden die Minimumskonformere der Combilexin-Derivate in den geplanten Docking-Studien als Liganden eingesetzt.

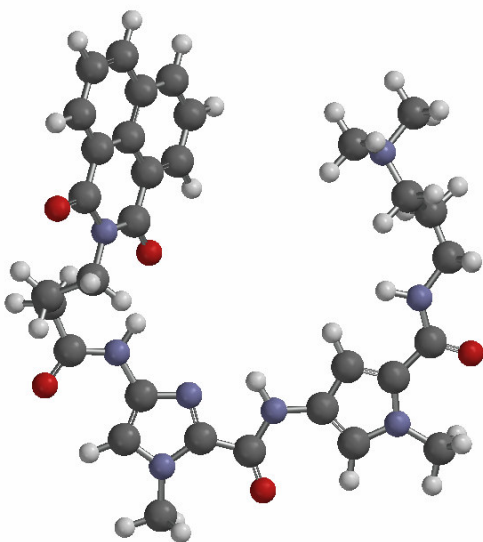
Aus den zur Ermittlung der lokalen Energieminima durchgeführten Konformeranalysen geht hervor, dass die von Netropsin abgeleiteten, bioisosteren Hybrid-Moleküle der Thiophen-pyrrol- und der Thiazol-pyrrol-Reihe eine von der Bezugssubstanz abweichende Stellung der N-terminalen Amidbindung aufweisen: Die Carbonyl-Gruppe dieser Peptid-Bindung ist bei den Thiophen- bzw. Thiazol-haltigen Verbindungen – im Gegensatz zu Netropsin und zu den Combilexinen mit Bispyrrol- und mit Imidazol-pyrrol-Struktur – der konkaven, die NH-Gruppe dagegen der konvexen Molekülseite zugewandt (Abb. 6.44, Seite 230). Diese Molekülkonformation ist bei den Interkalator-gekoppelten Thiophen-pyrrolcarboxamiden durch eine van der Waals-Abstoßung zwischen der Carbonyl-Gruppe der Amidbindung und der sich an Position 5 des Thiophen-Rings befindenden Methyl-Gruppe bedingt. Bei den Derivaten der Thiazol-Reihe führt dagegen die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Sauerstoffatom der Peptid-Bindung und dem, ebenfalls eine negative Partialladung tragenden,  $sp^2$ -hybridisierten Stickstoffatom des Thiazol-Rings dazu, dass sich die Carbonyl-Gruppe der konkaven Molekülseite zuwendet (Abb. 6.45, Seite 231). Die beschriebenen Besonderheiten der bei den Combilexinen mit Thiophen- und mit Thiazol-Struktur vorliegenden Molekülkonformationen wirken sich möglicherweise auf die DNA-Affinitäten dieser Derivate aus (Kapitel 6.3.7, Seite 256 ff.).



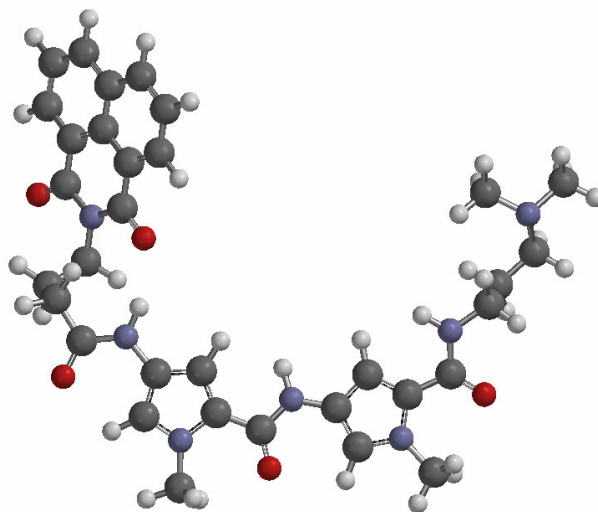
24



34



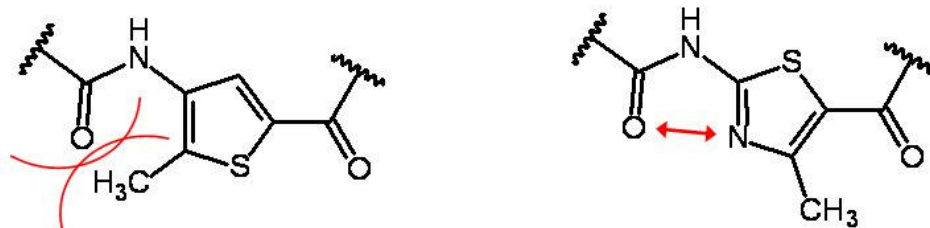
39



43

**Abb. 6.44:** Darstellung der lokalen Minimumkonformere der Naphthalimidbutter-säure-gekoppelten Combilexine mit jeweils verschiedenen Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Strukturen

(Simulation der Minimumkonformere unter Verwendung der in SPARTAN <sup>[35]</sup> enthaltenen Konformeranalyse; Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.)



**Abb.: 6.45** Schematische Darstellung der bei den Combilexinen der Thiophenpyrrol-Reihe auftretenden van der Waals-Abstoßung (links) bzw. der bei den Derivaten der Thiazol-pyrrol-Reihe auftretenden elektrostatischen Abstoßung (rechts)

Um den DNA-Bindemodus der Hybrid-Moleküle genauer untersuchen zu können, sollten Docking-Studien mit einigen ausgewählten Combilexin-Derivaten der Bispyrrol-Reihe, sowie mit bioisosteren Analoga mit Thiophen-, Thiazol- und Imidazolpyrrol-Struktur durchgeführt werden (Verbindungen **22-30**; Abb. 6.36, Seite 214; Verbindungen **33, 34**; Abb. 6.37, Seite 216; Verbindungen **38, 39**; Abb. 6.38, Seite 217; Verbindungen **43, 44**; Abb. 6.39, Seite 218). Wie schon bei den Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 162 ff.) und den Nukleobasengekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seite 189 ff.) beschrieben, wurden auch die Combilexin-Verbindungen in den Simulationen in monokationischer Form eingesetzt, da das tertiäre Stickstoffatom der C-terminalen Seitenkette bei physiologischem pH-Wert ( $\rightarrow$  pH-Wert der bei den biochemischen und biophysikalischen Experimenten eingesetzten Pufferlösungen) protoniert vorliegt (Abb. 6.60, Seite 253). Das schon für das Docken der Interkalatorcarbonsäuren (Kapitel 6.1.1.3, Seite 152 ff.) verwendete Oligonukleotid 1G3X<sup>[80]</sup> [ $\rightarrow$  PDB-Code<sup>[36]</sup>; Sequenz: 5'-D(\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'], diente als Rezeptor (Kapitel 5.3.1, Seite 128). Zur DNA-Bindung der trizyklischen Chromophore der Combilexine weist dieses DNA-Molekül eine zwischen zwei AT-Basenpaaren lokalisierte Interkalationskavität auf: Da die DNA-Matrizen während der in dem Programm ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> ablaufenden Docking-Simulationen unbeweglich sind<sup>[241]</sup> (*Rigid Receptor Docking*), muss die für die Interkalation eines Liganden erforderliche Aufweitung der DNA-Basen bei den für Interkalationsstudien einsetzbaren Oligomeren bereits vor dem Docking-Prozess erfolgt sein (Kapitel 4.2.3, Seite 111 ff.; Kapitel 5.4.1, Seite 124 ff.).

Die nach dem DNA-Ligand-Docking (mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>) vorliegenden Komplexe, wurden in HYPERCHEM<sup>[34]</sup> mittels Moleküldynamik-Rechnungen<sup>[193]</sup> ( $\rightarrow$  *Re-*

*finement*; Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) optimiert. Die direkt im Anschluss an die Docking-Simulationen mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> errechneten Komplexbildungsenergien sind zusammen mit den Energiewerten, die in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> (Rechenmethode: AMBER <sup>[179,180]</sup>) nach dem *Refinement* ermittelt wurden, in Tab 6.18 (Seite 233) aufgeführt. Einige ausgewählte DNA-Ligand-Komplexe sind in den Abb. 6.46-6.57 (Seiten 234-245) graphisch und schematisch dargestellt (Atombezeichnung der Nucleotide: Abb. 2.1, Seite 17).

Die Betrachtung der DNA-gebundenen Konformere der Combilexine zeigt, dass die Derivate der Imidazol-pyrrol- und die der Bispyrrol-Reihe bezüglich der Amidbindungen und der Fünfring-Heterozyklen die gleiche Konformation aufweisen wie die Bezugssubstanz Netropsin (Abb. 6.56-6.57, Seiten 244-245). Dies trifft auch auf die Verbindungen mit Thiazol-pyrrol-Struktur zu (Abb. 6.55, Seite 243): Im Gegensatz zu den in SPARTAN <sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformeren, ist die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Sauerstoffatom der N-terminalen Amidbindung und dem Stickstoffatom des Thiazol-Rings bei den DNA-gebundenen Konformeren nicht stark genug, um eine Orientierung der Carbonyl-Gruppe zur konkaven Molekülseite zu bewirken. Bei den mit DNA komplexierten Konformeren der Thiophen-Reihe tritt dagegen – wie zuvor schon bei den Minimumskonformeren zu beobachten – eine van der Waals-Abstoßung zwischen der Carbonyl-Gruppe der Amidbindung und der Methyl-Gruppe des Thiophen-Rings auf, die eine von Netropsin abweichende Stellung der N-terminalen Peptidbindung zur Folge hat: Die Carbonyl-Gruppe ist bei den DNA-gebundenen Konformeren der konkaven, die NH-Gruppe der konvexen Molekülseite zugewandt (Abb. 6.46-6.54, Seiten 234-242). Die Thiophen-haltigen Hybrid-Moleküle nehmen somit innerhalb der im Arbeitskreis *Pindur* synthetisierten Combilexine eine strukturelle Sonderstellung ein, was sich auf die DNA-Affinität dieser Derivate auswirkt (Kapitel 6.3.7, Seite 256 ff.).

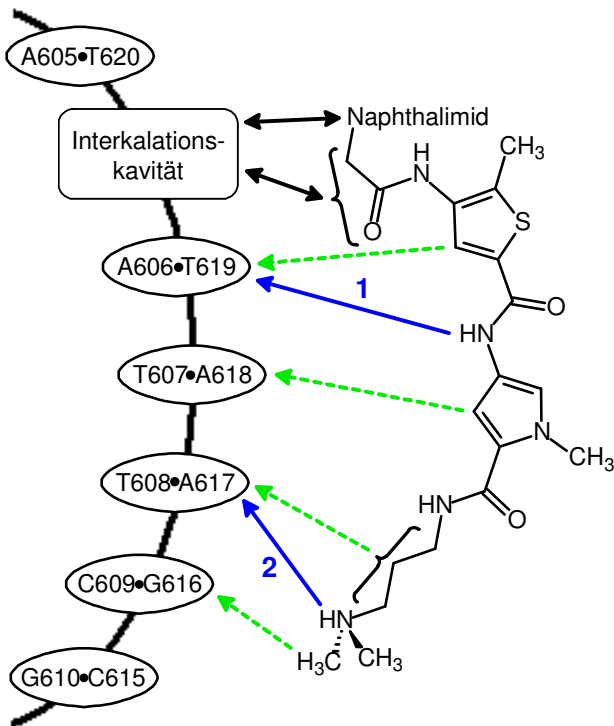
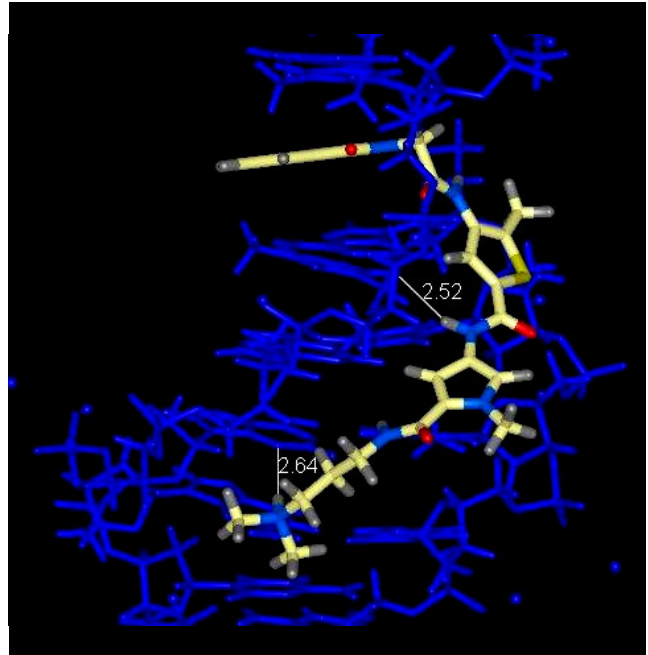
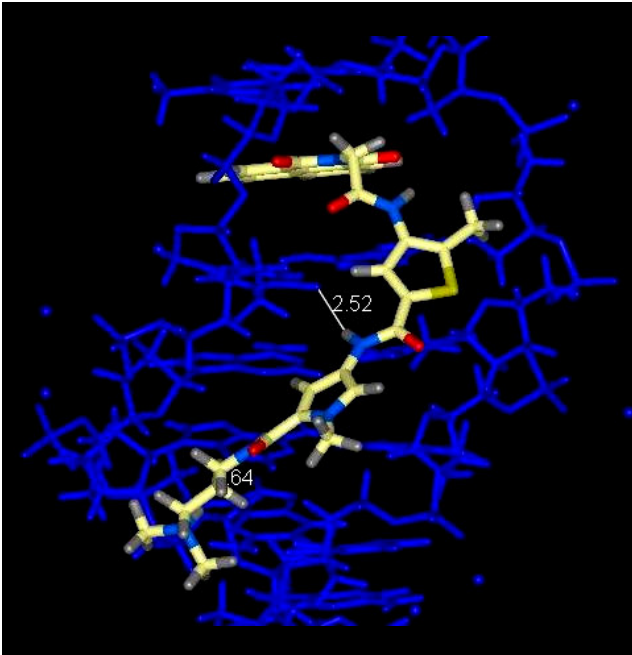


	Komplexbildungsenergie ICM-PRO <sup>1</sup> [kcal/mol]	Komplexbildungsenergie HYPERCHEM <sup>2</sup> [kcal/mol]
22	-103,2	-81,0
23	-110,7	-83,6
24	-109,1	-82,8
25	-113,5	-82,0
26	-112,5	-85,6
27	-113,2	-87,8
28	-100,1	-80,2
29	-106,4	-85,1
30	-103,7	-79,4
33	-119,5	-85,4
34	-118,5	-86,2
38	-116,4	-77,0
39	-117,4	-83,7
43	-119,2	-89,3
44	-122,9	-90,9

**Tab. 6.18:** Komplexbildungsenergien der mit ausgewählten Combilexinen simulierten DNA-Ligand-Komplexe

<sup>1</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> nach dem DNA-Ligand-Docking

<sup>2</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup> nach dem *Refinement* (→ Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup>, durchgeführt mit der Kraftfeld-Methode AMBER <sup>[179,180]</sup>)



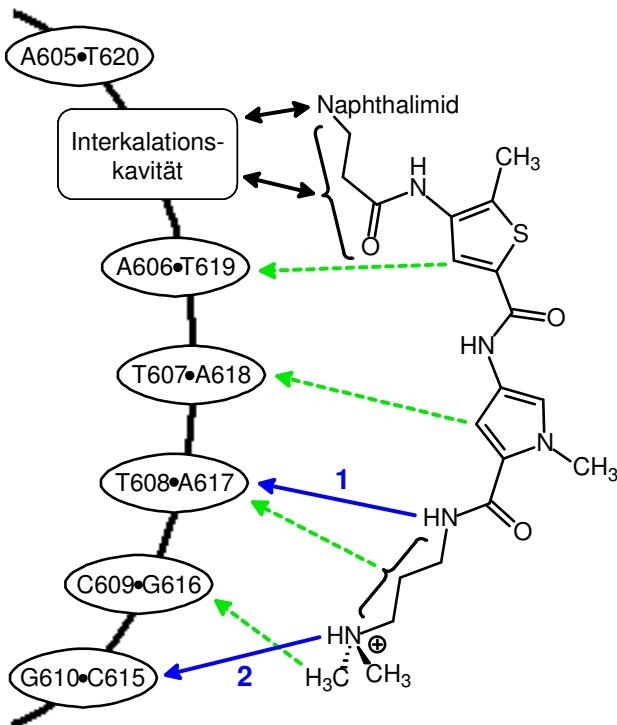
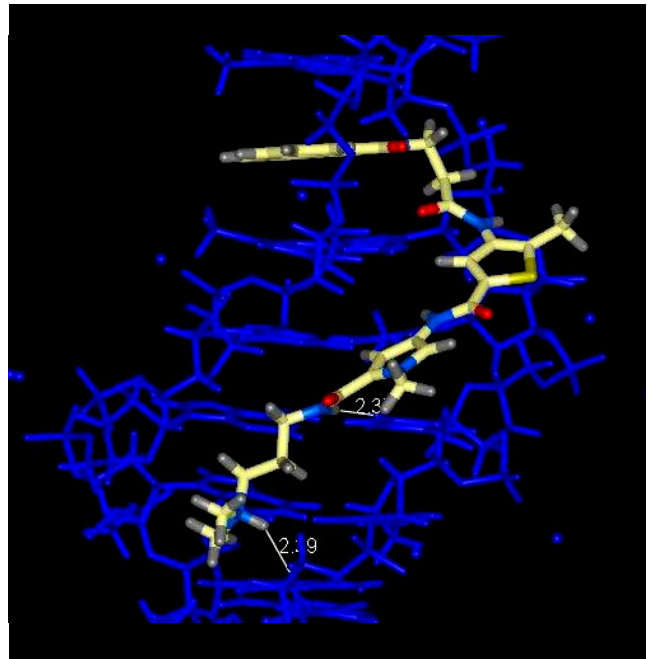
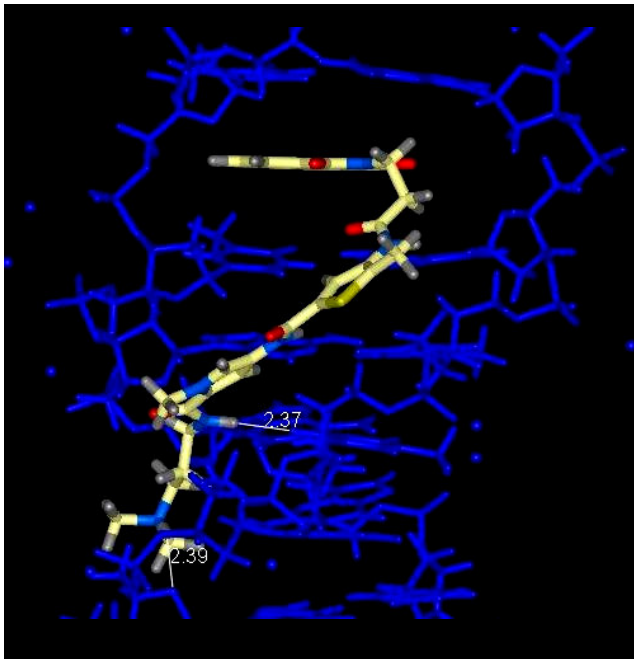
**Abb. 6.46:** Verbindung **22**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“

Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 619 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 617 N-3 als Akzeptor)

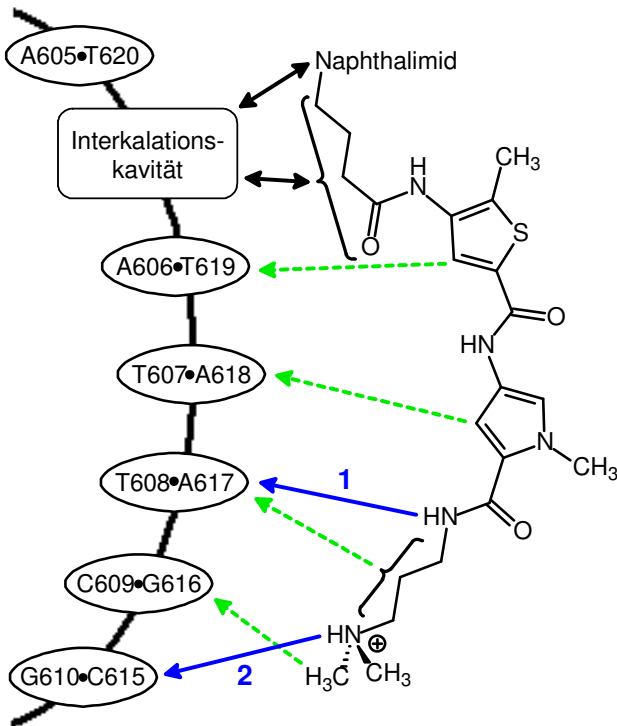
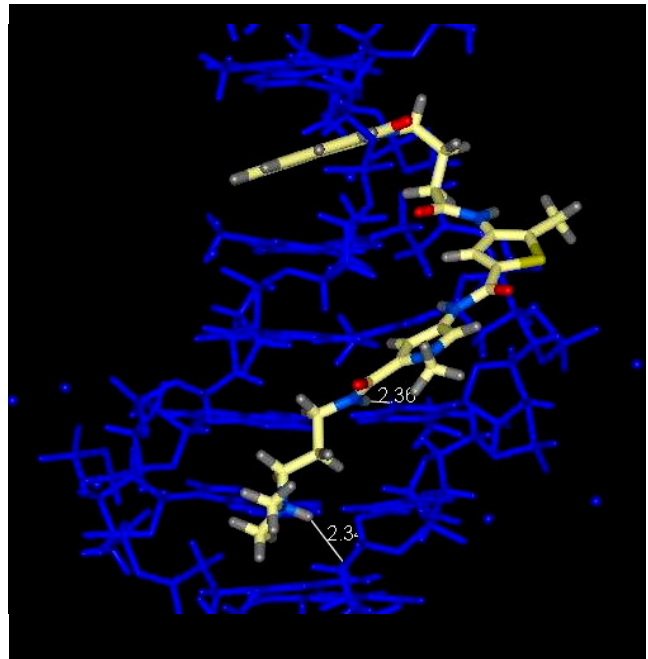
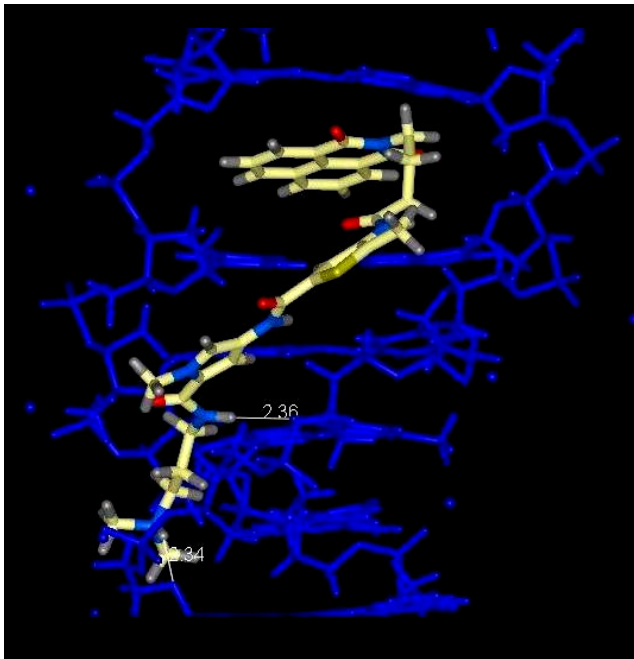


**Abb. 6.47:** Verbindung **23**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
**Oben:** Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

**Links:** Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Guanin 610 O-4\* als Akzeptor)

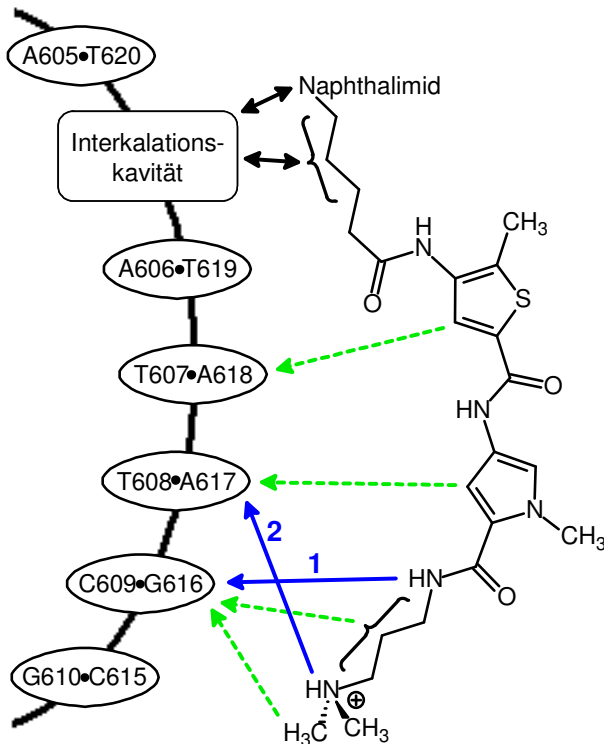
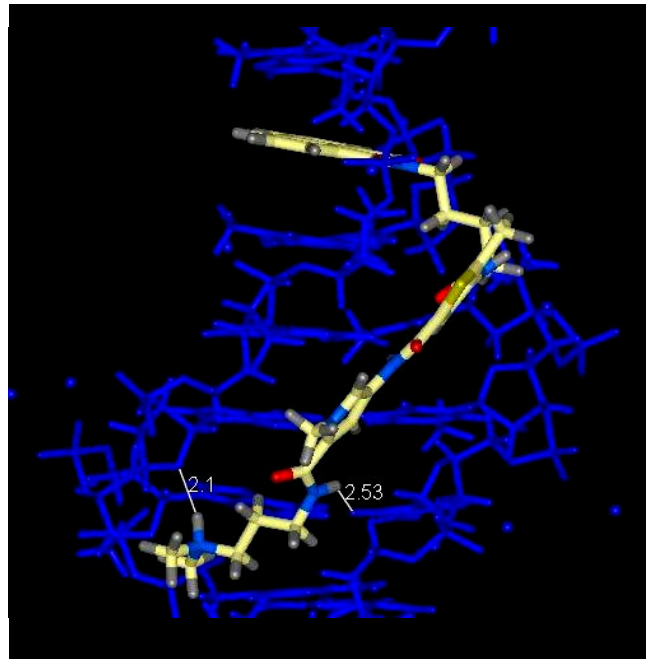
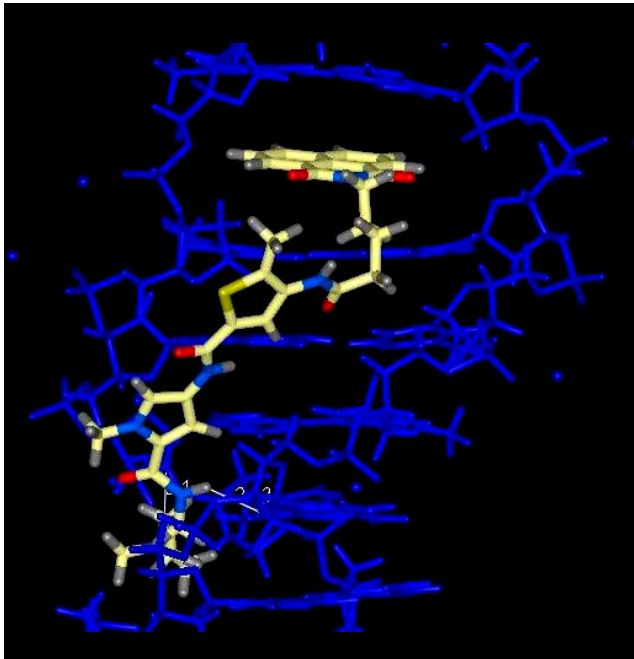


**Abb. 6.48:** Verbindung **24**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Guanin 610 O-4\* als Akzeptor)



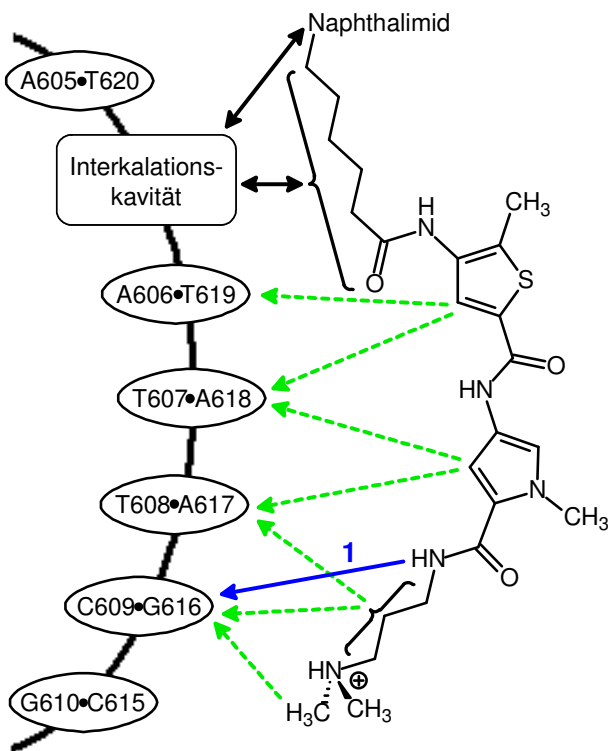
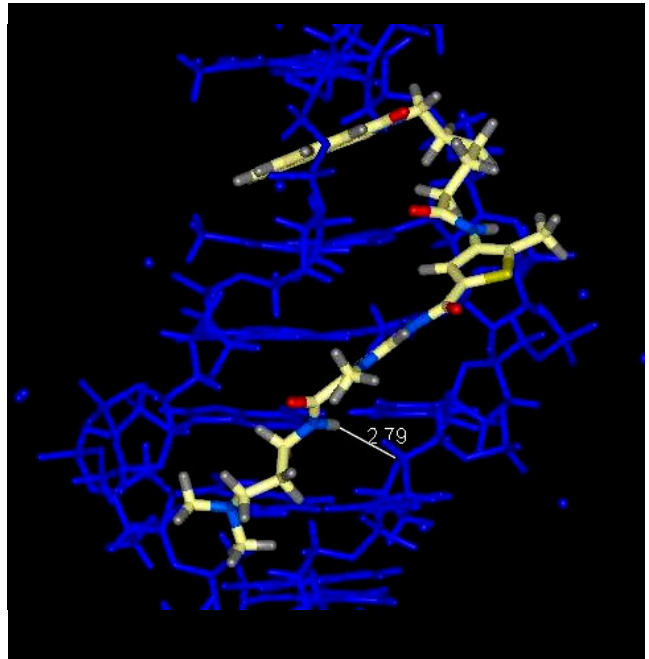
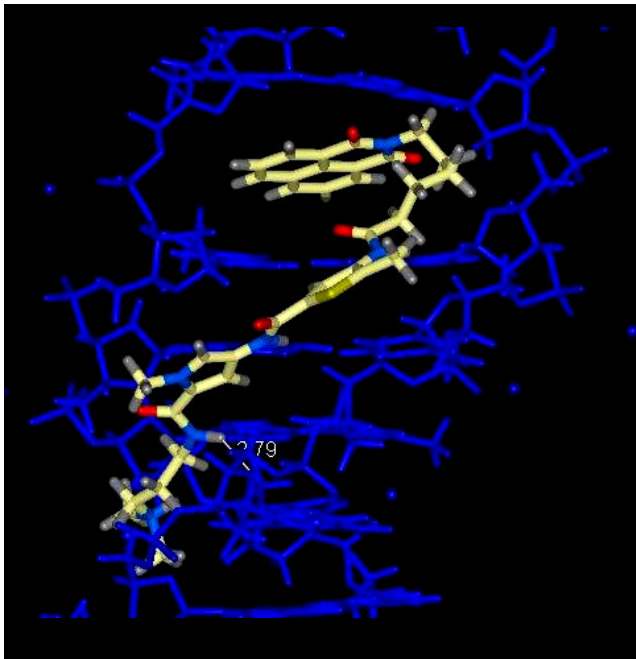
**Abb. 6.49:** Verbindung **25**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“

Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 609 O-2 als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 617 O-4\* als Akzeptor)



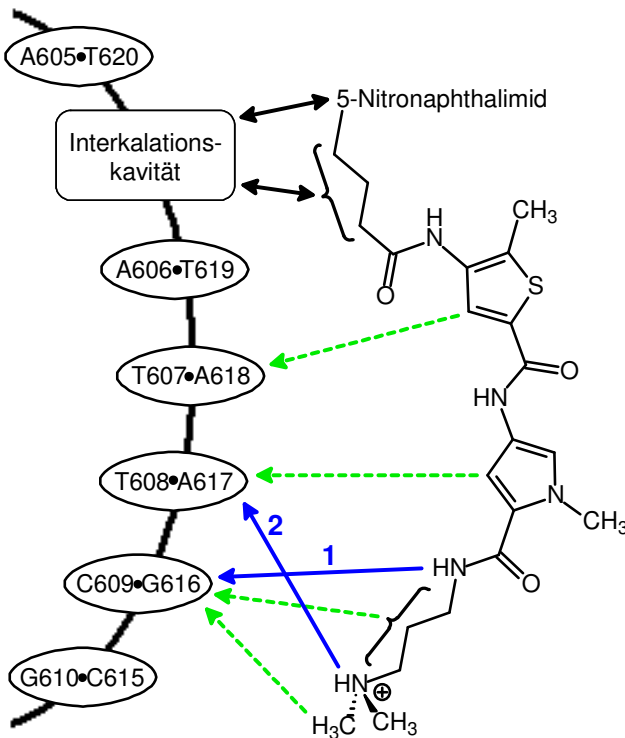
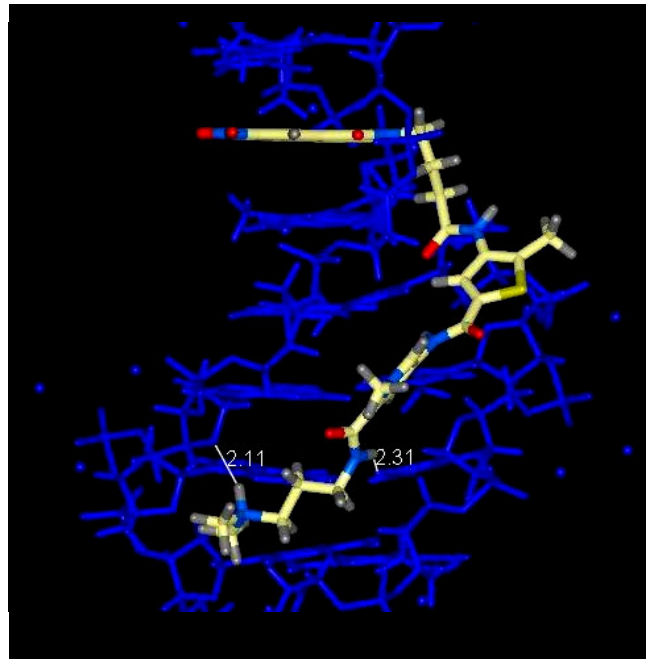
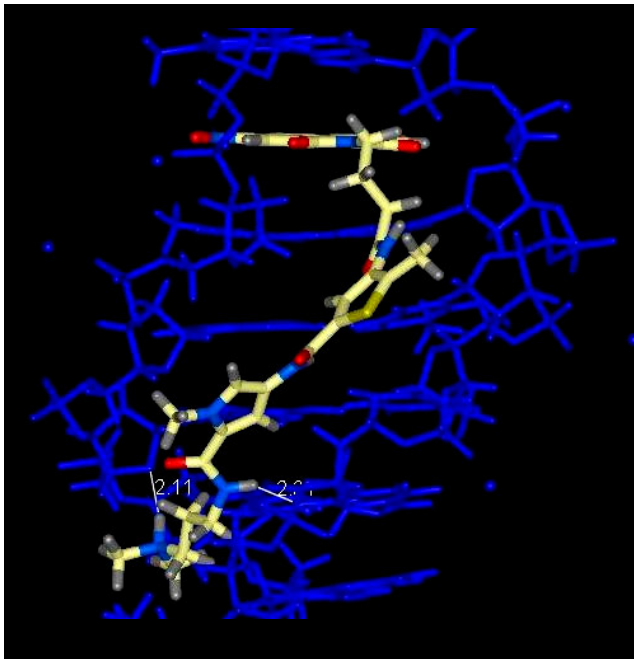
**Abb. 6.50:** Verbindung **26**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 609 O-4\* als Akzeptor)





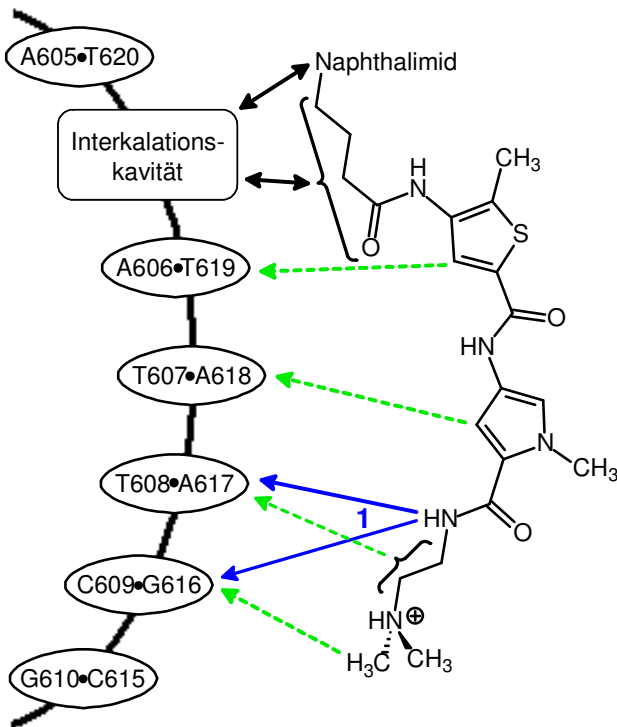
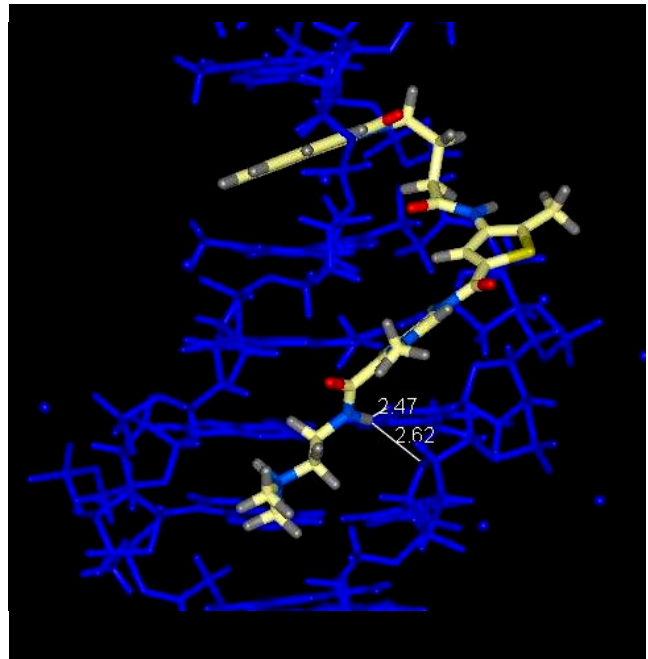
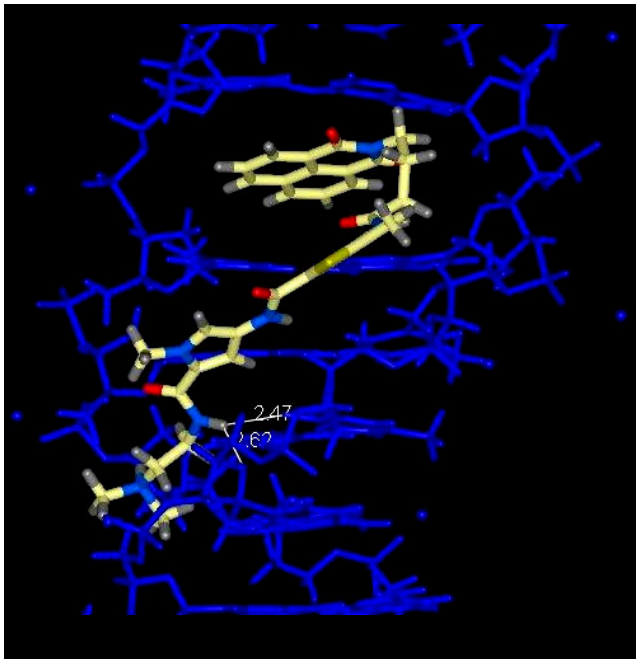
**Abb. 6.51:** Verbindung **27**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“

Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Cytosin 609 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 2 mit Adenin 617 O-4\* als Akzeptor)



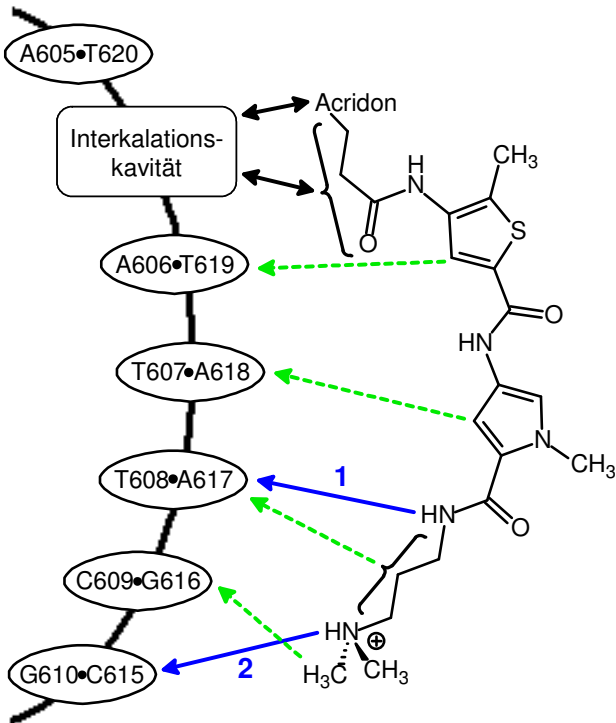
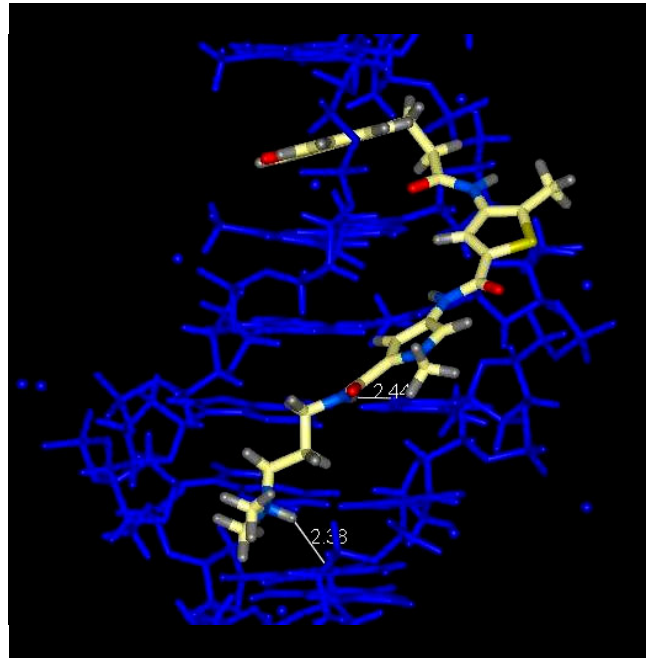
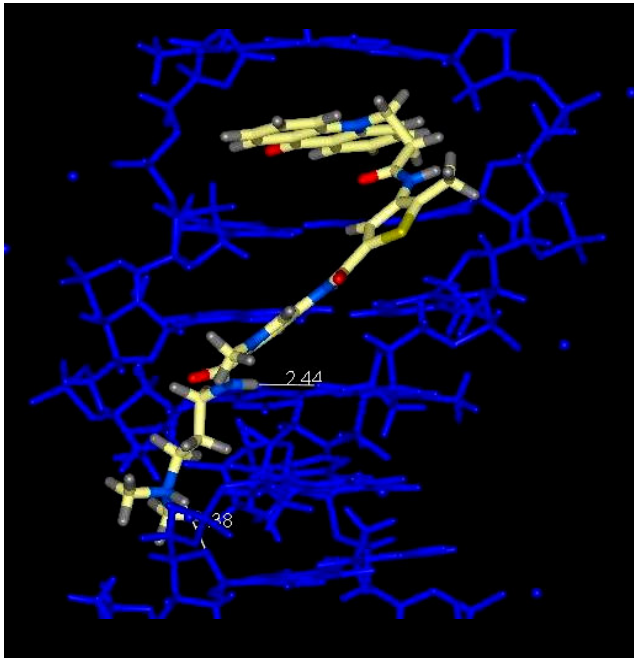
**Abb. 6.52:** Verbindung **28**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
**Oben:** Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

