

**Etablierung und Anwendung von biophysikalischen und
molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung von
Wirkmechanismen neuer Indol-, Carbazol- und
Oligopyrrolcarboxamid-Derivate als potentielle
antitumoraktive Stoffe**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Annalisa Marotto

Geb. in Vicenza, Italien

Mainz, 2001

**Die vorliegende Arbeit wurde
am Institut für Pharmazie
unter Anregung und Betreuung von
Herrn Prof. Dr. U. Pindur
durchgeführt**

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2002

*Nicht da ist man daheim, wo man seinen Wohnsitz hat,
sondern da, wo man verstanden wird.*

[Non si é a casa dove si ha il domicilio, ma lí dove si viene capiti]

(Christian Morgenstern)

alla mia famiglia

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	9
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	11
1.1 KREBS.....	11
1.1.1 <i>Definition.....</i>	<i>11</i>
1.1.2 <i>Tumorgenese.....</i>	<i>11</i>
1.1.3 <i>Therapieansätze.....</i>	<i>12</i>
1.1.3.1 Chemotherapie in der Krebsbehandlung.....	12
1.1.3.2 Neue Therapieansätze bei Krebs.....	13
1.2 ZIELSETZUNG.....	15
2 ALLGEMEINER TEIL ZU DEN METHODEN: DNA UND DAMIT WECHSELWIRKENDE ARZNEISTOFFE.....	17
2.1 DNA.....	17
2.2 DNA-SELEKTIVE LIGANDEN.....	19
2.2.1 <i>Stoffe, die kovalent an die DNA binden.....</i>	<i>19</i>
2.2.2 <i>Stoffe, die nicht-kovalent an die DNA binden.....</i>	<i>21</i>
2.2.2.1 Interkalierende Stoffe.....	21
2.2.2.2 Bisinterkalatoren.....	26
2.2.2.3 Rinnenbindende Stoffe.....	27
2.2.2.4 Hybridmoleküle.....	31
3 ALLGEMEINER TEIL ZU DEN METHODEN: DNA-MODIFIZIERENDE ENZYME – TOPOISOMERASEN.....	33
3.1 TOPOLOGIE DER DNA.....	34
3.1.1 <i>Plasmid-DNA.....</i>	<i>35</i>
3.2 TOPOISOMERASE I UND DEREN INHIBITOREN.....	36
3.2.1 <i>Topoisomerase I-Gifte.....</i>	<i>38</i>
3.2.1.1 Camptothecin und Analoga.....	39
3.2.1.2 Topoisomerase I-Gifte mit anelliertem Chromophor.....	40
3.2.1.3 Indolocarbazole als Topoisomerase I-Gifte.....	41
3.2.1.4 Rinnenbinder als Topoisomerase I-Gifte.....	45
3.2.2 <i>Topoisomerase I-Hemmer.....</i>	<i>46</i>
3.2.2.1 Enzym-bindende Topoisomerase I-Hemmer.....	46
3.2.2.2 DNA-bindende Topoisomerase I Hemmer.....	48
3.3 TOPOISOMERASE II UND DEREN INHIBITOREN.....	48
3.3.1 <i>Gyrase-Hemmer.....</i>	<i>48</i>

3.3.2	<i>Hemmer der eukaryotischen Topoisomerase II</i>	49
4	METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON WECHSELWIRKUNGEN NIEDERMOLEKULARER STOFFE MIT DER B-DNA	51
4.1	BESTIMMUNG DER DNA-AFFINITÄT	51
4.1.1	<i>Thermische Denaturierung – Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA</i>	51
4.1.2	<i>Ethidiumbromid-Verdrängungsassay</i>	54
4.2	BESTIMMUNG DES BINDUNGSMODUS.....	58
4.2.1	<i>DNA-Unwinding-Assay</i>	60
4.3	BESTIMMUNG DER SEQUENZSELEKTIVITÄT	63
4.3.1	<i>Footprinting-Assay</i>	63
5	METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON WECHSELWIRKUNGEN NIEDERMOLEKULARER STOFFE MIT DEN TOPOISOMERASEN	66
5.1	BESTIMMUNG DER TOPOISOMERASE I-AKTIVITÄT UND DEREN HEMMUNG.....	66
5.1.1	<i>Bestimmung der Bildung des Cleavable Complex zwischen DNA und Topoisomerase I</i>	68
5.1.1.1	Nicking-Assay mit Plasmid-DNA.....	68
5.1.1.2	Cleavage-Assay mit linearer DNA.....	69
5.2	BESTIMMUNG DER TOPOISOMERASE II-AKTIVITÄT UND DEREN HEMMUNG	69
5.2.1	<i>Bestimmung der Bildung des Cleavable Complex zwischen DNA und Topoisomerase II</i>	70
6	BESTIMMUNG DER ANTIPROLIFERATIVEN WIRKUNG	71
6.1	ALLGEMEINE METHODEN ZUR ZYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG	71
6.2	DAS ENTWICKLUNGSPROGRAMM FÜR THERAPEUTIKA VOM NATIONAL CANCER INSTITUTE.....	72
6.2.1	<i>Detektionsmethoden</i>	74
6.2.1.1	SRB-Assay.....	74
6.2.1.2	MTT-Assay	75
6.2.2	<i>Das Programm COMPARE vom NCI</i>	76
7	METHODISCHER TEIL UND ERGEBNISSE: PHYSIKALISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-WECHSELWIRKUNG UND TOPOISOMERASE I-HEMMUNG NEUER VERBINDUNGEN AUS DER STOFFGRUPPE DER ANELLIERTEN UND/ODER SUBSTITUIERTEN INDOLE, CARBAZOLE UND OLIGOPYRROLCAROXAMIDE	77
7.1	INDOL- UND CARBAZOLDERIVATE.....	77
7.1.1	<i>Substituierte bzw. anellierte Indole und Carbazole</i>	77
7.1.1.1	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay	81
7.1.1.2	T_m -Bestimmungen	85
7.1.1.3	Zellbiologische Assays.....	86
7.1.1.4	Unwinding-Assay und Hemmung der Topoisomerase I.....	87
7.1.1.5	Bilanz.....	88
7.1.2	<i>Biscarbazole</i>	89

7.1.3	<i>Indolocarbazole</i>	92
7.1.3.1	Biophysikalische Methoden zur Bestimmung der DNA-Wechselwirkungen	94
7.1.3.2	Unwinding-Assay und Hemmung der Topoisomerase I	95
7.1.3.3	Bilanz	96
7.2	OLIGOPYRROL-CARBOXAMIDE UND DAVON ABGELEITETE COMBILIXINE	97
7.2.1	<i>Biologische Assays</i>	102
7.2.2	<i>Biophysikalische Methoden zur DNA-Wechselwirkung</i>	103
7.2.2.1	T_m -Wert-Bestimmungen	103
7.2.2.2	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay	107
7.2.3	<i>Hemmung der Topoisomerase I</i>	110
7.2.4	<i>Hemmung der Topoisomerase II</i>	112
7.2.5	<i>Footprinting-Assay</i>	112
7.2.6	Bilanz	113
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	114
8.1	EINLEITUNG UND ZIEL	114
8.2	EINGESETZTE METHODEN	115
8.3	ERGEBNISSE ZU DEN GETESTETEN VERBINDUNGEN	116
8.4	BILANZ DER ERGEBNISSE UND VORSCHLÄGE FÜR ZUKÜNFTIGE MOLEKÜLPROFILIERUNGEN	118
9	EXPERIMENTELLER TEIL	120
9.1	ANGABEN ZU DEN VERWENDETEN GERÄTEN	120
9.1.1	<i>Spektrophotometrische Methoden</i>	120
9.1.1.1	Absorptionsspektroskopie	120
9.1.1.2	Fluoreszenzspektroskopie	120
9.1.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	121
9.2	REAGENZIEN	121
9.2.1	<i>Puffersysteme</i>	121
9.2.2	<i>Molekularbiologisches Material</i>	122
9.2.2.1	DNA	122
9.2.2.2	Enzyme	122
9.2.3	<i>Referenzsubstanzen</i>	122
9.2.4	<i>Testsubstanzen</i>	123
9.2.5	<i>Sonstiges</i>	123
9.3	SOFTWARE	124
9.4	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	124
9.4.1	<i>Bestimmung der T_m-Werte</i>	124
9.4.2	<i>Ethidiumbromid-Verdrängungsassay</i>	125
9.4.3	<i>Unwinding-Assay</i>	125
9.4.4	<i>Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung</i>	126
9.4.4.1	Methode a	126
9.4.4.2	Methode b	126

9.4.5	<i>Bestimmung der Topoisomerase II-Hemmung</i>	127
9.4.6	<i>Footprinting-Assay</i>	128
FORMELN-ANHANG		129
LITERATURVERZEICHNIS		137

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A ₂₆₀	UV-Absorption bei 260 nm
m-AMSA	Amsacrin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPE-Puffer	Bisphosphat-EDTA-Puffer
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
C ₅₀	Konzentration einer Substanz, die im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eine Fluoreszenzabnahme von 50% verursacht
CPT	Camptothecin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
B-DNA	DNA in der nativen B-Form
cccDNA	Kovalent geschlossene, ringförmige DNA (<i>covalently closed circular</i>)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
scDNA	Superspiralisierte DNA (<i>supercoiled</i>)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<i>single strand</i>)
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA (<i>calf thymus</i>)
DTP	<i>Developmental Therapeutic Program</i> des NCI
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EtdBr	Ethidiumbromid
F	Fluoreszenz
G	Guanin
GI ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Hemmung des Zellwachstums verursacht (<i>growth inhibitory concentration</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Menschliches Immunodefizienz-Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Hemmung eines Enzyms verursacht (<i>inhibitory concentration</i>)

Im	Imidazol
K _{app}	DNA-Bindungskonstante
LC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Tötung der Zellen verursacht (<i>lethal concentration</i>)
Lk	Verwindungszahl (<i>linking number</i>)
MIC	Kleinste Konzentration einer Substanz, bei der eine Enzym-Hemmung nachweisbar ist (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MGBLs	Rinnenbinder (<i>minor groove binding ligands</i>)
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NMR	Kernspin-Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PBD	Pyrrlobenzodiazepin
PCC	Korrelationskoeffizient nach Pearson (<i>Pearson's correlation coefficient</i>)
PKC	Proteinkinase C
Py	Pyrrrol
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRB	Sulphorhodamin B
SV 40	Simian virus 40
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur der DNA
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-bindende Proteine
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGI	Konzentration einer Substanz, die eine 100%ige Hemmung des Zellwachstums verursacht (<i>total growth inhibition</i>)
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tw	Helikale Windungszahl (<i>twisting number</i>)
Wr	Superhelikale Windungszahl (<i>writhing number</i>)

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Krebs

1.1.1 Definition

Mit dem Wort Krebs bezeichnet man eine wuchernde, bösartige Geschwulstbildung des menschlichen und tierischen Gewebes. Krebs entwickelt sich auf Grund einer abnormalen und unkontrollierten Zellteilung, wobei ein Tumor, eine krankhafte Gewebszunahme entsteht

Bösartige Tumore wachsen schrankenlos, dringen in die umgebenden Gewebe ein und zerstören sie (Abb. 1-1). Durch das Ausbreiten von Zellen in andere Gewebe, bilden sich sogenannte Metastasen, d.h. Tochtergeschwülste, entfernt von der eigentlichen Bildungsstelle des Tumors [1]. Deswegen auch der Name *Cancer*, den die Krankheit von dem römischen Arzt Claudius Galenus (129-199 n. Chr.) bekommen hat: die Invasivität der Geschwulstbildung gleicht dem Bild eines Krebses, der seine Gliedmaßen aus allen Teilen des Körpers nach außen streckt [2].

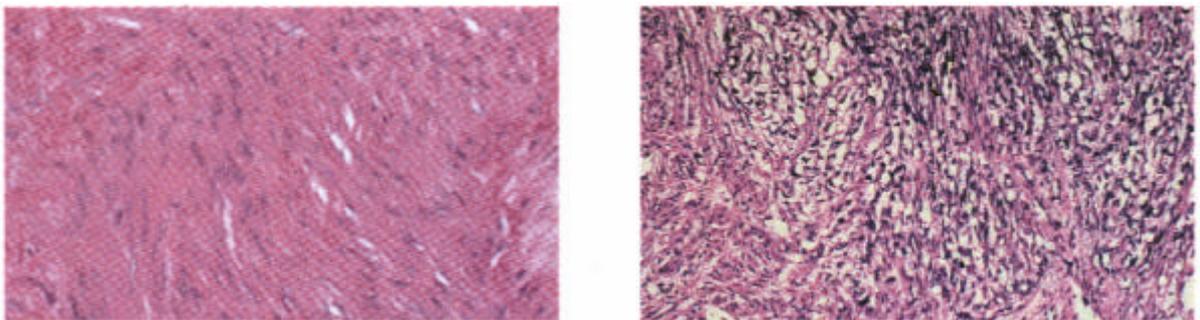


Abb. 1-1: Gesundes (l.) und krebsartiges (r.) Gewebe [nach 3]. Die dunkelgefärbten Tumorzellen sind in das gesunde Gewebe eingedrungen.

1.1.2 Tumorgenese

Die Ätiologie der Tumorentstehung ist zum großen Teil ungeklärt, denn die Ursache von Krebs geht mit einer Reihe unterschiedlicher umweltbedingten und chemischen Faktoren einher. Grundsätzlich sind aber die meisten Krebserkrankungen auf Schädigungen der DNA oder auf Störungen ihrer Replikation bzw. Reparatur zurückzuführen [4, 5].

Diese können ihrerseits mehrere Ursachen haben: synthetische oder natürlich vorkommende Chemikalien, partikuläre oder elektromagnetische Strahlung und Viren. Zur Transformation einer gesunden Zelle in den krebsartigen Zustand kommt es aber erst dann, wenn mehrere carcinogene Veränderungen stattgefunden haben. Durch die Wirkung von Carcinogenen auf die DNA der Zelle können Mutationen ausgelöst werden, wodurch Proto-Onkogene aktiviert bzw. Anti-Onkogene (auch Tumor-Suppressor-Gene genannt) inaktiviert werden können. Solche Onkogene fördern die Zellproliferation, indem sie die Wirkung von Wachstumsfaktoren und bestimmter Hormone nachahmen [5, 6, 7]. Auf der anderen Seite findet man bestimmte Krebstypen familiär gehäuft, was vermuten läßt, daß es eine genetische Veranlagung dafür gibt. Das ist z.B. beim Retinoblastom der Fall.

1.1.3 Therapieansätze

Die Vielfältigkeit der Tumorerkrankungen sowie die Tatsache, daß Krebszellen, wenn auch entartet, immer noch körpereigene Zellen sind, macht die Krebstherapie extrem schwierig. Die partielle Immunreaktion des Körpers gegen Krebszellen wird durch die hohe Tumorstadiumwachstumsrate schnell überwältigt und bleibt wenig wirksam [1].

Nach wie vor sind Chirurgie, Radio-, Immuno- und Chemotherapie die wichtigsten Therapieansätze für die Behandlung von Krebs; die besten Erfolgchancen hat eine Kombination von chirurgischer, Immuno- und Chemotherapie.

1.1.3.1 Chemotherapie in der Krebsbehandlung

Grundsätzlich unterscheiden sich Krebszellen von gesunden Zellen in ihrer verstärkten Teilungsrate. Medikamente, die nun die Synthese oder die Funktion von Nukleinsäuren oder die Mitose beeinträchtigen, reduzieren diese verstärkte Proliferation.

Tabelle 1-1 zeigt eine Zusammenfassung einiger klinisch angewandten Zytostatika. Eine ausführliche Beschreibung der pharmazeutischen Chemie und der Pharmakologie der Chemotherapeutika ist u.a. in [1] und in [6] zu finden.

Tabelle 1-1: Einige Beispiele von klinisch eingesetzten Zytostatika [1, 6, 8].

Gruppe	Name	Wirkungsmechanismus	Zellzyklus-Phase
Alkylantien	Cyclophosphamid (Cyclostin® u.v.a.)	Alkylierung der DNA an N-7 von Guanin	Phasen- unabhängig
	Cisplatin (Platinex® u.v.a.)	Alkylierung der DNA an N-7 von Guanin	Phasen- unabhängig
Antibiotika	Daunorubicin (Daunoblastin®)	Interkalation in die DNA und Hemmung der Topoisomerasen	Phasen- unabhängig
	Bleomycin (Bleomycinum Mack)	Interkalation in die DNA und Bildung freier Radikale	Phasen- unabhängig
Antimetabolite	Methotrexat (Farmitrexat® u.v.a.)	Folsäureantagonist	S-Phase
	Cytarabin (Alexan® u.v.a.)	Hemmung der DNA-Synthese	S-Phase
	Cladribin (Leustatin®)	Hemmung der DNA- Reparatur	S-Phase
Topoisomerase- Hemmer	Topotecan (Hycamtin®)	Hemmer der Topoisomerase I	S- und M- Phase
	Etoposid (Vepesid®)	Hemmer der Topoisomerase II	S- und G ₂ - Phase
Mitosehemstoffe	Vinblastin (Velbe®)	Hemmung des Aufbaus der Kernspindel	M-Phase
	Paclitaxel (Taxol®)	Blockierung des Abbaus der Kernspindel	G ₂ - und M-Phase

1.1.3.2 Neue Therapieansätze bei Krebs

Die Fortschritte in der Krebsforschung und die Kenntnisse über die Krebsbiologie haben zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei Krebs geführt [9]. Die Signaltransduktionswege vieler Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene sind mittlerweile bekannt, wie z. B. der Farnesyltransferase-Weg [10]. Verschiedene Farnesyltransferase-Hemmer, die einen solchen Signaltransduktionsweg blockieren, befinden sich in klinischer Entwicklung als neue antineoplastische Agenzien, beispielsweise SCH-66336 [10].

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Angiogenese, die Gefäßbildung in Tumorgewebe und Metastasen, denn das Tumorwachstum benötigt ausreichend Sauerstoff. Verschiedene Substanzgruppen werden auf diesem Gebiet untersucht, unter anderem Angiostatin und Endostatin, die endogene Hemmstoffe der Angiogenese darstellen, oder Tyrosinkinase-Hemmer, die am Rezeptor für das endotheliale Wachstum angreifen, worüber Angiopoietine aktiviert werden. Ebenso Matrix-Metalloproteinasen, wie Collagenasen und Gelatinasen, sind an Angiogenese und Tumorwachstum sowie Tumorausbreitung beteiligt.

Ein weiteres Forschungsgebiet befaßt sich mit der Telomerase. Dieses Enzym, das in stark proliferierenden Geweben und in der Keimbahn, nicht aber in somatischen Zellen zu finden ist, ist an der DNA-Replikation beteiligt und sorgt dafür, daß die Chromosomenenden, die bei jeder Verdopplung der DNA gekürzt werden, wieder synthetisiert werden, wodurch die Alterung der Zelle aufgehoben wird. Durch Hemmung der Telomerase kann der normale Alterungsprozess wieder hergestellt werden. Auch das bekannte Zytostatikum Cisplatin, dessen primäre Wirkung eine Alkylierung der DNA ist, ist als Telomerase-Hemmer wirksam. Ein neuer Stoff auf diesem Gebiet ist Telomestatin, isoliert aus *Streptomyces anulatus*, welches den zur Zeit selektivsten und potentesten Inhibitor von Telomerase darstellt (Abb. 1-2) [11].

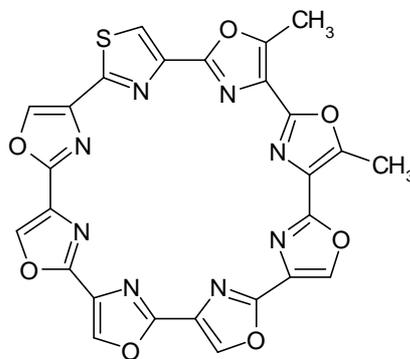


Abb. 1-2: Telomestatin als Hemmer der Telomerase.

Ein wichtiger Punkt in der Forschung nach neuen Wegen der Krebstherapie ist die Tumor-Selektivität. Ein innovativer Ansatz in diesem Sinne ist die Anwendung von monoklonalen Antikörpern, die sich gegen Wachstumsfaktoren richten. Ein Beispiel ist der rekombinante humanisierte IgG1 Antikörper Trastuzumab gegen den menschlichen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2), der in 25-30% aller Mammarkarzinome überexprimiert wird. Durch Andocken der Antikörper an den Zelloberflächenrezeptor wird eine Zerstörung der Krebszellen durch das Immunsystem eingeleitet [12].

Ein neuer Ansatz wird in der Onkopharmakogenomik gefunden. Hierunter wird ein Therapiekonzept verstanden, bei dem die Therapie dem genetischen Zustand des Patienten angepaßt wird, da dessen Empfindlichkeit gegenüber einer Therapie genetisch determiniert ist. Ziel ist es, an charakteristisch veränderten Genen bei Krebspatienten anzugreifen.

1.2 Zielsetzung

Trotz der Erfolge der Chemotherapie in der Krebsbehandlung ist es unerläßlich, selektivere Chemotherapeutika zu entwickeln.

Der Erfolg bei der Auffindung neuer Arzneimitteln hängt davon ab, wie genau das Design der Stoffe rationalisiert werden kann. Das rationale Design eines Stoffes mit spezifischer Aktivität gegen ein bestimmtes humanes Target benötigt eine genaue Definition dieses Targets. Bezüglich Krebs gibt es praktisch keine befriedigenden Informationen über einzelne zellbiochemische Eigenschaften von Krebszellen, die in der Forschung nach neuen Therapeutika als spezifisches Target benutzt werden könnten. Heute werden immer noch die meisten Chemotherapeutika auf empirischem Wege gefunden.

In der Arbeitsgruppe U. Pindur werden seit Jahren neue potentielle Zytostatika der Indol- und Carbazol-Reihe entwickelt. Dabei werden für die neu synthetisierten Verbindungen zunächst die Antitumor-Screening-Daten des *National Cancer Institute* herangezogen. Um die Frage des Wirkmechanismus der aktiven Substanzen zu lösen, wird nach den möglichen Targets dieser Verbindungen gesucht.

Im Mittelpunkt der potentiellen Targets stehen die DNA, die mit der DNA unmittelbar verbundenen Enzyme, wie z.B. die Topoisomerase I, und andere an der Tumorzellproliferation beteiligten Enzyme, wie z.B. Proteinkinasen.

Vor diesem Hintergrund ist Ziel der vorliegenden Arbeit, an Hand ausgewählter Synthesubstanzen und bekannter Standard-Zytostatika verschiedene Methoden zur Bestimmung der DNA- und Topoisomerase-Wechselwirkungen zu etablieren, zu validieren und deren Eignung für den zukünftigen Aufbau von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu prüfen.

Um optimale Verfahren mit guter Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu etablieren, sind zunächst die in den Literatur beschriebenen Methoden im Detail zu überprüfen. Basierend auf den literaturbekannten Konzepten sollen nun DNA-Bindungs-Methoden sowie Topoisomerase-Hemmungs-Assays aufgebaut werden. Die einzelnen Methoden sollen

optimiert werden und auf ihre Eignung in der Routine-Analytik geprüft werden. Dabei soll vor allem die Leistungsfähigkeit der Verfahren an den neuen Syntheseprodukten der Arbeitsgruppe im Vergleich mit Standardsubstanzen ermittelt werden.

Anschließend soll die Anwendung der etablierten Methoden für die Analyse der im Arbeitskreis U. Pindur synthetisierten Verbindungen zum Studium der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen solcher Stoffe und zur Planung weitergehender Synthese beitragen.

2 Allgemeiner Teil zu den Methoden: DNA und damit wechselwirkende Arzneistoffe

2.1 DNA

Die DNA (*DesoxyriboNucleic Acid*) ist Träger der genetischen Information in allen zellulären Lebensformen sowie in vielen Viren. Sie hat zwei zentrale Funktionen: sie steuert ihre eigene Replikation während der Zellteilung und sie steuert die Transkription der komplementären RNA für die folgende Proteinbiosynthese [4]. Den Fluß der genetischen Information, der somit entsteht, bezeichnet man als das zentrale Dogma der Molekularbiologie, in Abb. 2-1 dargestellt.

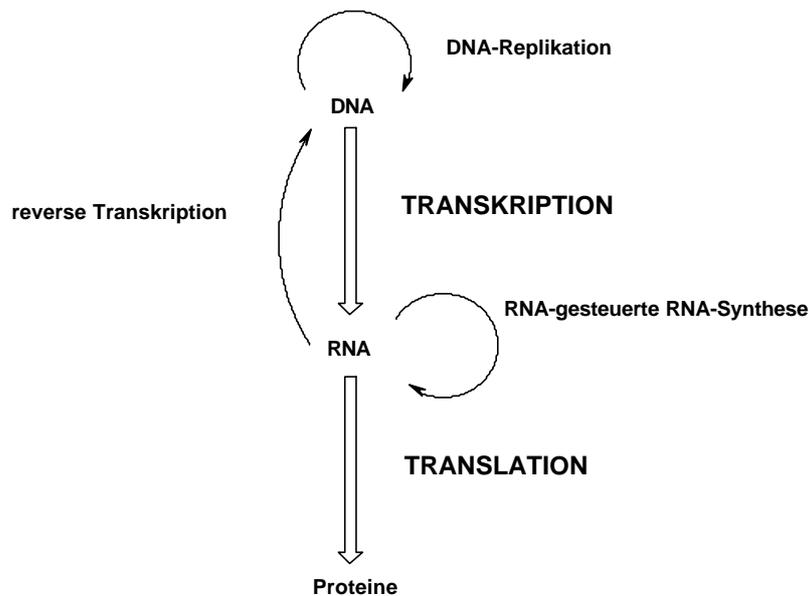


Abb. 2-1: Zentraldogma der Molekularbiologie [13].

Die native Form der DNA, die B-DNA (Abb. 2-2), wurde zum ersten mal im Jahr 1953 von J. Watson und F. Crick aufgeklärt. Sie besteht aus zwei antiparallel verlaufenden Polynukleotidketten, die sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse winden und eine über Wasserstoff-Brückenbindungen zusammengehaltene Doppelhelix bilden [4]. Auf der DNA-Doppelhelix kann man eine kleine und eine große Furche erkennen, in welche die funktionellen Gruppen der „Seitenkanten“ der Basen hineinragen, die nicht an der Wasserstoff-Brückenbindung beteiligt sind. Es ergibt sich dabei für jedes Basenpaar ein

spezifisches Muster von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, an dem spezifisch DNA-bindende Proteine – aber auch niedermolekulare Stoffe – das jeweilige Basenpaar erkennen können (s. Kap. 2, S. 27; [14]).

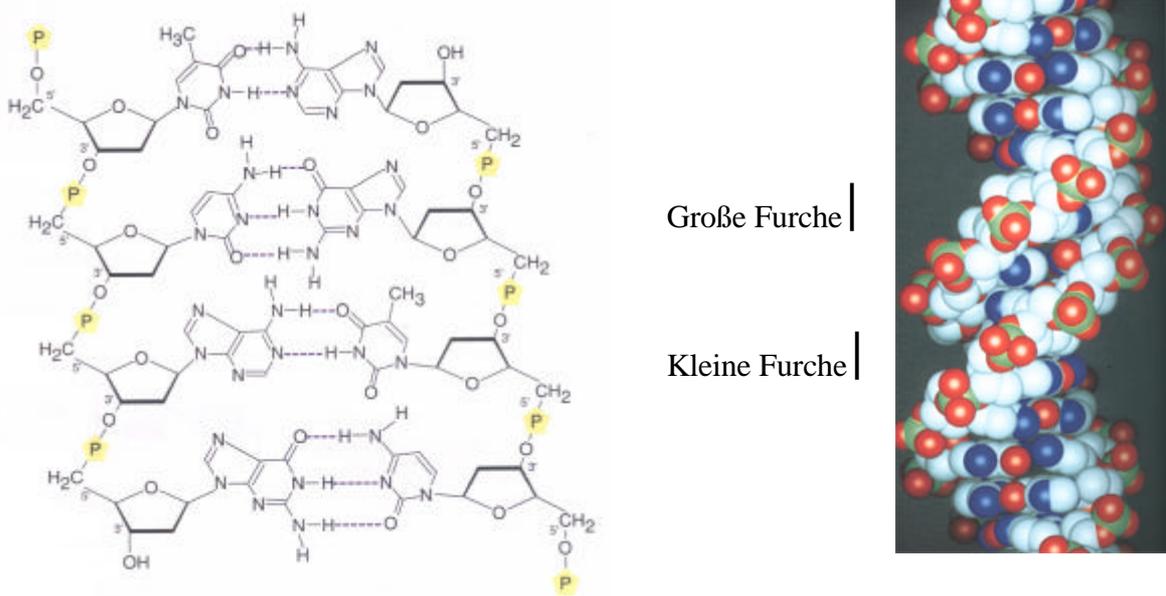


Abb. 2-2: Komplementäre Basenpaarung in der B-DNA (links) und raumfüllendes Modell der B-DNA (rechts) [4].

Die DNA-Doppelhelix ist auf höherer Ebene in unterschiedlichen Strukturen organisiert. In Bakterien ist die zirkuläre chromosomale DNA um sich selbst spiralisiert und noch mal in eine kompakte Form zusammengefaltet, die durch RNA und Proteine zusammengehalten wird. In eukaryotischen Zellen ist das lineare DNA-Molekül superspiralisiert und assoziiert mit Histonen in einem kompakten Komplex, der als Chromatin bezeichnet wird (Abb. 2-3).

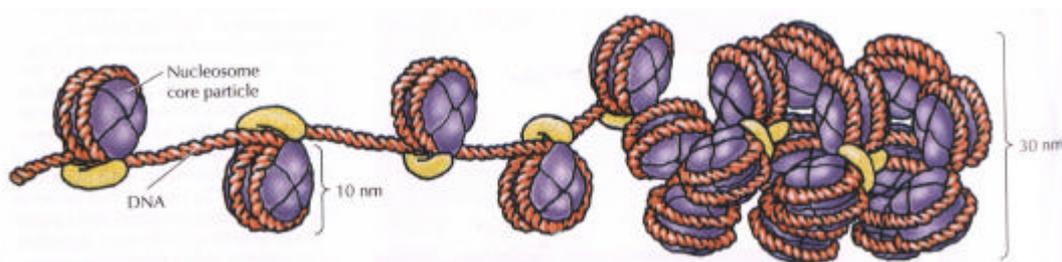


Abb. 2-3: Chromatinstruktur [nach 3]

2.2 DNA-selektive Liganden

Bei jeder Zellteilung wird die DNA repliziert. Das hat zur Folge, daß bei einer gestörten DNA-Replikation auch die Zellproliferation blockiert wird. Das macht aus der Nukleinsäure ein sehr interessantes Target für die Wirkstoff-Chemie. Eine Reihe von niedermolekularen Stoffen wechselwirken mit der DNA, u.a. mehrere Wirkstoffe gegen Krebs. Das Studium der Art dieser Bindung an der DNA ist essentiell, um den Wirkungsmechanismus solcher Stoffe zu verstehen und um Prinzipien zu formulieren, nach welchen das weitere Molekül-Design spezifischerer und effektiverer antitumoraktiver Wirkstoffe erfolgen soll.

DNA-Liganden können nach der Art ihrer Wechselwirkung mit der DNA – entweder kovalent oder nicht-kovalent – grob unterteilt werden (s. auch Kap. 1, S. 13). Im folgenden soll auf einige für die Arbeit relevante Verbindungen und deren Bindung an der DNA eingegangen werden.

2.2.1 Stoffe, die kovalent an die DNA binden

Stoffe, welche die Nukleinsäure kovalent binden, führen zu Vernetzungen der DNA-Stränge (*cross link*-Bildung), zu einer anormalen Basenpaarung und sogar zur Spaltung der DNA. Meistens handelt es sich um alkylierende Zytostatika, die mit nukleophilen Stellen der DNA – vor allem mit N7 und mit dem exozyklischen N2 von Guanin – reagieren [6]. Die ältesten Verbindungen dieser Gruppe sind Derivate von Dichlordiethylsulfid (S-Lost), das im ersten Weltkrieg als Gelbkreuzkampfstoff eingesetzt wurde. Weitere Alkylantien sind z.B. N-Nitrosoharnstoff-Derivate und Platin-Komplexe, die immer noch in der Klinik angewandt werden [1, 6].

Unter den Alkylantien in einem weiteren Sinne kann man auch die Pyrrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepine (PBD) einordnen [1]. Die PBD-Verbindungen binden kovalent an das exozyklische N2 von Guanin in der kleinen Rinne der DNA (Abb. 2-4) [1, 15].

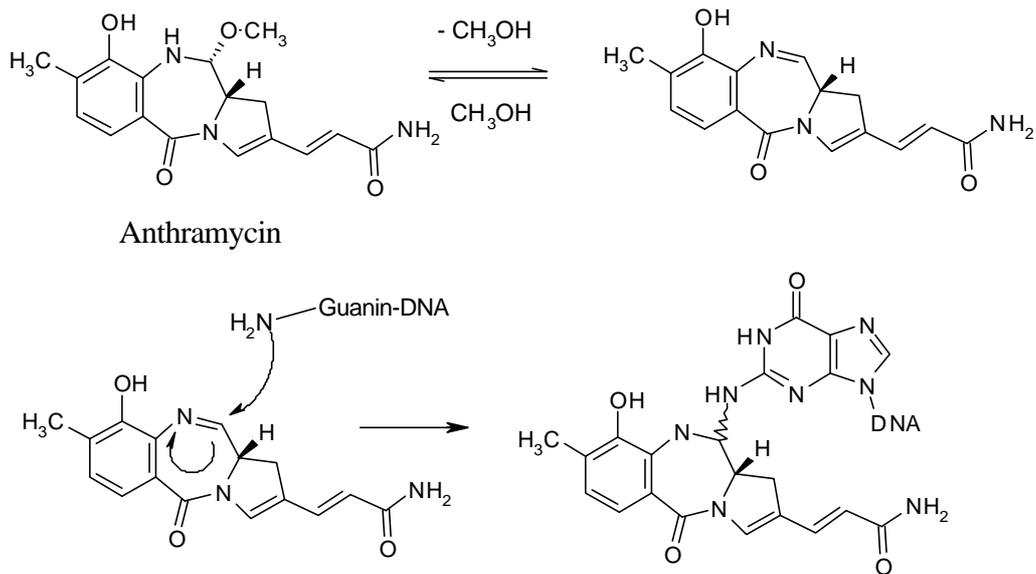


Abb. 2-4: Das PBD-Antibiotikum Anthramycin und seine Bindung an die DNA [15].

Eine neuere Klasse von DNA-alkylierenden Stoffen bilden (+) CC-1065 und Duocarmycin A (Abb. 2-5) [16]. Diese zwei Verbindungen binden in der kleinen Rinne und alkylieren dort Guanin und Adenin an Position N3.

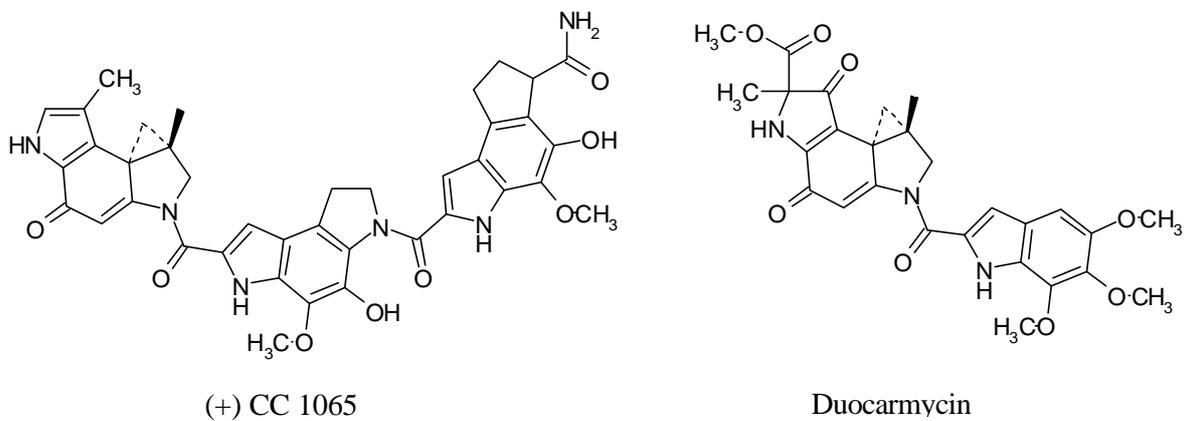


Abb. 2-5: Die Struktur von (+)CC-1065 und (+)Duocarmycin A als DNA-rinnenbindende Alkylantien.

Eine ausführliche Beschreibung des Wirkungsmechanismus von Verbindungen, welche die DNA kovalent binden, kann der Literatur entnommen werden [1, 6, 17].

2.2.2 Stoffe, die nicht-kovalent an die DNA binden

Eine Vielzahl von Stoffen, die mit der DNA wechselwirken, bilden keine kovalente Bindung aus, sondern DNA-Komplexe. Die am besten untersuchten Liganden, sind solche, die ein weitgehend planares konjugiertes π -Elektronen-System besitzen und in die DNA interkalieren. Unter Interkalation (aus dem Lateinischen: *intercalare*, hineinstecken) eines Liganden in die B-DNA versteht man die Einlagerung eines planaren Chromophors zwischen zwei gestapelten Basenpaaren, senkrecht zur DNA-Helixachse [18].

Einen zweiten gut definierten Bindungsmodus zeigt eine andere Familie von Liganden, die typischerweise eine geladene Gruppe an einem oder beiden Enden eines linearen Gerüsts besitzen. Weil die Bindung solcher Stoffe zu keiner Entwindung der DNA führt und einen längeren DNA-Abschnitt in Anspruch nimmt, ist eine Anlagerung in die kleine Rinne als Bindungsmodus für diese Stoffe vorgeschlagen worden. Bei höheren Ligand/DNA-Verhältnissen und bei bestimmten Stoffen ist noch eine unspezifische Bindung an der Außenseite der DNA möglich, sie ist aber nicht von besonderer pharmakologischer Bedeutung [19].

2.2.2.1 Interkalierende Stoffe

Bei der Interkalation ändern sich Primär- und Sekundärstruktur der DNA nicht, die Helix (Tertiärstruktur der DNA) wird aber zum Teil verlängert und entwunden (Abb. 2-6) [20, 21].

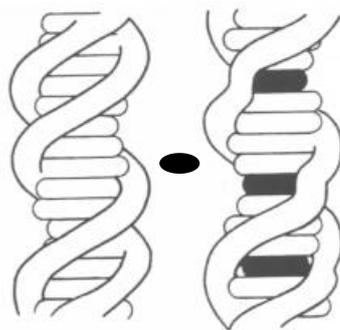


Abb. 2-6: Schematische Darstellung der Einlagerung eines Interkalators (in schwarz) zwischen den DNA-Basenpaaren [nach 18].

Durch Interkalation werden verschiedene biochemische Prozesse auf DNA-Ebene blockiert: die DNA-abhängige RNA-Polymerase wird gehemmt und auch die Topoisomeraseaktivität kann herabgesetzt werden (siehe Kap. 3).

Die Bildung eines Interkalationskomplexes erfolgt in drei Schritten (Abb. 2-7) [22]. Zuerst müssen sich die Basenpaare voneinander trennen, so daß ein Hohlraum für die Anlagerung des Liganden entsteht. Durch diese Entwindung der DNA werden auch die Phosphatgruppen voneinander entfernt. Eine Reduktion der Ladungsdichte findet statt, so daß die Gegenionen (M^+) frei werden. Der nächste Schritt besteht in dem hydrophobischen Transfer¹ des apolaren, aromatischen Interkalators aus der Lösung an die Bindungsstelle. Im letzten Schritt entstehen verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen DNA und Ligand-Molekül, das damit sozusagen verankert wird. Bei der Summation der Wechselwirkungen handelt es sich um spezifische Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Interkalator und DNA, zusammen mit van der Waals-Kräften, elektrostatischen Bindungen und dem sogenannten π - π -Stacking zwischen den π -Elektronen der Basen und des Interkalators [23]. Bei geladenen Liganden spielen Ionenbindungen eine zusätzlich Rolle.

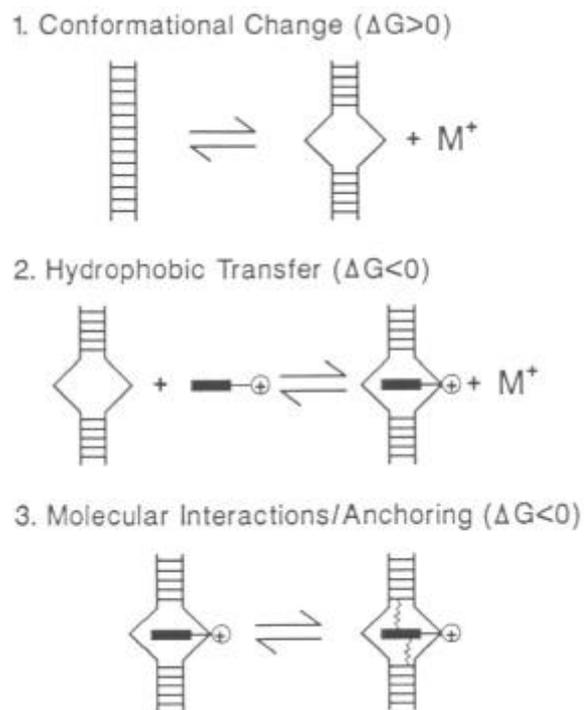


Abb. 2-7: Modell für die Interkalation [nach 22]; M^+ : Phosphatgerüst-Gegenionen.

¹ Unter *hydrophobischem Transfer* versteht man den Transfer des Ringsystems aus dem wässrigen Milieu in den lipophilen Hohlraum der DNA, der sich durch Entstapelung der Basen gebildet hat.

Der Begriff Interkalation wurde zum ersten Mal 1961 von Lerman benutzt, um die DNA-Bindung der Acridine zu erklären [24]. Schon bei den Acridinen kann man die Struktur-Merkmale eines typischen Interkalators erkennen (Abb. 2-8): eine coplanare hydrophobische Region mit einer Fläche größer als 28 \AA^2 , in der mindestens zwei anellierte aromatische Ringe vorhanden sind, sowie protonierbare oder wasserstoff-brückenbindungsfähige Gruppen auf dem Chromophor selbst und/oder an den Seitenketten [20, 25].

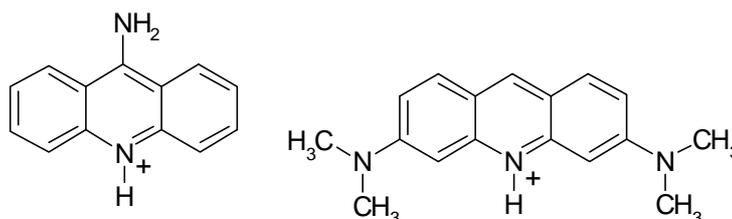


Abb. 2-8: 9-Aminoacridin und Acridin-Orange als Interkalatoren.

Seit 40 Jahren sind Tausende von Verbindungen isoliert oder synthetisiert worden, die in die DNA interkalieren und in allen sind die oben beschriebenen Struktur-Merkmale wiederzufinden [2, 20, 26]. Eine erschöpfende Beschreibung aller interkalierenden Stoffen kann der zahlreichen Literatur entnommen werden [1, 6, 17, 20].

Da nach der Zielsetzung dieser Arbeit auch Interkalation-Phänomene neuer Carbazole und Derivate untersucht werden soll, soll hier zur Erläuterung die Referenzsubstanz Ellipticin vorgestellt werden. Es handelt sich dabei um ein Carbazolderivat – 5,11-Dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazol –, das 1959 aus *Ochrosia elliptica* isoliert wurde [27]. Ellipticin und seine drei Derivate pflanzlicher Herkunft Olivacin und die 9-methoxysubstituierten Analoga (Abb. 2-9) zeigen antitumoraktive und zytotoxische Aktivität, die offenbar auf verschiedenen Wirkungsmechanismen beruhen [28, 29]. Zum einen interkaliert Ellipticin bevorzugt in GC-reiche Sequenzen, wahrscheinlich in seiner protonierten Form [30, 31]. Eine Bevorzugung für 5'-CpG-3'-Schritte an der DNA ist typisch für Interkalatoren auf Grund der Polarisierbarkeit, der größeren π -Oberflächenüberlappung und der geringeren Energie für das *Unstacking* – die Trennung der DNA-Basen voneinander [32]. Durch die Interkalation von Ellipticin in die DNA werden bestimmte DNA-bindende Enzyme gehemmt, wie z.B. die Topoisomerase II, mit der Ellipticin einen ternären DNA-Komplex bildet, der zu DNA-Strangbrüchen führt (siehe auch Kap. 3, S. 49) [33, 34]. Zum anderen kann dieses Carbazol in Position 9 oxidiert werden, so daß ein Phenoxy-Radikal entsteht, aus dem sich ein elektrophiles Chinonimin

bildet. Während das Radikal zu DNA-Strangbrüchen führt, kann das Chinonimin mit nukleophilen Biomolekülen reagieren [35].

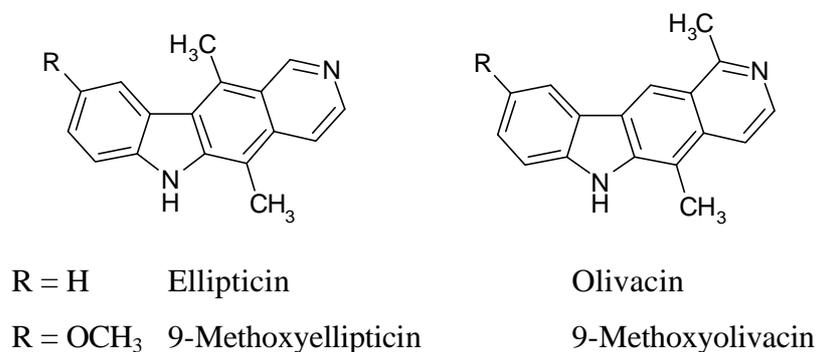


Abb. 2-9: Die Alkaloide Ellipticin, Olivacin und ihre 9-Methoxyderivate.

Mit dem Ziel, eine höhere DNA-Affinität und eine spezifischere Zytotoxizität zu erreichen, wurden zahlreiche Derivate von Ellipticin synthetisiert. Die meisten Derivate tragen einen Substituenten am aromatischen Stickstoff in Position 2 und zeigen durch die positive Ladung eine stärkere Affinität zur DNA [36, 37]. In anderen Derivaten ist einer der Benzolringe durch einen bioisosteren Aromat ersetzt worden [31, 38]. Die klinischen Anwendungen der Ellipticine sind aber trotz der weiteren Modifizierungen wegen der starken Nebenwirkungen beschränkt geblieben [37].

Neben Ellipticin wurden auch Mitoxantron und Amsacrin (m-AMSA) als Referenzsubstanzen im experimentellen Teil dieser Arbeit eingesetzt (Abb. 2-10). Diese beide Interkalatoren befinden sich seit Jahrzehnten in der klinischen Anwendung und sind dementsprechend gut mit biophysikalischen und zellbiologischen Methoden, sowie mit *Molecular Modelling* untersucht worden [39, 40, 41 und Zitate in diesen].

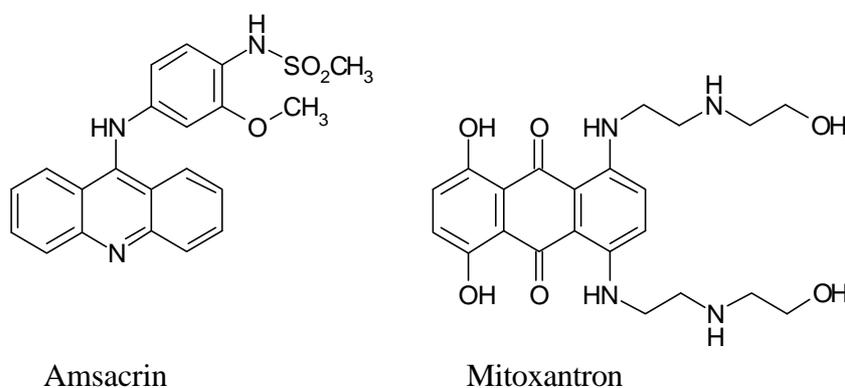


Abb. 2-10: Die Struktur von Amsacrin (m-AMSA) und Mitoxantron.

Beide Stoffe interkalieren bevorzugt in GC-reiche Sequenzen, wobei die Seitenketten in die große Rinne „hinausragen“. Dadurch kommt es zu Wechselwirkungen mit Gen-regulierenden Proteinen und mit der Topoisomerase II, die von beiden Stoffen gehemmt wird (siehe auch Kap. 3, S. 49) [39-41].

