

**UNTERSUCHUNGEN DER
WECHSELWIRKUNGEN VON ANELLIERTEN
CHINOLIZINIUMSALZEN MIT DNA**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Katja Faulhaber
aus
Würzburg

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Meinen Eltern und Michael

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Dr. Heiko Ihmels für die Bereitstellung des sehr interessanten und vielseitigen Themas sowie die gute Betreuung meiner Arbeit bedanken. Insbesondere danke ich ihm auch für sein großes Engagement und die schnellen Korrekturen, als es ums „Fertigwerden“ ging. Auch für die Auslandsaufenthalte, die er mir im Rahmen meiner Arbeit ermöglicht hat, bin ich ihm sehr dankbar.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. C. Böhne und Prof. F. Dall'Acqua und seinem Mitarbeiter Dr. G. Viola für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die effektive Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. W. Adam, Dr. M. Grüne, Prof. Dr. G. Bringmann, Prof. Dr. B. Giese und seiner Mitarbeiterin A.-K. Köhler sowie bei Prof. Dr. F. W. Schneider und seiner Mitarbeiterin Dr. A. Häfner. Die Zusammenarbeit mit ihnen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die ausgesprochen nette Atmosphäre bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des AKI. Ein besonderer Dank gebührt hierbei Kathrin Wissel mit der die Mittags- und Kaffeepausen in den letzten drei Jahren nie langweilig geworden sind. Weiterhin möchte ich mich bei Andrea Hofmann herzlich bedanken, dass sie mit ihren Ergebnissen sozusagen in letzter Minute meiner Arbeit den letzten Schliff verlieh.

Bei den Korrekturlesern Christian Mohrschladt, Daniela Otto, Kathrin Wissel, Michael Vermathen und Michael Schraut, der trotz „Zula-Stress“ noch diverse Computerprobleme gelöst hat, möchte ich mich für die schnelle und gründliche Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich den Auszubildenden Peggy Seibt und André Schuster, dass sie ohne größeren Widerstand immer wieder zu unzähligen Stunden am UV- und Fluoreszenzspektrometer zu überreden waren.

Außerdem möchte ich Michael ganz herzlich danken, dass er in den letzten Wochen meine doch sehr angespannte Laune (fast) ohne Murren ertragen hat und durch seine unermüdlichen

Aufmunterungs- und Motivationsversuche viel dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit dann doch ziemlich schnell ein Ende gefunden hat.

Schließlich gebührt auch meinen Eltern für ihre Unterstützung während des ganzen Studiums und während der Doktorarbeit ein ganz besonderer Dank. Ohne ihre Hilfe wäre nichts davon möglich gewesen.

Publikationsliste

Beiträge in Fachzeitschriften

H. Ihmels, K. Faulhaber, B. Engels, C. Lennartz, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 2854–2864.

New Dyes Based on Amino-Substituted Acridizinium Salts – Synthesis and Exceptional Photochemical Properties

H. Ihmels, K. Faulhaber, K. Wissel, G. Bringmann, K. Messer, G. Viola, D. Vedaldi, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1157–1161.

Synthesis and Investigation of the DNA-Binding and DNA-Photodamaging Properties of Indolo-[2,3-b]-Quinolizinium Bromide

G. Bringmann, M. Münchbach, D. Feineis, K. Faulhaber, H. Ihmels, *Neuroscience Lett.*, **2001**, 304,41–44.

Studies on DNA Single-Stranded Scissions by 'TaClo' (1-trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline)

H. Ihmels, K. Faulhaber, C. Sturm, G. Bringmann, K. Messer, N. Gabellini, D. Vedaldi, G. Viola, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 74, 505–511.

Acridizinium Salts as a Novel Class of DNA-Binding and Site-Selective DNA-Photodamaging Chromophores

H. Ihmels, K. Faulhaber, G. Viola in *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications* (Hrsg.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, im Druck.