**Links:** Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 608 O-2 und Cytosin 609 O-4\* als Akzeptoren)



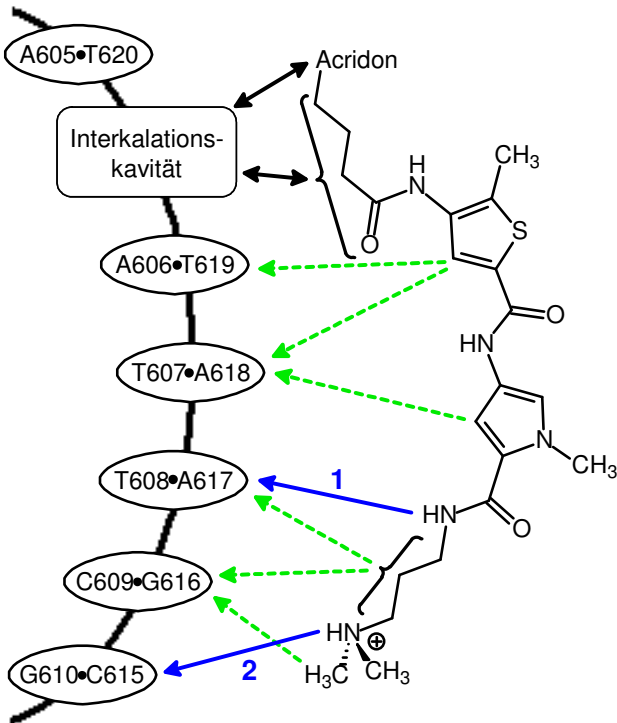
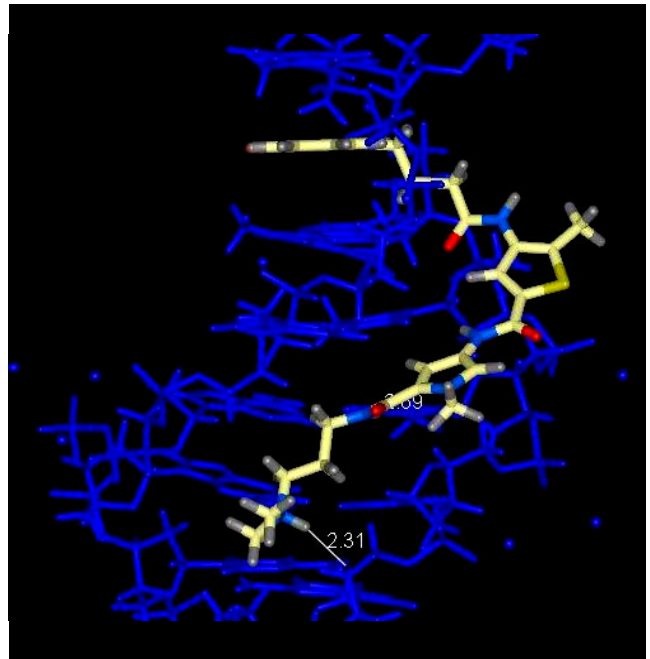
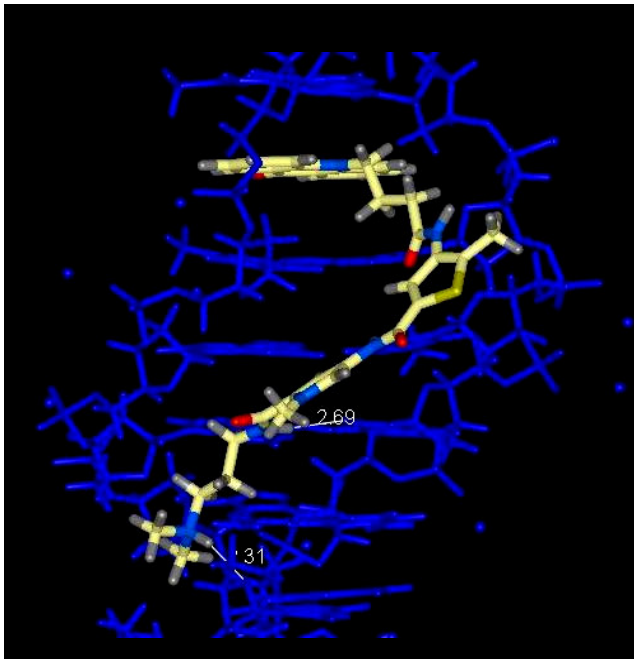


**Abb. 6.53:** Verbindung **29**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
**Oben:** Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

**Links:** Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 2 mit Guanin 610 O-4\* als Akzeptor)

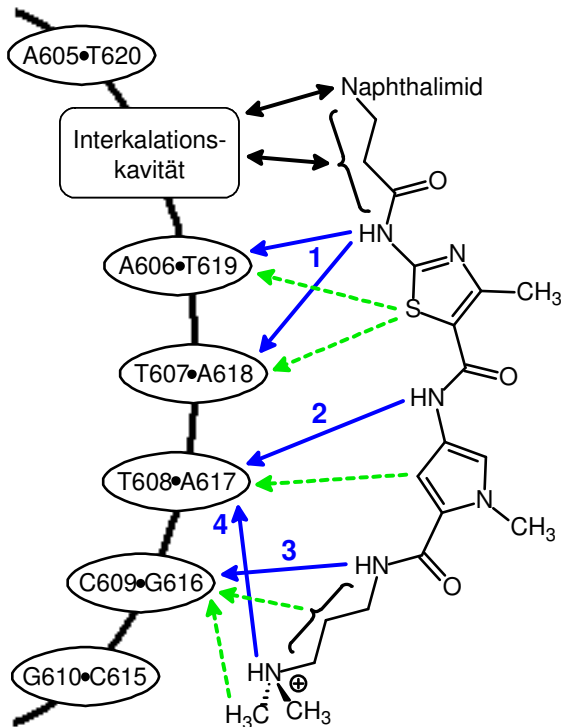
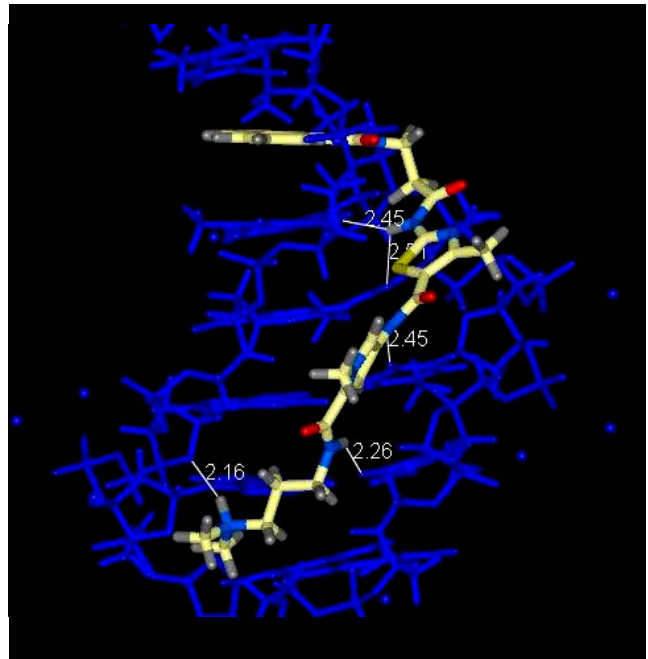
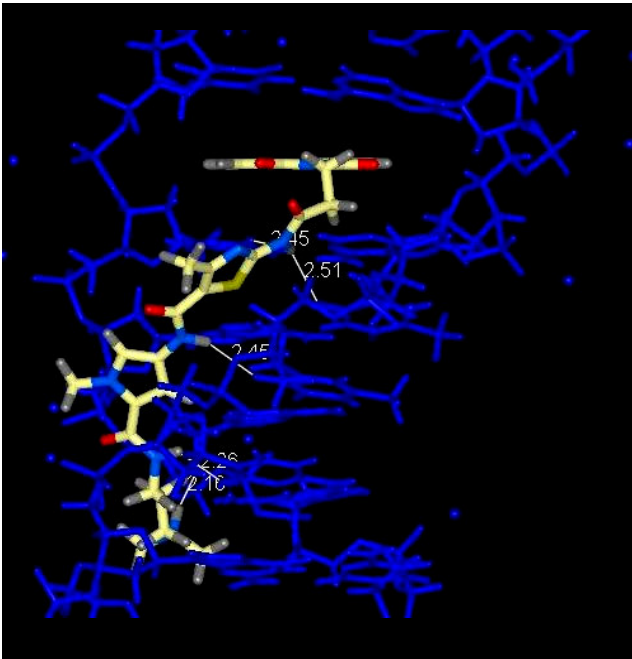


**Abb. 6.54:** Verbindung **30**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
 Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 2 mit Guanin 610 O-4\* als Akzeptor)



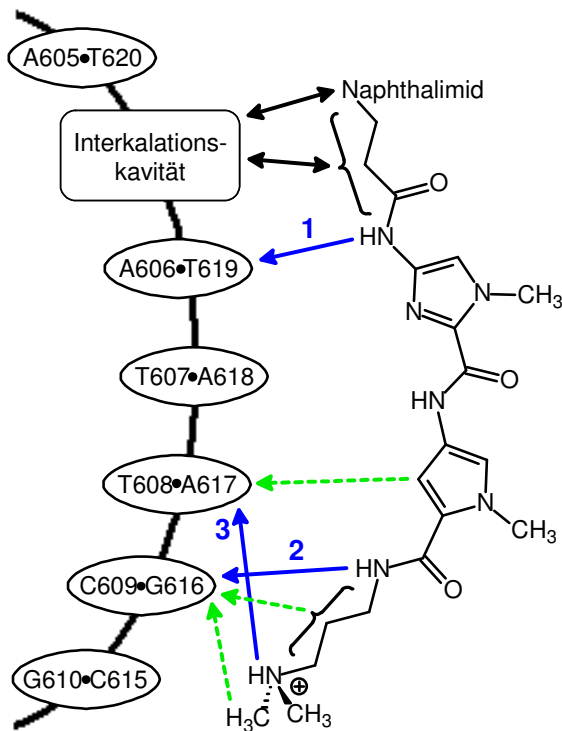
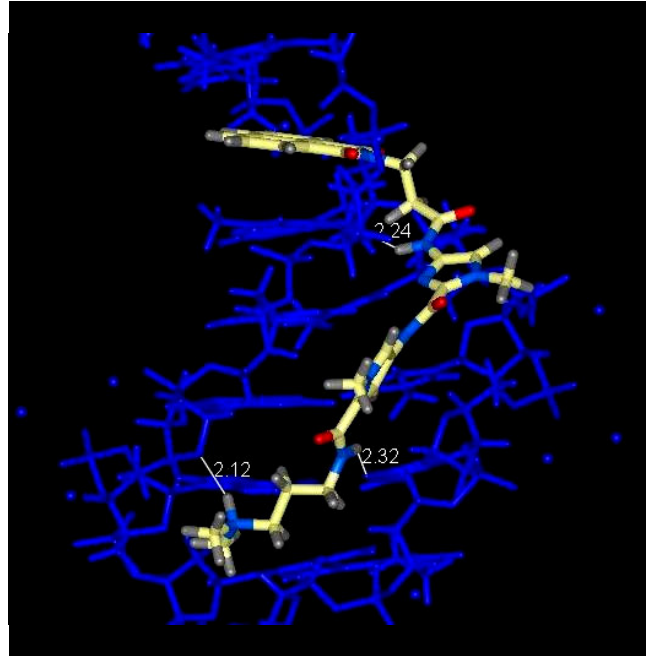
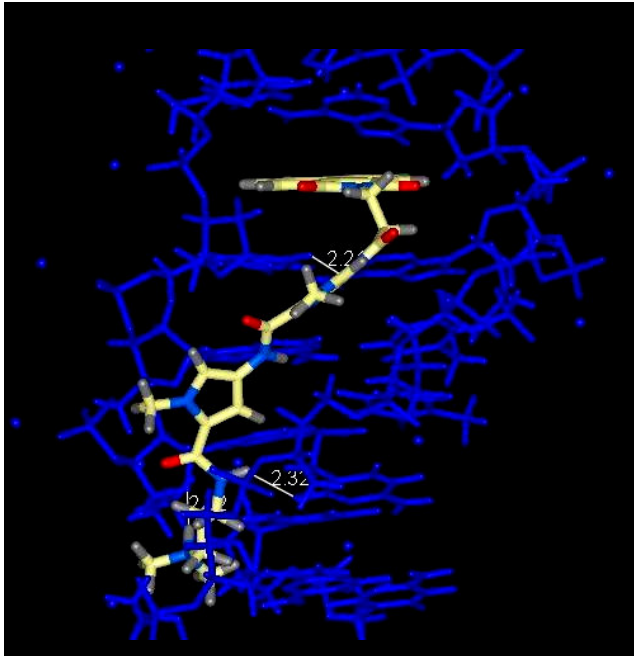
**Abb. 6.55:** Verbindung **33**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“

Oben: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

Links: Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 619 O-2 und Thymin 607 O-2 als Akzeptoren; H-Brücke 2 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 3 mit Cytosin 609 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 4 mit Adenin 617 O-4\* als Akzeptor)

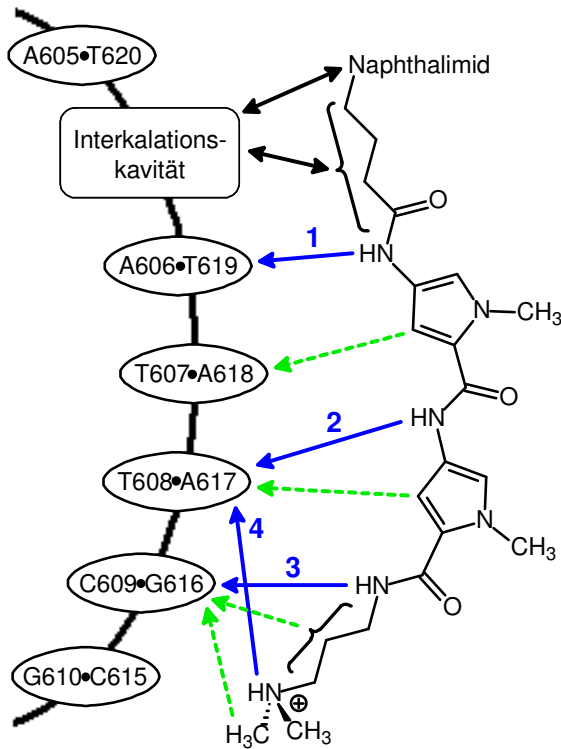
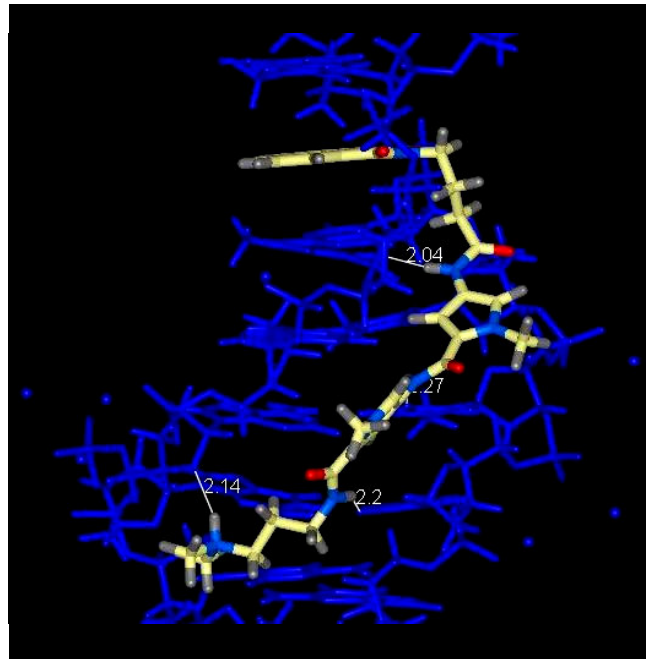
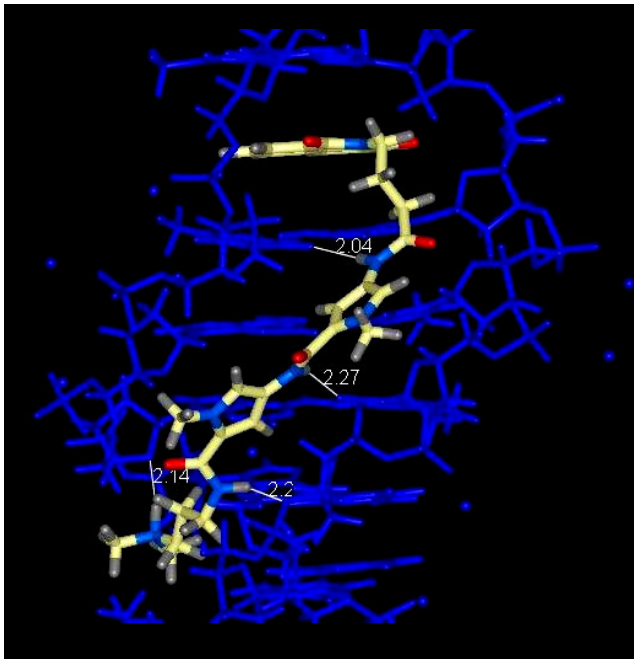


**Abb. 6.56:** Verbindung **38**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
**Oben:** Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

**Links:** Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 619 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 2 mit Cytosin 609 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 3 mit Adenin 617 O-4\* als Akzeptor)



**Abb. 6.57:** Verbindung **43**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
**Oben:** Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex

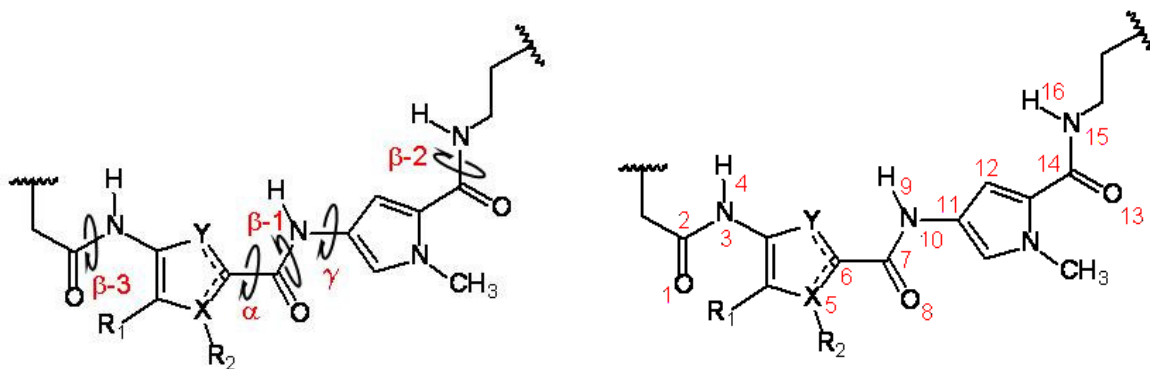
(DNA ist in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)

**Links:** Schematische Darstellung der DNA-Bindung

(schwarze Pfeile markieren die Strukturelemente des Liganden, die in der Interkalationskavität eingelagert sind; grüne Pfeile kennzeichnen van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen des Liganden und den H-2-Atomen der Adenin-Basen bzw. den Amino-Gruppen der Guanin-Basen mit Atomabständen von 2 bis 4 Å; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 619 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 2 mit Thymin 608 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 3 mit Cytosin 609 O-2 als Akzeptor; H-Brücke 4 mit Adenin 617 O-4\* als Akzeptor)

Die für die Docking-Studien ausgewählten Combilexine der Bispyrrol-Reihe (Verbindungen **43** und **44**; Abb. 6.39, Seite 218) und die bioisosteren Analoga mit Thiophen- (Verbindungen **22-30**; Abb. 6.36, Seite 214), Thiazol- (Verbindungen **33** und **34**; Abb. 6.37, Seite 216) und Imidazol-pyrrol-Struktur (Verbindungen **38** und **39**; Abb. 6.38, Seite 217) sollten nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) auf einen bei der DNA-Ligand-Komplexbildung potentiell auftretenden Induced-Fit untersucht werden. Dazu wurden, wie schon bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seiten 172-175) und den Nukleobasengekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seiten 198-200) beschrieben, zunächst die Torsionswinkel  $\alpha$  ( $\angle = X5-C6-C7-O8$ ),  $\beta-1$  ( $\angle = O8-C7-N10-H9$ ) und  $\gamma$  ( $\angle = H9-N10-C11-C12$ ) gemessen (Abb. 6.58, Seite 247). Aus den resultierenden Werten konnte anschließend für jede Testverbindung der Winkel  $\delta$ , der die relative Lage der beiden rinnenbindenden Fünfring-Heterozyklen zueinander beschreibt, berechnet werden <sup>[100]</sup>. Durch Vergleich dieser für die DNA-gebundenen Konformere der Combilexin-Derivate ermittelten Winkel, mit den bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden **4**, **5**, **7** und **8** (Abb. 6.5, Seite 158) vorliegenden Werten, lassen sich Aussagen über das Ausmaß der bei der DNA-Bindung auftretenden Rotationen um die beiden zentralen NH-Pyrrol- („N10-C11“) und CO-Hetaren- („C6-C7“) Bindungen machen (Abb. 6.58, Seite 247). [Die Kristallstrukturen der Verbindungen **4** <sup>[258]</sup>, **5** <sup>[259]</sup> und **8** <sup>[260]</sup> und das in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit Hilfe einer Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) ermittelte Minimumskonformer des Aminothiazol-Derivats **7** wurden zur Konstruktion der dreidimensionalen Computermodelle der Hybrid-Moleküle verwendet (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.).] Um die bei den DNA-gebundenen Konformeren der Combilexine vorliegenden Konfigurationen der Peptidbindungen vollständig aufklären zu können, wurden, ergänzend zu dem Torsionswinkel  $\beta-1$ , auch die Winkel der C-terminalen Amidbindungen ( $\beta-2$ ;  $\angle = O13-C14-N15-H16$ ) und die der N-terminalen Amidbindungen ( $\beta-3$ ;  $\angle = O1-C2-N3-H4$ ) bestimmt (Abb. 6.58, Seite 247). Die gemessenen und errechneten Winkel sind in den Tab. 6.19-6.20 (Seiten 247-249) aufgeführt.





**Abb. 6.58:** Schematische Darstellung der betrachteten Torsionswinkel (links) und der für die Winkelmessungen benötigten Atome mit ihrer Nummerierung (rechts)

	4 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup>	7 <sup>2</sup>	8 <sup>1</sup>
$\delta$ (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	-7,1°	2,8°	4,3°	-3,8°

**Tab. 6.19:** Winkel  $\delta$  der Fünfring-Hetaren-Pyrrolcarboxamide

<sup>1</sup>: Winkel der jeweiligen Kristallstruktur [258-260]

<sup>2</sup>: Winkel des in SPARTAN [35] simulierten Minimumskonformers

	22	23	24	25
$\alpha$ ( $\angle = X5-C6-C7-O8$ )	30,2°	16,6°	13,5°	-14,8°
$\beta-1$ ( $\angle = O8-C7-N10-H9$ )	-169,2°	-168,5°	-167,3°	-173,6°
$\gamma$ ( $\angle = H9-N10-C11-C12$ )	-1,5°	-3,4°	-2,3°	22,4°
$\delta$ (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>17,9°</b>	<b>1,7°</b>	<b>-1,5°</b>	<b>1,2°</b>
$\beta-2$ ( $\angle = O13-C14-N15-H16$ )	-171,7°	-176,5°	-178,8°	-177,9°
$\beta-3$ ( $\angle = O1-C2-N3-H4$ )	172,7°	-163,3°	-166,0°	180,0°

**Tab. 6.20A:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Combilexine

[Winkel der nach Docking (in ICM-PRO [32,33]) und *Refinement* (in HYPERCHEM [34]) vorliegenden Konformationen der Testverbindungen]

	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>
<b><math>\alpha</math></b> ( $\angle = \text{X5-C6-C7-O8}$ )	20,7°	18,4°	16,9°	13,7°
<b><math>\beta-1</math></b> ( $\angle = \text{O8-C7-N10-H9}$ )	-172,9°	-167,0°	-164,4°	-169,4°
<b><math>\gamma</math></b> ( $\angle = \text{H9-N10-C11-C12}$ )	7,4°	25,1°	2,2°	-1,1°
<b><math>\delta</math></b> (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>21,0°</b>	<b>30,5°</b>	<b>3,5°</b>	<b>2,0°</b>
<b><math>\beta-2</math></b> ( $\angle = \text{O13-C14-N15-H16}$ )	178,1°	-170,1°	-171,9°	-177,8°
<b><math>\beta-3</math></b> ( $\angle = \text{O1-C2-N3-H4}$ )	-167,4°	168,8°	-167,9°	-178,1°
	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>38</b>
<b><math>\alpha</math></b> ( $\angle = \text{X5-C6-C7-O8}$ )	10,7°	28,2°	28,7°	45,0°
<b><math>\beta-1</math></b> ( $\angle = \text{O8-C7-N10-H9}$ )	-169,9°	179,8°	-171,0°	172,9°
<b><math>\gamma</math></b> ( $\angle = \text{H9-N10-C11-C12}$ )	-2,0°	23,4°	20,7°	20,6°
<b><math>\delta</math></b> (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>-1,4°</b>	<b>51,8°</b>	<b>40,4°</b>	<b>72,7°</b>
<b><math>\beta-2</math></b> ( $\angle = \text{O13-C14-N15-H16}$ )	179,2°	178,7°	-174,9°	-173,1°
<b><math>\beta-3</math></b> ( $\angle = \text{O1-C2-N3-H4}$ )	173,8°	177,9°	-175,1°	175,2°

**Tab. 6.20B:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Combilexine  
 [Winkel der nach Docking (in ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM<sup>[34]</sup>)  
 vorliegenden Konformationen der Testverbindungen]



	<b>39</b>	<b>43</b>	<b>44</b>
<b><math>\alpha</math></b> ( $\angle = \text{X5-C6-C7-O8}$ )	-16,3°	25,6°	-27,2°
<b><math>\beta-1</math></b> ( $\angle = \text{O8-C7-N10-H9}$ )	-174,7°	-163,6°	176,8°
<b><math>\gamma</math></b> ( $\angle = \text{H9-N10-C11-C12}$ )	20,5°	16,4°	2,4°
<b><math>\delta</math></b> (berechnet aus $\alpha$ , $\beta-1$ und $\gamma$ )	<b>-1,1°</b>	<b>25,6°</b>	<b>-21,6°</b>
<b><math>\beta-2</math></b> ( $\angle = \text{O13-C14-N15-H16}$ )	-171,5°	-176,4°	178,2°
<b><math>\beta-3</math></b> ( $\angle = \text{O1-C2-N3-H4}$ )	-179,1°	178,3°	-172,1°

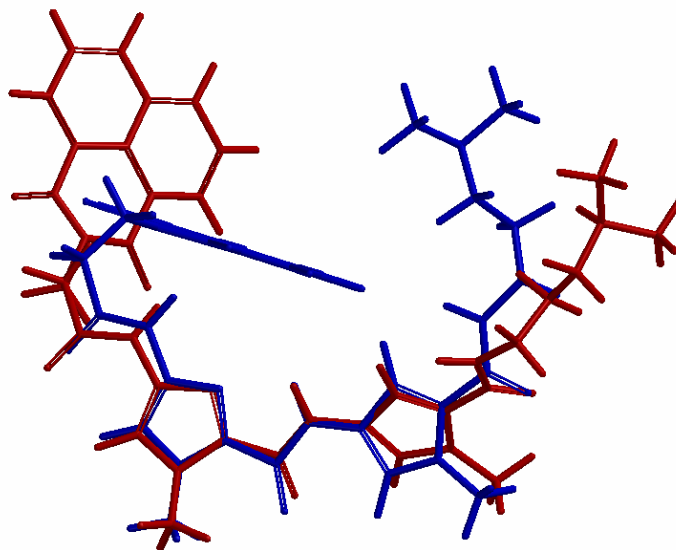
**Tab. 6.20C:** Zur Untersuchung des Induced-Fit ermittelte Winkel der Combilexine  
[Winkel der nach Docking (in ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>) und *Refinement* (in HYPERCHEM<sup>[34]</sup>)  
vorliegenden Konformationen der Testverbindungen]

Bei der Majorität der untersuchten Combilexine mit Thiophen-pyrrol-Struktur, tritt bei der DNA-Bindung kein Induced-Fit als Folge von Rotationen um die zentralen NH-Pyrrol- und CO-Thiophen-Bindungen auf: In Analogie zur Kristallstruktur des Nitrothiophen-Derivats **5** (Tab. 6.19, Seite 247; Abb. 6.5, Seite 158) zeigen die DNA-gebundenen Konformere der Verbindungen **23-25** und **28-30** (Abb. 6.36, Seite 214) Coplanarität bezüglich des rinnenbindenden Strukturelements (Winkel  $\delta < 10^\circ$ ; Tab. 6.20A-6.20B, Seiten 247-248). Die Anpassung des *Minor Groove Binders* an die Topologie der kleinen Furche erfolgt bei den betrachteten Hybrid-Molekülen der Thiophen-Reihe hauptsächlich durch Torsionen der N-terminalen und der mittleren Amidbindungen, die bei der DNA-Ligand-Komplexbildung konformativ aus der von den beiden Fünfring-Heterozyklen gebildeten Ebene herausgedreht werden. Erkennbar ist dies an den Werten, die für die Winkel der betrachteten Peptidbindungen ermittelt wurden: Bei sieben Testverbindungen ist der Winkel  $\beta-1$ , bei fünf Derivaten der Winkel  $\beta-3$ , kleiner  $170^\circ$ . Die DNA-Bindung dieser Liganden ist folglich mit dem Aufbau einer konformativen Molekülspannung verbunden. Diese ist sehr wahrscheinlich auf die nur bei den Combilexinen der 5-Methyl-thiophen-Reihe vorliegende Stellung der N-terminalen Amidbindung zurückzuführen, bei der die Carbonyl-Gruppe – im Gegensatz zur Referenzsubstanz Netropsin – der konkaven Molekülseite und somit

dem Rezeptor zugewandt ist (Abb. 6.46-6.54, Seiten 234-242). Die beschriebenen Besonderheiten der Bindekonformationen bedingen möglicherweise die im Vergleich zu den Bispyrrol- und Thiazol-Pyrrol-Derivaten reduzierte DNA-Affinität der Thiophen-Verbindungen (Tab. 6.16, Seiten 219-220).

Mit Ausnahme des Derivats **39** weisen die DNA-gebundenen Konformere der untersuchten Hybrid-Moleküle mit Thiazol-pyrrol-, Imidazol-pyrrol- und Bispyrrol-Struktur (→ Verbindungen **33**, **34**, **38**, **43**, **44**; Abb. 6.37-6.39, Seiten 216-218) dagegen jeweils eine isohelikale Konformation auf, d.h. die beiden Fünfring-Heterozyklen der Verbindungen liegen gegeneinander verdreht vor ( $\delta < 10^\circ$ ; Tab. 6.20B-6.20C, Seiten 248-249; Abb. 6.59, Seite 251). Da die Kristallstrukturen des Bispyrrolcarboxamids **4** und des Imidazol-pyrrolcarboxamids **8**, ebenso wie das in SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierte Minimumskonformer des Aminothiazol-Derivats **7**, jedoch Coplanarität besitzen (Tab. 6.19, Seite 247; Abb. 6.5, Seite 158), ist die Komplexbildung der untersuchten Combilexine folglich mit einer Rezeptor-induzierten Konformationsänderung verbunden. Die isohelikale Konformation hat eine bessere Anpassung des rinnenbindenden Molekülteils an die Topologie der DNA zur Folge, wodurch die DNA-Bindung verbessert wird.

Bei der DNA-Ligand-Komplexbildung der Hybrid-Moleküle bleibt die bereits bei den Minimumskonformeren der Testverbindungen vorliegende, energetisch günstige trans-(Z)-Konfiguration der Amidbindungen erhalten (Tab. 6.20, Seiten 247-249). Diese Konfiguration der peptidischen Bindungen bedingt eine Sichelform der Liganden, die aufgrund der erleichterten Einlagerung in die kleine Rinne des Rezeptors eine Erhöhung der DNA-Affinität zur Folge hat.



**Abb. 6.59:** Darstellung der helikalen Konformation des DNA-gebundenen Konformers der Verbindung **38**: Vergleich des in SPARTAN<sup>[35]</sup> simulierten Minimumskonformers (blaues Molekül) mit dem Konformer nach Docking und *Refinement* (rotes Molekül)  
(*Alignment* durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

Auf die Bedeutung der C-terminalen Dimethylaminoalkyl-Seitenkette für die DNA-Bindung von *Minor Groove Bindern* wurde bereits bei den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 176) und bei den Nucleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seiten 203-204) hingewiesen: Zum einen fungiert das bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegende Stickstoffatom (Abb. 6.60, Seite 253) bei vielen der untersuchten DNA-Ligand-Komplexe als H-Brücken-Donor; zum anderen gehen die Methyl- und Methyl-Gruppen der Kette van der Waals-Interaktionen mit der DNA ein. Diese van der Waals-Wechselwirkungen sollten am Beispiel zweier Combilexine der Thiophen-Reihe, die sich bei sonst gleichem strukturellen Aufbau nur in der Länge der aliphatischen Seitenkette unterscheiden (Verbindung **24** mit Propyl-, Verbindung **28** mit Ethyl-Kette; Abb. 6.36, Seite 214), genauer untersucht und halbquantitativ beurteilt werden. Dazu wurde bei den mit den beiden Derivaten **24** und **28** simulierten DNA-Ligand-Komplexen jeweils die Anzahl der Rezeptor-Atome bestimmt, die sich in einem Abstand von bis zu 3 bzw. bis zu 4 Å von den Wasserstoffatomen des DNA-gebundenen Combilexins entfernt befinden. Die Resultate sind in Tab. 6.21 (Seite 252) aufgeführt.

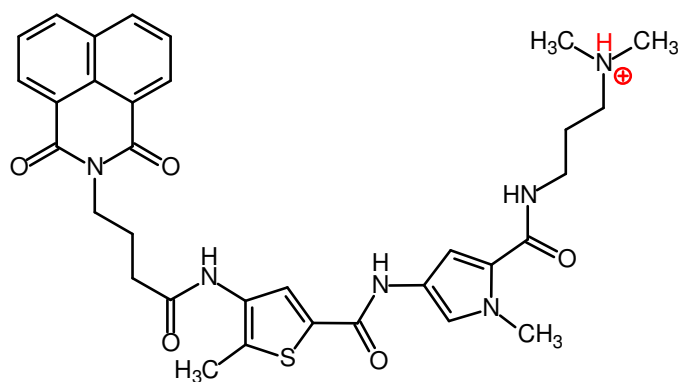
	<b>24</b>	<b>28</b>
<b>Naphthalimid</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 7 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 38 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 7 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 44 Kontakte
<b>Buttersäure-Linker, N-terminal</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 5 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 26 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 5 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 23 Kontakte
<b>Thiophen</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 1 Kontakt <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 6 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 1 Kontakt <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 6 Kontakte
<b>Pyrrrol</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 2 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 16 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 4 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 16 Kontakte
<b>Linker, C-terminal (Propyl- bzw. Ethyl-Kette)</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 15 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 47 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 7 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 26 Kontakte
<b>Methyl-Gruppen</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 10 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 40 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 6 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 36 Kontakte
<b>Seitenkette, gesamt</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 25 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 87 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 13 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 62 Kontakte
<b>Molekül, gesamt</b>	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 40 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 173 Kontakte	<b>3 Å<sup>1</sup>:</b> 30 Kontakte <b>4 Å<sup>2</sup>:</b> 171 Kontakte
<b>durch van der Waals-WW freiwerdende Komplex- bildungsenergie<sup>3</sup></b>	-70,2 kcal/mol (84,9% der Gesamtenergie)	-67,9 kcal/mol (84,7% der Gesamtenergie)

**Tab. 6.21:** Untersuchung der van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Combilexinen und der DNA am Beispiel der beiden Thiophen-pyrrol-carboxamide **24** und **28** und dem Rezeptor 1G3X <sup>[36,80]</sup>

<sup>1</sup>: Anzahl der DNA-Atome im Abstand von bis zu 3 Å, gemessen mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup>

<sup>2</sup>: Anzahl der DNA-Atome im Abstand von bis zu 4 Å, gemessen mit HYPERCHEM <sup>[34]</sup>

<sup>3</sup>: Energie, die auf van der Waals-Wechselwirkungen zurückzuführen ist (nach dem *Refinement* in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> berechnet; verwendete Rechenmethode: AMBER <sup>[179,180]</sup>)



**Abb. 6.60:** Beispiel eines Combilexins mit protoniert vorliegendem Stickstoffatom in der Seitenkette (hier: Verbindung **24**)

Die genaue Untersuchung der mit den beiden Thiophen-haltigen Combilexinen **24** und **28** simulierten Komplexe zeigt, dass mehr als 50% der für die DNA-Bindung der Derivate wichtigen van der Waals-Interaktionen auf die Beteiligung der aliphatischen Seitenkette zurückzuführen sind (Tab. 6.21, Seite 252). Da wiederum mehr als 80% der bei der Komplexbildung insgesamt freiwerdenden Energie auf van der Waals-Wechselwirkungen zwischen DNA und Hybrid-Molekül entfallen, ist eine Verkürzung der Seitenkette mit einer Reduktion der möglichen Wechselwirkungen und folglich mit einer signifikanten Abnahme der DNA-Affinität der Liganden verbunden. Erkennbar ist dies zum einen an den  $\Delta T_m$ -Werten, die für die beiden Derivate **24** und **28** ermittelt wurden (Verbindung **24**:  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2] = 17,4^\circ\text{C}$ ; Verbindung **28**:  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2] = 12,2^\circ\text{C}$ ; Tab. 6.16, Seite 219), und zum anderen an den von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> ( $\rightarrow$  unter Verwendung des Kraftfeldes AMBER<sup>[179,180]</sup>) für diese beiden Verbindungen jeweils berechneten Komplexbildungsenergien (Tab. 6.18, Seite 233).

In nahezu jedem der simulierten DNA-Ligand-Komplexe (genauer: bei 13 der 15 untersuchten Komplexe; Abb. 6.46-6.57, Seiten 234-245) liegt, in Analogie zu den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 164 ff.) und den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seite 191 ff.), eine von dem protonierten Stickstoffatom der Seitenkette (Abb. 6.60) ausgehende, intermolekulare H-Brücke zu einer DNA-Base vor. Dies beeinflusst die Positionierung des rinnenbindenden Molekülteils der Combilexine in der kleinen Furche der DNA<sup>[45,67,69,104]</sup> und, durch Verlängerung der Residualzeit, die Kinetik der DNA-Ligand-Komplexbildung<sup>[278]</sup>. Beides resultiert in einer Zunahme der DNA-Bindungsstärke.

### 6.3.6 Zytotoxizitätsstudien des NCI

Da das NCI (*National Cancer Institute*) lediglich die beiden Hybrid-Moleküle **24** und **34** (Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.37, Seite 216) zu seinen zellbiologischen Tests zugelassen hat (Kapitel 3.4.4, Seite 85 ff.), können die vorliegenden Daten nicht zur Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen genutzt werden. Zur Vervollständigung der mit den Combilexinen durchgeführten biophysikalischen, biochemischen und *in silico*-Studien, sind die Ergebnisse der NCI-Zytotoxizitätstests dennoch im Folgenden dargestellt.

	MG_MID LOG <sub>10</sub> GI <sub>50</sub> <sup>1</sup>	MG_MID LOG <sub>10</sub> TGI <sup>2</sup>	MG_MID LOG <sub>10</sub> LC <sub>50</sub> <sup>3</sup>
<b>24</b>	-4,03	> -4,0	> -4,0
<b>34</b>	> -4,0	> -4,0	> -4,0

**Tab. 6.22:** Ergebnisse der vom NCI durchgeführten Zytotoxizitätstests

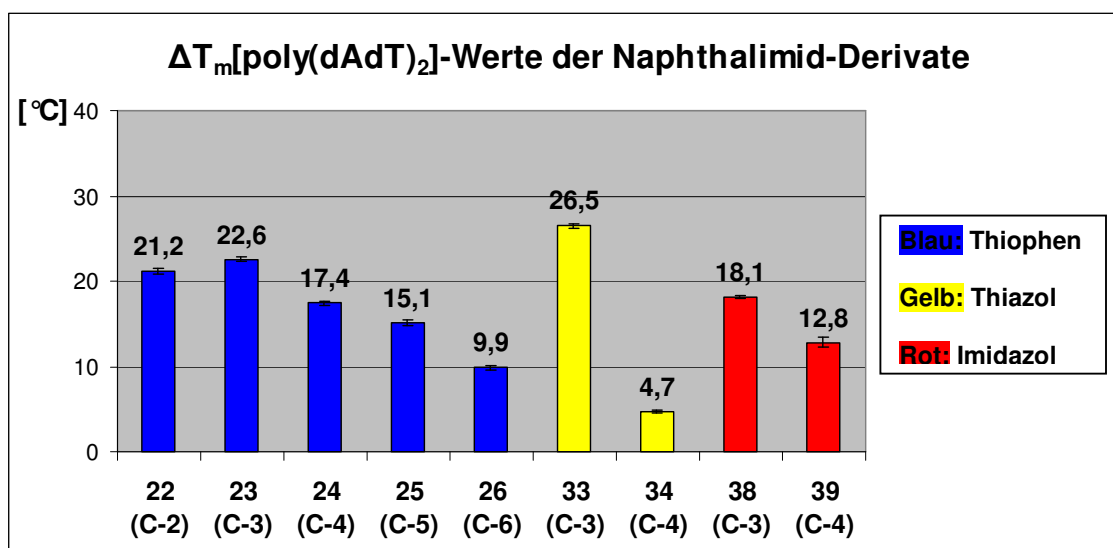
- <sup>1</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine 50%-ige Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>  
<sup>2</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine totale Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>  
<sup>3</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils bei 50% der Krebszellen zum Zelltod führt <sup>[90]</sup>

Aus den zellbiologischen Studien des NCI geht hervor, dass das Thiophen-pyrrolcarboxamid-Derivat **24** keine relevante zytotoxische Aktivität besitzt und auch nur eine sehr schwach ausgeprägte Wachstumshemmung der im Assay eingesetzten Krebszelllinien bewirken kann (Tab. 6.22); die Thiazol-Verbindung **34** weist weder zytostatische noch zytotoxische Eigenschaften auf. Da zumindest das Derivat **24** mit einer hohen Affinität an die DNA bindet ( $\Delta T_m[\text{poly(dAdT)}_2] = 17,4\text{ }^\circ\text{C}$ ; Tab. 6.16, Seiten 219-220), sind die Resultate der Zytotoxizitätstests möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in der Tumorzelle eine für einen biologischen Effekt notwendige Substanzkonzentration aufgrund einer zu geringen zellulären Bioverfügbarkeit der Testverbindungen nicht anfluten kann. Die unzureichende Zellmembranpenetration ist wahrscheinlich durch die Verletzung der „*Lipinski's rule of five*“ <sup>[118]</sup> in zumindest zwei Punkten bedingt: Die Moleküle sind sehr lipophil <sup>[38]</sup>, was die Selbstassoziation der Combilexine zu größeren Aggregaten begünstigt und folglich die Aufnahme der Test-

verbindungen in die Zelle erschwert <sup>[279]</sup>. Zudem liegt das Molekulargewicht über 600 Da. Zur Bestätigung dieser Hypothese der unzureichenden Bioverfügbarkeit müssten zum einen die aggregatbildenden Eigenschaften der Hybrid-Moleküle mittels Steady-State Fluoreszenz-Spektroskopie oder Transmissions-Elektronenmikroskopie <sup>[279]</sup> untersucht und das Ausmaß der Zellemembranpenetration der Testverbindungen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt werden <sup>[116,119,279]</sup>.