Eine andere Gruppe von interkalierenden Stoffen, deren Wirkung zum Teil auf der Hemmung der Topoisomerase beruht, stellen Antibiotika der Anthracyclinreihe dar (Abb. 2-11). Diese finden seit vielen Jahren in der Therapie von Systemtumoren und soliden Karzinomen Anwendung [6, 42].

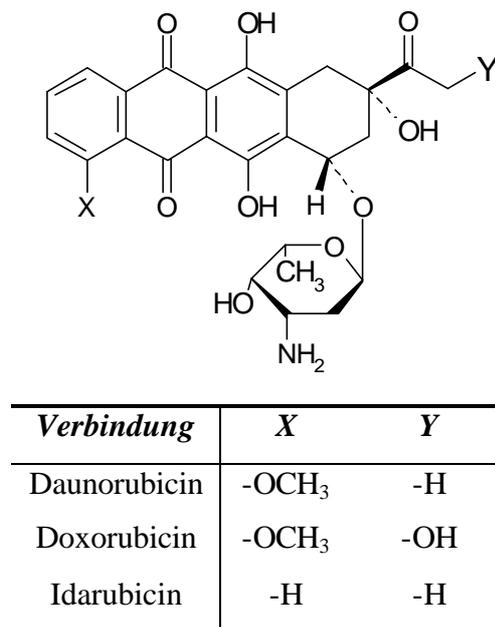


Abb. 2-11: Einige ausgewählte Anthracycline [nach 6].

Diese Stoffe, die seit Ende der 60er Jahre über einen längeren Zeitraum aus verschiedenen Streptomyces-Arten isoliert worden sind, bestehen aus einem System von vier Ringen, die über eine glykosidische Bindung an einen Aminozucker – Daunosamin – gebunden sind. Das Aglykon interkaliert in die DNA und verursacht eine Verzerrung der Helix, die von Enzymen erkannt werden kann, wie z.B. von der Topoisomerase II. Die Zuckerreste lagern sich in die kleine Rinne und können dort mit essentiellen Enzymen – u.a. Topoisomerasen und Polymerasen – wechselwirken.

Die Wechselwirkung mit den Topoisomerasen ist ein typischer Effekt vieler interkalierender Stoffe und hat zu der Vermutung geführt, daß die Zytotoxizität solcher Substanzen nicht von der Stärke der Interkalation abhängig ist, sondern von der Fähigkeit, diese essentiellen

Enzyme zu hemmen [17]. Die Hemmung kann dabei direkt durch Wechselwirkung mit dem Enzym erfolgen oder über die Verzerrung der Helix in Folge der Interkalation. Die Entwindung der DNA-Heilix, zu der die Bindung aller interkalierender Stoffe führt, ist die kennzeichnende Eigenschaft der Interkalation. Man macht sich dieses Merkmal bei der Bestimmung des Bindungsmodus von DNA-Liganden zunutze (siehe auch Kap. 4, S. 58).

2.2.2.2 Bisinterkalatoren

Bei vielen Interkalatoren, wie z.B. Amsacrin, korreliert die chemotherapeutische Wirkung mit der Stärke der DNA-Affinität [41]. Ausgehend von dieser Überlegung wurden Verbindungen synthetisiert, in welchen zwei interkalierende Moleküle über eine Kette unterschiedlicher Art und Länge gebunden sind. Auf Grund der dualen Wechselwirkung mit der DNA zeigen solche Bisinterkalatoren eine höhere DNA-Bindung (K_{app} bis zu 10^{11} M^{-1} gegen $K_{app} 10^6\text{-}10^8 \text{ M}^{-1}$ bei Monointerkalatoren [43, 44]) und eine geringere Dissoziationsgeschwindigkeit als die Monointerkalatoren [45]. Ein Prototyp solcher Stoffe ist Ditercalinium, in dem zwei Moleküle 9-Methoxyellipticin über das Stickstoff in Position 5 miteinander gekuppelt sind (Abb. 2-12) [46]. Ditercalinium zeigt zytotoxische Aktivität durch Schädigung des DNA-Reparatursystems der Zelle und führt auf molekularbiologischer Ebene zur Entstapelung der DNA-Basenpaare (*Unstacking*) [47].

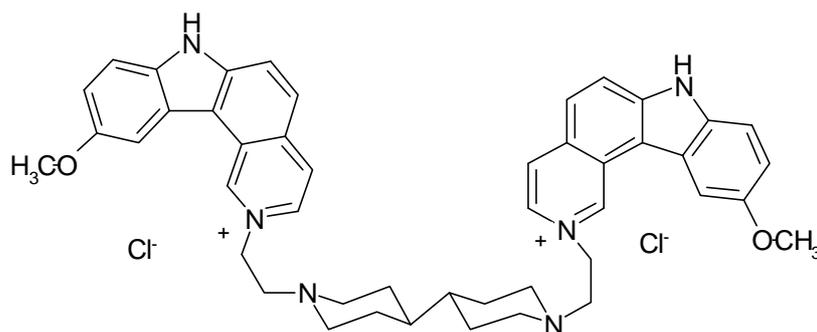


Abb. 2-12: Das Bisinterkalator Ditercalinium.

Die Natur der „linkenden“ Kette – optimale Länge ca. 11 \AA – beeinflusst bei Bisinterkalatoren die Art der Wechselwirkung mit der DNA. Strukturell ist es besonders wichtig, daß der Linker fähig ist, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden und eventuell z.T. kationisch ist. Er muß in der Lage sein, Wechselwirkungen in den DNA-Rinnen einzugehen (s. u.).

2.2.2.3 Rinnenbindende Stoffe

Mit *Groove Binding* bezeichnet man die Anlagerung von niedermolekularen Stoffen – aber auch von Proteinen – in den Rinnen der DNA. Charakteristisch für diese Art der DNA-Bindung ist die Basen-Sequenzselektivität, die sich durch die hinausragenden Seitengruppen der DNA-Basen in die große und kleine Furche ergibt (vgl. Abb. 2-2, S. 18 und Abb. 2-13).

Auch für diese Art der Bindung, wie für die Interkalation (s.o.), ist ein energetisches Modell erstellt worden [22]. Da die DNA-Konformation durch Bindung in der Rinne kaum geändert wird, besteht das Modell nicht aus drei Schritten, wie bei der Interkalation, sondern nur aus zwei: zuerst gibt es einen hydrophobischen Transfer² des Liganden in die DNA-Rinne, dann entstehen nichtkovalente molekulare Wechselwirkungen – vor allem Wasserstoff-Brückenbindungen – die den Komplex zusammen halten [22].

Während niedermolekulare Stoffe meist an der kleinen Rinne binden, wechselwirken größere Moleküle, genau wie Proteine, eher mit der großen Furche der DNA. Das liegt daran, daß kleinere Moleküle sich räumlich „enger“ an die kleine Rinne anpassen können und dort gute stabilisierende Wechselwirkungen mit der DNA eingehen, während großvolumige Proteine die breitere und flachere große Rinne bevorzugen. Außerdem steht den Proteinen durch die herausragenden Seitengruppen der DNA-Basen in der großen Rinne eine größere Menge an molekularen Informationen zur Verfügung, welche die sequenzselektive Bindung an die DNA gewährleistet. Dies ist z. B. für die Genexpression und -regulation notwendig [48].

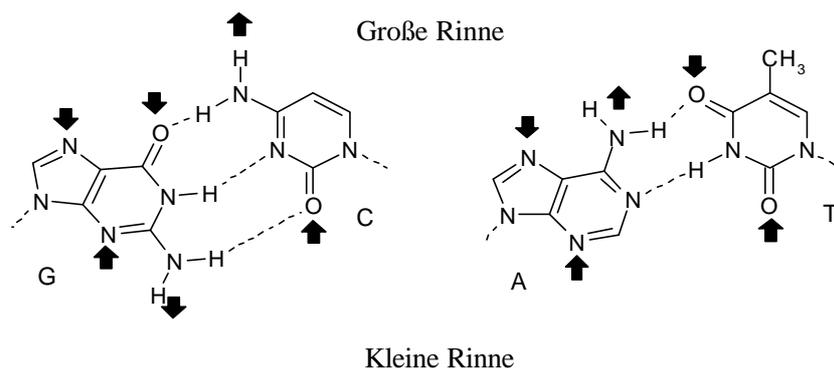


Abb. 2-13: Wasserstoffdonor- (↑) und Wasserstoffakzeptorgruppen (↓) in den DNA-Rinnen [nach 13].

² Siehe Fußnote S. 22

Allerdings hängt eine sequenzspezifische Bindung der Proteine an die DNA nicht nur vom genauen „Ablesen“ der Sequenz ab, sondern auch von der Konformation der DNA in bestimmten Abschnitten. Mittlerweile ist eine Reihe von Proteinen entdeckt worden, die in der kleinen Rinne binden können, wie z.B. viele chromosomale Proteine (u.a. Histone HI und das nicht-histonische chromosomale Protein HMG-I) und bestimmte Gen-regulierende Proteine (u.a. der RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor TFIID) [49, 50]

Das Ziel, der sequenzspezifischen Bindung von Gen-regulierenden Proteinen zu ähneln, wird in der Forschung nach DNA-gezielten Liganden angestrebt. Man erhofft sich hiermit, Krebs und andere genetisch bedingte Krankheiten DNA-selektiv therapieren zu können. Mit der Entwicklung neuer rinnenbindender Stoffe scheint dieses Ziel erreichbar zu sein.

Durch die Bindung in der kleinen Rinne ergibt sich eine spezifische Zusammensetzung von Wechselwirkungen zwischen Wasserstoffdonor- und Wasserstoffakzeptorgruppen der DNA und der Liganden, so daß die neu-entwickelten rinnenbindenden Liganden (*minor groove binding ligands*, MGBLs) z.B. in der Lage sind, die vier Basenpaare der DNA – AT, TA, GC, CG – zu unterscheiden [51]. Die Entwicklung solcher spezifischen Agentien könnte eine Alternative oder ein komplementärer Ansatz zu der Strategie der Antisense-Oligonukleotide sein. Allerdings binden die meisten niedermolekularen MGBLs – vor allem die Naturstoffe – an AT-reichen Sequenzen in der kleinen Rinne. Das liegt daran, daß der AATT-Bereich der DNA sehr eng ist, verglichen mit GC-reichen Sequenzen. Zusätzlich sind elektrostatische Wechselwirkungen in der AT-reichen kleinen Rinne günstiger als in GC-Bereichen [48].

Unter den Leitstrukturen, mit denen die Forschung nach sequenzspezifischen DNA-Liganden angefangen hat, sind insbesondere die Naturstoffe Netropsin und Distamycin A zu erwähnen. Netropsin ist ein Antibiotikum, isoliert aus *Streptomyces netropsis* [52, 53], das antitumorale und zugleich antivirale Aktivität besitzt [54]. Die chemische Struktur-Einheit von Netropsin und der eng verwandten Verbindung Distamycin A, isoliert aus *Streptomyces distallicus* [55] ist die N-Methyl-4-aminopyrazol-2-carbonsäure (Abb. 2-14).

Verschiedene Ergebnisse aus Röntgenstrukturanalysen von kristallisierten Komplexen zwischen unterschiedlichen Oligonukleotiden und Netropsin bzw. Distamycin A und NMR-Studien solcher Komplexe [56, 57, 58, 59] bestätigen die bevorzugte Anlagerung dieser zwei Verbindungen in AT-reichen Arealen der kleinen Rinne. Man diskutiert drei Gründe: a) Wasserstoff-Brückenbindungen entstehen zwischen dem amidischen NH der Liganden und dem Sauerstoff in Position 2 von Thymin oder dem Stickstoff in Position 3 von Guanin; b) die gesamte Strukturkomplementarität führt zu engen van der Waals-Wechselwirkungen

zwischen Ligand und DNA; c) elektrostatische Wechselwirkungen bestehen zwischen der polyanionischen DNA und den kationischen Liganden [60]. Außerdem verhindert die C2-Aminogruppe von Guanin auf dem Boden der Rinne bei GC-reichen Sequenzen die dortige Anlagerung der Liganden aus sterischen Gründen [48].

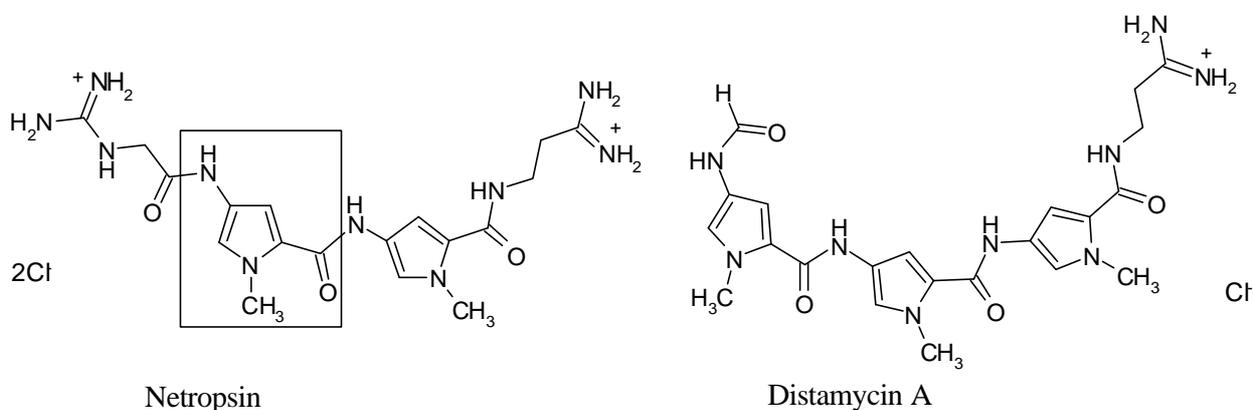


Abb. 2-14: Die AT-selektiven MGBLs Netropsin und Distamycin A.

Auf der modularen Polyamid-Struktur von Netropsin und Distamycin basieren die sogenannten Lexitropsine. Mit diesem Namen wurden 1985 von R. Dickerson und J.W. Lown solche Stoffe benannt, die in der Lage sind, durch spezifische Wechselwirkungen in der kleinen Rinne bestimmte Sequenzen auf der DNA zu „lesen“ [59, 61]. Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Lexitropsinen erfolgte durch den Austausch des natürlich vorkommenden N-Methylpyrrols mit anderen fünfgliedrigen Heterocyclen, vor allem mit Imidazol, wodurch eine Bindungselektivität für GC-reiche Sequenzen erreicht wurde [62]. Die Entdeckung im Jahr 1990, daß sich zwei Moleküle Distamycin A in antiparalleler Orientierung nebeneinander in der kleinen Rinne anlagern können, führte zur Entwicklung von homo- und heterodimeren Liganden [59, 60, 63]. Während der 1:1-Bindungsmodus nur den Unterschied zwischen AT- und GC- Basenpaaren erlaubt, zerstört der 2:1-Bindungsmodus diese Symmetrie so, daß AT- von TA-Basenpaaren und GC- von CG-Basenpaaren unterschieden werden können [51, 60, 63]. Dervan und Mitarbeiter entwickelten eine Reihe von Lexitropsin-Dimeren, in denen die zwei Ketten ein einziges Polyamidmolekül mit einer flexiblen γ -Aminobuttersäure-Brücke in der Mitte bilden [60, 64, 65, 66]. Bei anderen Polyamid-Dimeren sind die zwei Polyamidketten über einen Linker gebunden, der im Zentrum oder am Ende des Moleküls angreifen kann. Dadurch entstehen sogenannte *Hairpin-* (Haarnadel), *Cross-linked-* und *Bis-Polyamide* (Abb. 2-15).

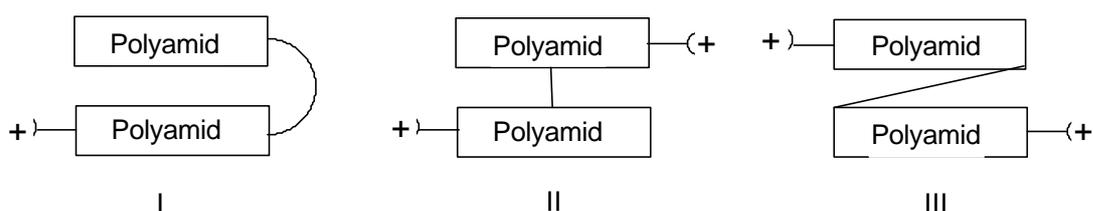


Abb. 2-15: Modelle für Lexitropsindimere: *Hairpins*- (I), *Cross-linked*- (II) und *Bis-Polyamide* (III) [nach 67].

Solche Lexitropsine können in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung aus Pyrrol-, Imidazol- und 3-Hydroxypyrrolringen verschiedene Sequenzen von Basenpaaren auf der DNA spezifisch erkennen. Sie zeigen eine Bindungsaffinität vergleichbar mit der von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen [60, 68]. Ein *Hairpin*-Polyamid aus 8 Ringen (ImPyPyPy- γ -ImPyPyPy- β -Dp, Abb. 2-16), das gezielt die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors TFIIIA binden sollte, zeigte in der Tat eine Hemmung der Transkription der 5S RNA-Gene [69].

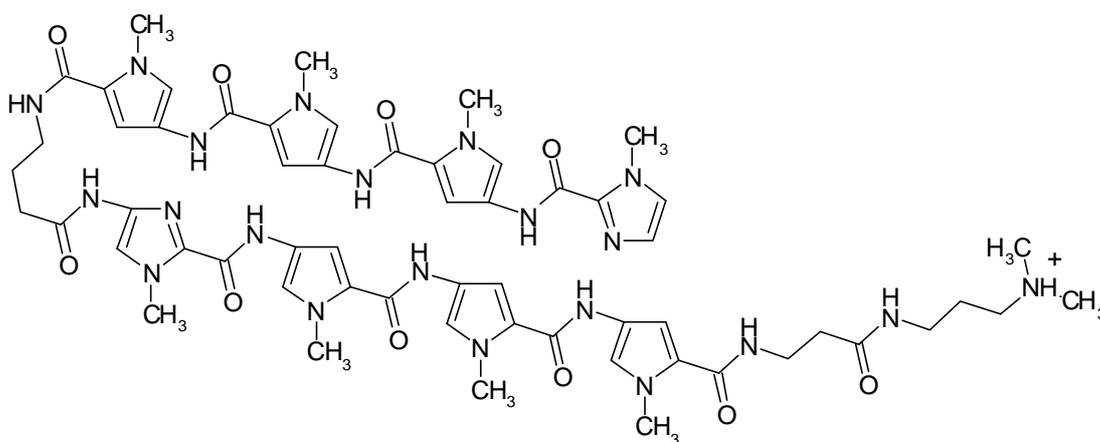


Abb. 2-16: Das *Hairpin*-Polyamid ImPyPyPy- γ -ImPyPyPy- β -Dp; Im: Imidazol; Py: Pyrrol; γ : γ -Aminobuttersäure; β : β -Alanin; Dp: Dimethylaminopropylamid.

Andere Targets solcher Lexitropsine sind z.B. die HIV-Integrase, ein Enzym, das für das Einfügen von viraler DNA in das Chromosom der Wirtszelle zuständig ist, verschiedene TATA-Box-Regionen und die DNA-Gyrase [67].

Eine andere Gruppe von Rinnenbindern besteht aus synthetischen Bis-benzimidazol- und Indolderivaten, wie z.B. Hoechst 33258 (2'-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-

2,5'-bi-1*H*-benzimidazol) oder DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (Abb. 2-17). Beide erkennen AT-reiche Bereiche in der kleinen Rinne der DNA und binden dort in einem Bereich von 4-5 Basenpaaren [70, 71, 72].

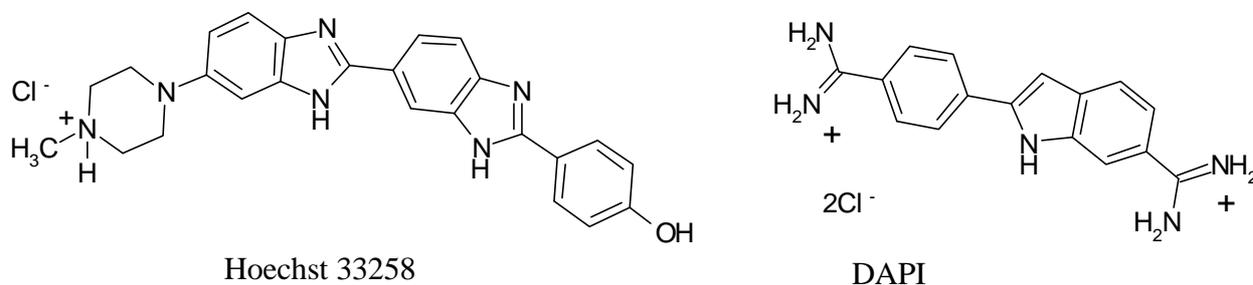


Abb. 2-17: Das Bis-benzimidazolderivat Hoechst 33258 (Pibenzimol) und das Indolderivat DAPI.

Eine ausführliche Beschreibung von biologisch aktiven *DNA-minor groove binding ligands* und von den Möglichkeiten der Sequenzselektivität kann mehreren Reviews entnommen werden [60, 66, 67, 73].

2.2.2.4 Hybridmoleküle

Als Hybridmoleküle bei DNA-Liganden werden Verbindungen bezeichnet, in denen strukturelle und wirkungsspezifische Eigenschaften verschiedener Arten von DNA-Liganden vereinigt werden. Meistens handelt es sich dabei um eine Verbindung von sequenzselektiven Motiven eines Rinnenbinders mit alkylierenden oder interkalierenden Gruppen, deren Wirkung sonst – wenn alleinstehend – sequenz-unabhängig ist [74]. Seit ihrer Entdeckung in den 40er/50er Jahren spielen alkylierende Stoffe eine große Rolle in der Chemotherapie von Krebs (s. Kap. 1, S. 19). Sie sind aber leider selbst hoch kanzerogen, denn sie besitzen eine starke elektrophile Reaktivität, außerdem mangelt es ihnen an DNA-Spezifität (s. S. 19). Aus diesen Gründen ist ein interessanter Forschungsschwerpunkt die Entwicklung von Verbindungen, in denen „einfache“ Alkylantien mit DNA-selektiven Trägern vereint sind. Als Leitstruktur dieser Gruppe von Verbindungen ist das Bis(2-chloroethyl)aminobenzoylderivat von Distamycin A, Tallimustin zu erwähnen (Abb. 2-18) [75]. Diese Verbindung ist ein hochspezifisches Alkylans und ein DNA-Rinnenbinder. Die Substanz führt zu Monoalkylierung an N3 des 3'-Adenins in der Sequenz 5'-TTTTGA-3' [76].

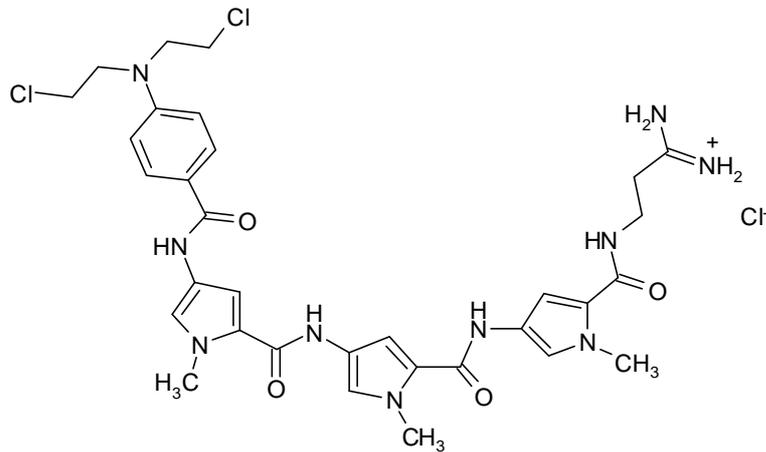


Abb. 2-18: Die Struktur von Tallimustin [76].

Hybridmoleküle, die ein rinnenbindendes Element des Typ von Distamycin A oder Netropsin mit einem interkalierenden Chromophor kombinieren, werden in Analogie mit den Lexitropsinen Combilexine genannt [75].

Combilexine natürlicher Herkunft sind z.B. Actinomycin oder die Anthracycline (Abb. 2-11), wie z.B. Daunomycin oder Nogalamycin, in denen die Interkalation des planaren Chromophores von der sequenzselektiven Anlagerung der Peptid- bzw. Zuckerreste in der Rinne begleitet wird. Viele Interkalatoren sind auch in der Lage, die Topoisomerasen zu hemmen (siehe Kap. 3, S. 36), und diese Eigenschaft ist in einigen Hybridmolekülen wieder zu finden. Zu erwähnen ist z.B. NetAmsa (Abb.2-19), ein Hybridmolekül aus Netropsin und Amsacrin, das mit dem rinnenbindenden Teil in AT-reichen Regionen der kleinen Rinne bindet, während das Chromophor interkaliert und die Methansulfonamidgruppe des Amsacrin-Strukturteils in die große Rinne hineinragt [77].

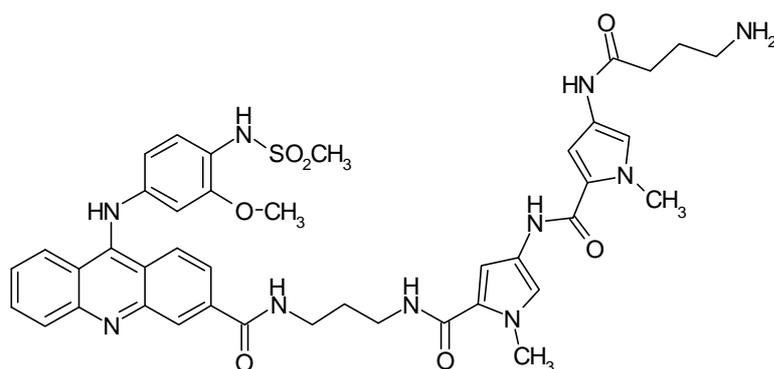


Abb.2-19: NetAmsa

Weitere Beispiele von Hybridmolekülen können der Literatur entnommen werden [72, 74, 78].

3 Allgemeiner Teil zu den Methoden: DNA-modifizierende Enzyme – Topoisomerasen

Da in dieser Arbeit auch ein Assay zur Topoisomerase-Hemmung etabliert wurde, soll im folgenden auf die Topologie der DNA sowie auf die Topoisomerasen und deren Hemmung etwas detaillierter eingegangen werden.

Die helikale Struktur doppelsträngiger DNA erlaubt die genaue Duplikation der DNA selbst sowie die Weitergabe der genetischen Information von einer Generation zu der nächsten und bewahrt gleichzeitig die Integrität der Polynukleotidkette. Durch diese Struktur kommt es aber während der semikonservativen Replikation zur Superspiralisierung der Stränge vor der sich fortbewegenden Replikationsgabel. Bei der Replikation zirkulärer Genome oder Plasmide, wobei die DNA-Matrizen physikalisch gebundene Ringe darstellen, entstehen umeinander gewundene Helices. In ähnlicher Weise kommt es bei der DNA-Transkription zur Bildung beschränkter Domänen von negativ und positiv superspiralisierter DNA hinter dem Transkriptionskomplex bzw. vor ihm [79].

Solche topologische Prozesse werden in der Natur von einer Familie von Enzymen reguliert: den Topoisomerasen. Ohne diese ubiquitären Enzyme würde die Superspiralisierung der Stränge die weitere Bewegung des Replikations- bzw. Transkriptionskomplexes am DNA-Strang hindern, so daß Replikation und Transkription gehemmt wären.

Die Topoisomerasen ändern die DNA-Topologie, d.h. den Torsionszustand der DNA-Stränge, in dem sie einen Strangbruch und die darauffolgende Wiederverknüpfung promovieren. Sie werden anhand der Anzahl der DNA-Stränge, die sie spalten und der kovalenten Bindung in dem Enzym-DNA-Zwischenprodukt klassifiziert. Die Enzyme vom Typ I spalten nur einen Strang in der DNA-Helix und ändern somit die Verwindungszahl (s. S. 34) in Stufen von eins. Die Topoisomerasen vom Typ IA bleiben bei der Spaltung des DNA-Stranges am 5'-Phosphat gebunden, während die vom Typ IB – zu denen auch die eukaryotische DNA-Topoisomerase I gehört – mit dem 3'-Phosphat reagieren. Alle Typ II-Enzyme spalten und wiederverschliessen beide Stränge der DNA-Helix (die Verwindungszahl ändert sich dabei in Stufen von zwei). Dabei bilden sie sich kovalente Zwischenprodukte am 5'-Phosphat. Die Topoisomerasen unterscheiden sich auch in ihrer Spezifität für die DNA-Konformation. Während die bakteriellen Topoisomerasen I und II für negativ bzw. positiv superhelikale

DNA spezifisch sind, sind die eukaryotischen Topoisomerasen gegenüber beiden Formen gleich aktiv.

Die Bedeutung dieser Enzymen als therapeutisches Target nimmt stetig zu: verschiedene Inhibitoren von Topoisomerasen zeigen antibakterielle, antiparasitäre, antimykotische, antivirale oder antitumorale Wirkung [80].

3.1 Topologie der DNA

Die Verdrillung der DNA, ein Phänomen, das als Superspiralisierung, Superhelicität (engl. *supercoiling*) oder auch als Tertiärstruktur der DNA bezeichnet wird, setzt voraus, daß die DNA in kreisförmigen, geschlossenen Schleifen vorliegt, wie bei viralen und bakteriellen Chromosomen, bei Plasmiden oder beim Proteingerüst eukaryotischer Chromosomen. Man spricht von *cccDNA* aus dem Englischen *covalently closed circular DNA*, kovalent geschlossenen, ringförmigen Duplex-DNA [4, 18]. Die Anzahl der Windungen einer *cccDNA* kann nicht geändert werden, ohne daß mindestens ein Polynukleotidstrang zuvor durchtrennt wird. Dieses Phänomen kann durch eine Gleichung erfaßt werden, die von Mathematikern entwickelt wurde, um die Verdrillung einer geschlossenen Schleife zu beschreiben:

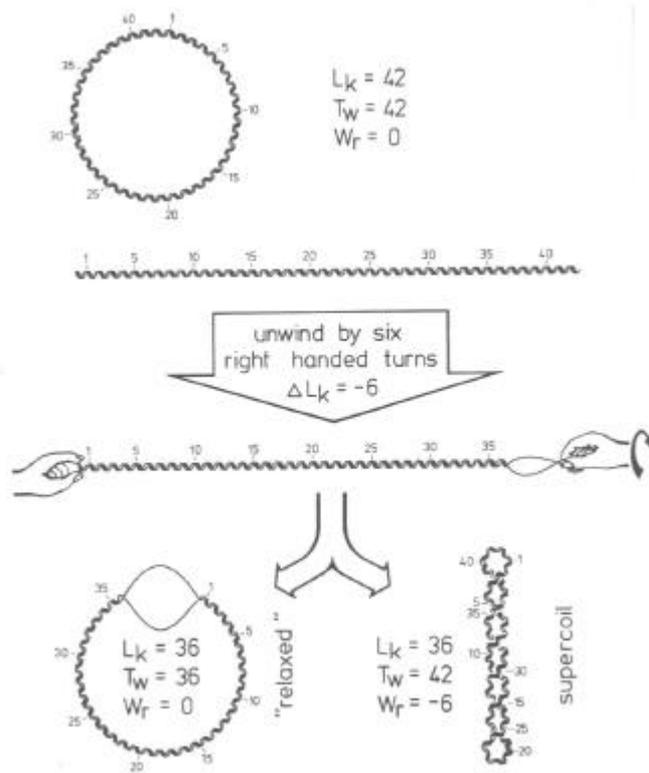
$$Lk = Tw + Wr$$

Lk ist die Verwindungszahl (*linking number*), womit die Windungen eines DNA-Stranges um den anderen gemeint sind. Solange die beiden Polynukleotidstränge intakt bleiben, ist die Verwindungszahl konstant unabhängig davon, ob das zirkuläre Molekül verdrillt oder verformt wird.

Tw ist die helikale Windungszahl (*twisting number*), d.h. die Anzahl der vollständigen Umdrehungen eines Polynukleotidstranges um die Duplex-Achse.

Wr ist die superhelikale Windungszahl (*writhing number*) und gibt die Anzahl der Windungen der Duplex-DNA um die Superhelix-Achse an; sie ist somit ein Maß für die Superhelicität eines DNA-Moleküls.

Verwindungszahl und helikale Windungszahl sind per Definition positiv bei einer rechtsgängigen Helix, während die superhelikale Windungszahl in diesem Fall negativ ist. Bei einer linksgängigen Helix ist die superhelikale Windungszahl hingegen positiv [4].



Entspannte zirkuläre DNA:

$L_k = T_w$, die Duplex-DNA-Achse befindet sich auf einer Ebene; $W_r = 0$

Ringförmige, kovalent geschlossene Duplex-DNA: L_k ist konstant; für jede neue doppelhelikale Windung \mathbf{DT}_w muß eine entsprechende und entgegengerichtete superhelikale Windung erfolgen, d.h. $\mathbf{DW}_r = -\mathbf{DT}_w$.

Abb. 3-1: Änderung von L_k , T_w und W_r an Beispiel einer verdrillten Schnur [nach 18]

3.1.1 Plasmid-DNA

Plasmide sind extrachromosomale doppelsträngige DNA-Elemente, die oft in mehreren identischen Kopien in einer Bakterienzelle vorliegen und sich unabhängig von der Replikation des Genoms der Bakterienzelle replizieren. Obwohl Bakterien gewöhnlich auch ohne Plasmide existenzfähig sind, vermitteln Plasmide unter bestimmten Bedingungen Eigenschaften, die ein Überleben der Bakterienzelle erst ermöglichen, wie z.B. die Resistenz gegen bestimmte Antibiotika.

Ringförmige Plasmid-DNA kann in verschiedenen topologischen Konformationen vorliegen: als superhelikale zirkuläre DNA (Form I), als zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch (*nicked DNA*, Form II), als lineare DNA mit einem Doppelstrangbruch (Form III) und als relaxierte zirkuläre DNA (Form IV) (Abb. 3-2; [2, 18]).

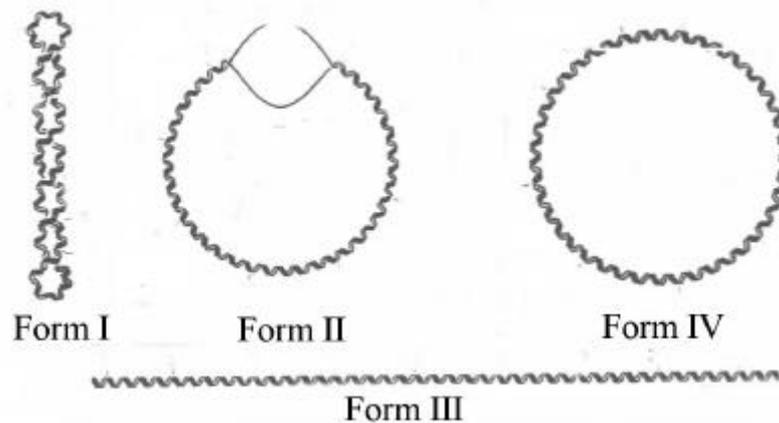


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der verschiedenen Plasmidformen [nach 18].

Die verschiedenen Plasmid-Formen können experimentell mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Mit dieser Methode kann man DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Größe und ihrer Gestalt trennen. Im Falle von Topoisomeren erfolgt die Trennung in Abhängigkeit der Kompaktheit der Moleküle, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit einer zirkulären Duplex-DNA mit dem Grad ihrer Superspiralisierung zunimmt. Superhelikale DNA (Form I) ist sehr kompakt und läuft schneller durch das Agarosegel als Form II-, Form III- oder Form IV-DNA.

Wenn superspiralisierte Plasmid-DNA mit eukaryotischer DNA-Topoisomerase I behandelt wird, entsteht eine Reihe von entspannten Topoisomeren, die auf dem Agarosegel jeweils eine diskrete Bande ergeben, deren Verwindungszahl sich um das Inkrement DLk (s. S. 34) unterscheidet [4, 81].

Man macht sich diese gelelektrophoretische Eigenschaft von Topoisomeren bei der Bestimmung der Topoisomerase-Aktivität auf die DNA in Anwesenheit von anderen Stoffen zunutze (siehe Kapitel 5).

3.2 Topoisomerase I und deren Inhibitoren

Typ I-Topoisomerasen, auch *nicking-closing enzymes* genannt, sind monomere Proteine von 100 bis 120 kD [82, 83]. Sie katalysieren die Entwindung von scDNA, in dem sie einen Einzelstrangbruch herbeiführen und die Enden der DNA wiederverknüpfen [84, 85]. Neben dieser primären Rolle auf DNA-Ebene zeigt die Topoisomerase I mehrere andere biochemische Funktionen [86]. Die eukaryotische Topoisomerase I ist an der Replikation

beteiligt und bindet bevorzugt an DNA-Bereiche, die aktiv transkribiert werden, wie z.B. die Gene für die RNA-Polymerase I und II [87]. Außerdem assoziiert sie mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) und ist an der Initiation der Transkription beteiligt [88, 89]. Die Topoisomerase I zeigt noch eine spezifische Kinase-Aktivität auf SR Proteine³, die an *Splicing*-Prozessen beteiligt sind [90].

Die Gene, die für die Topoisomerasen codieren, scheinen in menschlichen Tumorzellen nicht verändert zu sein; sie werden aber z.B. in Darm-, Ovar- und Speiseröhrenkrebszellen überexprimiert [91, 92]. Diese Überexprimierung der Topoisomerase I bei verschiedenen Krebsarten und ihre Beteiligung an verschiedenen biologischen Prozessen machen sie zu einem geeigneten Angriffspunkt für Stoffe mit antitumorale Wirkung.

Die eukaryotische Topoisomerase I scheint in vier Domänen organisiert zu sein [93, 94]. Die N-terminale Domäne (Met1-Lys197) ist für die Aktivität nicht notwendig und deswegen sehr variabel. Die *core*-Domäne (Glu198-Ile651) bindet an superspiralisierte DNA und bildet mit der C-terminalen Domäne einen 1:1-Komplex, der katalytisch aktiv ist [93, 95]. Die *linker*-Domäne (Asp652-Glu696) bindet an die DNA und stellt eine Art Scharnierbereich dar, an dem *core*- und C-terminale-Domäne in Kontakt zueinander kommen [93, 96]. Die C-terminale Domäne (Gln697-Phe765) beinhaltet das katalytisch aktive Tyrosin 723.

Der katalytische Zyklus, mit dem die Topoisomerase I die DNA entwindet, erfolgt in vier Schritten. Als erstes bindet das eukaryotische Enzym an doppelsträngige DNA (*E. coli*-Topoisomerase I hingegen bindet sehr stark an einzelsträngige DNA), anscheinend am effektivsten in den gebogenen und superspiralisierten Bereichen [97, 98]. Die DNA wird dann gespalten, indem die Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes Y723 eine kovalente Bindung mit dem 3'-Phosphat einer Phosphodiesterbindung eingeht, während die 5'-Hydroxylgruppe der DNA frei bleibt (Abb. 3-3).

Dieses kovalente Reaktionszwischenprodukt wird als *Cleavable Complex* (spaltbarer Komplex) bezeichnet.

Die Entspannung der DNA erfolgt dann entweder über einen Durchgang des intakten Stranges durch den eingefügten Strangbruch oder durch eine Rotation des gespaltenen Stranges um den intakten [99, 100]. Mit einer zweiten Transesterifikation, bei der die 5'-Hydroxylgruppe des gespaltenen DNA-Stranges die Phosphotyrosylbindung nukleophil angreift, wird der Strangbruch wieder verschlossen.

³ SR-Proteine enthalten mehrere Dipeptid-Folgen Serin (S)/Arginin(R) – das sogenannte SR-Motiv – als Erkennungszeichen für Spleißfaktoren.

Dieser Relaxationsprozeß kann durch eine Hemmung der Topoisomerase I an verschiedenen Stellen blockiert werden. Man unterscheidet zwischen sogenannten Topoisomerase I-Giften (engl. *poison*) und sogenannten Topoisomerase I-Hemmern (engl. *suppressor*) [99]. In beiden Fällen kommt es zur Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I: die DNA wird nicht relaxiert.

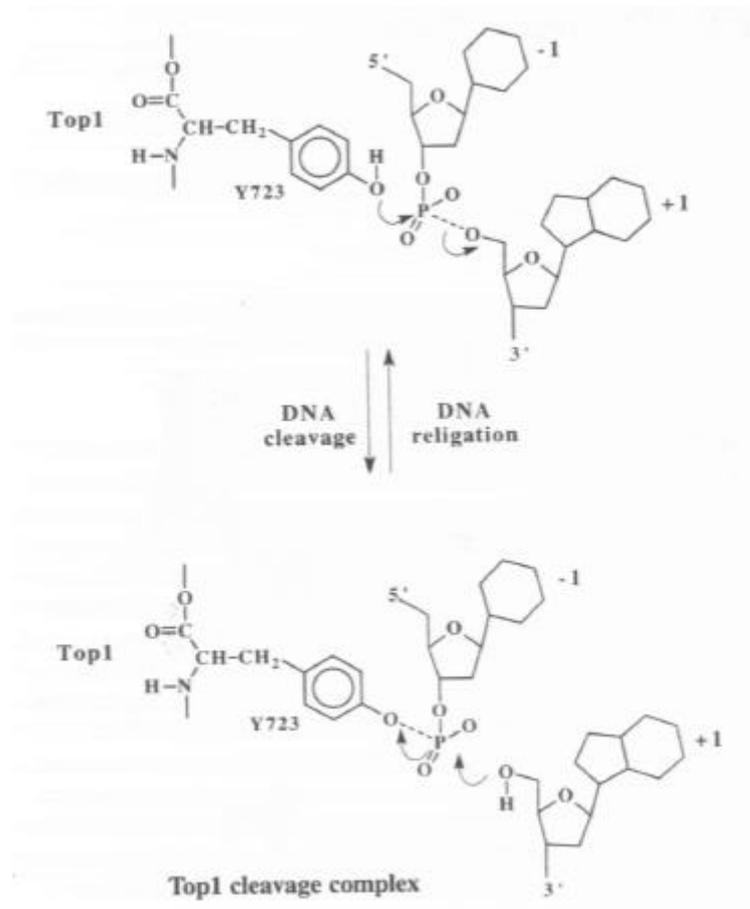


Abb. 3-3: Reaktionen im katalytischen Zyklus der Topoisomerase I [nach 96].

3.2.1 Topoisomerase I-Gifte

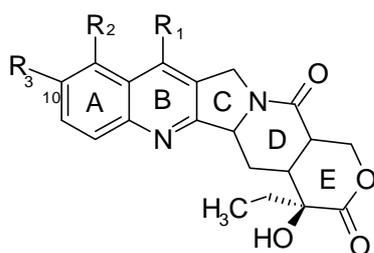
Die Topoisomerase I-Gifte stabilisieren den *Cleavable Complex* zwischen DNA und Enzym, indem sie einen ternären Komplex ausbilden. Die Zytotoxizität solcher Stoffe ist also eher mit dem erhöhten Einfügen von Protein-gebundenen Strangbrüchen in die DNA zu erklären als mit der Hemmung der DNA-Relaxation selbst. Dementsprechend steigt die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Topoisomerase I-Giften mit der Überexprimierung des Enzyms [101, 102]. Eine große Gruppe von Stoffen, die den *Cleavable Complex* stabilisieren, besteht aus

Camptothecin und dessen Derivaten, allerdings gibt es viele weitere Stoffgruppen, die diese Wirkung zeigen. Einige Beispiele werden im Rahmen dieser Arbeit insbesondere in Bezug auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen beschrieben.

3.2.1.1 *Camptothecin und Analoga*

Camptothecin (CPT) ist ein Alkaloid, das in der Rinde, den Wurzeln und Früchten von *Camptotheca acuminata*, einem in Asien beheimateten Baum, vorkommt. Schon in der traditionellen chinesischen Medizin wurden die Pflanzenteile bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes eingesetzt, aber erst in den 50er Jahren wurden solche zytotoxische Effekte in einem Screening von Naturstoffen mit antitumoraler Wirkung beim NCI (National Cancer Institute, USA) wissenschaftlich nachgewiesen. 1966 wurde CPT als Wirksubstanz identifiziert [91, 103], das in der Zelle u.a. eine Hemmung der DNA- und RNA-Synthese sowie die Fragmentierung der DNA bewirkt [104, 105]. Durch die schlechte Löslichkeit und die unerwartete Toxizität wurde die Entwicklung aber bald eingestellt. Erst 1985 wurde das Target von CPT als die Topoisomerase I identifiziert. Dieser damals neue Wirkungsmechanismus führte zu einer Wiederaufnahme der Forschung nach wasserlöslichen und weniger toxischen Derivaten von CPT [106, 107]. In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche Derivate von CPT mit dem Ziel synthetisiert, die Löslichkeit zu verbessern und die Toxizität zu reduzieren. In Abb. 3-4 sind einige Derivate von Camptothecin dargestellt.

Ab 1996/1997 wurden Topotecan (Hycamtin[®]) zur Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und Irinotecan (Campto[®]) zur Behandlung des Kolonkarzinoms zugelassen. Andere Topoisomerase-I-Hemmstoffe dieser Familie, u.a. 9-AminoCPT, sind zur Zeit in der klinischen Forschung [108, 109]. Trotz der planaren Struktur sind alle Camptothecine nicht in der Lage zu interkalieren. Ihre Zytotoxizität ist auf die DNA-Einzelstrangbrüche zurückzuführen, die durch Stabilisierung des *Cleavable Complex* entstehen [106, 110, 111]. Was Struktur-Aktivitäts-Beziehungen betrifft, ist der intakte Lactonring für die Wirkung essentiell, Substituenten im E-Ring sowie eine Konfigurationsumkehr an Position 20 führen zu Inaktivierung [112]. Substituenten in 7- oder 9-Stellung beeinflussen die Hemmung nicht, während kleine Substituenten in Position 10 zu einer Aktivitätserhöhung führen, wie im Falle von SN-38 [113, 114].



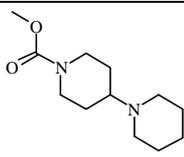
Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
CPT	-H	-H	-H
9-AminoCPT	-H	-NH ₂	-H
Topotecan	-H	-CH ₂ N(CH ₃) ₂	-OH
Irinotecan (CPT-11)	-CH ₂ CH ₃	-H	
SN-38	-CH ₂ CH ₃	-H	-OH

Abb. 3-4: Struktur von Camptothecin und einiger Derivate

Ein Problem bei den Camptothecin-Derivaten besteht darin, daß alle Verbindungen dieser Familie bei physiologischem pH-Wert im Gleichgewicht mit der biologisch inaktiven Carboxylat-Form des Lactonringes stehen [115]. Deswegen wurden in den letzten Jahren verschiedene Topoisomerase I-Gifte der sogenannten non-Camptothecin Reihe entwickelt.

3.2.1.2 Topoisomerase I-Gifte mit anelliertem Chromophor

Viele unterschiedliche aromatische und heteroaromatische Stoffe sind in der Lage, den *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase I zu stabilisieren. Verbindungen aus der Familie der Benzoanthracene, wie z.B. Saintopin [116], fügen Protein-gebundene Einzelstrangbrüche in die DNA ein und zeigen eine ähnliche Sequenzspezifität wie CPT [117]. Die Naturstoffe Nitidin und Fagaronin mit Benzophenanthridin-Grundgerüst sind zusätzlich starke DNA-Interkalatoren [118, 119, 120]. Beide stabilisieren den *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase I, und hemmen auch die Topoisomerase II, jedoch blockiert nur Nitidin den Topoisomerase II-DNA-Komplex. Intoplicin ist sowohl ein Inhibitor beider Topoisomerasen als auch ein DNA-Interkalator [121]. Die Protoberberine

Coralyn und 5,6-Dihydrocoralyn sind hingegen schwächere Interkalatoren als die Benzophenanthridine und haben kaum Wirkung auf die Topoisomerase II [122]. Wakayin, ein marines Naturprodukt, zeigt einen ähnlichen Hemmungsmechanismus der Topoisomerase I wie CPT, wenn auch mit schwächerer Wirkung [123]. In Abb. 3-5 sind diese Inhibitoren der Topoisomerase I dargestellt.

Strukturell neu ist die Verbindung NSC 314622, deren Wirkungsmechanismus vom National Institute of Health mit Hilfe der COMPARE-Analyse des Zytotoxizitätsmusters entdeckt wurde (siehe auch Kap. 6, S. 76). Die Substanz hemmt die Topoisomerase I über Stabilisierung des *Cleavable Complex* an anderen Stellen als CPT, ohne Interkalation in die DNA [124, 125].