Evaluation of the DNA-binding properties of cationic dyes by absorption and emission spectroscopy

Poster

K. Faulhaber, C. Bohne, H. Ihmels, N. Gabellini, G. Viola: *On the mechanism of the photoinduced DNA damage of acridizinium derivatives*, XIXth IUPAC Symposium on Photochemistry, Budapest, 14.-19. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ERLÄUTERUNGEN UND ABKÜRZUNGEN	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	3
2.1 WECHSELWIRKUNG VON FARBSTOFFEN MIT DNA	3
2.1.1 Bindungsmoden	3
2.1.2 Methoden zum Nachweis der Wechselwirkung mit DNA	5
2.1.2.1 UV-Spektroskopie	5
2.1.2.2 CD-Spektroskopie	6
2.1.2.3 LD-Spektroskopie.....	6
2.1.2.4 Emissionsspektroskopie.....	8
2.2 PHOTOSENSIBILISIERTE DNA-SCHÄDIGUNG	8
2.2.1 Allgemeines	8
2.2.2 Mechanismen der photosensibilisierten DNA-Spaltung	9
2.2.2.1 Photosensibilisierung nach dem Typ-I-Mechanismus.....	9
2.2.2.2 Photosensibilisierung nach dem Typ-II-Mechanismus	9
2.2.2.3 DNA-Schäden durch Radikale	11
2.3 FARBSTOFFE ALS PHOTOSENSIBILATOREN.....	12
3 PROBLEMSTELLUNG.....	14
4 ERGEBNISSE	17
4.1 SYNTHESE DER CHINOLIZINIUMSALZE.....	17
4.1.1 Darstellung des Indolochinoliziniumbromids 10 (VS1).....	17
4.1.2 Synthese der aminosubstituierten Acridiziniumsalze 9c und 9h (VS2, VS3) ..	17
4.2 LÖSUNGSMITTELABHÄNGIGKEIT DER SPEKTROSKOPISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ANELLIERTEN CHINOLIZINIUMSALZEN.....	19
4.2.1 Allgemeines	19
4.2.2 Solvatochromie der Chinoliziniumsalze.....	20
4.2.2.1 Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften (V1, V2) 20	
4.2.2.2 Auswirkung der Zugabe von Halogenidionen auf die Fluoreszenzeigenschaften des 7-Aminoacridiziniums (V3).....	23
4.3 WECHSELWIRKUNG MIT DNA	24

4.3.1	Spektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung des Bindungsmodus	24
4.3.1.2	Spektrophotometrische Titrationsen (V5).....	24
4.3.1.3	CD-Spektroskopie (V6).....	26
4.3.1.4	LD-Spektroskopie (V7)	27
4.3.1.5	NMR-Spektroskopie (V8, V9)	29
4.3.2	Lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Chinoliziniumderivate.....	32
4.3.2.1	Indolochinolizinium (V10).....	32
4.3.2.2	Acridiziniumderivate	33
4.3.3	Untersuchungen zur Bestimmung des Strangbruchmechanismus.....	33
4.3.3.1	Fluoreszenzmessungen	33
4.3.3.2	Laserblitzspektroskopie	40
4.3.3.2.1	Zugabe von DNA und deren Komponenten	44
4.3.3.3	Auffinden reaktiver Intermediate unter anaeroben Bedingungen (V23).....	46
5	DISKUSSION	48
5.1	PHOTOPHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER CHINOLIZINIUMDERIVATE	48
5.2	WECHSELWIRKUNG MIT DNA	50
5.2.1	Bestimmung des Bindungsmodus	50
5.2.2	Lichtinduzierte DNA-Schädigung.....	54
5.2.2.1	Steady-state-Fluoreszenzspektroskopie.....	55
5.2.2.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen	57
5.2.2.3	Laserblitz-Transientenspektroskopie.....	58
6	EXPERIMENTALTEIL.....	65
6.1	ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN.....	65
6.1.1	Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen	65
6.1.2	Bestrahlungsapparaturen	66
6.1.3	Reagenzien, Lösungsmittel und Nucleotide	66
6.1.3	Arbeitsmethoden.....	67
6.2	SYNTHESE DER ACRIDIZINIUMDERIVATE.....	67
6.2.1	Indolochinolizinium (VS1).....	68
6.2.2	7-Aminoacridiziniumbromid (VS2)	69
6.2.3	10-Aminoacridiziniumbromid (VS3)	71
6.3	LÖSUNGSMITTELABHÄNGIGKEIT DER SPEKTROSKOPISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ACRIDIZINIUMSALZEN	71
6.3.1	Allgemeine Vorbemerkungen.....	71
6.3.2	Untersuchung der Solvatochromie	72
6.3.3	Fluoreszenzquantenausbeute in verschiedenen Lösungsmitteln	74
6.4	WECHSELWIRKUNG MIT DNA	76
6.4.1	Spektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung des Bindungsmodus	76
6.4.1.1	Allgemeine Vorbemerkungen.....	76
6.4.1.2	UV-Spektroskopie	77
6.4.1.3	CD-Spektroskopie	82
6.4.1.4	LD-Spektroskopie.....	82
6.4.1.5	NMR-Spektroskopie.....	84
6.4.2	Lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Acridiziniumderivate.....	87
6.4.2.1	Sicherheitsmaßnahmen und allgemeine Versuchsvorbereitung	87
6.4.2.2	Versuchsdurchführung und Auswertung	89