### 6.3.7 Diskussion der Ergebnisse

Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass das Naphthalimidessigsäure-gekoppelte Thiazol-pyrrol-Derivat **22**, im Gegensatz zu den Interkalatorcarbonsäuren (Kapitel 6.1.1.2, Seite 149) und den Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.2, Seite 159 ff.), eine sehr gute DNA-Affinität besitzt (Abb. 6.61; Abb. 6.36, Seite 214; Kapitel 6.3.2, Seite 219 ff.). Durch Austausch des bei der Verbindung **22** vorliegenden Essigsäure-Linkers, welcher N-terminal das interkalierende Chromophor mit der rinnenbindenden Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur verknüpft, gegen eine C-3-Kette (Verbindung **23**), konnte die DNA-Bindungsstärke noch gesteigert werden. Eine weitere Linker-Verlängerung hatte dagegen eine Abnahme der DNA-Aktivität zur Folge (Verbindungen **24**, **25** und **26**).



**Abb. 6.61:**  $\Delta T_m$ [poly(dAdT)<sub>2</sub>]-Werte der Naphthalimid-gekoppelten Combilexine mit Thiophen-, Thiazol- und Imidazol-pyrrolcarboxamid-Struktur

Aus der graphischen Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe (Abb. 6.46-6.50, Seiten 234-238) lassen sich Erklärungen für diesen Sachverhalt ableiten: Nur der bei der Synthese der Verbindung **23** verwendete Propionsäure-Linker ermöglicht eine spannungsfreie Interkalation des Naphthalimids parallel zu den beiden AT-Basenpaaren der Interkalationskavität und gleichzeitig eine tiefe Einlagerung der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur in die kleine Rinne der DNA (Abb. 6.47, Seite 235).



In dem mit dem homologen Derivat **24** gebildeten Komplex liegt der rinnenbindende Teil des Moleküls zwar in einer der Verbindung **23** entsprechenden Orientierung an der DNA gebunden vor; die im Vergleich zu dem Combilexin **23** zusätzlich vorhandene Methylen-Gruppe des N-terminalen Linkers führt bei dem Buttersäure-Derivat **24** jedoch zu einer konformativen Stauchung der aliphatischen Kette, so dass der Interkalator mit der von dem Basenpaar „A606•T619“ gebildeten Ebene einen Winkel von ca. 30° einschließt (Abb. 6.48, Seite 236). Dies hat eine Schwächung des zwischen dem LUMO des Naphthalimid-Moleküls und dem HOMO der Adenin-Basen gebildeten Charge-Transfer-Komplexes <sup>[72,78,274]</sup> und, daraus resultierend, eine Reduktion der DNA-Bindungsstärke zur Folge (Abb. 6.61, Seite 256).

Im Gegensatz zu dem mit der Verbindung **24** simulierten Komplex wird das interkalierende Chromophor bei der DNA-Bindung des Thiophen-pyrrolcarboxamid-Derivats **25** nahezu parallel zu den Basenpaaren in die Interkalationskavität eingeschoben. Der Pentansäure-Linker dieses Hybrid-Moleküls verhindert allerdings eine mit den DNA-gebundenen Konformeren der Verbindungen **23** und **24** vergleichbar tiefe Einlagerung der beiden Heterozyklen und der sie verknüpfenden Amidbindung in die kleine Rinne des Rezeptors (Abb. 6.49, Seite 237). Die dadurch bedingte Vergrößerung des Bindungsabstandes zwischen DNA und Ligand führt über eine Abschwächung der van der Waals-Wechselwirkungen zu einer Abnahme der DNA-Affinität <sup>[63,280]</sup> (Abb. 6.61, Seite 256).

In Analogie zur Naphthalimidbuttersäure-Verbindung **24** ist auch die DNA-Bindung des Hexansäure-Derivats **26** mit einer konformativen Stauchung des N-terminalen, aliphatischen Linkers verbunden. Dies wirkt sich sowohl auf die Rinnenbindung des Thiophen-pyrrolcarboxamid-Strukturelements, als auch auf die Interkalation des Naphthalimid-Moleküls störend aus: Zum einen wird zwischen DNA und Ligand nur eine intermolekulare H-Brücke ausgebildet, wobei das Stickstoffatom der C-terminalen Amidbindung als Donor fungiert. Zum anderen nimmt der Winkel, der die relative Lage des Interkalators zu der von dem Basenpaar „A606•T619“ gebildeten Ebene beschreibt, einen Wert von ca. 30° an (Abb. 6.50, Seite 238).

Bei der Beurteilung der aus den  $T_m$ -Wert-Messungen resultierenden DNA-Aktivitäten des Naphthalimidpentansäure-Derivats **25** und der homologen Verbindung **26**, müssen auch thermodynamische Aspekte der DNA-Ligand-Komplexbildung berücksichtigt werden: Bedingt durch die Länge des N-terminalen Linkers besitzen die beiden Testverbindungen viele Molekül-Freiheitsgrade (Tab. 6.23, Seite 258), so

dass die DNA-Ligand-Komplexbildung mit einer deutlichen Entropie-Abnahme verbunden sein sollte <sup>[20]</sup>. Dies könnte eine weitere mögliche Erklärung für die im Vergleich zu der Naphthalimidpropionsäure-Verbindung **23** geringere DNA-Affinität der Derivate **25** und **26** sein (Abb. 6.61, Seite 256). Da die mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> durchgeführten Molecular Modelling-Simulationen im Vakuum ablaufen, kann der Einfluss der Entropie auf die DNA-Bindung der Combilexine bei der Simulation der DNA-Ligand-Komplexe und bei der Berechnung der Komplexbildungsenergien allerdings nicht in einem der Realität entsprechenden Ausmaß berücksichtigt <sup>[20,241]</sup> werden.

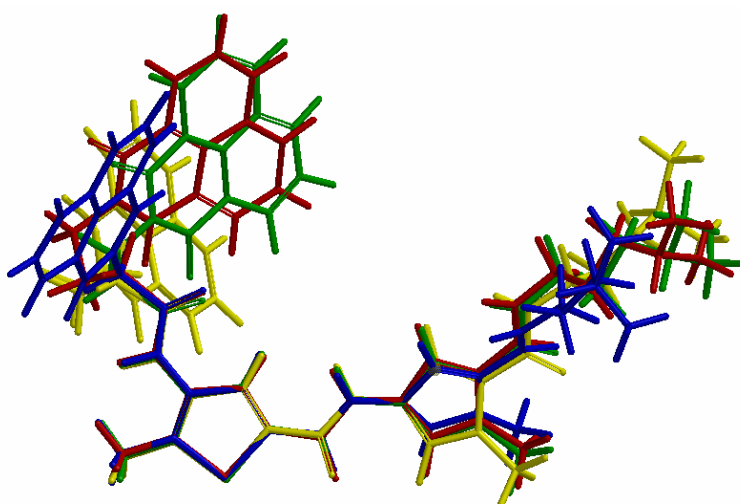
	Länge des N-terminalen Linkers	Freiheitsgrade <sup>1</sup>
<b>22</b>	C-2	219
<b>23</b>	C-3	228
<b>24</b>	C-4	237
<b>25</b>	C-5	246
<b>26</b>	C-6	255

**Tab. 6.23:** Molekül-Freiheitsgrade verschiedener Naphthalimid-gekoppelter Thiophen-pyrrolcarboxamide in Abhängigkeit von der Länge des N-terminalen Linkers

<sup>1</sup>: in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit der semiempirischen AM1-Methode <sup>[184,185]</sup> berechnet

Der nur aus zwei Kohlenstoffatomen bestehende, N-terminale Linker der Essigsäure-Verbindung **22** führt dazu, dass dieses Hybrid-Molekül an einen kürzeren Abschnitt der DNA bindet als die homologen Derivate **23-26** (Abb. 6.46, Seite 234). Die dadurch bedingte Reduktion der zwischen DNA und Ligand ausgebildeten van der Waals-Wechselwirkungen hat jedoch eine im Vergleich zu der Propionsäure-Verbindung **23** nur geringfügig schwächere DNA-Affinität zur Folge (Abb. 6.61, Seite 256). Dies ist zum einen auf die bei der DNA-Bindung des Derivats **22** auftretende, tiefe Einlagerung des Thiophen-pyrrolcarboxamid-Strukturelements in die kleine Rinne der DNA zurückzuführen. Zum anderen liegt das interkalierende Chromophor in der Kavität nahezu parallel zu den DNA-Basenpaaren ausgerichtet vor, wodurch das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking des Naphthalimid-Moleküls mit den Basen des Oligonukleotids energetisch begünstigt wird <sup>[72,78,274]</sup>.

In Abb. 6.62 sind die nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) vorliegenden Konformere der Naphthalimid-gekoppelten Combilexine **22-25** (Abb. 6.36, Seite 214) vergleichend graphisch dargestellt. Eine genaue Betrachtung der verschiedenen Konformere zeigt, dass die Thiophen-pyrrol-carboxamid-Struktur und die aliphatische, C-terminale Dimethylaminopropyl-Seitenkette bei allen Testverbindungen in einer sehr ähnlichen Orientierung in der kleinen Rinne der DNA gebunden vorliegen. Die bei den einzelnen Hybrid-Molekülen jeweils unterschiedlich langen, N-terminalen Linker bedingen dagegen variable Positionen des interkalierenden Naphthalimid-Ringsystems in der Interkalationskavität des Rezeptors.



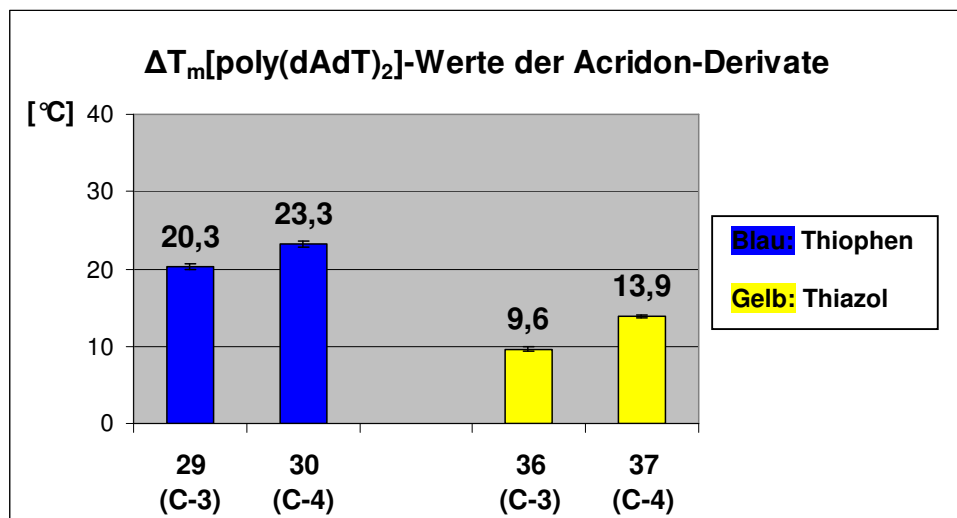
**Abb. 6.62:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Naphthalimid-gekoppelten Thiophen-pyrrolcarboxamide **22** (blaues Molekül), **23** (grünes Molekül), **24** (rotes Molekül) und **25** (gelbes Molekül) (*Alignment* durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

In Analogie zu den untersuchten Hybrid-Molekülen der Thiophen-Reihe, besitzt auch das Propionsäure-gekoppelte Thiazol-pyrrolcarboxamid **33** eine höhere DNA-Affinität als das homologe Derivat **34** (Abb. 6.61, Seite 256; Abb. 6.37, Seite 216). Aus der Betrachtung der mit diesen beiden Testverbindungen simulierten DNA-Ligand-Komplexe geht hervor, dass nur der C-3-Linker des Combilexins **33** eine Interkalation des Naphthalimid-Moleküls parallel zu den Basenpaaren der Interkalationskavität und gleichzeitig eine tiefe Einlagerung der rinnenbindenden Thiazol-pyrrol-Struktur in die kleine Furche der DNA ermöglicht (Abb. 6.55, Seite 243). In dem mit dem Hybrid-Molekül **34** gebildeten DNA-Ligand-Komplex liegen die beiden Heterozyklen und die C-terminale Dimethylaminopropyl-Seitenkette zwar in einer der DNA-Bindung des Deri-

vats **33** entsprechenden Weise an der DNA orientiert vor; das Naphthalimid-Ringsystem ist jedoch so in die Kavität eingelagert, dass der Interkalator mit der von dem Basenpaar „A606•T619“ gebildeten Ebene einen Winkel von ca. 15° einschließt. Die dadurch bedingte Störung des  $\pi$ - $\pi$ -Stacking der DNA-Basen mit dem interkalierenden Chromophor hat eine Schwächung der DNA-Affinität der Verbindung **34** zur Folge <sup>[72,78,274]</sup>. Da sich die beiden Thiazol-Derivate in ihrer DNA-Bindung allerdings nicht so deutlich voneinander unterscheiden wie dies bei den analogen Thiophen-Verbindungen **23** und **24** der Fall ist, wurde darauf verzichtet, den mit dem Combilexin **34** gebildeten DNA-Ligand-Komplex zusätzlich zur DNA-Bindung des Derivats **33** graphisch darzustellen.

Die aus den  $T_m$ -Wert-Messungen resultierenden, unterschiedlichen DNA-Affinitäten der Imidazol-haltigen Combilexine **38** (Naphthalimidpropionsäure-Derivat) und **39** (Naphthalimidbuttersäure-Derivat; Abb. 6.38, Seite 217) ließen sich auf der Basis der durchgeführten Docking-Simulationen zunächst nicht erklären (Abb. 6.56, Seite 244). Da die DNA-Ligand-Komplexe dieser beiden Verbindungen keine optisch wahrnehmbaren Unterschiede aufwiesen, wurden sie mit dem Programm HYPERCHEM <sup>[34]</sup> in weiterführenden Molecular-Modelling-Studien genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden bei den mit den Derivaten **38** und **39** gebildeten Komplexen jeweils die Imidazol-pyrrolcarboxamid-Struktur und die C-terminale Dimethylaminopropyl-Seitenkette des Liganden entfernt, um für beide Verbindungen ausschließlich die Komplexbildungsenergie, die auf die Interkalation des Naphthalimid-Moleküls zurückzuführen ist, ermitteln zu können. Aus den in HYPERCHEM <sup>[34]</sup> mit dem Kraftfeld AMBER <sup>[179,180]</sup> durchgeführten Berechnungen geht hervor, dass – in Analogie zu den Combilexinen der Thiophen- und der Thiazol-Reihe – das interkalierende Chromophor des Propionsäure-Derivats **38** energetisch günstiger in der Interkalationskavität des Rezeptors bindet als das Buttersäure-Analogon **39** (Verbindung **38**: -15,8 kcal/mol; Verbindung **39**: -12,3 kcal/mol). Dieses Ergebnis korreliert mit den für die Verbindungen **38** und **39** ermittelten  $T_m$ -Werten (Abb. 6.61, Seite 256).

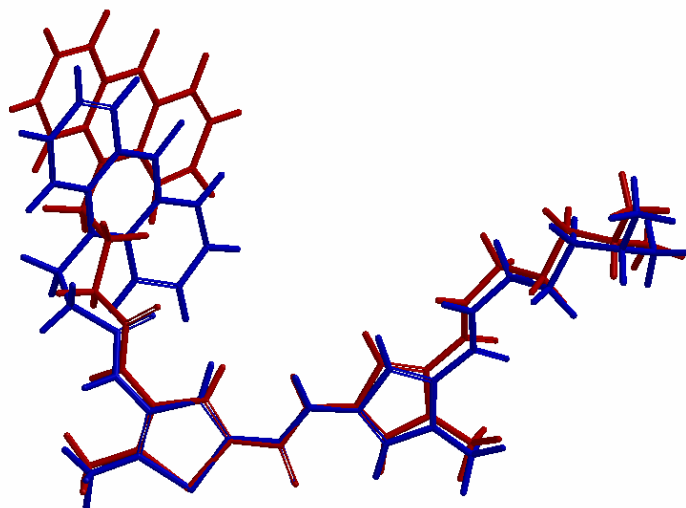
Aus den mit den Acridon-Derivaten **29**, **30**, **36** und **37** (Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.37, Seite 216) durchgeführten  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass sowohl bei den Combilexinen mit Thiophen-pyrrol-Struktur, als auch bei den Hybrid-Molekülen der Thiazol-Reihe, das Buttersäure-Derivat (Verbindung **30** bzw. **37**) eine höhere DNA-Affinität aufweist, als das entsprechende Propionsäure-Analogon (Verbindung **29** bzw. **36**; Abb. 6.63).



**Abb. 6.63:**  $\Delta T_m$ [poly(dAdT)<sub>2</sub>]-Werte der Acridon-gekoppelten Combilexine mit Thiophen- und Thiazol-pyrrolcarboxamid-Struktur

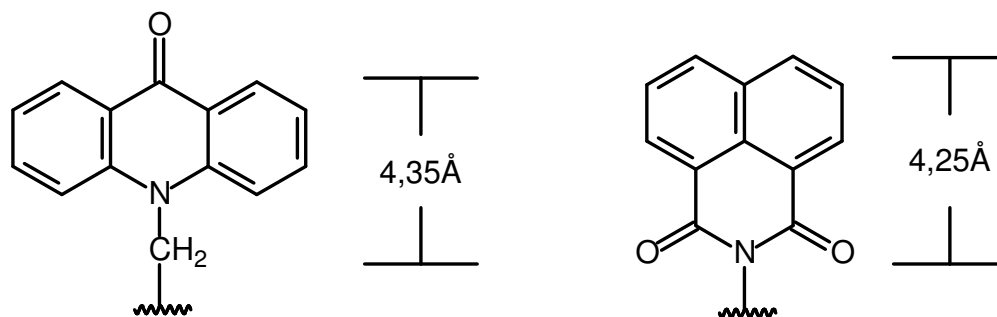
Zur Untersuchung des DNA-Bindemodus der Acridon-gekoppelten Hybrid-Moleküle, wurden DNA-Komplexe mit den beiden Thiophen-haltigen Combilexinen **29** und **30** simuliert (Abb. 6.53-6.54, Seiten 241-242). Dabei zeigte sich, dass der Acridon-Trizyklus der Buttersäure-Verbindung **30** parallel zu den Basenpaaren in der Kavität eingelagert vorliegt, während das Interkalator-Molekül des Propionsäure-Derivats **29** mit der von dem Basenpaar „A606•T619“ gebildeten Ebene einen Winkel von ca. 30° bildet. Dies hat – ebenso wie der Umstand, dass bei der DNA-Ligand-Komplexbildung des Hybrid-Moleküls **29** der rechte Benzol-Ring des interkalierenden Chromophors teilweise über die Ebene der DNA-Basen hinaus in die große Rinne geschoben wird – eine Schwächung des zwischen dem LUMO des Acridons und dem HOMO der Purin-Basen gebildeten Charge-Transfer-Komplexes zu Folge <sup>[72,78,274]</sup>. Diese bei der DNA-Bindung auftretende Störung des  $\pi$ - $\pi$ -Stacking bedingt sehr wahrscheinlich die im Vergleich zu dem Buttersäure-Derivat **30** geringere DNA-Aktivität der Propionsäure-Verbindung **29**.

In Abb. 6.64 sind die DNA-gebundenen Konformere der Acridon-gekoppelten Combilexine **29** und **30** vergleichend graphisch dargestellt. Wie bei den Naphthalimid-Verbindungen **22-25** (Abb. 6.62, Seite 259), weisen die Dimethylaminopropyl-Seitenkette und die Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur bei beiden Derivaten eine sehr ähnliche Orientierung in der kleinen Rinne der DNA auf, während die bei diesen Verbindungen jeweils unterschiedlich langen N-terminalen Linker variable Positionen des Acridon-Moleküls in der Interkalationskavität des Rezeptors bedingen.



**Abb. 6.64:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Acridon-gekoppelten Thiophen-pyrrolcarboxamide **29** (blaues Molekül), und **30** (rotes Molekül)  
(*Alignment* durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

Die Beobachtung, dass bei den Naphthalimid-gekoppelten Combilexinen ein Propionsäure-Linker, bei den Acridon-Derivaten dagegen ein C-4-Linker zu Verbindungen mit der jeweils höchsten DNA-Affinität führt, kann damit begründet werden, dass das an Position 10 Methyl-substituierte Acridon und der am Stickstoffatom unsubstituierte Naphthalimid-Trizyklus – bezogen auf eine Senkrechte zur Basenpaar-Trajektorie – nahezu die gleiche Molekül-Ausdehnung aufweisen (Abb. 6.65, Seite 263). Die Studien zur Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Linkers auf die DNA-Affinität der Combilexine zeigen, dass die Länge des Linkers, der das interkalierende Chromophor mit der rinnenbindenden Fünfring-Heteren-pyrrolcarboxamid-Struktur verknüpft, in Abhängigkeit von dem Aufbau des für die Synthese der Hybrid-Moleküle verwendeten Interkalators optimiert werden muss.

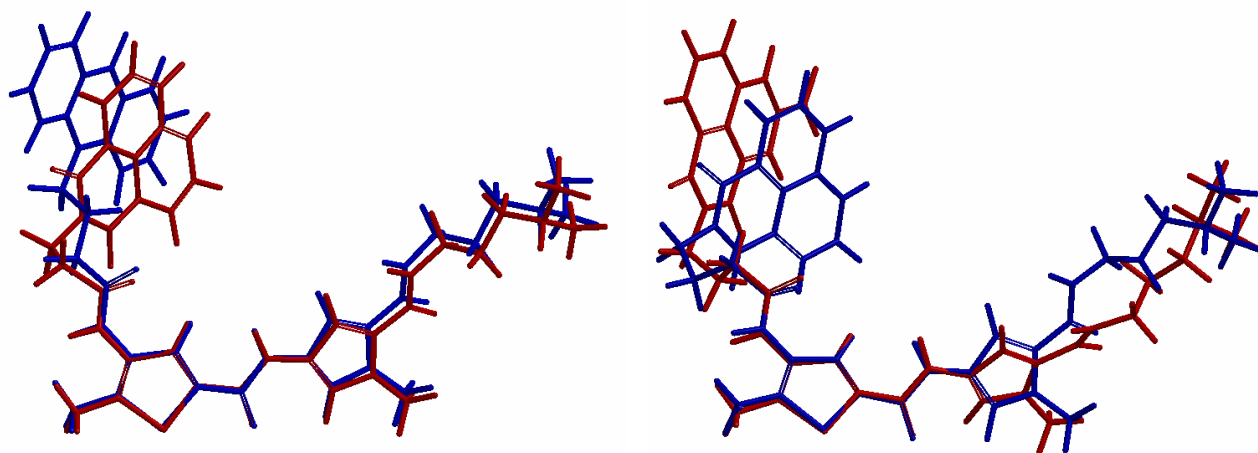


**Abb. 6.65:** Ausdehnung der eingesetzten Interkalator-Moleküle, bezogen auf eine Senkrechte zur Basenpaar-Trajektorie

Aus den mit der Substanzklasse der Combilexine durchgeführten Molecular Modelling-Simulationen geht hervor, dass der Einfluss des N-terminalen Linkers auf die DNA-Bindung der Hybrid-Moleküle, bei den mit den Thiophen-haltigen Testverbindungen gebildeten DNA-Ligand-Komplexen besonders deutlich erkennbar ist (Abb. 6.46-6.50, Seiten 234-238; Abb. 6.53-6.54, Seiten 241-242). Des Weiteren zeigen die  $T_m$ -Wert-Messungen, dass die für die Derivate der Thiophen-Reihe aufgestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen, auch auf die entsprechenden Verbindungen mit Thiazol- und Imidazol-Struktur übertragbar sind (Kapitel 6.3.2, Seite 219 ff.). Folglich können Docking-Studien mit Thiophen-pyrrolcarboxamid-Derivaten als Liganden dazu verwendet werden, die Linker-Länge, die für die Verknüpfung eines neuen Interkalator-Moleküls mit dem rinnenbindenden Strukturelement am besten geeignet ist, noch vor Beginn des Syntheseprozesses zu ermitteln ( $\rightarrow$  geeignetes Modell für Design und Synthese neuer Combilexine). Die von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> ( $\rightarrow$  mit dem Kraftfeld AMBER<sup>[179,180]</sup>) für die DNA-Bindung der sich jeweils nur in der N-terminalen Linker-Länge unterscheidenden Hybrid-Moleküle (z. B. Verbindungen **22-25**, **29** und **30**) berechneten Komplexbildungsenergien (Tab. 6.18, Seite 233) können dagegen nicht zur Formulierung von Struktur-Wirkungsbeziehungen herangezogen werden, da sie nicht mit den  $\Delta T_m$ -Werten der Testverbindungen korrelieren. Dies liegt hauptsächlich darin begründet, dass hydrophobe und Solvations-Effekte, die die mit Hilfe von *in vitro*-Testsystemen ermittelten DNA-Affinitäten der Liganden maßgeblich beeinflussen, bei den im Vakuum ablaufenden Molecular Modelling-Simulationen nur unzureichend berücksichtigt werden können<sup>[20,241]</sup>. Folglich sind *in silico*-Studien generell besser für die Vorhersage der möglichen Binde-

modi neuer Testverbindungen, als für die Kalkulation von Komplexbildungsenergien geeignet <sup>[59,281,282]</sup>.

Neben dem Einfluss der N-terminalen Linker-Länge auf die DNA-Bindung der Com-bilexine sollte auch untersucht werden, wie sich die verschiedenen, bei der Synthese der Hybrid-Moleküle verwendeten Interkalatoren (Acridon, Naphthalimid, 5-Nitro-naphthalimid) auf die DNA-Affinitäten der Testverbindungen auswirken. Den Aus-führungen auf den Seiten 262 und 263 betreffend der Linker-Länge, die für eine opti-male Verknüpfung der interkalierenden Struktur mit dem rinnenbindenden Molekülteil erforderlich ist, zur Folge, müssen zu diesem Zweck die Naphthalimidpropionsäure-Derivate der Thiophen-, der Thiazol- und der Imidazol-Reihe (Verbindungen **23**, **33** bzw. **38**) mit den analogen Acridonbuttersäure-Verbindungen (Verbindungen **30**, **37** bzw. **40**; Abb. 6.36-6.38, Seiten 214-217) verglichen werden (Abb. 6.66).



**Abb. 6.66:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere ver-schiedener Interkalator-gekoppelter Thiophen-pyrrolcarboxamide:  
Links: Vergleich der Naphthalimidpropionsäure-Verbindung **23** (rotes Molekül) mit der Acridonbuttersäure-Verbindung **30** (blaues Molekül)  
Rechts: Vergleich der Naphthalimidbuttersäure-Verbindung **24** (blaues Molekül) mit der Nitronaphthalimidbuttersäure-Verbindung **27** (rotes Molekül)  
(Alignment durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)

Die Stärke des bei einer interkalativen DNA-Bindung gebildeten Charge-Transfer-Komplexes hängt zum einen von der Größe des Überlappungsintegrals, das infolge der Überschneidung des HOMO der Purin-Basen und des LUMO des interkalieren-



den Chromophors gebildet wird, und zum anderen von der Differenz dieser beiden Orbital-Energien ab <sup>[72,78,274]</sup> (Kapitel 2.2.5, Seite 31 ff.). Aus diesem Grund werden die Molekülflächen der Interkalatoren und die LUMO-Energien ( $E_{\text{LUMO}}$ ) der Minimumskonformere der Testverbindungen (Kapitel 5.2.2, Seite 118) in die folgenden Überlegungen mit einbezogen.

Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass bei den Thiophen- und bei den Imidazol-Pyrrolcarboxamiden die Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Derivate und die analogen Acridonbuttersäure-Verbindungen nahezu die gleichen DNA-Affinitäten aufweisen (Vergleich der Verbindungen **23** und **30** bzw. Vergleich der Verbindungen **38** und **40**; Tab. 6.24, Seiten 267-268; Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.38, Seite 217). Dieses Ergebnis lässt sich auf der Basis der durchgeführten Molecular Modelling-Studien jedoch nur partiell begründen: Die beiden Interkalator-Moleküle besitzen zwar ähnlich große Molekülflächen (Naphthalimid: 200,7 Å<sup>2</sup>; Acridon: 213,12 Å<sup>2</sup>; berechnet in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit der semiempirischen AM1-Methode <sup>[184,185]</sup>), so dass das bei der Interkalation gebildete Überlappungsintegral, das durch Überschneidung des HOMO der Purin-Basen und des LUMO des jeweiligen Chromophors gebildet wird, ebenfalls annähernd gleich groß sein sollte. Die LUMO-Energien, die für die Naphthalimid-Verbindungen **23** und **38** berechnet wurden, sind allerdings niedriger als die der Acridon-Derivate **30** und **40** (Tab. 6.24, Seiten 267-268), so dass die von den Naphthalimid-gekoppelten Combilexinen gebildeten Charge-Transfer-Komplexe aufgrund der geringeren HOMO-LUMO-Differenz energetisch günstiger sein sollten. Wider Erwarten wirken sich die unterschiedlich hohen LUMO-Werte der beiden Interkalator-Moleküle jedoch nicht auf die mittels  $T_m$ -Wert-Messmethodik bestimmten DNA-Affinitäten der Testverbindungen aus.

Bedingt durch den -I/-M-Effekt des Substituenten weist das 5-Nitronaphthalimid eine, im Vergleich zu dem unsubstituierten Analogon, verringerte Elektronendichte im Molekül und, daraus resultierend, eine niedrigere LUMO-Energie auf (Kapitel 6.1.1.4, Seite 149 ff.). Durch Verstärkung des  $\pi$ - $\pi$ -Stacking zwischen den elektronenreichen Purin-Basen der DNA und dem elektronenarmen, interkalierenden Chromophor müssten die Nitronaphthalimid-Verbindungen folglich eine, bezogen auf die Naphthalimid-Derivate, gesteigerte DNA-Aktivität besitzen <sup>[72,78,274]</sup>. Für die Nitronaphthalimid-gekoppelten Combilexine der Thiophen-pyrrol- und der Bispyrrol-Reihe (Verbindung **27** bzw. **44**) wurden jedoch kleinere  $\Delta T_m$ -Werte ermittelt als für die entsprechenden Naphthalimidbuttersäure-Analoga (Verbindung **24** bzw. **43**; Tab. 6.24,

Seiten 267-268; Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.39, Seite 218). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Nitronaphthalimid-Verbindungen **27** und **44** einen N-terminalen C-4-Linker aufweisen und nicht den für die Verknüpfung des Naphthalimid-Moleküls mit der rinnenbindenden Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Struktur am besten geeigneten Propionsäure-Linker (Seite 262 ff.). Die im Vergleich zu den Naphthalimid-Verbindungen schwächeren DNA-Affinitäten der Nitronaphthalimid-Derivate sind also nicht notwendigerweise auf einen fehlenden Einfluss der LUMO-Energien auf die DNA-Ligand-Komplexbildung zurückzuführen; die geringeren DNA-Bindungsstärken können hypothetisch auch durch van der Waals-Abstoßungen zwischen der großvolumigen Nitro-Gruppe und den DNA-Basen der Interkalationskavität bedingt sein, die als Folge der durch die zusätzliche Methylen-Gruppe des Buttersäure-Linkers hervorgerufene Behinderung der Interkalation des 5-Nitronaphthalimid-Moleküls auftreten. Um definitiv beurteilen zu können, ob bei den Combilexinen der Thiophen- und der Bispyrrol-Reihe die Nitrierung des Naphthalimids über eine Absenkung der LUMO-Energie zu einer Steigerung der DNA-Affinität führt, müssten Nitronaphthalimidpropionsäure-gekoppelte Hybrid-Moleküle synthetisiert und deren  $\Delta T_m$ -Werte ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den untersuchten Testverbindungen mit Thiophen- und mit Imidazol-pyrrol-Struktur weist das Naphthalimidpropionsäure-Derivat der Thiazol-Reihe (Verbindung **33**) nicht nur eine niedrigere LUMO-Energie, sondern auch eine deutlich höhere DNA-Aktivität auf, als die analoge Acridonbuttersäure-Verbindung **37** (Tab. 6.24, Seiten 267-268; Abb. 6.37, Seite 216). Des Weiteren hat die mit einer Absenkung des LUMO-Wertes verbundene Nitrierung des Interkalators, eine im Vergleich zu dem Naphthalimidbuttersäure-Derivat **34** gesteigerte DNA-Affinität der Nitronaphthalimid-Verbindung **35** zur Folge. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass sich die LUMO-Energien der Thiazol-Derivate bei der DNA-Ligand-Komplexbildung aus einem noch unbekanntem Grund stärker auf die DNA-Aktivitäten der Testverbindungen auswirken, als dies bei den Interkalator-gekoppelten Thiophen-pyrrol-, Imidazol-pyrrol- und Bispyrrolcarboxamiden der Fall ist.

Wie schon bei den Interkalatoren beschrieben (Kapitel 6.1.1.4, Seite 152 ff.), beeinflussen die LUMO-Werte der Liganden möglicherweise indirekt über die Zuordnung entsprechender Atomtypen (Kapitel 4.1.1, Seite 90) die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> für die DNA-Komplexbildung der Combilexine berechneten Energien: Im Vergleich zu den Acridon-Derivaten wird – den Molecular Modelling-

Programmen gemäß – bei der DNA-Bindung der Naphthalimid-gekoppelten Hybrid-Moleküle mehr Energie freigesetzt; die höchste DNA-Affinität wird für die Nitronaphthalimid-Verbindung **44** vorhergesagt (Tab. 6.18, Seite 233; Abb. 6.39, Seite 218).

	$\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]^1$ [°C]	Interkalator/ Linkerlänge	$E_{\text{LUMO}}^2$ [eV]	Differenz $ \text{E}_{\text{HOMO}}(\text{A}) - \text{E}_{\text{LUMO}} ^2$ [eV]
<b>23</b>	$22,6 \pm 0,31$	Naphthalimid/ C-3	-1,61	7,16
<b>30</b>	$23,3 \pm 0,38$	Acridon/ C-4	-0,64	8,13
<b>24</b>	$17,4 \pm 0,30$	Naphthalimid/ C-4	-1,69	7,08
<b>27</b>	$12,6 \pm 0,35$	Nitronaphthalimid/ C-4	-2,34	6,43
<b>33</b>	$26,5 \pm 0,22$	Naphthalimid/ C-3	-1,67	7,10
<b>37</b>	$13,9 \pm 0,20$	Acridon/ C-4	-1,08	7,69
<b>34</b>	$4,7 \pm 0,18$	Naphthalimid/ C-4	-1,66	7,11
<b>35</b>	$6,9 \pm 0,27$	Nitronaphthalimid/ C-4	-2,26	6,51

**Tab. 6.24A:**  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werte und Moleküleigenschaften einiger Interkalator-gekoppelter Combilexine mit Thiophen-pyrrol- und mit Thiazol-pyrrol-Struktur

<sup>1</sup>:  $\Delta T_m$ -Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen  $\pm$  Standardabweichung

<sup>2</sup>: Durch semiempirische AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup> in SPARTAN<sup>[35]</sup> unter Berücksichtigung des Gesamtmoleküls ermittelt

<sup>3</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung) mit  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) = -8,77 eV ( $\rightarrow$  in SPARTAN<sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup> ermittelt)

	$\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]^1$ [°C]	Interkalator/ Linkerlänge	$E_{\text{LUMO}}^2$ [eV]	Differenz $ \text{E}_{\text{HOMO}}(\text{A}) - \text{E}_{\text{LUMO}} ^2$ [eV]
<b>38</b>	18,1 ± 0,17	Naphthalimid/ C-3	-1,52	7,25
<b>40</b>	18,0 ± 0,62	Acridon/ C-4	-0,60	8,17
<b>39</b>	12,8 ± 0,57	Naphthalimid/ C-4	-1,61	7,16
<b>43</b>	21,5 ± 0,05	Naphthalimid/ C-4	-1,64	7,13
<b>44</b>	18,9 ± 0,16	Nitronaphthalimid/ C-4	-2,31	6,46

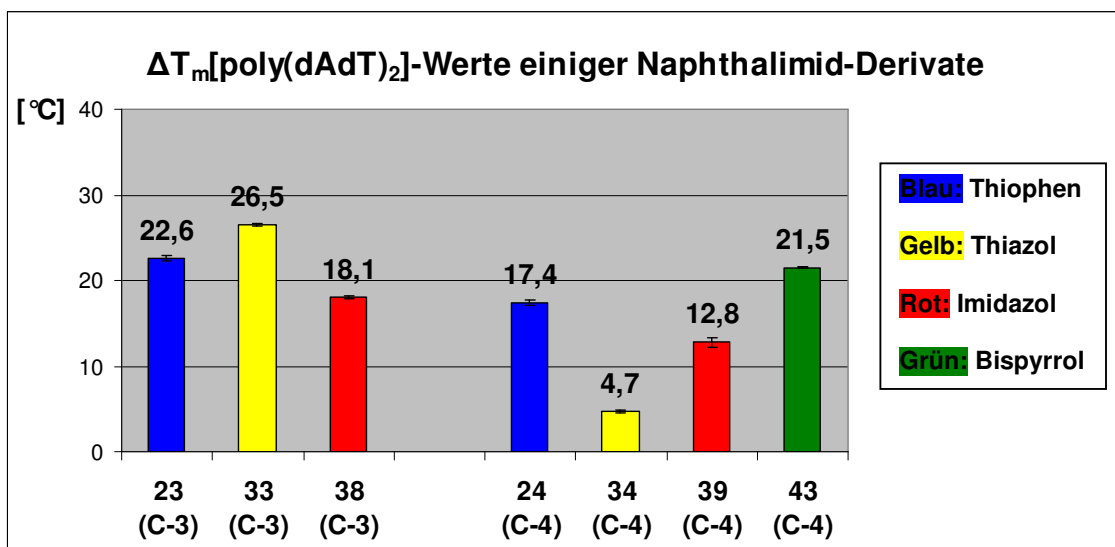
**Tab. 6.24B:**  $\Delta T_m[\text{poly}(\text{dAdT})_2]$ -Werte und Moleküleigenschaften einiger Interkalator-gekoppelter Combilexine mit Imidazol-pyrrol- und mit Bispyrrol-Struktur

<sup>1</sup>:  $\Delta T_m$ -Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung

<sup>2</sup>: Durch semiempirische AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup> in SPARTAN<sup>[35]</sup> unter Berücksichtigung des Gesamtmoleküls ermittelt

<sup>3</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung) mit  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) = -8,77 eV (→ in SPARTAN<sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung<sup>[184,185]</sup> ermittelt)

Zur Erweiterung der bereits erläuterten, sich mit dem Aufbau des Interkalators und des N-terminalen Linkers befassenden Struktur-Wirkungsbeziehungen, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die verschiedenen N-terminalen Fünfring-Heterozyklen, die zur Synthese des rinnenbindenden Molekülteils der Combilexine verwendet wurden, auf die DNA-Bindung der Hybrid-Moleküle haben. Zu diesem Zweck werden zunächst die Naphthalimidpropionsäure-Derivate mit Thiophen-pyrrol-, Thiazol-pyrrol- und Imidazol-pyrrol-Struktur (Verbindungen **23**, **33** und **38**) und anschließend das Naphthalimidbuttersäure-gekoppelte Bispyrrolcarboxamid **43**, sowie die bioisosteren Analoga **24**, **34** und **39** (Abb. 6.36-6.39, Seiten 214-218) näher betrachtet.



**Abb. 6.67:**  $\Delta T_m$ [poly(dAdT)<sub>2</sub>]-Werte der Naphthalimidpropionsäure- und der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine mit Thiophen-pyrrol-, Thiazol-pyrrol-, Imidazol-pyrrol- und Bispyrrol-Struktur

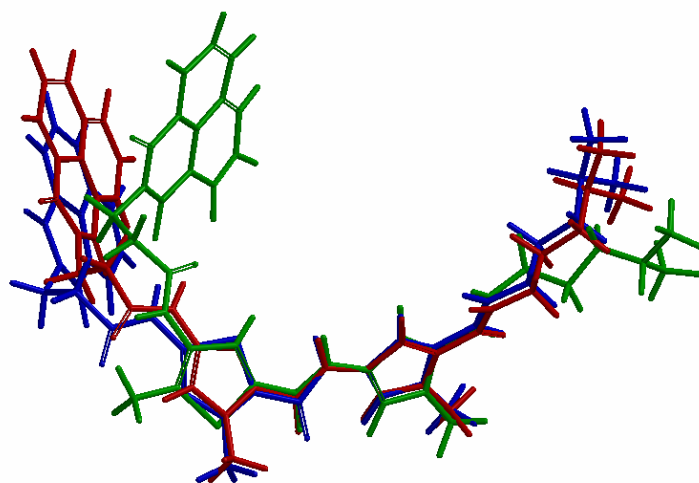
Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass die Thiazol-Verbindung **33** die höchste DNA-Affinität aller untersuchten Naphthalimidpropionsäure-Derivate aufweist (Abb. 6.67). Der im Vergleich zur Verbindung **33** kleinere  $\Delta T_m$ -Wert des Thiophen-Derivats **23** ist sehr wahrscheinlich auf die nur bei den Hybrid-Molekülen mit Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur auftretende Stellung der N-terminalen Amidbindung zurückzuführen (Kapitel 6.3.5, Seite 229 ff.): Im Gegensatz zur Leitsubstanz Netropsin und den Combilexinen der Thiazol-pyrrol-, der Imidazol-pyrrol- und der Bispyrrol-Reihe, ist die Carbonyl-Gruppe der N-terminalen, peptidischen Bindung bei den Thiophen-Derivaten der konkaven, die NH-Gruppe dagegen der konvexen Molekülseite zugewandt (Abb. 6.46-6.54, Seiten 234-242). Als Folge dieser strukturellen Besonderheit bindet das Thiophen-Derivat **23** an einen kürzeren DNA-Abschnitt als das analoge Hybrid-Molekül **33** (Abb. 6.47, Seite 235; Abb. 6.55, Seite 243). Dies bedingt eine Schwächung der DNA-Ligand-Interaktionen, da die bei der Komplexbildung zwischen Rezeptor und Combilexin ausgebildeten van der Waals-Wechselwirkungen folglich reduziert und weniger Wasser-Moleküle aus der kleinen Rinne verdrängt werden. Letzteres ist mit einer Verringerung der bei der DNA-Bindung auftretenden Entropie-Zunahme verbunden <sup>[20,23,42,63]</sup>. Dieser aus hydrophoben DNA-Ligand-Interaktionen resultierende Effekt wirkt sich zwar auf die Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Studien (wie  $T_m$ -Wert-Messung und Ethidiumbromid-Verdrängungsassay) aus, wird bei den im Vakuum ablaufenden Molecular

Modelling-Simulationen jedoch nicht in einem der Realität entsprechenden Ausmaß berücksichtigt <sup>[20,241]</sup>. Die besondere Konformation der N-terminalen Amidbindung (Abb. 6.44 Seite 230) und die damit verbundene, im Vergleich zur Thiazol-Verbindung **33** divergente DNA-Positionierung des Thiophen-Derivats **23** führt außerdem dazu, dass bei der Komplexbildung eine geringere Anzahl von Wasserstoff-Brücken zwischen Rezeptor und Ligand ausgebildet wird: In dem mit der Thiazol-Verbindung **33** simulierten Komplex sind alle amidischen Stickstoffatome sowie das quartäre Ammonium-Ion der aliphatischen Seitenkette an der Ausbildung von intermolekularen H-Brücken beteiligt, während bei der DNA-Bindung des Thiophen-Derivats **23** lediglich das N-Atom der C-terminalen Amidbindung und das protoniert vorliegende Stickstoffatom der Seitenkette als H-Brücken-Donatoren fungieren. Des Weiteren bedingt die Stellung der N-terminalen Amidbindung, dass bei der DNA-Ligand-Komplexbildung des Thiophen-Derivats **23** zwei Amidbindungen konformativ aus der Ebene der beiden Fünfring-Heterozyklen herausgedreht werden ( $\beta$ -1 und  $\beta$ -3 < 170°; Tab. 6.20A, Seite 247), um die Interkalation des Naphthalimid-Moleküls und die gleichzeitige Rinnenbindung der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur ermöglichen zu können. Die daraus resultierende, hohe Molekülspannung des DNA-gebundenen Konformers hat – ebenso wie die im Vergleich zur Thiazol-Verbindung **33** geringere Anzahl an intermolekularen Wasserstoff-Brücken im Komplex – eine Reduktion der DNA-Affinität des Thiophen-Derivats **23** zur Folge.