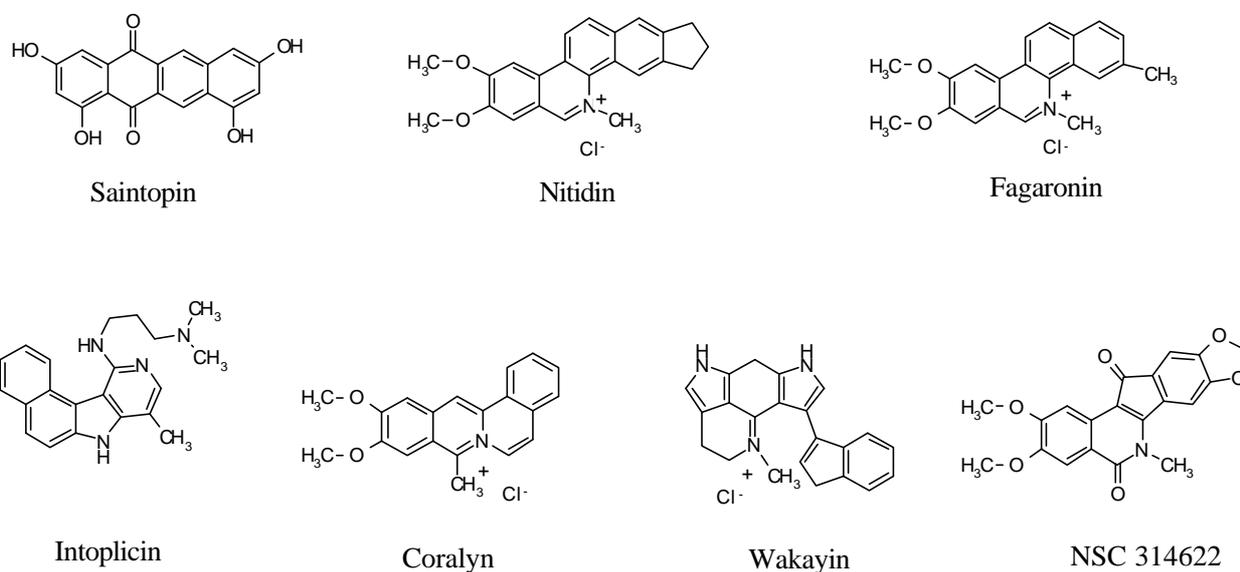


Abb. 3-5: Topoisomerase I-Gifte mit aneliertem Chromophor.

3.2.1.3 Indolocarbazole als Topoisomerase I-Gifte

Indolocarbazole stellen eine besondere Gruppe von Inhibitoren der Topoisomerase I dar, denn die meisten zeigen zusätzlich eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC). Sie wechselwirken mit der ATP-Bindungsstelle der PKC, worauf vermutlich auch ihre Unspezifizität beruht, denn diese Bindungsstelle ist bei fast allen Kinasen vorhanden, die ATP als Cosubstrat verwenden [126]. Indolocarbazole mit antibiotischer Wirkung wurden als Naturstoffe zwischen dem Ende der 80er und dem Anfang der 90er Jahre entdeckt. Unter den ersten Verbindungen waren Staurosporin, isoliert aus *Streptomyces staurosporeus* [127], BE

13793C, isoliert aus *Streptoverticillium mobaraense* [128], und Rebeccamycin, isoliert aus *Saccharotrix aerecolonigenes* [129] (Abb. 3-6).

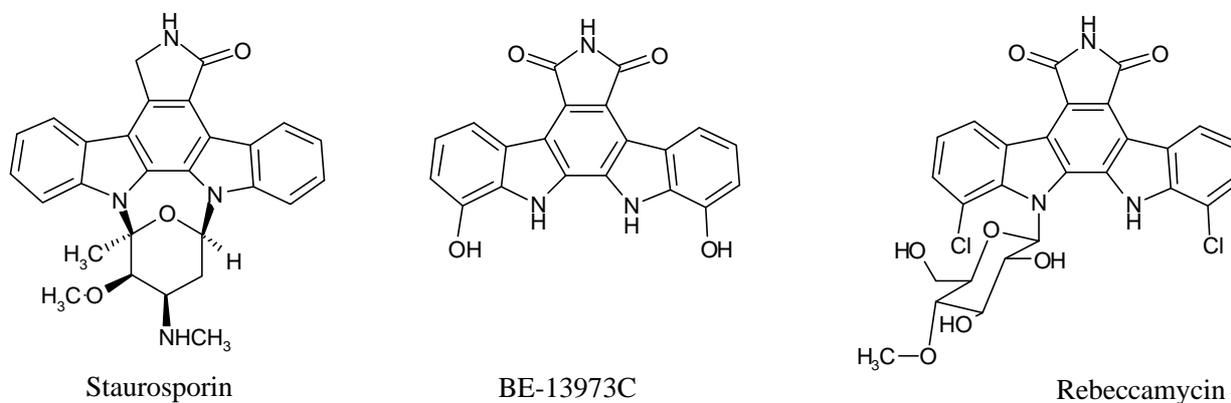


Abb. 3-6: Die Indolocarbazol-Antibiotika Staurosporin, BE-13793C und Rebeccamycin.

Während Staurosporin die Proteinkinase C hemmt und kaum Wirkung auf die Topoisomerase I zeigt, sind BE 13793C und Rebeccamycin zwei DNA-Interkalatoren, die den DNA-Topoisomerase I Komplex stabilisieren und somit die katalytische Aktivität der Topoisomerase I hemmen, ohne die Proteinkinase C-Aktivität zu beeinflussen, wie Tabelle 3-1 zeigt [126, 130, 131].

Tabelle 3-1: PKC- und Topoisomerase I- Hemmung durch Staurosporin, BE-13793C und Rebeccamycin; IC₅₀: Konzentration eines Hemmstoffes, die zu einer 50%igen Hemmung des Enzyms führt; MIC: kleinste hemmende Konzentration.

Verbindung	IC ₅₀ PKC- α ^a [μ M]	MIC Topoisomerase I [μ M]
Staurosporin	0.028	-
BE-13793C	40	> 3.0
Rebeccamycin	> 100	1.75

^a: PKC- α , ein Isoenzym der PKC-Familie

In den letzten Jahren sind unzählige Varianten dieser Antibiotika synthetisiert worden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf die PKC- bzw. Topoisomerase I-Hemmung aufzustellen [126, 132-141]. Allen synthetisierten Verbindungen ist das Indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-Gerüst von Arcyriaflavin A gemeinsam, dem grundsätzlich drei

Bereiche für strukturelle Variationen zur Verfügung stehen. Auf dem Ring A können die Maleimid-Struktur – zu einem Amid oder Anhydrid – oder die Stickstoffsubstituenten geändert werden. Auf die Indolringen können Hydroxy- oder Halogensubstituenten (X) eingefügt werden. Der Zuckerrest (Y) kann an keinem, einem oder beiden Indolstickstoffen gebunden sein und unterschiedlich substituiert werden (Abb. 3-7).

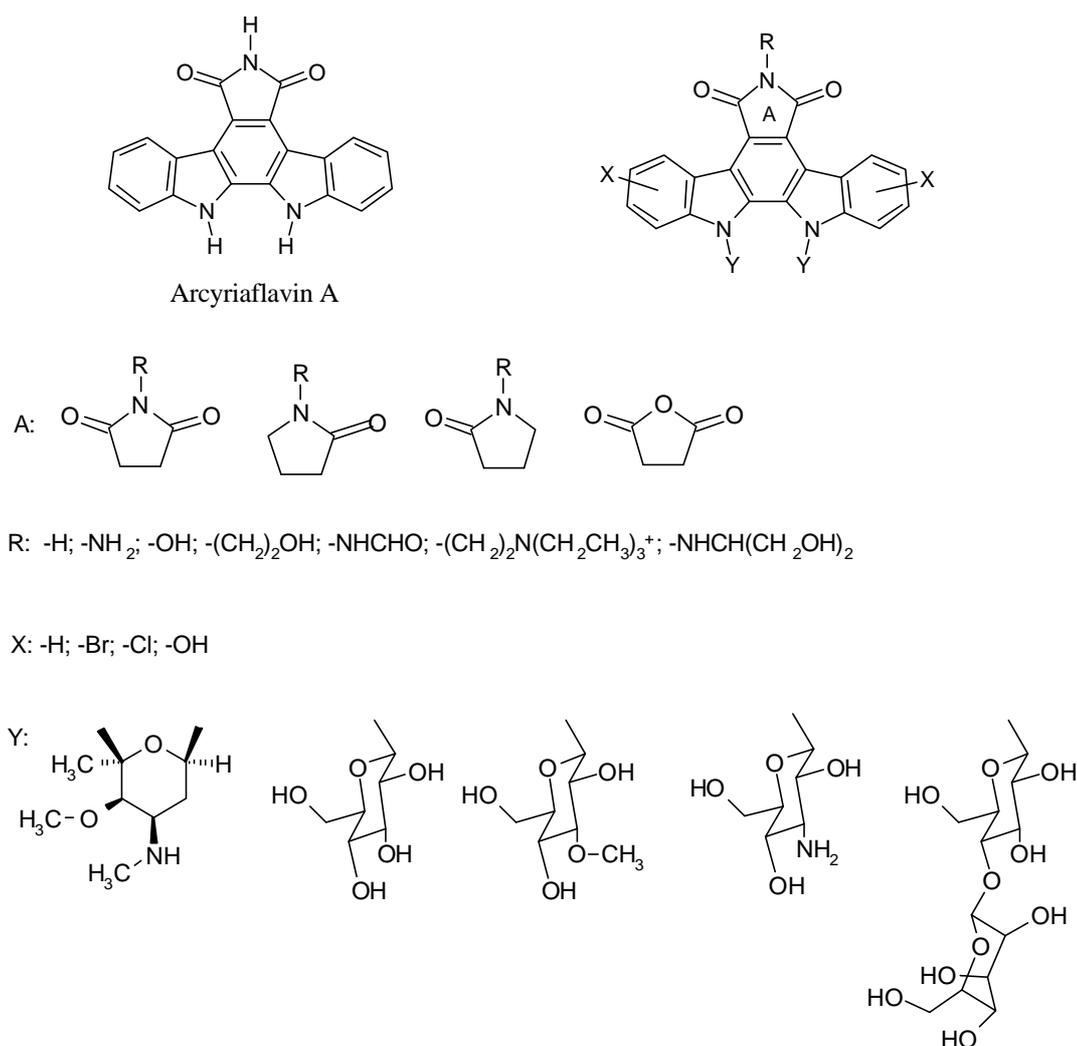


Abb. 3-7: Arcyriaflavin A und einige der bedeutendsten Substitutionsmöglichkeiten.

Diese drei Strukturelemente werden als die drei pharmakophorbildenden Domänen der Indolocarbazole bezeichnet: das cyclische Imid ist für die unmittelbaren Wechselwirkungen mit der Topoisomerase I zuständig, die anellierte Indole bilden ein planares System, das in die DNA interkaliert, und der Zucker ist in der Lage, in der kleinen Rinne an die DNA zu binden [126, 133].

Aus Studien über Struktur-Aktivität-Beziehungen haben sich einige wichtige Punkte herausgestellt. Am Stickstoff des Imidrings können unterschiedliche Substituenten eingefügt werden, ohne daß die Hemmung der Topoisomerase I beeinträchtigt wird, solange der Rest R Wasserstoffbrücken mit dem Enzym bilden kann. Die Substitution mit einer Methylgruppe führt hingegen zum Aktivitätsverlust [134, 135]. Das Maleimid selbst ist nicht essentiell für die Hemmung der Topoisomerase I: Maleamid- und Anhydridverbindungen bleiben aktiv. Sperrige X-Substituenten an den Indolringen, die die Interkalation beeinträchtigen, führen oft zu einer Minderung der Topoisomerase I-Hemmung. Deswegen wurde die Fähigkeit der Indolocarbazole zu interkalieren als *conditio sine qua non* für die Stabilisierung des *Cleavable Complex* gehalten [136, 137, 138]. Erst 1999 wurde bewiesen, daß DNA-Interkalation und Topoisomerase I-Hemmung zwei unabhängige Mechanismen sind, denn ein Regioisomer (**b** in Abb. 3-8) von NB-506, bei dem sich die Hydroxylgruppen in Positionen 2 und 10 befinden, interkaliert zwar nicht, hemmt aber die Topoisomerase I [139]. Eine β -glycosidische Bindung zur D-Glucose – eventuell auch mit Amino- oder Methoxysubstituenten – scheint am wirksamsten für eine selektive Topoisomerase I-Hemmung zu sein. Verbindungen, bei denen der Zucker an den Stickstoffatomen beider Indole oder über eine α -glykosidische Bindung gebunden ist, sowie die reinen Aglykone zeigen eher PKC-hemmende Aktivität als Topoisomerase I-Hemmung [136]. Interessant ist die disaccharidisch substituierte Verbindung, die eine starke Zytotoxizität behält, ohne die Topoisomerase I zu hemmen [140]. Daher stellt sich die Frage, ob die Antitumor-Wirkung dieser Stoffe, von denen sich einige in der klinischen Phase befinden, wirklich von der Topoisomerase I-Hemmung abhängig ist. Diese Verbindungen besitzen ein großes Potential als neue Topoisomerase I-Gifte, denn sie zeigen drei komplementäre Wirkungsmechanismen: Sie bilden einen stabilen ternären Komplex mit der DNA und Topoisomerase I, sie blockieren DNA-prozessierende Enzyme durch Bindung an die DNA selbst und sie hemmen die SR-Proteinkinase-Aktivität der Topoisomerase I [141].

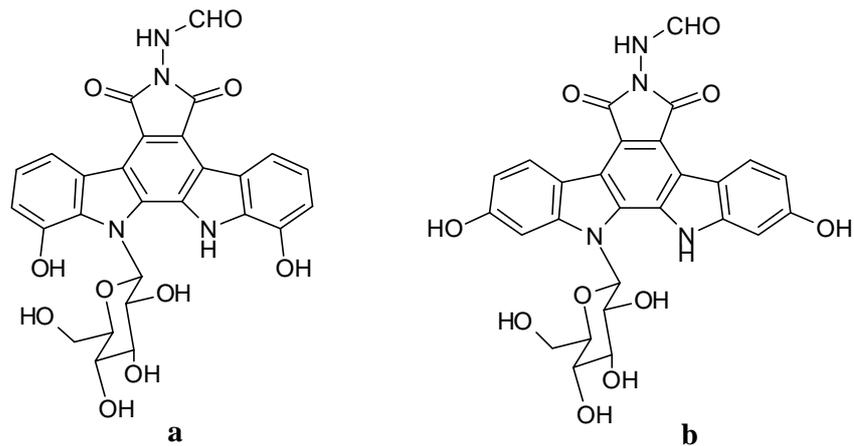


Abb. 3-8: NB-506 (a), ein Indolocarbazolderivat in der klinischen Phase, und sein Regioisomer (b) [nach 139].

3.2.1.4 Rinnenbinder als Topoisomerase I-Gifte

Verschiedene Stoffe, die in der kleinen Rinne der DNA binden, sind auch in der Lage, die Topoisomerase I zu hemmen. Das ist z. B. bei den Verbindungen Hoechst 33258 und 33342 der Fall (Abb. 3-9; s. auch S. 27).

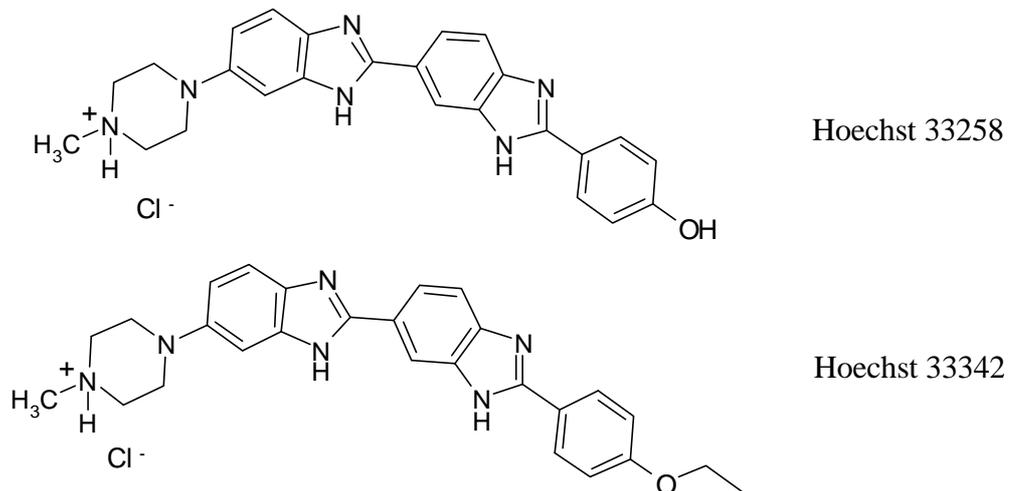


Abb. 3-9: Hoechst 33258 und 33342: zwei rinnenbindende Stoffe mit Topoisomerase I-hemmender Aktivität.

Seit den 70er Jahren wird Hoechst 33258 zum Anfärben von chromosomalen Strukturen in der Zellbiologie angewandt, denn durch Wechselwirkung dieses Moleküls mit der DNA

entsteht ein fluoreszierender Komplex [142, 143]. Hoechst 33258 zeigt eine Wirksamkeit gegen die Mausleukämie-Zelllinie L1210, aber wegen seiner Toxizität ist es in der klinischen Studie nicht über Phase II gekommen [144, 145, 146]. Beide Hoechst Farbstoffe binden sehr stark an AT-reiche Sequenzen der DNA und stabilisieren den Topoisomerase I-DNA-Komplex (siehe auch Kapitel 2, S. 27; [71]). Andere Rinnenbinder wie z.B. Distamycin A und Netropsin, die auch an AT-reiche Sequenz in der kleinen Rinne der DNA binden, sind viel schwächere Topoisomerase I-Gifte und hemmen eher die Bindung des Enzyms an die DNA [71, 147]. Das liegt möglicherweise daran, daß Hoechst 33258 auch in GC-reiche DNA-Sequenzen interkalieren kann und in der Lage ist, eine „gebogene“ DNA-Konformation zu stabilisieren [148, 149, 150]. Auch der Naturstoff Bulgarein – aus Kulturen von Actinomyceten – bindet in der kleinen Rinne der DNA und stabilisiert den *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase I (Abb. 3-10) [151].

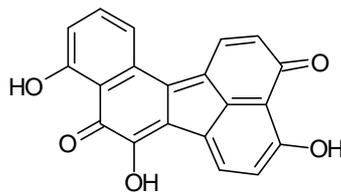


Abb. 3-10: Der Naturstoff Bulgarein.

3.2.2 Topoisomerase I-Hemmer

Viele Verbindungen, die die Topoisomerase I hemmen, werden auf Englisch *suppressor* genannt, weil sie die katalytische Aktivität des Enzyms unterdrücken, ohne mit dem *Cleavable Complex* zu interagieren. Solche Topoisomerase I-Hemmer zeigen zwei Wirkungsmechanismen: einige binden direkt an das Enzym, während andere an die DNA binden und somit die Bindung des Enzyms an die DNA selbst verhindern [141].

3.2.2.1 Enzym-bindende Topoisomerase I-Hemmer

Der am besten untersuchte Enzym-bindende Topoisomerase I-Hemmer ist β -Lapachon [152] aus *Tabebuia avellanadae*, der aber auch die Topoisomerase II, die Reverse Transkriptase und die DNA-Polymerase hemmt [153, 154]. Viele andere natürlich vorkommende

Naphthochinone zeigen eine ähnliche Wirkung, wie z.B. Shikonin aus *Lithospermum erythrorhizon* [155] und die Acetyl-11-keto-boswellinsäure, der Hauptkomponente des Harzes von *Boswellia serrata* und *Boswellia carterii* (Abb. 3-11) [156]. Eine mögliche Erklärung für diesen Wirkungsmechanismus ist die Fähigkeit von Hydroxynaphthochinonen, Chelatkomplexe mit Metallionen zu bilden. Auf diesem Weg könnten solche Verbindungen die Topoisomerase I durch Bindung an Zink-Finger-Domänen des Proteins hemmen, so daß der *Cleavable Complex* nicht gebildet wird [152, 157].

Eine ganz andere Gruppe von Topoisomerase I-Hemmern besteht aus Lipid-Derivaten, wie z.B. Topostatin aus *Thermomonospora alba* [158], das aber auch die Topoisomerase II hemmt. Solche Lipide wechselwirken mit dem Enzym auch in Abwesenheit der DNA [141].

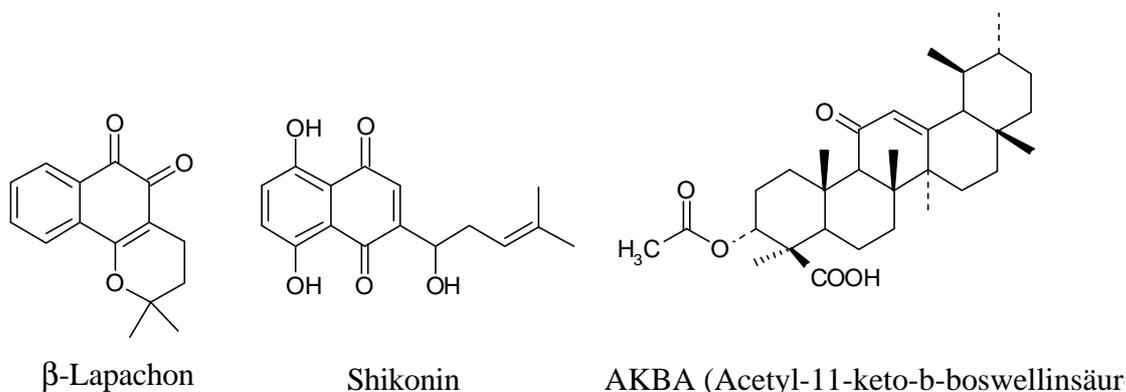


Abb. 3-11: β -Lapachon, Shikonin und AKBA als Topoisomerase I-Hemmer.

Interessant ist die Aktivität einer Reihe von Flavonen (Abb. 3-12), die mit Quercetin strukturell verwandt sind. Trotz ähnlicher Struktur sind einige in der Lage, die Topoisomerase II zu hemmen und den DNA-Topoisomerase I-*Cleavable Complex* zu stabilisieren, während andere nur die katalytische Aktivität der Topoisomerase I hemmen [159, 160].

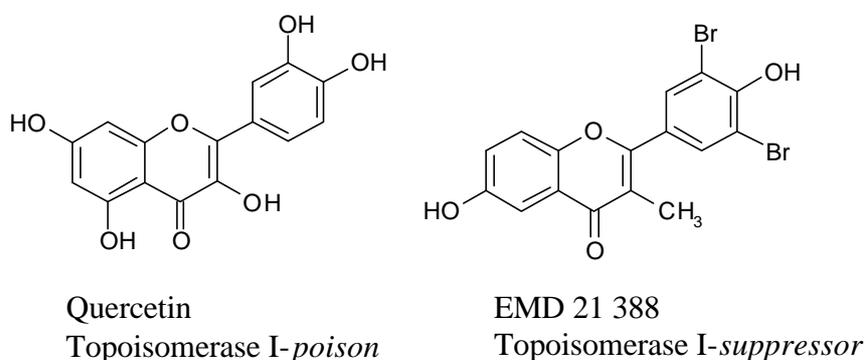


Abb. 3-12: Flavone als Inhibitoren der Topoisomerase I.

3.2.2.2 DNA-bindende Topoisomerase I Hemmer

Stoffe, die in die DNA interkalieren oder in der kleinen Rinne der DNA binden, können die Bindung der Topoisomerase I an die DNA beeinträchtigen. Ein Beispiel hierfür sind die Antibiotika der Anthracyclin-Reihe (Abb. 2-11), deren primäre Wirkung die Stabilisierung des *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase II darstellt. Desweiteren agieren sie aber auch als DNA-Interkalatoren, die die Topoisomerase I unspezifisch hemmen [161]. Unter den Rinnenbindern seien noch einmal Distamycin A und Netropsin als Hemmer der Topoisomerase I erwähnt (s. SS. 27 und 45; Abb. 2-14) [71].

3.3 Topoisomerase II und deren Inhibitoren

Eine zur Topoisomerase I entgegengesetzte Aktivität zeigt das bakterielle Enzym *E. coli* DNA-Topoisomerase II – auch DNA-Gyrase genannt [162]. Sie katalysiert die Umwandlung von relaxierter DNA in negativ superspiralisierte DNA unter Verbrauch von ATP; dabei werden beide Stränge der DNA gespalten und wieder verknüpft [79, 163, 164].

Die eukaryotische DNA-Topoisomerase II hat eine lebenswichtige Rolle bei der Trennung der neuen DNA-Helices am Ende der Replikation und in der Segregation der Chromosomen. Außerdem ist sie ein essentielles Enzym für die Organisation des Chromatingerüsts [88, 165].

Inhibitoren der Topoisomerase II zeigen grundsätzlich zwei therapeutische Anwendungsmöglichkeiten: auf der einen Seite werden die Hemmer der eukaryotischen Topoisomerase II gegen Krebs eingesetzt, auf der anderen Seite haben Hemmer der bakteriellen Topoisomerase II eine große Bedeutung als Antibiotika.

3.3.1 Gyrase-Hemmer

Seit Jahren sind Chinoloncarbonsäuren und deren Aza-Analoga bewährte Antiinfektiva mit bakterizider Wirkung. Sie binden an die α -Untereinheit der DNA-Gyrase und stabilisieren den *Cleavable Complex* zwischen Enzym und DNA (Topoisomerase II-*poison*). Prototyp dieser Verbindungen ist die Nalidixinsäure, deren Weiterentwicklung zu Gyrase-Hemmern

der zweiten und dritten Generation geführt hat, die in der Therapie bakterieller Infektionen der Harnwege und anderer Organe eingesetzt werden [6, 166, 167].

Novobiocin hingegen blockiert die katalytische Aktivität, indem es durch Bindung an die B-Untereinheit die Bindung von ATP verhindert (Topoisomerase II-*suppressor*) [168].

3.3.2 Hemmer der eukaryotischen Topoisomerase II

Verschiedene Naturstoffe sind in der Lage, den *Cleavable Complex* zwischen DNA und der eukaryotischen Topoisomerase II zu stabilisieren. Unter diesen sind die Podophyllotoxine die wahrscheinlich bekanntesten. Die semisynthetischen Podophyllotoxinen Etoposid und Teniposid (Abb. 3-13) sind sehr aktive Agentien in der Behandlung bestimmter Arten von Lungen- und ZNS-Krebs [169].

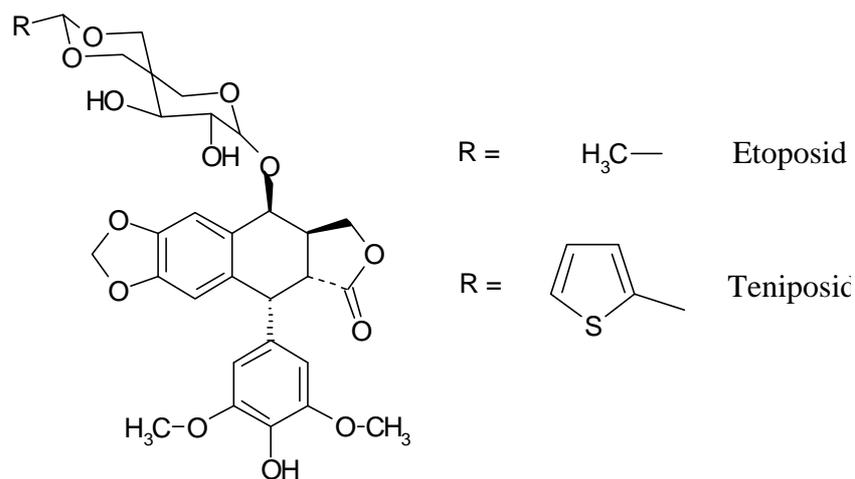
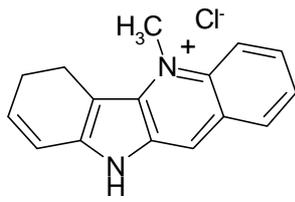


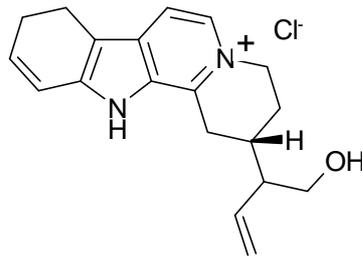
Abb. 3-13: Die Podophyllotoxin-Derivate Etoposid und Teniposid.

Eine Hemmung der Topoisomerase II kann auch über die DNA-Bindung erfolgen. Ellipticin z.B. übt seine zytotoxische Aktivität nicht nur durch DNA-Interkalation aus, sondern auch durch Stabilisierung des *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase II (s. Kap. 2, S. 24; [33, 34, 170, 171]).

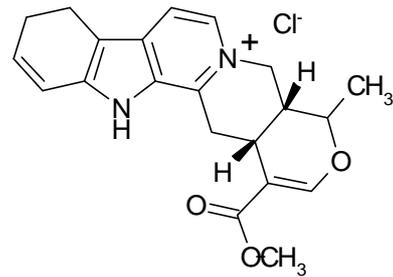
Weitere Naturstoffe, welche die Topoisomerase II hemmen, sind die Alkaloide Cryptolepin aus *Cryptolepis triangularis* (Zäire) und *C. sanguinolenta* (Nigeria), Matadin aus *Strychnos gossweileri* (Zäire) und Serpentin aus *Rauwolfia serpentina* und *Strychnos camptoneura* (Afrika) (Abb. 3-14).



Cryptolepin



Matadin



Serpentin

Abb. 3-14: Die Alkaloide Cryptolepin, Matadin und Serpentin.

Diese drei Stoffe, die zytotoxische Aktivität gegen einige Tumorzelllinien, wie z.B. B16 Melanom und HeLa Karzinom zeigen [172, 173], interkalieren in die DNA mit unterschiedlicher Affinität und stabilisieren den *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase II [174]. Den gleichen Wirkungsmechanismus zeigen auch einige Stoffe der Anthracyclinreihe (Siehe auch S. 48 und [88, 161, 165]). Unter den synthetischen Stoffen, welche die Topoisomerase II als *poison* hemmen, sind noch die Interkalatoren Amsacrin und Mitoxantron zu erwähnen (Siehe auch Kap. 2, S. 21 und [39-41, 169, 175]).

Weitere Einzelheiten über die Anwendung von Topoisomerase-Hemmern in der Krebstherapie können der Literatur entnommen werden [176].

4 Methoden zur Bestimmung von Wechselwirkungen niedermolekularer Stoffe mit der B-DNA

Gemäß dem Hauptziel der Arbeit, der Etablierung von Methoden zur DNA-Bindung für die Entwicklung neuer antitumoraktiver Wirkstoffe, sollen zunächst die theoretischen und chemischen Grundlagen der angewandten Verfahren detailliert beschrieben werden.

4.1 Bestimmung der DNA-Affinität

4.1.1 Thermische Denaturierung – Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA

Eine physikalisch relativ einfache Methode stellt die UV-spektrophotometrische Analyse der Schmelzkurven der DNA dar.

Wenn die Temperatur einer wäßrigen DNA-Lösung erhöht wird, kommt es zum „Schmelzen“ der DNA, d.h. die DNA denaturiert, und die Stränge trennen sich voneinander [18, 177]. Mit dem Begriff Schmelztemperatur (T_m , *melting temperature*) bezeichnet man die Temperatur bei der die Hälfte der DNA als Doppelstrang und die andere Hälfte als Einzelstrang vorliegt, also beide Spezies im Gleichgewicht sind.

Die Denaturierungstemperatur der DNA hängt von der Zusammensetzung der DNA-Basen ab, da die Basen Guanin und Cytosin über drei Wasserstoff-Brückenbindungen paaren, während Adenin und Thymin nur von zwei solcher Bindungen zusammengehalten werden. Je größer der GC-Anteil ist, desto höher ist die Schmelztemperatur. Im allgemeinen, wenn man zufällige Abschnitte doppelsträngiger DNA unter bestimmten Puffer- und pH-Bedingungen betrachtet, gilt folgende empirische Gleichung [4, 18, 178]:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 69.3 + 0.41 (\% \text{ GC})$$

Der Denaturierungsprozeß kann über UV-Absorption, zirkulären Dichroismus, NMR, Viskosität, Elektrophorese oder Kalorimetrie verfolgt werden [18]. Allerdings ist die UV-Absorption wegen ihrer methodischen Einfachheit, Empfindlichkeit und guten Reproduzierbarkeit die gebräuchlichste Methode. Nukleinsäuren zeigen eine charakteristische Absorption im UV-Bereich, mit einem Absorptionsmaximum bei Wellenlängen zwischen

250nm und 280nm. Weit verbreitet ist die Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}), um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen. Der Extinktionskoeffizient der Nukleinsäuren hängt lediglich von ihrer Sequenz und von ihrem Zustand – ob einzel- oder doppelsträngig – ab, denn es kommt bei der Denaturierung zu einer Zunahme der Absorption (hyperchrome Verschiebung). Das liegt daran, daß die elektronischen Wechselwirkungen zwischen den gestapelten Basen während der Denaturierung abnehmen und dann die Endabsorption der Absorption der einzelnen reinen Nukleotiden entspricht [18]. Die Hyperchromie bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur wird bei der Bestimmung von Schmelzkurven über UV-Absorption verfolgt und der T_m -Wert entspricht dem Wendepunkt solcher Kurven (Abb. 4-1).

Substanzen, die mit der DNA in Wechselwirkung treten, binden an doppelsträngige DNA meist mit größerer Affinität als an den Einzelstrang. Das stabilisiert die Doppelhelix und bewirkt somit eine Erhöhung der charakteristischen Denaturierungstemperatur der DNA, denn es wird mehr Energie benötigt, um die Stränge voneinander zu trennen. Der Unterschied zwischen der Denaturierungstemperatur einer reinen Nukleinsäure T_m° und der Denaturierungstemperatur T_m in Anwesenheit einer DNA-bindenden Substanz wird als ΔT_m bezeichnet und steht in Beziehung zu der Bindungsaffinität der Substanz an die DNA [178]. Interkalatoren lagern sich zwischen den gestapelten Basenpaaren ein und stabilisieren die dsDNA so, daß eine deutliche Rechtsverschiebung der T_m zu beobachten ist. Außerdem zeigen Interkalatoren selten eine Sequenzselektivität, daher bleibt das ΔT_m bei GC- oder AT-reichen Sequenzen im großen und ganzen gleich [179, 180]. Rinnenbinder können auch die Doppelhelix stabilisieren und führen dementsprechend zu einer T_m -Verschiebung. Bei diesen Verbindungen ist oft eine Sequenzselektivität vorhanden, das spiegelt sich in einer unterschiedlichen Verschiebung der T_m bei GC- oder AT-reichen Sequenzen wieder [181]. Zu beachten ist, daß Substanzen, die stärker an einzelsträngige DNA binden als an doppelsträngige, zu einer T_m -Abnahme führen. Das ist beispielweise bei Cisplatin der Fall, denn diese Verbindung bildet Pt-Komplexe zwischen Basen innerhalb desselben Stranges [182].

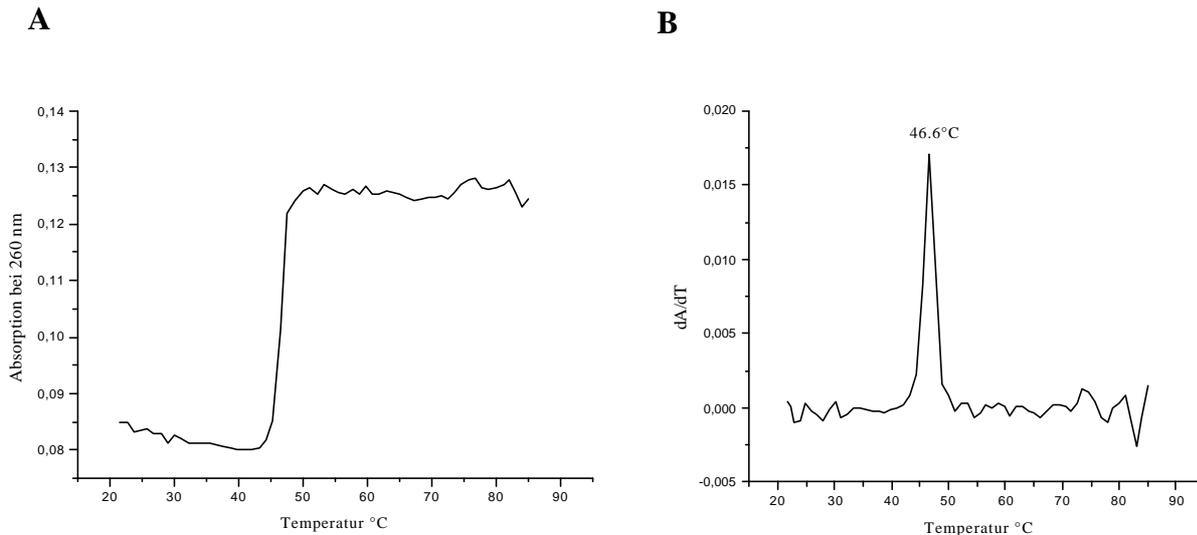


Abb. 4-1: Bestimmung der Schmelztemperatur des Polynukleotids Poly[dA-dT]·Poly[dA-dT]. **A:** sigmoide Schmelzkurve des Polynukleotids [$A_{260} = f(T)$]. **B:** Ableitung der Schmelzkurve; das Maximum der ersten Ableitung entspricht der Schmelztemperatur. Dieser T_m -Wert für das Polynukleotid Poly[dA-dT]·Poly[dA-dT] ($46,6^\circ\text{C}$) wurde in den Denaturierungsexperimenten dieser Arbeit verwendet. Er stimmt gut mit Literaturdaten überein [134, 183].

Die thermische Denaturierung wird routinemäßig angewandt, um Wechselwirkungen mit der DNA schnell zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in der Dissertation eingesetzte Methode zuerst unter der Leitung von Prof. Dr. C. Bailly im Institut für Krebsforschung von Centre Oscar Lambret in Lille, Frankreich, durchgeführt und später in unserer Arbeitsgruppe aufgebaut und zur Anwendung gebracht. Zur Validierung der Methode wurden verschiedene Referenzsubstanzen vermessen, deren ΔT_m -Werte aus der Literatur bekannt sind: Der Interkalator Ethidiumbromid und die Rinnenbinder Hoechst 33258, Netropsin und DAPI (s. Kap. 2, S. 27; [183]). Die Messungen wurden mit einem temperaturgesteuerten UV-Vis-Spektralphotometer durchgeführt, das an ein Wasserbad angeschlossen war. Die Heizleistung des Thermostats und die Aufnahme des Spektrums bzw. der Absorption bei 260 nm wurden über einen Temperaturfühler in der Küvette gesteuert. Dabei wurde in Schritten von $1^\circ\text{-}2^\circ\text{C}/\text{min}$ geheizt, und die Absorption wurde bei jeder Temperaturerhöhung registriert. Die erhaltenen Schmelzkurven (Absorption bei 260 nm gegen Temperatur in Grad Celsius) wurden mit der Funktion *sigmoidal fit* des Programms Origin auf Windows analysiert. Daraus wurde die erste Ableitung berechnet, deren Maximum

dem Wendepunkt des Denaturierungsvorgangs, also dem T_m -Wert entspricht. Als DNA wurde das synthetische Polynukleotid Poly[dA-dT]·Poly[dA-dT] verwendet. Es hat eine Schmelztemperatur bei ca. 46°C. Das hat den Vorteil, daß mit einem Wasserbad-Thermostat auch Substanzen vermessen werden können, die einen hohen ΔT_m -Wert (bis zu ca. 40°C) aufweisen. Mit GC-reichen Polynukleotiden wäre das nicht möglich, denn es käme bei hoher Affinität zu T_m -Werten über 100°C. Die Referenz- und Testsubstanzen wurden in einer Phosphatpuffer-Lösung bei einem Verhältnis [DNA]:[Ligand]= 1:1 untersucht [134]. In Tabelle 4-1 sind die von uns erhaltenen ΔT_m -Werte und die Literaturwerte für die Referenzsubstanzen zusammengefaßt..

Tabelle 4-1: ΔT_m -Werte der getesteten Referenzsubstanzen in Vergleich mit den Literaturwerten.

Verbindung	Gemessener ΔT_m	ΔT_m (aus der Literatur [183])
Ethidiumbromid	29.4 ± 1.7	16.8 ± 1.0
Hoechst 33258	24.3 ± 1.7	24.1 ± 0.8
Netropsin	37.1 ± 1.7	35.1 ± 3.8
DAPI	> 40°	40.5 ± 0.5

Eine sehr gute Übereinstimmung der Daten ist bei Hoechst 33258 und bei Netropsin zu finden. Mit dem aufgebauten System konnte man allerdings aus technischen Gründen die Bestimmung nicht bis über 85°C durchführen. Daher konnte die Schmelztemperatur der DNA in Anwesenheit von DAPI nicht vermessen werden. Trotz mehrfacher Messungen ließ sich der T_m -Literaturwert von Ethidiumbromid nicht reproduzieren.

4.1.2 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Ethidiumbromid (EtdBr) ist ein planarer, heteroaromatischer Fluoreszenzfarbstoff, der durch Interkalation an die Duplex-DNA bindet, wobei die Fluoreszenz im UV-Bereich im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert wird (Abb. 4-2). Diese Eigenschaft des Ethidiums und anderer ähnlicher planarer heteroaromatischer Kationen macht man sich bei der DNA-Färbung von Agarosegelen zu Nutze, wobei auch kleinste Mengen von DNA (bis zu 50 ng) nachgewiesen werden können [4].

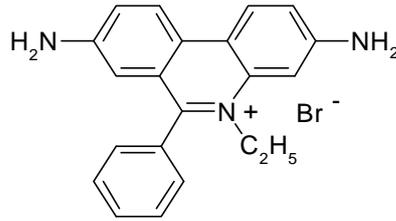


Abb. 4-2: Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid

Eine weitere Anwendung von Ethidiumbromid ist der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit DNA [184, 185]. Dabei handelt es sich um eine Standardmethode zur Bindungsanalyse von DNA-Liganden. Das Verfahren basiert auf einer fluorimetrischen Titration. Die DNA wird dabei mit Ethidiumbromid beladen, wodurch ein fluoreszierender Komplex entsteht. Die Fluoreszenz dieses Komplexes nimmt bei der Zugabe einer DNA-bindenden Substanz ab, da die Substanz das Ethidium aus seinen Bindungsstellen in der DNA verdrängt. Die Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Abnahme der Fluoreszenz des Ethidium-DNA-Komplexes verursacht, wird als C_{50} bezeichnet. Der C_{50} -Wert steht in Beziehung zu der Bindungskonstanten K_{app} (*apparent equilibrium constant*) des Liganden, die aus diesem C_{50} -Wert und aus der Bindungskonstanten von Ethidiumbromid berechnet werden kann [184-186].

$$K_{app} = \frac{[Ligand]_{bound}}{[Ligand]_{free} [DNA]_{free}}$$

Literaturdaten aus unterschiedlichen Quellen und experimentelle Daten bezüglich DNA-Bindungskonstanten und die daraus abgeleitete DNA-Affinität stimmen aber oft nicht überein, deswegen ist es notwendig, diesen Assay vor der routinemäßigen Anwendung im Sinne der Gültigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu validieren und zu evaluieren. Zur Validierung der Methode in der vorliegenden Arbeit wurden bekannte DNA-bindende Verbindungen eingesetzt, deren Bindungskonstanten aus der Literatur bekannt sind, und zwar Amsacrin (siehe Kap 2; [186]) und Hoechst 33258 (siehe Kap 2; [144]). Von diesen Substanzen wurden in mehreren Ansätzen unter variierenden Bedingungen verschiedene C_{50} -Werte bestimmt und dementsprechend verschiedene Bindungskonstanten berechnet. In Tabelle 4-2 sind die unterschiedlichen Bedingungen – mit 1, 2 und 3 bezeichnet – zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Bedingungen für die Durchführung des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays

Bedingungen	[DNA]	[EtdBr]	pH	Puffer	Substanz-Zugabe
1[187]	1×10^{-5} M	5×10^{-6} M	7.4	10 mM Tris-HCl 75 mM NaCl	3 μ l der 3mM DMSO-Stammlösung
2[188]	1×10^{-5} M	5×10^{-6} M	4,7	9.3 mM NaCl 2 mM NaOAc 0.1 mM EDTA	3 μ l der 3mM DMSO-Stammlösung
3[189]	1×10^{-6} M	1.26×10^{-6} M	5,0	9.3 mM NaCl 2 mM NaOAc 0.1 mM EDTA	3 μ l der 3mM DMSO-Stammlösung

Es wurde zuerst die Fluoreszenz der Pufferlösung von EtdBr gemessen und die Intensität als 0% Fluoreszenz (F) festgesetzt. Dann wurde die DNA zugegeben, bis die Fluoreszenz bei einem Verhältnis Ethidium : Basenpaare (bp) = 1 : 2 (*next neighbour exclusion*) ein Maximum erreichte. Diese Fluoreszenzintensität wurde als 100% F bezeichnet. Nach Zugabe von kleinen Aliquoten der Testsubstanz in regelmäßigen Zeitabständen wurde die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Die fluorimetrische Titration konnte als % F gegen die Konzentration der Testsubstanz graphisch dargestellt werden. Aus den Diagrammen wurden die C_{50} -Werte abgelesen, mit welchen die K_{app} -Werte der Verbindungen berechnet werden konnten. Allerdings sind in der Literatur verschiedene mathematische Gleichungen beschrieben, mit denen man die Bindungskonstanten mit dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bestimmen kann. Die am häufigsten verwendeten Gleichungen sind in den Publikationen von Wellman und Mitarbeitern [185] und von Boger und Mitarbeitern [187] zu finden – andere Gleichungen können auf diese beiden zurückgeführt werden. Sie werden deswegen im Rahmen dieser Arbeit als Wellman'sche und Boger'sche Gleichung bezeichnet.

Wellman'sche Gleichung [185]: $K_{EtdBr}[EtdBr] = K_{app}[Ligand]$

Boger'sche Gleichung [187]: $K_{app} = 1/([Ligand] - 0.5[DNA] r)$

Dabei ist: K_{app} die Bindungskonstante der getesteten Verbindung
 K_{EtdBr} die Bindungskonstante von Ethidiumbromid
 $[EtdBr]$ die molare Konzentration von Ethidiumbromid in dem Assay
 $[Ligand]$ die molare Konzentration der getesteten Verbindung bei einer 50%igen Abnahme der Fluoreszenz (C_{50})
 $[DNA]$ die molare Konzentration der DNA in dem Assay
 r^4 das Verhältnis zwischen der Anzahl der Basenpaare und dem gebundenen Ligand.

Weitere Daten-Abweichungen entstehen durch die Anwendung der aus der Literatur bekannten verschiedenen Werte für die Bindungskonstante von Ethidiumbromid. In Tabelle 4-3 sind die Ergebnisse zusammengefasst, die unter Anwendung der zwei Gleichungen für die unterschiedlichen C_{50} -Werte erhalten wurden.

Die Unterschiede in den erhaltenen Werten kann man wie folgt erklären. Während mit der Wellman'schen Methode die Bindungskonstanten der Test-Verbindung und von Ethidiumbromid direkt verglichen werden, berücksichtigt die Boger'sche Methode den wahrscheinlich unterschiedlichen DNA-Bindungsmodus von Testsubstanz und Ethidium, in dem das Verhältnis r in die Gleichung eingebunden wird. Dieser Wert r ist nur bei DNA-wechselwirkenden Substanzen bekannt, deren Bindungsmodus und Bindungsstelle an der DNA strukturell gesichert ist. Für m-AMSA ist in der Literatur ein Wert von 0.3 für r angegeben [186]. Für Hoechst 33258 sollte $r = 0.2$ sein, da es eine 5 Basenpaare lange Stelle an der DNA bindet; es ist aber kein Literaturwert bekannt. Diese Werte für m-AMSA und Hoechst 33258 wurden bei Berechnungen mit der Boger'schen Gleichung angewandt. Die somit berechneten Daten stimmen in sich überein, sie unterscheiden sich allerdings von den Literaturdaten [144, 186]. Bei m-Amsa ist „nur“ ein Unterschied um Faktor 10 zu finden, während die für Hoechst berechneten Werte um Faktor 50 zu niedrig sind. Das liegt daran, daß für m-Amsa ein bekannter r -Wert eingesetzt werden konnte [186], während für Hoechst 33258 ein r -Wert angewandt wurde, der nicht experimentell bestimmt wurde, sondern aus der Größe der Bindungsstelle auf der DNA (5 bp, [144]) berechnet. Trotz der Unterschiede, die sich bei einer Änderung der Versuchsbedingungen ergeben, stimmen hingegen die nach der Wellman'schen Gleichung berechneten Werte relativ gut miteinander und mit den

⁴ Für die Ermittlung von r siehe [187] und [188].