6.4.2.3	Strangbruchexperimente zur Quantifizierung der photoschädigenden Wirksamkeit.....	91
6.4.2.3.1	Indolochinolizinium.....	91
6.4.2.3.2	Acridiziniumderivate	91
6.4.3	Mechanistische Untersuchungen zur Bestimmung des Strangbruchmechanismus.....	92
6.4.3.1	Fluoreszenzmessungen	92
6.4.3.1.1	Spektrofluorimetrische Titrationsen mit DNA, Mononucleotiden und – nucleosiden	92
6.4.3.1.2	Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten.....	95
6.4.3.2	Laserblitzspektroskopie	95
6.4.3.2.1	Allgemeine Vorbemerkungen.....	95
6.4.3.2.2	Untersuchung der reinen Acridiziniumsalze	97
6.4.3.2.3	Zugabe von DNA und DNA-Komponenten	99
6.4.3.3	Auffinden reaktiver Intermediate unter anaeroben Bedingungen (V23)....	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	103

Erläuterungen und Abkürzungen

Oft genannte chemische Verbindungen sind im Text mit fettgedruckten arabischen Zahlen gekennzeichnet. Am Ende der Arbeit befindet sich eine Ausklapptafel, welche die zugehörigen Strukturformeln zeigt. Die Gegenionen der Chinoliziniumsalze **9** und **10** sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht immer angegeben. In der Regel wurden jedoch für die Untersuchungen der photophysikalischen Eigenschaften die entsprechenden Tetrafluoroborate und für Experimente Gegenwart von DNA die jeweiligen Bromide eingesetzt.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung vorangestellt, in der die Nummerierung der Verbindungen von der im Hauptteil verwendeten abweicht. Deshalb wurden die Strukturen hier mit römischen Zahlen gekennzeichnet.

Literaturhinweise sind mit hochgestellten arabischen Zahlen kenntlich gemacht. Das Literaturverzeichnis am Ende der Arbeit beinhaltet alle Literaturstellen. Für Fußnoten in den Tabellen sowie für wichtige Anmerkungen zum Text werden hochgestellte lateinische Buchstaben verwendet.

Im Ergebnisteil wird mit dem Kürzel „V-...“ auf die entsprechenden Versuche bzw. mit „VS...“ auf die entsprechenden Synthesen im Experimentalteil verwiesen. Dort sind auch die entsprechenden Eintragungen im Laborjournal angegeben (z. B. III-21-1). Dabei gibt die römische Zahl den Laborjournalband, die erste arabische Zahl die Seite und die zweite arabische Zahl die Versuchsnummer an.

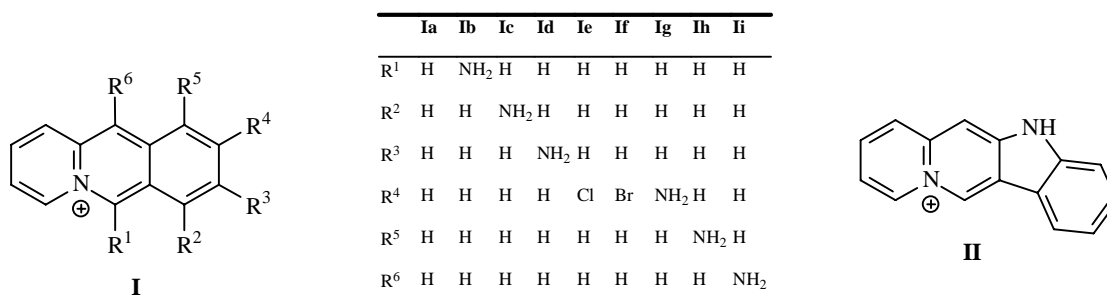
Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