Der kleinste  $\Delta T_m$ -Wert aller untersuchten Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Combilexine wurde für die Imidazol-Verbindung **38** ermittelt (Abb. 6.67, Seite 269). Dennoch weist dieses Derivat bei der DNA-Ligand-Komplexbildung eine dem Thiazol-Analogon **33** entsprechende Orientierung an der DNA auf (Abb. 6.68, Seite 271, Abb. 6.55-6.56, Seiten 243-244), so dass sich aus den durchgeführten Docking-Studien nur wenige Erklärungsansätze für die vergleichsweise schwache DNA-Affinität der Imidazol-Verbindung **38** ableiten lassen: Bedingt durch seine negative Partialladung (Kapitel 6.1.2.3, Seite 161-162), wirkt sich das  $sp^2$ -hybridisierte, der konkaven Molekülseite zugewandte Stickstoffatom des Imidazol-Rings sehr wahrscheinlich störend auf die DNA-Bindung in der von AT-Basenpaaren gebildeten, elektronenreichen kleinen Rinne der DNA aus <sup>[45,67,69,109-111]</sup>. Außerdem baut das Thiazol-pyrrolcarboxamid **33** bei der DNA-Ligand-Komplexbildung vier, das Imidazol-Derivat **38** dagegen nur drei intermolekulare Wasserstoff-Brücken zu dem Rezeptor-Molekül

auf, was ebenfalls ein Grund für die im Vergleich zur Thiazol-Verbindung geringere DNA-Aktivität des Imidazol-Analogons sein könnte.

Die aus den  $T_m$ -Wert-Messungen resultierende, hohe DNA-Affinität des Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Thiazol-Derivats **33** korreliert mit den mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> (Rechenmethode: AMBER<sup>[179,180]</sup>) ermittelten Komplexbildungsenergien: Bei der DNA-Bindung dieses Hybrid-Moleküls wird, den verwendeten Molecular Modelling-Programmen zur Folge, ein größerer Energiebetrag freigesetzt, als bei der Komplexbildung der analogen Verbindungen **23** (Thiophenpyrrolcarboxamid) und **38** (Imidazol-pyrrolcarboxamid; Tab. 6.18, Seite 233). Die DNA-Bindungsstärken der beiden letztgenannten Derivate werden von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> allerdings unterschiedlich bewertet: Im Widerspruch zu den Resultaten der biophysikalischen Studien stuft ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> die Imidazol-Verbindung **38** als DNA-Ligand mit der im Vergleich zum Thiophen-Derivat **23** besseren DNA-Affinität ein; die mit HYPERCHEM<sup>[34]</sup> durchgeführten Berechnungen spiegeln dagegen die Ergebnisse der  $T_m$ -Wert-Messungen wider, indem für die DNA-Bindung des Thiophen-pyrrolcarboxamids **23** ein höherer Energiebetrag ermittelt wurde als für das Imidazol-Analogon **38**. Das mit Hilfe von Molecular Modelling-Simulationen erstellte Ranking der DNA-Affinitäten der Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Combilexine ist folglich von der verwendeten Rechenmethode abhängig.



**Abb. 6.68:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Naphthalimidpropionsäure-gekoppelten Combilexine mit Thiophenpyrrol- (Verbindung **23**, grünes Molekül), Thiazol-pyrrol- (Verbindung **33**, blaues Molekül) und Imidazol-pyrrol-Struktur (Verbindung **38**, rotes Molekül)

(Alignment durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

Innerhalb der Gruppe der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Hybrid-Moleküle besitzt das Bispyrrol-Derivat **43** (Abb. 6.39, Seite 218) die höchste DNA-Affinität (Abb. 6.67, Seite 269). Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten der durchgeführten Molecular Modelling-Studien: Den Programmen ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> gemäß, wird bei der Komplexbildung dieser Bispyrrol-Verbindung der im Vergleich zu den bioisosteren Combilexinen der Naphthalimid-Reihe (Thiophen-Verbindung **24**, Thiazol-Verbindung **34**, Imidazol-Verbindung **39**; Abb. 6.36-6.38, Seiten 214-217) größte Energiebetrag freigesetzt (Tab. 6.18, Seite 233). Auch die graphische Auswertung des mit dem Bispyrrol-Derivat **43** simulierten Komplexes lässt vermuten, dass es sich bei dieser Verbindung um einen sehr potenten DNA-Liganden handelt: Das interkalierende Chromophor wird bei der DNA-Bindung parallel zu den Basenpaaren in die Interkalationskavität eingeschoben, so dass ein störungsfreier Charge-Transfer-Komplex zwischen dem Naphthalimid-Molekül des Combilexins und den Purin-Basen der DNA aufgebaut werden kann <sup>[72,78,274]</sup>. Des Weiteren bildet die Bispyrrolcarboxamid-Struktur, die ein stark positives MEP ( $\rightarrow$  molekulares elektrostatisches Potential) auf der dem Rezeptor zugewandten, konkaven Molekülseite aufweist (Abb. 6.70B, Seite 276) und somit im Komplex tief in der kleinen Rinne eingelagert vorliegt, vier intermolekulare Wasserstoff-Brücken zur DNA aus (Abb. 6.57, Seite 245).

Das Thiazol-Derivat **34** wird in dem mit den Programmen ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> erstellten Ranking der DNA-Affinitäten der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Hybrid-Moleküle als zweitbesten DNA-Ligand eingestuft (Tab. 6.18, Seite 233). Diese Bewertung stimmt jedoch nicht mit den Ergebnissen der biophysikalischen Studien überein, da das Thiazol-pyrrolcarboxamid **34** die schwächste DNA-Bindungsstärke aller untersuchten Naphthalimidbuttersäure-Derivate aufweist (Abb. 6.67, Seite 269). Für diesen im Vergleich zu der analogen Naphthalimid-propionsäure-Verbindung **33** (Abb. 6.37, Seite 216) und dem zuvor beschriebenen Bispyrrol-Derivat **43** überraschend kleinen  $\Delta T_m$ -Wert der Verbindung **34**, lässt sich aus der graphischen Auswertung des mit diesem Thiazol-haltigen Combilexin simulierten Komplexes allerdings kein Erklärungsansatz ableiten: Zwischen der DNA und dem Liganden werden vier intermolekulare Wasserstoff-Brücken aufgebaut, wobei alle amidischen Stickstoffatome und das quartäre Ammonium-Ion der aliphatischen Seitenkette als H-Brücken-Donatoren fungieren. Außerdem wird die konkave Molekülseite der Thiazol-pyrrolcarboxamid-Struktur, die wie das Combilexin **43** ein deut-



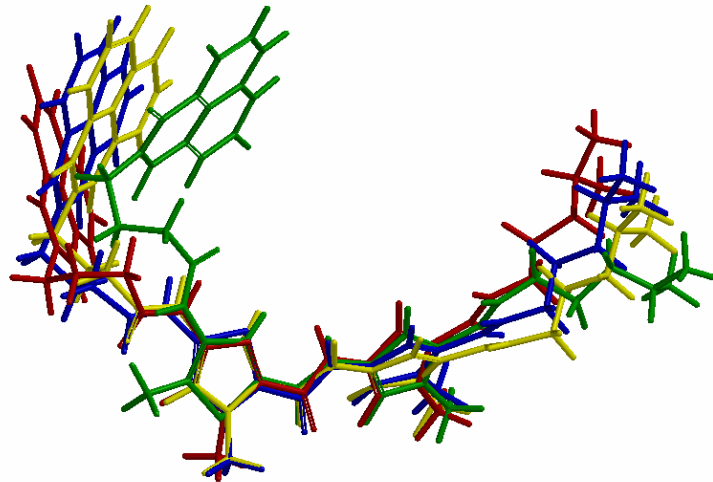
lich positives MEP aufweist (Abb. 6.70A, Seite 275), bei der DNA-Bindung des Derivats **34** tief in die kleine Rinne des Rezeptors eingelagert. Das interkalierende Chromophor liegt zwar, im Gegensatz zu den mit den Verbindungen **33** und **43** simulierten Komplexen, nicht vollkommen parallel zu den DNA-Basen in der Interkalationskavität vor; der Winkel, der von dem Naphthalimid-Molekül und der von dem Basenpaar „A606•T619“ gebildeten Ebene eingeschlossen wird, ist mit einem Wert von etwa 15° jedoch deutlich kleiner als der Winkel, der bei der DNA-Bindung des analogen Thiophen-Derivats **24** von dem Interkalator und dem Basenpaar gebildet wird. Dennoch wurde für das Thiophen-pyrrolcarboxamid **24** ein signifikant höherer  $\Delta T_m$ -Wert als für die Thiazol-Verbindung **34** ermittelt (Abb. 6.67, Seite 269). Zudem besitzen die DNA-gebundenen Konformere des Thiazol-Derivats und des eine hohe DNA-Affinität aufweisenden Bispyrrol-Analogons **43**, große strukturelle Ähnlichkeit (Abb. 6.69, Seite 275), so dass auch dieser Vergleich keine Begründung für die geringe DNA-Bindungsstärke des Thiazol-pyrrolcarboxamids **34** liefert.

Die auf das Bispyrrol-Derivat **43** bezogene, schwächere DNA-Aktivität der Thiophen-Verbindung **24** (Abb. 6.36, Seite 214) kann dagegen anhand des mit diesem bioisosteren Combilexin simulierten DNA-Ligand-Komplexes erklärt werden (Abb. 6.48, Seite 236): Das Naphthalimid-Molekül wird bei der DNA-Bindung des Derivats **24** nicht parallel zu den Basenpaaren in die Interkalationskavität eingelagert, so dass das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking des Interkalators mit den Basen der DNA gestört und, daraus resultierend, die DNA-Affinität herabgesetzt wird <sup>[72,78,274]</sup>. Des Weiteren bedingt die bei allen Derivaten der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Reihe auftretende, im Vergleich zu Netropsin und den Hybrid-Molekülen mit Thiazol-pyrrol-, Imidazol-pyrrol- und Bispyrrol-Struktur divergente Stellung der N-terminalen Amidbindung einige die DNA-Ligand-Interaktionen schwächende Effekte, die bereits bei den Naphthalimid-propionsäure-gekoppelten Combilexinen detailliert dargestellt wurden (→ Anzahl der intermolekularen H-Brücken ↓; Entropie-Zunahme bei der DNA-Ligand-Komplexbildung durch Wasserverdrängung <sup>[20,23,42,63]</sup> ↓; van der Waals-Wechselwirkungen ↓; Energie des DNA-gebundenen Konformers ↑; Seiten 269-270; Abb. 6.70A, Seite 275).

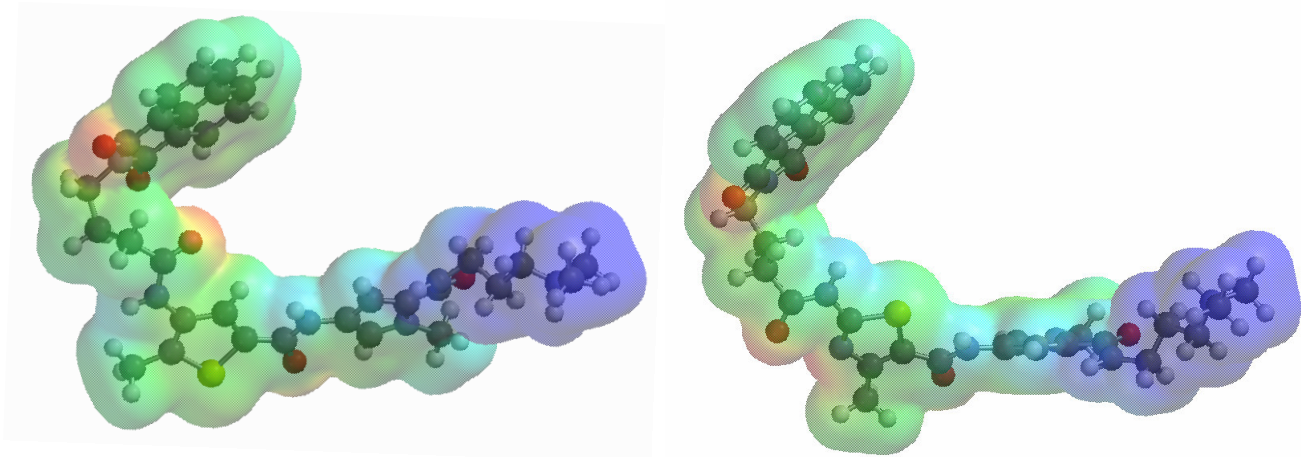
Der im Vergleich zur Bispyrrol-Verbindung **43** kleinere  $\Delta T_m$ -Wert des Imidazol-Derivats **39** (Abb. 6.38, Seite 217; Abb. 6.67, Seite 269) kann auf das der konkaven Molekülseite zugewandte Stickstoffatom des Imidazol-Rings, welches aufgrund seiner negativen Partialladung einen störenden Einfluss auf die Einlagerung der Imida-

zol-pyrrolcarboxamid-Struktur in die von AT-Basenpaaren gebildete, elektronenreiche kleine Rinne hat, zurückgeführt werden <sup>[45,67,69,109-111]</sup> (Abb. 6.70B, Seite 276).

In Analogie zu den untersuchten Hybrid-Molekülen der Naphthalimidpropionsäure-Reihe, stimmen die mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> (verwendete Rechenmethode: Kraftfeld AMBER <sup>[179,180]</sup>) für die Komplexbildung des Thiophen-Derivats **24** und der Imidazol-Verbindung **39** jeweils berechneten Energien nicht mit den Ergebnissen der biophysikalischen Studien überein (Tab. 6.18, Seite 233; Abb. 6.67, Seite 269): Den Molecular Modelling-Programmen zur Folge wird bei der DNA-Bindung des Thiophen-pyrrolcarboxamids **24**, welches den im Vergleich zum Derivat **39** größeren  $\Delta T_m$ -Wert aufweist, ein kleinerer Energiebetrag freigesetzt als bei der DNA-Ligand-Komplexbildung der analogen Imidazol-Verbindung. Die mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM <sup>[34]</sup> für die DNA-Bindung der verschiedenen Naphthalimidpropionsäure- und Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine (Verbindungen **23**, **24**, **33**, **34**, **38**, **39** und **43**) jeweils ermittelten Komplexbildungsenergien sind jedoch untereinander stimmig und spiegeln die Ergebnisse der graphischen Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe wider (Tab. 6.18, Seite 233; Abb. 6.47-6.48, Seiten 235-236; Abb. 6.55-6.57, Seiten 243-245). Die sich aus der Korrelation mit den  $\Delta T_m$ -Werten ergebenden Widersprüche sind sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei den im Vakuum ablaufenden Computersimulationen einige, die DNA-Affinität der Liganden bestimmende Effekte wie Entropie und Lösungsmittel-einflüsse, nur unzureichend berücksichtigt werden können <sup>[20,241]</sup>.



**Abb. 6.69:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine mit Thiophen-pyrrol- (Verbindung **24**, grünes Molekül), Thiazol-pyrrol- (Verbindung **34**, blaues Molekül), Imidazol-pyrrol- (Verbindung **39**, rotes Molekül) und Bispyrrol-Struktur (Verbindung **43**, gelbes Molekül)  
(Alignment durchgeführt in SPARTAN <sup>[35]</sup>)

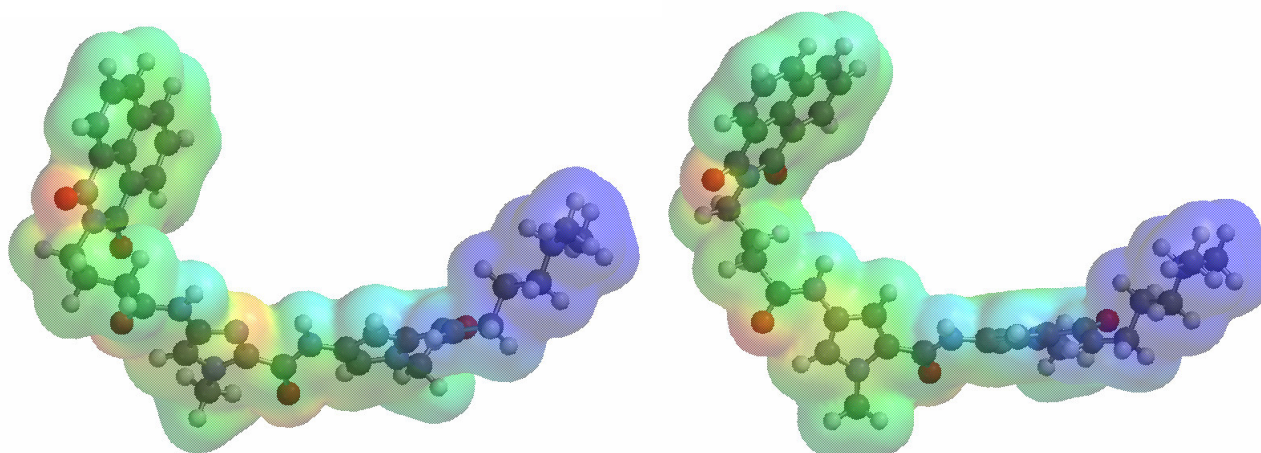


**Abb. 6.70A:** Molekulares elektrostatisches Potential der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine

Links: DNA-gebundenes Konformer der Thiophen-Verbindung **24**

Rechts: DNA-gebundenes Konformer der Thiazol-Verbindung **34**

[Berechnung des MEP in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von -50,0 kcal/mol bis +100,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an <sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht <sup>[25,197]</sup>]



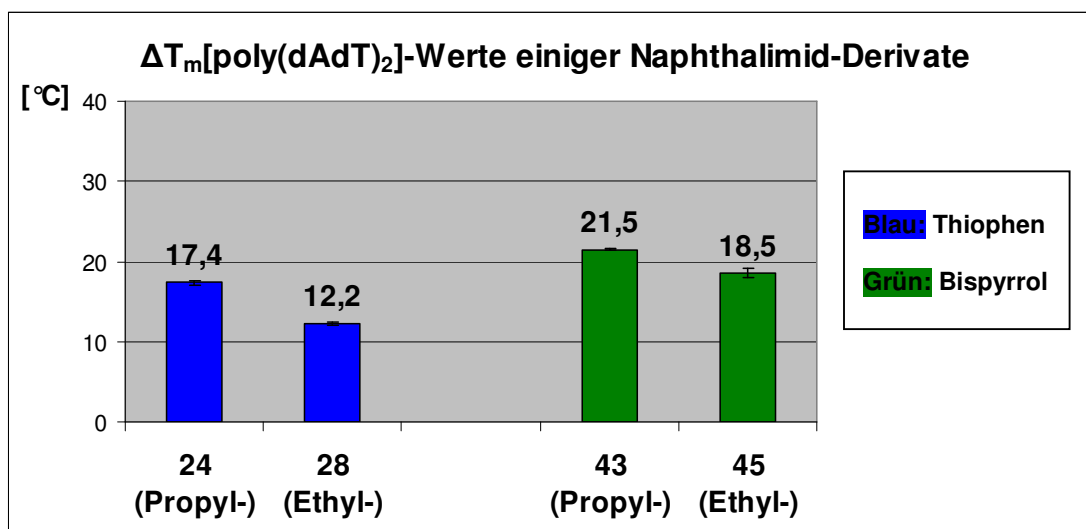
**Abb. 6.70B:** Molekulares elektrostatisches Potential der Naphthalimidbuttersäuregekoppelten Combiflexine

Links: DNA-gebundenes Konformer der Imidazol-Verbindung **39**

Rechts: DNA-gebundenes Konformer der Bispyrrol-Verbindung **43**

[Berechnung des MEP in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von -50,0 kcal/mol bis +100,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an <sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht <sup>[25,197]</sup>

Neben dem Einfluss, den die Struktur des interkalierenden Chromophors, die Länge des N-terminalen Linkers und der Aufbau des rinnenbindenden Fünfring-Hetarenpyrrolcarboxamid-Strukturelements jeweils auf die DNA-Affinität der Combiflexine ausüben, sollte auch untersucht werden, wie sich eine Verkürzung der C-terminalen Dimethylaminopropyl-Seitenkette auf die DNA-Bindungsstärke der Hybrid-Moleküle auswirkt. Zu diesem Zweck werden die Verbindungen der Thiophen-pyrrol- und der Bispyrrol-Reihe, die jeweils N-terminal mit Naphthalimidbuttersäure und C-terminal mit einer Propyl-Kette verknüpft sind (Verbindung **24** bzw. Verbindung **43**), mit den analogen, eine Ethyl-Seitenkette aufweisenden Derivaten verglichen (Verbindung **28** bzw. Verbindung **45**; Abb. 6.36, Seite 214; Abb. 6.39, Seite 218).

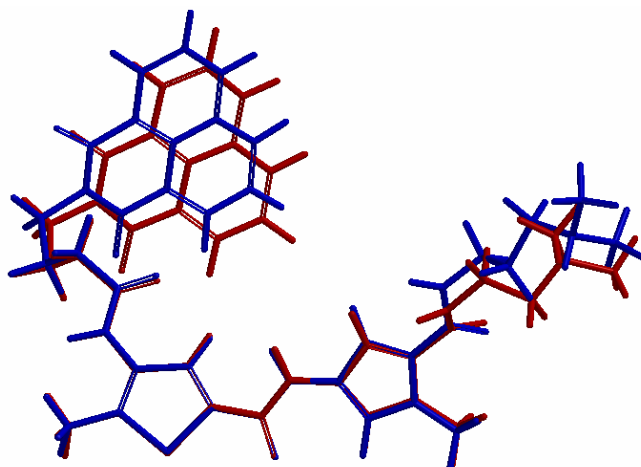


**Abb. 6.71:**  $\Delta T_m$ [poly(dAdT)<sub>2</sub>]-Werte der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine mit Thiophen-pyrrol- und mit Bispyrrol-Struktur, die C-terminal eine Propyl- bzw. eine Ethyl-Seitenkette aufweisen

Sowohl bei den Thiophen-pyrrol-, als auch bei den Bispyrrol-Derivaten, wurde für die Verbindung, die C-terminal mit einer Ethyl-Seitenkette substituiert ist, ein kleinerer  $\Delta T_m$ -Wert ermittelt als für das eine Propyl-Kette aufweisende Analogon (Abb. 6.71). Dieses Ergebnis kann anhand des mit dem Thiophen-Derivat **28** simulierten Komplexes begründet werden (Abb. 6.52, Seite 240): Wie bereits in Kapitel 6.3.5 (Seiten 251 ff.) dargestellt, entfallen mehr als 80% der bei der DNA-Bindung eines Combilexins insgesamt freiwerdenden Energie auf van der Waals-Wechselwirkungen zwischen DNA und Ligand, wobei mehr als 50% dieser Interaktionen auf die Beteiligung der aliphatischen Seitenkette zurückzuführen sind. Eine Verkürzung der C-terminalen Kette hat somit eine Reduktion der im Komplex ausgebildeten van der Waals-Wechselwirkungen und, daraus resultierend, eine Abnahme der DNA-Affinität zur Folge. Zudem kann das C-terminale, quartäre Ammonium-Ion bei der DNA-Bindung des Thiophen-Derivats **28**, aufgrund der kürzeren Seitenkette und der dadurch eingeschränkten Beweglichkeit, keine Wasserstoff-Brücke zum Rezeptor aufbauen. Die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> und HYPERCHEM<sup>[34]</sup> (verwendete Rechenmethode: AMBER<sup>[179,180]</sup>) ermittelten Komplexbildungsenergien korrelieren ebenfalls mit den Resultaten der biophysikalischen Studien: Den Molecular Modelling-Programmen zur Folge wird bei der DNA-Bindung des Derivats **24** (→ C-terminale Propyl-Kette) der im Vergleich

zu dem Hybrid-Molekül **28** (→ C-terminale Ethyl-Kette) größere Energiebetrag freigesetzt (Tab. 6.18, Seite 233).

In Abb. 6.72 sind die nach Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) und *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) vorliegenden Konformere der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Combilexine mit einer C-terminalen Dimethylaminopropyl- bzw. Dimethylaminoethyl-Seitenkette (Verbindung **24** bzw. Verbindung **28**; Abb. 6.36, Seite 214) vergleichend graphisch dargestellt. Die Betrachtung dieser Konformere zeigt, dass die Länge der Seitenkette die DNA-Bindung des Interkalators, des N-terminalen Linkers und der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur nur geringfügig beeinflusst: Im Gegensatz zur aliphatischen Amino-Kette selbst, die bei der Komplexbildung der Derivate **24** und **28** in Abhängigkeit der Kettenlänge jeweils etwas unterschiedlich in die kleine Rinne der DNA eingelagert wurde, weisen die zuvor erwähnten Molekülteile beider Konformere eine sehr ähnliche Orientierung an der DNA auf.



**Abb. 6.72:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere der Naphthalimidbuttersäure-gekoppelten Thiophen-pyrrolcarboxamide mit C-terminaler Dimethylaminopropyl-Kette (Verbindung **24**, blaues Molekül) und mit C-terminaler Dimethylaminoethyl-Kette (Verbindung **28**, rotes Molekül)

(Alignment durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)

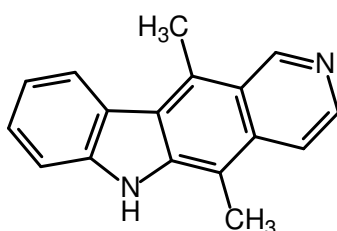
## 6.4 Hetaren[a]carbazol-Derivate

### 6.4.1 Einleitung und Zielsetzung

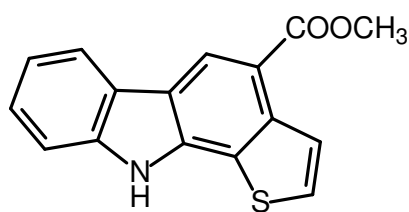
Die im Arbeitskreis *Pindur* entwickelten Pyrido- und Thieno[a]carbazol-Derivate stellen Struktur-Analoga des in Apocynaceae-Arten (z. B. *Ochrosia elliptica*, *Ochrosia moorei*) natürlich vorkommenden, sekundären Pflanzeninhaltsstoffs Ellipticin dar <sup>[91-93]</sup> (Abb. 6.73, Seiten 280-281; Kapitel 2.3.1, Seiten 38). Dieses Alkaloid ist antineoplastisch wirksam gegen Leukämie-, Melanom- und Kolonkarzinom-Zelllinien, indem es mit pleiotropen zellulären Targets interagiert <sup>[91-93]</sup>: Neben der interkalativen DNA-Bindung, die chromosomale Abnormalitäten und eine Unterbrechung des Zellzyklus zur Folge hat, modifiziert Ellipticin die Aktivität einiger für die DNA-Replikation und DNA-Transkription wichtigen Enzyme (u. a. Topoisomerase I und II, Telomerase, DNA-Polymerase, RNA-Methylase) <sup>[91-93]</sup>. Zudem reichert sich das Alkaloid in mitochondrialen Membranen an, wo es eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung verursacht <sup>[92]</sup>. Allerdings ist eine klinische Anwendung des Ellipticins nicht möglich, da die Substanz sehr lipophil ist und zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. Hämolyse, Granulozytopenie, Hypotension und Nierenschäden hervorruft <sup>[91-93]</sup>. Aus diesem Grund richtet sich der Fokus auf die Entwicklung von Ellipticin-Analoga, die eine bessere Wasserlöslichkeit und ein günstigeres Nutzen-Risiko-Profil aufweisen.

Die von *Lemster* <sup>[39]</sup> im Arbeitskreis *Pindur* synthetisierten Pyrido- und Thieno[a]carbazol-Derivate (Abb. 6.73, Seiten 280-281) sollten auf ihre DNA-bindenden Eigenschaften untersucht werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen für diese viel versprechende, Ellipticin-analoge Substanzklasse aufstellen zu können. Dazu wurden die DNA-Affinitäten der Carbazol-Verbindungen *in vitro* unter Anwendung der  $T_m$ -Wert-Messmethodik ermittelt. Zur Verifizierung der aus diesen biophysikalischen Experimenten resultierenden Ergebnisse sollte zudem die DNA-Bindekonstante eines Carbazol-Derivats bestimmt werden, wozu der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eingesetzt wurde. Ergänzend wurden Molecular Modelling-Studien mit zwei Vertretern der Pyrido[a]carbazol-Reihe durchgeführt, wobei zunächst, mit Hilfe der in dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup> enthaltenen Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.), lokale Minimumskonformere der ausgewählten Testverbindungen simuliert wurden. Zum einen dienten diese energiearmen Konformere als Basis zur Berech-

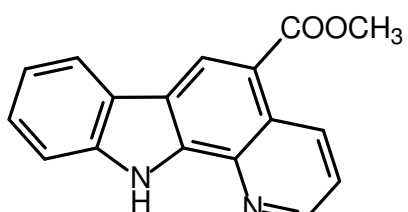
nung einiger, potentiell die DNA-Aktivität der Carbazol-Derivate beeinflussenden, Moleküleigenschaften [u. a. molekulares elektrostatisches Potential (Kapitel 4.1.2, Seite 96), Grenzorbitalenergien, Dipolmoment). Zum anderen wurden die Minimumskonformere an ein Undekanukleotid (PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1G3X <sup>[80]</sup>) gedockt, um Aussagen über die Orientierung des tetrazyklischen Chromophors in der Interkalationskapazität der DNA machen zu können. Abschließend wurde in Topoisomerase I-Hemmtests untersucht, ob die Hetaren[a]annelierten Carbazole die Aktivität dieses – für die DNA-Replikation und Transkription wichtigen – Enzyms herabsetzen können.



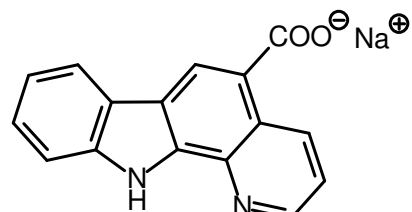
**Ellipticin**



**46**



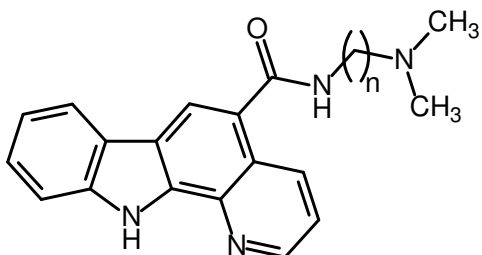
**47**



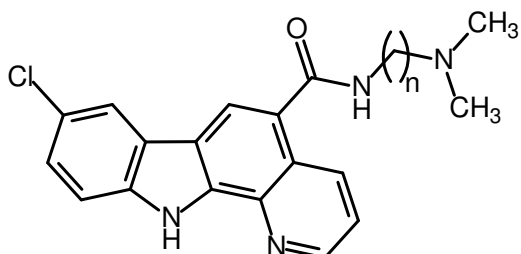
**48**

**Abb. 6.73A:** Strukturformel des Ellipticins und Strukturformeln der untersuchten Hetaren[a]carbazol-Derivate

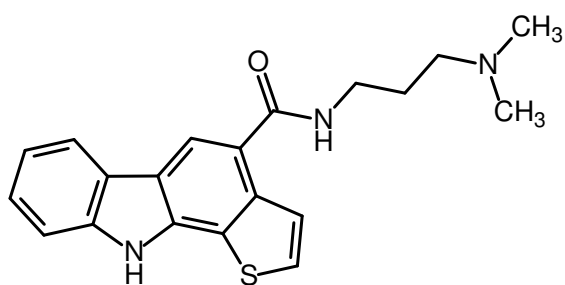




	n
<b>49</b>	2
<b>50</b>	3



	n
<b>51</b>	2
<b>52</b>	3



**53**

**Abb. 6.73B:** Strukturformeln der untersuchten Hetaren[a]carbazol-Derivate, die mit basischen Seitenketten substituiert sind

## 6.4.2 T<sub>m</sub>-Wert-Messungen

Die aus den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen (Kapitel 3.4.1, Seite 64 ff.) resultierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sollten direkt in das Design und die Synthese neuer Carbazol-Derivate mit potentiell höherer DNA-Bindungsstärke mit einbezogen werden. Aus diesem Grund wurden die DNA-Affinitäten der Pyrido- und Thieno[a]carbazol-Verbindungen **46-53** (Abb. 6.73, Seiten 280-281) direkt im Anschluss an ihre Darstellung ermittelt, wobei eine synthetische, nur aus alternierend angeordneten AT-Basensequenzen aufgebaute DNA [→ „poly(dAdT)<sub>2</sub>“-DNA] als Matrize für diese biophysikalischen Studien verwendet wurde. Die ΔT<sub>m</sub>-Werte der Carbazol-Derivate sind in Tab. 6.25 aufgeführt.

	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>
ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	n. m.	n. a.	n. a.	19,7 ± 0,49
	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>
ΔT <sub>m</sub> [poly(dAdT) <sub>2</sub> ] [°C]	18,5 ± 0,54	24,5 ± 0,54	26,4 ± 0,84	19,0 ± 0,33

**Tab. 6.25:** ΔT<sub>m</sub>-Werte der untersuchten Pyrido- und Thieno[a]carbazol-Derivate  
(ΔT<sub>m</sub>-Werte: Mittelwerte aus mindestens drei Messungen ± Standardabweichung)

n. m.: ΔT<sub>m</sub>-Wert ist nicht messbar, die Verbindung ist im eingesetzten Puffermedium unlöslich

n. a.: Substanz bindet nicht an die DNA, ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] ≤ 1 °C

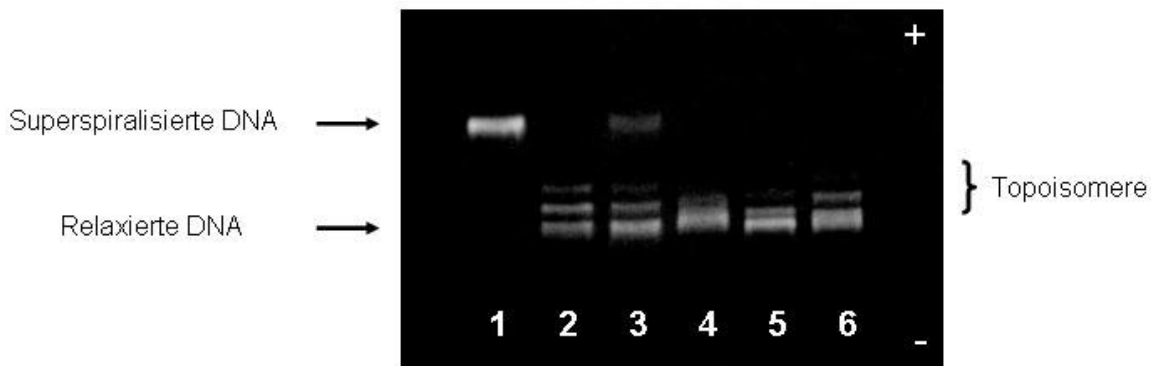
Der ΔT<sub>m</sub>-Wert des Thieno[a]carbazols **46** (Abb. 6.73A, Seite 280) konnte nicht ermittelt werden, da das Derivat aufgrund der Methylester-Funktion und des in dem Molekül enthaltenen Schwefelatoms zu lipophil ist, um in dem für die Messungen eingesetzten, wässrigen Puffermedium (pH-Wert = 7,1) ausreichend löslich und somit den Affinitätsbestimmungen zugänglich zu sein. Die Wasserlöslichkeit der schwefelhaltigen Verbindungen lies sich durch Austausch der Ester-Gruppe des Derivats **46** gegen die bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegende Dimethylaminopropylcarboxamid-Seitenkette jedoch erheblich steigern, so dass mit dem resultierenden Thieno[a]carbazol **53** (Abb. 6.73B, Seite 281) T<sub>m</sub>-Wert-Messungen durchgeführt werden konnten (Tab. 6.25).

Die Einführung einer amidischen Seitenkette ist allerdings nicht nur mit einer Erhöhung der Hydrophilie, sondern auch mit einer signifikanten Verbesserung der DNA-bindenden Eigenschaften der Carbazol-Derivate verbunden: Im Gegensatz zu den Pyridin-haltigen Verbindungen mit Methylester- bzw. Natriumcarboxylat-Funktion (Verbindung **47** bzw. **48**), die keine detektierbare DNA-Aktivität aufweisen, binden die Derivate mit Dimethylaminoethyl- bzw. -propyl-Seitenkette (Verbindung **49** bzw. **50**; Abb. 6.73, Seiten 280-281) mit einer hohen Affinität an die DNA. Bislang kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, welche Kettenlänge eine optimale DNA-Ligand-Interaktion der Hetaren[*a*]anellierten Carbazole bewirkt: Bei den chlorierten Pyrido[*a*]carbazol-Derivaten (Verbindungen **51** und **52**) besitzt die Verbindung mit der Propyl-Kette, bei den unsubstituierten Analoga (Verbindungen **49** und **50**; Abb. 6.73B, Seite 281) dagegen das Derivat mit der Ethyl-Seitenkette die jeweils höhere DNA-Aktivität (Tab. 6.25, Seite 282).

Allerdings geht aus den mit den vier Pyridin-haltigen Verbindungen **49-52** durchgeführten  $T_m$ -Wert-Messungen eindeutig hervor, dass die DNA-Affinität der Carbazole, unabhängig von der Länge der bei der Synthese verwendeten amidischen Seitenkette, durch die Einführung eines Chlor-Substituenten an Position 8 des Tetrazyklus, deutlich gesteigert werden kann. Zudem zeigt ein Vergleich der beiden Derivate **50** und **53**, die sich nur in dem Aufbau des jeweils mit der Carbazol-Struktur anellierten Heterozyklus unterscheiden (Verbindung **50**: Pyrido[*a*]carbazol; Verbindung **53**: Thieno[*a*]carbazol; Abb. 6.73B, Seite 281), dass der Pyridin-Ring ohne signifikante Änderung der DNA-Affinität nach dem Bioisosterie-Prinzip gegen ein Thio-phen-Molekül ausgetauscht werden kann (Tab. 6.25, Seite 282).

### 6.4.3 Topoisomerase I-Hemmtest

Da die Ellipticin-analogen, Hetaren[*a*]anellierten Carbazol-Verbindungen die Aktivität der für die DNA-Replikation und Transkription essentiellen Topoisomerase I möglicherweise herabsetzen können, wurden TOPO I-Hemmassays durchgeführt (Kapitel 3.4.2, Seite 70 ff.). Hierbei diente das als Bis-hydrochlorid vorliegende Pyrido[*a*]carbazol-Derivat **50** (Abb. 6.73B, Seite 281) als Testsubstanz. Die chlorierten Derivate **51** und **52** konnten nicht untersucht werden, da sie nicht in hydrochloridischer Form zur Verfügung standen und somit unter den Testbedingungen nicht ausreichend löslich waren.



**Abb. 6.74:** Gelelektropherogramm des mit der Verbindung **50** durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests

(*Spur 1:* Plasmid-DNA pUC19; *Spur 2:* Plasmid-DNA+Topoisomerase I → vollständige Relaxierung des Plasmids; *Spur 3:* Camptothecin 20  $\mu\text{M}$  → konzentrationsabhängige Hemmung der TOPO I; *Spur 4:* **50** 50  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung, da vollständige Relaxierung des Plasmids; *Spur 5:* **50** 20  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung; *Spur 6:* **50** 5  $\mu\text{M}$  → keine Hemmung)

Aus dem Gelelektropherogramm des mit dem Pyrido[*a*]carbazol **50** durchgeführten Topoisomerase I-Hemmtests geht hervor, dass die Verbindung bei keiner der im Assay eingesetzten Substanzkonzentrationen eine Enzymhemmung bewirken kann: In Analogie zur Negativkontrolle (*Spur 2*) liegt bei den, das Derivat **50** enthaltenden Reaktionsansätzen (*Spuren 4-6*), nach der Inkubationszeit keine superspiralisierte DNA mehr vor (Abb. 6.74). Dies bedeutet, dass das Enzym die gesamte Plasmid-DNA mittels Einzelstrangbrüchen relaxieren konnte, so dass die Aktivität der Topoisomerase I durch die Zugabe der Carbazol-Verbindung folglich nicht reduziert worden ist.

Bei dem als Referenzsubstanz verwendeten Alkaloid Camptothecin, handelt es sich dagegen um ein potentes Topoisomerase I-Gift, das durch Stabilisierung des kovalenten Komplexes aus Enzym und DNA (*Cleavable Complex*) die vollständige Relaxation der Plasmid-DNA verhindert <sup>[47,50-56]</sup> (Kapitel 2.1.2, Seite 23 ff.). Dies ist an der bei Camptothecin vorkommenden Bande für superspiralisierte DNA zu erkennen, deren Auftreten demzufolge das Vorhandensein von enzymhemmenden Eigenschaften anzeigt <sup>[47]</sup> (*Spur 3*; Kapitel 3.4.2.1, Seite 70 ff.).

Aufgrund des Testprinzips des hier beschriebenen Topoisomerase I-Hemmtests (Auftreten der Bande für superspiralisierte DNA  $\Rightarrow$  Testsubstanz besitzt enzymhemmende Eigenschaften) konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der mit dem Pyrido[*a*]carbazol **50** durchgeführte Test durch den interkalativen DNA-

Bindemodus des Derivats, im Sinne eines falsch negativen Testergebnisses gestört worden sein könnte <sup>[47,49,56]</sup> (nach der Inkubationszeit ist aufgrund der Enzymhemmung noch superspiralisierte Plasmid-DNA im Reaktionsansatz vorhanden → Testsubstanz interkaliert zwischen die Basenpaare dieser DNA → Aufwindung der DNA → im Gelelektropherogramm ist nur die Bande für relaxierte DNA erkennbar ⇒ Testergebnis falsch negativ; Kapitel 3.4.2.1, Seite 72 ff.). Aus diesem Grund wurde die Carbazol-Verbindung zusätzlich mittels der am I.N.S.E.R.M. in Lille, Frankreich, etablierten Assay-Systeme (u. a. Topoisomerase I-Footprinting Assay, Topoisomerase I-Hemmtest mit Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gelen; Kapitel 3.4.2.1, Seite 74 ff.) auf eventuell vorhandene, enzymhemmende Eigenschaften getestet. Aus den in Frankreich durchgeführten Studien geht jedoch ebenfalls hervor, dass das Derivat die Aktivität der Topoisomerase I nicht herabsetzen kann, so dass das hier beschriebene Testergebnis bestätigt werden konnte.

#### 6.4.4 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

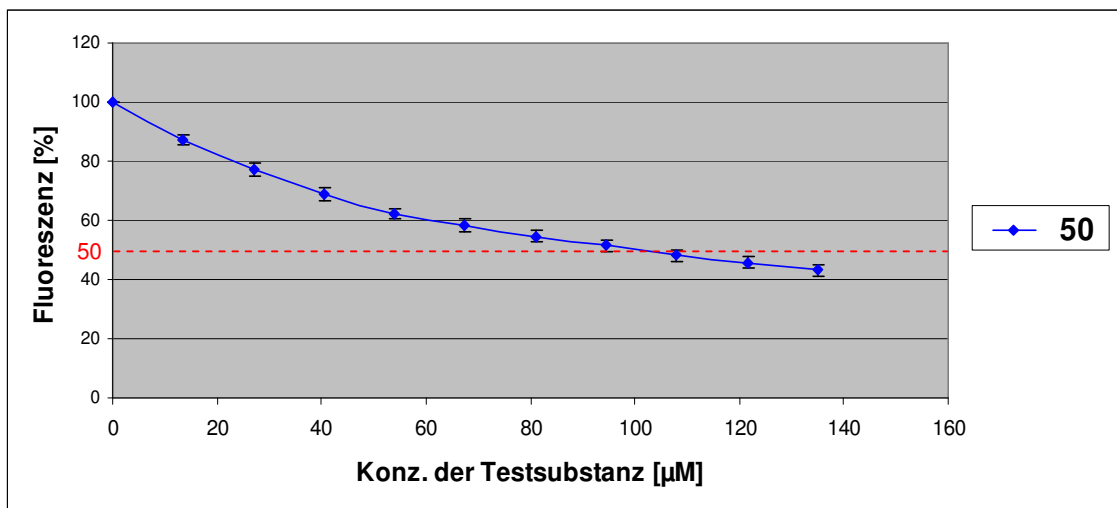
Unter Anwendung des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays sollte die DNA-Bindekonstante eines Hetaren[a]nelierten Carbazol-Derivats bestimmt werden, um die aus den  $T_m$ -Wert-Messungen abgeleiteten Aussagen über die DNA-Affinitäten der Carbazol-Verbindungen zu verifizieren (Kapitel 3.4.3, Seite 80 ff.). Für diese biophysikalischen Studien wurde die Verbindung **50** (Abb. 6.73B, Seite 281) als Testsubstanz ausgewählt, da sie als Salz (in Form des Bis-Hydrochlorids, Abb. 6.76, Seite 288) zur Verfügung stand, so dass eine ausreichende Löslichkeit des Derivats in dem für den Test verwendeten, wässrigen Puffermedium gewährleistet werden konnte.