Literaturwerten [144, 186] überein. Die Wellman'sche Methode kann also verlässlich eingesetzt werden, um die Affinität DNA-bindender Substanzen zu bestimmen.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der berechneten K_{app} -Werte [M^{-1}] für die Referenzsubstanzen unter Anwendung der in Tabelle 4-2 beschriebenen Messbedingungen 1, 2 und 3 und der verschiedenen Gleichungen.

Verbindung		Hoechst 33258			m-AMSA		
Bedingungen		1	2	3	1	2	3
C_{50} [M]		7.6×10^{-6}	3.8×10^{-6}	3.6×10^{-6}	31×10^{-6}	18×10^{-6}	7.4×10^{-6}
K_{app} nach Wellman	$K_{EtdBr} = 2.5 \times 10^6$	1.7×10^6	3.4×10^6	-	4.2×10^5	7.2×10^5	-
	$K_{EtdBr} = 4.5 \times 10^6$	3.0×10^6	5.9×10^6	-	7.3×10^5	12.5×10^5	-
	$K_{EtdBr} = 1.0 \times 10^7$	-	-	3.5×10^6	-	-	17.0×10^5
K_{app} nach Boger		1.5×10^5	3.6×10^5	-	0.4×10^5	0.6×10^5	-
K_{app} nach Literatur		7.0×10^6 [144]			5.5×10^5 [186]		

Der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay kann also angewandt werden, um die DNA-Affinität einer Reihe strukturell ähnlicher Verbindungen miteinander zu vergleichen, insbesondere wenn sie einen ähnlichen Bindungsmodus und eine ähnlichen Bindungsstelle an der DNA besitzen. In diesem Fall sollte ein direkter Vergleich der C_{50} -Werten möglich sein. Wenn es aber um Verbindungen geht, deren Bindungsmodi nicht hinreichend aufgeklärt sind bzw. stark divergieren, können direkte Vergleiche der C_{50} -Werten zu fehlerhaften Aussagen führen.

4.2 Bestimmung des Bindungsmodus

Bei der Entwicklung von DNA-wechselwirkenden Substanzen ist es besonders wichtig, die Art und Weise zu bestimmen, wie diese Verbindungen mit der DNA in Wechselwirkung treten. Eine genaue Beschreibung des Bindungsmodus auf molekularer Ebene kann eigentlich nur mit NMR-Spektroskopie und Röntgen-Kristallographie erreicht werden [190, 191]. Wenn Daten molekularer Auflösung nicht vorhanden sind, kann der Bindungsmodus nur indirekt aus DNA-Bindungsstudien geschlossen werden, die auf grundlegenden Strukturänderungen basieren, die in der DNA durch Interkalation bzw. Rinnenbindung entstehen [192, 193]. Durch Bindung an die Rinnen kommt es eigentlich nur zu kleinen Konformationsänderungen

der DNA-Doppelhelix, die DNA bleibt grundsätzlich in einer „ungestörten“ B-Form. Bei einer Interkalation hingegen führt das Einfügen eines planaren Liganden zwischen den gestapelten Basenpaaren zu einer bedeutenden Veränderung der DNA-Struktur, denn die Helix wird verlängert, versteift und entwunden. Außerdem befindet sich das planare Chromophor eines interkalierten Liganden in engem Kontakt zu den DNA-Basenpaaren und ist senkrecht zur Helixachse orientiert (s. Kap. 2, S. 21 und [24, 194]). Diese strukturellen Eigenschaften macht man sich bei der Bestimmung des Bindungsmodus zunutze.

Versteifung und Entwindung der Helixstruktur äußern sich z.B. in einer Änderung der Viskosität einer DNA-Lösung und des Sedimentationskoeffizienten bei der Ultrazentrifugation, oder in einer veränderten elektrophoretischen Mobilität von zirkulär geschlossener DNA [195]. Elektronische Wechselwirkungen zwischen Interkalator und benachbarten Basenpaaren führen zusätzlich zu einem batho- und hypochromen Effekt im Absorptionsspektrum des Liganden [20]. Das spiegelt sich auch in einer Hochfeldverschiebung im $^1\text{H-NMR}$ der aromatischen Protone des interkalierten Moleküls wider, die auf den Ringstrom in den Ebenen der gestapelten aromatischen Basen zurückzuführen ist [196]. Die Orientierung des interkalierenden Chromophors in Bezug auf die Helixachse kann mittels Dichroismus – *linear flow* oder *electric* – bestimmt werden, während die Rigidität des Systems an der Interkalationsstelle mit Fluoreszenzpolarisations-Experimenten untersucht werden kann [197, 198, 199]. Trotzdem ist die Anwendung von nur einer dieser Methoden nicht ausreichend, um eine zuverlässige Aussage über den Bindungsmodus eines DNA-Liganden zu treffen [193]. Eine interessante Analyse über die Zuverlässigkeit solcher Methoden wurde 1995 an den Liganden Ethidiumbromid als Interkalator und Hoechst 33258 als Rinnenbinder durchgeführt [200]. Daraus ergab sich, daß die UV-Spektroskopie eine gute Methode für die Bestimmung der DNA-Bindung selbst ist. Sie kann aber nicht zwischen Rinnenbindung und Interkalation unterscheiden, genau wie die Fluoreszenzpolarisierung, denn bei Ethidium und Hoechst 33258 sind ähnliche spektroskopische Änderungen zu finden [200]. Sogenannte *Fluorescence contact energy transfer*-Experimente zeigen hingegen einen deutlichen Unterschied zwischen Rinnenbindung und Interkalation. Diese Methode basiert auf spektraler Überlappung, geringer Entfernung und einer bestimmten Dipolorientierung zwischen Donor und Akzeptor. Die dazu notwendigen Bedingungen können nur von Interkalatoren erfüllt werden [201]. Die beiden letztgenannten Methoden erfordern aber eine aufwendige Apparatur, die uns nicht zur Verfügung stand. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Bestimmung

des Bindungsmodus etabliert, die auf der Änderung der Helixstruktur durch Interkalation basiert: der sogenannte *Unwinding-Assay*.

4.2.1 DNA-Unwinding-Assay

Die Entwindung der DNA-Helix kann, wie oben beschrieben, mit verschiedenen Techniken detektiert werden. Eine interessante Möglichkeit ist die Anwendung von bestimmten Enzymen, die die Topologie der DNA ändern: die Topoisomerasen (s. S. 33) [202].

In der ersten Version dieses Assays wird ein durch eine Endonuklease linearisiertes Plasmid verwendet, das nach Inkubation mit einem Stoff, der DNA-Entspiralisierung verursacht, mit Hilfe einer Ligase wieder zirkularisiert wird. Durch diesen Prozeß von Linearisierung und Rezirkularisierung in Anwesenheit von interkalierenden Substanzen entsteht ein relaxiertes, entwundenes Plasmid. Dieses schrumpft wieder zusammen in die superspiralisierte Form, wenn nach der Reaktion die Testsubstanz entfernt wird.

In einer einfacheren Version des Assays wird die Topoisomerase I eingesetzt, die sowohl Endonuklease- als auch Ligaseaktivität besitzt [203, 204]. Wie in Abb. 4-3 aufgezeigt, wird die superspiralisierte Plasmid-DNA zuerst mit der Testsubstanz inkubiert. Durch die Interkalation des Moleküls in die DNA werden die gestapelten Basenpaare voneinander getrennt und der Helixdrehwinkel wird reduziert. Dadurch kommt es zu einer Entwindung der Helix, die sich in einer Abnahme der helikalen Windungszahl T_w widerspiegelt. Gleichzeitig findet eine entgegengesetzte Zunahme der superhelikalen Windungszahl W_r statt, denn bei intakten Polynukleotidstränge gilt $Lk = T_w + W_r$ (siehe auch Kap. 3, S. 34; [4, 18]). Die Mischung wird anschließend mit einem Überschuß an Topoisomerase I versetzt, welche die Verteilung der Topoisomeren reguliert. Dadurch ändert sich die Verwindungszahl Lk , d.h. die DNA wird vollständig in die relaxierte Form überführt. Wenn nach der Reaktion die Topoisomerase I und die Testsubstanz mittels Gelelektrophorese oder Phenolextraktion entfernt werden, schrumpft die DNA wieder zusammen und liegt wieder als superspiralisiertes Plasmid vor.

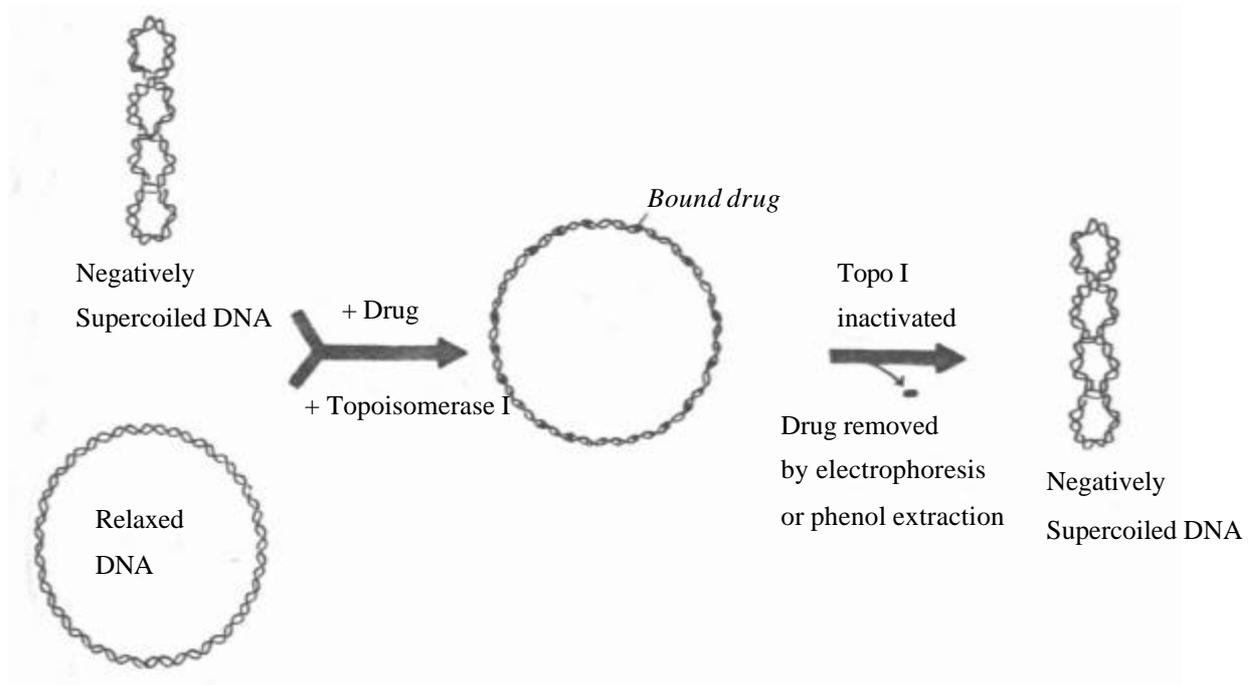


Abb. 4-3: Schematische Darstellung des Prinzips des Unwinding Assays nach Pommier [203, 204].

Für diesen Test ist die Aktivität der Topoisomerase I essentiell. Eine mögliche gleichzeitige Hemmung des Enzyms durch die Testverbindung würde zu falsch positiven Ergebnissen führen, denn die DNA bliebe unverändert. Um zwischen DNA-Entwindung und -Hemmung der Topoisomerase I selbst zu unterscheiden, startet man zwei parallele Experimente mit superspiralisiertem bzw. relaxiertem Plasmid. Nur wenn keine Hemmung der Topoisomerase I stattfindet, sind die Ergebnisse aus den zwei Experimenten gleich. Abgesehen von dem eventuell vorhandenen Entwindungseffekt der Testsubstanz, wenn diese die Topoisomerase I hemmt, bleibt die DNA in der ursprünglichen superspiralisierten oder relaxierten Form [204]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bindungsmodus der vom Arbeitskreis U. Pindur synthetisierten Substanzen mit einer weiteren Variante dieses Assays bestimmt, welche ebenfalls die Analyse der Effekte eines Wirkstoffes auf die Topoisomeren erlaubt, die durch Einwirkung der Topoisomerase I auf zirkulär geschlossene DNA entstehen [2, 132, 205, 206]. In diesem Assay wird zirkuläre DNA zuerst mit Topoisomerase I inkubiert, d.h. sie wird vollständig relaxiert, danach wird die Testsubstanz zugegeben. Wie in dem Assay nach Pommier [203] liegt die DNA relaxiert vor, bis man Interkalator und Topoisomerase I entfernt. Mittels Gelelektrophorese können wieder die DNA-Formen am Ende des Versuchs

detektiert werden: durch Vergleich des Zustandes der DNA nach Inkubation mit Topoisomerase I und bekannten Interkalatoren kann man Rückschlüsse auf den Bindungsmodus der Testsubstanz ziehen. Ein wichtiger Punkt ist die Bestimmung der Wirkung der Testverbindung auf der Topoisomerase I, denn durch Hemmung des Enzyms im zweiten Schritt des Assays bleibt die DNA relaxiert, und es kommt zu falsch negativen Ergebnissen. Der DNA-Unwinding-Versuch kann wie folgend schematisiert werden:

1. Superspiralisierte DNA (Form I) + Topo I \rightarrow relaxierte DNA (Form IV)
2. Inkubation mit Interkalator: $T_w \downarrow W_r \uparrow \rightarrow$ DNA in Form I (pos. *supercoiling*)
aber Topo I ist noch dabei: Form I \rightarrow Form IV
3. Auswaschen: $T_w \uparrow W_r \downarrow$ Form IV \rightarrow Form I (neg. *supercoiling*)

kein Interkalator \rightarrow DNA bleibt in Form IV

Interkalator/kein Interkalator und Topo I Hemmer \rightarrow DNA in Form IV

Die gelelektrophoretische Trennung der DNA-Topoisomere bei dem Unwinding-Assay ist in Abb. 4-4 am Beispiel des Interkalators Ellipticin aufgezeigt (s. auch Kap. 7, SS. 88 und 96).

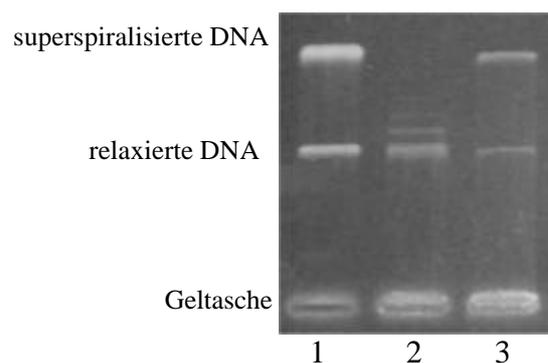


Abb. 4-4: Unwinding-Assay mit Ellipticin. Spur 1: scDNA; Spur 2: relaxierte DNA; Spur 3: 100 μ M Ellipticin.

Mit dem Unwinding-Assay, sei es nach Pommier oder mit der in der Arbeit etablierten Variante, kann man die Fähigkeit einer Substanz bestimmen, in die DNA zu interkalieren, wenn sie die Aktivität der Topoisomerase I nicht beeinflusst [205].

4.3 Bestimmung der Sequenzselektivität

Wie im Kapitel 2 beschrieben, ist die Entwicklung von „Kleinmolekülen“, die Ähnlichkeit den regulatorischen Proteinen die DNA sequenzspezifisch binden, ein wichtiges Forschungsgebiet. Man könnte damit eine genspezifische Wirkung erzielen. Dementsprechend sind verschiedene Methoden entwickelt worden, mit welchen die Sequenzselektivität der Liganden-Bindung bestimmt werden kann. Eine der wichtigsten Methoden auf diesem Bereich ist der sogenannte *footprinting*-Assay, mit dem man die Regionen auf der DNA bestimmen kann, an denen eine Substanz bindet [207].

4.3.1 *Footprinting*-Assay

Der *Footprinting*-Assay wurde 1978 in der molekularbiologischen Forschung entwickelt, um die Bindungsstellen der Proteine auf der DNA zu lokalisieren [208]. Mit verschiedenen Techniken werden Strangbrüche in der DNA erzeugt, die durch die spezifische Bindung eines Liganden oder eines Proteins an bestimmten Stellen verhindert werden können. Bei dieser Technik wird in der Regel ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment bestimmter Sequenz und Länge mit einem geeigneten endonukleolytischen Reagens in Anwesenheit und Abwesenheit der Testsubstanz „verdaut“. Die Spaltung wird im Bereich der Liganden-Bindungsstelle verhindert, so daß, wenn man die Reaktionsprodukte auf Polyacrylamidgel elektrophoretisch trennt und autoradiographiert, die Position des Liganden auf der DNA wie ein Abbruch der sonst entstandenen Bandenleiter auf dem Gel aussieht (Abb. 4-5).

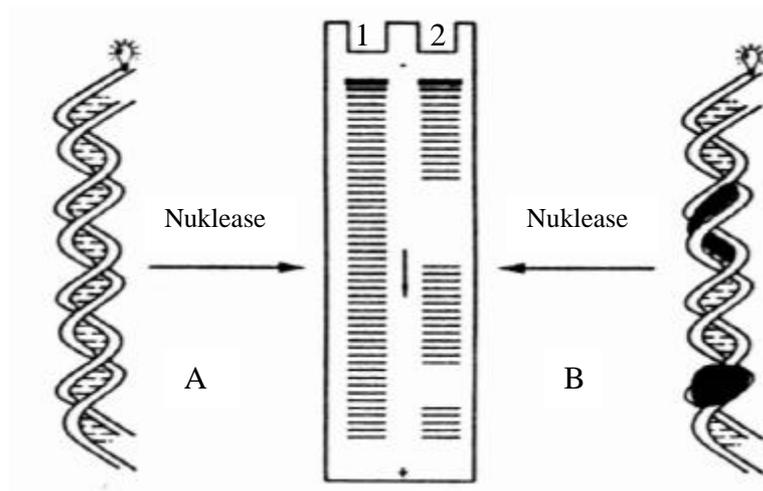


Abb. 4-5: Schematische Darstellung eines *footprinting*-Experiments (nach [74]). Spur 1: Gelelektrophorese von nativer DNA nach Behandlung mit einer Nuclease (A). Spur 2: Gelelektrophorese der gleichen DNA nach Inkubation mit einem Liganden (in schwarz dargestellt) und Behandlung mit einer Nuclease (B).

Als endonukleolytisches Reagens kann man z.B. das Enzym DNase I einsetzen, welches sich in verschiedenen Anwendungen bewährt hat, wie im Falle von Actinomycin D, Netropsin und vielen anderen Rinnenbindern [209, 210]. Es gibt aber auch andere endonukleolytische Reagenzien, die für eine *Footprinting*-Analyse geeignet sind, wie DNase II, Methidiumpropyl-EDTA-Fe(II), Hydroxylradikale und viele weitere chemische Reagenzien [211, 212, 213]. Jedes dieser Reagenzien wirkt nach einem bestimmten Spaltungsmechanismus und ist für die Bestimmung unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen Testsubstanz und DNA geeignet. Ein ideales Reagens für das *Footprinting* sollte sequenzunabhängig sein und in Abwesenheit von Liganden zu einer regelmäßigen Reihe von Spaltprodukten führen. Diese Eigenschaft besitzen nur einige chemische Verbindungen, wie Methidiumpropyl-EDTA-Fe(II) und Hydroxylradikale. Trotzdem ist die Anwendung von DNase I am häufigsten, obwohl dieses Enzym ein unregelmäßiges DNA-Spaltungsmuster verursacht, in Abhängigkeit von DNA-Sequenz und -Struktur. Die DNase I ist eine spezifische Endonuklease für dsDNA, die einzelsträngige Brüche am Phosphatgerüst erzeugt, indem sie die O3'-P-Bindung spaltet. A_n-T_n-Abschnitte und GC-reiche Bereiche sind ungünstige Substrate für das Enzym, dessen Spaltungsfähigkeit vor allem durch die Breite der kleinen Rinne und die DNA-Flexibilität beeinflusst wird [214, 215]. Als DNA-Substrate werden meistens 20-200 bp lange DNA-Fragmente aus Plasmiden eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthese-Verbindungen im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Bailly (Centre

Oscar Lambret, Lille, Frankreich) auf Sequenzselektivität der DNA-Bindung untersucht [134, 216].

5 Methoden zur Bestimmung von Wechselwirkungen niedermolekularer Stoffe mit den Topoisomerasen

Trotz immer weitergehender Erkenntnisse über die DNA-Bindung von antitumoraktiven Stoffe, ist es immer noch schwierig, einen direkten Zusammenhang zwischen der DNA-Bindung und der biologischen Wirksamkeit zu finden. Das liegt daran, daß viele DNA-bindende Substanzen die Wechselwirkungen DNA-bindenden Proteinen, vor allem zwischen DNA und den Topoisomerasen, beeinflussen, wie schon in den Kapiteln 2 und 3 beschrieben (s. SS. 19-51). Daß die Topoisomerasen ein interessantes Target für Stoffe mit antitumorale Wirkung sind, ist schon lange bekannt. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Wechselwirkungen von neuen Verbindungen mit diesen Enzymen ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit. Wie schon auf Seite 36 aufgeführt, können Inhibitoren der Topoisomerasen ihre Aktivität in unterschiedlicher Weise ausüben. Dementsprechend sind verschiedene Testmethoden entwickelt worden, mit welchen die Angriffspunkte solcher Inhibitoren bestimmt werden können. Im Rahmen der Dissertation wurden einige der im folgenden beschriebenen Assays neu etabliert und optimiert.

5.1 Bestimmung der Topoisomerase I-Aktivität und deren Hemmung

Ein Assay für die Topoisomerase I, der auf der Relaxation von Plasmid-DNA basiert, wurde von Wang zusammen mit der Entdeckung der Topoisomerase I aus *E. coli* beschrieben [217]. Um den topologischen Zustand eines Plasmids nach Reaktion mit der Topoisomerase I zu bestimmen, wurde die Sedimentation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten beobachtet. In weiteren frühen Methoden zur Bestimmung der Plasmidrelaxation durch die Topoisomerase wurden Gleichgewichtszentrifugation in Anwesenheit von Propidiumdiodid oder fluorimetrische Analyse der Änderungen der Ethidium-Bindung an die DNA während der Relaxation genutzt [218, 219, 220]. Später wurde von Keller die Methode der Agarose-Gelelektrophorese beschrieben, um Topoisomere von SV40-cccDNA zu trennen [221]. Der kompakte Zustand von superhelikalen Topoisomeren führt zu einer schnelleren Wanderung durch die poröse Gelmatrix als bei den relaxierten Topoisomeren, deren Wanderungsgeschwindigkeit durch ihre zirkuläre Konfiguration geringer wird. Agarose-Gelelektrophorese ist heutzutage die Methode der Wahl für die Bestimmung der Produkte bei einem Relaxationsassay für die Topoisomerase. Die Relaxationsreaktion wird mit Plasmid-

DNA durchgeführt, die durch Cäsiumchlorid-Zentrifugation gereinigt wird, denn mindestens 80% des Plasmids soll als negativ überspiralisierte cccDNA (Form I; s. S. 35) vorliegen und das *nicked* Plasmid (mit einem Einzelstrangbruch, Form II; s. S. 35) soll höchstens 20% der DNA betragen. Die DNA wird mit der Topoisomerase I in einem Puffer bei 37°C inkubiert, welcher in Bezug auf pH-Wert, Ionenstärke und Reduktionspotential den physiologischen Bedingungen entspricht [205, 222]. Die Reaktion wird durch Denaturierung des Enzyms mit SDS gestoppt und gelelektrophoretisch analysiert. In Abb. 5-1 ist eine zeitabhängige Bestimmung der Aktivität der Topoisomerase I als Beispiel dargestellt: nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten ist die Relaxation der Plasmid-DNA vollständig.

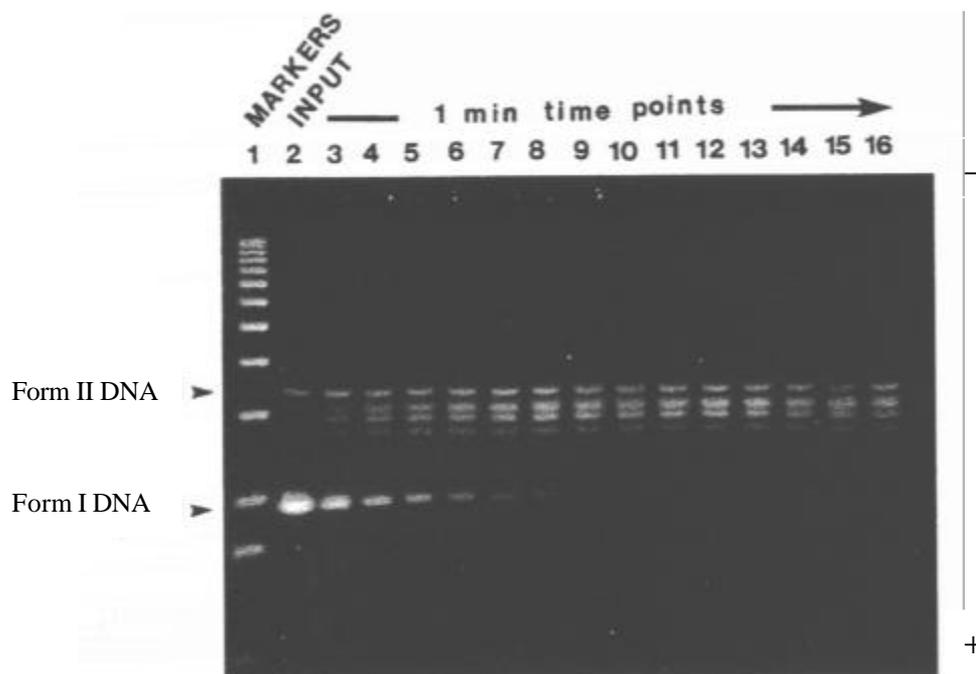


Abb. 5-1: Elektropherogramm eines Topoisomerase I-Relaxationsassays. Spur 1: DNA-Marker; Spur 2: Plasmid DNA, unbehandelt; Spuren 3-16: Relaxationsprodukte nach 1-14 Minuten Inkubationszeit (nach [222]). Mit der Zeit wird die superspiralisierte Form I DNA immer mehr in die relaxierte Form überführt.

Wenn die Reaktion in Anwesenheit einer Testsubstanz durchgeführt wird, welche die Topoisomerase I hemmt, bleibt die DNA superspiralisiert, unabhängig von der Art der Hemmung. Zur Unterscheidung von Topoisomerase I-Inhibitoren und -Giften (s. S.38) muß die Fähigkeit der Testsubstanz zur Stabilisierung des *Cleavable Complex* zwischen Topoisomerase I und DNA bestimmt werden.

5.1.1 Bestimmung der Bildung des *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase I

Die sogenannten Topoisomerase I-Gifte, wie Camptothecin und seine Derivate Topotecan und Irinotecan, stabilisieren den kovalenten Topoisomerase I-DNA-Komplex, in dem sie die Religation der DNA-Stränge verhindern (vgl. Kap. 3, S. 38). Dieser ternäre Komplex stellt ein Hindernis für die fortlaufende Replikationsgabel in der S-Phase des Zellzyklus dar und führt zu DNA-Strangbrüchen, zur Unterbrechung des Zellzyklus selbst und zum Zelltod. Diese Substanzen verwandeln das für die Zelle lebenswichtige Enzym Topoisomerase I in ein zelluläres Gift, sie hemmen aber nicht die Enzymaktivität. Die Fähigkeit von bestimmten Stoffen, mit dem katalytischen Zyklus der DNA Topoisomerase I zu interferieren, kann grundsätzlich mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt werden, in denen entweder Plasmid-DNA oder linearisierte DNA eingesetzt wird.

5.1.1.1 *Nicking-Assay mit Plasmid-DNA*

Die Topoisomerase vom Typ I katalysiert die reversible Spaltung und Religation (*nicking* bzw. *closing*) von dsDNA [223]. Im gespaltenen Zustand ist das Enzym an die DNA über eine Phosphodiesterbindung zwischen einem Tyrosinrest und dem DNA-Ende gebunden. Dieses kovalente Zwischenprodukt kann isoliert werden, indem der sogenannte *nicking-closing* Zyklus durch Zugabe z. B. von SDS in die Reaktionsmischung von Topoisomerase I und DNA blockiert wird [224, 225]. Durch elektrophoretische Trennung der Produkte einer solchen Reaktion mit superhelikaler DNA (Form I) kann der Komplex einfach sichtbar gemacht werden, denn er wandert langsamer als die superhelikale DNA. Für eine empfindlichere Detektion der Komplexe ist eine Zugabe von Proteinase K erforderlich, denn dieses Enzym entfernt die Aminosäure der gebundenen Topoisomerase, so daß die Komplexe zusammen mit der *nicked* Form II der DNA wandern. Leider ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Form II-DNA und der der relaxierten Topoisomere sehr ähnlich. Eine Trennung von diesen zwei Topoisomeren ist erst unter Anwendung von Ethidiumbromid möglich, denn er führt durch Interkalation zu einer weiteren Entwindung der DNA [226].

5.1.1.2 Cleavage-Assay mit linearer DNA

Durch Verwendung von linearen DNA-Substraten, die an einem einzigen 3'-Ende markiert sind, kann die Sequenz bestimmt werden, an welcher der Strangbruch durch die Topoisomerase-hemmende Verbindung induziert wird [227]. Als DNA-Substrat wird ein synthetisch hergestelltes Plasmid angewandt, das als Kontrolle eine Spaltungsstelle mit großer Affinität für die Topoisomerase I enthält [228]. Dieses wird mit Topoisomerase I in einem geeigneten Puffer in Anwesenheit der Testsubstanz inkubiert, die stabilisierten DNA-Enzym-Zwischenprodukte werden mit Hilfe von denaturierenden Agentien isoliert. Nach Entfernung der kovalent gebundenen Topoisomerase mit Proteinase K wird die DNA gereinigt und auf einem Polyacrylamidgel getrennt. Durch parallele Maxam-Gilbert-Sequenzierung des DNA-Substrates und Vergleich der gelelektrophoretischen Trennung kann die Sequenzspezifität der gebildeten Komplexe und das Ausmaß der Stabilisierung des *Cleavable Complex* analysiert werden [228]. Die relative Intensität der Banden kann durch densitometrische Analyse der entwickelten Röntgenfilme oder mit einem PhosphorImage-Gerät bestimmt werden.

5.2 Bestimmung der Topoisomerase II-Aktivität und deren Hemmung

Die Bestimmung der Aktivität der Topoisomerase II und der Fähigkeit neuer Substanzen, entweder die katalytische Aktivität des Enzyms zu hemmen oder den Komplex zwischen Enzym und DNA zu stabilisieren, erfolgt mit ähnlichen Methoden wie bei der Topoisomerase I [229]. Die Topoisomerase II fügt *in vivo* Doppelstrangbrüche in die DNA ein, durch welche ein zweiter DNA-Doppelstrang hindurchgeführt wird. Das Ergebnis ist die Relaxation der DNA und die Trennung von eingeketteten DNA-Duplex nach der Replikation (siehe Kap. 3). Diese Reaktion wird zur Bestimmung der Topoisomerase II-Aktivität im *decatenation* Assay genutzt [230].

5.2.1 Bestimmung der Bildung des *Cleavable Complex* zwischen DNA und Topoisomerase II

Einige klinisch relevante Stoffe mit antitumoraler Aktivität führen zur Bildung von kovalenten Topoisomerase II-DNA Komplexen [231, 232, 233].

Genau wie bei der Topoisomerase I kann man den *Cleavable Complex* zwischen Topoisomerase II und DNA isolieren, indem die Reaktion von Plasmid-DNA und Enzym durch Zugabe von denaturierenden Agentien wie SDS gestoppt und das Enzym mit Proteinase K entfernt wird. Das Ausmaß der Komplexbildung wird durch Bestimmung der Spaltung von cccDNA zu linearisierter DNA über Agarosegelelektrophorese quantifiziert [234, 235]. In Abb. 5-2 sind die Effekte von Etoposide (siehe Kapitel 3) auf die Aktivität von Topoisomerase II dargestellt.

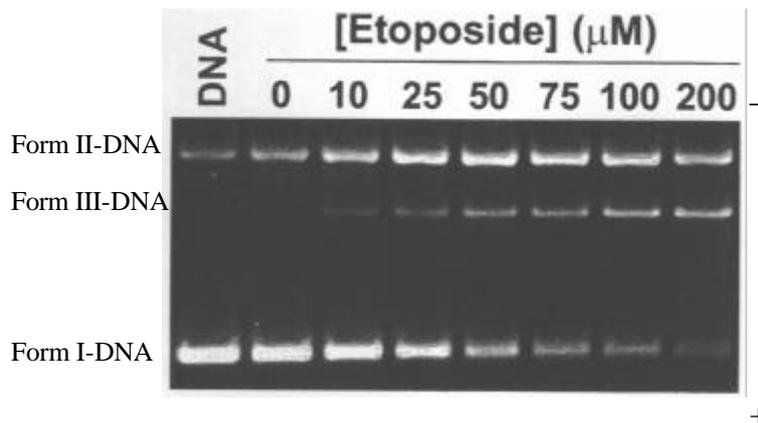


Abb. 5-2: Gelelektrophoretische Trennung von Plasmid DNA in Anwesenheit von Topoisomerase II und verschiedener Konzentrationen von Etoposide. Durch Stabilisierung des *Cleavable Complex* zwischen DNA, Topo II und Etoposide wird Form I-Plasmid DNA in Form III-Plasmid DNA (linear) umgewandelt [modifiziert nach 235].

Ab einer Konzentration von 50 mM Etoposid kann die Entstehung der linearen Form III der Plasmid-DNA beobachtet werden, denn Etoposid stabilisiert den *Cleavable Complex* zwischen Topoisomerase II und DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Synthese-Verbindungen im Arbeitskreis Prof. C. Bailly auf Hemmung der Topoisomerase II untersucht.

6 Bestimmung der antiproliferativen Wirkung

6.1 Allgemeine Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung

Zur Bestimmung der zytostatischen Wirkung von potentiell antitumoraktiven Verbindungen ist eine schnelle und genaue Abchätzung der Zellvitalität und des Zellwachstums einer Kultur sehr wichtig. Diese beiden Parameter werden über die Messung von Lebensfunktionen bestimmt, die charakteristisch für biologisch intakte Zellen sind [236].

Bei der Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wird zwischen sich-teilenden Zellen und Zellen in Ruhephase (G_0 vom Zellzyklus) nicht unterschieden. Die einfachste Methode ist eine direkte Zählung der Zellen mit einem *Cell-Counter*-Gerät. In einer weiterführenden Variante dieser Methode ist eine vorgeschaltete Anfärbung der Zellen vorgesehen. Dies erfolgt entweder mit einem Proteinmarker, durch den tote und lysierte Zellen nicht gefärbt werden, oder mit Farbstoffen, die normalerweise von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden. Erst durch Änderungen der Permeabilität der Zellmembran infolge des Zelltodes können die Farbstoffe in die Zelle eindringen. Ein solches Verfahren kann aber zu einer Fehleinschätzung der Zytotoxizität führen, wenn der Schaden im Zellinneren stattfindet und die Zelle schon abgestorben ist, bevor die Plasmamembran geschädigt ist.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Zellvitalität ist die Anwendung kolorimetrischer Methoden. Abgestorbene Zellen sind nicht mehr in der Lage, bestimmte Tetrazolium-Salze reduktiv zu verstoffwechseln, dagegen spalten metabolisch aktive Zellen mit ihren Reduktionsenzymen diese Salze in ein farbiges Formazan. Ein Nachteil ist, daß Zellen, die gerade in die Apoptose eingehen, noch metabolisch aktiv sind; deswegen kann man mit solchen Verfahren den Zelltod erst dann feststellen, wenn die Apoptose sich in einem fortgeschrittenen Stadium befindet. Kolorimetrische Verfahren sind sehr wichtig, um innerhalb eines Zeitraums von 24-96 Stunden eine durch äußere Faktoren ausgelöste Zytotoxizität in Zellkultur zu bestimmen.

Über andere Methoden wird das Zellwachstum bestimmt. Eine Möglichkeit ist das Ausplattieren einer bestimmten Anzahl von Zellen und die Zählung der entstandenen Kolonien nach einer gewissen Zeit. Ein anderes Verfahren besteht in der Messung der DNA-Synthese als ein Zeichen für die Replikation. In diesem Fall wird der Einbau von markierten DNA-Bausteinen (^3H -Thymidin oder Bromodeoxyuridin) in die DNA der Zellen bestimmt.

6.2 Das Entwicklungsprogramm für Therapeutika vom National Cancer Institute

Die Bestimmung der antiproliferativen Wirkung der von unserem Arbeitskreis synthetisierten Substanzen wurde in erster Linie vom *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, USA) durchgeführt. Im Rahmen der Forschung nach Substanzen mit Antitumorwirkung bietet das *Developmental Therapeutics Program* (DTP) des NCI die Möglichkeit an, die wachstumshemmende Aktivität neuer Verbindungen in einer Reihe von bis zu 60 Tumorzelllinien menschlichen Ursprungs *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen [237, 238]. Dieses Screening läuft in verschiedenen Stufen ab. Zuerst werden die Verbindungen auf Grund ihrer Struktur ausgewählt. Es muß sich um chemisch neue Verbindungen handeln, die neuartige Strukturelemente enthalten oder auch um Verbindungen, die mit anderen neuen biologisch aktiven Strukturtypen verwandt sind. Das Screening, dem die ausgewählten Substanzen unterworfen werden, besteht aus drei Prüfphasen. Die erste Stufe ist ein Vorscreening, mit dem die Wirkung bei einer Konzentration von 0.1 mM auf drei verschiedene humane Tumorzelllinien untersucht wird, die besonders empfindlich sind, zur Zeit MCF 7 (Brustkarzinom), NCI-H460 (Lungenkarzinom) und SF-268 (Gliom). Stoffe, die das Zellwachstum bis auf 32% des normalen Wachstums unterdrücken, werden im nächsten Schritt bei einer Reihe von 60 humanen Tumorzelllinien in fünf verschiedenen Konzentrationen (10^{-4} M – 10^{-8} M) weitergetestet. In beiden Screening-Verfahren wird der Sulforhodamin B-Assay angewandt (s. S. 74; [239]). Die Aktivität jeder Verbindung gegenüber den 60 verschiedenen Zelllinien wird mit folgenden Standardparametern definiert: GI_{50} ist die Konzentration, bei welcher das Zellwachstum auf 50% reduziert wird; TGI ist die Konzentration, bei welcher das Zellwachstum völlig gehemmt wird; LC_{50} ist die Konzentration, bei der 50% der Zellen abgestorben sind. Die Ergebnisse werden auch als graphische Darstellung des Zellwachstums in Prozent gegen die Substanzkonzentration in jeder Zelllinie dokumentiert und zusätzlich als „*Mean Graph*“ dargestellt (Abb. 6-1). Hier wird die durchschnittliche GI_{50} aus allen Zelllinien ermittelt und die Selektivität gegen bestimmte Tumorarten als Abweichung von diesem Wert aufgezeigt.

Mean Graphs

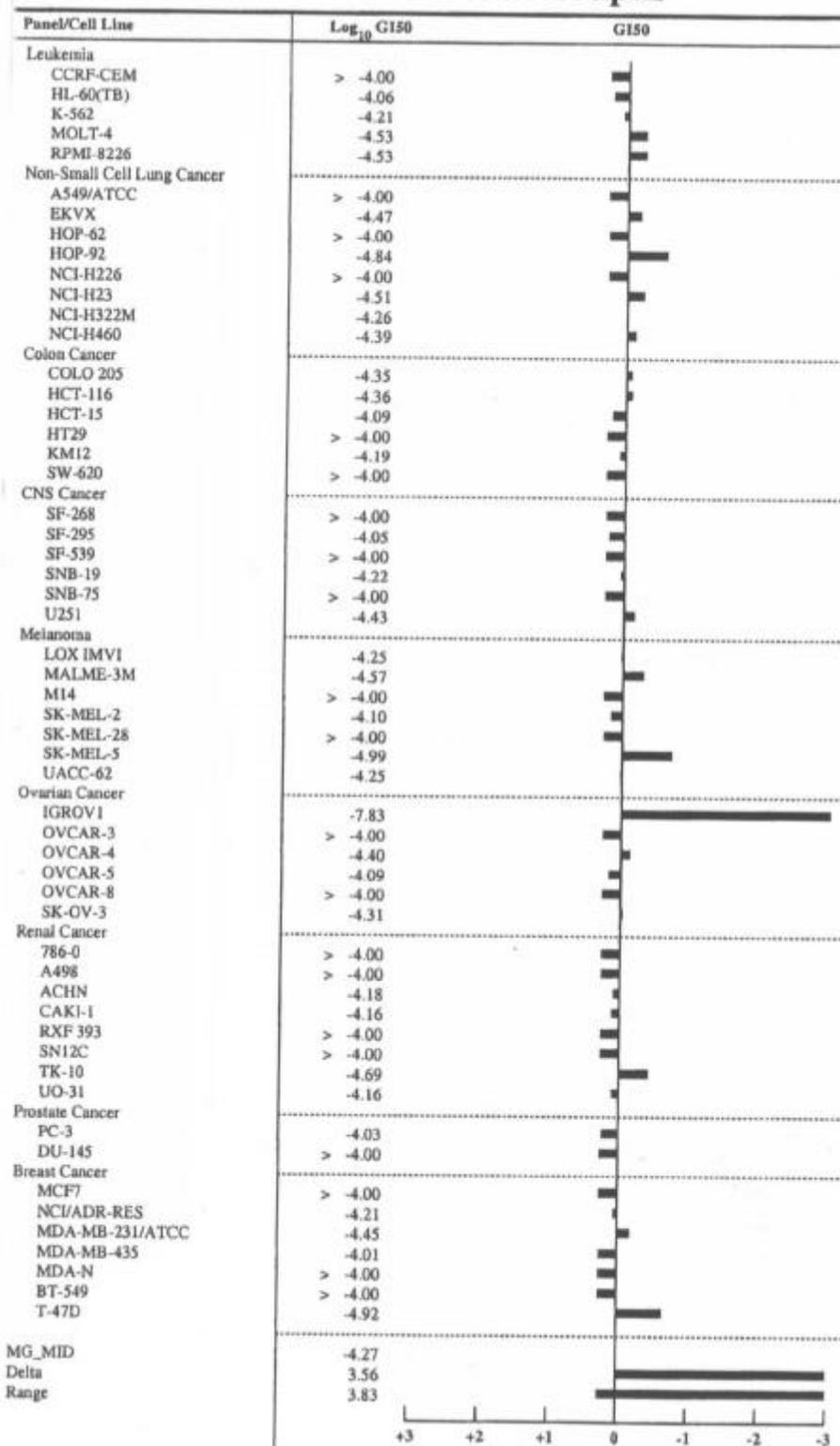


Abb. 6-1: Original-NCI-Mean graph am Beispiel des Tripyrrolcarboxamid-esters **59** (s. Kap. 7, S. 102). Die durchschnittliche GI₅₀ beträgt $10^{-4.27}$ M, eine Selektivität für die Zelllinie IGROV1 ist deutlich zu erkennen.

Mit dem *Mean Graph* erhält man eine Art *Fingerprint* der Aktivität einer Substanz, welcher dann mit dem Programm COMPARE bearbeitet werden kann (s. S. 76).

Verbindungen werden in der dritten Phase vom NCI getestet und als „aktiv“ bezeichnet, wenn sie eine GI_{50} von mindestens $10^{-7.5}$ M zeigen und eine gewisse Selektivität für verschiedene Zelllinien besitzen. Für diese dritte Stufe der Testung – das Screening *in vivo* – müssen die Substanzen noch ein neues Selektivitätsmuster bei den 60 Zelllinien zeigen. Wenn dies der Fall ist, werden die Verbindungen mit dem sogenannten *Hollow Fiber*-Assay gegenüber 12 verschiedenen humanen Tumorzelllinien getestet, die in Mäuse implantiert werden [240]. Eine Suspension tumoraler Zellen wird in Polyvinylidenfasern eingeschleust, deren Wände für das Kulturmedium, nicht aber für die Zellen durchlässig sind, die Enden der Fasern werden dann versiegelt. Die Fasern werden dann so geschnitten, daß man 2 cm lange Proben bekommt. Drei dieser Proben werden bei jeder Maus intraperitoneal, drei weitere subkutan implantiert. Die Zellvitalität der tumoralen Zelllinien wird am Tag der Implantierung mit dem Mikrotiterplatte-Tetrazolium-Assay (MTT-Assay; s. S. 75) bestimmt und während der Therapie mit der neuen Verbindung verfolgt. Die Substanzen müssen eine Zellwachstumshemmung von mindestens 50% bei zehn von den 48 möglichen Testkombinationen (12 Zelllinien x 2 verschiedene Implantatslagen x 2 verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz) zeigen, damit dann erst weiterführende, spezifischere biologische Testungen *in vivo* folgen können.

6.2.1 Detektionsmethoden

6.2.1.1 SRB-Assay

Sulforhodamin B (SRB) ist ein Farbstoff der Gruppe der Aminoxanthene mit zwei Sulfonylgruppen, der in der Biologie und Biochemie allgemein zur Färbung von Proteinen angewandt wird (Abb. 6-2).

Bei diesem Assay werden die Zellkulturen mit Trichloressigsäure fixiert und mit SRB behandelt [241]. Nach mehrmaligem Waschen der Kultur wird der Farbstoff mit einem Puffer extrahiert und seine Farbintensität spektrophotometrisch bestimmt. Über den Gehalt an Proteinen in der Zellkultur wird das Zellwachstum oder die Zellvitalität ermittelt. Man geht davon aus, daß abgestorbene Zellen lysiert vorliegen und deswegen bei der Bestimmung nicht

stören. Da diese Bedingung nicht immer erfüllt ist, zeigt der SRB-Assay eine Tendenz zu falsch positiven Ergebnissen, d.h. zu einer Überschätzung der Anzahl überlebender zellen.

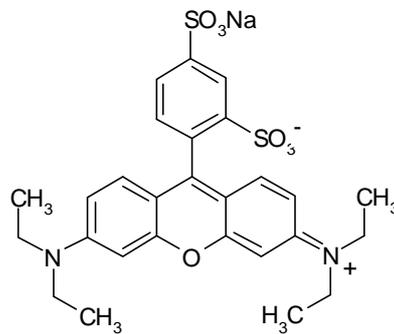


Abb. 6-2: Der Farbstoff Sulforhodamin B.

Ein Vergleich dieser Methode mit anderen Testsystemen zur Bestimmung der Zellvitalität unter ähnlichen Bedingungen führte zu analogen Ergebnissen. Außerdem zeigte die SRB-Methode einige Vorteile wegen der einfachen Durchführung, vor allem bei einem Screening mit hohem Durchsatz, wie es z.B. im NCI der Fall ist [241].

6.2.1.2 MTT-Assay

Bei dem sogenannten Mikrotiterplatte-Tetrazolium-Assay werden exponentiell wachsende Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Bohrungen ausplattiert und für eine bestimmte Zeit in Ab- und Anwesenheit der Testsubstanz inkubiert, deren Zytotoxizität bestimmt werden soll [236]. Anschließend werden die Zellkulturen für eine kurze Zeit mit dem Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt. MTT wird in die Zellen aufgenommen und von der Succinat-Tetrazolium-Reduktase, einem Enzym der Atmungskette, zu einem farbigen Formazan gespalten, das nicht membrangängig ist und sich in der Zelle anhäuft (Abb. 6-3).

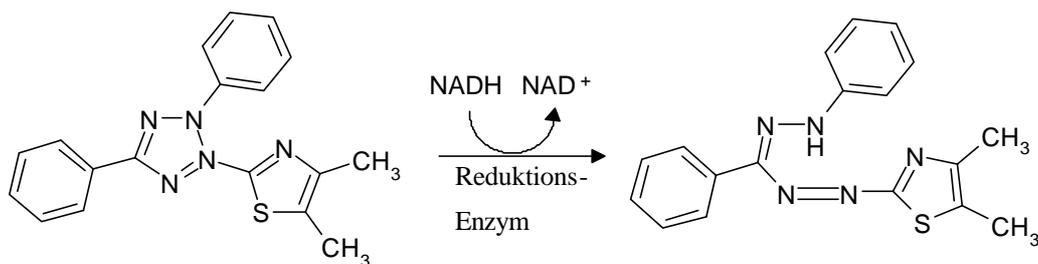


Abb. 6-3: Reduktion von MTT zu dem farbigen Formazanderivat.

Nach Zugabe von DMSO werden die Zellen lysiert, und die Farbintensität wird spektrophotometrisch bestimmt. Dieses Testsystem ist einfach anzuwenden und kann mit verschiedenen Zellkulturen durchgeführt werden, vorausgesetzt die Zellen wachsen exponentiell und haben eine normale oder erhöhte mitochondriale Aktivität. Die Toxizität von Substanzen, die selektiv auf die Mitochondrien wirken, kann bei diesem Assay überschätzt werden. Trotzdem ist diese Methode sehr zuverlässig im Vergleich zu anderen Testsystemen zur Bestimmung der Zellvitalität [236].

6.2.2 Das Programm COMPARE vom NCI

Bei dem Programm COMPARE handelt es sich um einen Algorithmus, mit dem es möglich ist, das Profil der antiproliferativen Aktivität einer Substanz – die als „Keimverbindung“ (engl. *seed compound*) bezeichnet wird – in den 60 Zelllinien des sogenannten *Primary Screening* zu analysieren [242]. Mit diesem Programm wird die ganze Datenbank der vom NCI getesteten Verbindungen durchsucht. Dabei werden die Aktivitätsprofile in den 60 Zelllinien nach der Ähnlichkeit mit dem Profil der sogenannten Keimverbindung sortiert. Eine Ähnlichkeit in dem Aktivitätsmuster wird quantitativ als Pearsons Korrelationskoeffizient⁵ (*Pearson's correlation coefficient*, PCC) dargestellt. Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß Verbindungen mit einem hohen Korrelationkoeffizienten einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzen. Somit erlaubt eine COMPARE-Analyse des Aktivitätsmusters einer neuen Substanz eine theoretische Voraussage über den potentiellen Wirkungsmechanismus und über das biochemische Target dieser Substanz.

Leider setzt eine COMPARE-Analyse voraus, daß die Ergebnisse der GI₅₀-Bestimmung schon in der Internet-Datenbank vom NCI [238] veröffentlicht worden sind. Das kann bis zu zwei Jahre nach der eigentlichen Durchführung des Assays dauern. Zahlreiche Beispiele solcher Analysen können in der Literatur gefunden werden [242, 243, 244].

⁵ Mit dem pearsons Korrelationkoeffizient wird die Stärke einer linearen Beziehung zwischen zwei Variablen bestimmt.

7 Methodischer Teil und Ergebnisse: Physikalische und molekularbiologische Untersuchungen zur DNA-Wechselwirkung und Topoisomerase I-Hemmung neuer Verbindungen aus der Stoffgruppe der anellierten und/oder substituierten Indole, Carbazole und Oligopyrrolcarboxamide

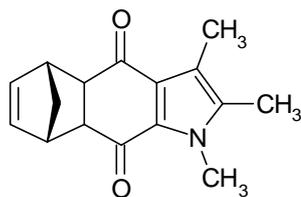
7.1 Indol- und Carbazolderivate

7.1.1 Substituierte bzw. anellierte Indole und Carbazole

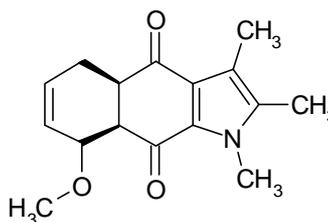
Substituierte bzw. anellierte Derivate der Indol- und Carbazol-Reihe sind pharmakologisch interessant als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirksubstanzen mit antitumorale Aktivität [28, 245, 246]. Im Rahmen der Forschung nach Derivaten des Pyrido[4,3-b]carbazol-Alkaloids Ellipticin, das in die DNA interkaliert und die Topoisomerase II hemmt (s. S. 24; [33]), und nach Analoga von Mitoxantron sind in der Arbeitsgruppe U. Pindur verschiedene neue substituierte bzw. anellierte Indole und Carbazole synthetisiert worden [2, 247-252]. Der mögliche Wirkmechanismus einiger der neu synthetisierten Verbindungen soll in dieser Arbeit mit biophysikalischen und molekularbiologischen Methoden untersucht werden. Ziel ist dabei neben der Methoden-Etablierung u.a. die Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und die Bewertung der strukturellen Eigenschaften, die für eine Wechselwirkung mit der DNA essentiell sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Verbindungen getestet:

- Substituierte und anellierte Indole [247]:

(±)-1,2,3-Trimethyl-4a,5,8,8a-tetrahydro-5,8-methano-1*H*-benzo[*f*]indol-4,9-dion (**1**) und (±)-8-Methoxy-1,2,3-trimethyl-4a,5,8,8a-tetrahydro-1*H*-benzo[*f*]indol-4,9-dion (**2**)



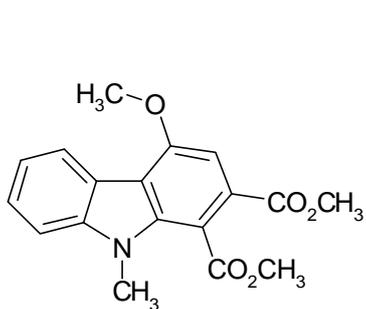
1



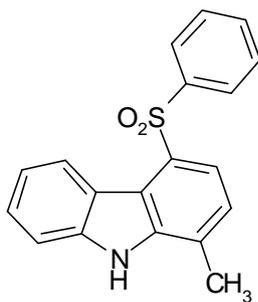
2

- Substituierte Carbazole [248, 249, 250]:

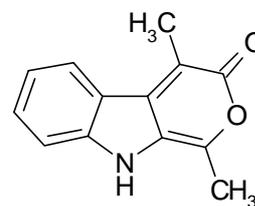
Dimethyl-4-methoxy-9-methyl-9*H*-carbazol-1,2-dicarboxylat (**3**), 1-Methyl-3-phenylsulfonyl-9*H*-carbazol (**4**), 1,4-Dimethyl-3,9-dihydropyrano[3,4-*b*]indol-3-on (**5**), 1-Methyl-9*H*-carbazol-2-carbonsäuremethylester (**6**), 1-[1-(1*H*-3-indolyl)ethyl]-3,9-dihydropyrano[3,4-*b*]indol-3-on (**7**), 1,4-Dimethyl-9*H*-carbazol-3-carbonitril (**8**) und 2-Methyl-1-(4-methylphenyl)-4,9-dihydro-3*H*-3,4-carbazoldion (**9**)



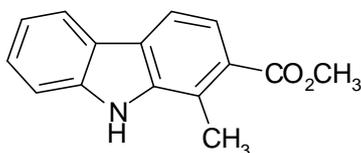
3



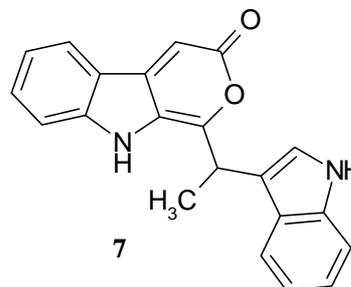
4



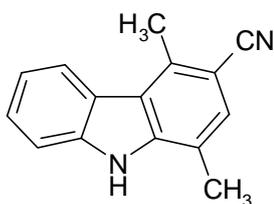
5



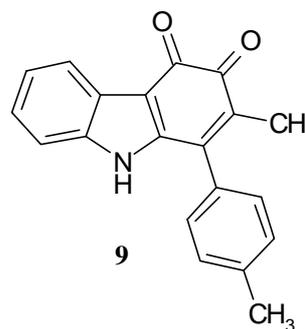
6



7



8

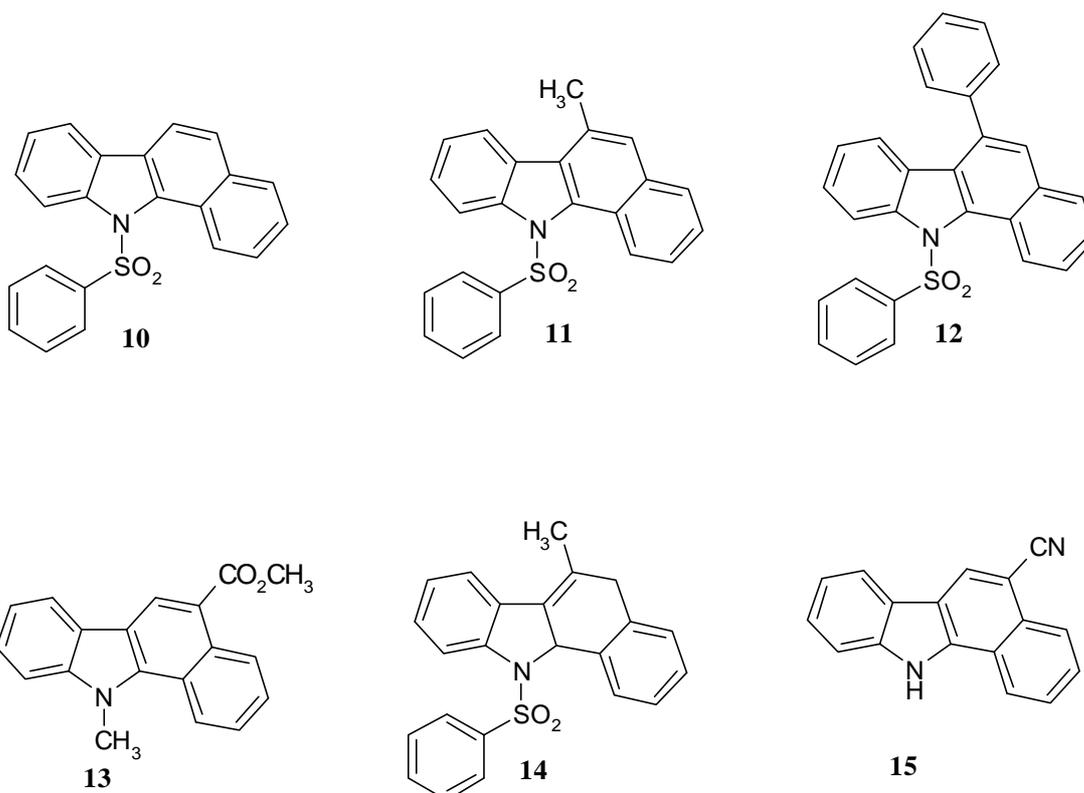


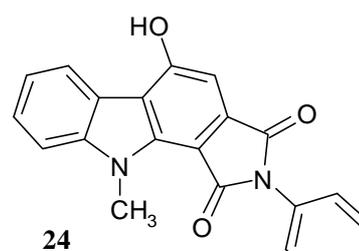
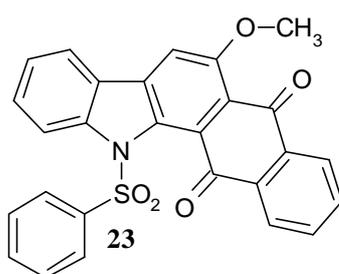
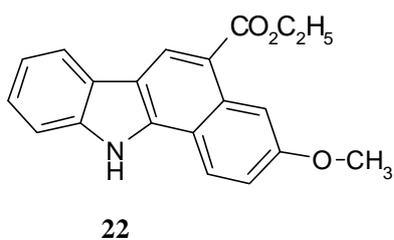
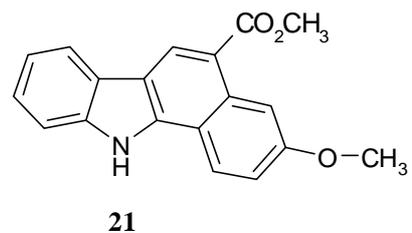
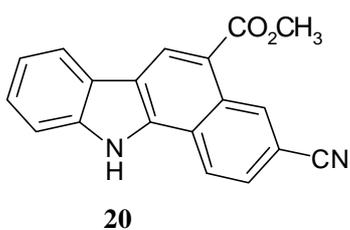
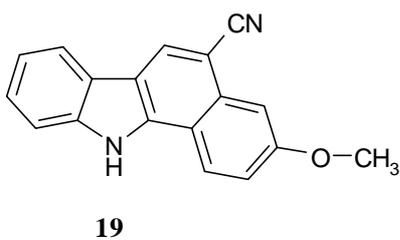
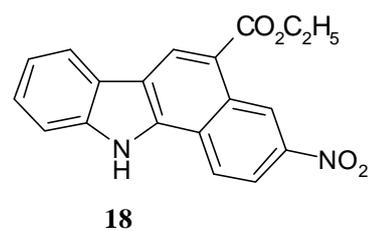
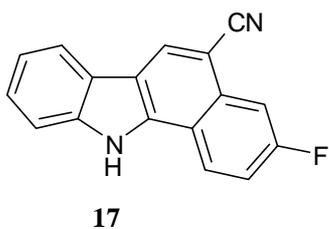
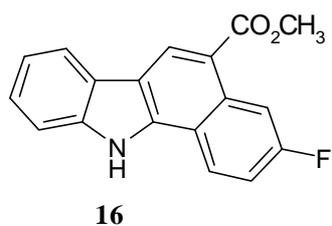
9

- Anellierte Carbazole [249, 251, 252]

[a]-anellierte Carbazole:

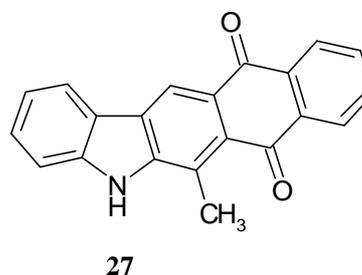
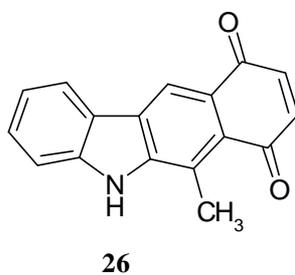
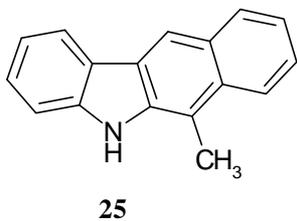
11-(Phenylsulphonyl)-11*H*-benzo[*a*]carbazol (**10**), 6-Methyl-11-(phenylsulphonyl)-11*H*-benzo[*a*]carbazol (**11**), 6-Phenyl-11-(phenylsulphonyl)-11*H*-benzo[*a*]carbazol (**12**), 11-Methyl-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-methylcarboxylat (**13**), 6-Methyl-11-phenylsulphonyl-11,11*a*-dihydro-5*H*-benzo[*a*]carbazol (**14**), 11*H*-Benzo[*a*]carbazol-5-carbonitril (**15**), 3-Fluoro-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-methylcarboxylat (**16**), 3-Fluoro-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-carbonitril (**17**), 3-Nitro-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-methylcarboxylat (**18**), 3-Methoxy-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-carbonitril (**19**), 3-Cyano-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-methylcarboxylat (**20**), 3-Methoxy-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-methylcarboxylat (**21**), 3-Methoxy-11*H*-benzo[*a*]carbazol-5-ethylcarboxylat (**22**), 6-Methoxy-12-(phenylsulphonyl)-12*H*-naphtho[2,3-*a*]carbazol-5,13-dion (**23**), und 5-Hydroxy-10-methyl-2-phenyl-1,2,3,10-tetrahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-1,3-dion (**24**)





[b]-anellierte Carbazole [251]:

5-Methyl-6*H*-benzo[*b*]carbazol (**25**), 5-Methyl-6*H*-benzo[*b*]carbazol-1,4-dion (**26**), und 6-Methyl-7*H*-naphtho[2,3-*b*]carbazol-5,13-dion (**27**)



7.1.1.1 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Die Fähigkeit dieser 27 neuen Verbindungen, mit der DNA zu wechselwirken, wurde vorerst mit Hilfe des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays (s. S. 54) untersucht. Dabei war die Löslichkeit ein schwerwiegendes Problem: viele der synthetisierten Stoffe sind zu lipophil und praktisch wasserunlöslich. Die Durchführung von optischen Assays in wässrigem Milieu war dadurch für einige der Verbindungen nicht möglich, denn es kam zu einer Trübung der Testlösungen. Durch den Streulichteffekt zeigten die Fluoreszenzmeßwerte im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eine extrem hohe Standardabweichung, insbesondere bei den substituierten Carbazolen **3-8**. Hier kam es bis zu einer Standardabweichung von ± 13.3 %F bei Verbindung **5** und von ± 9.4 %F bei Verbindung **8** (Abb. 7-1).

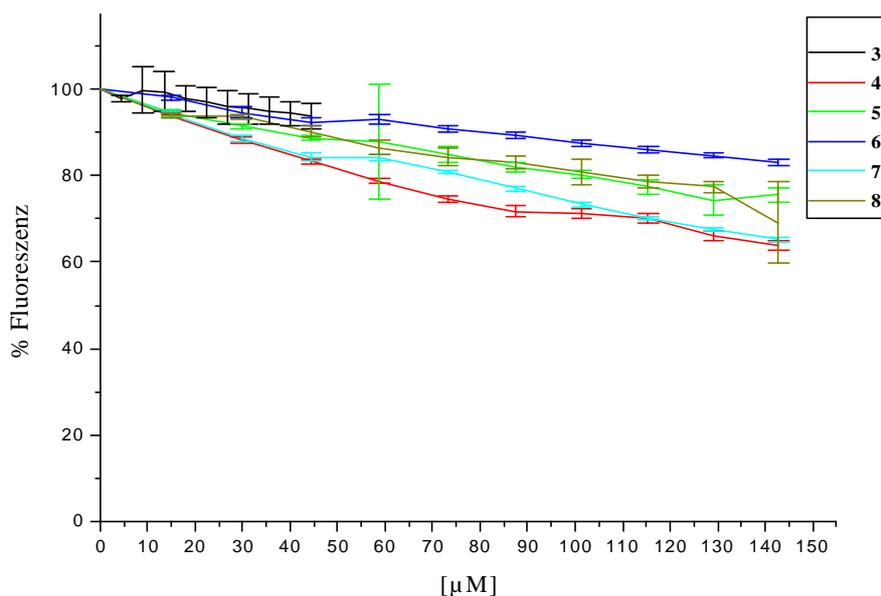


Abb. 7-1: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bei den Verbindungen **3-8**.

Dasselbe Problem ergab sich mit den [b]-anellierten Carbazolen **25**, **26** und **27**, die eine Standardabweichung von bis zu ± 6.9 %F zeigten (vgl. Abb. 7-2).

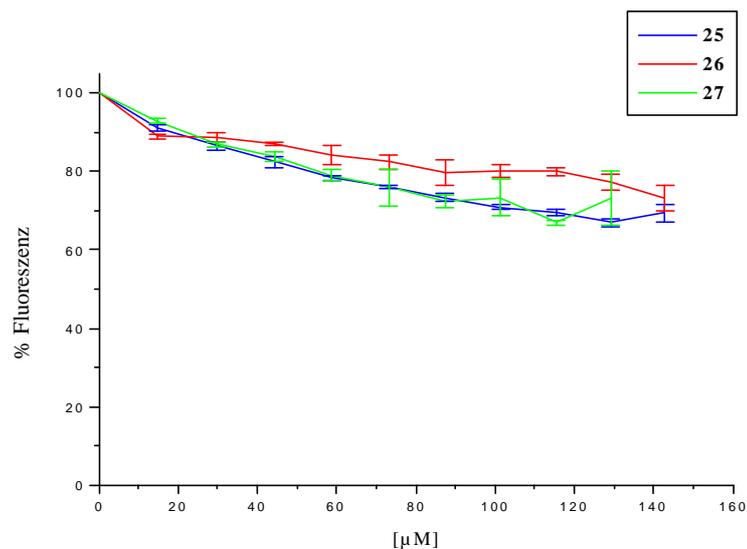


Abb. 7-2: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bei den Verbindungen **25**, **26**, **27**.

In diesen Fällen konnte man leider nicht beurteilen, ob die beobachtete Fluoreszenzabnahme ein Ergebnis der Verdrängung von Ethidiumbromid aus seinem Komplex mit der DNA, ein Quenching-Effekt oder sogar nur ein Streulichteffekt war.

In einigen Fällen hielt sich die Trübung in Grenzen und die Standardabweichungen waren annehmbar. Die dabei beobachtete Fluoreszenzreduktion konnte nicht für die Berechnung der Bindungskonstante verwendet werden, sie zeigte aber qualitativ eine gewisse DNA-Affinität der Testverbindungen.

Bei den [a]-anellierten Carbazolen **10-14** waren ähnliche Probleme, sie zeigten ebenfalls eine schwache Affinität für die DNA. Die „beste“ Verbindung dieser Reihe war das Carbazol **12**, bei dem die Fluoreszenzabnahme maximal 30% der initialen Fluoreszenz reichte, bei einer Konzentration der Testsubstanz von ca. 50 µM (vgl. Abb. 7-3).

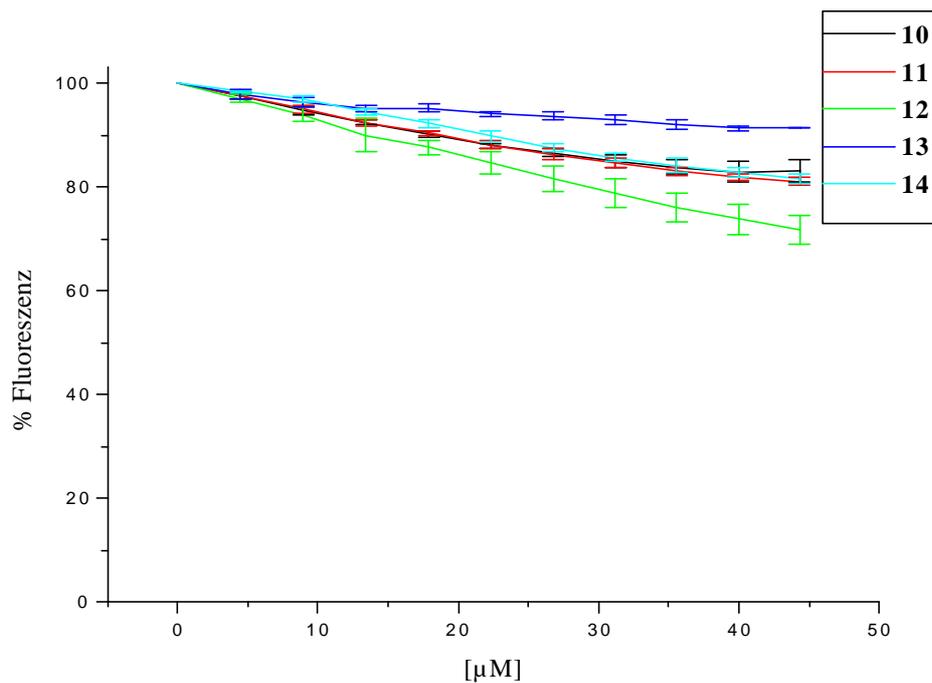


Abb. 7-3: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bei den [a]-anellierten Carbazolen **10-14**.

Kleinere Moleküle, wie die Indolderivate **1** und **2**, fielen in der Pufferlösung nicht aus (Standardabweichung bei Verbindung **2** < 0.5%F), zeigten aber eine sehr schwache Affinität für die DNA (vgl. Abb. 7-4).

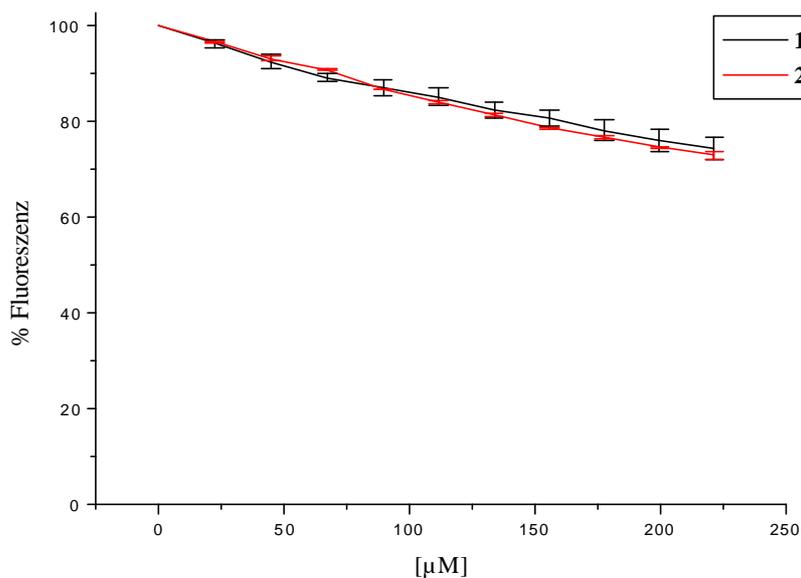


Abb. 7-4: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bei den Indolderivaten **1** und **2**.

Mit keiner der oben beschriebenen Testverbindungen konnte eine 50%ige Abnahme der Fluoreszenz erreicht werden, und es konnte dementsprechend keine Bindungskonstante berechnet werden.

Das Carbazoldion **9** und das Naphthocarbazonion **23** zeigten hingegen kaum Löslichkeitsprobleme. Es konnte mit diesen Stoffen eine 55-58%ige Fluoreszenzabnahme bei dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay erreicht werden (vgl. Abb. 7-5).

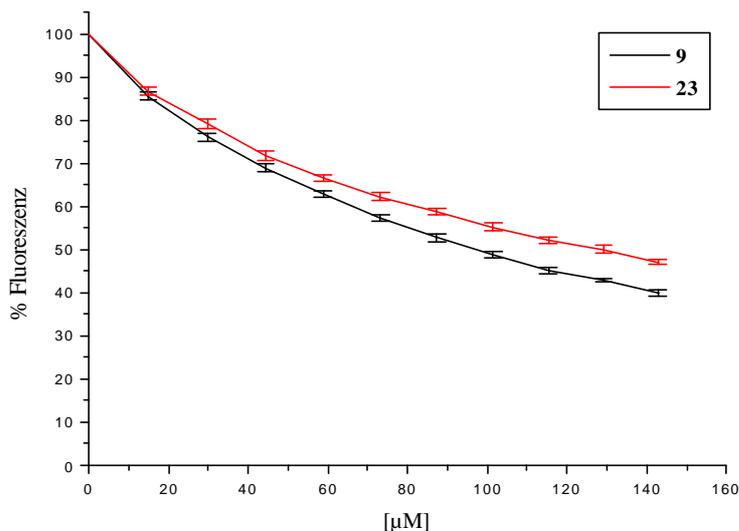


Abb. 7-5: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Verbindung **9** und **23**

Aus dem Diagramm kann man die C_{50} -Werte der zwei Verbindungen ermitteln:

Verbindung	C_{50} -Wert
9	94.8 ± 0.8
23	127.2 ± 0.9

Wie im Kapitel 4 beschrieben (s. S. 54), sind die bemessenen C_{50} -Werte umgekehrt proportional zu den Bindungskonstanten. Man kann diese unter der Voraussetzung berechnen, daß der Bindungsmodus von Testverbindung und Ethidiumbromid gleich ist. Da für beide Stoffe in den späteren Testungen keine Interkalation nachgewiesen werden konnte (s. S. 87), wäre eine Berechnung der Bindungskonstanten nach Wellman oder nach Boger nicht angebracht (vgl. Kap.4 und [185, 187]).

7.1.1.2 T_m -Bestimmungen

Auf Grund der Löslichkeitsprobleme und der schwachen Affinität der 27 Testverbindungen in dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay wurden bei den schwerlöslichen Verbindungen keine T_m -Bestimmung durchgeführt. Auf der anderen Seite bietet diese Methode eine schnellere Möglichkeit, eventuelle Wechselwirkungen mit der DNA unabhängig von Bindungsmodus zu bestimmen. Deswegen wurden exemplarisch einige Verbindungen erst mit diesem Assay untersucht und nur in Anwesenheit von Wechselwirkungen mit der DNA den anderen Testverfahren unterworfen.

Das schnelle Vorscreening der [a]-anellierten Carbazole **15-22** erfolgte mittels Bestimmung der Schmelztemperatur des Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit der Testverbindungen. Auch in diesem Fall gab es Probleme mit der Schwerlöslichkeit der Substanzen im Phosphat-Puffer. Es war dabei keine Verschiebung des T_m -Wertes der DNA nach höheren Temperaturen zu beobachten.

Die Verbindungen **9** und **23**, bei welchen im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eine 50%ige Abnahme der Fluoreszenz erreicht wurde, wurden nun auch der T_m -Bestimmung unterworfen. Verbindung **9** wies in diesem Versuch überraschenderweise keine Affinität für die DNA auf, denn die Schmelztemperatur des Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] blieb bei 46°C, wie in Abwesenheit der Substanz. Leider war wegen einer Zersetzung von Verbindung **23** bei höheren Temperaturen eine Bestimmung des T_m -Wertes für das Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit dieser Substanz experimentell nicht möglich (vgl. Abb. 7-6).

Für keine der exemplarisch getesteten Indol- und Carbazolderivate konnte über die Bestimmung der Schmelzkurven eine Wechselwirkung mit der DNA nachgewiesen werden. Das läßt vermuten, daß der Fluoreszenzabnahme beim Ethidiumbromid-Verdrängungsassay eher ein Quenching-Effekt zugrunde liegt als eine echte Verdrängung von Ethidium aus dem DNA-Komplex.

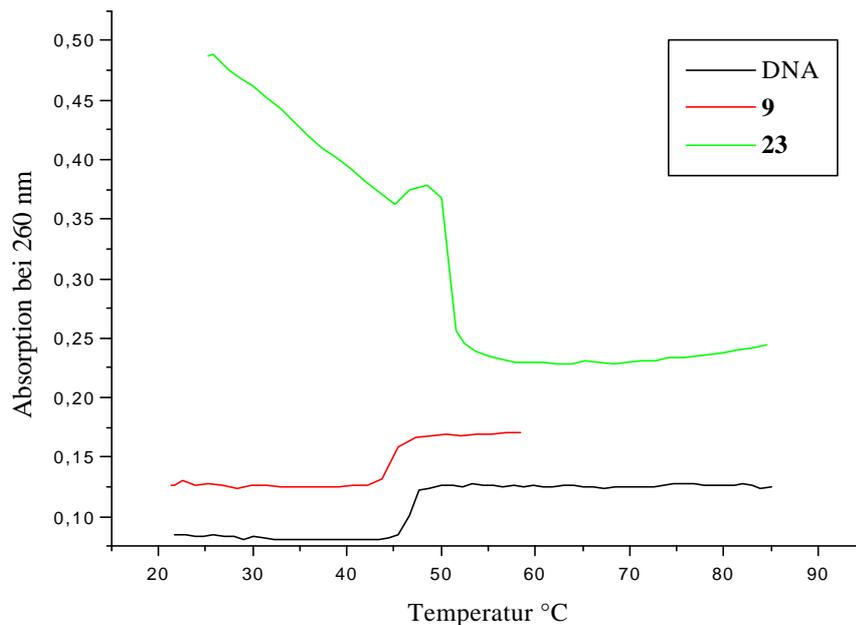


Abb. 7-6: Schmelzkurve von reinem [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] und [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit von Verbindung **9** bzw. **23**.

7.1.1.3 Zellbiologische Assays

Die Zytotoxizität der Carbazole **3** und **23** wurde *in vitro* in vier verschiedenen humanen Tumorzelllinien mit dem MTT-Assay untersucht (MTT-cytotoxicity assay, primary screening-Methode vom NCI; vgl. Kap.6, S. 75). Verbindung **23** zeigte eine signifikative Hemmung des Zellwachstums gegen drei der getesteten Zelllinien (Tabelle 7-1). Im Vergleich mit dem hochaktiven Antibiotikum der Anthracyclin-Reihe Doxorubicin (GI_{50} 0.037 mmol, L1210 Zelllinie) oder mit Ellipticin (GI_{50} 0.99 mmol L1210 Zelllinie) zeigten aber beide Carbazolderivate jedoch schwächere Zytotoxizität [205].

Auf Grund dieser richtungsweisenden Ergebnisse wurden beide Carbazole **3** und **23** auf molekularbiologischer Ebene mit dem Unwinding-Assay weiter untersucht (vgl. S. 87).

Leider stehen uns für Verbindung **9** keine Daten über Zytotoxizität zur Verfügung, denn die Messungen konnten wegen Löslichkeitsprobleme nicht durchgeführt werden [250]. Bei weiteren Studien zeigte aber diese Verbindung eine interessante antioxidative Wirkung: Verbindung **9** schützt die DNA vor oxidativer Schädigungen und hemmt Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade [250]. Aus diesem Grund wurde auch Verbindung **9** mit molekularbiologischen Methoden weiter untersucht (vgl. S. 87).

Tabelle 7-1: GI₅₀ (*growth inhibitory concentration*) und LC₅₀ (*lethal concentration*) der Carbazole **3** und **23**, als log₁₀ der molaren Konzentration [205] n.b.: nicht bestimmt.

Zelllinie	Carbazol 3		Carbazol 23	
	GI ₅₀	LC ₅₀	GI ₅₀	LC ₅₀
K562 (chronische myeloide Leukämie)	-0.7	n.b.	-1.6	n.b.
RXF393 (Nierenkrebs)	-1.0	-0.7	-1.5	-1.1
HCT116 (Colonkrebs)	>-1.0	>-1.0	>-1.0	>-1.0
SKmel28 (malignes Melanom)	>-1.0	>-1.0	-1.3	-1.2/-1.1

7.1.1.4 Unwinding-Assay und Hemmung der Topoisomerase I

Als planare aromatische Verbindungen sind Carbazole potentiell in der Lage zu interkalieren. Diese Fähigkeit wurde bei viele bekannten Interkalatoren mit Hilfe des *Molecular Modelling* untersucht und vorhergesagt [41]. Die Kristallstrukturen der Verbindungen wurden mit MOPAC minimiert, mit ESP-Ladungen versehen und mit Hilfe der SYBYL-Option DOCK interaktiv in die Interkalationskavitäten von d(CGTACG)₂ und d(CGGCCG)₂ interkaliert. Die energetisch günstigsten Komplexe wurden per Moleküldynamik-Simulation und anschließender Kraftfeldminimierung erhalten [41, 253]. Demnach interkalieren die Verbindungen **3** und **24** fast vollständig und parallel zur Basenpaar-Längsachse in die DNA, während die Verbindung **23** aufgrund der Molekülwinkelung und dem N-Phenylsulfonylrest eine Konformation einnehmen muß, bei der günstigerweise die Benzochinonstruktur interkaliert und die Seitenkette in der kleinen Rinne liegt. Grenzorbitalverteilungen und -energien für den energetisch günstigsten Interkalationskomplex in d(CGTACG)₂ wurden mit MOPAC/AM1 berechnet: Nur Verbindung **23** kann energetisch günstige Charge-Transfer-Wechselwirkungen in TA-Kavitäten eingehen [41, 205, 253].

Um die durch *Molecular Modelling* vorhergesagte Interkalationsfähigkeit der Verbindungen **3**, **23** und **24** experimentell zu beweisen, wurden die drei Carbazolderivate mit dem Unwinding Assay untersucht. Der Einsatz dieses Assays zur Bestimmung der Interkalationsfähigkeit einer Substanz ist aber nur möglich, wenn die Substanzen die Topoisomerase I nicht hemmen (s. S. 60). Deswegen wurden beide Assays parallel durchgeführt (vgl. Abb. 7-7).

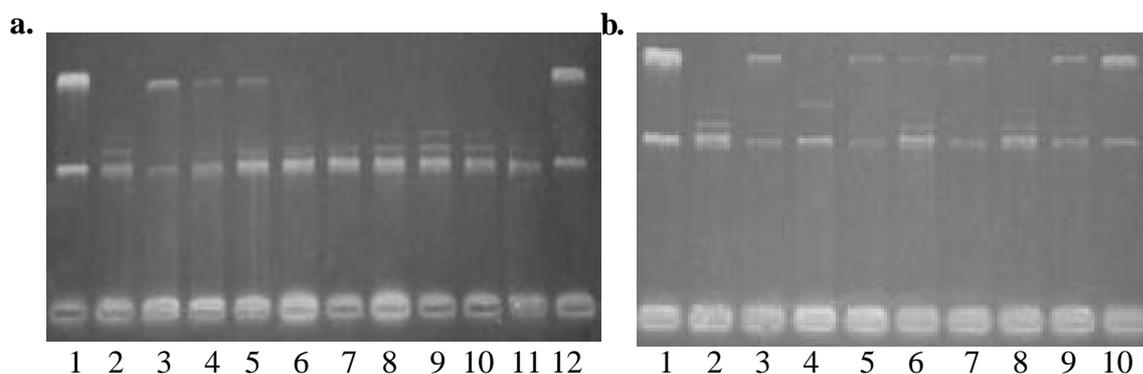


Abb. 7-7: Unwinding Assay (a.) und Hemmung der Topoisomerase I (b.) durch die Verbindungen **3**, **23** und **24**. Abb. a.): Spuren 1,12: Form I DNA; Spur 2: Form IV DNA; Spuren 3,4,5: Ellipticin, bzw.. Mitoxantron und Hoechst 33258, jeweils 100 μ M; Spuren 6 und 7: **3**, Spuren 8 und 9: **23**, Spuren 10 und 11: **24**, jeweils 10 μ M bzw. 100 μ M. Abb. b.): Spuren 1,10: Form I DNA; Spur 2: Form IV DNA; Spur 3: Camptothecin 100 μ M; Spuren 4 und 5: **3**, Spuren 6 und 7: **23**, Spuren 8 und 9: **24**; jeweils 10 μ M bzw. 100 μ M.

Alle drei Verbindungen können bei einer Konzentration von 100 μ M die katalytische Aktivität der Topoisomerase I hemmen, Verbindung **23** sogar schon bei einer Konzentration von 10 μ M. Dadurch konnte Assay-bedingt leider für keine dieser Substanzen die Interkalation nachgewiesen werden, da die zur Bestimmung notwendige Topoisomerase I gehemmt wird. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß der bevorzugte DNA-Bindungsmodus des Carbazolderivat **23** die Interkalation sein kann, wie durch *Molecular Modelling* vorhergesagt. Das sollte weitergehend mit zusätzlichen Methoden belegt werden, die nicht Topoisomerase-abhängig sind.

Das Ergebnis des Unwinding-Assays für Verbindung **9** ist negativ, und die Verbindung ist auch nicht in der Lage, die Topoisomerase I zu hemmen. Deswegen kann für diesen Stoff eine interkalative Wechselwirkung mit der DNA sicher ausgeschlossen werden.

7.1.1.5 Bilanz

Bezüglich der DNA-Affinität der 27 substituierten und/oder anellierten Indol- und Carbazolderivate lieferte der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay infolge der enormen Löslichkeitsprobleme praktisch keine aussagekräftigen Ergebnisse. Lediglich beim Carbazol **12** wurde eine Fluoreszenzabnahme von maximal 30% bei einer Konzentration von ca. 50 μ M erreicht, was auf eine sehr schwache Affinität für die DNA hindeutet. Nur bei dem

Carbazoldion **9** und bei dem Naphthocarbazol **23** konnte auf Grund der besseren Löslichkeit ein C_{50} -Wert (ca. 95 μM bzw. ca. 130 μM ; s. S. 84) ermittelt werden. Leider wurde dieser Hinweis auf DNA-Bindung für die Carbazolderivate **9** und **23** durch die Bestimmung der T_m -Werte in den Denaturierungsexperimenten nicht bestätigt. Für keine der aus dieser Reihe getesteten Verbindungen konnte mit den beschriebenen Assays eine Wechselwirkung mit der DNA nachgewiesen werden.

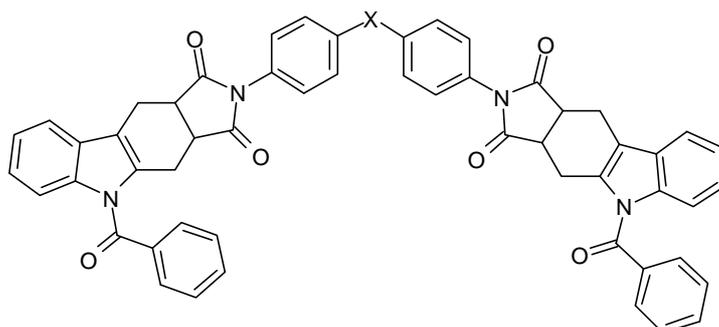
Die interessante Zytotoxizität der Verbindungen **3** und **23** in dem Antitumor-Screening-Verfahren vom NCI läßt sich mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden mit einer Hemmung der Topoisomerase I eventuell erklären, weitere Wirkungsmechanismen können an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

7.1.2 Biscarbazole

Mit dem Ziel der Erstellung neuer Bisinterkalatoren wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Biscarbazole synthetisiert, in denen die zwei Carbazol-Chromophore über unterschiedliche Linker gebunden wurden [254, 255]. In der ersten Gruppe dieser Verbindungen sind die Carbazole über eine funktionalisierte Diarylkette gebunden (vgl. Abb. 7-8).

Diese Stoffe wurden in einer Mischung aus Racemat und Mesoformen getestet. Sie zeigten eine extrem geringe Löslichkeit in Wasser, so daß eine Durchführung des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays unmöglich war. Schon ab einer Konzentration von 3 μM fielen die Substanzen in der Meßlösung aus und verhinderten somit eine korrekte Messung der Fluoreszenz. Aus diesem Grund war auch die Bestimmung der T_m -Werte für diese Verbindungen leider nicht erfolgreich.

Bei einem Vorscreening des NCI in drei empfindlichen Tumorzelllinien (vgl. Kap. 6, S. 72) zeigte das Diphenylamin **31** eine relativ starke Hemmung des Zellwachstums, und bei der Brustkrebslinie MCF7 war sogar zytotoxische Aktivität zu beobachten (Tabelle 7-2). Um diese Effekte von Verbindung **31** mit den Methoden der Arbeit zu erklären, wurden speziell der Unwinding-Effekt und die Topoisomerase I-Hemmung dieses Stoffes untersucht. Der Unwinding-Assay zeigte keine Interkalation der Substanz in die DNA, und die Topoisomerase I wurde nicht gehemmt.



Verbindung	Name	-X-
28	2-(4-{4-[5-Benzoyl-1,3-dioxo-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-2-yl]benzyl}phenyl)-5-benzoyl-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-1,3dion	-CH ₂ -
29	2-(4-{4-[5-Benzoyl-1,3-dioxo-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-2-yl]benzyl}sulphonyl)-5-benzoyl-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-1,3dion	-SO ₂ -
30	2-(4-{4-[5-Benzoyl-1,3-dioxo-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-2-yl]benzoyl}phenyl)-5-benzoyl-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-1,3dion	-CO-
31	(3a <i>S</i> , 10a <i>R</i>)-2-(4-{4-[(3a <i>R</i> , 10a <i>S</i>)-5-Benzoyl-1,3-dioxo-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-2-yl]anilino}phenyl)-5-benzoyl-1,2,3,3a,4,5,10,10a-octahydropyrrolo[3,4- <i>b</i>]carbazol-1,3dion	-NH-

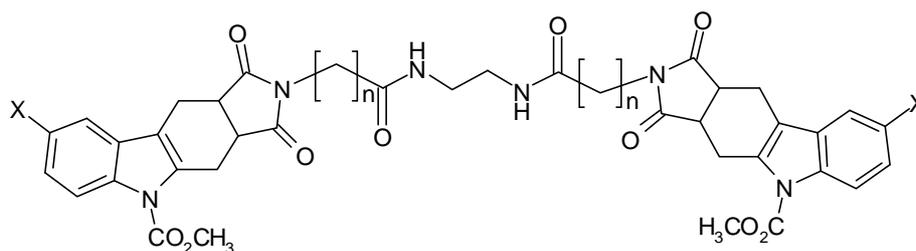
Abb. 7-8: Biscarbazole mit nicht-amidischen Linker

Tabelle 7-2: Zellwachstums-hemmende Aktivität der Verbindung **31** bei den drei Zelllinien MCF-7 (Brustcarcinom), NCI-H460 (Lungencarcinom) und SF 268 (Gliom), als Zellwachstum in Prozent bezogen auf die unbehandelte Kontrolle [239].

Verbindung 0.1 mM	Zellwachstumsprozent		
	NCI-H460 (Lungen)	MCF7 (Brust)	SF-268 (ZNS)
31	6	-38	38

Aus diesen Ergebnissen können zwei mögliche Hypothesen aufgestellt werden. Die antitumorale Wirkung könnte an einer Wechselwirkung mit der DNA liegen, die mit unseren Methoden leider nicht feststellbar ist. Diese kann aber nicht interkalativ sein. Auf der andere Seite könnte dieser Stoff andere Targets als die DNA angreifen.

In der zweiter Gruppe der im Arbeitskreis U. Pindur synthetisierten Biscarbazole sind die zwei Chromophore über eine diamidische Brücke verbunden (vgl. Abb. 7-9) [255].



Verbindung	Name	n	-X
32	1,2-Bis(β -8-brom-5-methoxycarbonyl-4,5,10,10a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-b]carbazol-1,3-dion-2-yl-propansäureamido)ethan	2	-Br
33	1,2-Bis(γ -8-brom-5-methoxycarbonyl-4,5,10,10a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-b]carbazol-1,3-dion-2-yl-butansäureamido)ethan	3	-Br
34	1,2-Bis(δ -5-methoxycarbonyl-4,5,10,10a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-b]carbazol-1,3-dion-2-yl-pentansäureamido)ethan	4	-H
35	1,2-Bis(ϵ -8-methoxy-5-methoxycarbonyl-4,5,10,10a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-b]carbazol-1,3-dion-2-yl-hexansäureamido)ethan	5	-OCH ₃

Abb. 7-9: Biscarbazole mit amidischem Linker

Diese Verbindungen wurden in einer Mischung aus Racemat und Mesoform untersucht. Trotz der amidischen Gruppen als H-Brücken-Donor und -Akzeptor im Linker sind diese Stoffe auch sehr schlecht wasserlöslich. Dadurch waren die Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays beeinträchtigt. Daher konnten mit dieser Methode keine Rückschlüsse

auf die DNA-Affinität gezogen werden. Außerdem zeigten diese Verbindungen eine eigene UV-Absorption zwischen 200-300 nm, so daß die Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA auch nicht realisiert werden konnte. Die Substanzen wurden im Rahmen des *Development Therapeutic Program* des NCI zur Bestimmung der Zytotoxizität angefordert, aber die Ergebnisse dieses Screenings liegen zur Zeit noch nicht vor.

Einige neu synthetisierte Verbindungen der Biscarbazol-Reihe wurden exemplarisch dem *Footprinting*-Assay im Arbeitskreis von Prof. C. Bailly unterworfen (s. S. 63). Leider zeigte keine der getesteten Substanzen eine Sequenz-selektive Bindung an die DNA [255].

7.1.3 Indolocarbazole

Eine Reihe von Indolocarbazolen wurde in der Arbeitsgruppe U. Pindur durch selektive Funktionalisierung von 2,2'-Bisindolylderivaten als strukturelle Ableitung der Indolocarbazol-Alkaloide Rebeccamycin und Staurosporin synthetisiert [130, 132, 256]. Diese natürlich vorkommenden Stoffe sind interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer zytostatisch wirksamen Verbindungen (vgl. Kap. 3, S. 41). Trotz ihrer ähnlichen Struktur hemmen sie das Zellwachstum mit zwei verschiedenen Mechanismen. Rebeccamycin zeigt antitumorale Aktivität, wahrscheinlich auf Grund seiner Fähigkeit, die Topoisomerase I zu hemmen, während Staurosporin ein unselektiver Inhibitor der Proteinkinase C ist [257, 258].

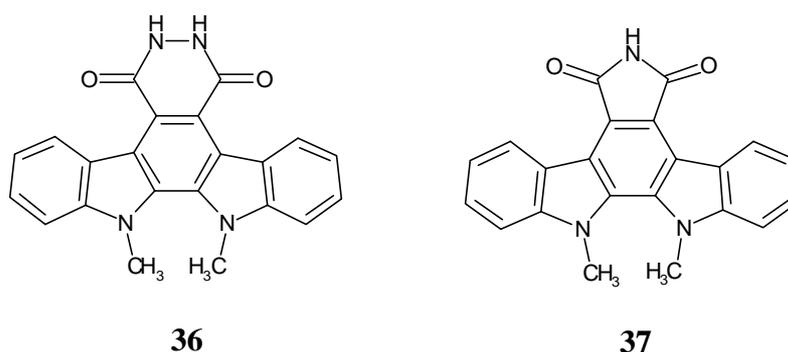


Abb. 7-10: Die neu synthetisierten Verbindungen 12,13-Dimethyl-5,7,12,13-tetrahydro-6H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-5,7-dion **36** und 13,14-Dimethyl-5,6,7,8,13,14-hexahydroindolo[2,3-a]pyridazino[4,5-c]carbazol-5,8-dion **37**.