Die Bindekonstante wurde ermittelt, indem der aus der Messung der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme (Abb. 6.75, Seite 286) resultierende  $C_{50}$ -Wert (→ Konzentration der Testverbindung, die eine 50%-ige Fluoreszenzabnahme bewirkt) zur Berechnung von  $K_{app}$  (*Apparent Binding Constant* <sup>[164]</sup>) in die unten aufgeführte *Wellman'sche* Gleichung <sup>[47,164]</sup> (Seite 286) eingesetzt wurde (Tab. 6.26, Seite 286).

Wellman'sche Gleichung <sup>[47,164]</sup>:

$$K_{\text{EtdBr}}[\text{EtdBr}] = K_{\text{app}}[\text{Ligand}]$$

- Mit:**  $K_{\text{EtdBr}}$ : Bindekonstante von Ethidiumbromid <sup>[164]</sup>( $\rightarrow 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )  
 $[\text{EtdBr}]$ : im Assay eingesetzte Ethidiumbromid-Konzentration <sup>[47,165]</sup>  
( $\rightarrow 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ )  
 $K_{\text{app}}$ : DNA-Bindekonstante der getesteten Verbindung (in  $\text{M}^{-1}$ )  
 $[\text{Ligand}]$ : Konzentration des Liganden, die zu einer 50%-igen Fluoreszenzabnahme führt ( $C_{50}$ ; in M)



**Abb. 6.75:** Darstellung der bei der Testung des Pyrido[a]carbazol-Derivats **50** gemessenen, konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme

	$C_{50}$ [µM]	Bindekonstante $K_{\text{app}}^1$ [ $\text{M}^{-1}$ ]
<b>50</b>	101,3	$1,2 \times 10^5$

**Tab. 6.26:**  $C_{50}$ -Wert und Bindekonstante des Pyrido[a]carbazol-Derivats **50**

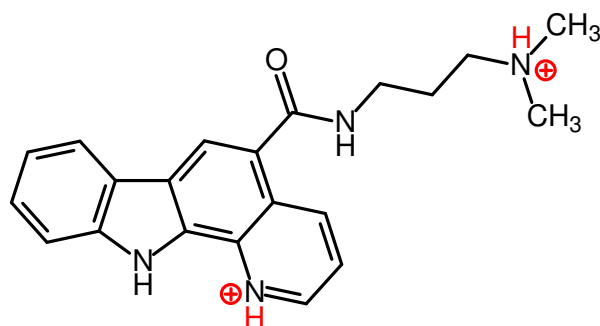
<sup>1</sup>:  $K_{\text{app}}$  berechnet mit der Wellman'schen Gleichung <sup>[164]</sup>

Sowohl aus der für das Pyrido[*a*]carbazol **50** berechneten Bindekonstante ( $K_{\text{app}} = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; Tab. 6.26, Seite 286) als auch aus dem zuvor ermittelten  $\Delta T_m$ -Wert der Verbindung ( $\Delta T_m[\text{poly(dAdT)}_2] = 18,5^\circ\text{C}$ ; Tab. 6.25, Seite 282) geht hervor, dass das getestete Derivat eine gute bis zufrieden stellende DNA-Affinität besitzt. Folglich besteht auch bei den Carbazol-Verbindungen die bereits bei den Combilexinen (Kapitel 6.3.4, Seite 228) beschriebene Korrelation zwischen den Ergebnissen der  $T_m$ -Wert-Messungen und denen des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays. Dieses Resultat verdeutlicht, dass die  $T_m$ -Wert-Messung als schnelle und zuverlässige Methode der DNA-Affinitätsbestimmung dazu geeignet ist, das Design und die Synthese neuer DNA-Liganden zu begleiten und zu beeinflussen. Zudem bestätigt die gute Bindekonstante des Derivats **50** die Hypothese, dass es sich bei den Ellipticin-analogen, Hetaren[*a*]anellierten Carbazolen um eine Erfolg versprechende Substanzklasse auf der Suche nach neuen anticancerogenen Verbindungen handelt.

#### 6.4.5 Molecular Modelling-Studien

Das mit einer Dimethylaminopropylcarboxamid-Seitenkette substituierte Pyrido[*a*]carbazol-Derivat **50** und das chlorierte Analogon **52** (Abb. 6.73B, Seite 281) wurden in den ergänzend zu den *in vitro*-Experimenten durchgeführten Molecular Modelling-Studien als Testverbindungen eingesetzt. Da keine Kristallstrukturen der ausgewählten Derivate zur Verfügung standen, wurden zunächst, mit Hilfe des in dem Programm SPARTAN<sup>[35]</sup> enthaltenen Baukastensystems<sup>[197]</sup>, dreidimensionale Computermodelle dieser Carbazol-Verbindungen konstruiert. Diese Modelle wurden anschließend unter Verwendung der ebenfalls in SPARTAN<sup>[35]</sup> implementierten Konformeranalyse (Kapitel 5.2.2, Seite 118 ff.) energieminiert. Auf der Basis dieser Minimumskonformere wurden, als potentiell die DNA-Aktivität der Carbazol-Derivate beeinflussende Moleküleigenschaften, das molekulare elektrostatische Potential (MEP; Kapitel 4.1.2, Seite 96; Kapitel 6.1.1.3, Seite 151 ff.) und das Dipolmoment<sup>[91]</sup> der Verbindungen **50** und **52** berechnet ( $\rightarrow$  unter Anwendung der semiempirischen AM1-Methode<sup>[184,185]</sup>; Kapitel 5.2.2, Seite 127). Da es sich bei den [*a*]anellierten Carbazolen um Interkalatoren handelt, deren DNA-Affinitäten zudem von der Stärke des zwischen DNA und Ligand ausgebildeten Charge-Transfer-Komplexes und somit von der Differenz zwischen der LUMO-Energie  $E_{\text{LUMO}}$  des interkalierenden Chromo-

phors und der HOMO-Energie  $E_{\text{HOMO}}$  der Purin-Basen abhängig sind, wurden außerdem die Grenzorbital-Energien der Minimumskonformere ermittelt. Die Molecular Modelling-Studien wurden dabei mit den biskationischen Formen der Testverbindungen durchgeführt, da das tertiäre Stickstoffatom der Seitenkette, ebenso wie das N-Atom des Pyridin-Rings, bei physiologischem pH-Wert ( $\rightarrow$  pH-Wert der Pufferlösungen der *in vitro*-Experimente) protoniert vorliegen (Abb. 6.76). Die berechneten Moleküleigenschaften der Carbazol-Derivate sind in Tab. 6.27 aufgeführt.



**Abb. 6.76:** Schematische Darstellung der biskationischen Form eines Hetero[a]carbazol-Derivats (hier: Verbindung **50**)

	$E_{\text{LUMO}}^1$ [eV]	Differenz $ E_{\text{HOMO}}(\text{A}) - E_{\text{LUMO}} ^2$ [eV]	Differenz $ E_{\text{HOMO}}(\text{G}) - E_{\text{LUMO}} ^3$ [eV]	Dipolmoment <sup>1</sup> [debye]
<b>50</b>	-7,47	1,30	1,05	5,16
<b>52</b>	-7,55	1,22	0,97	6,05

**Tab. 6.27:** Moleküleigenschaften der getesteten Carbazol-Derivate und Differenz der HOMO-Energien  $E_{\text{HOMO}}$  der Purin-Basen und der LUMO-Energien  $E_{\text{LUMO}}$  der Testverbindungen

<sup>1</sup>: Unter Anwendung einer semiempirische AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> in SPARTAN <sup>[35]</sup> ermittelt

<sup>2</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung) mit  $E_{\text{HOMO}}$  (Adenin) = -8,77 eV ( $\rightarrow$  in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> ermittelt)

<sup>3</sup>: Betrag der Differenz von  $E_{\text{HOMO}}$  (Guanin) und  $E_{\text{LUMO}}$  (Testverbindung) mit  $E_{\text{HOMO}}$  (Guanin) = -8,52 eV ( $\rightarrow$  in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup> ermittelt)

Die mit Hilfe der computergestützten Rechenverfahren kalkulierten Moleküleigenschaften der exemplarisch untersuchten Pyrido[a]anellierten Carbazol-Derivate **50** und **52** (Abb. 6.73B, Seite 281) zeigen, dass es sich bei den Testverbindungen um Liganden mit hoher DNA-Affinität handeln muss: Da zwischen den  $E_{\text{LUMO}}$ -Werten der



Carbazol-Verbindungen und den  $E_{\text{HOMO}}$ -Werten der Purin-Basen nur geringe Energiedifferenzen vorliegen, kann der Elektronentransfer von den elektronenreichen DNA-Basen zu den elektronenarmen Interkalator-Molekülen leicht und ungehindert erfolgen, so dass stabile und energetisch günstige Charge-Transfer-Komplexe aufgebaut werden können <sup>[72,78,274]</sup> (Tab. 6.27, Seite 288; Kapitel 2.2.5, Seite 31 ff.). Eine Erklärung für die im Vergleich zu dem Carbazol-Derivat **50** gesteigerte DNA-Aktivität des chlorierten Analogons **52** (Tab. 6.25, Seite 282) lässt sich aus den in Tab. 6.27 (Seite 288) aufgeführten Moleküleigenschaften der Testverbindungen jedoch nicht ableiten. So ist wenig wahrscheinlich, dass der auf die Chlor-Substitution zurückzuführende, signifikante Anstieg des  $\Delta T_m$ -Wertes durch die bezogen auf die Verbindung **50** nur geringfügig niedrigere LUMO-Energie des Derivates **52** hervorgerufen wird. Zudem weist die chlorierte Verbindung ein größeres Dipolmoment als das unsubstituierte Derivat auf (Tab. 6.27, Seite 288), obwohl bei den Ellipticin-Analoga eine Zunahme des Dipolmoments generell mit einer Abnahme der DNA-Affinität korreliert <sup>[91]</sup>. Möglicherweise bewirkt der -I/+M-Effekt des Chloratoms eine Änderung in der Elektronenstruktur des Tetrazyklus, die das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking der Purin-Basen mit dem interkalierenden Chromophor zwar *in vitro* energetisch begünstigt, mit den im Vakuum ablaufenden Molecular Modelling-Simulationen jedoch nicht erfassbar ist.

Um Aussagen über den DNA-Bindemodus der Ellipticin-analogen, Hetaren[a]anelierten Carbazol-Derivate machen zu können, sollten DNA-Ligand-Komplexe mit den Verbindungen der Pyridin-Reihe **50** und **52** simuliert werden (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.). Da das tertiäre Stickstoffatom der Carboxamid-Seitenkette ebenso wie das  $sp^2$ -hybridisierte N-Atom des Pyridin-Rings bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt, wurden die Testverbindungen in den Docking-Studien in Form ihrer Bis-Kationen eingesetzt (Abb. 6.76, Seite 288). Als Rezeptor diente das bereits zur Simulation der DNA-Bindung der Interkalatorcarbonsäuren (Kapitel 6.1.1.3, Seite 152 ff.) und der Combilexine (Kapitel 6.3.5, Seite 231 ff.) verwendete Undekanukleotid mit dem PDB-Code <sup>[36]</sup> 1G3X <sup>[80]</sup> [Sequenz: 5'-D(\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3']. Dieses Oligomer weist eine zwischen zwei AT-Basenpaaren gelegene Interkalationskavität zur Einlagerung des tetrazyklischen Chromophors der Carbazol-Derivate auf.

Die mit den Carbazol-Verbindungen **50** und **52** und dem Rezeptor 1G3X<sup>[36,80]</sup> jeweils simulierten Komplexe sind in den Abb. 6.77 und 6.78 (Seiten 291-292) graphisch und schematisch dargestellt (Atombezeichnung der Nukleotide: Abb. 2.1, Seite 17). Da den Docking-Studien gemäß beide Carbazol-Derivate einen sehr ähnlichen DNA-Bindemodus aufweisen, lässt sich der im Vergleich zur Verbindung **50** größere  $\Delta T_m$ -Wert des Derivats **52** auf der Basis der vorliegenden DNA-Ligand-Komplexe nicht erklären: Sowohl bei der DNA-Bindung des unsubstituierten Derivats **50**, als auch bei der Komplexbildung der chlorierten Verbindung **52**, wurde das Carbazol-Strukturelement, in Analogie zur Bezugssubstanz Ellipticin<sup>[91,92]</sup>, senkrecht zur Basenpaar-Trajektorie in die Interkalationskavität eingeschoben („*head-on*“-Ausrichtung<sup>[46,49,78]</sup>). Auch liegt bei beiden Carbazol-Derivaten die Amidbindung der Dimethylaminopropylcarboxamid-Seitenkette bei der DNA-gebundenen Konformation in der energetisch günstigen *trans*-(Z)-Konfiguration vor.

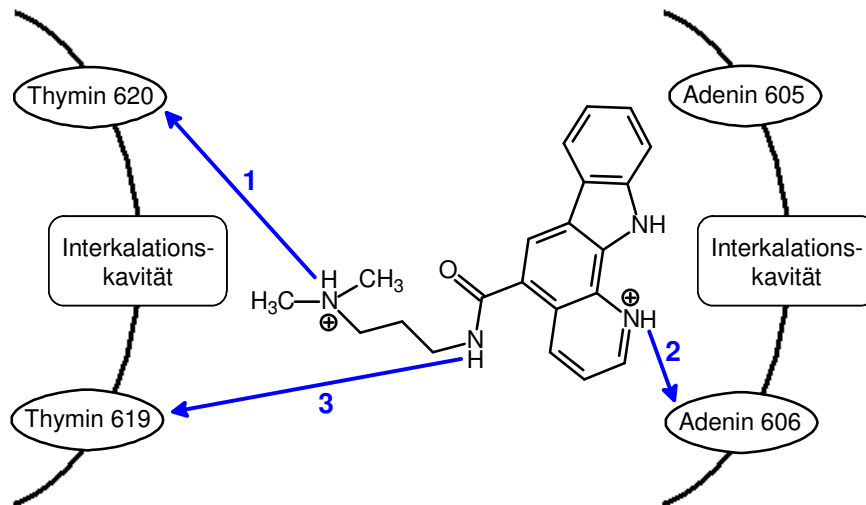
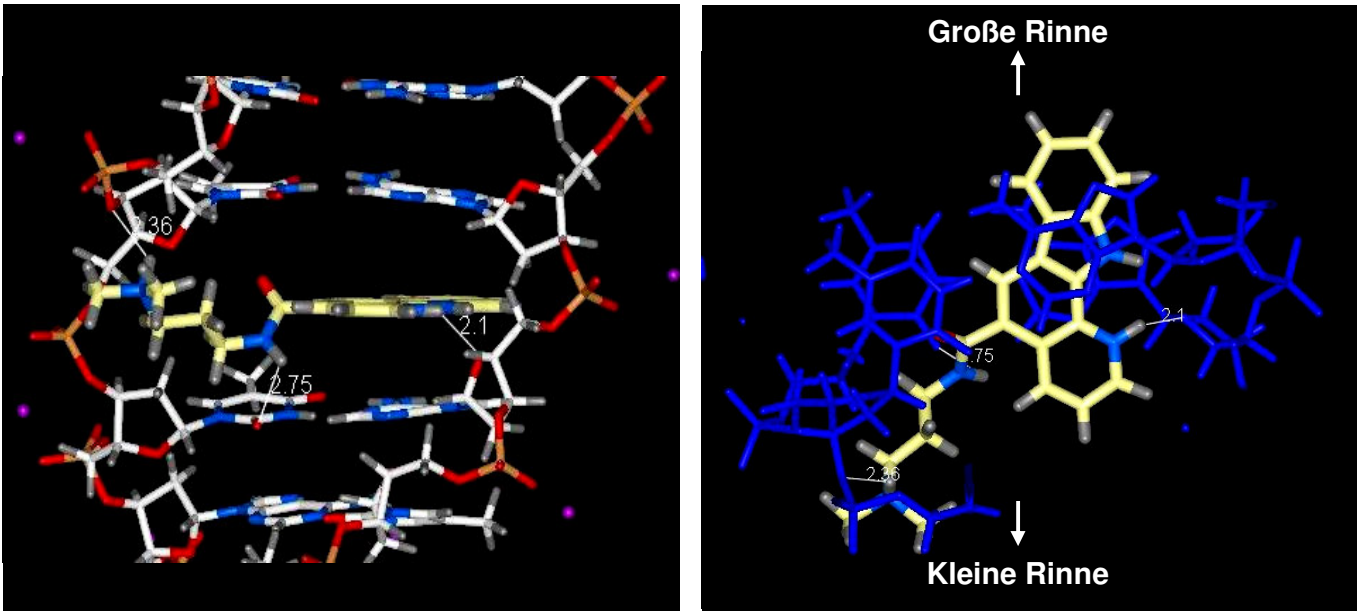
Im Gegensatz zu den Energien, die nach dem *Refinement* (Kapitel 5.4.2, Seite 143 ff.) in HYPERCHEM<sup>[34]</sup> mit der Kraftfeldmethode AMBER<sup>[179,180]</sup> errechnet wurden, korrelieren die mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> direkt nach dem DNA-Ligand-Docking (Kapitel 5.4.1, Seite 134 ff.) kalkulierten Energiewerte mit den *in vitro* ermittelten DNA-Affinitäten der Testverbindungen **50** und **52** (Tab. 6.25, Seite 282): Dem Docking-Programm gemäß wird bei der DNA-Bindung des chlorierten Derivats **52** ein etwas größerer Energiebetrag freigesetzt, als bei der Komplexbildung des unsubstituierten Analogons **50** (Tab. 6.28).

	Komplexbildungsenergie ICM-PRO <sup>1</sup> [kcal/mol]	Komplexbildungsenergie HYPERCHEM <sup>2</sup> [kcal/mol]
<b>50</b>	-61,6	-70,4
<b>52</b>	-62,9	-63,4

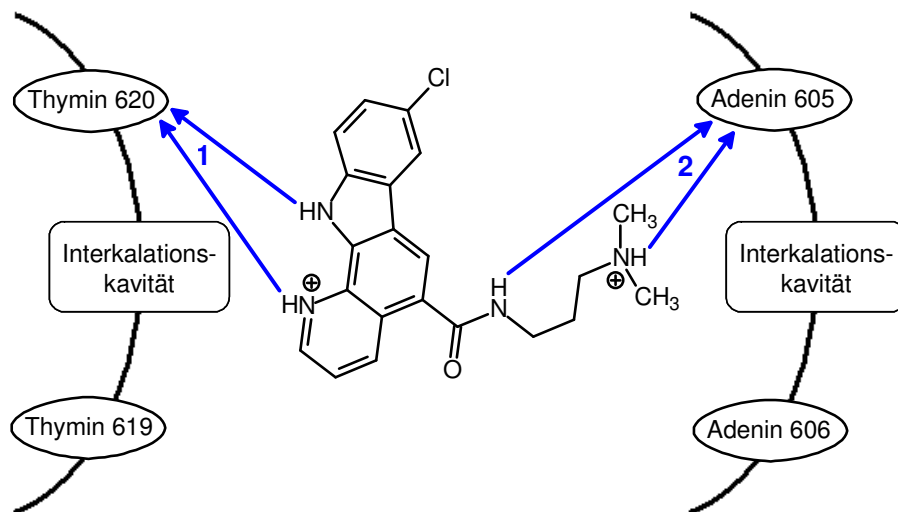
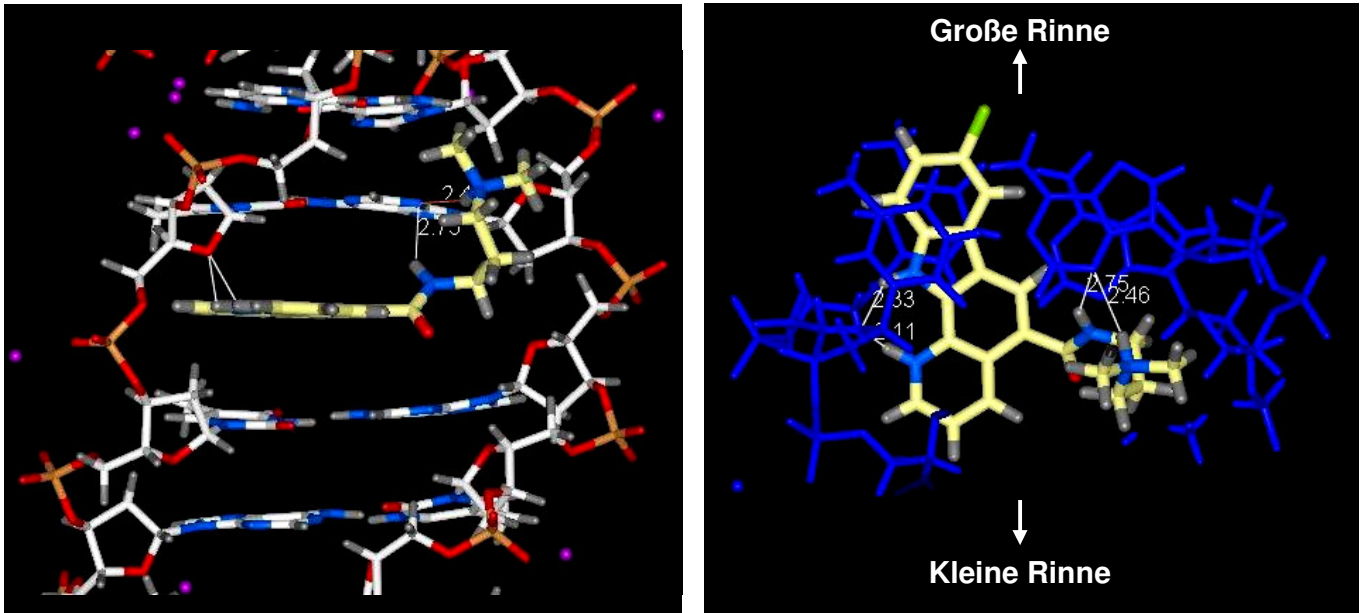
**Tab. 6.28:** Komplexbildungsenergien der mit den Pyrido[a]carbazol-Derivaten simulierten DNA-Ligand-Komplexe

<sup>1</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> nach dem DNA-Ligand-Docking

<sup>2</sup>: Komplexbildungsenergie, berechnet mit HYPERCHEM<sup>[34]</sup> nach dem *Refinement* (→ Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup>, durchgeführt mit der Kraftfeld-Methode AMBER<sup>[179,180]</sup>)



**Abb. 6.77:** Pyrido[a]carbazol-Verbindung **50**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
Oben links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex  
 (die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)  
Oben rechts: Ausschnitt aus dem mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-Ligand-Komplex  
 (die beiden AT-Basenpaare, die die Interkalationskavität bilden, sind in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blickrichtung parallel zur DNA-Helixachse)  
Unten: Schematische Darstellung der DNA-Bindung  
 (der Tetrazyklus und die Seitenkette liegen in der Interkalationskavität; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 mit Thymin 620 O-3\* als Akzeptor, H-Brücke 2 mit Adenin 606 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 3 mit Thymin 619 O-2 als Akzeptor)



**Abb. 6.78:** Pyrido[a]carbazol-Verbindung **52**, gebunden an den Rezeptor „1G3X“  
Oben links: Mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierter DNA-Ligand-Komplex  
 (die weißen bzw. die orangefarbene Linie(n) symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blick auf die kleine Rinne mit Blickrichtung senkrecht zur DNA-Helixachse)  
Oben rechts: Ausschnitt aus dem mit ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> simulierten DNA-Ligand-Komplex  
 (die beiden AT-Basenpaare, die die Interkalationskavität bilden, sind in blau dargestellt; die weißen Linien symbolisieren intermolekulare H-Brücken zwischen DNA und Ligand; Blickrichtung parallel zur DNA-Helixachse)  
Unten: Schematische Darstellung der DNA-Bindung  
 (der Tetrazyklus liegt in der Interkalationskavität; die Seitenkette liegt teilweise in der Interkalationskavität, teilweise in der kleinen Rinne; blaue Pfeile symbolisieren H-Brücken: H-Brücke 1 → Dreizentren-H-Brücke mit Thymin 620 O-4\* als Akzeptor, H-Brücke 2 → Dreizentren-H-Brücke mit Adenin 605 N-3 als Akzeptor)

## 6.4.6 Zytotoxizitätsstudien des NCI

Die Ergebnisse der vom NCI (*National Cancer Institute*) mit den Hetaren[a]carbazol-Derivaten **46**, **47**, **50** und **51** (Abb. 6.73, Seiten 280-281) durchgeführten Zytotoxizitätstests (Kapitel 3.4.4, Seite 85 ff.) sind in Tab. 6.29 aufgeführt.

	MG_MID LOG <sub>10</sub> GI <sub>50</sub> <sup>1</sup>	MG_MID LOG <sub>10</sub> TGI <sup>2</sup>	MG_MID LOG <sub>10</sub> LC <sub>50</sub> <sup>3</sup>
<b>46</b>	-4,72	-4,13	-4,01
<b>47</b>	-4,35	-4,01	>-4,0
<b>50</b>	-4,9	-4,29	-4,06
<b>51</b>	-5,56	-5,04	-4,55

**Tab. 6.29:** Ergebnisse der vom NCI durchgeführten Zytotoxizitätstests

- <sup>1</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine 50%-ige Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>  
<sup>2</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils eine totale Wachstumshemmung der Krebszellen bewirkt <sup>[90]</sup>  
<sup>3</sup>: Mittelwert der logarithmischen molaren Konzentration der Testverbindung, die bei allen 60 im Assay eingesetzten Krebszelllinien jeweils bei 50% der Krebszellen zum Zelltod führt <sup>[90]</sup>

	49	50	51	52	53
<b>logP<sup>1</sup></b>	2,29 ± 1,28	2,60 ± 1,28	2,92 ± 1,29	3,28 ± 1,29	4,89 ± 1,29

**Tab. 6.30:** logP-Werte der mit einer amidischen Seitenkette substituierten Hetaren[a]carbazol-Derivate

- <sup>1</sup>: Berechnet mit ACD <sup>[283]</sup>

Aus den zellbiologischen Tests des NCI geht hervor, dass das Pyrido[a]anellierte Carbazol-Derivat **47** (Abb. 6.73A, Seite 280) nicht zytotoxisch wirksam ist. Die Verbindung kann jedoch, obwohl sie keine mittels T<sub>m</sub>-Wert-Messmethodik detektierbare DNA-Affinität besitzt (Tab. 6.25, Seite 282), das Wachstum der im Assay eingesetzten Krebszelllinien hemmen (Tab. 6.29). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Derivat **47** zwar nicht mit der DNA, jedoch mit einem anderen, bislang unbe-

kannten intrazellulären Target in Wechselwirkung tritt, was eine Hemmung des Zellwachstums zur Folge hat.

Die Thieno[*a*]carbazol-Verbindung **46** (Abb. 6.73A, Seite 280), für die aufgrund der zu geringen Wasserlöslichkeit kein  $\Delta T_m$ -Wert ermittelt werden konnte, ist stärker zytostatisch aktiv als das zuvor erwähnte Derivat **47**. Daneben besitzt die schwefelhaltige Verbindung, im Gegensatz zum Pyridin-Analogen, zytotoxische Eigenschaften, auch wenn diese nur schwach ausgeprägt sind. Die im Vergleich zur Verbindung **47** erhöhte, zellbiologische Wirksamkeit des Derivats **46** kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass das Thieno[*a*]anellierte Carbazol, als Folge der durch das Schwefelatom hervorgerufenen Lipophilie-Steigerung und der damit verbundenen, verbesserten Zellmembranpenetration, stärker mit dem unbekanntem intrazellulären Target interagieren kann.

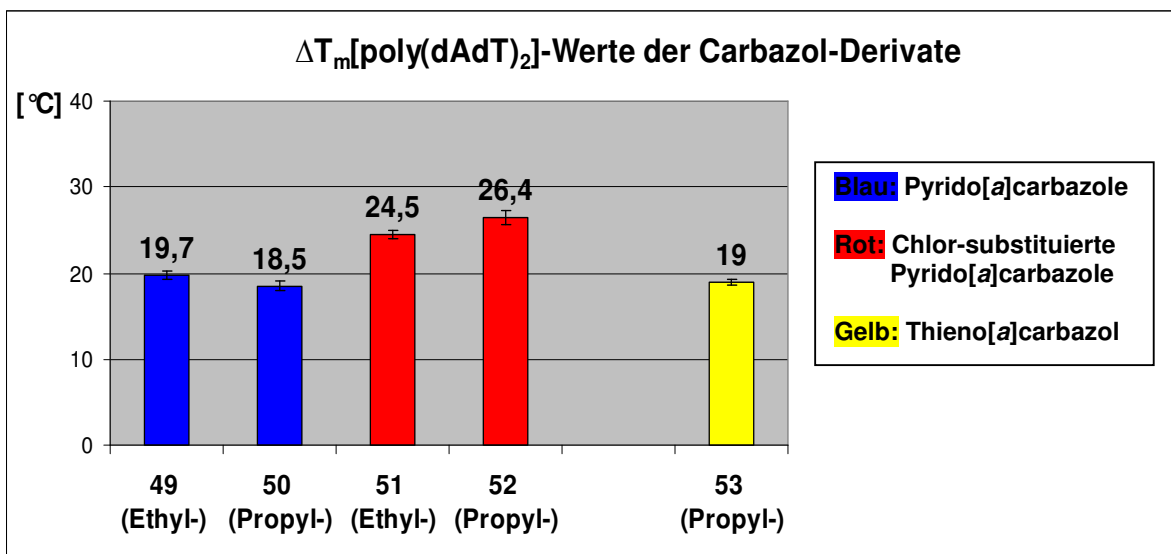
Die besten zytostatischen und zytotoxischen Eigenschaften der bislang vom NCI getesteten Carbazol-Derivate besitzen die mit einer Dimethylaminoalkyl-carboxamid-Seitenkette substituierten Verbindungen **50** und **51** (Abb. 6.73B, Seite 281; Tab. 6.29, Seite 293). Da diese Pyrido[*a*]carbazol-Derivate zudem mit einer hohen Affinität an die DNA binden (Tab. 6.25, Seite 282; Tab. 6.26, Seite 286), wird die zellbiologische Aktivität dieser Substanzen wahrscheinlich nicht nur durch eine mögliche Wechselwirkung mit dem unbekanntem Target, sondern darüber hinaus auch durch ihre interkalative DNA-Bindung hervorgerufen. Es ist zu vermuten, dass die im Vergleich zur Verbindung **50** stärkere zytotoxische und zytostatische Aktivität des Chlor-Derivats **51** maßgeblich durch die höhere DNA-Affinität dieses Pyrido[*a*]anellierten Carbazols bedingt ist. Zudem besitzt die Verbindung **51** möglicherweise aufgrund der höheren Lipophilie (Tab. 6.30, Seite 293), die auf den Einfluss des Chlor-Atoms zurückzuführen ist, die besseren Zellmembranpenetrierenden Fähigkeiten, so dass das Derivat **51** intrazellulär in einer höheren Substanzkonzentration anfluten und, damit verbunden, einen stärkeren zellbiologischen Effekt auslösen kann.

## 6.4.7 Diskussion der Ergebnisse

Wie bereits bei den Hetaren-pyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.1.2.3, Seite 176), den Nukleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrolcarboxamiden (Kapitel 6.2.4, Seite 203-204) und den Combilexinen (Kapitel 6.3.5, Seite 251 ff.) beschrieben, zeigen auch die mit den Hetaren[*a*]anellierten Carbazolen durchgeführten *in vitro*- und *in silico*-Studien, dass die Dimethylaminoalkyl-carboxamid-Seitenkette für eine gute Affinität DNA-bindender Liganden von großer Bedeutung ist <sup>[93]</sup>. Das tertiäre, bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegende Stickstoffatom dieser Seitenkette führt zu einer Steigerung der Hydrophilie der Derivate <sup>[277]</sup>, wodurch ihre Zugänglichkeit für biophysikalische und biochemische Messungen verbessert wird. So konnte für das Thieno[*a*]carbazol-Derivat **53** (Abb. 6.73B, Seite 281), das mit einer Propylcarboxamid-Seitenkette substituiert ist, ein  $\Delta T_m$ -Wert ermittelt werden, während die, eine Methylether-Funktion aufweisende, schwefelhaltige Verbindung **46** (Abb. 6.73A, Seite 280) unter den Messbedingungen unlöslich war (Abb. 6.79, Seite 296). Außerdem bewirkt die Kette eine Verlängerung der DNA-Residualzeit der Liganden <sup>[79]</sup>, indem das Ammonium-Ion und das amidische Stickstoffatom als Donatoren H-Brücken zu den DNA-Basen aufbauen (Abb. 6.77-6.78, Seiten 291-292). Weiterhin gehen die Methyl- und Methylen-Gruppen der Seitenkette zahlreiche van der Waals-Wechselwirkungen mit der DNA ein, auf die ein großer Teil der bei der Komplexbildung freiwerdenden Energie zurückzuführen ist (Kapitel 6.3.5, Seite 251 ff.).

Aus der Betrachtung der DNA-Aktivitäten der untersuchten Pyrido[*a*]carbazol-Verbindungen **47-52** (Abb. 6.73, Seiten 280-281) geht eindeutig hervor, dass die beschriebene, durch den Einfluss der Carboxamid-Seitenkette auf die DNA-Bindung der Derivate hervorgerufene Herabsetzung der Dissoziationsgeschwindigkeit eine signifikante Verbesserung der DNA-Affinitäten der Liganden zur Folge hat (Abb. 6.79, Seite 296): Im Gegensatz zu den eine Methylether- bzw. eine Natriumcarboxylat-Funktion tragenden Verbindungen **47** bzw. **48**, weisen die mit einer Dimethylaminoalkyl-Seitenkette substituierten Derivate **49-52** eine mit Hilfe der  $T_m$ -Wert-Messmethodik detektierbare DNA-Aktivität auf. Die mit den Hetaren[*a*]anellierten Carbazolen durchgeführten Bindestudien lassen folglich darauf schließen, dass es sich bei der aliphatischen Carboxamid-Seitenkette um ein Strukturelement handelt, dass für die Synthese neuer Derivate mit hoher DNA-Bindungsstärke unverzichtbar ist. Allerdings

kann bislang keine Aussage darüber gemacht werden, welche Kettenlänge eine optimale DNA-Ligand-Interaktion ermöglicht, da bei den unsubstituierten Pyrido[*a*]carbazol-Derivaten **49** und **50** die Verbindung mit der Ethyl-Kette, bei den chlorierten Analoga **51** und **52** dagegen das Derivat mit der Propyl-Kette die jeweils höhere DNA-Affinität besitzt (Abb. 6.79). Möglicherweise können Kristallstrukturen einiger mit einem Oligonukleotid komplexierter Carbazol-Derivate, die mit einer in der Länge jeweils variierenden Dimethylaminoalkyl-carboxamid-Kette substituiert sind, weitere Erkenntnisse über den für die DNA-Bindung optimalen Aufbau der aliphatischen Seitenkette liefern.



**Abb. 6.79:** ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>]-Werte der Pyrido- und Thieno[*a*]carbazol-Derivate

(Verbindung **46**: ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] nicht messbar wegen zu geringer Wasserlöslichkeit der Substanz; Verbindung **47** und Verbindung **48**: ΔT<sub>m</sub>[poly(dAdT)<sub>2</sub>] ≤ 1 °C)

Neben der Bedeutung der Seitenkette für die DNA-Aktivität der Carbazol-Verbindungen sollte auch untersucht werden, welchen Einfluss die verschiedenen, bei dem Design der Ellipticin-Analoga zur Verknüpfung mit der Carbazol-Struktur jeweils verwendeten Heterozyklen (Pyridin bzw. Thiophen) auf die DNA-bindenden Eigenschaften der Derivate ausüben.

Aus dem Vergleich der für die Pyrido[*a*]anellierte Carbazol-Verbindung **50** und für das Thiophen-Analogon **53** (Abb. 6.73B, Seite 281) ermittelten ΔT<sub>m</sub>-Werte geht hervor, dass beide Derivate etwa mit der gleichen Stärke an die DNA binden (Abb. 6.79). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass der Pyridin-Ring gegen ein Thio-

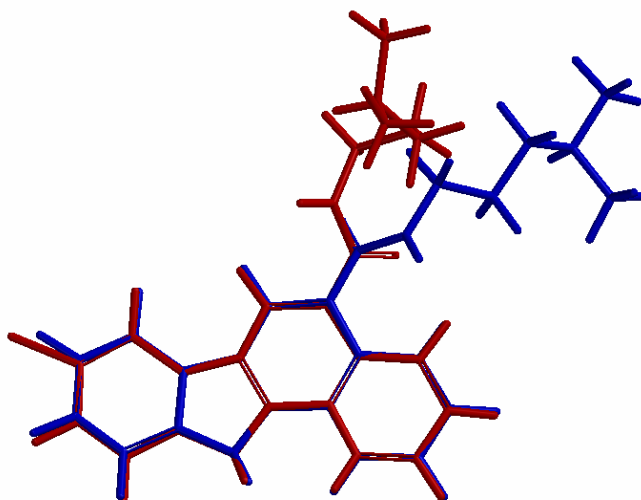


phen-Molekül ausgetauscht werden kann, ohne dass sich die *in vitro* messbare DNA-Affinität signifikant ändert. Die Ergebnisse der vom NCI durchgeführten Zytotoxizitätstests (Tab. 6.29, Seite 293) lassen jedoch vermuten, dass die Thieno[*a*]carbazol-Verbindungen, möglicherweise bedingt durch die von dem Schwefelatom hervorgerufene Lipophilie-Steigerung (Tab. 6.30, Seite 293) und der damit verbundenen, verbesserten Zellmembranpermeation, die im Vergleich zu den Pyridin-Derivaten stärkere zellbiologische Aktivität besitzen. Da das getestete Substanz-Kollektiv bislang allerdings noch zu klein ist, um endgültige Aussagen über die bei den Hetero[*a*]anellierten Carbazolen vorliegenden Struktur-Wirkungsbeziehungen machen zu können, sollten zunächst weitere Derivate der Thiophen- und der Pyridin-Reihe synthetisiert und auf ihre zytostatischen und zytotoxischen Eigenschaften untersucht werden. Sollte sich die Hypothese bestätigen, dass die schwefelhaltigen Verbindungen generell die bessere anticancerogene Aktivität aufweisen, sollte der Fokus in Zukunft auf die Entwicklung neuer, Ellipticin-analoger Thieno[*a*]carbazol-Derivate gerichtet werden.

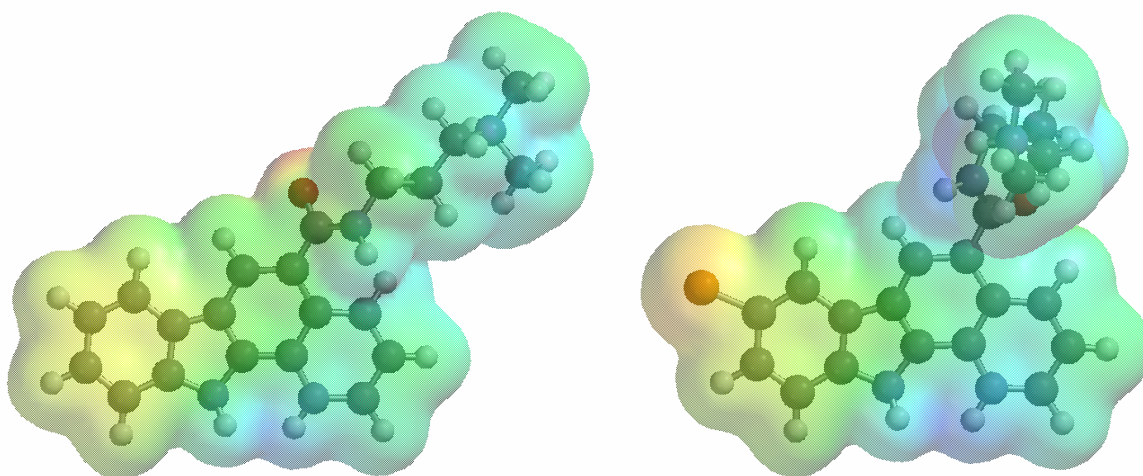
Ergänzend zu den bereits erörterten, sich mit dem Aufbau der Seitenkette und des Tetrazyklus befassenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sollte auch untersucht werden, wie sich die Chlor-Substitution des planaren Chromophors auf die DNA-Affinität der Carbazol-Verbindungen auswirkt.

Die zu diesem Zweck mit den Pyrido[*a*]anellierten Carbazolen **49-52** (Abb. 6.73B, Seite 281) durchgeführten  $T_m$ -Wert-Messungen zeigen, dass die Einführung eines Chloratoms in das Interkalator-Molekül zu einer deutlichen Steigerung der DNA-Affinität und zu einer signifikanten Verstärkung der zytostatischen und zytotoxischen Wirksamkeit führt (Abb. 6.79, Seite 296, Tab. 6.29, Seite 293). Allerdings kann bislang noch keine genaue Aussage darüber gemacht werden, wie die beobachtete, auf die Chlorierung der Carbazol-Derivate zurückzuführende Aktivitätszunahme zustande kommt. So unterscheiden sich die für die beiden Verbindungen **50** und **52** ermittelten  $E_{LUMO}$ -Werte nicht signifikant voneinander (Tab. 6.27, Seite 288); folglich sollten die bei der Interkalation des Derivats **50** und die bei der DNA-Bindung des chlorierten Analogons **52**, jeweils zwischen dem Chromophor und den Purin-Basen der DNA aufgebauten Charge-Transfer-Komplexe, energetisch nahezu gleichwertig sein <sup>[72,78,274]</sup>. Auch aus der graphischen Auswertung der DNA-Ligand-Komplexe, die mit den Pyrido[*a*]anellierten Carbazolen **50** und **52** simuliert wurden, lässt sich keine Erklärung für die im Vergleich zu dem unsubstituierten Derivat **50** ge-

steigerte Aktivität der Chlor-Verbindung **52** ableiten: In beiden Komplexen liegen die tetrazyklischen Chromophore jeweils in einer sehr ähnlichen Orientierung in der Interkalationskavität des Rezeptors eingeschoben vor (Abb. 6.77-6.78, Seiten 291-292; Abb. 6.80). Die molekularen elektrostatischen Potentiale, die für die DNA-gebundenen Konformere der beiden untersuchten Derivate ermittelt wurden (in SPARTAN<sup>[35]</sup> unter Verwendung der AM1-Methode<sup>[184,185]</sup> berechnet; Kapitel 5.2.2, Seite 127), weisen jedoch geringfügige Unterschiede auf (Abb. 6.81, Seite 299). Möglicherweise führt das Chloratom, bedingt durch seinen -I/+M-Effekt, zu einer Veränderung in der Elektronenstruktur des interkalierenden Tetrazyklus<sup>[91]</sup>, die das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking des chlorierten Derivats mit den Basen der DNA *in vitro* energetisch begünstigt, während dieser Effekt bei den im Vakuum ablaufenden Docking-Simulationen nicht korrekt berücksichtigt wird. Um präzisere Aussagen darüber machen zu können, wie sich ein Substituent auf die DNA-Affinität der Hetaren[a]anellierten Carbazole auswirkt und über welchen Mechanismus diese Einflussnahme vermittelt wird, müssten weitere Carbazol-Verbindungen mit anderen funktionellen Gruppen (z. B. Hydroxy-Gruppe, Nitro-Gruppe) synthetisiert und ihre DNA-bindenden Eigenschaften untersucht werden.