Eine Auswahl der von uns synthetisierten Verbindungen wurde beim *National Cancer Institute* (NCI, USA) auf Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien geprüft. In dem *Primary Antitumor Screening* (s. Kap. 6, S. 72) zeigten die Indolocarbazole **36** und **37** eine interessante Zytotoxizität, wie in Tabelle 7-3 zusammengefaßt (Vgl.

Abb. 7-10; [206]).

Tabelle 7-3: GI_{50} *growth inhibitory concentration* [als \log_{10} der molaren Konzentration] von Rebeccamycin, Staurosporin und der Indolocarbazole **36** und **37**; *Primary Screening* vom National Cancer Institute, Bethesda (USA). Die Bestimmung erfolgte mit dem SRB-Assay; [259]; n.b.= nicht bestimmt.

Zelllinie	Rebeccamycin	Staurosporin	36	37
Durchschnittliche GI_{50}	-6.6	-8.1	-4	-4
SR (Leukämie)	-7.5	n.b.	-8.0	-8.0
MCF 7 (Brustkrebs)	-7.1	n.b.	-6.8	-4.6
T-47 D (Brustkrebs)	-6.8	n.b.	-6.3	-4.4
OVCAR-3 (Ovarkrebs)	-6.5	-8.1	n.b.	-7.3
RXF 393 (Nierenkrebs)	-6.7	-8.6	n.b.	-7.4

Darüber hinaus wurden weitere Studien beim NCI (Bethesda, USA) zur Hemmung der Proteinkinase C_{α} von den beiden Verbindungen **36**, **37** durchgeführt [130]. Bezogen auf die Hemmung von Proteinkinase C_{α} durch Staurosporin (als 100% festgelegt) zeigten Verbindung **36** und **37** eine Hemmung von 31% bzw. 50%.

Auf Grund dieser richtungsweisenden Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Untersuchungen durchgeführt, um den potentiellen Wirkmechanismus dieser zwei Indolocarbazole aufzuklären. Mit Hilfe von T_m -Bestimmungen, des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays und des Unwinding-Assays wurde die DNA-Interaktion der zwei Indolocarbazole bestimmt. Zusätzlich wurde die Hemmung der Topoisomerase I untersucht.

7.1.3.1 Biophysikalische Methoden zur Bestimmung der DNA-Wechselwirkungen

In Abb. 7-11 sind die Schmelzkurven von reiner DNA und von DNA in Anwesenheit von **36** bzw. **37** dargestellt. Der T_m -Wert zeigt keine Verschiebung nach höheren Werten, was hindeutet, daß keines der zwei Indolocarbazole mit der DNA in Wechselwirkung tritt.

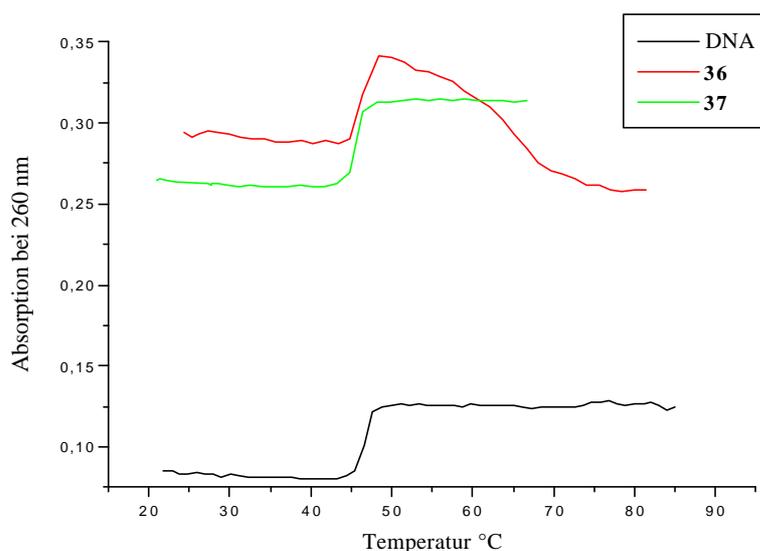


Abb. 7-11: Schmelzkurve von DNA in Ab- und Anwesenheit von Verbindung **36** und **37**.

Tabelle 7-4: T_m -Werte von Poly[dA-dT]·Poly[dA-dT] in Ab- und Anwesenheit von Verbindung **36** bzw. **37**.

	Poly[dA-dT]×Poly[dA-dT]	Poly[dA-dT]×Poly[dA-dT] + 36	Poly[dA-dT]×Poly[dA-dT] + 37
T_m-Werte	46.6 ± 0.5	45.0 ± 0.8	46.0 ± 0.6

Das Fehlen von Wechselwirkungen der zwei Indolocarbazole mit der DNA zeigt sich auch im Ausbleiben der Fluoreszenzabnahme bei dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay (vgl. Abb. 7-12). Beide Verbindungen, **36** und **37**, zeigten eine sehr geringe Fluoreszenzabnahme, die mit dem Verdünnungseffekt durch die Zugabe der gleichen Mengen von DMSO als Lösungsmittel vergleichbar ist.

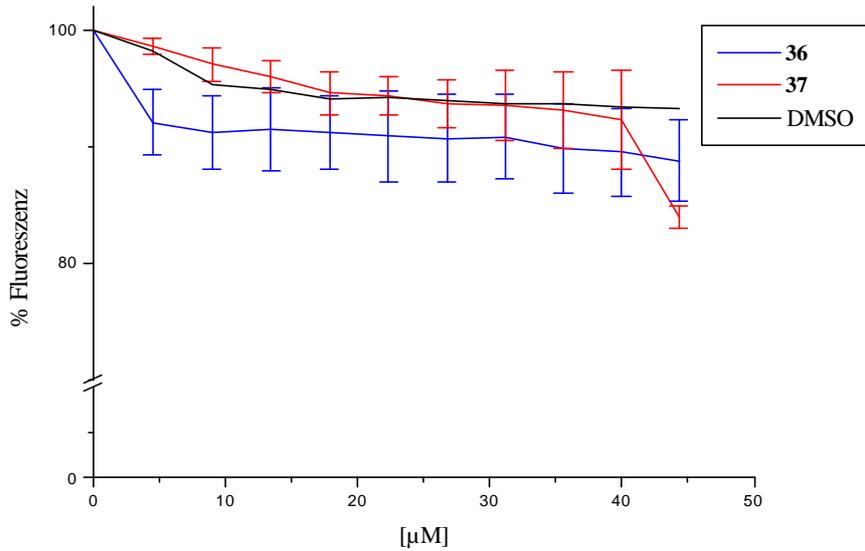


Abb. 7-12: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay der Verbindungen **36** und **37** in Vergleich mit DMSO.

7.1.3.2 Unwinding-Assay und Hemmung der Topoisomerase I

Auch bei den Indolocarbazolen **36** und **37** wurden der Unwinding-Assay für die Bestimmung der Interkalation der synthetisierten Verbindungen und der Assay zur Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung parallel durchgeführt. Durch Inkubation einer DNA/Topoisomerase I-Mischung in Anwesenheit und Abwesenheit der zwei Carbazole **36** und **37** wurden verschiedene Verteilungen der Topoisomere erhalten.

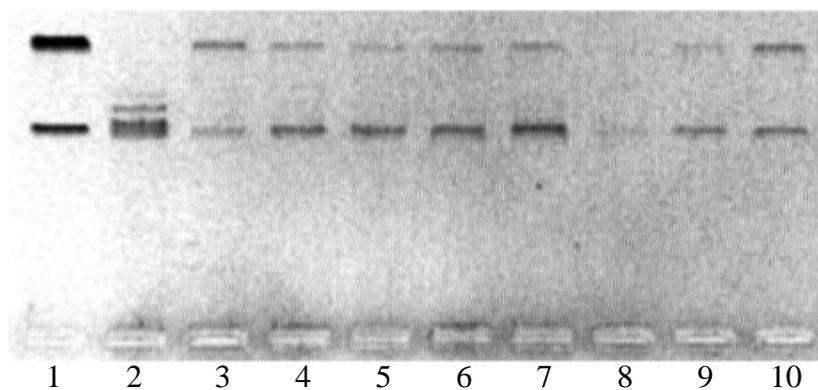


Abb. 7-13: Topoisomerase I-Hemmung durch **36** und **37**. Spur 1: scDNA (Form I); Spur 2: relaxierte DNA (nach Inkubation mit Topoisomerase I, Form IV); Spuren 3 und 4:

Camptothecin 100 bzw. 200 μM ; Spuren 5, 6, 7: **37** 50, 100 und 200 μM ; Spuren 8, 9, 10: **36** 50, 100 und 200 μM .

Wie in Abb. 7-13 dargestellt, bleibt die Plasmid-DNA in Anwesenheit beider Carbazole in der superhelikalen Form, d.h. die Topoisomerase I wird gehemmt. Dementsprechend zeigt auch der Unwinding-Assay bei der Prüfung auf Interkalation ein negatives Ergebnis (vgl. Abb. 7-14).

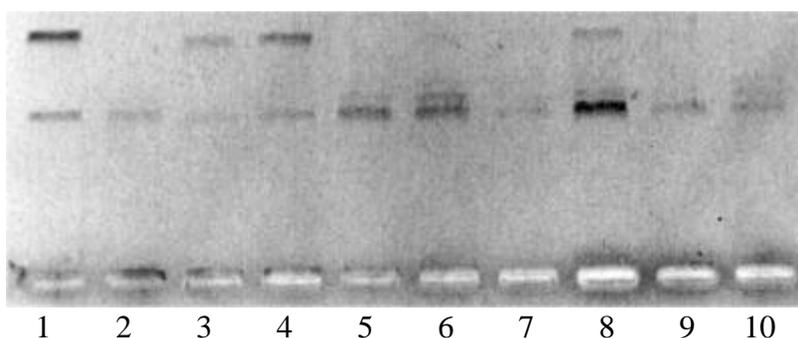


Abb. 7-14: Unwinding-Assay der Verbindungen **36** und **37**. Spur 1: scDNA (Form I); Spur 2: relaxierte DNA (nach Inkubation mit Topo I, Form IV); Spuren 3 und 4: Ellipticin 100 bzw. 200 μM ; Spuren 5, 6, 7: **37** 50, 100 und 200 μM ; Spuren 8, 9, 10: **36** 50, 100 und 200 μM .

7.1.3.3 Bilanz

Durch die Hemmung der Topoisomerase I bleibt mit diesen Methoden die Frage offen, ob es sich bei dem Unwinding-Assay von Verbindung **36** und **37** um ein falsch negatives Ergebnis handelt, d.h. ob die getesteten Verbindungen interkalieren oder nicht. Diese Möglichkeit ist allerdings eher unwahrscheinlich auf Grund der Ergebnisse aus den anderen Assays, die keine Wechselwirkung der Indolcarbazole mit der DNA zeigen (s. S. 94). Eine Interkalation in die DNA ist also keine notwendige Bedingung für die Hemmung der Topoisomerase I durch Indolcarbazolderivate, wie schon in Kap. 3 berichtet [139].

Eine COMPARE-Analyse des Zytotoxizitätsmusters der Verbindungen **36** und **37** wurde mit einem Vergleich der *Standard Agents Database* und der *Synthetic Agents Database* des NCI durchgeführt. Eine sehr schwache Korrelation (PCC ca. 0.5) konnte mit den bekannten alkylierenden Verbindungen Lomustin und Chlorambucil nachgewiesen werden. Eine bessere

Korrelation (PCC = 0.935) hat sich mit dem Diazepino[a]anthrachinon NSC 637717 erwiesen, dessen Target allerdings noch nicht bekannt ist (Abb. 7-15).

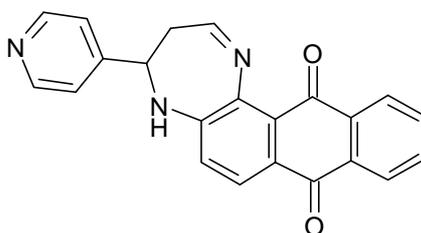


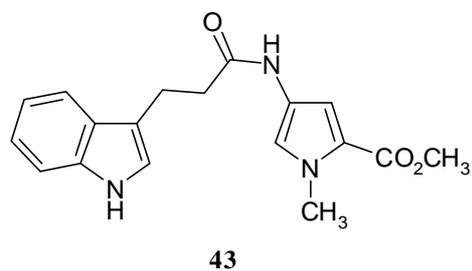
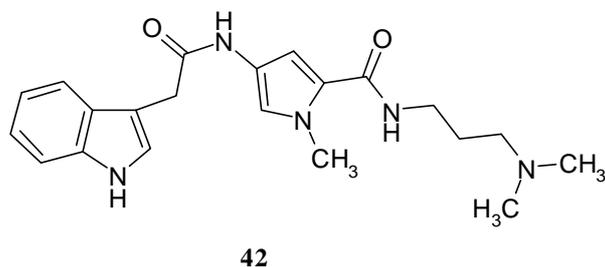
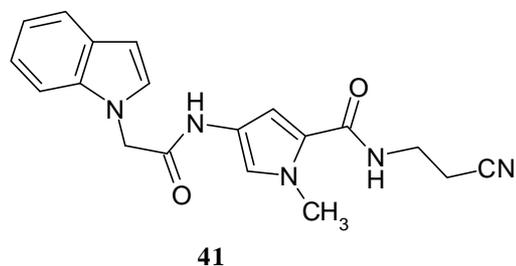
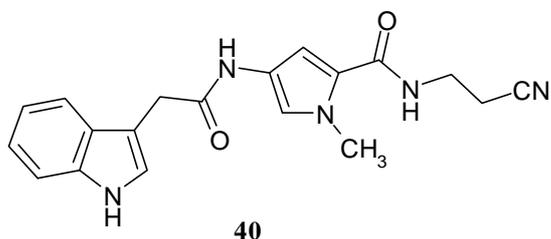
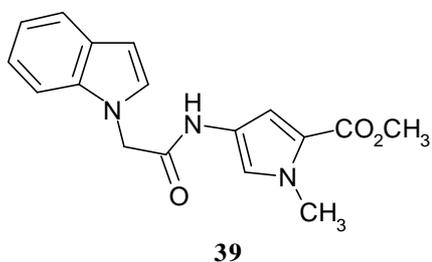
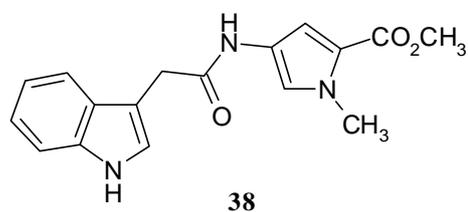
Abb. 7-15: Das anellierte Antrachinonderivat NSC 637717 aus dem *Synthetic Agents Database* des NCI.

7.2 Oligopyrrolcarboxamide und davon abgeleitete Combilexine

Combilexine sind als potentielle antitumoraktive Stoffe sehr interessant, denn sie verbinden die zytostatische Wirkung eines Interkalators mit der Sequenzselektivität eines Lexins (s. auch Kap. 2, S. 31). Im Rahmen der Forschung nach potentiellen Combilexinen als DNA-Liganden wurden mehrere Verbindungen im Arbeitskreis U. Pindur synthetisiert, in welchen verschiedene Chromophore mit Pyrrolketten unterschiedlicher Länge carboxamidisch gebunden wurden [260]. Ziel war unter anderem, die Effekte des chromophoren Teils und der Länge der Pyrrol-Kette, sowie der amidischen Brücke auf die DNA-Bindung und auf die zytotoxische Wirkung zu überprüfen. Als sogenannter chromophorer Teil wurden Indole, Carbazole und Thymin eingesetzt, während der „Lexin“-Teil aus einem bis drei Pyrrolen bestand. Weitere Variationen betrafen den *Linker*, der entweder aus einem Essig-, einem Propion- oder einem Buttersäureamidrest bestand. Zusätzlich wurde das Ende der Pyrrolkette mit einer Amino-, einer Ester- oder einer Cyanogruppe abgeschlossen. Um eine strukturelle Analyse durchführen zu können, wurden die synthetisierten Stoffe anhand des chromophoren Teils und der Pyrroleinheiten systematisch aufgeteilt.

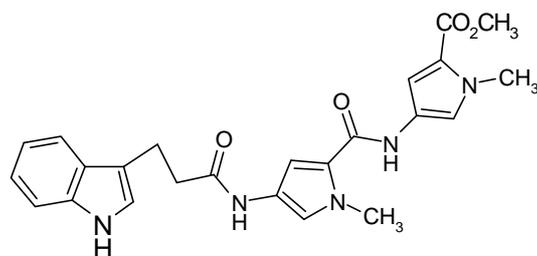
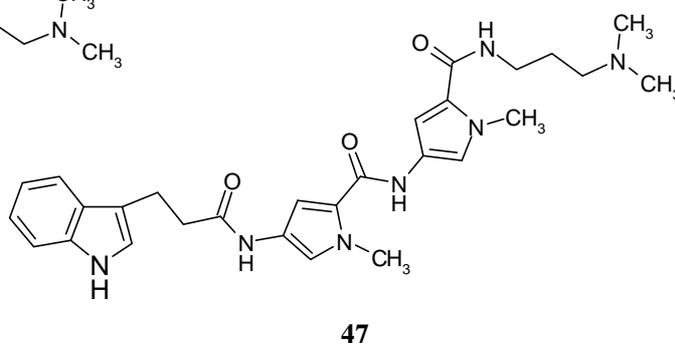
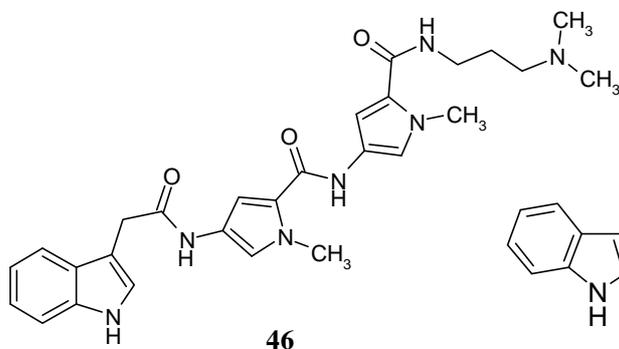
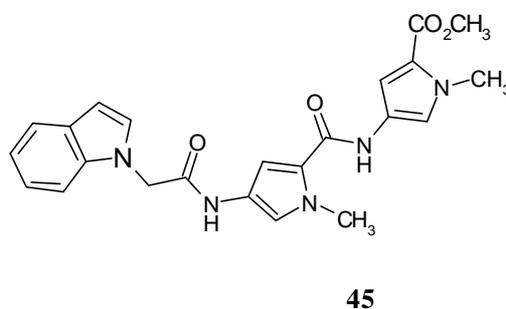
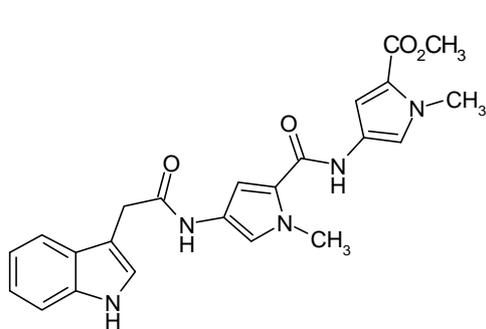
Indolderivate mit einer Monopyrrol-Kette:

4-{[2-(1*H*-3-Indolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **38**, 4-{[2-(1*H*-1-Indolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylate **39**, N2-(2-Cyanoethyl)-4-{[2-(1*H*-3-indolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **40**, N2-(2-Cyanoethyl)-4-{[2-(1*H*-1-indolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **41**, N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-{[2-(1*H*-3-indolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **42**, 4-{[3-(1*H*-3-Indolyl)propanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **43**



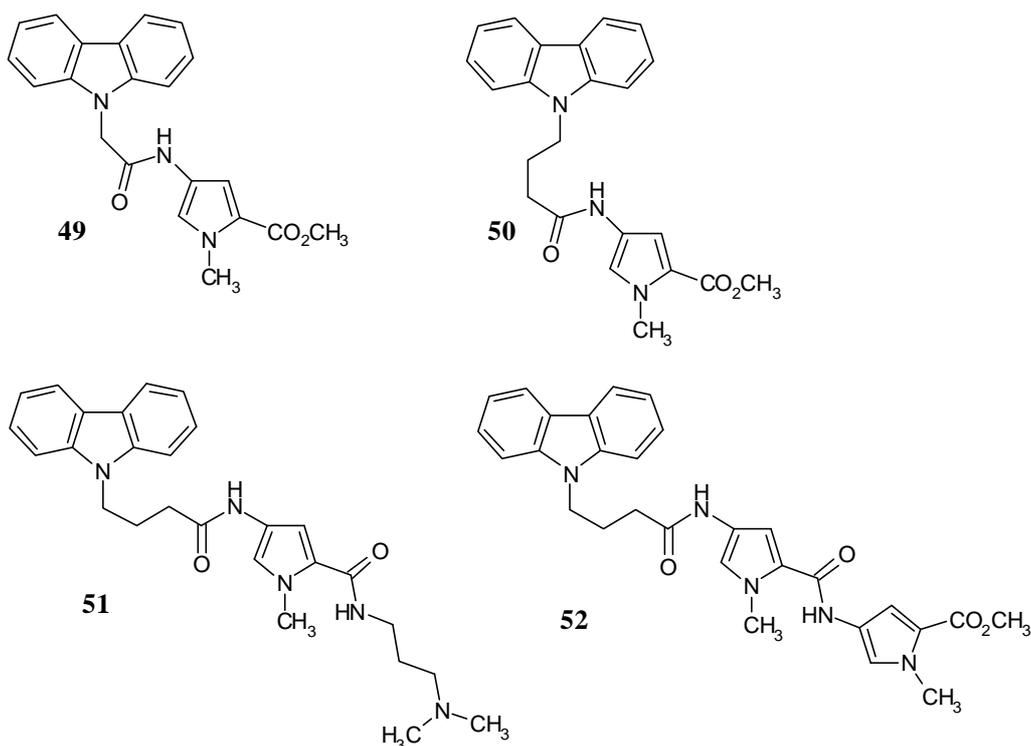
Indolderivate mit einer Bispyrrol-Kette

4-{{4-{{2-(1*H*-3-Indolyl)acetyl}amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrolyl)carbonyl}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **44**, 4-{{4-{{2-(1*H*-1-Indolyl)acetyl}amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrolyl)carbonyl}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **45**, N2-[5-{{3-(Dimethylamino)propyl}amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-4-{{2-(1*H*-3-indolyl)acetyl}amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **46**, N2-[5-{{3-(Dimethylamino)propyl}amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-4-{{3-(1*H*-3-indolyl)propanoyl}amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **47**, 4-[2-(4-{{3-(1*H*-Indolyl)propanoyl}amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrolyl)-2-oxoethyl]-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **48**



Carbazolderivate mit einer Mono- oder Bispyrrolkette

4-{[2-(9*H*-9-Carbazolyl)acetyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **49**, 4-[2-(4-{[4-(9*H*-9-Carbazolyl)butanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **50**, N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-{[4-(9*H*-9-carbazolyl)butanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **51**, 4-{-[4-(9*H*-Carbazolyl)butanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrolyl)-2-oxoethyl]-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **52**



Thyminderivate

1-Methyl-4-{[2-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino}-1*H*-2-pyrrol-methylcarboxylat **53**, N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{[2-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino}-1*H*-2-pyrrol-carboxamid **54**

{[(1-methyl-4-nitro-1H-2-pyrrol)carbonyl]amino}-1H-2-pyrrolyl)carbonyl]amino}-1H-2-pyrrol -methylcarboxylat **59**

7.2.1 Biologische Assays

In einem ersten Auswahlverfahren des NCI (USA) wurden die Verbindungen **38, 40, 43-45, 48, 49, 51, 52, 55, 59** für die Bestimmung der Zytotoxizität in drei empfindlichen Tumorzelllinien (*Preliminary Sreening*) ausgewählt. Wie in Tabelle 7-5 zusammengefaßt, zeigten Verbindungen **38, 44, 49, 51** und **59** eine richtungsweisende Zellwachstumshemmung und wurden deswegen auf 60 Zelllinien im *Primary Screening* weitergetestet.

Tabelle 7-5: Zellwachstumshemmende Aktivität der Verbindungen **38, 40, 43-45, 48, 49, 51, 52, 55, 59** bei den drei Zelllinien MCF-7 (Brustcarcinom), NCI-H460 (Lungencarcinom) und SF 268 (Gliom), als Zellwachstum in Prozent [239].

Verbindung 0.1 mM	Zellwachstumsprozent		
	NCI-H460 (Lungen)	MCF7 (Brust)	SF-268 (ZNS)
38^a	31	24	41
40	86	53	76
43	102	91	62
44^a	-2	12	23
45	109	90	93
48	113	86	83
49^a	14	31	7
51^a	10	13	36
52	93	84	96
55	104	74	97
59^a	14	62	59

^a: auf 60 Zelllinien weitergetestet

Die ersten Ergebnisse des *Primary Screening* auf 60 Zelllinien zeigten eine ausgeprägte Selektivität der zytotoxischen Wirkung von Verbindung **51** für die Linie HOP92 (*non-small*

cell lung cancer) und von Verbindung **59** für die Linie IGROV1 (*ovarian cancer*) (Tabelle 7-6) . Die durchschnittliche GI₅₀ hatte bei allen 60 Zelllinien aber einen zu hohen Wert, daher wurden die Verbindungen vom NCI nicht weiter getestet (siehe auch Kap. 6, S. 72).

Tabelle 7-6: Durchschnittliche GI₅₀-Werte und Selektivität der Verbindungen **51** und **59** als log₁₀ der molaren Konzentration im Vergleich mit dem Topoisomerase I-Hemmer Topotecan.

Verbindung	51	59	Topotecan
mean GI ₅₀	-4.52	-4.27	-7.2
GI ₅₀ HOP92	-5.67	-4.84	-6.94
GI ₅₀ IGROV1	-5.18	-7.83	-6.39

In weiteren Experimenten wurde nun versucht, eine Korrelation zwischen diesen biologischen Ergebnissen und der Wirkung der oben beschriebenen Stoffe auf molekularbiologischer und biophysikalischer Ebene zu finden. Als Vergleich wurden aber noch mehrere der vom NCI als inaktiv bezeichneten Verbindungen getestet und auch einige, die sich noch im NCI-Auswahlverfahren befinden.

7.2.2 Biophysikalische Methoden zur DNA-Wechselwirkung

7.2.2.1 T_m-Wert-Bestimmungen

Die DNA-Bindung der zytotoxisch aktiven Indolderivate **38** und **44** wurde zuerst über die Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA bestimmt. Beide Verbindungen verursachten keine Rechtsverschiebung des T_m-Wertes der DNA. Das läßt vermuten, daß die zytotoxische Wirkung nicht auf einer Wechselwirkung mit der DNA beruht, sondern sie muß mit einem anderen Mechanismus erklärt werden.

Die Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA wurde exemplarisch auch mit den Indolderivaten mit Dimethylaminopropylkette (**42**, **46** und **47**), die sich noch im Auswahlverfahren beim NCI befinden, durchgeführt. Verbindung **46** bzw. **47** zeigte eine Rechtsverschiebung der Schmelztemperatur des Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] mit einem ΔT_m-Wert von 8.4 ± 0.5 bzw. 10.4 ± 0.5 °C (vgl. Abb. 7-16 und Tabelle 7-7).

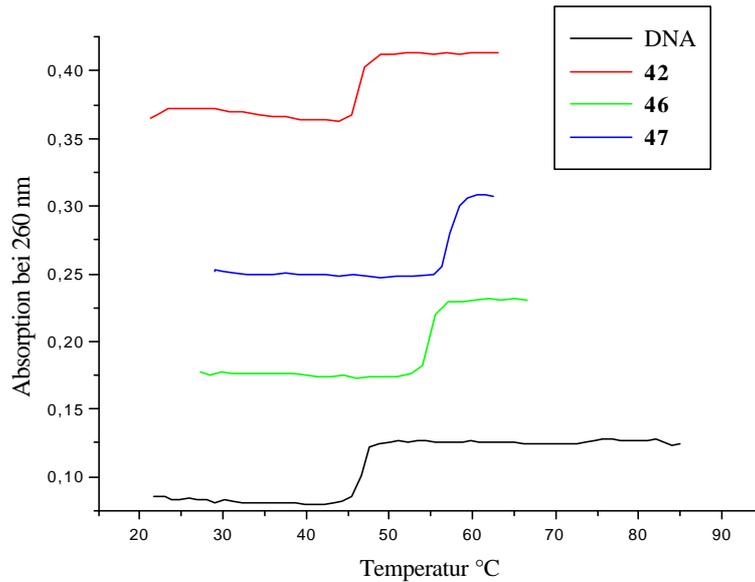


Abb. 7-16: Denaturierungskurven von reinem [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] und von [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit von Verbindung **42**, **46** und **47**.

Tabelle 7-7: Schmelztemperatur des Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Ab- und Anwesenheit der Verbindungen **42**, **46** und **47**.

	reine DNA	DNA + 42	DNA + 46	DNA + 47
T_m-Wert in °C	46.6 ± 0.5	46.6 ± 0.5	55.0 ± 0.5	57 ± 0.5

In der Vermutung, daß die DNA-Affinität durch die Dimethylaminopropyl-Kette verliehen sei, wurden weitere Verbindungen mit Dimethylaminopropyl-Ende synthetisiert und getestet. In Bezug auf die Carbazolderivate konnte keine DNA-Affinität nachgewiesen werden, weder bei dem Dimethylaminopropyl-substituierten **51**, noch bei den Verbindungen **49**, **50** und **52**. Das könnte daran liegen, daß bei Verbindung **51**, genau wie bei Verbindung **42**, die Seitenkette aus einer einzigen Pyrroleinheit besteht. Bei den Thyminderivaten **53** und **54** führte die Substitution des terminalen Methylesters mit dem Dimethylaminopropyl-Ende zu einer Verschiebung der Schmelztemperatur der DNA um ca. 7°C (vgl. Abb. 7-17 und Tabelle 7-8). Auch in diesem Fall bestand die Seitenkette aus zwei Pyrroleinheiten.

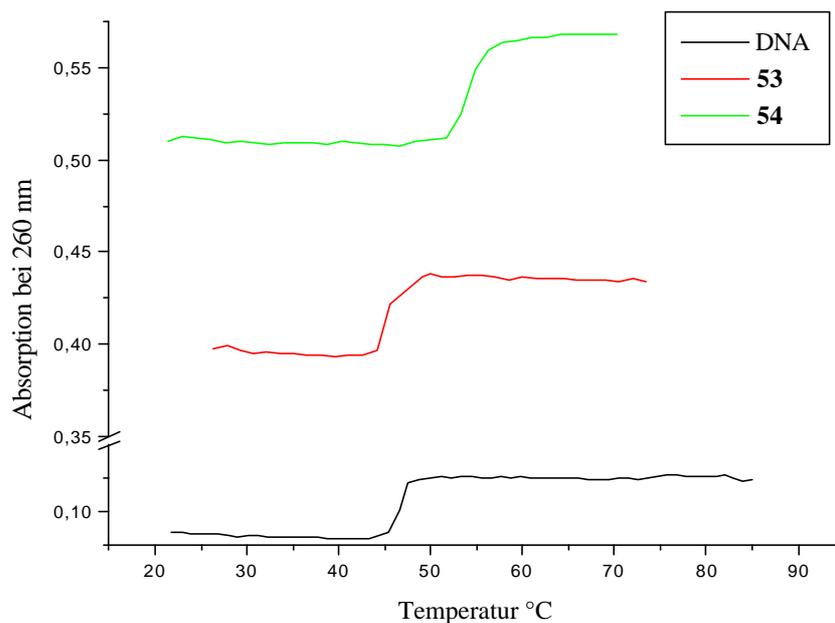


Abb. 7-17: Denaturierungskurven von reinem [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] und von [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit von Verbindung **53**, **54**.

Tabelle 7-8: Schmelztemperatur der DNA in Ab- und Anwesenheit von Verbindung **53** und **54**

	reine DNA	DNA + 53	DNA + 54
T_m-Wert in °C	46.6 ± 0.5	46.8 ± 0.5	54.0 ± 0.5

Um zu verifizieren, welche Rolle die Anzahl der Pyrroleinheiten bei der DNA-Bindung spielt, wurden die Effekte der terminalen Gruppe und der Pyrrolenanzahl auf die Doppelhelix-Stabilisierung bei den „Lexin“-Ketten untersucht. Weder Verbindung **57**, die zwei Pyrroleinheiten und ein Dimethylaminopropyl-Ende besitzt, noch Verbindung **59**, die drei Pyrroleinheiten und eine terminale Estergruppe enthält, zeigten eine Verschiebung auf höhere Temperaturen der Schmelztemperatur des Polynukleotids [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)]. Hingegen wies Verbindung **58** einen ΔT_m -Wert von 12.7 ± 0.5 °C auf (vgl. Abb. 7-18 und Tabelle 7-9).

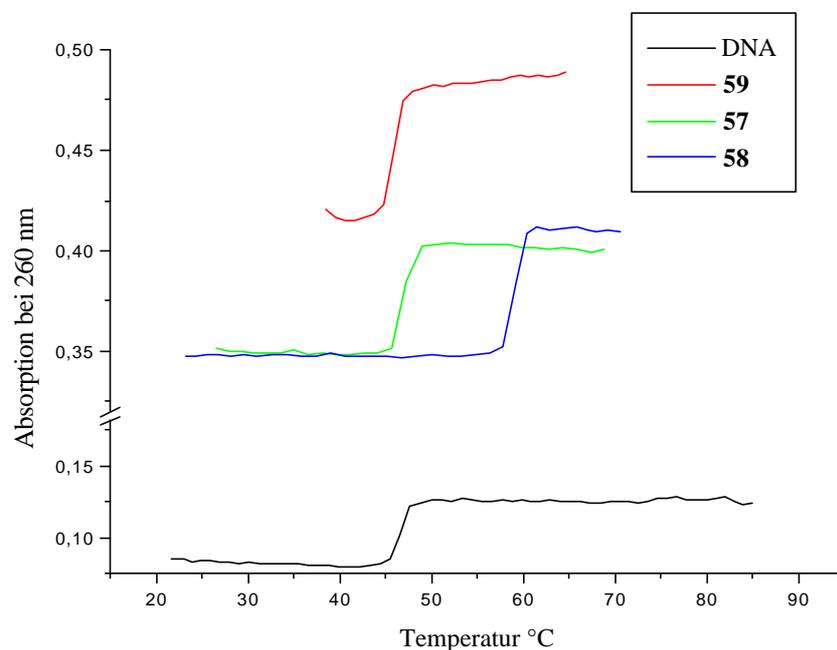


Abb. 7-18: Denaturierungskurven von reinem [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] und von [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit von Verbindung **57**, **58**, **59**.

Tabelle 7-9: Schmelztemperatur der DNA in Ab- und Anwesenheit von Verbindung **57**, **58**, **59**.

	reine DNA	DNA + 57	DNA + 58	DNA + 59
T_m-Wert in °C	46.6 ± 0.5	46.5 ± 0.5	59.3 ± 0.4	45.9 ± 0.5

Diese relativ hohe Rechtsverschiebung des T_m-Wertes der DNA bei Verbindung **58** scheint, auf der Acetylamo-Gruppe in Position 4 auf dem ersten Pyrrol zu beruhen, da die selbe Verbindung mit der Nitrogruppe an dieser Stelle keine DNA-Bindung zeigte.

7.2.2.2 Ethidumbromid-Verdrängungsassay

Die DNA-Bindung der zytotoxisch aktiven Verbindungen **38** und **44** wurde ebenfalls mit dem Ethidumbromid-Verdrängungsassay untersucht. In diesem Assay führte Verbindung **38** zu einer relativ starken Abnahme der Fluoreszenz, allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung. Verbindung **44** zeigte hingegen gut übereinstimmende Werte, aber eine viel schwächere Verdrängung des Ethidiums aus dem DNA-Komplex (Abb. 7-19). In beiden Fällen scheint die Fluoreszenzabnahme eher ein Effekt des Quenching zu sein als eine echte Bindung an die DNA.

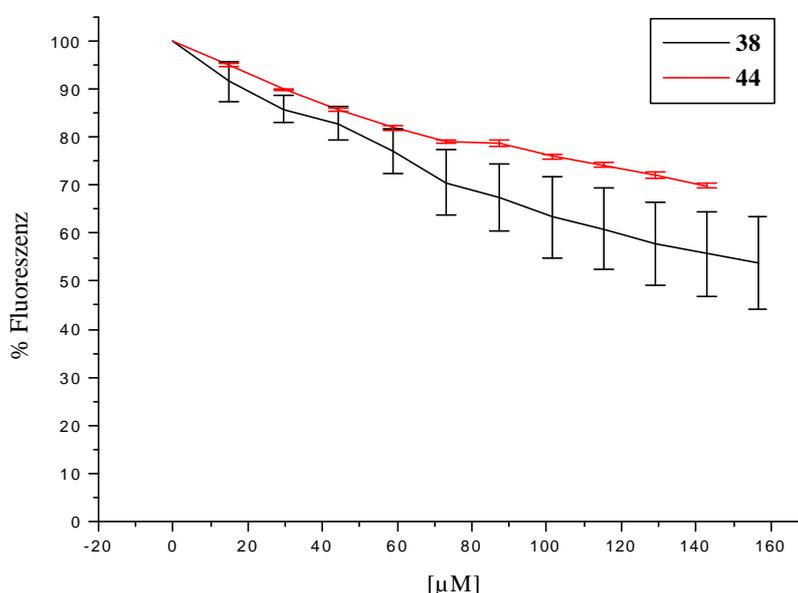


Abb. 7-19: Ethidumbromid-Verdrängungsassay von Verbindung **38** und Verbindung **44**.

Weitere Stoffe wurden exemplarisch getestet, um eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Denaturierungsexperimente und des Ethidumbromid-Verdrängungsassays zu suchen.

Die Bedeutung der Dimethylaminopropyl-Gruppe für die DNA-Affinität der Indolderivate konnte auch mit dieser Methode bestätigt werden. Verbindung **46** und Verbindung **47** zeigten eine deutlich höhere Fluoreszenzabnahme als die entsprechenden Methylester **44** und **48** (Abb. 7-20).

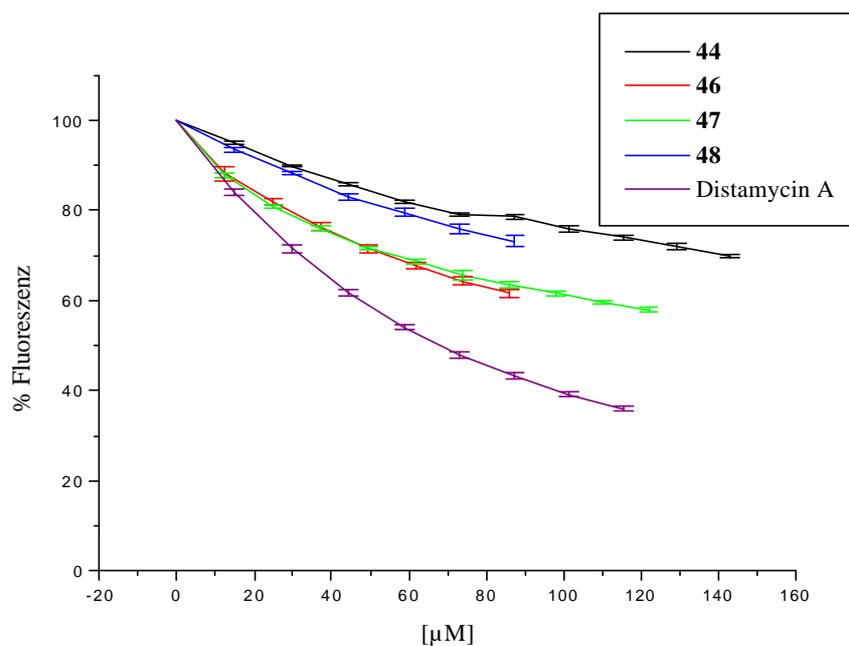


Abb. 7-20: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay der Verbindungen **44**, **46**, **47**, **48** und Distamycin A als Vergleich.

Dasselbe galt für die Thyminderivate **53** und **54** und für die Pyrrolketten **56** und **58** (Abb. 7-21 und Abb. 7-22).

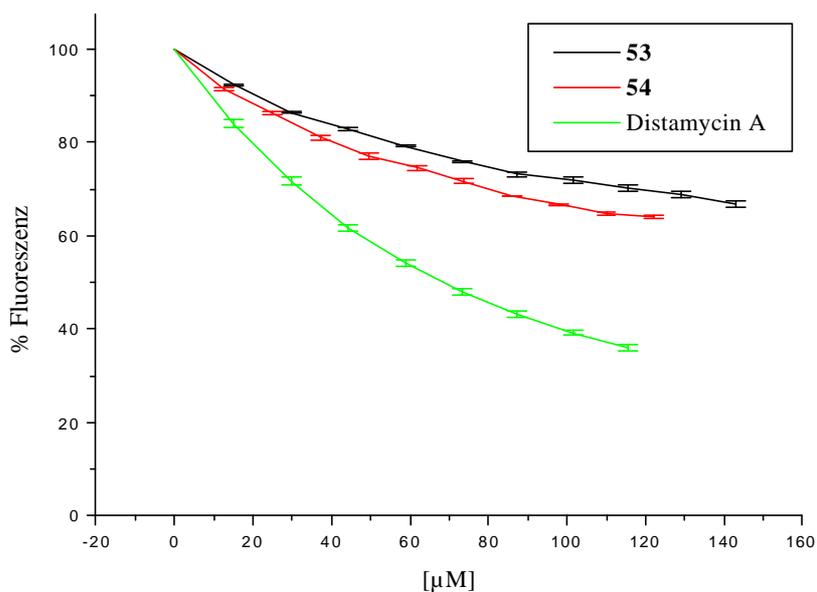


Abb. 7-21: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Verbindung **53** und **54** in Vergleich mit Distamycin A.

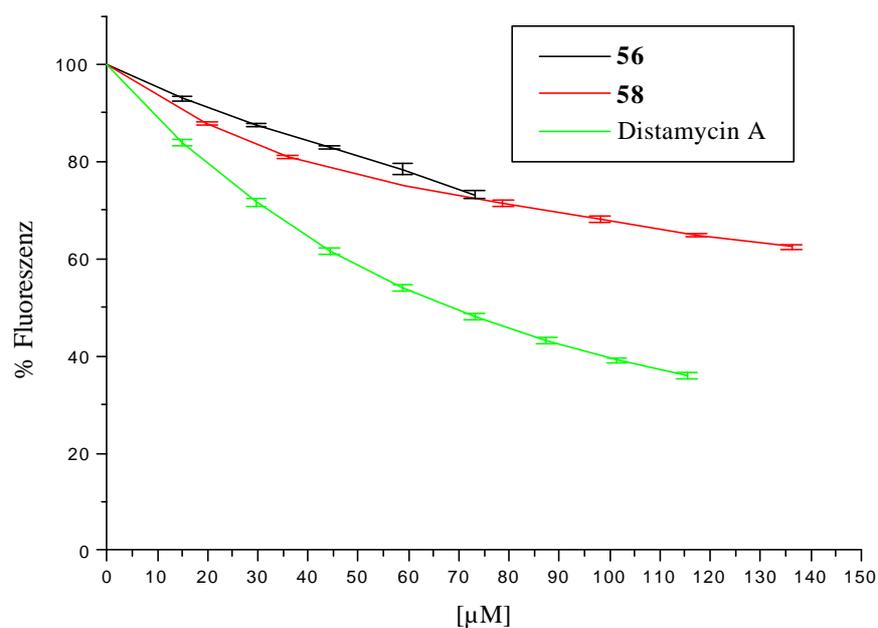


Abb. 7-22: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Verbindung **56** und **58** in Vergleich mit Distamycin A.

In allen Fällen führte die Substitution der Ester- mit der Aminogruppe zu einer Verbesserung der DNA-Affinität. Die Verdrängung des Ethidiums aus seinem Komplex mit der DNA korrelierte aber nicht mit der Helixstabilisierung in den Denaturierungsexperimenten (Abb. 7-23).

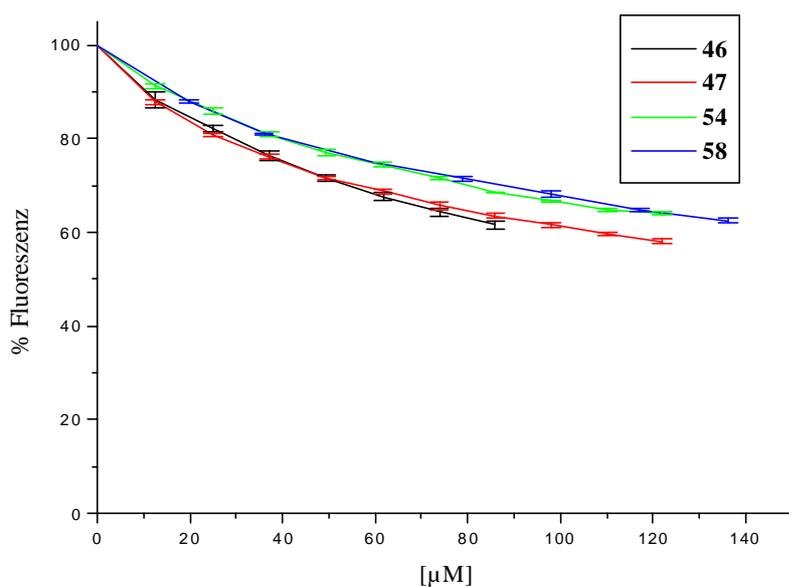


Abb. 7-23: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Verbindung **46**, **47**, **54** und **58**.

Das könnte daran liegen, daß sich die in den beiden Assays verwendete DNA in der Basenzusammensetzung unterscheidet. Während der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit Kalbsthymus-DNA durchgeführt wird, die ungefähr dieselbe Anzahl an AT- und CG-Basenpaaren enthält, wird bei den Denaturierungsexperimenten ein synthetisches Polynukleotid aus AT-Basenpaaren verwendet. Eine Substanz, die bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der DNA binden würde, würde bei gleicher DNA-Affinität eine höhere Rechtsverschiebung der Denaturierungskurve der DNA verursachen als eine Substanz, die keine AT-Selektivität zeigt.

7.2.3 Hemmung der Topoisomerase I

Da mit den im Kap. 4 aufgeführten Methoden keine Korrelation zwischen der zytotoxischen Aktivität einiger der von uns synthetisierten Verbindungen und deren DNA-Bindung bestimmt werden konnte, wurde die Hemmung der Topoisomerase I als mögliche Erklärung der Zytotoxizität näher untersucht.

Alle elf Verbindungen, die vom NCI für die Bestimmung der Zytotoxizität ausgewählt wurden (siehe Tabelle 7-5), wurden auf Hemmung der Topoisomerase I getestet. Alle bis auf Verbindung **38** und Verbindung **43** zeigten eine Hemmung der Topoisomerase I bei unterschiedlichen Konzentrationen (vgl. Tabelle 7-10).

Tabelle 7-10: Konzentration in μM der Verbindungen **40**, **44***, **45**, **48**, **49***, **51***, **52**, **55** und **59***, bei der eine Hemmung der Topoisomerase I mit der Methode b (vgl. Kap. 9, S. 126) nachweisbar ist.

Verbindung	40	44*	45	48	49*	51*	52	55	59*
Topo I Hemmung bei μM	20	20	20	5	5	20	50	50	5

*: vom NCI als zytotoxisch aktiv bezeichnet und in 60 Zelllinien weitergetestet.

Exemplarisch in Abb. 7-24 ist das Ergebnis eines solchen Assays für die Verbindungen **40**, **51** und **52** dargestellt. Eine Hemmung der Topoisomerase I ist in Spur 3 (Camptothecin), in Spur

5 (Verbindung **40**, 20 μ M), in Spur 9 (Verbindung **52**, 50 μ M) und in Spur 11 (Verbindung **51**, 20 μ M) zu erkennen.