**Abb. 6.80:** Vergleichende Darstellung der DNA-gebundenen Konformere des Pyrido[a]carbazol-Derivats **50** (blaues Molekül) und des chlorierten Analogons **52** (rotes Molekül)  
(Alignment durchgeführt in SPARTAN<sup>[35]</sup>)



**Abb. 6.81:** Molekulares elektrostatisches Potential der Pyrido[a]carbazol-Derivate

Links: DNA-gebundenes Konformer der Verbindung **50**

Rechts: DNA-gebundenes Konformer des chlorierten Analogons **52**

[Berechnung des MEP in SPARTAN <sup>[35]</sup> mit einer semiempirischen AM1-Rechnung <sup>[184,185]</sup>; das MEP reicht von +40,0 kcal/mol bis +200,0 kcal/mol und ist farbcodiert: Rote Felder geben Bereiche eines negativen MEP (hohe Elektronendichte) wider; blaue Felder zeigen das Vorhandensein eines positiven MEP (niedrige Elektronendichte) an <sup>[197]</sup>; Projektion des MEP auf die Connolly-Oberfläche (lösungsmittelzugängliche Oberfläche) der Moleküle, deren äußere Grenze jeweils einer Elektronendichte von 0,002 e/au<sup>3</sup> entspricht <sup>[25,197]</sup>]

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Trotz der zahlreichen Fortschritte, die in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Tumorthherapie (→ Zulassung innovativer Arzneistoffe, Etablierung neuer Behandlungskonzepte), sowie bei der Behandlung der Chemo- und Strahlentherapie-induzierten Nebenwirkungen gemacht wurden, sind viele maligne Neoplasien nach wie vor unheilbar <sup>[3,4,6,10]</sup>. So verstarben im Jahr 2005 allein in Deutschland mehr als 200000 Menschen infolge einer Krebserkrankung <sup>[1]</sup>. Aus diesem Grund stellt die Suche nach neuen antitumoraktiven Verbindungen immer noch eines der wichtigsten Betätigungsfelder der pharmazeutischen Industrie dar <sup>[7,9,13-17]</sup>. Da es sich bei einer malignen Neoplasie um eine Erkrankung der Gene handelt, die durch Mutationen in Tumorsuppressor- und/oder Proto-Onkogenen ausgelöst wird, kommt vor allem der DNA als Target für neue Zytostatika eine große Bedeutung zu <sup>[6-9]</sup>. Von besonderem Interesse ist dabei die Entwicklung von sequenzselektiv bindenden Substanzen (sog. *Gene-Selective Targeted Drugs*), die eine zielgerichtete Modifikation spezifischer Gene ermöglichen sollen <sup>[46,67,69,103,106]</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neu synthetisierte, potentiell antitumoraktive Derivate der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamid-, der Combilexin- und der Hetaren[a]carbazol-Reihe auf ihre DNA-bindenden und Topoisomerase I-hemmenden Eigenschaften untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene biochemische und biophysikalische Analysemethoden (→  $T_m$ -Wert-Messung, Topoisomerase I-Hemmtest, Ethidiumbromid-Verdrängungsassay) eingesetzt, die durch computergestützte Simulationen ergänzt werden sollten. Diese Molecular Modelling-Studien sollten die Berechnung von molekularen Eigenschaften, die Durchführung von Konformeranalysen, sowie das Docken von DNA-Ligand-Komplexen umfassen. Durch Korrelation der *in vitro*-Befunde mit den *in silico*-Daten sollten systematische Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden, die zur Optimierung des rationalen Designs und der Syntheseplanung künftiger Derivate mit potentiell höherer Antitumoraktivität beitragen sollen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Affinitäten aller verfügbaren Derivate der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamid-, der Hetaren[a]carbazol-, und der Combilexin-Reihe, sowie die DNA-Aktivitäten der für die Synthese der Hybrid-Moleküle verwendeten Interkalatorcarbonsäuren und Fünfring-Hetaren-pyrrol-

carboxamid-Strukturen mittels  $T_m$ -Wert-Messungen bestimmt. Um Aussagen sowohl über die Stärke, als auch über die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der Testsubstanzen machen zu können, wurden diese biophysikalischen Schmelzpunktstudien mit poly(dAdT)<sub>2</sub>-, und erstmals auch mit Kalbsthymus-DNA (~42% GC-Basenanteil <sup>[30,31]</sup>) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der  $T_m$ -Wert-Messmethodik um ein routinemäßig einsetzbares, sehr effizientes und zuverlässiges Verfahren zur DNA-Affinitätsbestimmung handelt, das ausgezeichnet dazu geeignet ist, den Syntheseprozess von DNA-Liganden zu begleiten und auf der Basis der resultierenden, vororientierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen das rationale Design neuer Derivate zu beeinflussen. Dabei konnten vor allem die  $\Delta T_m$ -Werte, die durch Verwendung des synthetischen, nur aus alternierend angeordneten AT-Basenpaaren bestehenden Polynukleotids ermittelt wurden, aufgrund ihrer sehr guten Reproduzierbarkeit zum Vergleich der DNA-Bindestärken verschiedener Substanzen herangezogen werden. Die Daten, die aus den mit Thymus-DNA durchgeführten Messungen resultierten, eigneten sich dagegen weniger für einen derartigen Aktivitätsvergleich, da diese native DNA eine geringere Sensitivität gegenüber DNA-Liganden besitzt <sup>[119,275]</sup>, was sich in kleinen  $\Delta T_m$ -Werten mit verhältnismäßig großen Standardabweichungen äußert. In Kombination mit den poly(dAdT)<sub>2</sub>-Werten lieferten die mit Thymus-DNA ermittelten Affinitäten jedoch wertvolle Hinweise über die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der untersuchten Testsubstanzen.

Zur Verifizierung der aus den  $T_m$ -Wert-Messungen abgeleiteten Aussagen über die DNA-Aktivitäten der Testsubstanzen wurden die Bindekonstanten ( $K_{app}$ ) einiger ausgewählter Derivate mit Hilfe des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays ermittelt. Dabei gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal,  $K_{app}$ -Werte für Vertreter der Combilexin-, (→ **23**:  $6,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; **30**:  $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; **33**:  $7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) sowie der Hetaren[a]carbazol-Reihe (→ **50**:  $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; Kapitel 8.1.2, Seite 314 ff.) zu berechnen. Die Grundlage für diesen Erfolg bildete der Einsatz der Testverbindungen in Form ihrer Hydrochloride, wodurch eine ausreichende Löslichkeit der Derivate in dem für die Messungen verwendeten wässrigen Puffermedium gewährleistet werden konnte. Aus dem Vergleich der errechneten Bindekonstanten mit den zuvor ermittelten  $\Delta T_m$ -Werten der entsprechenden DNA-Liganden geht hervor, dass es sich bei der  $T_m$ -Wert-Messmethodik um ein wertvolles Verfahren zur Affinitätsbestimmung handelt, das rational plausible Daten liefern kann. Darüber hinaus konnte anhand

des  $K_{app}$ -Wertes des hoch affinen Rinnenbinders Hoechst 33258 ( $\rightarrow 1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) gezeigt werden, dass sich die getesteten Combilexin-Derivate **23**, **30** und **33** sowie das Hetaren[a]anellierte Carbazol **50** durch eine gute bis zufrieden stellende DNA-Bindung auszeichnen. Da bei DNA-Liganden oftmals eine Korrelation zwischen der Höhe der DNA-Aktivität und dem ausgelösten zytotoxischen Effekt besteht <sup>[102]</sup>, stellen die Combilexine und die Carbazole folglich viel versprechende Substanzklassen auf der Suche nach neuen, antitumoraktiven Verbindungen, dar.

Des Weiteren wurden einige ausgewählte Vertreter der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamid-, der Combilexin- und der Hetaren[a]carbazol-Reihe auf potentiell vorhandene, Topoisomerase I-hemmende Eigenschaften untersucht. Zu diesem Zweck mussten einige Änderungen des Testprotokolls vorgenommen werden, um eine Steigerung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Aus den Gelelektropherogrammen der durchgeführten TOPO I-Hemmassays geht hervor, dass lediglich einige Combilexin-Verbindungen eine Abnahme der Enzymaktivität bewirken können, wobei es sich bei diesen Substanzen laut Angaben der I.N.S.E.R.M.-Mitarbeiter (Lille, Frankreich) sehr wahrscheinlich nur um wachstumshemmende Suppressoren und nicht um zytotoxisch wirkende Enzym-Gifte handelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zur Ergänzung der biophysikalischen und biochemischen *in vitro*-Experimente computergestützte Studien mit ausgewählten Vertretern der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamide, der Interkalatorcarbonsäuren, der Combilexine, der Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide und der Hetaren[a]carbazol-Derivate durchgeführt. Dabei gelang es erstmalig, die Molecular Modelling-Programmpakete SPARTAN <sup>[35]</sup> und ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> zu validieren und ein routinemäßig anwendbares Protokoll für die Berechnung von Moleküleigenschaften, für die Generierung von Minimumskonformeren, sowie für das DNA-Ligand-Docking zu entwickeln.

Aus den durchgeführten Docking-Studien geht hervor, dass die Software ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> mit allen Testsubstanzen – unabhängig von ihrem jeweiligen DNA-Bindemodus – rational plausible DNA-Ligand-Komplexe simulieren konnte. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass auch der duale, Interkalation und Rinnenbindung vereinigende Bindemodus der Combilexine von dem Programm korrekt erfasst und entsprechend umgesetzt werden konnte. Aus der graphischen Auswertung der gedockten Komplexe ließen sich wertvolle Hinweise auf die wirksamkeitsbestimmenden

Strukturelemente und Erklärungen für die unterschiedlichen DNA-Affinitäten der verschiedenen Testsubstanzen ableiten. Da ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>, ebenso wie die Majorität der derzeit verfügbaren Docking-Programme, generell besser für die geometrische Vorhersage der möglichen Rezeptorbindung einer Substanz (→ Docking), als für die Bewertung der Stärke der Target-Ligand-Interaktionen (→ Scoring) geeignet ist<sup>[23,281,282]</sup>, korrelieren die berechneten Komplexbildungsenergien wie erwartet nicht in jedem Fall mit den zuvor ermittelten  $\Delta T_m$ -Werten. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass bei den Energieberechnungen einige intermolekulare Wechselwirkungen, die die Rezeptoraffinität eines Liganden *in vitro* signifikant beeinflussen (z. B. die elektrostatischen Interaktionen oder die aus der Verdrängung von Wassermolekülen und Gegenionen resultierenden entropischen Effekte), von einem *in vacuo* arbeitenden Molecular Modelling-Programm nicht korrekt berücksichtigt werden können<sup>[20,241]</sup>. Darüber hinaus ist ein als Matrize fungierendes Oligonukleotid während des Docking-Prozesses unbeweglich (*Rigid Receptor Docking*)<sup>[241]</sup>, so dass keine konformative Anpassung des DNA-Moleküls an die eingelagerte Testverbindung und somit auch keine Optimierung der Rezeptor-Ligand-Interaktionen erfolgen kann. Da der Scoring-Algorithmus von ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> jedoch einige Terme enthält, die die computergestützten Simulationen an die realen Bedingungen anpassen sollen (z. B. Solvatationsenergie-Terme<sup>[33,247]</sup>), stimmten die von der Docking-Software errechneten Komplexbildungsenergien besser mit den *in vitro*-Befunden überein als die Energiewerte, die in HYPERCHEM<sup>[34]</sup> unter Anwendung einfacherer Kraftfeldmethoden ermittelt wurden. Letztere lieferten allerdings wertvolle Hinweise auf Art und Stärke der an der DNA-Ligand-Komplexbildung beteiligten intermolekularen Wechselwirkungen. Bei der Auswertung der mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup> durchgeführten Studien muss des Weiteren beachtet werden, dass die für verschiedene Testverbindungen jeweils berechneten Komplexbildungsenergien nur dann miteinander verglichen werden können, wenn die gedockten Derivate derselben Stoffklasse angehören.

Unter Einsatz sowohl des Struktur-, als auch des Pharmakophor-basierten Wirkstoffdesign-Konzepts konnten anhand der *in vitro*- und der *in silico*-Resultate einige Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Nukleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide, für die Combilexine, sowie für die Hetaren[a]anellierten Carbazole aufgestellt werden, die im Folgenden nach Stoffklassen geordnet aufgeführt sind.

### Nukleobasen-gekoppelte Mono- und Bispyrrolcarboxamide:

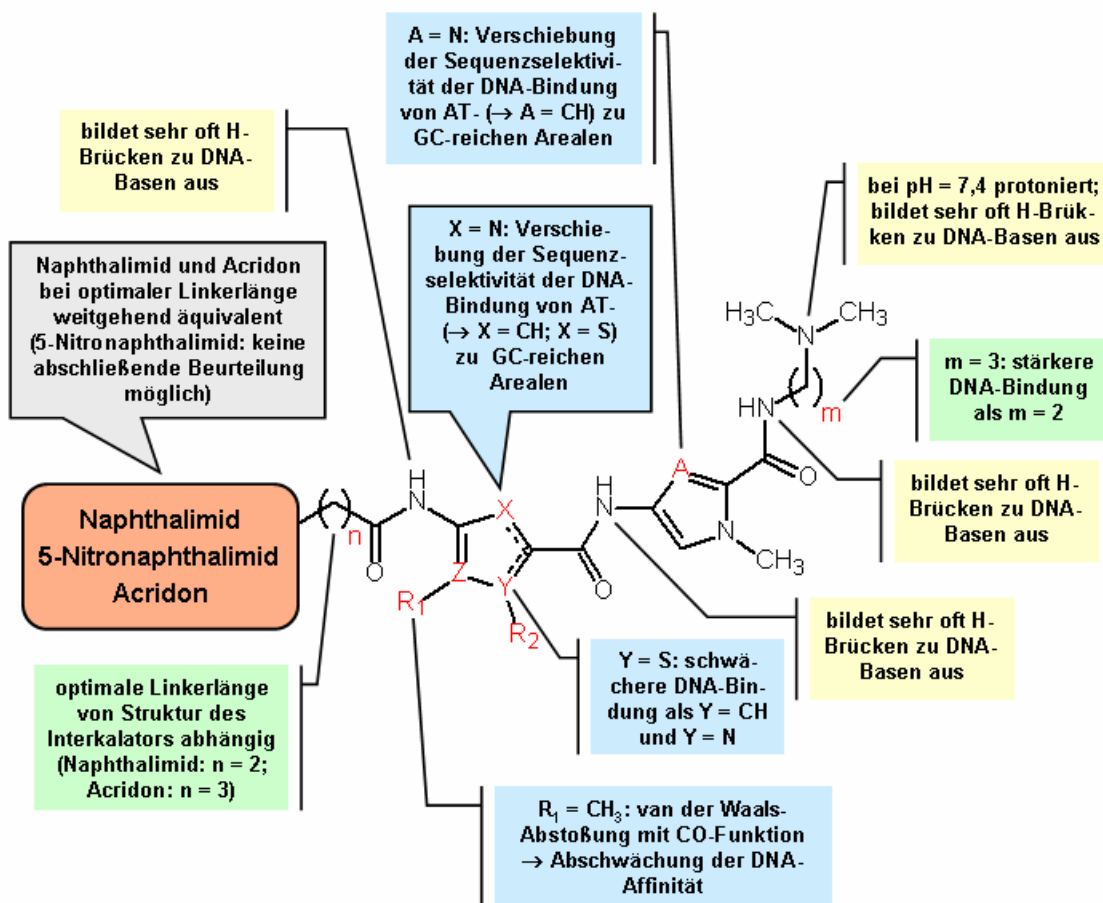
- Im Gegensatz zu den Nukleobasen-gekoppelten Monopyrrol-Derivaten besitzt jede der getesteten Bispyrrol-Verbindungen eine mittels  $T_m$ -Wert-Messung detektierbare DNA-Affinität. Dieses Resultat ist sehr wahrscheinlich nicht auf die nur bei den Bispyrrolcarboxamiden vorhandene, eine zusätzliche H-Brücken-Donator-Funktion aufweisende, dritte Amidbindung zurückzuführen. Die graphische Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe lässt vielmehr vermuten, dass bei der Rezeptor-Bindung der Bispyrrol-Derivate – aufgrund der im Vergleich zu den Monopyrrol-Analoga signifikant größeren Moleküldurchmesser – sehr viel stärkere intermolekulare van der Waals-Wechselwirkungen zustande kommen. Da die Bispyrrolcarboxamide mit einem größeren DNA-Abschnitt in Interaktion treten als die Monopyrrol-Verbindungen, können sie bei der Komplexbildung sehr wahrscheinlich auch mehr Wassermoleküle aus der kleinen Rinne verdrängen <sup>[20]</sup>. Dies hätte eine Entropiesteigerung zur Folge, die sich ebenfalls günstig auf die DNA-Affinität der Bispyrrol-Derivate auswirken würde <sup>[20]</sup>.
- Es liegt kein linearer Zusammenhang zwischen der Länge des aliphatischen, die Nukleobase mit der rinnenbindenden Pyrrolcarboxamid-Struktur verknüpfenden Linkers und den aus den  $T_m$ -Wert-Messungen abgeleiteten DNA-Aktivitäten der Testverbindungen vor. Innerhalb der Gruppe der Uracil-gekoppelten Pyrrolcarboxamide besitzt die Verbindung **14**, die einen N-terminalen C4-Linker aufweist, die größte DNA-Affinität ( $\Delta T_m$ -Wert:  $8,8 \pm 0,34^\circ\text{C}$ ), während bei den Thymin-Analoga das Essigsäure-Derivat **18** am stärksten an die DNA bindet ( $\Delta T_m$ -Wert:  $7,7 \pm 0,15^\circ\text{C}$ ; Kapitel 8.1.2, Seite 313).
- Aus den Schmelzpunkt-Studien geht hervor, dass die Derivate der Uracil-Reihe stärker an die DNA binden als die analogen Thymin-gekoppelten Pyrrolcarboxamide. Es liegt nahe zu vermuten, dass diese unterschiedlichen DNA-Aktivitäten darauf zurückzuführen sind, dass die bei dem Thymin-Molekül zusätzliche vorhandene Methyl-Gruppe die Einlagerung der Thymin-Derivate in die kleine Rinne der DNA sterisch behindert. Diese Hypothese lässt sich auf der Basis der durchgeführten Docking-Studien allerdings nicht bestätigen. Zur endgültigen Klärung des vorliegenden Sachverhalts müssten daher Kristall-



strukturen von an DNA gebundenen Uracil- und Thymin-Derivaten hergestellt und untersucht werden.

- Auf der Basis der simulierten DNA-Ligand-Komplexe und der nur kleinen  $\Delta T_m$ -Werte, die für die Nucleobasen-gekoppelten Bispyrrolcarboxamide ermittelt wurden, kann darauf geschlossen werden, dass die zur Verstärkung der DNA-Aktivität angestrebte *Hoogsteen*-Basenpaarung des Thymin- bzw. Uracil-Moleküls mit einem AT-Basenpaar der DNA bei der Rezeptor-Bindung der Testsubstanzen nicht zustande kommt.
- Da die Nucleobasen-gekoppelten Mono- und Bispyrrol-Derivate keine bzw. eine nur schwach ausgeprägte DNA-Affinität besitzen, erscheint eine Weiterentwicklung dieser Substanzklasse nicht lohnenswert.

### Combilexine:



**Abb. 7.1:** Pharmakophormodell für die Substanzklasse der Combilexine

- Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen geht hervor, dass die Combilexine mit einer C-terminalen N,N-Dimethylaminopropyl-Kette stärker an die DNA binden als die Derivate, die eine kürzere Ethyl-Seitenkette aufweisen. Die gedockten DNA-Ligand-Komplexe zeigen, dass dieser Sachverhalt höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass das bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegende N-Atom der Propyl-Struktur – aufgrund des größeren Aktionsradius und der höheren Flexibilität der längeren Seitenkette – im Gegensatz zu dem Ammonium-Ion der Ethyl-Analoga eine starke ionische H-Brücken-Bindung zur DNA ausbilden kann.
- Nahezu alle getesteten Verbindungen der Thiazol-pyrrol- und der Bispyrrol-Reihe weisen höhere DNA-Affinitäten auf als die analogen Thiophen-pyrrol-Derivate. Aus der graphischen Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe lässt sich ableiten, dass die schwächere DNA-Bindung der Interkalatorgekoppelten Thiophen-pyrrolcarboxamide sehr wahrscheinlich durch die im Vergleich zu den bioisosteren Combilexinen divergente Stellung der N-terminalen Amidbindung bedingt ist. Diese besondere Molekülkonformation der Thiophen-Derivate resultiert aus der van der Waals-Abstoßung zwischen der amidischen Carbonyl-Funktion und dem an Position 5 befindlichen Methyl-Substituenten des Thiophen-Rings (Abb. 6.44, Seite 230; Abb. 6.45, Seite 231). Diese Abstoßungsreaktion schwächt die DNA-Ligand-Interaktionen, da die NH-Gruppe der N-terminalen Amidbindung, die bei den Thiophen-Derivaten im Gegensatz zu den bioisosteren Analoga zur konvexen Molekülseite ausgerichtet ist, nicht als H-Brücken-Donator fungieren kann. Darüber hinaus wird die synchrone Einlagerung des interkalierenden und des rinnenbindenden Strukturelements durch die der kleinen Rinne zugewandte, amidische CO-Funktion sterisch behindert.
- Aus den mit poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA durchgeführten Schmelzpunkt-Studien geht hervor, dass die Majorität der getesteten Imidazol-pyrrol-Derivate eine im Vergleich zu den Bispyrrol- und den Thiazol-pyrrol-Analoga schwächere DNA-Affinität besitzt. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die negative Partiaalladung des sp<sup>2</sup>-hybridisierten N-Atoms des Imidazol-Rings zurückzuführen, die das ansonsten positive elektrostatische Potential der konkaven Molekülseite unterbricht und sich somit störend auf die Einlagerung der rinnenbindenden Fünf-

ring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Struktur in die aus AT-Basenpaaren aufgebaute, elektronenreiche kleine Furche auswirkt.

- Die berechneten Relationen der unter Verwendung von Thymus-DNA ermittelten  $\Delta T_m$ -Werte zu den mit poly(dAdT)<sub>2</sub>-DNA bestimmten Werten zeigen, dass das Imidazol-pyrrol-Derivat **38** und die Bisimidazol-Verbindung **42** (Kapitel 8.1.2, Seiten 316-317) die Toleranz für GC-reiche DNA aufweisen, die mit ihrem Design angestrebt werden sollte. Dieses Resultat liegt unter anderem in den H-Brücken-Akzeptor-Eigenschaften des sp<sup>2</sup>-hybridisierten, der konkaven Molekülseite zugewandten Imidazol-N-Atoms begründet, das eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu der exozyklischen Amino-Gruppe einer Guanin-Base ausbilden kann. Da die anderen getesteten Substanzen der Imidazol-pyrrol- bzw. Bisimidazol-Reihe keine Präferenz für die Interaktion mit GC-reichen DNA-Abschnitten besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere, bislang unbekannte Molekülstrukturen und/oder molekulare Eigenschaften die Sequenzselektivität der DNA-Bindung der Combilexine beeinflussen.
- Aus der graphischen Auswertung der simulierten DNA-Ligand-Komplexe und aus den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen geht hervor, dass die Länge des N-terminalen Linkers, die eine spannungsfreie DNA-Bindung sowohl des interkalierenden, als auch des rinnenbindenden Molekülteils ermöglicht, von der Struktur des vorliegenden Interkalators abhängig ist. So erwies sich ein C3-Linker für die Verknüpfung des Naphthalimids mit dem Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Strukturelement als am besten geeignet, während bei den Acridon-Derivaten die Verbindungen mit einem Buttersäure-Linker die höchste DNA-Affinität zeigen. Dieses Resultat ist höchstwahrscheinlich auf die im Vergleich zu dem Naphthalimid-Molekül geringere y-Achsen-Ausdehnung (→ bezogen auf ein mathematisches x/y-Koordinatensystem) des Acridons zurückzuführen.
- Bei den Hybrid-Molekülen der Thiophen-pyrrol- und der Imidazol-pyrrol-Reihe führten das Naphthalimid und das Acridon trotz signifikant unterschiedlicher E<sub>LUMO</sub>-Werte – bei idealer Länge des N-terminalen Linkers – zu Verbindungen, die bei den T<sub>m</sub>-Wert-Messungen nahezu die gleichen DNA-Aktivitäten aufwiesen. Die Eignung des 5-Nitronaphthalimids als interkalierendes Strukturelement von Combilexin-Derivaten kann noch nicht abschließend beurteilt

werden, da keine Testsubstanzen mit einem C3-Linker, der für die Anbindung des Nitronaphthalimid-Moleküls voraussichtlich am besten geeignet wäre, zur Verfügung standen.

#### Hetaren[a]anellierte Carbazole:

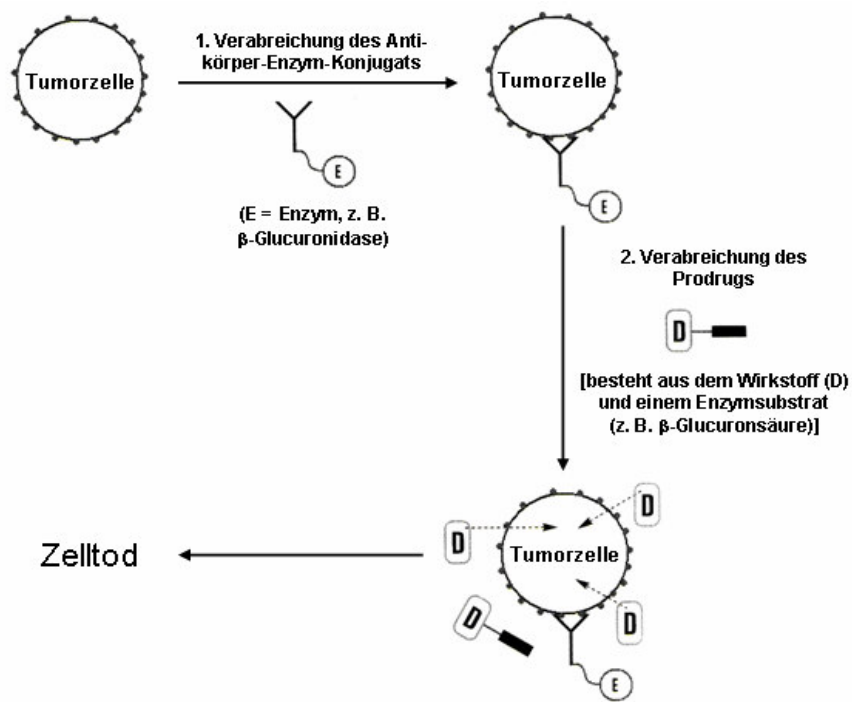
- Im Gegensatz zu den Carbazol-Derivaten mit einer Methylester- oder einer Natriumcarboxylat-Funktion, besitzen die Verbindungen, die mit einer N,N-Dimethylaminoalkyl-carboxamid-Struktur substituiert sind, mittels  $T_m$ -Wert-Messungen detektierbare DNA-Affinitäten. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein einer bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegenden, amidischen Seitenkette für das Design und die Synthese von DNA-aktiven Hetaren[a]anellierten Carbazolen von großer Wichtigkeit ist. Bislang kann allerdings noch keine Aussage darüber gemacht werden, welche Kettenlänge eine optimale DNA-Ligand-Interaktion bedingt, da bei den chlorierten Pyrido[a]carbazolen die Verbindung mit der Propyl-Kette (Verbindung **52**), bei den unsubstituierten Analoga dagegen das Derivat mit der Ethyl-Struktur (Verbindung **49**; Kapitel 8.1.2, Seite 318) die jeweils größere DNA-Bindungsstärke aufweist.
- Die Resultate der DNA-Denaturierungsexperimente und der NCI-Zytotoxizitätstests deuten darauf hin, dass die Thieno-Derivate bei gleicher DNA-Affinität stärker antineoplastisch wirksam sind als die analogen Pyrido[a]anellierten Carbazole. Möglicherweise besitzen die Thieno-Verbindungen – aufgrund ihrer durch den Einfluss des Schwefelatoms gesteigerten Lipophilie – die im Vergleich zu den Pyrido-Derivaten besseren Zellmembran-penetrierenden Fähigkeiten.
- Aus den  $T_m$ -Wert-Messungen und den NCI-Zytotoxizitätstests geht hervor, dass die Chlorierung des endständigen Benzol-Rings der Pyrido[a]anellierten Carbazole eine signifikante Zunahme der DNA-Affinität, sowie der zellbiologischen Wirksamkeit der resultierenden Derivate zur Folge hat. Allerdings sind die Ursachen für diese Aktivitätssteigerung zurzeit noch unklar. So kann bislang lediglich vermutet werden, dass das Chlor-Atom eine Veränderung der Elektronenstruktur des Pyridocarbazol-Chromophors hervorruft, die mit Hilfe quantenmechanischer Rechnungen nicht erfassbar ist.

Die Korrelation der aus den biophysikalischen und biochemischen Tests resultierenden Befunde mit den mittels computergestützten Simulationen erhobenen Daten machen – ebenso wie die daraus abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen – deutlich, dass die Molecular Modelling-Verfahren nicht alle Beobachtungen erklären und demzufolge die *in vitro*-Experimente nicht ersetzen können. Dennoch leisten die *in silico*-Studien einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der DNA-Ligand-Interaktionen und somit zur Rationalisierung und Optimierung des Designs und der Synthese neuer, potentiell aktiverer Derivate.

Aufgrund der viel versprechenden DNA-bindenden Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Combilexin- und Hetaren[a]carbazol-Verbindungen sollten sich auch zukünftige Arbeiten mit der Entwicklung weiterer, strukturell modifizierter Derivate dieser beiden Stoffklassen befassen. Bei den Hybrid-Molekülen bietet sich vor allem das Design von Verbindungen an, die neue, für die Combilexin-Synthese bislang noch nicht verwendete Interkalator-Komponenten enthalten. Mit Hilfe von Docking-Studien könnte die Linkerlänge, die für die Verknüpfung eines zur Darstellung neuer Combilexin-Derivate ausgewählten Interkalator-Moleküls mit der Fünfring-Hetaren-pyrrolcarboxamid-Struktur am besten geeignet wäre, noch während der Syntheseplanung evaluiert werden. Zudem wäre die Darstellung von 5-Nitronaphthalimid-Verbindungen mit N-terminalen Propionsäure-Linkern empfehlenswert, um den Einfluss, den ein elektronenziehender Substituent auf die DNA-Bindung der Hybrid-Moleküle ausübt, genauer untersuchen zu können. Des Weiteren könnte die DNA-Affinität der Combilexine mit Thiophen-pyrrol-Struktur möglicherweise durch die Entfernung der an Position 5 des Thiophen-Rings befindlichen Methyl-Gruppe gesteigert werden. Diese strukturelle Modifikation würde das Auftreten der besonderen, nur bei den Thiophen-Derivaten vorhandenen Stellung der N-terminalen Amidbindung, die als Folge der van der Waals-Abstoßung zwischen dem Methyl-Substituenten und der amidischen CO-Funktion zustande kommt und die Einlagerung der Thiophen-pyrrolcarboxamid-Struktur in die kleine Rinne der DNA sterisch behindert, unterbinden. Zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit, zur Steigerung der DNA-Aktivität, sowie zur Veränderung der Sequenzselektivität der DNA-Bindung könnten bei der Combilexin-Synthese neben Pyrrol, Thiophen, Thiazol und Imidazol zudem noch weitere Fünfring-Heterozyklen wie z. B. Furan, Oxazol oder Pyrazol eingesetzt werden. Bei den Hetaren[a]carbazolen wäre vor allem die Synthese weiterer Thieno-Derivate sinnvoll, da diese in den zellbiologischen Tests des NCI viel versprechende zyto-

toxische Eigenschaften aufwiesen. Um Aussagen darüber machen zu können, wie sich ein Substituent auf die DNA-Affinität der Hetaren[a]anellierten Carbazole auswirkt, sollten zudem weitere Verbindungen mit bislang noch nicht verwendeten funktionellen Gruppen (z. B. Hydroxy-, Methoxy-, Amino- oder Nitro-Gruppe) dargestellt und ihre DNA-bindenden Eigenschaften untersucht werden.

Neben den beschriebenen strukturellen Modifikationen könnten zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit, sowie zur Steigerung der Tumorzellspezifität *Prodrugs* (z. B. Antikörper-Konjugate <sup>[284,285]</sup>) der am stärksten DNA-bindenden Liganden der Combi-lexin- und der Hetaren[a]carbazol-Reihe synthetisiert werden. Eine besonders elegante Methode der Antikörpertherapie stellt dabei die von *Tietze et. al.* entwickelte ADEPT-Strategie (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) dar <sup>[82,286-289]</sup> (Abb. 7.2). Im Rahmen dieses Konzepts wird ein kovalenter Komplex, der sich aus einem Enzym (z. B.  $\beta$ -Glucuronidase) und einem tumorzellspezifischen Antikörper zusammensetzt, gemeinsam mit einem *Prodrug* verabreicht, welches aus der Wirksubstanz und einem Enzymsubstrat (z. B.  $\beta$ -Glucuronsäure) besteht <sup>[82,286-289]</sup>. Nach der Bindung des Antikörpers an das Tumor-assoziierte Antigen katalysiert das Enzym durch den Abbau des im *Prodrug* befindlichen Substrats die Freisetzung des Zytostatikums, das daraufhin in die Tumorzelle eindringen kann <sup>[82,286-289]</sup>.

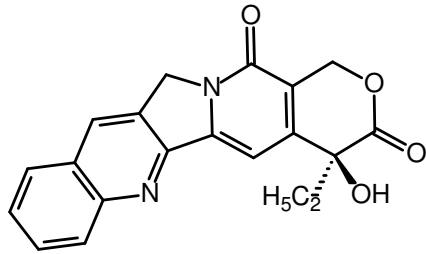


**Abb. 7.2:** Schematische Darstellung des von *Tietze* entwickelten ADEPT-Konzepts (nach Kratz <sup>[82]</sup>)

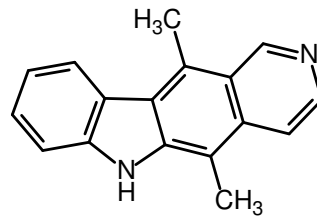
## 8. Anhang

### 8.1 Strukturformeln

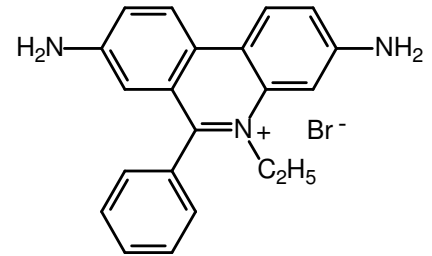
#### 8.1.1 Referenzsubstanzen



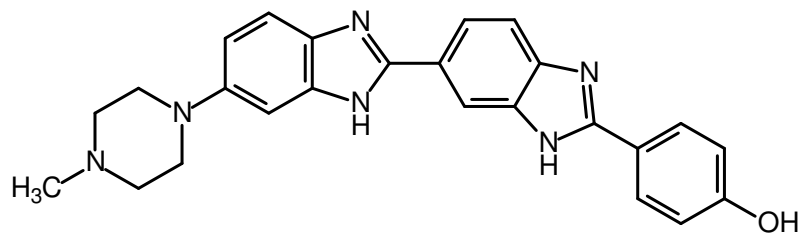
Camptothecin



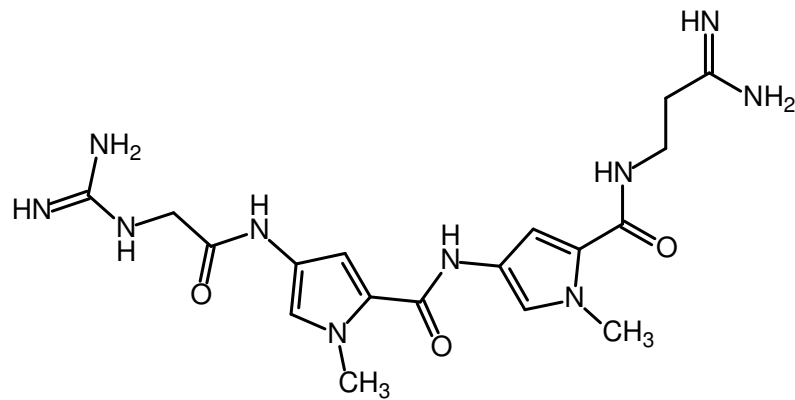
Ellipticin



Ethidiumbromid

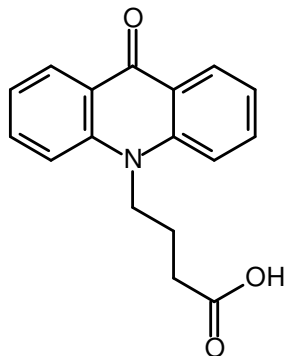


Hoechst 33258

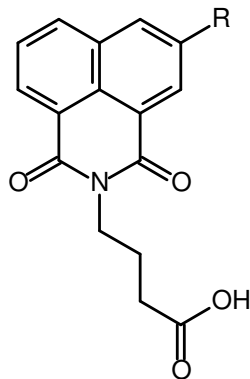


Netropsin

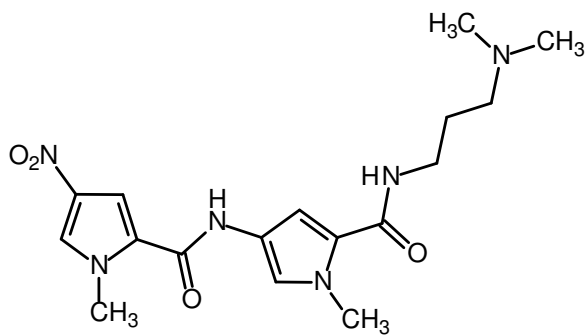
## 8.1.2 Testsubstanzen



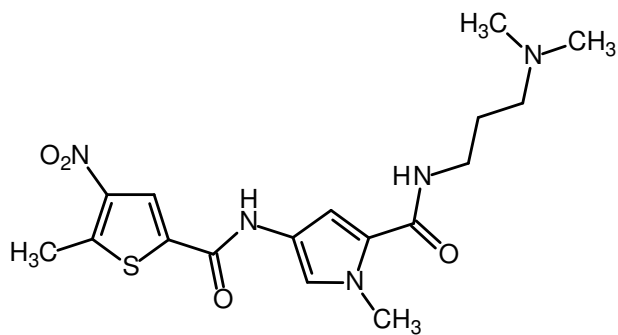
**1**



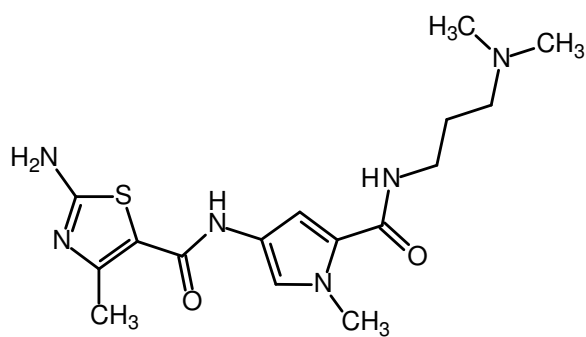
	<b>R</b>
<b>2</b>	-H
<b>3</b>	-NO <sub>2</sub>



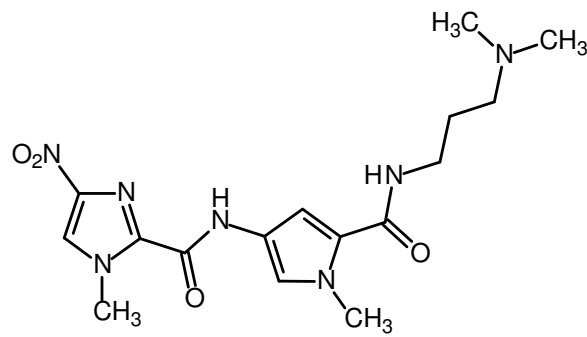
**4**



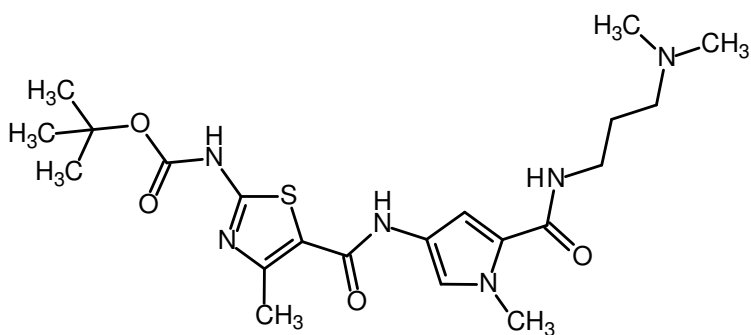
**5**



**7**

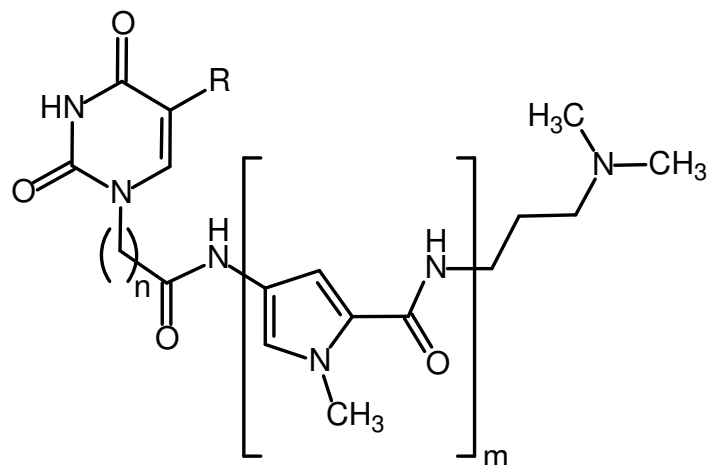


**8**

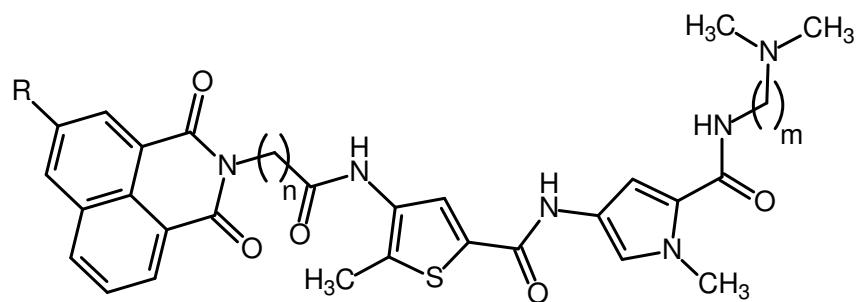


**6**

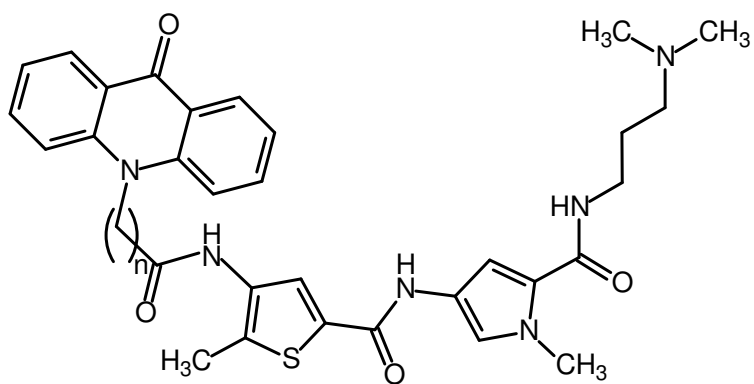




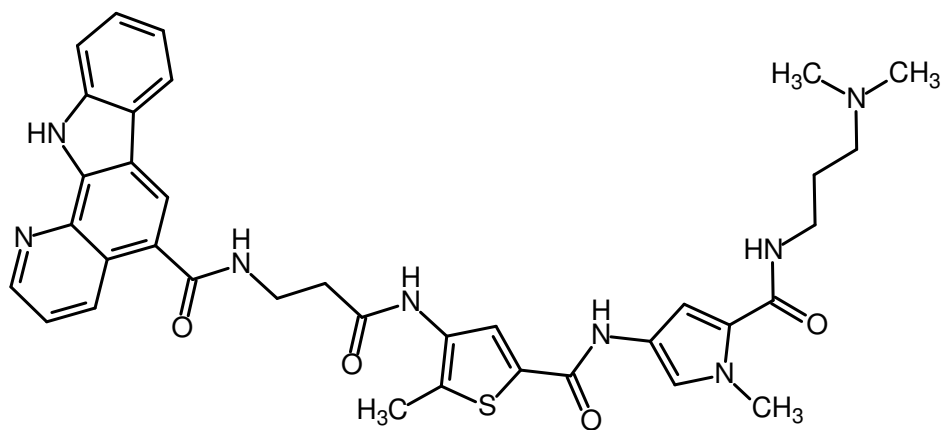
	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>R</b>
<b>9</b>	1	1	-H
<b>10</b>	2	1	-H
<b>11</b>	3	1	-H
<b>12</b>	1	2	-H
<b>13</b>	2	2	-H
<b>14</b>	3	2	-H
<b>15</b>	1	1	-CH <sub>3</sub>
<b>16</b>	2	1	-CH <sub>3</sub>
<b>17</b>	3	1	-CH <sub>3</sub>
<b>18</b>	1	2	-CH <sub>3</sub>
<b>19</b>	2	2	-CH <sub>3</sub>
<b>20</b>	3	2	-CH <sub>3</sub>
<b>21</b>	5	2	-CH <sub>3</sub>