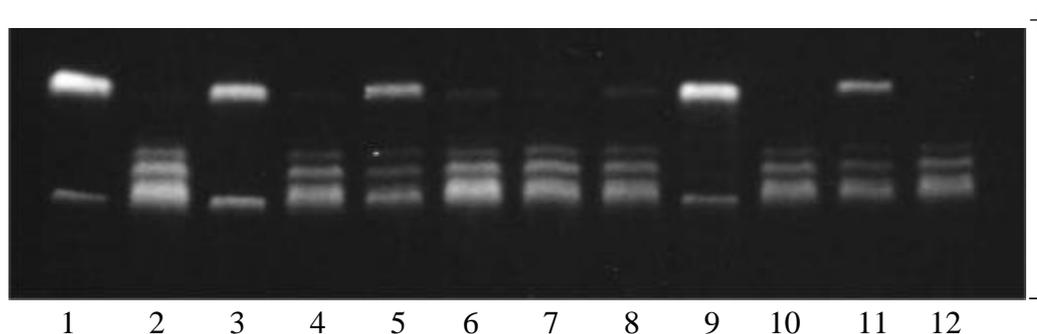


Abb. 7-24: Elektropherogramm nach dem Topoisomerase I-Hemmungsassay nach Methode b (vgl. Kap.9, S. 126) für die Verbindungen **40**, **51** und **52**; Spur 1: scDNA; Spur 2: relaxierte DNA (mit Topoisomerase I behandelt); Spur 3: Camptothecin 100 μ M; Spur 4, 5, 6: **40**; Spur 7, 8, 9: **52**; Spur 10, 11, 12: **51**. Alle drei Verbindungen in 5-20-50 μ M Konzentration getestet.

Vier der fünf Substanzen, die vom NCI als zytotoxisch aktiv bezeichnet wurden, zeigten auch eine Hemmung der Topoisomerase I. Besonders interessant scheint Verbindung **59**. Dieses Tris-Pyrrolcarboxamid zeigte eine selektive Tumorwachstumshemmung der Ovarkrebs-Zelllinie IGROV1 und eine Hemmung der Topoisomerase I schon bei 5 μ M. Diese zwei Eigenschaften der Verbindung **59** könnten in Korrelation miteinander stehen, denn einige Ovarkrebs-Zelllinien zeigen eine Überexprimierung von Topoisomerase I [91, 92, 261].

Die Topoisomerase I-Hemmung einiger der Verbindungen, die sich noch im Auswahlverfahren beim NCI befinden, wurde auch exemplarisch untersucht. Das Ergebnis der Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung der Verbindungen **42**, **46**, **47**, **54** und **58** – die Derivate mit terminaler Dimethylaminopropylkette – ist in Abb. 7-25 dargestellt.

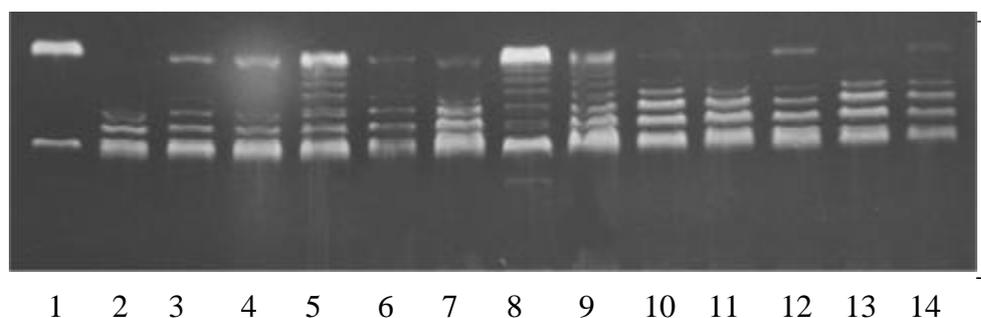


Abb. 7-25: Elektropherogramm nach dem Topoisomerase I-Hemmungsassay nach Methode b (vgl. Kap. 8) für die Verbindungen **42**, **46**, **47**, **54** und **58**; Spur 1: scDNA; Spur 2: relaxierte

DNA (mit Topoisomerase I behandelt); Spur 3, 4: Camptothecin; Spur 5, 6: **42**; Spur 7, 8: **46**; Spur 9, 10: **47**; Spur 11, 12: **54**; Spur 13, 14: **58**. Alle Verbindungen in Konzentration von 5-50 μM getestet.

Die Verbindung **42** in Konzentration von 5 μM , Verbindung **46** in Konzentration von 50 μM , Verbindung **47** in Konzentration von 5 μM und Verbindung **54** in Konzentration von 50 μM zeigen eine Hemmung der Topoisomerase I (Tabelle 7-11)

Tabelle 7-11: Konzentration in μM der Verbindungen **42**, **46**, **47** und **54**, bei der eine Hemmung der Topoisomerase I mit der Methode b (vgl. Kap. 9, S. 126) nachweisbar ist.

Verbindung	42	46	47	54
Topo I Hemmung bei [μM]	5	50	5	50

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist anzunehmen, daß diese Verbindungen eine zytotoxische Wirkung aufweisen könnten. Leider stehen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung noch nicht zur Verfügung.

7.2.4 Hemmung der Topoisomerase II

Einige der neu synthetisierten Oligopyrrol-carboxamide wurden im Arbeitskreis von Prof. C. Bailly auf Hemmung der Topoisomerase II untersucht (s. SS. 53, 64 und 69). Die exemplarisch getesteten Verbindungen **48-52** und **59** zeigten keine deutliche Hemmung der Topoisomerase II.

7.2.5 Footprinting-Assay

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. C. Bailly konnten einige Oligopyrrolcarboxamid-Derivate einer *Footprinting*-Analyse unterworfen werden (s. SS. 53, 64 und 69). In Einklang mit den Ergebnissen der Denaturierungsexperimente ließ sich für

keine der exemplarisch getesteten Verbindungen **50-52** eine sequenzselektive DNA-Bindung nachweisen.

7.2.6 Bilanz

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen bezüglich DNA-Affinität und Topoisomerase-Hemmung der Oligopyrrolcarboxamid-Derivate konnten folgende Basis-Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammengefasst werden.

Für eine Wechselwirkung mit der DNA scheinen die terminale Dimethylaminopropyl-Gruppe und eine Pyrrolkette aus mindestens zwei Einheiten essentiell zu sein (Verbindungen **46, 47, 54** und **58**). Fast alle neu synthetisierten Oligopyrrol-Carboxamide – Verbindung **40, 42, 44-49, 51, 52, 54-56, 59** – zeigten eine Hemmung der Topoisomerase I. Vermutlich handelt es sich dabei um eine unspezifische Hemmung, denn die Verbindungen wiesen eine hohe Struktur-Heterogenität auf.

Darüber hinaus ist mindestens eine partielle Korrelation zwischen der Zytotoxizität in dem NCI-Antitumor-Screening und der Topoisomerase I-Hemmung zu finden (Verbindungen **44, 49, 51** und **59**). Eine eventuelle Korrelation zwischen DNA-Bindung und Zytotoxizität wird weiter untersucht.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Einleitung und Ziel

Im Rahmen der gezielten Suche nach neuen Leitstrukturen mit antitumorale Wirkung werden im Arbeitskreis U. Pindur seit Jahren verschiedene Strukturvarianten der Indol-, Carbazol und Pyrrol-Reihe studiert [2, 23, 26, 41, 48, 130-132, 205, 206, 247-256].

Ausgehend von Ellipticin, Amsacrin und Mitoxantron, und von den Naturstoffen Rebeccamycin und Staurosporin, deren Aktivität eine interkalative Bindung in der DNA und/oder eine Hemmung der Topoisomerase bzw. der Proteinkinase C zu Grunde liegen, wurden mehrere substituierte und/oder anellierte Indol- und Carbazolderivate synthetisiert. Diese sollten durch ihre planare Struktur in der Lage sein, in die DNA zu interkalieren. Mit dem Ziel, potentielle Interkalatoren mit höherer Affinität für die DNA zu finden, wurde dann dieses Gebiet auf die Bisinterkalatoren ausgeweitet. Das führte u.a. zur Synthese von Biscarbazolderivaten mit unterschiedlichen Linkern. Darüber hinaus beschreibt die Literatur [74, 77, 78] die DNA-Bindung von Hybridmolekülen, wie z.B. NetAmsa und Combilexinen. Diese werden im Arbeitskreis U. Pindur zur Zeit auch näher studiert.

Durch die Vielzahl neu synthetisierter Verbindungen war es erforderlich, geeignete Screening-Verfahren für die Routineanalyse zu etablieren, die möglichst früh vielversprechende Substanzen detektieren können. Biologische und strukturelle Eigenschaften der Chemotherapeutika, die aktuell in der Krebstherapie eingesetzt werden und/oder sich in klinischen Studien befinden, zeigen, daß zwei bedeutsame Targets der antitumoralen Wirkstoffe die DNA und die Topoisomerase I sind. Demzufolge war es das Kernziel dieser Arbeit, in erster Linie Assay-Verfahren zu studieren und neu zu etablieren, die eine Wechselwirkung von neu-synthetisierten Verbindungen mit diesen Targets nachweisen könnten. Literaturbekannte Verfahren zur Bestimmung von Wechselwirkungen mit der DNA, wie die Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur und der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, sollten neu aufgebaut werden und hinsichtlich ihrer Aussagekraft validiert und miteinander verglichen. Weitere Assays zur Bestimmung der Wechselwirkungen mit den Topoisomerasen sollten neu etabliert und für die Routineanwendung optimiert werden. Dabei wurden als Testverbindungen neben bekannten Standard-Wirkstoffen neu synthetisierte Indol-, Carbazol- und Oligopyrrolcarboxamid-Derivate eingesetzt, deren Struktur-Aktivitätsbeziehungen studiert werden sollten.

8.2 Eingesetzte Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Assay-Verfahren neu etabliert und für die Routineanwendung optimiert: die Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur, der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, der Unwinding-Assay und die Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung.

Für die Bestimmung der Wechselwirkungen der Verbindungen mit der DNA haben sich in der Arbeit die DNA-Denaturierungsexperimente und der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay als hilfreiche Methoden bewährt.

Mit Hilfe der DNA-Denaturierungsexperimente werden Wechselwirkungen eines Liganden mit der DNA über die Stabilisierung der Doppelhelix bestimmt. Durch die DNA-Bindung kommt es zu einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur der DNA, die man über UV-Absorption detektieren kann (s. S. 51). Eine Problematik solcher sonst einfacher Bestimmungen besteht in der Löslichkeit der Testverbindungen, die meist lipophil sind, während die Messung in wässriger Pufferlösung durchgeführt wird. Wichtig ist auch, daß die Testverbindungen keine UV-Absorption in dem Wellenlängenbereich $\lambda = 250\text{-}280$ nm aufweisen, denn das würde die Absorption der DNA bei $\lambda = 260$ nm maskieren.

Diese zwei Bedingungen müssen auch bei dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay an der DNA erfüllt werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine fluorimetrische Titration, in der die Fluoreszenzabnahme des Komplexes zwischen Ethidiumbromid und DNA nach Zugabe einer DNA-bindenden Testsubstanz gemessen wird (s. S. 54). Wieder erfolgt die Bestimmung im wässrigen Milieu, in dem die meist lipophilen Liganden oft nicht gut löslich sind. Außerdem sollen die Testverbindungen im Bereich $\lambda = 500\text{-}600$ nm weder absorbieren noch fluoreszieren, denn das Ethidiumbromid wird in dem Assay bei $\lambda = 545$ nm angeregt und bei $\lambda = 595$ nm wird die Fluoreszenz gemessen.

Während die DNA-Denaturierungsexperimente eine direkte einfache Bestimmung der DNA-Affinität der Testsubstanzen erlauben, werden die Ergebnisse vom Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von vielen Parametern beeinflusst. Ein direkter Vergleich der DNA-Affinität von Ethidium und Ligand, was dem Assay zu Grunde liegt, ist nur dann möglich, wenn die Bindungsmodi des interkalierenden Farbstoffes und der Testverbindung gleich sind. Das ist oft nicht der Fall. Außerdem kann die Fluoreszenzabnahme nicht nur eine Folge der Verdrängung von Ethidium aus seinem Komplex mit der DNA sein, sondern auch, in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen, ein Ergebnis von Quenching-Effekten. Trotz dieser

Problematik erhält man mit diesen zwei Methoden einen Hinweis auf die Fähigkeit neuer Verbindungen, mit der DNA zu wechselwirken.

Für die Bestimmung der Art der Wechselwirkung, vor allem Interkalation oder Bindung in den Rinnen konnte der Unwinding-Assay erfolgreich etabliert und angewandt werden (s. S. 60). Mit dieser Methode werden die Effekte der Topoisomerase I auf den topologischen Zustand einer ringförmigen, geschlossenen DNA unter Einfluß der Testverbindung bestimmt, die selbstverständlich keine hemmende Aktivität auf das Enzym zeigen darf.

Wegen dieser Voraussetzung für den Unwinding-Assay und auf Grund der großen Bedeutung der Topoisomerase I als Target in der Krebstherapie wurde ein Assay für die Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung etabliert. Beide Assays sollten parallel durchgeführt werden. Für viele der synthetisierten Stoffe war leider keine Aussage über den Bindungsmodus möglich, denn sie hemmten die Topoisomerase I.

Mit diesen vier Methoden, die mit Hilfe neuer Synthesesubstanzen und bekannter Standard-Cytostatika in dieser Arbeit aufgebaut, validiert und optimiert wurden, und mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsbestimmung, die im *National Cancer Institute* durchgeführt wurde, sollten nun erste Basisinformationen zum zukünftigen Aufbau von Struktur-Wirkungsbeziehungen der im Arbeitskreis U. Pindur synthetisierten Verbindungen geliefert werden.

8.3 Ergebnisse zu den getesteten Verbindungen

Die Anwendung der oben beschriebenen Verfahren ermöglichte in der Tat eine systematische Analyse der neuen Verbindungen bezüglich DNA-Wechselwirkung und Topoisomerase I-Hemmung. Die Kernergebnisse dieser Experimente sollen in Folge zusammen mit den Ergebnissen des NCI-Zytotoxizitäts-Screening nach Stoffgruppen geordnet und resümiert werden.

Für die 27 substituierten und/oder anellierten Indol- und Carbazolderivate konnte mit dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und den Denaturierungsexperimenten keine oder nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit der DNA festgestellt werden.

Die richtungsweisenden Zytotoxizitätsdaten der Oxocarbazole **3** und **23** veranlaßten die Durchführung weiterer Experimente, um den potentiellen Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen zu erklären. Mit dem Topoisomerase I-Hemmungsassay zeigten diese

Carbazole eine Inaktivierung des Enzyms bei einer Konzentration von 10-100 μ M. Die gleiche Wirkung wurde auch für die Verbindung **24** dieser Reihe nachgewiesen. Dadurch konnte für diese Stoffe der Unwinding-Assay nur (falsch) negative Ergebnisse liefern, denn die Enzymaktivität ist für die Durchführung dieses Assays notwendig.

Die schwerwiegenden Löslichkeitsprobleme bei den Biscarbazolen **28-35** verhinderten leider weitere DNA-Bindungsstudien dieser Stoffe als potentielle Bisinterkalatoren. Die ausgeprägte zytotoxische Aktivität von Verbindung **31** im NCI-Antitumor-Screening-Verfahren konnte auch nicht mit einer Hemmung der Topoisomerase I erklärt werden, denn der Assay fiel negativ aus.

Die Indolocarbazole **36** und **37** lieferten besonders interessante Ergebnisse im NCI-Screening-Verfahren, denn sie zeigten neben einer ausgeprägten Zytotoxizität eine Hemmung der Proteinkinase C_{α} . *Molecular Modelling*-Studien dieser Verbindungen konnten eine Interaktion dieser Stoffe mit den Proteinkinasen voraussagen und zeigten auch die Möglichkeit einer interkalativen Wechselwirkung mit der DNA. Leider konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden keine Wechselwirkung mit der DNA nachgewiesen werden. Jedoch zeigten beide Verbindungen eine Hemmung der Topoisomerase I. Zwei Arbeitshypothesen wurden im Bezug auf den Mechanismus der Topoisomerase I-Hemmung für die Indolocarbazole **36** und **37** angenommen: Diese Stoffe könnten direkte Hemmer des Enzyms sein, oder wie das Alkaloid Rebeccamycin zur Bildung des *Cleavable Complex* führen. Eine Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung mit dem *Cleavage Assay* mit linearer DNA könnte diesen Tatbestand klären, denn mit dieser weiterführenden Methode ist eine Bestimmung der Entstehung des *Cleavable Complex* möglich (s. S. 69).

Anschließend wurden 22 Verbindungen der Pyrrolcarboxamid-Reihe als potentielle DNA-Rinnenbinder bzw. Combilexine getestet, die als Abwandlung der Leitstrukturen Distamycin A und Netropsin im Arbeitskreis U. Pindur synthetisiert wurden. Fünf dieser Stoffe – **38, 44, 49, 51, 59** – zeigten eine Hemmung des Zellwachstums im NCI-Antitumor-Screening, zum Teil mit einer deutlichen Selektivität (Verbindung **51** für die Lungenkrebs-Zelllinie HOP92, Verbindung **59** für die Ovarkrebs-Zelllinie IGROV1). Weitere Verbindungen befinden sich noch im Auswahl- bzw. Screening-Verfahren beim NCI. Interessanterweise konnte für vier der fünf zytotoxisch aktiven Pyrrolcarboxamide – **44, 48, 51, 59** – eine Hemmung der

Topoisomerase I nachgewiesen werden. Für keine von ihnen war aber eine Wechselwirkung mit der DNA feststellbar. Eine DNA-Bindung zeigten hingegen die dimethylaminopropyl-substituierten Pyrrolcarboxamide **46**, **47**, **54** und **58**, bei welchen ein ΔT_m -Wert von bis zu ca. 12°C bestimmt wurde. Die Bedeutung der Dimethylaminopropyl-Kette bei der DNA-Bindung wurde auch mit dem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay bestätigt. Hier konnte für analoge Verbindungen eine Erhöhung der Fluoreszenzabnahme bei der Substitution mit der Dimethylaminopropyl-Gruppe festgestellt werden. Mit den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden konnte aus technischen Gründen für keine der Pyrrolcarboxamid-Derivate eine Interkalation in die DNA nachgewiesen werden, denn bei den meisten Verbindungen war eine Hemmung der Topoisomerase I vorhanden. Auf Grund der parallelen Hemmung der Topoisomerase I und DNA-Bindung bei den Verbindungen **46**, **47** und **54** wurde die Hypothese angenommen, daß diese Stoffe die Bindung des Enzyms an die DNA hemmen könnten, wie bei den Leitstrukturen Distamycin A und Netropsin (s. S. 48 und [71]).

8.4 Bilanz der Ergebnisse und Vorschläge für zukünftige Molekülprofilierungen

Aus der Analyse der Problematik bei der Durchführung der Assays zur Bestimmung der Wechselwirkungen mit der DNA und der damit ermittelten Ergebnisse haben sich folgendes als besonders wichtig herausgestellt: Sehr lipophile Stoffe können mit vielen Methoden nicht untersucht werden, denn die meisten Assays werden in wäßrigem Puffer durchgeführt. Eine sehr gute Lösung dieses Problems ist das Einfügen von protonierbaren und wasserlöslichen Substituenten (s. u.a. die Verbindungen **38-59**). Man erreicht dadurch nicht nur eine bessere Wasserlöslichkeit, sondern erhöht auch die Möglichkeit von Wechselwirkungen mit dem anionischen Phosphatgerüst der DNA. Protonierbare und wasserstoffbrückenbindungsfähige Seitengruppen sind auch für die Interkalation wichtig: eine planare hydrophobe Region aus zwei oder mehr anellierten aromatischen Ringen ist zwar eine Voraussetzung für die Interkalation, aber in vielen Fällen nicht ausreichend (s. u.a. die Verbindungen **3-27**).

Die Bestimmung der Interkalation mit dem Unwinding-Assay kann nur bei Substanzen erfolgen, die keine Hemmung der Topoisomerase I zeigen. Dadurch ist die Anwendung dieser Methode sehr eingeschränkt, denn viele DNA-bindende Stoffe besitzen diese Eigenschaft.

In Hinblick auf Struktur-Wirkungsbeziehungen der neu synthetisierten Verbindungen konnten ausgehend von den bisherigen Ergebnissen erste vororientierende Korrelationen zwischen den verschiedenen Assay-Daten aufgestellt werden. Allerdings konnte auf Grund der

Heterogenität der rationalen Hintergründe der Testverfahren und der Heterogenität der untersuchten Stoffgruppen noch kein einheitliches weiterführendes Strukturkonzept erarbeitet werden. Lediglich bei den Pyrrolcarboxamid-Derivaten konnte unter Berücksichtigung folgender Informationen eine weitergehende Strukturoptimierung vorgenommen werden.

Eine terminale Dimethylaminopropyl-Gruppe ist für die Bindung an die DNA essentiell, aber nicht genügend (s. Verbindungen **42** und **51**). Weiterhin sind mindestens zwei Pyrroleinheiten bzw. drei amidische Gruppen bei den lexin-ähnlichen Pyrrolcarboxamid-Ketten erforderlich, um eine Wechselwirkung mit der DNA zu erreichen (s. Verbindungen **46, 47, 54, 58**).

Der interkalierende Teil der als potentielle Combilexine entwickelten Oligopyrrolcarboxamid-Derivate sollte eine große Affinität zur DNA aufweisen, sonst scheint dieser Strukturabschnitt eher einen sterischen Störeffekt bei der Bindung in die Rinnen der Seitenkette hervorzurufen (s. Verbindungen **46, 58**).

Eine Analyse der erforderlichen strukturellen Eigenschaften für die Wechselwirkung mit der Topoisomerase I war nicht möglich, denn Testverbindungen unterschiedlichster Struktur haben eine Hemmung dieses Enzyms gezeigt. Weiterhin ist keine Korrelation zwischen der DNA-Affinität und der Fähigkeit zur Hemmung der Topo I festzustellen. Dennoch konnte die zytotoxische Wirkung bei einer Vielzahl von Verbindungen mit einer Hemmung der Topoisomerase I erklärt werden (s. Verbindungen **23, 36, 37, 44, 49, 51, 59**).

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse sollten nun weitere Verbindungen gezielter synthetisiert werden, deren Analyse mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren zur Aufklärung weiterer essentieller Punkte für die Wechselwirkung mit der DNA und den Topoisomerasen führen soll.

9 Experimenteller Teil

9.1 Angaben zu den verwendeten Geräten

9.1.1 Spektrophotometrische Methoden

9.1.1.1 Absorptionsspektroskopie

Für Bestimmungen der Absorption im UV-Vis-Bereich wurde das Hitachi-U-2000 Spektralphotometer mit folgenden Einstellungen verwendet:

Basislinie	speziell
Zeitkonstante	2 sec
Lampenwechsel	345 nm

Für die T_m -Bestimmungen wurde ein Hitachi-U-3200 Spektralphotometer verwendet, das an einen Thermostat von Julabo angeschlossen war. Die Temperatur in der Küvette wurde mit einem Thermistor gemessen, und die Spektrenaufnahme wurden mit dem Programm Meßwert (Dr. G. Schneider) darüber gesteuert. Folgende Parameter wurden eingestellt:

Baseline	standard
Scan speed	30.0 nm/min
Bandpass	1.00 nm
Response	slow

9.1.1.2 Fluoreszenzspektroskopie

Für die fluorimetrischen Bestimmungen wurde ein Hitachi-F-2000 Fluorescence Spectrophotometer verwendet. Für den Ethidiumbromid-Verdrängungsassay wurde das Programm *Photometry* mit *Intensity* als *Data Mode* benutzt, und folgende Parameter wurden eingestellt:

Wellenlänge	1
-------------	---

Test setup:	sample number	1
	λ_{ex}	545 nm
	λ_{em}	595 nm
	replicate	3
	initial delay	2 sec
	integration time	2 sec
Instrument setup:	response	0.5
	band pass	10 nm in excitation und emission
	PM voltage	700 V

9.1.2 Molekularbiologische Methoden

Für den Unwinding-Assay und für die Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung wurden folgende Geräte verwendet:

- für die Inkubation: Thermomix 1480 Wasserbad der Firma B.Braun
Trockenschrank der Firma Memmert
- für die Zentrifugation: Eppendorf 5415C Zentrifuge
- für die Gelelektrophorese: 14x15 cm Kammer von Fischer Biotec
GD 61D Sebia Power Supply
Transilluminator N90 (MW 312 nm) der Firma Konrad Benda
GelCam von Polaroid mit Schwarzweißfilmen vom Typ 667

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit einem Scanner der Firma Mustek und dem Programm für *Electrophoresis Analysis* der Firma Herolab auf Windows.

9.2 Reagenzien

9.2.1 Puffersysteme

- BPE-Puffer: 6 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.0 ± 0.2
- Puffer nach Boger: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 75 mM NaCl
- Puffer nach Baguley: 9.3mM NaCl, 2mM Natriumacetat-Puffer pH 5, 0.1mM EDTA

- TAE-Puffer (10x): 0.4 M Tris, 0.2 M Essigsäure, 0.01 M EDTA-Na₂, pH 8.5 ± 0.2 (Applichem)
- TBE-Puffer (10x): 0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 0.01 M EDTA-Na₂, pH 8.3 ± 0.2 (Applichem)
- TE-Puffer: 10 mM Tris (des gewünschten pH-Wertes), 1 mM EDTA, pH 8
- Tris-Glycin-Puffer (10x): 0.25 M Tris, 1.92 M Glycin, pH 8.3 ± 0.1 (Applichem)
- Tris-HCl 1 M (pH 7.4 ± 0.05) *stock solution* (Sigma)
- Topoisomerase I Reaktionspuffer (10x): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 30 µg/ml BSA (TopoGen)
- Topoisomerase II Reaktionspuffer (10x): 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 60 mM KCl, 10 mM MgCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 30 µg/ml BSA, 1 mM ATP (TopoGen)

9.2.2 Molekularbiologisches Material

9.2.2.1 DNA

- *Calf thymus* DNA Type I, Sigma
- [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)], Amersham Pharmacia
- Plasmid DNA pUC 19, Invitrogen (ehem. GIBCO Life Technologies)

9.2.2.2 Enzyme

- *Calf thymus* Topoisomerase I, Invitrogen (ehem. GIBCO Life Technologies)
- Humane Topoisomerase I, TopoGen
- Humane Topoisomerase II, TopoGen
- Proteinase K, Roth

9.2.3 Referenzsubstanzen

Alle Referenzsubstanzen wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben.

- Amsacrin, Goedecke

- S-(+)-Camptothecin, Aldrich
- DAPI Dihydrochlorid, Aldrich
- Distamycin A Hydrochlorid, ICN
- Ellipticin, Fluka
- Hoechts 33258, Acros
- Mitoxantron Hydrochlorid, Lederle
- Netropsin Dihydrochlorid, Fluka

9.2.4 Testsubstanzen

Alle getesteten neuen Verbindungen wurden im Arbeitskreis U. Pindur, Universität Mainz, synthetisiert und gereinigt. Der Reinheitsgrad wurde mittels NMR- und Massenspektroskopie und chromatographisch bestimmt. Aus allen Stoffen wurden 5 mM-Stammlösungen in DMSO zubereitet, die den Versuchen entsprechend entweder mit DMSO oder Wasser weiter verdünnt wurden.

9.2.5 Sonstiges

- Absolutes Ethanol, Roth
- Agarose SeaKem LE, FMC BioProducts
- BSA Rinderserumalbumin, Sigma
- CIA-Lösung: Chloroform:Isoamylalkohol 24:1
- DMSO Micro Select für die Molekularbiologie, Fluka
- Ethidiumbromid-Lösung 1% w/v in Wasser, Applichem
- Isoamylalkohol für die Molekularbiologie, Sigma
- Phenol-Lösung wassergesättigt, Applichem
- SDS Natrium dodecylsulfat, Sigma

Das Wasser wurde über eine Millipore Anlage (Milli Q Plus) gereinigt.

9.3 Software

Data Analysis and Graphics Program *GraFit* der Firma GraphPad Software

Data Analysis and Technical Graphic Program *Origin* der Firma Microcal Software

Electrophoresis Analysis Program der Firma Herolab

Programm für die T_m -Bestimmungen *Meßwert* von Dr. G. Schneider

9.4 Versuchsdurchführung

9.4.1 Bestimmung der T_m -Werte

Die T_m -Werte von [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] in Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzen wurden in BPE-Puffer mit einem Verhältnis DNA:Testsubstanz = 1:1 bestimmt. Dafür wurde zuerst die DNA (10 units; 1u in 1ml H₂O gelöst ergibt eine A_{260} von 1) in 1 ml BPE-Puffer gelöst und die Absorption bei 260 nm wurde bestimmt, um die Konzentration zu berechnen. 50 µl der DNA-Stammlösung ad 1 ml mit BPE-Puffer verdünnt zeigten eine A_{260} von 0.52. Um Verdünnungs- und Streulichtfehler bei der Absorptionsbestimmung zu vermeiden, eignet sich eine Konzentration der Meßsubstanz, die zu einer Absorption von 0.1-0.2 führt. Bei unseren Versuchen wurde eine 20µM-Konzentration von [Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)] gewählt, die einer A_{260} von 0.12 entspricht [262]. Dementsprechend ergab sich folgendes Pipettierschema für die Erstellung der Proben zur T_m -Bestimmung:

	Konzentration der Testsubstanz-Stammlösung	
	3 mM	5 mM
BPE-Puffer	981.8 µl	984.5 µl
[Poly(dA-dT)·Poly(dA-dT)]-Stammlösung	11.5 µl	11.5 µl
Testsubstanz-Stammlösung	6.7 µl	4.0 µl

Die Absorption bei 260 nm der Lösung von DNA und Testverbindung wurde gegen BPE-Puffer gemessen. Dabei wurde bei jeder Temperaturerhöhung (1°, 1.5° oder 2°C-Schritte) die Absorption bei 260 nm aufgenommen und gegen die gemessene Temperatur in einem

Diagramm aufgetragen. Die erhaltene Schmelzkurve wurde mit Hilfe des Programms Origin® analysiert und die T_m -Werte wurden wie im Kapitel 4 beschrieben berechnet.

Für jede Testlösung wurden mindestens 2 Meßreihen durchgeführt und der Mittelwert wurde berechnet.

9.4.2 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Die Lösungen für den Ethidiumbromid-Verdrängungsassay wurden in Abhängigkeit der Löslichkeit der Testverbindungen in verschiedenen Puffern hergestellt. Routinemäßig wurde der Puffer nach Boger bei pH 7.4 verwendet [187]. Bei schwerlöslichen Verbindungen wurden die Messungen in einem saureren Puffer (Puffer nach Baguley, pH 5; [188]) durchgeführt. Zu einer Lösung von Ethidiumbromid ($5.0 \times 10^{-6}M$) in dem entsprechenden Puffer wurde Kalbsthymus-DNA ($1.0 \times 10^{-5}M$ in Basenpaaren) in kleinen Mengen zugegeben, bis ein Verhältnis von 2:1 zwischen DNA-Basenpaaren und Ethidium und ein Gesamtvolumen von 2ml erreicht wurde. Die Fluoreszenz der Lösung von reinem Ethidiumbromid wurde bei Raumtemperatur als 0% F und die der Lösung von Ethidiumbromid und DNA als 100% F festgelegt. Diese Lösung wurde dann mit 3 μ l-Aliquoten der Stammlösung der Testsubstanz (3mM in DMSO) titriert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur vor jeder Fluoreszenzaufnahme gerührt. Jede Fluoreszenzmessung wurde dreifach wiederholt und der Mittelwert wurde angegeben. Für jede Testverbindung wurden drei bis acht Lösungen angefertigt und gemessen.

9.4.3 Unwinding-Assay

Plasmid-DNA (pUC 19, GIBCO; 0.033 μ g/ μ l) wurde für 30 min. bei 37°C mit Topoisomerase I (GIBCO; 0.16 U/ μ l) in dem Reaktionspuffer für die Topoisomerase I-Relaxation inkubiert. Die erhaltene Mischung – in der relaxierte Plasmid-DNA vorliegt – wurde in 10 μ l-Aliquoten zu den Lösungen der Testverbindungen in verschiedenen Konzentrationen (10 und 100 μ M) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktionsmischung mit TE-Puffer (pH 7.9) versetzt und einer Phenolreinigung unterworfen. Sie wurde zweimal mit einer 1:1 Mischung von Phenol und CIA-Lösung (je 500 μ l) extrahiert und einmal mit reiner CIA-Lösung. Der Überstand wurde mit 65 μ l Natriumacetat (3M, pH 7) und mit 200 μ l abs. Ethanol

(99%; -20°C) versetzt und eine Stunde bei -20°C inkubiert. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das DNA-Pellet über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 20µl TE-Puffer gelöst, mit 2µl Auftragspuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Tris-Glycin-Puffer für 4 Stunden bei 55V durchgeführt.

9.4.4 Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung

9.4.4.1 Methode a

Plasmid-DNA (pUC 19, GIBCO; 0.033 µg/µl) wurde für 30min. bei 37°C mit Topoisomerase I (GIBCO; 0.16 U/µl) in dem Reaktionspuffer für die Topoisomerase I-Relaxation in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Testverbindungen inkubiert. Die DNA wurde dann wie bei dem Unwinding-Assay weiter behandelt und elektrophoretisch analysiert.

9.4.4.2 Methode b

Plasmid-DNA (pUC 19, GIBCO; 0.033 µg/µl) wurde für 15min. bei 35°C in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Testverbindungen (5, 20, 50µM) in dem Reaktionspuffer für die Topoisomerase I-Relaxation inkubiert, anschließend mit Topoisomerase I (TopoGen; 0.25 U/µl) versetzt, so daß ein Gesamtvolumen von 21µl erreicht wurde, und noch mal für 15' bei 35°C inkubiert. Die Reaktionsmischungen wurden nach folgendem Pipettierschema vorbereitet.

1. Vorbereitung des Master Mix

Gesamtvolumen: (Anzahl der Proben +1) x 18 µl
Davon (Anzahl der Proben +1) x 2 µl Puffer (10fach konzentriert)
(Anzahl der Proben +1) x 2 µl Plasmid DNA (0.25µg/µl)
mit Wasser auffüllen.

2. Vorbereitung der Reaktionsmischungen für die Inkubation

Jeweils 18µl des Master Mix wurden wie folgt versetzt:

- Die ersten zwei Proben mit 2µl Wasser

- Die restlichen Proben mit 2µl der Referenz- bzw. Testverbindung in der entsprechenden Konzentration, so daß eine Endkonzentration von 5, 20 oder 50µM erreicht wurde
- Nach 15min. Inkubation bei 35°C wurden alle Proben außer der ersten (scDNA als Vergleich) mit 1µl Topoisomerase versetzt

Jede Reaktion wurde nach der Inkubation mit einer 1:1 Mischung von SDS und Proteinase K behandelt, um die Reaktion zu stoppen und die Topoisomerase abzuspalten. Die erhaltene Lösung wurde mit 2µl Auftragspuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in TAE-Puffer bei 120V für 2 Stunden. In der ersten Probe liegt überspiralisierte Plasmid-DNA vor, in der zweiten relaxierte Plasmid-DNA und in den restlichen Proben ist der Effekt der Testverbindung zu beobachten.

9.4.5 Bestimmung der Topoisomerase II-Hemmung⁶

Die Bestimmung der Topoisomerase II-Hemmung erfolgte mit der selben Methode, wie die Bestimmung der Hemmung der Topoisomerase I (s. S. 126). Bei der Vorbereitung des Master Mix mußte man beachten, daß die Topoisomerase II ATP benötigt:

Vorbereitung des Master Mix

Gesamtvolumen:	(Anzahl der Proben +1) x 18 µl
Davon	(Anzahl der Proben +1) x 2 µl Puffer (10fach konzentriert)
	(Anzahl der Proben +1) x 0.2 µl ATP (Endkonz. 1mM)
	(Anzahl der Proben +1) x 2 µl Plasmid-DNA (0.25µg/µl)
	mit Wasser auffüllen.

Nach der Durchführung wie bei der Bestimmung der Topoisomerase I-Hemmung wurden die Reaktionen auf einem 1%igen Agarosegel mit EtdBr (4µg/ml) in TBE-Puffer gelelektrophoretisch analysiert (2 Std. bei 150V).

⁶ Dieser Assay wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. C. Bailly, Centre Oscar Lambret pour la Reserche sur le Cancer, Lille, Frankreich, durchgeführt

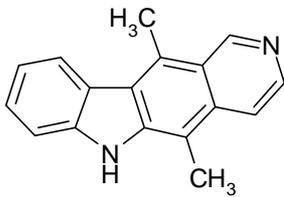
9.4.6 *Footprinting-Assay*⁷

Die *Footprinting*-Experimente wurden auf einem 117bp-langen *EcoRI-PvuII*-Restriktionsfragment aus pBS-Plasmid durchgeführt, das am 3'-Ende mit [α -³²P]dATP markiert wurde. Die markierte DNA (3 μ l \approx 500cps) wurde für 15min. bei Raumtemperatur mit 5 μ l Puffer (20mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, pH 7.3) inkubiert, in dem die gewünschte Konzentration der Testsubstanz enthalten war (Endkonzentration der Testverbindung: 5, 20, 50 μ M). Nach Zugabe von 2 μ l DNase I (Endkonzentration 0.01units/ml) wurde die Reaktion für weitere 3min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100 μ l Ethanol 99% (-20°C) versetzt. Die Lösung wurde für 5-10 min. bei 70°C gekühlt und 20min. bei 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde dann aufgesaugt und das DNA-Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Die Elektrophorese wurde auf Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (8% Acrylamid, 7M Harnstoff) für 60'-80' bei 65V durchgeführt. Das Gel wurde mit einer 10%igen Essigsäure-Lösung fixiert, auf Whatmann 3MM-Papier transferiert, bei 80°C Vakuum-getrocknet und mit einem Molecular Dynamics 425E PhosphorImager detektiert.

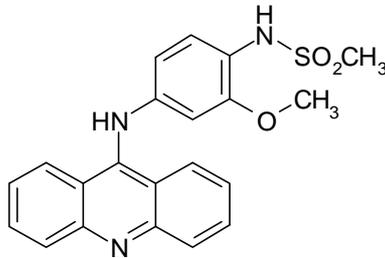
⁷ Dieser Assay wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. C. Bailly, Centre Oscar Lambret pour la Reserche sur le Cancer, Lille, Frankreich, durchgeführt

Formeln-Anhang

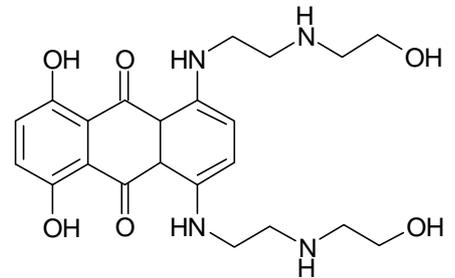
Häufig verwendete Referenz-Verbindungen



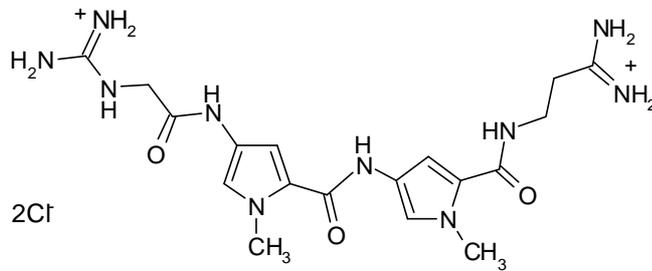
Ellipticin



Amsacrin

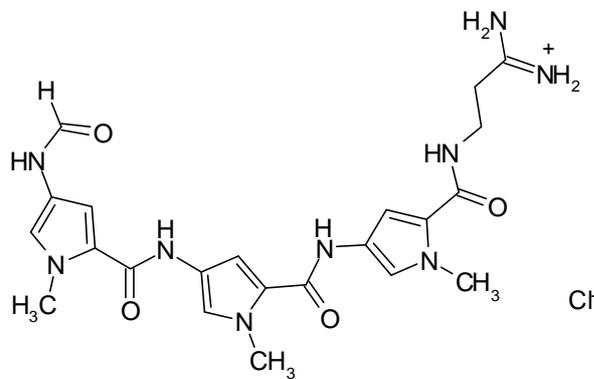


Mitoxantron



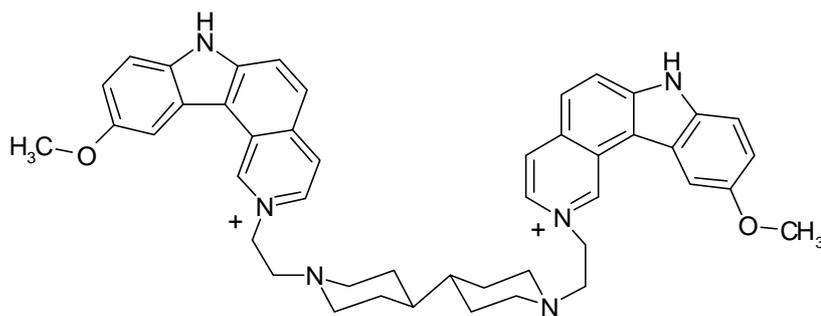
2Cl

Netropsin

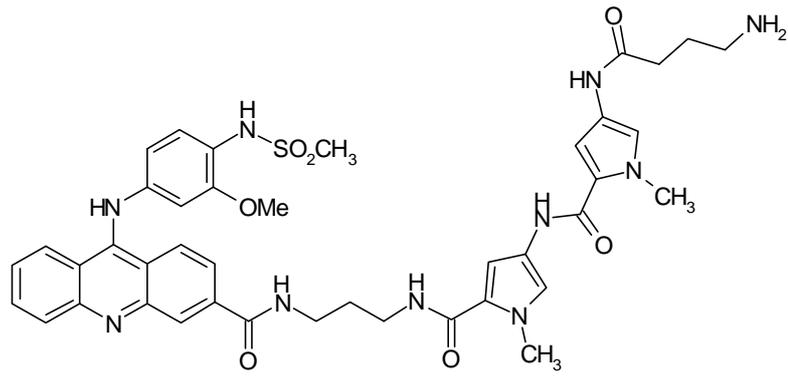


Cl

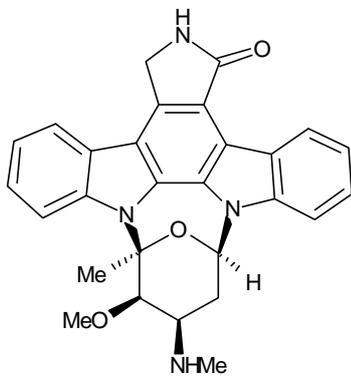
Distamycin A



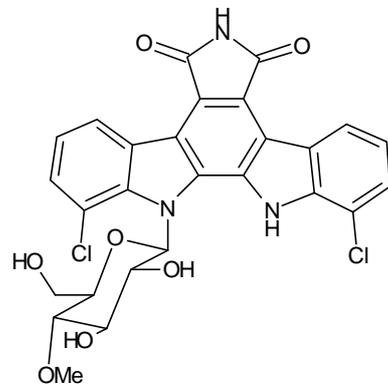
Ditercalinium



NetAmsa

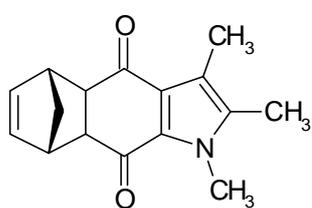


Staurosporin

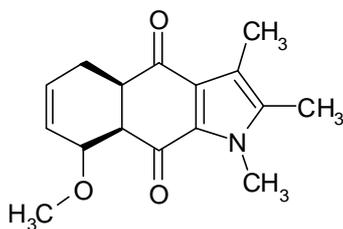


Rebeccamycin

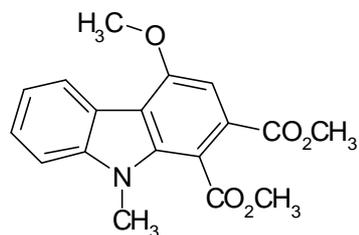
Getestete Verbindungen



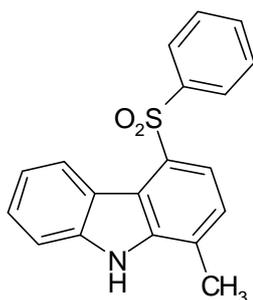
1



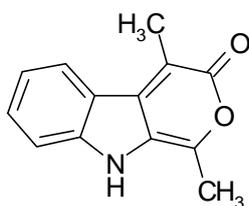
2



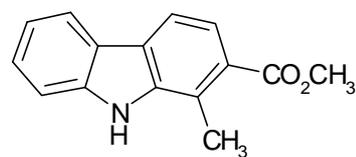
3



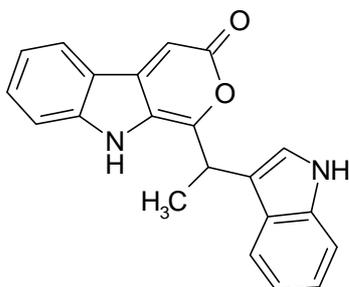
4



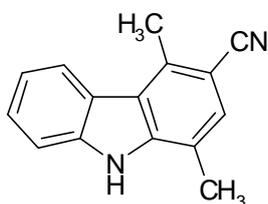
5



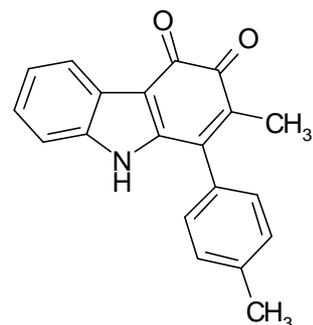
6



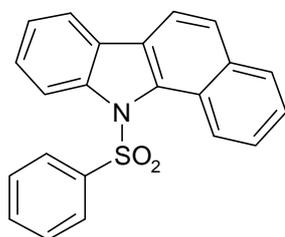
7



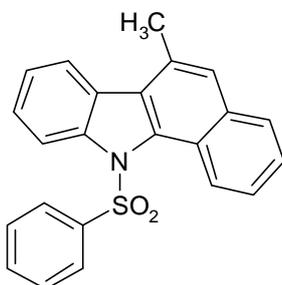
8



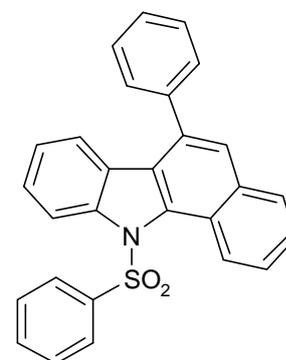
9



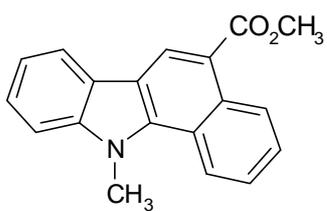
10



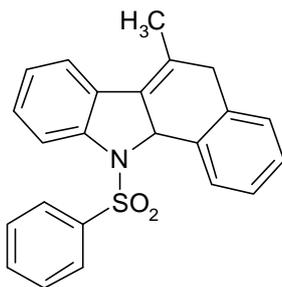
11



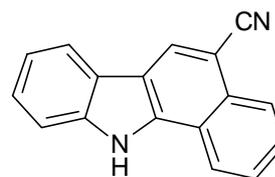
12



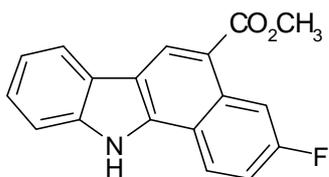
13



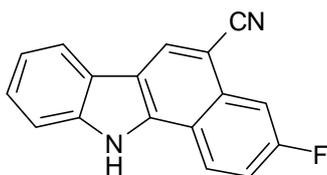
14



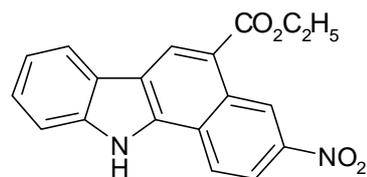
15



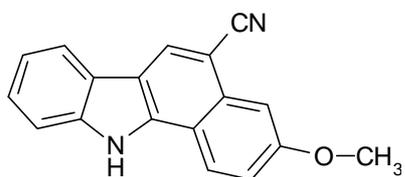
16



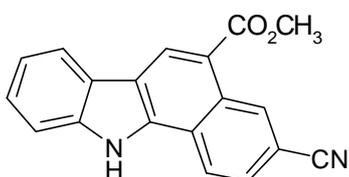
17



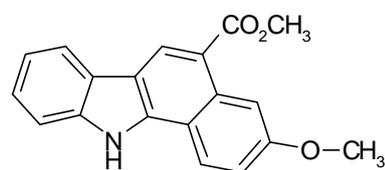
18



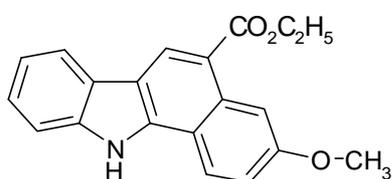
19



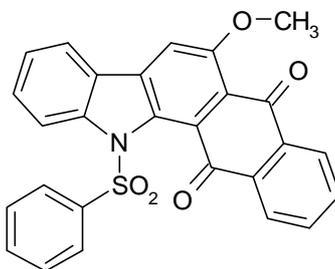
20



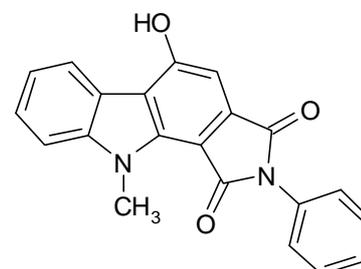
21



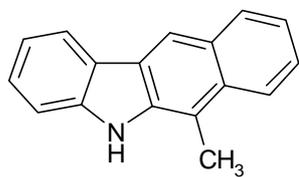
22



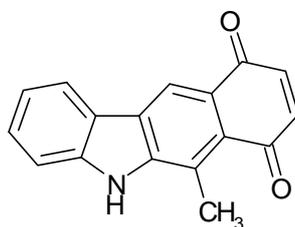
23



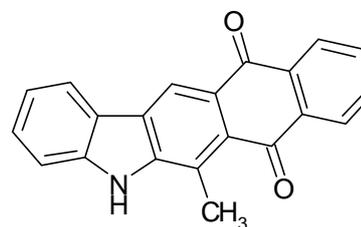
24



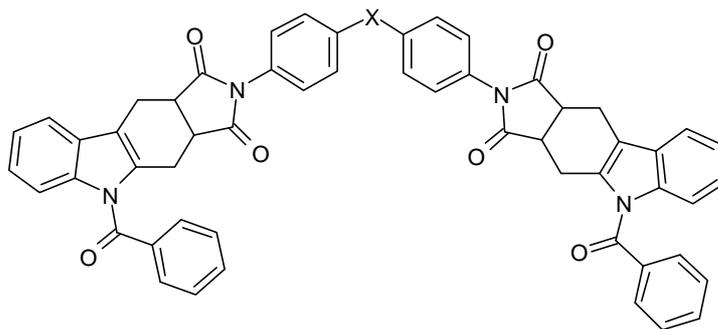
25



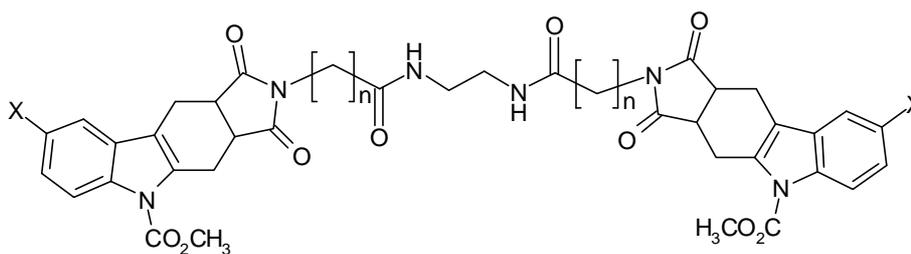
26



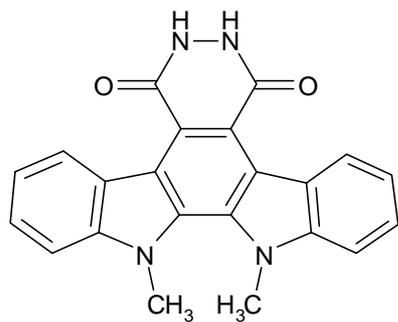
27



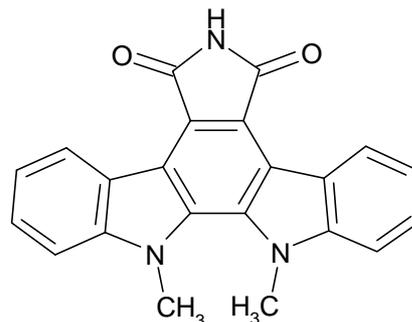
Verbindung	-X-
28	-CH ₂ -
29	-SO ₂ -
30	-CO-
31	-NH-