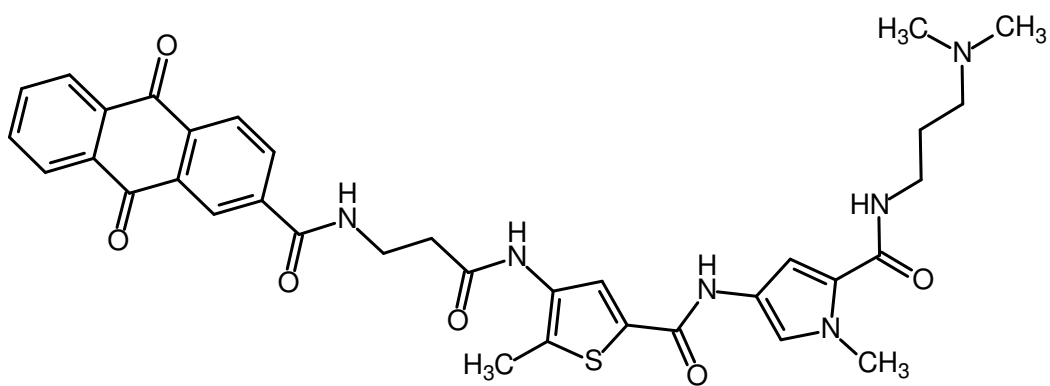
	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>R</b>
<b>22</b>	1	3	-H
<b>23</b>	2	3	-H
<b>24</b>	3	3	-H
<b>25</b>	4	3	-H
<b>26</b>	5	3	-H
<b>27</b>	3	3	-NO <sub>2</sub>
<b>28</b>	3	2	-H



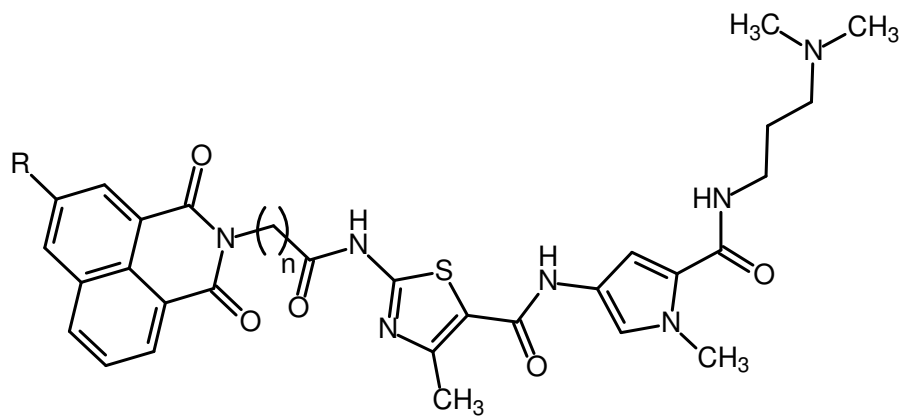
	<b>n</b>
<b>29</b>	2
<b>30</b>	3



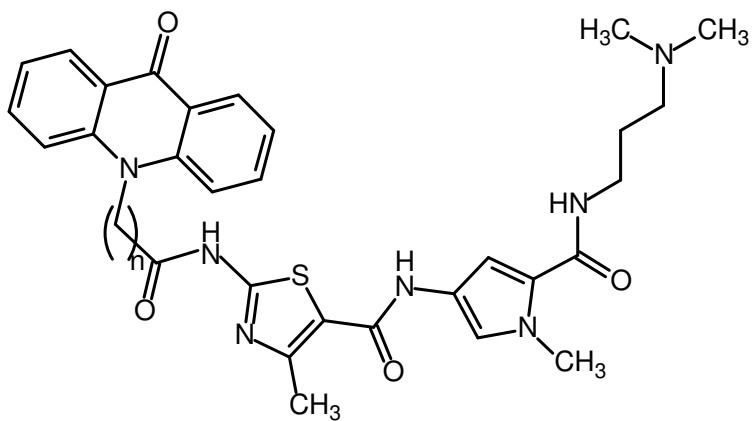
**31**



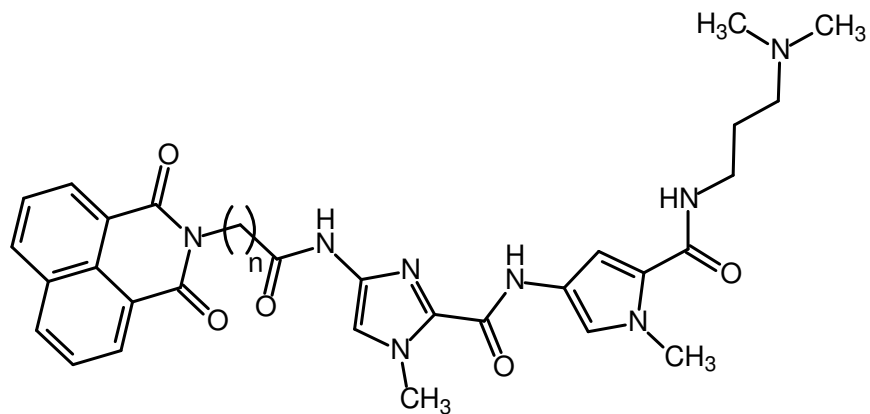
**32**



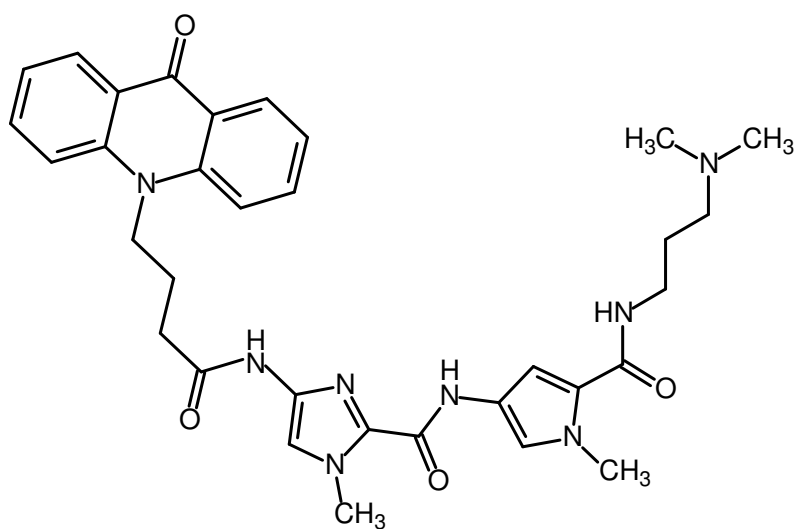
	<b>n</b>	<b>R</b>
<b>33</b>	2	-H
<b>34</b>	3	-H
<b>35</b>	3	-NO <sub>2</sub>



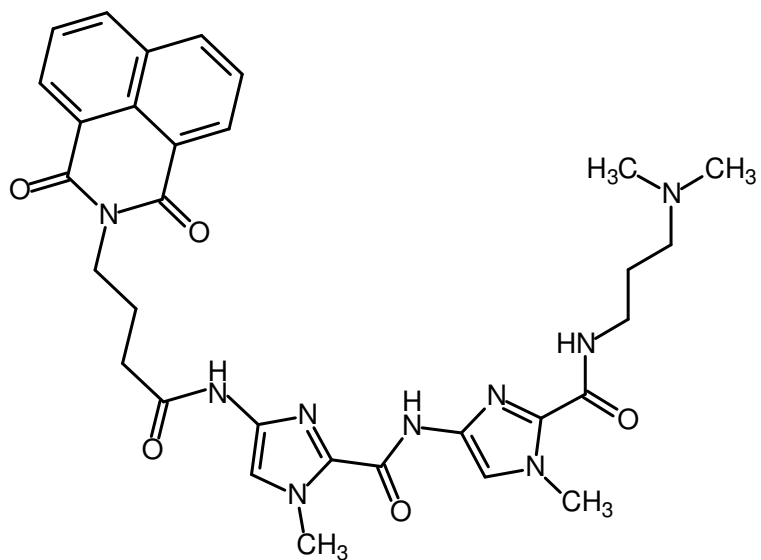
	<b>n</b>
<b>36</b>	2
<b>37</b>	3



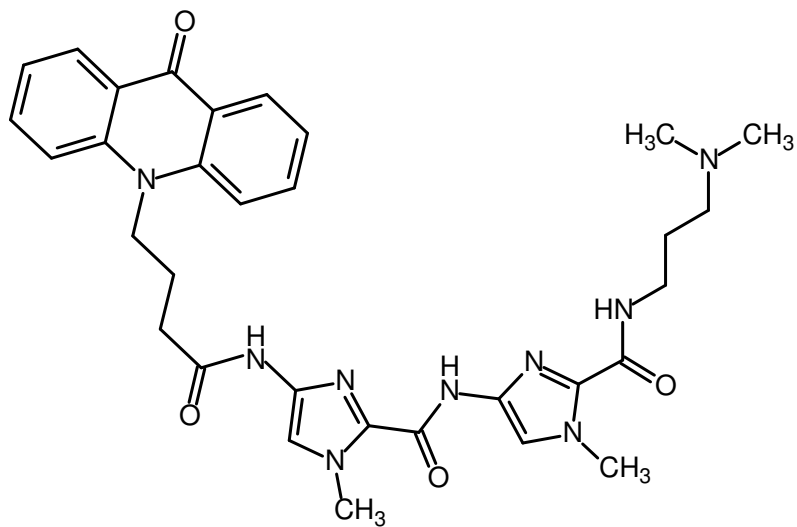
	<b>n</b>
<b>38</b>	2
<b>39</b>	3



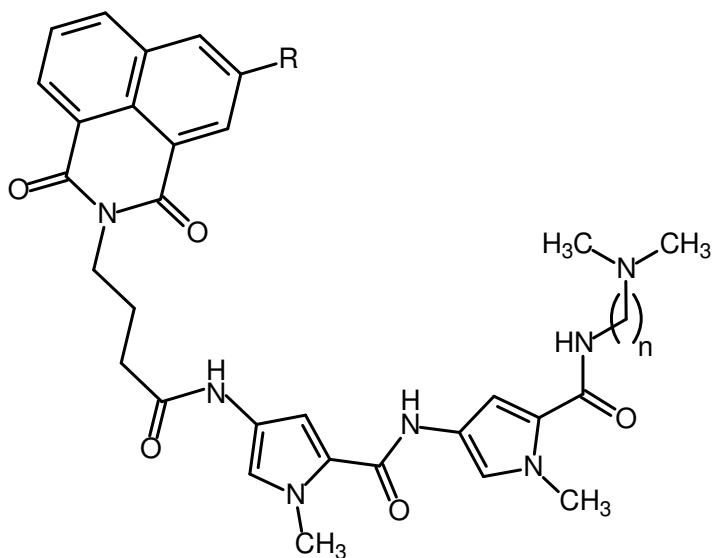
**40**



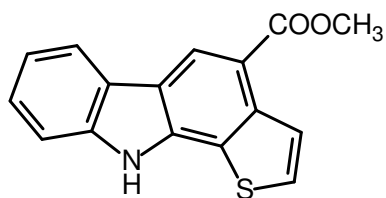
**41**



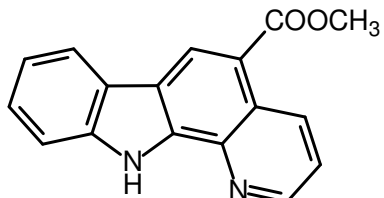
**42**



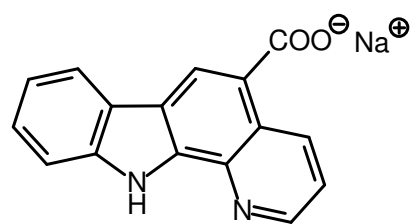
	<b>n</b>	<b>R</b>
<b>43</b>	3	-H
<b>44</b>	3	-NO <sub>2</sub>
<b>45</b>	2	-H



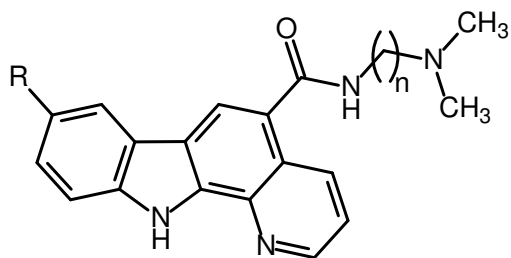
**46**



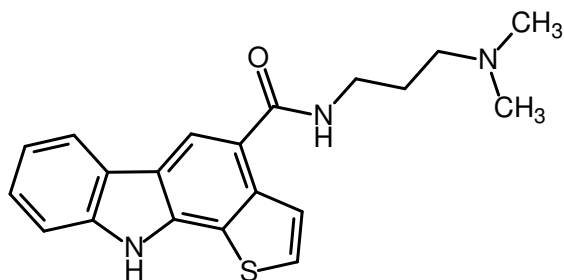
**47**



**48**



	<b>n</b>	<b>R</b>
<b>49</b>	2	-H
<b>50</b>	3	-H
<b>51</b>	2	-Cl
<b>52</b>	3	-Cl



**53**

## 8.2 Dateiformate, die die Kompatibilität der verschiedenen Molecular Modelling-Programme ermöglichen

### 8.2.1 Überführung der SPARTAN-Dateien in HYPERCHEM- und in ICM-PRO-Dateien

Datei des Liganden (Minimumskonformer der Testverbindung) mit dem Programm SPARTAN<sup>[35]</sup> öffnen (\*.spartan-Format)



Speichern als \*.sdf-Datei



Öffnen der \*.sdf-Datei mit dem Programm WEBLAB VIEWER PRO<sup>[290]</sup>



Speichern als \*.mol-Datei



Öffnen der \*.mol-Datei mit dem Programm HYPERCHEM<sup>[34]</sup>



Speichern als \*.ml2-Datei



Öffnen der \*.ml2-Datei mit dem Programm ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>



Speichern als \*.ob-Datei



Datei schließen



Öffnen der \*.ob-Datei mit ICM-PRO<sup>[32,33]</sup>



Manuelle Korrektur der Ladungen und Doppelbindungen



Molekül konvertieren (ICM-PRO-Befehl<sup>[32,33]</sup> zur Erzeugung einer ICM-PRO-kompatiblen Datei<sup>[32,33]</sup>, die in den Docking-Simulationen als Ligand eingesetzt werden kann)



Speichern als \*.ob-Datei

## 8.2.2 Überführung der ICM-PRO-Dateien in HYPERCHEM- und in SPARTAN-Dateien

Datei des DNA-Ligand-Komplexes mit dem Programm ICM-PRO <sup>[32,33]</sup> öffnen (\*.icb-Format)



Molekül des Rezeptors und Molekül des Liganden zu einem einzigen Objekt vereinigen (→ im sog. *Workspace Panel* den Namen des Liganden anklicken und bei gedrückter linker Maustaste auf den Namen des Rezeptors ziehen)



Speichern des Objekts als \*.mol2-Datei (→ im *Workspace Panel* den Namen des Objekts mit der rechten Maustaste anklicken und „Save as“ - Option auswählen)



Öffnen der \*.mol2-Datei mit dem Programm WEBLAB VIEWER PRO <sup>[290]</sup>



Speichern als \*.mol-Datei



Öffnen der \*.mol-Datei mit dem Programm HYPERCHEM <sup>[34]</sup>



Speichern als \*.hin-Datei



Löschen des Rezeptors



Speichern des DNA-gebundenen Konformers als \*.ml2-Datei



Öffnen der \*.ml2-Datei mit dem Programm MS VIEWER PRO <sup>[290]</sup>



Speichern als \*.mol-Datei



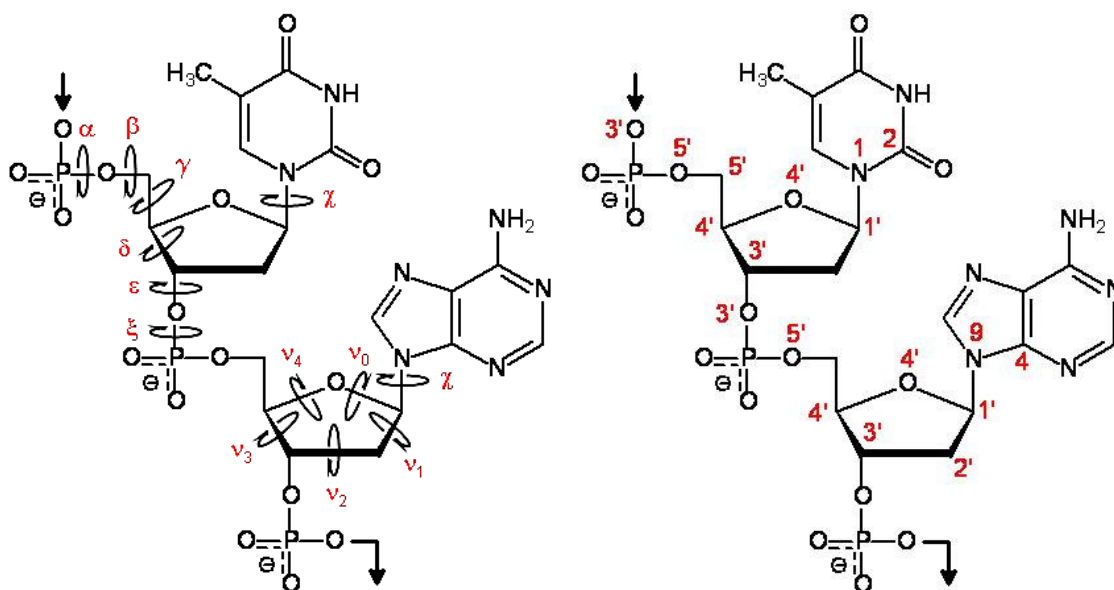
Öffnen der \*.mol-Datei mit dem Programm SPARTAN <sup>[35]</sup>



Speichern als \*.spartan-Datei



### 8.3 Winkel der als Rezeptoren verwendeten DNA-Oligomere vor und nach den zur Energieminimierung durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen



**Abb. 8.1:** Schematische Darstellung der Torsionswinkel, die zur Untersuchung der Molekülkonformationen der DNA-Oligomere gemessene wurden (links), sowie der für die Winkelmessungen benötigten Atome mit ihrer Nummerierung (rechts; nach Saenger<sup>[42]</sup>)

Torsionswinkel	Zugehörige Atome	Torsionswinkel	Zugehörige Atome
$\alpha$	$(n-1)O_3'-P-O_5'-C_5'$	$\nu_1$	$O_4'-C_1'-C_2'-C_3'$
$\beta$	$P-O_5'-C_5'-C_4'$	$\nu_2$	$C_1'-C_2'-C_3'-C_4'$
$\gamma$	$O_5'-C_5'-C_4'-C_3'$	$\nu_3$	$C_2'-C_3'-C_4'-O_4'$
$\delta$	$C_5'-C_4'-C_3'-O_3'$	$\nu_4$	$C_3'-C_4'-O_4'-C_1'$
$\epsilon$	$C_4'-C_3'-O_3'-P$	$\chi$	$O_4'-C_1'-N_1-C_2'$ (für Pyrimidine)
$\xi$	$C_3'-O_3'-P-O_5'(n+1)$		$O_4'-C_1'-N_9-C_4'$ (für Purine)
$\nu_0$	$C_4'-O_4'-C_1'-C_2'$		

**Tab. 8.1:** Atome, die für die Messung der verschiedenen Torsionswinkel jeweils benötigt werden (nach Saenger<sup>[42]</sup>)

(n-1): Das bezeichnete Atom gehört zu dem vorhergehenden Nukleotid.

(n+1): Das bezeichnete Atom gehört zu dem folgenden Nukleotid.

### 8.3.1 Rezeptor „polyA“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1JKQ <sup>[265]</sup>

Sequenz: 5'-D(\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*TP\*A)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-T	-	178,7	55,8	135,2	-172,2	-100,5	-110,5	-18,8	28,4	-26,9	16,4	1,5
T	-57,0	166,7	53,2	126,7	-158,1	-118,0	-120,1	-36,4	40,3	-28,6	8,4	17,5
T	-48,3	160,5	46,5	131,3	-160,4	-108,4	-105,2	-28,0	36,4	-30,8	15,2	8,0
T	-64,3	160,7	55,8	119,1	163,7	-99,9	-115,5	-38,0	37,4	-22,7	1,3	23,0
T	-41,4	-160,0	44,9	143,6	170,5	-75,1	-111,6	-8,1	25,0	-30,9	27,1	-12,2
T	-85,4	-162,1	50,6	139,4	-140,1	-165,8	-94,4	-31,5	40,1	-33,4	16,0	9,4
A-3'	-48,1	126,2	61,1	130,0	-	-	-123,6	-30,3	38,6	-32,5	15,3	9,3

Tab. 8.2: Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „polyA“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-T	-	178,1	42,2	140,6	-131,1	-177,0	-107,1	-25,2	38,3	-36,0	22,0	1,9
A	-9,3	105,9	33,6	137,3	-164,7	-137,3	-94,1	-29,8	40,5	-35,6	19,2	6,5
A	-58,4	164,8	52,9	136,0	176,0	-95,6	-102,1	-17,2	28,6	-28,9	19,3	-1,4
A	-69,4	179,8	54,8	141,4	-110,4	168,9	-107,9	-30,3	39,9	-34,0	17,5	7,8
A	-45,0	112,8	50,9	130,5	-145,2	-118,3	-125,3	-39,0	43,4	-32,0	9,9	17,9
A	-57,0	159,9	39,9	139,2	-150,0	-114,6	-91,7	-24,0	37,1	-35,6	22,5	0,8
A-3'	15,9	-140,7	-88,8	132,9	-	-	-129,5	-2,5	11,3	-15,2	13,9	-7,3

Tab. 8.3: Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „polyA“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-T</b>	-	179,3	60,1	132,8	-178,5	-98,5	-108,7	-21,2	29,5	-24,7	12,7	5,1
<b>T</b>	-69,8	172,5	63,9	118,8	-167,0	-106,8	-117,5	-40,5	43,1	-27,2	3,7	23,2
<b>T</b>	-69,3	170,5	61,1	121,6	-169,1	-97,5	-110,5	-37,8	35,8	-19,5	-2,7	25,6
<b>T</b>	-70,9	162,5	63,9	106,5	159,2	-89,6	-127,9	-41,0	34,9	-15,9	-8,1	31,5
<b>T</b>	-58,2	-165,1	60,3	141,4	-175,6	-91,9	-113,9	-16,5	34,1	-36,7	28,6	-7,7
<b>T</b>	-71,3	-171,4	42,9	141,2	-143,9	-167,1	-86,8	-38,2	47,3	-37,8	16,5	13,7
<b>A-3'</b>	-53,9	126,6	64,9	131,7	-	-	-125,0	-39,4	45,1	-30,9	9,7	19,1

**Tab. 8.4:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors "polyA" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-T</b>	-	-178,8	54,2	144,5	-135,2	178,7	-103,0	-25,7	39,8	-36,7	23,1	1,2
<b>A</b>	0,6	94,4	41,9	131,7	-170,7	-133,7	-84,8	-38,0	46,5	-35,5	15,3	14,5
<b>A</b>	-69,2	168,2	61,4	137,9	-173,2	-105,8	-99,7	-17,4	30,9	-29,9	21,6	-2,6
<b>A</b>	-67,7	170,6	54,8	142,7	-102,7	166,8	-109,0	-37,7	47,2	-37,7	17,4	12,6
<b>A</b>	-56,0	115,8	53,4	121,3	-156,6	-101,9	-127,1	-42,3	41,4	-23,7	0,3	26,0
<b>A</b>	-75,2	171,9	54,9	134,8	-158,3	-116,7	-89,8	-30,0	37,2	-29,6	13,3	11,0
<b>A-3'</b>	29,2	-154,9	-100,3	145,5	-	-	-136,7	3,2	13,2	-22,1	23,5	-17,5

**Tab. 8.5:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors "polyA" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

### 8.3.2 Rezeptor „polyAT“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 473D <sup>[266]</sup>

Sequenz: 5'-D(\*GP\*TP\*AP\*TP\*AP\*TP\*AP\*C)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	157,2	40,8	144,3	-172,3	-96,0	-105,5	-11,2	27,3	-34,1	26,1	-8,9
T	-70,3	178,3	42,0	132,5	-116,5	-175,7	-99,3	-39,0	44,5	-35,5	11,4	17,3
A	-65,3	150,7	41,2	133,9	174,4	-70,7	-104,1	-16,1	25,7	-25,6	15,3	0,5
T	-81,3	-176,9	55,6	136,6	-111,8	-176,9	-105,2	-43,3	50,8	-41,4	15,9	17,4
A	-49,3	152,2	26,1	137,7	-177,7	-92,5	-101,2	-8,2	19,4	-23,6	17,9	-5,9
T	-60,8	170,9	37,8	108,9	-173,0	-92,6	-112,5	-39,5	32,6	-15,2	-9,0	30,1
A	-61,5	162,8	55,7	112,3	-167,7	-96,0	-117,6	-40,3	33,8	-16,4	-7,5	30,1
C-3'	-56,8	167,6	43,3	133,6	-	-	-107,9	-39,7	46,2	-37,4	13,7	16,7

**Tab. 8.6:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „polyAT“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	134,3	31,5	102,2	-158,5	-73,3	-170,7	-6,2	-5,6	14,9	-18,1	14,9
T	-70,0	-163,2	55,7	144,7	-159,1	-123,7	-113,4	-20,8	35,0	-38,1	24,5	-1,8
A	-69,6	-173,2	43,2	141,5	-175,2	-94,8	-101,3	-15,5	30,4	-34,4	24,0	-5,1
T	-62,3	172,2	47,7	138,9	-99,6	168,1	-98,4	-40,5	50,4	-43,0	18,7	14,2
A	-75,5	146,3	49,6	137,9	-164,5	-92,3	-113,0	-13,6	27,7	-31,5	22,1	-5,2
T	-54,1	165,2	39,5	104,9	-177,1	-94,2	-120,9	-40,7	30,2	-9,8	-14,8	34,3
A	-60,5	-171,4	48,6	142,2	-164,8	-88,0	-91,6	-12,8	28,4	-33,0	24,6	-7,2
C-3'	-70,1	171,4	35,7	94,3	-	-	-104,9	-38,2	19,7	5,1	-27,1	41,1

**Tab. 8.7:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „polyAT“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	162,2	42,2	149,9	-173,8	-95,0	-99,4	-18,5	36,3	-38,8	28,8	-6,7
T	-76,1	-178,6	50,3	141,4	-117,0	173,5	-92,5	-44,2	51,5	-38,8	14,2	18,5
A	-68,9	148,3	45,3	136,4	178,4	-81,4	-99,2	-26,3	37,6	-33,4	19,4	5,3
T	-78,2	175,5	62,3	139,0	-109,0	172,6	-101,8	-51,2	56,8	-36,9	8,2	26,7
A	-65,6	153,1	42,2	133,8	-178,3	-92,6	-100,5	-16,2	29,5	-30,1	22,3	-3,6
T	-63,4	173,7	49,9	109,1	-174,9	-89,9	-109,4	-41,1	36,7	-17,9	-6,7	30,8
A	-63,4	163,8	61,3	110,7	-172,1	-92,6	-115,8	-41,8	36,9	-17,9	-6,0	31,6
C-3'	-65,0	171,9	52,9	134,2	-	-	-109,2	-45,5	50,4	-34,1	9,2	22,6

**Tab. 8.8:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors "polyAT" nach der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	130,5	45,9	99,0	-160,9	-74,7	-170,5	-10,7	-6,8	20,0	-27,3	24,2
T	-73,2	-167,8	60,6	147,4	-161,0	-125,5	-110,8	-25,8	41,4	-39,5	25,8	0,5
A	-68,8	-175,3	46,9	140,7	-178,1	-92,4	-101,5	-21,5	34,7	-33,0	22,2	0,1
T	-69,1	170,8	59,8	140,9	-100,7	161,8	-100,7	-43,9	54,1	-41,0	15,8	18,2
A	-77,6	148,0	48,7	137,4	-168,4	-92,1	-109,5	-22,1	32,0	-28,8	17,3	3,4
T	-60,7	161,8	54,4	99,0	179,4	-93,1	-124,5	-47,3	36,6	-11,7	-17,7	41,9
A	-62,8	-169,5	51,1	142,8	-169,3	-87,7	-87,6	-17,1	30,6	-30,8	22,4	-3,0
C-3'	-71,4	166,7	44,1	93,6	-	-	-99,0	-38,3	18,0	7,8	-31,0	43,3

**Tab. 8.9:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors "polyAT" nach der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

### 8.3.3 Rezeptor „polyG“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1NVP <sup>[267]</sup>

Sequenz: 5'-D(\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*GP\*C)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	-151,0	-26,7	108,4	175,8	-55,6	-133,5	0,5	-14,2	21,2	-21,3	13,4
G	-103,6	174,1	84,9	109,1	-163,9	-96,7	-125,3	-7,8	-8,6	20,2	-25,2	21,0
G	-62,5	179,0	43,7	117,7	58,3	51,9	-98,7	-9,4	15,3	-15,4	10,1	-0,5
G	-168,0	-153,2	60,2	151,5	-45,1	142,6	-84,7	-23,1	37,7	-36,6	24,2	-0,8
G	-81,9	147,6	13,1	123,7	156,7	-90,3	-100,8	-21,5	28,5	-24,5	12,4	5,7
G	-84,4	-165,0	65,9	107,1	161,0	-56,8	-123,5	-7,6	-10,1	22,3	-27,2	22,2
G	-89,1	-170,3	53,2	103,5	170,3	-74,5	-135,1	-13,0	-6,4	21,7	-29,5	26,9
C-3'	-70,1	-170,0	45,7	101,1	-	-	-146,3	-7,5	-12,6	26,4	-31,1	24,5

**Tab. 8.10:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „polyG“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-G	-	147,1	53,9	132,6	-157,6	-105,7	-122,7	-25,4	32,7	-27,5	13,3	7,5
C	-55,6	164,7	46,8	128,8	-155,5	-129,9	-114,8	-32,5	38,8	-30,0	11,9	12,8
C	-14,2	162,3	-4,4	106,6	174,0	-66,0	-135,1	1,2	-15,7	22,9	-22,6	13,8
C	-83,1	-178,3	69,4	148,1	-137,0	-125,8	-114,1	-27,1	41,2	-39,0	24,4	1,4
C	-79,0	157,8	36,2	103,7	20,9	84,9	-122,8	-13,4	-7,4	23,6	-31,5	28,6
C	-158,5	-179,2	66,9	106,0	169,2	-59,4	-120,1	-3,0	-12,7	22,2	-24,3	17,4
C	-86,4	-160,3	61,3	162,2	-69,2	120,3	-76,4	-18,5	37,5	-41,1	31,7	-8,4
C-3'	105,7	-152,6	165,4	163,2	-	-	112,3	-12,1	32,3	-38,9	33,0	-13,2

**Tab. 8.11:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „polyG“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-G</b>	-	-175,5	-66,4	144,7	-167,6	-116,2	-109,4	-29,4	41,5	-37,1	21,6	4,6
<b>G</b>	-83,1	162,2	74,9	107,8	-167,3	-94,9	-121,9	-22,1	11,7	2,5	-15,7	23,1
<b>G</b>	-72,3	-177,3	56,4	126,0	44,0	59,5	-91,2	-7,1	13,8	-14,8	11,4	-2,8
<b>G</b>	-166,5	-160,0	69,0	156,2	-74,4	156,5	-73,0	-27,3	42,5	-39,6	25,8	0,6
<b>G</b>	-82,5	156,6	23,6	133,0	174,7	-110,4	-100,5	-30,8	39,7	-31,7	14,1	10,8
<b>G</b>	-76,2	-179,9	66,9	111,4	-171,8	-83,0	-134,4	-23,4	20,6	-10,0	-5,0	18,5
<b>G</b>	-72,6	168,5	57,1	93,5	-175,2	-83,4	-152,9	-30,3	11,2	10,0	-27,3	37,6
<b>C-3'</b>	-69,9	177,2	55,8	88,8	-	-	149,0	-11,5	-9,7	25,0	-32,7	28,3

**Tab. 8.12:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors "polyG" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-G</b>	-	151,9	60,1	126,2	-169,1	-94,1	-122,0	-27,9	31,2	-21,7	6,3	13,4
<b>C</b>	-74,3	172,1	61,5	121,7	-167,8	-113,9	-115,2	-40,7	41,8	-27,2	3,4	23,2
<b>C</b>	-45,6	169,1	27,1	104,7	-172,6	-80,9	-141,5	-15,0	2,8	8,9	-17,5	21,1
<b>C</b>	-67,1	172,3	64,3	145,7	-137,3	-126,4	-106,4	-30,0	43,5	-38,9	22,9	4,5
<b>C</b>	-81,6	148,7	55,0	75,1	50,0	71,7	-132,5	-30,3	5,9	17,9	-36,1	42,1
<b>C</b>	-158,7	166,3	84,6	101,6	-174,3	-72,4	-116,6	-21,1	8,7	5,5	-18,2	25,1
<b>C</b>	-78,2	-176,7	68,8	155,9	-84,5	142,2	-76,3	-21,7	38,8	-38,8	29,3	-5,2
<b>C-3'</b>	85,7	-147,8	179,1	153,4	-	-	-119,3	-18,5	34,3	-35,7	26,6	-5,2

**Tab. 8.13:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors "polyG" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

### 8.3.4 Rezeptor „polyGC“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1CF7 <sup>[268]</sup>

Sequenz: 5'-D(\*TP\*CP\*GP\*CP\*GP\*CP\*GP\*G)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-T	-	-155,7	-76,6	156,8	176,9	-66,9	-116,3	-0,1	19,8	-30,6	31,0	-19,6
C	-85,8	-171,2	48,6	-132,6	-99,2	160,8	-100,5	-34,7	40,3	-30,7	11,8	13,9
G	-79,7	144,0	56,1	132,8	-178,5	-75,4	-114,1	-19,3	32,2	-32,2	21,6	-1,6
C	-41,0	-162,3	7,4	136,5	-163,5	-107,8	-103,0	-19,5	29,1	-27,3	16,6	1,7
G	-55,6	165,8	45,8	147,3	-116,5	162,2	-88,1	-27,7	41,9	-39,3	24,7	1,7
C	-62,7	143,2	45,4	135,9	-172,1	-50,4	-116,7	-20,5	31,8	-30,9	19,4	0,6
G	-151,5	101,8	162,4	143,7	-149,3	-114,9	-129,2	-16,8	31,0	-32,7	23,6	-4,4
G-3'	-54,7	160,9	46,6	134,6	-	-	-121,4	-24,9	34,4	-31,1	17,1	4,9

Tab. 8.14: Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „polyGC“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
5'-C	-	-160,4	-95,0	145,0	-166,0	-73,0	-126,7	-15,1	27,3	-28,3	20,3	-3,5
C	-89,3	178,4	56,7	137,0	-89,8	125,3	-106,8	-26,3	42,8	-32,3	12,5	14,4
G	112,6	-141,6	166,0	133,7	-153,9	-91,6	-139,1	-19,9	29,4	-28,2	16,7	1,8
C	73,4	-170,4	-110,7	139,3	-143,2	-103,9	-113,7	-16,3	26,3	-25,9	17,1	-0,6
G	-50,5	162,1	38,6	146,0	-117,5	167,0	-85,2	-30,4	44,5	-40,6	24,4	3,6
C	-61,8	145,1	43,8	138,4	-158,1	-98,1	-104,8	-22,0	34,5	-33,3	21,0	0,5
G	-67,3	167,2	50,0	147,0	-111,3	178,0	-85,5	-27,4	41,1	-38,8	23,9	2,0
A-3'	-70,7	137,9	48,5	143,5	-	-	-107,4	-33,2	44,0	-37,9	19,6	8,2

Tab. 8.15: Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „polyGC“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden



Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-T</b>	-	-163,0	-92,9	164,3	-165,3	-89,0	-118,4	-6,4	26,5	-36,1	33,1	-17,1
<b>C</b>	-81,0	171,3	55,0	122,5	-95,6	155,5	-107,2	-43,9	45,2	-28,1	3,3	25,4
<b>G</b>	-90,1	145,0	63,6	131,7	177,7	-80,2	-117,7	-30,3	41,9	-35,1	17,5	7,9
<b>C</b>	-77,9	174,4	62,0	104,5	-162,9	-100,0	-111,8	-43,4	39,8	-21,6	-3,2	29,3
<b>G</b>	-71,0	168,1	55,3	143,9	-108,1	155,3	-91,0	-37,2	45,8	-35,0	16,2	11,8
<b>C</b>	-76,1	146,3	52,9	136,9	-157,7	-55,5	-119,7	-26,3	37,8	-33,6	18,8	4,9
<b>G</b>	-127,7	77,3	168,5	141,5	-158,0	-105,6	-129,5	-18,0	32,9	-33,6	24,2	-4,1
<b>G-3'</b>	-69,9	167,5	59,0	132,2	-	-	-109,0	-32,3	37,6	-26,2	9,3	13,5

**Tab. 8.16:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors "polyGC" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-163,1	-93,4	156,7	-159,9	-87,7	-117,5	-12,5	30,3	-34,7	29,5	-10,6
<b>C</b>	-86,1	169,7	55,7	132,3	-83,9	121,0	-105,5	-41,9	45,9	-31,8	8,7	21,0
<b>G</b>	99,3	-136,9	173,1	124,6	-154,5	-79,2	-163,1	-13,8	17,2	-13,4	5,2	5,7
<b>C</b>	102,0	-175,9	-146,9	128,3	-130,4	-97,1	-142,3	-30,3	21,9	-6,9	-9,7	25,4
<b>G</b>	-76,9	166,5	53,1	141,3	-108,5	159,7	-86,1	-36,0	45,3	-36,3	16,5	11,5
<b>C</b>	-73,3	147,2	50,1	132,0	-163,0	-90,7	-111,2	-31,3	35,6	-26,7	9,2	13,9
<b>G</b>	-78,8	173,1	57,2	144,5	-102,7	170,5	-89,4	-34,1	44,3	-35,5	17,2	10,1
<b>A-3'</b>	-77,2	138,2	49,2	134,8	-	-	-109,1	-33,9	41,1	-32,3	13,6	13,1

**Tab. 8.17:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors "polyGC" nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

### 8.3.5 Rezeptor „1G3X“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 1G3X <sup>[80]</sup>

Sequenz: 5'-D(\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-G</b>	-	-143,3	72,9	117,0	-125,7	-92,6	174,2	-8,1	4,0	1,2	-6,0	9,2
<b>C</b>	-58,6	164,1	62,0	132,1	-164,6	-99,0	-113,5	-27,7	34,9	-28,9	12,6	9,7
<b>G</b>	-38,4	-172,8	14,5	170,8	-112,2	-158,3	-82,0	-7,9	33,3	-44,2	40,7	-21,0
<b>A</b>	25,5	-150,2	-111,2	154,8	-135,2	-130,4	-102,4	-15,2	35,3	-40,8	33,0	-11,8
<b>A</b>	-23,0	160,9	36,0	123,8	-179,4	-128,7	-101,3	-49,8	48,0	-32,0	3,5	29,6
<b>T</b>	-29,6	157,8	40,7	119,7	-179,2	-96,3	-131,2	-48,8	46,2	-27,0	-0,6	32,3
<b>T</b>	-90,1	-173,6	69,4	124,4	171,8	-88,9	-98,1	-36,1	38,1	-26,3	6,5	18,2
<b>C</b>	-49,0	-164,2	30,4	149,4	-146,7	-124,0	-104,4	-19,2	35,1	-37,2	27,8	-5,6
<b>G</b>	-49,2	150,5	40,2	140,9	-102,8	150,0	-91,4	-43,0	47,7	-35,2	13,2	17,4
<b>C</b>	-60,5	143,7	38,1	148,7	-155,5	-125,0	-112,3	-16,9	36,4	-41,9	32,2	-10,0
<b>G-3'</b>	77,4	-167,0	-118,5	143,8	-	-	-109,2	0,2	17,3	-27,0	28,0	-18,1

**Tab. 8.18:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „1G3X“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-151,0	-179,1	144,8	-128,5	-179,5	-100,6	-24,9	38,7	-37,3	24,0	0,4
<b>G</b>	38,0	152,8	-62,9	146,7	130,5	-59,0	-79,6	7,3	11,1	-23,6	29,6	-23,3
<b>C</b>	-115,5	-159,5	85,5	104,6	164,4	-96,2	-115,9	-45,5	35,4	-13,2	-13,3	38,4
<b>G</b>	-99,3	-157,1	81,5	141,4	173,7	-100,9	-100,4	-20,2	33,7	-34,2	23,2	-2,2
<b>A</b>	-66,3	-159,4	49,7	149,6	-168,9	-96,9	-105,5	-21,1	36,1	-36,9	25,9	-3,1
<b>A</b>	-85,9	175,4	56,7	122,8	-166,1	-116,1	-122,2	-36,6	35,1	-20,0	-1,4	24,7
<b>T</b>	-30,1	147,7	27,9	88,7	-152,5	-95,4	-139,0	-28,3	2,2	22,4	-38,7	42,3
<b>T</b>	122,2	-175,4	-115,0	137,4	-149,5	-131,7	-111,9	-25,4	32,8	-27,1	13,0	7,7
<b>C</b>	-35,3	174,4	13,5	150,5	-152,9	-132,4	-88,1	-12,1	28,0	-33,9	27,4	-9,7
<b>G</b>	-8,7	150,0	2,5	144,9	-164,1	-117,7	-82,6	-26,9	39,3	-36,3	22,0	2,7
<b>C-3'</b>	-118,0	144,4	97,2	90,1	-	-	-141,9	-8,0	-16,7	33,4	-37,7	29,7

**Tab. 8.19:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „1G3X“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-G</b>	-	-165,8	56,1	109,4	-141,2	-71,2	-176,5	10,4	-12,8	10,4	-4,4	-4,0
<b>C</b>	-72,8	173,5	64,0	127,1	-170,0	-84,6	-117,0	-16,0	22,4	-19,7	10,9	3,1
<b>G</b>	-84,2	177,7	73,1	137,9	-156,4	-114,4	-93,3	-31,0	42,2	-36,6	20,2	6,2
<b>A</b>	64,4	-175,6	-125,8	143,9	-156,0	-88,6	-109,7	-3,2	8,9	-12,2	10,3	-4,4
<b>A</b>	-73,3	173,8	67,4	96,9	163,7	-87,5	-113,8	-43,8	34,6	-12,4	-12,8	35,4
<b>T</b>	-63,7	173,7	69,6	123,8	-164,0	-106,4	-132,4	-36,6	37,9	-24,5	3,2	21,5
<b>T</b>	-58,5	174,5	48,4	129,4	167,3	-97,7	-100,9	-28,2	36,3	-29,3	13,1	9,1
<b>C</b>	-59,1	-176,7	61,6	125,3	-162,2	-102,7	-118,7	-37,8	38,8	-24,7	3,2	21,9
<b>G</b>	-71,1	165,6	51,2	143,1	-85,6	142,2	-99,4	-40,1	47,2	-35,8	13,6	16,6
<b>C</b>	-85,4	148,5	53,0	127,2	-161,7	-105,0	-120,2	-27,8	31,2	-22,5	6,9	13,2
<b>G-3'</b>	107,8	-168,7	-154,2	158,3	-	-	-116,2	1,0	21,9	-34,6	37,1	-23,9