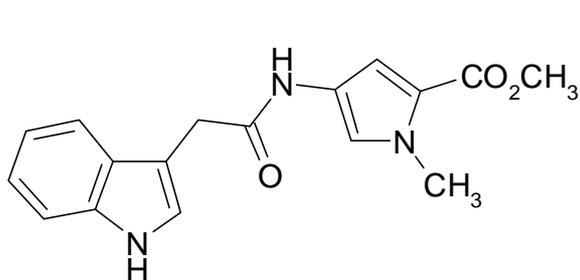
Verbindung	n	-X
32	2	-Br
33	3	-Br
34	4	-H
35	5	-OCH ₃



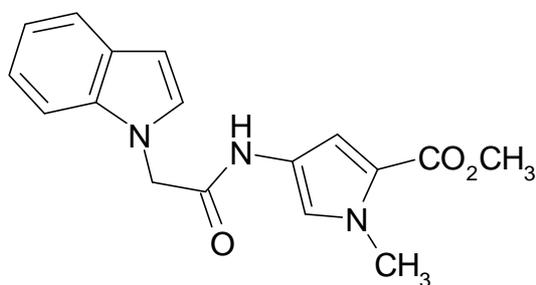
36



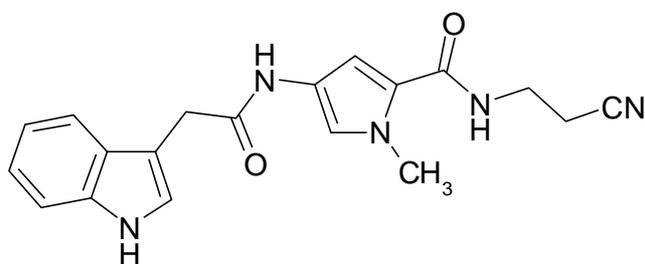
37



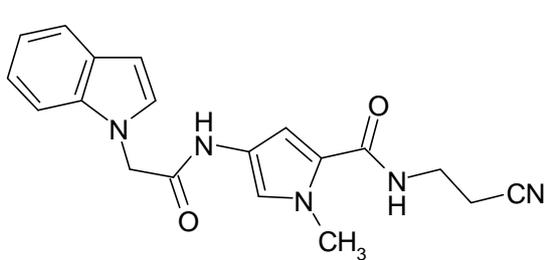
38



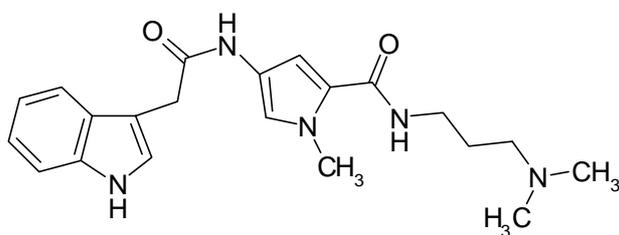
39



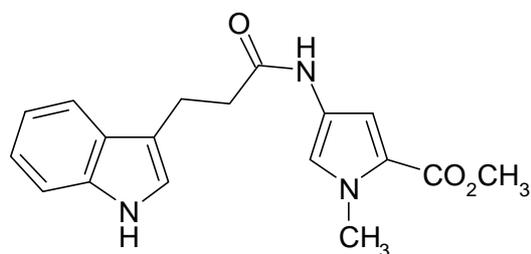
40



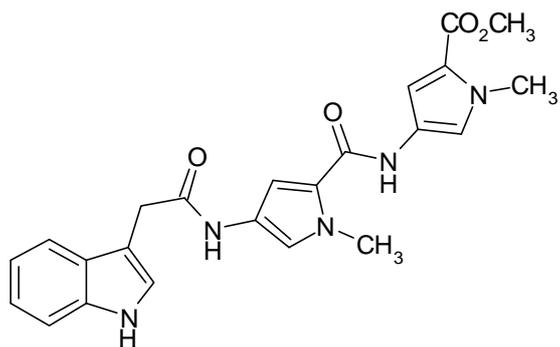
41



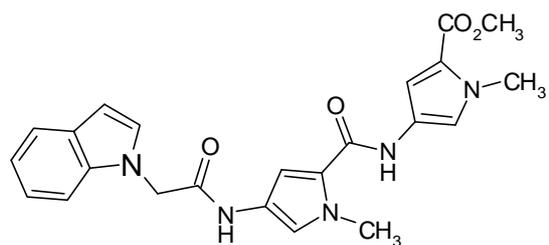
42



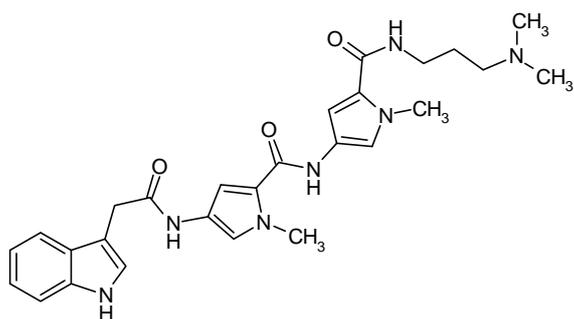
43



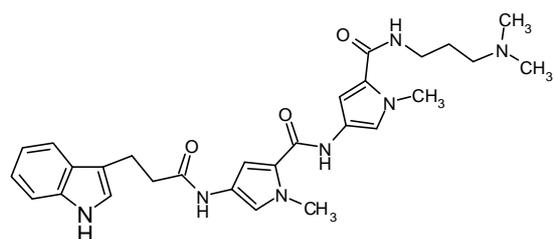
44



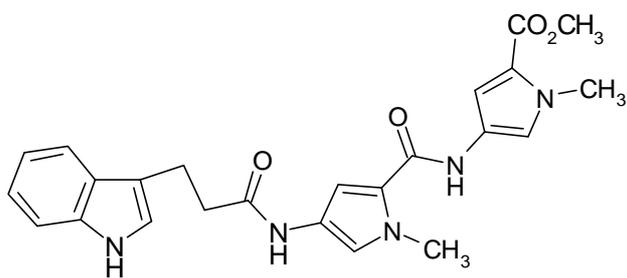
45



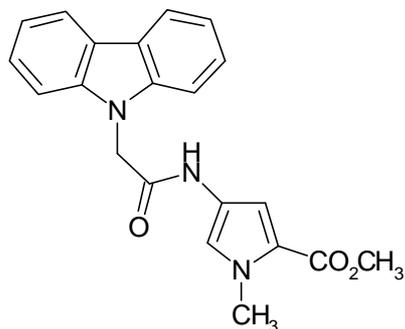
46



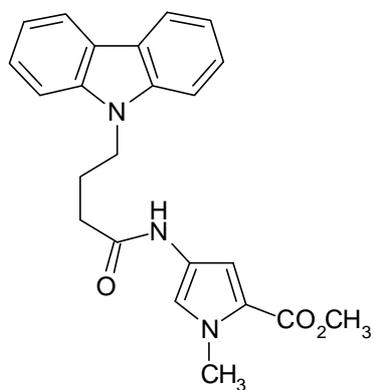
47



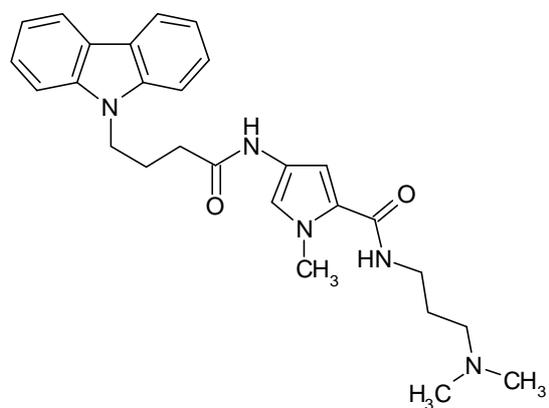
48



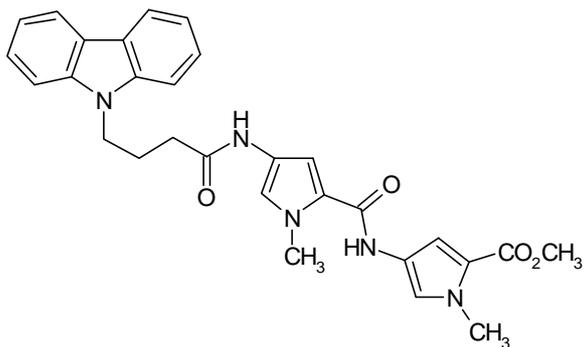
49



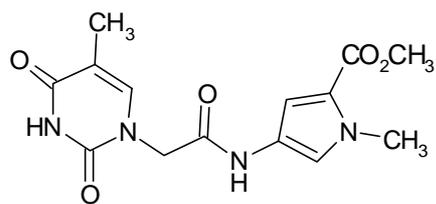
50



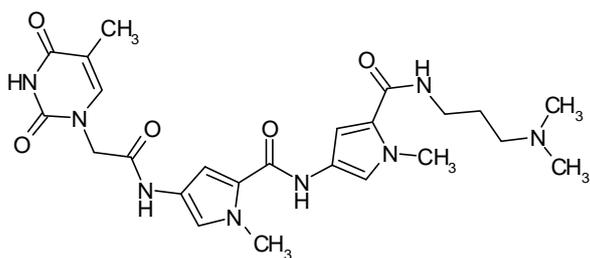
51



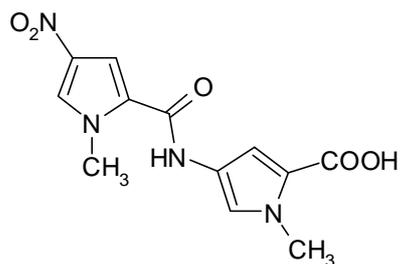
52



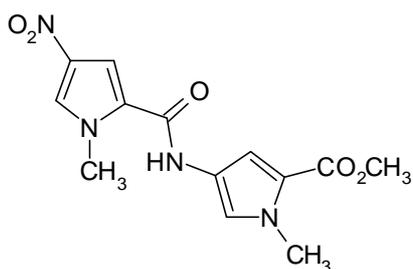
53



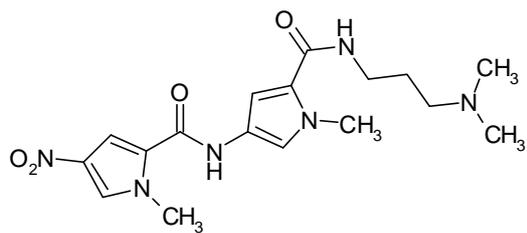
54



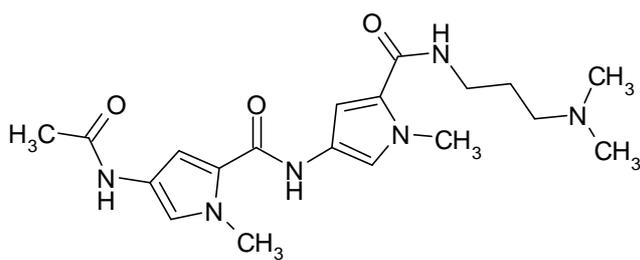
55



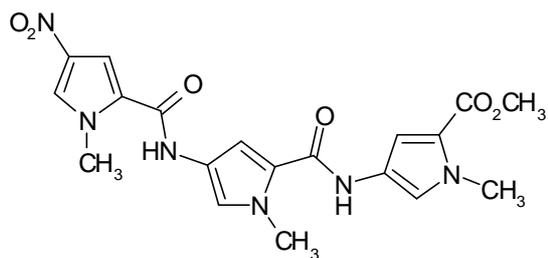
56



57



58



59

Literaturverzeichnis

- 1 Pratt, W.B; Ruddon, R.W.; Ensminger, W.D.; Maybaum, J. in *The Anticancer Drugs*, **1994**, Oxford University Press, New York
- 2 Sattler, K.S.; *Dissertation*, **1994**, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 3 Cooper, M.G. in *The Cell: A Molecular Approach*, **1994**, Palgrave Press, USA
- 4 Voet, D.; Voet, J.D. in *Biochemie*, **1994**, VCH-Verlag, Weinheim, Deutschland
- 5 Hennig, W in *Genetik*, **1998**, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland
- 6 Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M.; *Arzneimittelwirkungen*, **2001**, Wiss. Verlag-Gesellschaft, Stuttgart, Deutschland, 8. Auflage
- 7 Pitot, H.C.; *Cancer Suppl.*, **1993**, 72, 962-970
- 8 Hilgeroth, A.; *Pharm. in unserer Zeit*, **1999**, 6, 309-313
- 9 Heinzl, S.; *Mediz. Monatsh. Pharmaz.*, **1997**, 22, 197
- 10 Adjei, A.A.; *Drugs Fut.*, **2000**, 25, 1069-1079
- 11 Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1262-1263
- 12 trastuzumab www.pharmazeutische-zeitung.de/86-00.htm
- 13 Hecht, S.M. (Editor); Long, E.C. in *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, **1996**, Oxford University Press, New York, USA
- 14 Neidle, S.; Pearl, L.H.; Skelly, J.V.; *Biochem. J.*, **1987**, 243, 1-13
- 15 Remers, W.A. in *The Chemistry of Antitumor Antibiotics*, **1988**, Wiley Press, New York, USA
- 16 Boger, D.L.; Johnson, D.S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1439
- 17 Neidle, S.; Waring, M. (Editors) in *Molecular aspects of anticancer drugs-DNA interactions*, **1993**, CRC Press, Boca Raton, USA
- 18 Saenger, W. in *Principles of Nucleic Acid Structure*, **1983**, Springer Press, New York, USA
- 19 Feigon, J; Denny, W.A.; Leupin, W.; Kearns, D.R.; *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 450-465
- 20 Pindur, U.; Haber, M.; Sattler, K.; *J. Chem. Educ.*, **1993**, 70, 263-272
- 21 Berman, H.M.; Young, P.R.; *Annu Rev. Biophys. Bioeng.*, **1981**, 10, 87
- 22 Chaires, J.B.; *Biopolymers*, **1997**, 44, 201-215

-
- 23 Rehn, C.; Pindur, U.; *Monatsh. Chemie*, **1996**, 127, 645-658
- 24 Lerman, L.S.; *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18
- 25 Miller, K.J.; Newlin, D.D.; *Biopolymers*, **1982**, 21, 633-652
- 26 Haber, M.; *Dissertation*, **1992**, Mainz
- 27 Goodwin, S.; Smith, A.F.; Horning, E.C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 1903-1908
- 28 Gribble, G.W. in Brossi, A. (Editor); *The Alkaloids*, **1990**, Vol. 39, Academic Press Inc., San Diego, USA
- 29 Bhuyan, B.K.; Fraser, T.J.; Li, L.H.; *Cancer Res.*, **1972**, 32, 2538-2544
- 30 Kohn, K.W.; Waring, M.J.; Glaubiger, D.; Friedmann, C.A.; *Cancer Res.*, **1975**, 35, 71-76
- 31 Dodin, G., Schwaller, M.A.; Aubard, J.; Paoletti, C.; *Eur J. Biochem.*, **1988**, 176, 371-376
- 32 Molina, A.; Vaquero, J.J.; Garcia-Navio, J.L.; Alvarez Builla, J.; de Pascual Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M.M.; *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3907-3915
- 33 Pommier, Y.; Schwartz, R.E.; Zwelling, L.A.; Kohn, K.W.; *Biochemistry*, **1985**, 24, 6406-6410
- 34 Djuric, Z.; Everett, C.K.; Valeriolo, F.A.; *Cancer Res.*, **1992**, 52, 1515-1519
- 35 Dugue, B.; Auclair, C.; Paoletti, C.; Meunier, B.; *Cancer Res.*, **1985**, 46, 3828-3833
- 36 Mauffret, O.; Rene, B.; Convert, O.; Monnot, M.; Lescot, E.; Femandjian, S.; *Biopolymers*, **1991**, 31, 1325-1341
- 37 Ismail, M.A.; Sanders, K.J.; Fennel, G.C.; Latham, H.C.; Wormell, D.; Rodger, A.; *Biopolymers*, **1998**, 46, 127-143
- 38 Jones, R.A.; Pastor, J.; Siro, J.; Voro, T.N.; *Tetrahedron*, **1997**, 53, 479-486
- 39 Lown, J.W.; Morgan, A.R.; Yen, S.F.; Wang, Y.H.; Wilson, W.D., *Biochemistry*, **1985**, 24, 4028-4035
- 40 Faulds, D.; Balfour, J.A.; Chrisp, P.; Langtry, H.D., *Drugs*, **1990**, 17, 161
- 41 Fischer, G.; *Dissertation*, **1997**, Mainz
- 42 Taatjes, D.J.; Gaudiano, G.; Resing, K.; Koch, T.H.; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 1276-1286
- 43 Chaires, J.B.; Leng, F.; Przewloka, T.; Fokt, I.; Ling, Y.H.; Perez-Soler, R.; Preibe, W.; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 261-266
- 44 Chaires, J.B.; *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 314-320

-
- 45 Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C.; Wakelin, L.P.; *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 1568-1574
- 46 Roques, B.P.; Pelaprat, D.; Le Guen, I., Porcher, G.; Gosse, C.; Le Pecq, J.B.; *Biochem. Pharm.*, **1979**, 28, 1811-1815
- 47 Lambert, B.; Segal-Bendirdjian, E.; Esnault, C.; Le Pecq, J.B.; Roques, B.P.; Jones, B.; Yeung, A.T.; *Anticancer-Drug Des.*, **1990**, 5, 43-53
- 48 Pindur, U; Fischer, G.; *Curr. Med. Chem.*, **1996**, 3, 379-406
- 49 Churchill, M.E.A.; Travers, A.A.; *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, 16, 92-97
- 50 Wang, S.; Cosstick, R.; Gardner, J.F.; Gumpport, R.I.; *Biochemistry*, **1995**, 34, 13082-13090
- 51 Kopka, M.L.; Goodsell, D.S.; Han, G.W.; Chiu, T.K.; Lown, J.W.; Dickerson, R.E.; *Structure*, **1997**, 5, 1033-1046
- 52 Finlay, A.C.; Hochstein, F.A.; Sobin, B.A.; Murphy, F.X.; *J.Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 341
- 53 Thrum, H.; *Naturweiss*, **1959**, 46, 87
- 54 Zimmer, C.; Wahnert, U.; *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **1986**, 47, 31-112
- 55 Arcamone, F.; Penco, S.; Orezzi, P.; Nicoletta, V.; Pirelli, A.; *Nature*, **1964**, 203, 1064
- 56 Kopka, M.L.; Yoon, C; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R.E.; *J. Mol. Biol.*, **1985**, 183, 553-563
- 57 Coll, M.; Aymami, J.; Van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Rich, A.; Wang, A.H.; *Biochemistry*, **1989**, 28, 310-320
- 58 Patel, D.J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 6424-6428
- 59 Pelton, J.G.; Wemmer, D.E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 5723-5727
- 60 Bailly, C; Chaires, J.B.; *Bioconjug. Chem.*, **1998**, 9, 513-538
- 61 Kopka, M.L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R.E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 1376-1380
- 62 Rao, K.E.; Shea, R.G.; Bathini, Y.; Lown, J.W.; *Anti-Cancer Drug. Des.*, **1990**, 5, 3-20
- 63 Goodsell, D.S.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 509-516
- 64 Parks, M.E.; Baird, E.E.; Dervan, P.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6153
- 65 White, S.; Baird, E.E; Dervan, P.B., *Chem. Biol.*, **1997**, 4, 569-578
- 66 Turner, J.M.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7636-7644
- 67 Sharma, S.K.; Narayan Reddy, B.S.; Lown, J.W.; *Drugs Fut.*, **2001**, 26, 39-49

-
- 68 Weisz, K.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 2592
- 69 Gottesfeld, J. M.; Neely, L.; Trauger, J.W.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.; *Nature*, **1997**, 387, 202-205
- 70 Chiang, S.Y.; Welch, J.; Rauscher, F.J. III; Beerman, T.A.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 7033-7040
- 71 Chen, A.Y.; Yu, C, Gatto, B.; Liu, L.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 8131-8135
- 72 Reddy, B.S.P., Sharma, S.K., Lown, J.W., *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 475-508
- 73 Pindur, U. (Editor); *Curr. Med. Chem.*, special issue, **2001**, 8, 475-581
- 74 Bailly, C. in *Advances in DNA-Sequence-Specific Agents*, JAI Press Inc., USA, **1998**, 3, 97-156
- 75 Broggin, M.; Coley, H.M.; Mongelli, N.; Pesenti, E.; Wyatt, M.D.; Hartley, J.A.; D'Incalci, M., *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 81-87
- 76 Denny, W.A.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 533-544
- 77 Bourdouxhe-Housiaux, C.; Colson, P.; Houssier, C.; Waring, M.J., Bailly, C.; *Biochemistry*, **1996**, 35, 4251-4264
- 78 Sharma, S.K.; Jia, G.; Lown, J.W.; *Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents*, **2001**, 1, 27-45
- 79 Bjornsti, M.A.; Osheroff, N. in *Protocols in DNA-Topology and Topoisomerases*, **1999**, Vol.1, Humana Press, Totowa, USA, 1-8
- 80 Holden, J.A.; *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, **2001**, 1, 1-25
- 81 Keller, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 2553
- 82 Gellert, M; *Annu. Rev. Biochem.*, **1981**, 50, 879-910
- 83 Wang, J.C.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, 54, 665-697
- 84 Goto, T.; Laipis, P.; Wang, J.C.; *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 10422-10429
- 85 Tanizawa, A.; Pommier, Y.; *Cancer Res.*, **1992**, 52, 1848-1854
- 86 Wang, J.C.; *Annu Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 635-692
- 87 Kroeger, P.E.; Rowe, T.C.; *Biochemistry*, **1992**, 31, 2492-2501
- 88 Capranico, G.; Zunino, F.; *Curr. Pharm. Des.*, **1995**, 1, 1-14
- 89 Merino, A.; Madden, K.R.; Lane, W.S.; Champoux, J.J.; Reinberg, D.; *Nature*, **1993**, 365, 227-232
- 90 Rossi, F.; Labourier, E.; Forne, T.; Divita, G.; Derancourt, J.; Riou, J.F.; Antoine, E.; Cathala, G.; Brunel, C.; Tazi, J.; *Nature*, **1996**, 381, 80-82

-
- 91 Giovanella, B.; Stehlin, J.S.; Wall, M.E.; Wani, M.C.; Nicholas, A.W.; Liu, L.F.; Silber, R.; Potmesil, M.; *Science*, **1989**, 246, 1046-1048
- 92 Potmesil, M.; Hsiang, Y.H.; Silber, R.; *Cancer Res.*, **1988**, 48, 3537-3543
- 93 Stewart, L.; Ireton, G.; Champoux, J.J.; *J. Mol. Biol.*, **1997**, 269, 355-372
- 94 Stewart, L.; Ireton, G.; Champoux, J.J.; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 7602-7608
- 95 Stewart, L.; Ireton, G.; Parker, L.; Madden, K.R.; Champoux, J.J.; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 7593-7601
- 96 Pommier, Y.; *Biochimie*, **1998**, 80, 225-270
- 97 Depew, R.E.; Liu, L.F.; Wang, J.C.; *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 511-518
- 98 Caserta, M.; Amadei, A.; Camilloni, G.; Di Mauro, E.; *Biochemistry*, **1990**, 29, 8152-8157
- 99 Pommier, Y.; Pourquier, P.; Fan, Y.; Strumberg, D.; *Bioch. Biophys. Acta*, **1998**, 1400, 83-106
- 100 Stivers, J.T.; Hariis, T.K.; Mildvan, A.S.; *Biochemistry*, **1997**, 36, 5212-5222
- 101 Madden, K.R.; Champoux, J.J.; *Cancer Res.*, 1992, 52, 525-532
- 102 Gupta, M.; Fujimori, A.; Pommier, Y.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1262, 1-14
- 103 Wall, M.E.; Wani, M.C.; Cooke, C.E.; Palmer, K.H.; McPhail, A.T.; Slim, G.A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 3888-3890
- 104 Horwitz, S.B.; Chang, C.; Grollmann, A.P.; *Mol. Pharmacol.*, **1971**, 7, 632-644
- 105 Spataro, A.; Kessel, D.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1972**, 48, 643-648
- 106 Hsiang, Y.H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L.F.; *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 14873-14878
- 107 Liu, L.F.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, 58, 351-375
- 108 Kollmannsberger, C.; Mross, K.; Jakob, A.; Kanz, L.; Bokemeyer, C.; *Oncology*, **1999**, 56, 1-12
- 109 Bornkessel, B.; *Medizin. Monatsh. Pharmaz.*, **1997**, 205, 114-116
- 110 Hertzberg, R.P.; Caranfa, M.J.; Hecht, S.M.; *Biochemistry*, **1989**, 28, 4629-4638
- 111 Fan, Y.; Weinstein, J.N.; Kohn, K.W.; Shi, L.M.; Pommier, Y.; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2216-2226
- 112 Jaxel, C.; Kohn, K.W.; Wani, M.C.; Wall, M.E.; Pommier, Y.; *Cancer Res.*, **1989**, 49, 1465-1469
- 113 Tanizawa, A.; Fujimori, A.; Fujimori, Y.; Pommier, Y.; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1994**, 86, 836-842

-
- 114 Tanizawa, A.; Kohn, K.W.; Kohlhagen, G.; Leteurtre, F.; Pommier, Y.; *Biochemistry*, **1995**, 43, 7200-7206
- 115 Covey, J.M.; Jaxel, C.; Kohn, K.W.; Pommier, Y.; *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5016-5022
- 116 Yamashita, Y.; Kawada, S.Z.; Fujii, N.; Nakano, H.; *Biochemistry*, **1991**, 30, 5838-5845
- 117 Leteurtre, F.; Fujimori, A.; Tanizawa, A.; Chhabra, A.; Mazumder, A.; Kohlhagen, G.; Nakano, H.; Pommier, Y.; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 28702-28707
- 118 Fang, S.D.; Wang, L.K.; Hecht, S.M.; *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 5025-5027
- 119 Wang, L.K.; Johnson, R.K.; Hecht, S.M.; *Chem. Res. Toxicol.*; **1993**, 6, 813-818
- 120 Larsen, A.K.; Grondard, L.; Couprie, J.; Desoize, B.; Comoe, L.; Jardillier, J.C.; Riou, J.F.; *Biochem. Pharmac.*, **1993**, 46, 1403-1412
- 121 Nabiev, I.; Chourpa, I.; Riou, J.F.; Nguyen, C.H.; Lavelle, F.; Manfait, M.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 9013-9023
- 122 Wang, L.K.; Rogers, B.D.; Hecht, S.M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 75-83
- 123 Kokoshka, J.M.; Capson, T.L.; Holden, J.A.; Ireland, C.H.; Barrows, L.R.; *Anticancer Drugs*, **1996**, 7, 758-765
- 124 Kohlhagen, G.; Paull, K.D.; Pommier, Y.; *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **1996**, 37, 431
- 125 Strumberg, D.; Pommier, Y.; Paull, K.; Jayaraman, M.; Nagafuji, P.; Cushman, M.; *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 446-457
- 126 Prudhomme, M.; *Curr. Med. Chem.*, **2000**, 7, 1189-1212
- 127 Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchiya, H.; Takahaschi, Y.; Masuma, R.; *J. Antibiotics*, **1977**, 30, 275-282
- 128 Kojiri, K.; Kondo, H.; Yoshinari, T.; Arakawa, H.; Nakajima, S.; Satoh, F.; Kawamura, K.; Kura, A.; Suda, H.; Okanishi, M.; *J. Antib.*, **1991**, 44, 723-728
- 129 Nettleton, D.E.; Doyle, T.W.; Krishnan, B.; Matsumaoto, G.K.; Clardy, J.; *Tetrah. Lett.*, **1985**, 26, 4011
- 130 Kim, Y.S., *Dissertation*, **1997**, Mainz
- 131 Pindur, U.; Kim, Y.S.; Mehrabani, F.; *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 29-69
- 132 Pindur, U.; Lemster, T.; *Pharmazie*, **1998**, 53, 79-86
- 133 Rodrigues-Pereira, E.; Belin, L.; Sancelme, M.; Prudhomme, M.; Ollier, M.; Rapp, M.; Sevère, D.; Riou, J.F.; Fabbro, D.; Meyer, T.; *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4471-4477
- 134 Bailly, C.; Qu, X.; Anizon, F.; Prudhomme, M.; Riou, J.F.; Chaires, J.B.; *Molec. Pharm.*, **1999**, 55 377-385

-
- 135 Bailly, C.; Riou, J.F.; Colson, P.; Houssier, C.; Rodrigues-Pereira, E.; Prudhomme, M.; *Biochemistry*, **1997**, 36, 3917-3929
- 136 Moreau, P.; Anizon, F.; Sancelme, M.; Prudhomme, M.; Bailly, C.; Carrasco, C.; Ollier, M.; Sevère, D.; Riou, J.F.; Fabbro, D.; Meyer, T.; Aubertin, A.M.; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1631-1640
- 137 Anizon, F.; Moreau, P.; Sancelme, M.; Voldoire, A.; Prudhomme, M.; Ollier, M.; Sevère, D.; Riou, J.F.; Bailly, C.; Fabbro, D.; Meyer, T.; Aubertin, A.M.; *Bioorg. & Med. Chem.*, **1998**, 6, 1957-1604
- 138 Traxler, P.; Lydon, N.; *Drugs Fut.*, **1995**, 20, 1261
- 139 Bailly, C.; Dassoneville, L.; Colson, P.; Houssier, C.; Fukasawa, K.; Nishimura, S.; Yoshinari, T.; *Cancer Res.*, **1999**, 59, 2853-2860
- 140 Qu, X.; Chaires, J.B.; Ohkubo, M.; Yoshinari, T.; Nishimura, S.; Bailly, C.; *Anti Cancer Drug Des.*, **1999**, 14, 433-442
- 141 Bailly, C.; *Curr. Med. Chem.*, **2000**, 7, 39-58
- 142 Herzog, A.; Schütze, H.R.; *Deut. Tierärztl. Wschr.*, **1968**, 75, 476-479
- 143 Hilwig, I.; *Z.Zellforsch.*, **1970**, 104, 127-137
- 144 Frau, S.; Bernardou, J.; Meunier, B.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1996**, 133, 1053-1070
- 145 Chiang, S.Y.; Welch, J.; Rauscher, F.J. III; Beerman, T.A.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 7033-7040
- 146 Chen, A.Y.; Yu, C.; Gatto, B.; Liu, L.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 8131-8135
- 147 Mortensen, U.H.; Stevnsner, T.; Krogh, S.; Olesen, K.; Westergaard, O.; Bonven, B.J.; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, 18, 1983-1989
- 148 Colson, P.; Housier, C.; Bailly, C.; *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1995**, 13, 351-366
- 149 Sun, Q.; Gatto, B.; Yu, C.; Liu, A.; Liu, L.F.; La Voie, E.J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 2871-2876
- 150 Xu, Z.; Li, T.K.; Kim, J.S.; La Voie, E.J.; Breslauer, K.J.; Liu, L.F.; Pilch, D.S.; *Biochemistry*, **1998**, 37, 3558-3566
- 151 Fujii, N.; Yamashita, Y.; Saitoh, Y.; Nakano, H.; *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 13160-13165
- 152 Li, C.J.; Averboukh, L.; Pardee, A.B.; *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 22463-22468
- 153 Frydman, B.; Marton, I.J.; Sun, J.S.; Neder, K.; Witiak, D.T.; Liu, A.A.; Wang, H.M.; Mao, Y.; Wu, H.Y.; Sanders, M.M.; Liu, L.F.; *Cancer Res.*, **1997**, 57, 620-627

-
- 154 Schwerk, A.R.; Wehrh, W.; *Eur. J. Biochem.*, **1978**, 84, 197
- 155 Ahn, B.Z.; Baik, K.U.; Kweon, G.R.; Lim, K.; Hwang, B.D.; *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 1044-1047
- 156 Hoernlein, R.F.; Orlikowsky, T.; Zehrer, C.; Niethammer, D.; Sailer, E.R.; Simet, T.; Dannecker, G.E.; Ammon, H.P.T.; *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **1999**, 288, 613-619
- 157 Plyta, Z.F.; Li, T.; Papageorgiou, V.P.; Mellidis, A.S.; Assimopoulou, A.N.; Pitsinos, E.N.; Couladouros, E.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 3385-3390
- 158 Suzuki, K.; Nagao, K.; Monnai, Y.; Yagi, A.; Uyeda, M.; *J. Antibiot.*, **1998**, 51, 991-998
- 159 Yamashita, Y.; Kawada, S.; Nakano, H.; *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, 39, 737-744
- 160 Boege, F.; Straub, T.; Kehr, A.; Boesenberg, C.; Christiansen, K.; Andersen, A.; Jakob, F.; Köhrler, J.; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 2262-2270
- 161 Crow, R.T.; Crothers, D.M.; *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3191-3194
- 162 Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H.; Nash, H.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1976**, 73, 3872-3876
- 163 Roca, J.; Wang, J.C.; *Cell*, **1994**, 77, 609-616
- 164 Orphanides, G.; Maxwell, A.; *Curr. Biology*, **1994**, 4, 1006-1009
- 165 Capranico, G.; Giaccone, G.; Zunino, F.; Garattini, S.; D'Incalci, M.; *Cancer Chemother. Biol. Resp. Modif.*, **1996**, 6, 1668-1687
- 166 Shen, L.L. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 171-184
- 167 Petersen, U.; *Pharm. Unserer Zeit*, 30, **2001**, 376-381
- 168 Liu, L.F.; Wang, J.C. in *DNA-Topoisomerases in Cancer*, **1991**, Oxford University Press, New York, USA
- 169 Sinha, B.K.; *Drugs*, **1995**, 49, 11-19
- 170 D'Arpa, P.; Liu, L.F.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, 989, 163-177
- 171 Monnot, M.; Mauffret, O.; Simon, V.; Lescot, E.; Psaume, B.; Saucier, J.M.; Charra, M.; Belehradec, Jr., J.; Femandjian, S.; *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 1820-1829
- 172 Bonjean, K.; De Pauw-Gillet, M.C.; Defresne, M.P.; Colson, P.; Houssier, C.; Dassoneville, L.; Bailly, C.; Wright, C.; Quetin-Leclercq, J.; Angenot, L.; *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 4068-4069
- 173 Quetin-Leclercq, J.; Coucke, P.; Delaude, C.; Warin, R.; Bassleer, R.; Angenot, L.; *Phytotherapy*, **1991**, 30, 1697-1700

-
- 174 Dassoneville, L.; Bonjean, K.; De Pauw-Gillet, M.C.; Colson, P.; Houssier, C.; Quetin-Leclercq, J.; Angenot, L.; Bailly, C.; *Biochemistry*, **1999**, 38, 7719-7726
- 175 Rene, B.; Fosse, P.; Khelifa, T.; Jacquemin-Sablon, A.; Bailly, C.; *Molec. Pharmac.*, **1996**, 49, 343-350
- 176 Potmesil, M.; Kohn, K.W. (Editors) in *DNA Topoisomerases in Cancer*, **1991**, Oxford University Press, New York, USA
- 177 Mandel, M.; Marmur, J. in Grossmann, L.; Moldave, K. (Editors), *Methods in Enzymology*, vol. XXII (Part B), 1968, Academic Press, 195-206
- 178 Wilson, W.D.; Tanious, F.A.; Fernandez-Saiz, M.; Rigl, C.T. in Fox, K.R. (Editor) *Drug-DNA Interaction Protocols*, **1997**, Humana press, Totowa, USA
- 179 Wilson, W.D.; Ratmeyer, L.; Zhao, M.; Strekowski, L.; Boykin, D.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 4098-4104
- 180 Wilson, W.D. in Blackburn, M.; Gait, M. (Editors) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Reversible Interactions of Small Molecules with Nucleic Acids*, **1990**, Oxford IRL, oxford, UK, 295-336
- 181 Zimmer, C.; Wahnert, U.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **1986**, 47, 31-112
- 182 Brabec, V.; Reedijk, J., Leng, M.; *Biochemistry*, **1992**, 31, 12397-12402
- 183 Fairley, T.A.; Tidwell, R.R.; Donkor, I.; Naiman, N.A.; Ohemeng, K.A.; Lombardy, R.J.; Bentley, J.A.; Cory, M.; *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1746-1753
- 184 Morgan, A.R.; Lee, J.S.; Pulleyblank, D.E.; Murray, N.L.; Evans, D.H.; *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 7, 547-569
- 185 Wellman, S.E.; *Biopolymers*, **1996**, 39, 491-501
- 186 Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C.; *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 1625-1630
- 187 Boger, D.L.; Chen, J-H.; Saionz, K.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 1629-1644
- 188 Baguley, B.C., Falkenhaus, E. M., *Nucleic Acids Res.*, **1978**, 5, 161-171
- 189 Antonini, I.; Polucci, P.; Jenkins, T.C.; Kelland, L.R.; Menta, E.; Pescalli, N.; Stefanska, B.; Mazerski, J.; Martelli, S.; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 3749-3755
- 190 Gmeiner, W.H.; *Curr. Med. Chem.*, **1998**, 5, 115-135
- 191 Han, X.; Gao, X.; *Curr Med. Chem.*, **2001**, 8, 551-581
- 192 Wilson, W.D., Jones, R.L.; *Interkalation Chem.*, **1982**, Academic Press, New York, USA, 445-501
- 193 Long, E.C.; Barton, J.K.; *Acct. Chem. Res.*, **1990**, 23, 271-273
- 194 Lerman, L.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1963**, 49, 94

-
- 195 Waring, M.; *J. mol. Biol.*, **1970**, 54, 247-279
- 196 Gao, X.; Patel, D.J.; *Q. Rev. Biophys.*, **1989**, 22, 93-138
- 197 Norden, B.; Tjerdal, F.; *Biophys. Chem.*, **1976**, 4, 191-198
- 198 Fritzsche, H.; Triebel, H.; Chaires, J.B.; Dattagupta, N.; Crothers, D.M.; *Biochemistry*, **1982**, 21, 3940-3946
- 199 Kumar, C.V.; Barton, J.K., Turro, N.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 5518
- 200 Suh, D.; Chaires, J.B.; *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 723-728
- 201 Le Pecq, J.B.; Paoletti, C.; *J. Mol. Biol.*, **1967**, 27, 87-106
- 202 Wang, J.C.; *Sci. Am.*, **1982**, 247, 94-109
- 203 Pommier, Y.; Covey, J.M.; Keriigan, D.; Markovits, J.; Pham, R.; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 6713-6731
- 204 Shen, L.L. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 149-160
- 205 Pindur, U.; Marotto, A.; Schulze, E.; Fischer, G.; *Pharmazie*, **2000**, 55, 727-732
- 206 Marotto, A.; Kim, Y.S.; Pindur, U.; *Pharmazie*, im Druck
- 207 Fox, K.R. in Fox, K.R. (Editor) *Drug-DNA Interaction Protocols*, **1997**, Humana press, Totowa, USA
- 208 Galas, D.J.; Schmitz, A.; *Nucleic Acids Res.*, **1978**, 5, 3157-3170
- 209 Lane, M.J.; Dabrowiak, J-C.; Vournakis, J.N.; *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80, 3260-3264
- 210 Abu-Day, A.; Brown, P.M.; Fox, K.R.; *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 3385-3392
- 211 Cons, B.M.G.; Fox, K.R.; *FEBS Lett.*, **1990**, 264, 100-104
- 212 Van Dyke, M.W.; Dervan, P.B.; *Biochemistry*, **1983**, 22, 2373-2377
- 213 Portugal, J.; Waring, M.J., *FEBS Lett.*, **1987**, 225, 195-200
- 214 Drew, H.R.; *J. Mol. Biol.*, **1984**, 176, 537-557
- 215 Bruckner, I.; Jurukowski, V.; Savic, A.; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, 18, 891-894
- 216 Dodouit, F.; Goossens, J.F.; Houssin, R.; Henichart, J.P.; Colson, P.; Houssier, C.; Gelus, N.; Bailly, C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 553-557
- 217 Wang, J.C.; *J. Mol. Biol.*, **1971**, 55, 523-533
- 218 Champoux, J.J.; Dulbecco, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1972**, 69, 143-146
- 219 McConaughy, B.L.; Young, L.S.; Champoux, J.J.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 655, 1-8

-
- 220 Morgan, A.R.; Pulleyblank, D.E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1974**, 61, 396-403
- 221 Keller, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 4876-4880
- 222 Stewart, L.; Champoux, J.J. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 1-12
- 223 Champoux, J.J.; in Cozzarelli, N.R.; Wang, J.C. (Editors) *DNA Topology and its Biological Effects*, **1990**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 217-242
- 224 Been, M.D.; Champoux, J.J.; *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 8, 6129-6142
- 225 Champoux, J.J., Aronoff, R.; *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 1010-1015
- 226 Champoux, J.J. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 81-87
- 227 Knab, A.M.; Fertala, J.; Bjornsti, M.A.; *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 6141-6148
- 228 Fiorani, P.; Hann, C.L.; Benedetti, P.; Bjornsti, M.A. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 291-301
- 229 Haldane, A.; Sullivan, D.M. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 13-23
- 230 Marini, J.C.; Miller, K.G.; Englund, P.T.; *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 4976-4979
- 231 Chen, A.Y.; Liu, L.F.; *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1994**, 34, 191-218
- 232 Fortune, J.M.; Osheroff, N.; *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.*, **2000**, 64, 221-253
- 233 Nelson, E.M.; Tewey, K.M.; Liu, L.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 1361-1365
- 234 Liu, L.F.; Rowe, T.C.; Yang, L.; Tewey, K.M.; Chen, G.L.; *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 15365-15370
- 235 Burden, D.A.; Froelich-Ammon, S.J.; Osheroff, N. in Osheroff, N.; Bjornsti, M.A. (editors) *DNA-Topoisomerase Protocols*, **2001**, Vol.2, Humana Press, Totowa, USA, 283-289
- 236 Wyllie, A.; Donahue, V.; Fischer, B.; Hill, D.; Keeseey, J.; Manzow, S. in *Apoptosis and Cell Proliferation*, **1998**, Boehringer Mannheim GmbH, Biomedica, Mannheim, Deutschland
- 237 Boyd, M.R.; *Princ. Pract. Oncol. Updates*, **1989**, 3, 1-15
- 238 <http://dtp.nci.nih.gov>

-
- 239 Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.;
Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, 83, 757-766
- 240 Hollingshead, M.G.; Alley, M.C.; Camalier, R.F.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Malspeis,
L.; Grever, M.R.; *Life Sci.*, **1995**, 57, 131-141
- 241 Rubinstein, L.V.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Simon, R.M.; Tosini, S.; Shekan, P.;
Scudiero, D.A.; Monks, A.; Boyd, M.R.; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, 82, 1113-1118
- 242 http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html
- 243 Cleaveland, E.S.; Zaharewitz, D.W.; Kelley, J.A.; Paull, K.; Cooney, D.A.; Ford, H.;
Biochem. Biophys. Res. Commun., **1996**, 223, 654-659
- 244 Mu, F.; Coffing, S.L.; Riese, D.J.2nd; Geahlen, R.L.; Verdier-Pinard, P.Hamel, T.E.;
Johnson, J.; Cushman, M.; *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 441-452
- 245 Bergman, I.; in Atta-ur-Rahman (editor): *Studies in Natural Products Chemistry*,
1988, Vol.2, Elsevier, Amsterdam, Niederlande, 8-12
- 246 Segall, A.; Pappa, H.; Causabon, R.; Martin, G.; Bergoc, R.; Pizzorno, M.T.; *Eur. J.*
Med. Chem., **1995**, 30, 165
- 247 Maucher, J.; *geplante Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 248 Gonzalez, E.; Pindur, U.; Schollmeyer, D.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1996**, 1767
- 249 Rogge, M.; *Dissertation*, **1994**, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 250 Aygün, A.; *geplante Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 251 Erfanian-Abdoust, H.; *Dissertation*, **1991**, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 252 Perlick, C.; *geplante Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 253 Fischer, G.; Pindur, U.; *Pharmazie*, **1999**, 54, 83-93
- 254 Mehrabani, F.; *geplante Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 255 Meyer, K.U.; *Dissertation*, **2000**, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 256 Pindur, U.; Lemster, T. *Recent Res. Devel. in Org. & Bioorg. Chem.* **1997**, 1, 33-53
- 257 Bush, J. A.; Long, B. H.; Catino, J. J.; Bradner, W. T.; Tomita, K. *J. Antibiot. Tokyo*
1987, 40, 668-678
- 258 Tamaoki, T.; Nomoto, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F. *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. **1986**, 135, 397-402
- 259 Keepers, Y. P.; Pizao, P. E.; Peters, G. J.; van Ark Otte, J.; Winograd, B.; Pinedo, H.
M. Eur. J. Cancer. **1991**, 27, 897-900
- 260 Hotzel, C.; *geplante Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

-
- 261 Holden, J.A.; Rahn, M.P.; Jolles, C.J.; Vorobyev, S.V.; Bronstein, I.B.; *Mol. Pathol.*, **1997**, 50, 247-53
- 262 Bailly, C. und Mitarbeiter; persönliche Mitteilung