**Tab. 8.20:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „1G3X“ nach der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-154,9	-169,9	152,2	-135,4	-174,4	-100,0	-26,3	41,6	-39,5	26,3	-0,3
<b>G</b>	25,8	169,0	-54,4	160,4	171,8	-89,5	-86,0	9,8	14,0	-30,0	36,9	-30,0
<b>C</b>	-60,7	177,1	51,9	118,4	179,2	-106,6	-110,9	-24,2	24,4	-15,3	1,4	14,3
<b>G</b>	-46,7	-178,3	48,7	151,3	169,6	-112,2	-85,7	-10,6	29,8	-35,5	30,2	-13,2
<b>A</b>	-54,6	-177,4	57,9	144,6	-173,8	-99,8	-100,2	-15,3	32,8	-35,6	28,0	-9,0
<b>A</b>	-72,9	171,4	59,9	122,9	-177,5	-95,6	-118,6	-42,5	37,7	-19,4	-5,0	29,5
<b>T</b>	-76,8	173,2	62,5	85,1	-136,7	-90,6	-137,4	-24,5	-0,6	23,3	-38,2	39,9
<b>T</b>	122,9	-174,9	-79,8	72,5	165,0	-75,7	-122,4	22,6	7,8	-27,6	42,9	-44,5
<b>C</b>	-106,0	-160,5	83,1	124,9	-174,7	-99,1	-95,6	-38,7	40,9	-27,3	5,1	21,6
<b>G</b>	-64,3	166,2	58,9	133,5	-157,5	-130,9	-99,8	-43,8	48,3	-32,5	8,3	22,1
<b>C-3'</b>	-70,7	139,8	58,4	82,9	-	-	-145,9	-1,3	-23,2	36,2	-38,3	25,5

**Tab. 8.21:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „1G3X“ nach der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

### 8.3.6 Rezeptor „102D“

PDB-Code <sup>[36]</sup>: 102D <sup>[264]</sup>

Sequenz: 5-D(\*CP\*GP\*CP\*AP\*AP\*AP\*TP\*TP\*TP\*GP\*CP\*G)-3'

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-151,0	162,9	155,9	-177,3	-105,1	-110,9	-19,2	36,3	-37,8	26,7	-5,1
<b>G</b>	-48,5	-172,5	22,9	149,7	-176,0	-111,9	-96,2	-21,1	34,7	-34,9	22,7	-1,2
<b>C</b>	-68,6	172,1	55,5	132,3	-168,4	-105,4	-113,1	-22,9	31,7	-30,0	15,4	5,1
<b>A</b>	-57,8	-159,4	40,9	144,7	171,5	-105,3	-89,3	-11,2	26,4	-32,6	25,7	-9,5
<b>A</b>	-61,0	178,3	54,9	152,7	-169,7	-114,6	-97,6	-20,1	37,2	-40,8	30,4	-9,7
<b>A</b>	-66,1	-176,1	48,1	142,8	178,2	-92,7	-102,2	-20,4	34,6	-37,1	23,9	-2,5
<b>T</b>	-80,5	177,5	55,4	148,6	-91,5	175,7	-101,7	-34,3	44,9	-40,1	19,2	9,6
<b>T</b>	-45,3	168,6	-4,0	150,3	-168,8	-102,8	-99,5	-20,7	36,7	-38,7	26,0	-3,3
<b>T</b>	-76,5	-165,2	41,7	136,8	-176,4	-109,3	-94,3	-20,1	31,7	-33,0	20,1	0,0
<b>G</b>	-51,9	170,2	42,6	152,9	-134,3	-169,8	-87,6	-23,7	40,3	-42,0	28,4	-3,3
<b>C</b>	-66,5	169,1	47,4	143,7	-169,3	-95,4	-105,4	-15,3	30,2	-33,9	25,2	-6,4
<b>G-3'</b>	-74,8	-176,4	46,8	148,5	-	-	-77,2	-21,3	40,2	-41,9	31,4	-6,3

**Tab. 8.22:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „102D“ vor der Moleküldynamik-Simulation <sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-151,0	-63,7	161,9	-125,0	-178,8	-98,7	-16,8	36,7	-42,7	34,4	-10,6
<b>G</b>	-50,4	154,6	25,0	146,5	-170,5	-108,0	-110,4	-18,7	31,8	-33,6	21,6	-1,4
<b>C</b>	-59,8	170,6	52,8	140,4	-155,7	-134,9	-118,7	-25,1	35,3	-33,7	17,7	4,6
<b>A</b>	-57,8	158,8	61,9	152,0	-168,7	-114,0	-98,2	-15,3	32,6	-38,2	29,6	-9,4
<b>A</b>	-63,8	175,0	52,4	143,3	-166,0	-105,8	-103,2	-13,2	30,2	-37,4	28,8	-11,1
<b>A</b>	-55,4	177,8	40,6	145,7	-177,8	-98,8	-104,3	-22,3	37,6	-37,3	23,7	-1,1
<b>T</b>	-73,4	175,6	58,0	147,4	-141,7	-160,9	-103,1	-30,7	45,0	-40,0	23,0	4,4
<b>T</b>	10,2	173,1	-35,0	157,6	178,5	-98,2	-99,1	-8,5	28,0	-35,2	30,8	-14,6
<b>T</b>	-69,9	177,9	55,3	139,2	-155,6	-118,1	-106,8	-28,4	38,7	-35,6	18,6	6,1
<b>G</b>	-41,0	155,2	33,8	148,7	-104,0	174,8	-80,4	-29,5	43,3	-41,7	26,3	1,7
<b>C</b>	-52,5	156,8	15,6	150,0	-160,2	-123,2	-109,9	-21,7	38,0	-37,2	24,6	-1,2
<b>G-3'</b>	-62,7	-162,5	57,1	138,2	-	-	-116,0	-16,9	29,7	-31,9	20,8	-2,3

**Tab. 8.23:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „102D“ vor der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-150,7	169,1	154,1	-175,0	-104,3	-100,6	-6,6	27,7	-35,3	32,4	-16,9
<b>G</b>	-69,3	-174,3	50,8	138,3	-179,1	-109,9	-99,8	-28,2	30,9	-33,6	18,2	6,2
<b>C</b>	-68,2	176,6	57,7	111,8	175,0	-87,7	-122,4	-25,5	20,6	-9,4	-5,0	19,7
<b>A</b>	-60,1	-167,9	51,6	137,2	168,5	-103,0	-85,9	-17,0	28,6	-29,0	20,0	-2,6
<b>A</b>	-58,4	-179,0	56,3	145,9	178,4	-104,9	-97,2	-22,7	33,8	-31,8	19,6	2,0
<b>A</b>	-67,4	-177,4	54,7	136,2	179,7	-96,5	-101,9	-26,8	37,7	-32,8	17,7	5,3
<b>T</b>	-72,6	-178,3	48,7	142,6	-100,8	-179,9	-112,5	-42,7	44,3	-29,4	4,0	25,9
<b>T</b>	-77,0	164,8	41,8	135,7	-169,4	-112,1	-92,5	-15,7	26,8	-28,8	20,0	-2,5
<b>T</b>	-62,1	-164,0	35,4	138,5	-170,8	-115,1	-93,0	-17,7	28,1	-28,1	18,8	-1,1
<b>G</b>	-54,9	169,6	45,7	152,4	-137,7	-175,4	-95,8	-30,4	39,8	-34,0	17,0	8,7
<b>C</b>	-62,4	160,7	53,9	140,1	-167,7	-101,3	-106,4	-19,0	27,9	-26,6	17,3	0,9
<b>G-3'</b>	-70,9	-169,7	41,8	146,9	-	-	-84,9	-18,9	31,3	-30,9	20,8	-0,9

**Tab. 8.24:** Winkel, die für den Strang 1 des Rezeptors „102D“ nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden



Nukleotid	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$\delta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\xi$ [°]	$\chi$ [°]	$\nu_0$ [°]	$\nu_1$ [°]	$\nu_2$ [°]	$\nu_3$ [°]	$\nu_4$ [°]
<b>5'-C</b>	-	-156,7	-60,4	161,5	-118,0	178,2	-101,5	-22,5	38,9	-40,2	28,7	-2,7
<b>G</b>	-68,4	155,0	41,0	135,6	179,5	-104,3	-109,0	-21,3	31,8	-29,3	16,7	2,7
<b>C</b>	-60,4	176,6	55,0	127,8	-168,1	-129,6	-119,3	-29,7	29,9	-20,0	3,1	17,1
<b>A</b>	-62,4	153,7	73,0	142,6	-173,9	-114,6	-93,9	-19,9	32,6	-32,6	21,7	-1,1
<b>A</b>	-63,5	-176,4	54,8	136,6	-177,2	-103,1	-97,5	-25,1	34,5	-29,7	15,5	5,7
<b>A</b>	-63,6	-179,6	48,5	131,6	176,0	-95,4	-106,5	-27,7	36,2	-30,3	13,7	8,8
<b>T</b>	-71,2	-174,1	57,7	140,5	-151,0	-155,5	-99,3	-36,4	41,9	-32,9	12,3	15,5
<b>T</b>	9,6	170,7	-30,6	162,8	-179,0	108,6	-88,3	5,0	18,5	-33,7	36,2	-26,8
<b>T</b>	-64,8	-178,4	49,9	131,0	-158,8	-113,0	-106,7	-32,0	34,9	-25,6	8,6	14,6
<b>G</b>	-54,7	165,3	42,8	144,5	-89,2	162,3	-91,9	-37,4	44,3	-36,0	14,6	15,0
<b>C</b>	-77,7	142,4	37,5	128,6	-176,9	-112,0	-119,0	-33,8	38,5	-28,2	8,9	15,9
<b>G-3'</b>	-67,4	178,9	58,5	132,5	-	-	-128,4	-22,1	28,7	-25,1	12,7	5,8

**Tab. 8.25:** Winkel, die für den Strang 2 des Rezeptors „102D“ nach der Moleküldynamik-Simulation<sup>[193]</sup> ermittelt wurden

## 8.4 Literaturverzeichnis

- [1] Homepage des Statistischen Bundesamtes: <http://www.destatis.de>
- [2] Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Mitchell, R. N.; Robbins, S. L.; *Basic Pathology*, 8. Auflage, **2007**, Saunders Elsevier, Philadelphia USA
- [3] Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Roth, H. J.; *Medizinische Chemie – Targets und Arzneistoffe*, **2005**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland
- [4] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M.; *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, **2001**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland
- [5] Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.; *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, 5. Auflage, **1999**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland
- [6] Bailly, C.; Bourdouxhe-Housiaux, C.; Colson, P.; *Biochemistry*, **1996**, *35*, 4251-4264
- [7] Reddy, B. S. P.; Sharma, S. K.; Lown, J. W.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 475-508
- [8] Catoen-Chackal, S.; Facompré, M.; Houssin, R.; Pommery, N.; Goossens, J.-F.; Colson, P.; Bailly, C.; Hénichart, J.-P.; *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 3665-3673
- [9] Hurley, L. H.; *Nature-Reviews – Cancer*, **2002**, *2*, 188-200
- [10] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U.; Starke, K.; *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, **2001**, Urban & Fischer, München, Deutschland
- [11] *Pharm. Ztg., Pharmazeutische Zeitung – Neue Arzneistoffe 2005*, **2006**, *5*, 14-15
- [12] *Pharm. Ztg., Pharmazeutische Zeitung – Neue Arzneistoffe 2006*, **2007**, *6*, 13-14
- [13] Gupta, R.; Brosh Jr., R. M.; *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 503-517
- [14] Sharma, V.; Hupp, C. D.; Tepe, J. J.; *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 1061-1074
- [15] Cunningham, A. P.; Love, W. K.; Zhang, R. W.; Andrews, L. G.; Tollefsbol, T. O.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2875-2888
- [16] Miao, H.-Q.; Liu, H.; Navarro, E.; Kussie, P.; Zhu, Z.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2101-2111
- [17] Frlan, R.; Gobec, S.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2309-2327
- [18] Xi, X. G.; *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 883-915
- [19] Zhou, J.-L.; Lu, Y.-J.; Ou, T.-M.; Zhou, J.-M.; Huang, Z.-S.; Zhu, X.-F.; Du, C.-J.; Bu, X.-Z.; Ma, L.; Gu, L.-Q.; Li, Y.-M.; Chan, A. S.-C.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7315-7321
- [20] Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.; *Wirkstoffdesign*, **1996**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland
- [21] Dror, O.; Shulman-Peleg, A.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J.; *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11*, 71-90
- [22] Schneidman-Duhovny, D.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J.; *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11*, 91-107
- [23] Gohlke, H.; Klebe, G.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2644-2676
- [24] Höltje, H.-D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G.; *Molecular Modelling – Basic Principles and Applications*, Second Edition, **2003**, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland
- [25] Kunz, R. W.; *Molecular Modelling für Anwender*, 2. Auflage, **1997**, Teubner-Verlag, Stuttgart, Deutschland
- [26] Steindl, T. M.; Crump, C. E.; Hayden, F. G.; Langer, T.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6250-6260
- [27] Leach, A. R.; *Molecular Modelling – Principles and Applications*, **1996**, Addison Wesley Longman Limited, Harlow, UK
- [28] Höltje, M.; Brandt, B.; Rupp, B.; Höltje, H.-D.; *PZ Prisma*, **2001**, *8*, 217-227
- [29] Glen, R. C.; Allen, S. C.; *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 763-777
- [30] Bailly, C.; Pommery, N.; Houssin, R.; *J. Pharm. Sci.*; **1989**, *11*, 910-917
- [31] Dias, N.; Jacquemard, U.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; *Eur. J. Med. Chem.*; **2005**, *40*, 1206-1213
- [32] ICM-PRO v 3.3-02a, Molsoft L.L.C., La Jolla, CA
- [33] Abagayan, R.; Totrov, M.; Kuznetsov, D.; *J. Comp., Chem.*; **1994**, *15*, 488-506
- [34] HYPERCHEM Release 7.5, Hypercube Inc., Gainesville, FL
- [35] SPARTAN '04 v 1.0.1, Wavefunction Inc., Irvine, CA
- [36] Homepage der PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [37] Keuser, C.; Dissertation „Design, Synthese und biologische Evaluierung von Pyrrolcarboxamiden mit Nukleobasen- oder trizyklischer Aromaten-Funktion“, **2005**
- [38] Benzschawel, K.; Dissertation „Design, Synthese und biologische Evaluierung bioisosterer Oligopyrrolcarboxamide mit aliphatisch verknüpften Interkalatoren“, **2007**
- [39] Lemster, T.; Forschungsarbeit, Arbeitskreis Pindur, Institut für Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- [40] Voet, D.; Voet, J. D.; *Biochemie*, **1994**, VCH-Verlag, Weinheim, Deutschland
- [41] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Biochemie*, 5. Auflage, **2003**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin, Deutschland
- [42] Saenger, W.; *Principles of Nucleic Acid Structure*, **1988**, Springer-Verlag, New York, USA

- [43] Silverman, R. B.; *Medizinische Chemie*, **1995**, Academic Press, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland
- [44] Kopka, M. L.; Larsen, T. A. in Probst, C. L.; Perun, T. J.; Dekker, M. (Hrsg.); *Nucleic Acid Targeted Drug Design*, **1992**, New York, USA
- [45] Pindur, U.; Fischer, G.; *Curr. Med. Chem.*, **1996**, *3*, 379-406
- [46] Bischoff, G.; Hoffmann, S.; *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 321-348
- [47] Marotto, A.; Dissertation „Etablierung und Anwendung von biophysikalischen und molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung von Wirkmechanismen neuer Indol-, Carbazol- und Oligopyrrolcarboxamid-Derivate als potentielle antitumoraktive Stoffe“, **2001**
- [48] Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, **2005**, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- [49] Sattler, K.; Dissertation „Theoretische und experimentelle Studien zur DNA-Interkalation von Carbazol-Derivaten“, **1994**
- [50] Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W. D. (Hrsg.); *DNA and RNA-Binders: From small Molecules to Drugs*, 2. Auflage, **2002**, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland
- [51] Bailly, C.; *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 39-58
- [52] Staker, B. L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin Jr., A. B.; Stewart, L.; *PNAS*, **2002**, *99*, 15387-15392
- [53] Sanna, N.; Chillemi, G.; Grandi, A.; Castelli, S.; Desideri, A.; Barone, V.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15429-15436
- [54] Beretta, G. L.; Perego, P.; Zunino, F.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 3291-3305
- [55] Li, Q.-Y.; Zu, Y.-G.; Shi, R.-Z.; Yao, L.-P.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2021-2039
- [56] Bailly, C.; *Meth. Enzym.*; **2001**, *340*, 610-623
- [57] Giovanela, B.; Stehlin, J. S.; Wall, M. E.; Wann, M. C.; Nicholas, A. W.; Liu, L. F.; Silber, R.; Potmesil, M.; *Science*, **1989**, *246*, 1046-1048
- [58] Potmesil, M.; Hsiang, Y. H.; Silber, R.; *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 3537-3543
- [59] Prado, S.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 3943-3953
- [60] Martínez, R.; Chacón-García, L.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 127-151
- [61] Facompré, M.; Baldeyrou, B.; Bailly, C.; Anizon, F.; Prudhomme, M.; Colson, P.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, *37*, 925-932
- [62] Routier, S.; Peixoto, P.; Mérour, J.-Y.; Coudert, G.; Dias, N.; Bailly, C.; Pierré, A.; Léonce, S.; Caignard, D.-H.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1401-1413
- [63] Auterhoff, H.; Knabe, J.; Hölftje, H.-D.; *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, **1999**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland
- [64] Schapira, M.; Totrov, M.; Abagayan, R.; *J. Mol. Recognit.*, **1999**, *12*, 177-190
- [65] Anthony, N. G.; Johnston, B. F.; Khalaf, A. I.; Mackay, S. P.; Parkinson, J. A.; Suckling, C. J.; Waigh, R. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11338-11349
- [66] Mortimer, C. E.; *Chemie*, 6. Auflage, **1996**, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- [67] Goodsell, D. S.; *Curr. Med. Chem.*; **2001**, *8*, 509-516
- [68] Ren, J.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B.; *Biochemistry*, **2000**, *39*, 8439-8447
- [69] Turner, P. R.; Denny, W. A.; *Curr. Drug Tar.*, **2000**, *1*, 1-14
- [70] Bender, C. J.; *Chem. Soc. Rev.*, **1986**, *15*, 475-502
- [71] Sliifkin, M. A.; *Charge Transfer Interactions of Biomolecules*, **1971**, Academic Press, London, England
- [72] Mulliken, R. S.; *Recueil Trav. Chim. Pays-Bas*, **1956**, *75*, 845-852
- [73] Lerman, L. S.; *J. Mol. Biol.*, **1961**, *3*, 18-30
- [74] Braña, M. F.; Cacho, M.; Gradellas, A.; *Curr. Pharm. Des.*, **2001**, *7*, 1745-1780
- [75] Chaires, J. B.; *Biopolymers*, **1997**, *44*, 201-215
- [76] Chaires, J. B.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **2006**, *453*, 26-31
- [77] Pindur, U.; Haber, M.; Sattler, K.; *Pharmazie in unserer Zeit*, **1992**, *21*, 21-36
- [78] Rehn, C.; Dissertation „Theoretische Studien zur DNA-Interkalation von Anthrachinon-, 9-Aminoacridin-, Isochinolin- und Pyrido-carbazol-1,3-dion-Derivaten sowie Synthese von Pyrido-carbazol-1,3-dionen“, **1995**
- [79] Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Baguley, B. C.; *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 1625-1630
- [80] Malinina, L.; Soler-Lopez, M.; Aymamí, J.; Subirana, J. A.; *Biochemistry*, **2002**, *41*, 9341-9348
- [81] Tan, J.-H.; Zhang, Q.-X.; Huang, Z.-S.; *Eur. J. Med. Chem.*; **2006**, *41*, 1041-1047
- [82] Kratz, F.; Warnecke, A.; Schmid, B.; Chung, D.-E.; Gitzel, M.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 477-523
- [83] Zhang, G.; Fang, L.; Zhu, L.; Aimiwu, J. E.; Shen, J.; Cheng, H.; Muller, M. T.; Lee, G. E.; Sun, D.; Wang, P. G.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5269-5278

- [84] Portugal, J.; Cashman, D. J.; Trent, J. O.; Ferrer-Miralles, N.; Przewloka, T.; Fokt, I.; Priebe, W.; Chaires, J. B.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 8209-8219
- [85] Zhang, G.; Fang, L.; Zhu, L.; Zhong, Y.; Wang, P. G.; Sun, D.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1792-1799
- [86] Meyer-Losic, F.; Quinonero, J.; Dubois, V.; Alluis, B.; Dechambre, M.; Michel, M.; Cailler, F.; Fernandez, A.-M.; Trouet, A.; Kearsley, J.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 6908-6916
- [87] Burkhart, D. J.; Barthel, B. L.; Post, G. C.; Kalet, B. T.; Nafie, J. W.; Shoemaker, R. K.; Koch, T. H.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7002-7012
- [88] Sánchez, I.; Reches, R.; Caignard, D. H.; Renard, P.; Pujol, M. D.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 340-352
- [89] Cholody, W. M.; Kosakowska-Cholody, T.; Hollingshead, M. G.; Hariprakash, H. K.; Michedja, C. J.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4474-4481
- [90] Asche, C.; Frank, W.; Kucklaender, U.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 819-837
- [91] Harding, M. M.; Grummitt, A. R.; *Mini Rev. in Med. Chem.*, **2003**, *3*, 67-76
- [92] Garbett, N. C.; Graves, D. E.; *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, **2004**, *4*, 149-172
- [93] Pierré, A.; Atassi, G.; Devissaguet, M.; Bisagni, E.; *Drugs Fut.*; **1997**, *22*, 53-59
- [94] Pavlov, V.; Lin, P. K. T.; Rodilla, V.; *Chemico-Biological Interactions*, **2001**, *137*, 15-24
- [95] Braña, M. F.; Ramos, A.; *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, **2001**, *1*, 237-255
- [96] Hsiang, Y.-H.; Jiang, J. B.; Liu, L. F.; *Mol. Pharmacol.*, **1989**, *36*, 371-376
- [97] Antonini, I.; Santoni, G.; Lucciarini, R.; Amantini, C.; Sparapani, S.; Magnano, A.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7198-7207
- [98] Hung, D.T.; Shakhnovich, E. A.; Pierson, E.; Mekalanos, J. J.; *Science*, **2005**, *310*, 670-674
- [99] Fairley, T. A.; Tidwell, R. R.; Donkor, I.; Cory, M.; *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 1746-1753
- [100] Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Dickerson, R. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, *82*, 1376-1380
- [101] Wartell, R. M.; Larson, J. E.; Wells, R. D.; *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 6719-6731
- [102] Lauria, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Dattolo, G.; Almerico, A. M.; *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 2136-2160
- [103] Bailly, C.; Chaires, J. B.; *Bioconjugate Chemistry*, **1998**, *9*, 513-537
- [104] Gniazdowski, M.; Denny, W. A.; Nelson, S. M.; Czyz, M.; *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 909-924
- [105] Evans, D. A.; Neidle, S.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4232-4238
- [106] Bartulewicz, D.; Brelawski, K.; Bielawska, A.; *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*; **2002**, *9*, 422-426
- [107] Anthony, N. G.; Fox, K. R.; Johnston, B. F.; Khalaf, A. I.; Mackay, S. P.; McGroarty, I. S.; Parkinson, J. A.; Skellern, G. G.; Suckling, C. J.; Waigh, R. D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1353-1356
- [108] van Hecke, K.; Nam, P. C.; Nguyen, M. T.; van Meervelt, L.; *FEBS J.*, **2005**, *272*, 3531-3541
- [109] Kopka, M. L.; Goodsell, D. S.; Dickerson, R. E.; *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4983-4993
- [110] Foister, S.; Marques, M. A.; Doss, R. M.; Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 4333-4340
- [111] Hawkins, C. A.; Peláez de Clairac, R.; Dominey, R.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5235-5243
- [112] Hansen, M.; Lee, S.-J.; Cassidy, J. M.; Hurley, L. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5553-5561
- [113] Pelton, J. G.; Wemmer, D. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 5723
- [114] Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2215-2235
- [115] Gottesfeld, J. M.; Neely, L.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Nature*, **1997**, *387*, 202-205
- [116] Pindur, U.; Jansen, M.; Lemster, T.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 2804-2847
- [117] Kielkopf, C. L.; Bremer, R. E.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C.; *J. Mol. Biol.*, **2000**, *295*, 557-567
- [118] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeny, P. J.; *Adv. Drug Del. Rev.*, **1997**, *23*, 3-25
- [119] Carrasco, C.; Helissey, P.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; *Chem. Biochem.*, **2003**, *4*, 50-61
- [120] Shinohara, K.-I.; Narita, A.; Oyoshi, T.; Bando, T.; Teraoka, H.; Sugiyama, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5113-5118
- [121] Bando, T.; Narita, A.; Sasaki, S.; Sugiyama, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13890-13895
- [122] David-Cordonnier, M.-H.; Hildebrand, M.-P.; Baldeyrou, B.; Lansiaux, A.; Keuser, C.; Benzschawel, K.; Lemster, T.; Pindur, U.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, *42*, 752-771
- [123] Bailly, C.; Hénichart, J.-P.; *Bioconjugate Chem.*, **1991**, *2*, 379-393
- [124] Zündorf, I.; Vollmar, A.; Dingermann, T.; *Pharm. Unserer Zeit*, **2005**, *34*, 283-296

- [125] Paloma, L. G.; Smith, J. A.; Chazin, W. J.; Nicolaou, K. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 3697-3708
- [126] Walker, S.; Murnick, J.; Kahne, D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7954-7961
- [127] Henichart, J.-P.; Waring, M. J.; Denny, W. A.; Bailly, C.; *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *51*, 448-461
- [128] Hotzel, C.; Marotto, A.; Pindur, U.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, *38*, 189-197
- [129] Zhang, Z.; Herdewijn, P.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 517-531
- [130] Hoehn, S. T.; Junker, H.-D.; Bunt, R. C.; Turner, C. J.; Stubbe, J.; *Biochemistry*, **2001**, *40*, 5894-5905
- [131] Aboul-Fadl, T.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 2193-2214
- [132] Uhlmann, E.; *Chemie in unserer Zeit*, **1998**, *32*, 150-160
- [133] Pöijärvi-Virta, P.; Lönnberg, H.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 3441-3465
- [134] Fox, K. R.; *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 17-37
- [135] DaRos, T.; Spalluto, G.; Prato, M.; Cacciari, B.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 71-88
- [136] Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L.; *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, *32*, 338-349
- [137] Haq, I.; Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z.; Jenkins, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10693-10701
- [138] Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 22561-2599
- [139] Nielson, P. E.; *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 624-630
- [140] Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O.; *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500
- [141] Nielsen, P. E.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 545-550
- [142] Nielsen, P. E.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 505-507
- [143] Maier, M. A.; Esau, C. C.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Albertshofer, K.; Kinberger, G. A.; Kadaba, N. S.; Watanabe, T.; Manoharan, M.; Bennett, C. F.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2534-2542
- [144] Kumar, M.; Kumar, V. A.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 3393-3399
- [145] Keuser, C.; Pindur, U.; *Pharmazie*, **2006**, *61*, 261-268
- [146] Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Fernandez-Saiz, M.; Rigl, C. T.; Fox, K. R. (Hrsg.); *Drug-DNA Interaction Protocols*, **1997**, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA
- [147] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Auflage, **2002**, Thieme Verlag, Berlin, Deutschland
- [148] Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G.; *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 2. Auflage, **1992**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland
- [149] Voet, D.; Gratzler, W. B.; Cox, R. A.; Doty, P.; *Biopolymers*, **1963**, *1*, 193-208
- [150] David-Cordonnier, M.-H.; Laine, W.; Lansiaux, A.; Rosu, F.; Colson, P.; de Pauw, E.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Hickman, J. A.; Pierré, A.; Bailly, C.; *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, *4*, 71-80
- [151] Routier, S.; Vezin, H.; Lamour, E.; Bernier, J.-L.; Catteau, J.-P.; Bailly, C.; *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 4160-4166
- [152] Shaikh, S. A.; Jayaram, B.; *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2240-2244
- [153] Herstellerangabe der Firma *GE Healthcare Europe GmbH* (ehemals *Amersham Biosciences*), Munzinger Strasse 5, D-79111 Freiburg
- [154] Hotzel, H. C.; Dissertation „Design und Synthese von Oligopyrrolcarboxamiden als neue DNA-Liganden mit potentieller Antitumoraktivität“, **2003**
- [155] Kluza, J.; Baldeyrou, B.; Colson, P.; Rasoanaivo, P.; Bailly, C.; *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, *20*, 383-391
- [156] Herstellerangabe der Firma *TopoGEN Inc.*, 108 Aces Alley, 32128 Port Orange, FL, USA
- [157] Herstellerangabe der Firma *Fermentas GmbH*, Opelstraße 9, D-68789 St.Leon-Rot
- [158] Jenkins, T. C.; Fox, K. R. (Hrsg.); *Drug-DNA Interaction Protocols*, **1997**, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA
- [159] Baguley, B. C.; Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Cain, B. F.; *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 170-177
- [160] Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblank, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H.; *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *7*, 547-569
- [161] Baguley, B. C.; Falkenhaus, E.-M.; *Nucleic Acids Res.*, **1978**, *5*, 161-171
- [162] Olmsted III, J.; Kearns, D. R.; *Biochemistry*, **1977**, *16*, 3647-3654;
- [163] Momany, F. A.; McGuire, R. F.; Burgess, A. W.; Scheraga, H. A.; *J. Phys. Chem.*, **1975**, *79*, 2361-2381
- [164] Wellman, S. E.; *Biopolymers*, **1996**, *39*, 491-501
- [165] Boger, D. L.; Chen, J.-H.; Saionz, K. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1629-1644
- [166] Jacquemard, U.; Routier, S.; Bailly, C.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 1087-1095
- [167] a) Frau, S.; Bernardou, J.; Meunier, B.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1996, *133*, 1053-1070  
b) Loontjens, F. G.; Regenfuss, P.; Zechel, A.; Dumortier, L.; Clegg, R. M.; *Biochemistry*, **1990**, *29*, 9029-9039

- [168] Homepage des NCI: <http://dtp.nci.nih.gov/>
- [169] Sławiński, J.; Brzozowski, Z.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 1180-1189
- [170] Huang, R.; Wallqvist, A.; Covell, D. G.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1964-1979
- [171] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, *83*, 757-766
- [172] Homepage des COMPARE-Programmes: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare.html>
- [173] Naasani, I.; Seimiya, H.; Yamori, T.; Tsuruo, T.; *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 4004-4011
- [174] Cleaveland, E. S.; Zaharewitz, D. W.; Kelley, J. A.; Paull, K.; Cooney, D. A.; Ford, H.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *223*, 654-659
- [175] Mu, F.; Coffing, S. L.; Riese 2<sup>nd</sup>, D. J.; Geahlen, R. L.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E.; Johnson, J.; Cushman, M.; *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 441-452
- [176] Fischer, G.; Dissertation „Kristallographische und theoretische Strukturuntersuchungen mit Carbazol- und Acridin-Derivaten als potentielle DNA-Interkalierende Wirkstoffe“, **1997**
- [177] HYPERCHEM, *HYPERCHEM® Release 7.0 for Windows – Reference Manual*, **2002**, Hypercube Inc., Gainesville, FL
- [178] HYPERCHEM, *HYPERCHEM® – Computational Chemistry*, **2002**, Hypercube Inc., Gainesville, FL
- [179] Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 765-784
- [180] Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz Jr., K. M.; Ferguson, D. M.; Kollman, P. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179-5197
- [181] SPARTAN '04, *A Brief Introduction to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Methods*, **2004**, Wavefunction Inc., Irvine CA
- [182] Stewart, J. J. P.; *J. Comp.-Aid. Mol. Design*, **1990**, *4*(1), 1-108
- [183] Dewar, M. J. S.; Thiel, W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 4899-4907
- [184] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Stewart J. J. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 3902-3909
- [185] Dewar, M. J. S.; Yuan, Y.-C.; *Inorg. Chem.*; **1990**, *29*, 3881-3890
- [186] Pople, J. A.; Beveridge, D. L.; Dobosh, P. A.; *J. Chem. Phys.*, **1967**, *47*, 2026-2033
- [187] Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A.; *J. Chem. Phys.*, **1965**, *43*, S129-S135
- [188] Pople, J. A.; Segal, G. A.; *J. Chem. Phys.*, **1966**, *44*, 3289-3296
- [189] Pople, J. A.; Segal, G. A.; *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, S136-S149
- [190] Stewart, J. J. P.; *J. Comp. Chem.*, **1989**, *10*, 209-264
- [191] Press, W. H.; Flannery, B. T.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*, 4. Auflage, **1988**, Cambridge University Press, Cambridge, UK
- [192] Schlick, T.; *Optimization Methods in Computational Chemistry in: Reviews in Computational Chemistry*, Volume 3, Chapter 1, 1-71, **1992**, VCH Publishers, New York, USA
- [193] van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.; *Angew. Chem.*; **1990**, *102*, 1020-1055
- [194] Howard, A. E.; Kollman, P. A.; *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 1669-1675
- [195] Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4379-4386
- [196] Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N.; Teller, A. H.; Teller, E.; *J. Chem. Phys.*; **1953**, *21*, 1087-1092
- [197] SPARTAN '04, *Windows – Tutorial and User's Guide*, **2004**, Wavefunction Inc., Irvine, CA
- [198] SPARTAN '04, *Frequently Asked Questions*, **2005**, Wavefunction Inc., Irvine, CA
- [199] Clark, M.; Cramer III, R. D.; van Opdenbosch, N.; *J. Comp. Chem.*, **1989**, *10*, 982-1012
- [200] Halgren, T. A.; *J. Comp. Chem.*, **1996**, *17*, 490-641
- [201] Halgren, T. A.; *J. Comp. Chem.*, **1999**, *20*, 720-748
- [202] Thiel, W.; Voityuk, A. A.; *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*, 616-626
- [203] Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kedziora, G. S.; Rassalov, V. A.; Maurice, D. R.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A.; *J. Comp. Chem.*, **2000**, *21*, 1532-1548
- [204] Hurst, D.; Umejiego, U.; Lynch, D.; Seltzman, H.; Hyatt, S.; Roche, M.; McAllister, S.; Lewis, D.; Reggio, P.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5967-5987
- [205] Razgulin, A. V.; Mecozzi, S.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7902-7906
- [206] Boiani, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Torres de Ortiz, S.; Serna, E.; de Bilbao, N. V.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Cerecetto, H.; Gonzáles, M.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3215-3224
- [207] Poduch, E.; Bello, A. M.; Tang, S.; Fujihashi, M.; Pai, E. F.; Kotra, L. P.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4937-4945
- [208] dos Santos, R.; Kuhnén, C. A.; Yunes, R. A.; *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2006**, *339*, 227-237

- [209] Bielawski, K.; Bielawska, A.; Bartulewicz, D.; Rózański, A.; *Acta Biochim. Pol.*, **2002**, *47*, 855-866
- [210] Karlsson, H. J.; Bergqvist, M. H.; Lincoln, P.; Westman, G.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2369-2384
- [211] Hilgeroth, A.; Molnár, A.; Molnár, J.; Voigt, B.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 548-551
- [212] Fletcher, R.; *Practical Methods of Optimization*, **1980**, John Wiley & Sons, New York, USA
- [213] Gill, P. E.; Murray, W.; Wright, M. H.; *Practical Optimization*, **1981**, Academic Press Inc., New York, USA
- [214] Baker, J.; *J. Comp. Chem.*, **1986**, *7*, 385-395
- [215] Peng, C.; Schlegel, H. B.; *Israel J. Chem.*, **1993**, *33*, 449-454
- [216] Karplus, M.; Petsko, G. A.; *Nature*, **1990**, *347*, 631-639
- [217] Allen, M. P.; Tildesley, D. J.; *Computer Simulation of Liquids*, **1987**, Clarendon Press, Oxford, UK
- [218] Allinger, N. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 8127-8134
- [219] Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.; *J. Comp. Chem.*, **1983**, *4*, 187-217
- [220] Mac Kerell Jr., A. D.; Bashford, D.; Bellot, M.; Dunbrack Jr., R. L.; Evanseck, J.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnik, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. J.; *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 3586-3616
- [221] Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1657-1666
- [222] Pranate, J.; Wierschke, S.; Jorgensen, W. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 2810-2819
- [223] Hoffmann, R.; *J. Chem. Phys.*, **1963**, *39*, 1397-1412
- [224] Baird, N. C.; Dewar, M. J. S.; *J. Chem. Phys.*, **1969**, *50*, 1262-1274
- [225] Dewar, M. J. S.; Hasselbach, E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 590-598
- [226] Dewar, M. J. S.; Lo, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 5296-5303
- [227] Dewar, M. J. S.; Lo, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 1285-1318
- [228] Zerner, M. C.; *Semiempirical Molecular Orbital Methods in: Reviews in Computational Chemistry*, Vol. 2, **1991**, VCH-Publishers Inc., New York, USA
- [229] Hehre, W. J.; Stewart, R. F.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.*, **1969**, *51*, 2657-2664
- [230] Collins, J. B.; Schleyer, P. V.; Binkley, J. S.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.*, **1976**, *64*, 5142-5151
- [231] Stewart, R. F.; *J. Chem. Phys.*, **1970**, *52*, 431-438
- [232] Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 939-947
- [233] Gordon, M. S.; Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1982**, *104*, 2797-2803
- [234] Pietro, W. J.; Francke, M. M.; Hehre, W. J.; Defrees, D. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 5039-5048
- [235] Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.*, **1972**, *56*, 2257-2261
- [236] Hariharan, P. C.; Pople, J. A.; *Theor. Chim. Acta*, **1973**, *28*, 213-222
- [237] Gordon, M. S.; *Chem. Phys. Lett.*, **1980**, *76*, 163-168
- [238] Krishnan, R.; Kinkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.*, **1980**, *72*, 650-654
- [239] McLean, A. D.; Chandler, G. S.; *J. Chem. Phys.*, **1980**, *72*, 5639-5648
- [240] Dunning, T. H.; Hay, P. J.; *Modern Theoretical Chemistry*, **1976**, Plenum, New York, USA
- [241] ICM-PRO, *ICM Manual and User's Guide*, **2005**, Molsoft L.L.C., La Jolla, CA
- [242] Schapira, M.; Abagayan, R.; Totrov, M.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3045-3059
- [243] Totrov, M.; Abagayan, R.; *Derivation of sensitive discrimination potential for virtual ligand screening in: Proceedings of the Third Annual Intl. Conf. on Comp. Mol. Bio.*, **1999**, 312-320
- [244] Abagayan, R.; Totrov, M.; *J. Comp. Phys.*, **1999**, *151*, 402-421
- [245] Eisenmenger, F.; Argros, P.; Abagayan, R.; *J. Mol. Biol.*, **1993**, *231*, 849-860
- [246] Cardozo, T.; Totrov, M.; Abagayan, R.; *Proteins*, **1995**, *23*, 403-414
- [247] Abagayan, R.; Totrov, M.; *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 983-1002
- [248] Fernández-Recio, J.; Totrov, M.; Abagayan, R.; *J. Mol. Biol.*, **2004**, *335*, 843-865
- [249] Maiorov, V.; Abagayan, R.; *Proteins*, **1997**, *27*, 410-424
- [250] Powell, M. J. D.; *Math. Programming*, **1977**, *12*, 241-254
- [251] Nemethy, G.; Gibson, G. D.; Palmer, K. A.; Yoon, C. N.; Paterlini, G.; Zagari, A.; Rumsey, S.; Scheraga, H. A.; *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96*, 6472-6484
- [252] Jin, E.; Katritch, V.; Olson, W. K.; Kharatisvili, M.; Abagayan, R.; Pilck, D. S.; *J. Mol. Biol.*, **2000**, *298*, 95-110
- [253] Dyatkina, N. B.; Roberts, C. D.; Keicker, J. D.; Dai, Y.; Nadherny, J. P.; Zhang, W.; Schmitz, U.; Kongpachitk, A.; Fung, K.; Novikov, A. A.; Lou, L.; Velligan, M.; Khorlin, A. A.; Chen, M. S.; *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 805-817

- [254] Perola, E.; Charifson, P. S.; *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2499-2510
- [255] Moore, S.; Jaeschke, H.; Kleinau, G.; Neumann, S.; Costanzi, S.; Jiang, J.-K.; Childress, J.; Raaha, B. M.; Colson, A.; Paschke, R.; Krause, G.; Thomas, C. J.; Gershengorn, M. C.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3888-3896
- [256] Ulbrich, H. K.; Luxenburger, A.; Prech, P.; Eriksson, E. E.; Soehnlein, O.; Rotzius, P.; Lindbom, L.; Dannhardt, G.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5988-5999
- [257] Cambridge Structural Database, Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2, 1EZ, UK
- [258] Liping, L.; Miaoli, Z.; Jiangfeng, L.; Pin, Y.; *Acta Cryst.*, **2003**, *E59*, 0417-0419
- [259] Benzschawel, K.; Pindur, U.; Schollmeyer, D.; *Cambridge Crystallographic Data Centre*, CCDC-Nr. 254238
- [260] Benzschawel, K.; Pindur, U.; Schollmeyer, D.; *Cambridge Crystallographic Data Centre*, CCDC-Nr. 282123
- [261] SPARTAN '04, *Selecting a Model*, **2004**, Wavefunction Inc., Irvine, CA
- [262] Testa, B.; *Grundlagen der organischen Stereochemie*, **1983**, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland
- [263] Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E.; *Science*, **1994**, *266*, 646-650
- [264] Nunn, C. M.; Neidle, S.; *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 2317-2325
- [265] Chiu, T. K.; Sohn, C.; Johnson, R. C.; Dickerson, R. E.; *EMBO J.*, **2002**, *21*, 801-814
- [266] Abrescia, N. G.; Malinina, L.; Subirana, J. A.; *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 657-666
- [267] Bleichenbacher, M.; Tan, S.; Richmond, T. J.; *J. Mol. Biol.*, **2003**, *332*, 783-793
- [268] Zheng, N.; Fraenkel, E.; Prabo, C. O.; Pavletich, N. P.; *Genes & Dev.*, **1999**, *13*, 666-674
- [269] HYPERCHEM, *HYPERCHEM<sup>®</sup> Release 7 for Windows – Getting Started*, **2002**, Hypercube Inc. Gainesville FL
- [270] Barthwal, R.; Sharma, U.; Srivastava, N.; Jain, M.; Awasthi, P.; Kaur, M.; Barthwal, S. K.; Govil, G.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 27-39
- [271] Khandelwal, A.; Lukacova, V.; Comez, D.; Kroll, D. M.; Raha, S.; Balaz, S.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5437-5447
- [272] Wang, D.-F.; Helquist, P.; Wiech, N. L.; Wiest, O.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6936-6947
- [273] Ersmark, K.; Nervall, M.; Hamelink, E.; Janka, L. K.; Clemente, J. C.; Hallberg, A.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6090-6106
- [274] Řeha, D.; Kabeláč, M.; Ryjáček, F.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3366-3376
- [275] Charmantray, F.; Demeunynck, M.; Bailly, C.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 967-977
- [276] Benzschawel, K.; Pindur, U.; Schollmeyer, D.; *Cambridge Crystallographic Data Centre*, CCDC-Nr. 282122
- [277] Routier, S.; Mérour, J.-Y.; Bailly, C.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 789-799
- [278] Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 450-465
- [279] Kahn, Q. A.; Barbieri, C. M.; Srinivasan, A. R.; Wang, Y.-H.; LaVoie, E. J.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5245-5251
- [280] Breitmaier, E.; Jung, G.; *Organische Chemie*, **2005**, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- [281] Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E.; *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5851-5855
- [282] Coupez, B.; Lewis, R. A.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2995-3003
- [283] ACD/Labs, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada
- [284] Jeffrey, S. C.; Torgov, M. Y.; Andreyka, J. B.; Boddington, L.; Cerveny, C. G.; Denny, W. A.; Gordon, K. A.; Gustin, D.; Haugen, J.; Kline, T.; Nguyen, M. T.; Senter, P. D.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1344-1358
- [285] Kline, T.; Torgov, M. Y.; Mendelson, B. A.; Cerveny, C. G.; Senter, P. D.; *Molecular Pharmaceuticals*, **2004**, *1*, 9-22
- [286] Nosse, B.; *Chem. Unserer Zeit*, **2006**, *40*, 164-172
- [287] Tietze, L. F.; Major, F.; Schuberth, I.; *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 6724-6727
- [288] Tietze, L. F.; Major, F.; Schuberth, I.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6574-6577
- [289] Tietze, L. F.; Feuerstein, T.; *Aust. J. Chem.*, **2003**, *56*, 841-854
- [290] WEBLAB Viewer Pro v.1999, Molecular Simulations Inc., Cambridge, UK