A	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
AN	Akzeptornummer
C	Cytosin
dG	Desoxyguanosin
DN	Donornummer
DNA	Desoxyribonucleinsäure

G	Guanin
GMP	Guanosinmonophosphat
KT-DNA	Kalbsthymus DNA
8-oxo-dG	Oxo-7,8-dihydroguanosin
Poly[dA-dT]-Poly[dA-dT])	Polydesoxyadenylthymidylsäure
(Poly[dG-dC]-Poly[dG-dC])	Polydesoxyguanyldesoxycytidylsäure
Smp	Schmelzpunkt
ST-DNA	Salmon Testes DNA
T	Thymin
TMS	Tetramethylsilan
TSP	3-(Trimethylsilyl)propionsäure

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die anellierte Chinoliziniumderivate **Ia-i** und **II** synthetisiert und auf ihre Wechselwirkung mit DNA hin untersucht. Hierbei sollte in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster sowohl die Bindungsaffinität und der Bindungsmodus als auch der Mechanismus, der zur lichtinduzierten DNA-Schädigung führt, aufgeklärt werden.



Assoziation von Chinoliziniumderivaten an DNA

Zunächst wurde durch spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Titrations eine starke bindende Wechselwirkung ($10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$) aller Chinoliziniumsalze an DNA festgestellt. Hierbei treten in den Absorptionsspektren aller untersuchten Verbindungen isosbestische Punkte und eine ausgeprägte Hypochromie sowie eine bathochrome Verschiebung der langwelligen Absorptionmaxima auf. Die aus den spektrophotometrischen Titrations mit nativer DNA und mit den synthetischen Polynucleotiden (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) abgeleiteten Bindungskonstanten zeigen eine Bindungspräferenz der Chinoliziniumderivate für CG-Basenpaare. In den Emissionsspektren ist mit steigender DNA-Konzentration in der Regel eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, die durch einen Elektronentransfer zwischen dem angeregten Chinolizinium und den Nucleinbasen verursacht wird. Eine Ausnahme hiervon bildet das schwach fluoreszierende 6-Aminoacridizinium (**Ib**), bei dem ein signifikanter Anstieg der Emissionsintensität bei DNA-Zugabe zu beobachten ist. Dieser ist in Gegenwart von AT-Basenpaaren besonders ausgeprägt, so dass diese Verbindung eine neuartige Fluoreszenzsonde, eine sogenannte "light-up probe", zur Detektion und Markierung von AT-reichen Basensequenzen darstellt.

Weiterhin wurde der Bindungsmodus, mit dem die Chinoliziniumderivate an die DNA assoziieren, mit Circular dichroismus (CD)-, Lineardichroismus (LD)- und ¹H-NMR-

Spektroskopie untersucht. Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchungen des selbstkomplementären Dodecamers (5'-CGCGAATTCGCG-3') in Anwesenheit der Verbindungen **Ia**, **Ib** und **Ig** weisen auf einen intercalativen Bindungsmodus hin und bestätigen die Präferenz für die Bindung an CG-Basenpaare. Darüber hinaus geben Chinoliziniumsalze in Anwesenheit von DNA induzierte CD-Signale (ICD), deren Phase und Intensität auf eine vom Substitutionsmuster abhängige Orientierung der jeweiligen Derivate in der Bindungstasche schließen lässt. So weisen die Derivate **Ia** und **II** ein positives ICD-Signal auf. Unter Berücksichtigung eines entlang der langen Molekülachse polarisierten Übergangsdipolmoments lässt dies auf eine Bindungsgeometrie schließen, bei der die Moleküle mit ihrer langen Molekülachse senkrecht zur langen Achse der Basenpaare stehen. Das Aminoacridizinium **Ig** hingegen weist ein schwaches negatives Signal auf, was eine Orientierung der langen Molekülachse dieses Moleküls parallel zur langen Bindungstasche andeutet (Abbildung A).

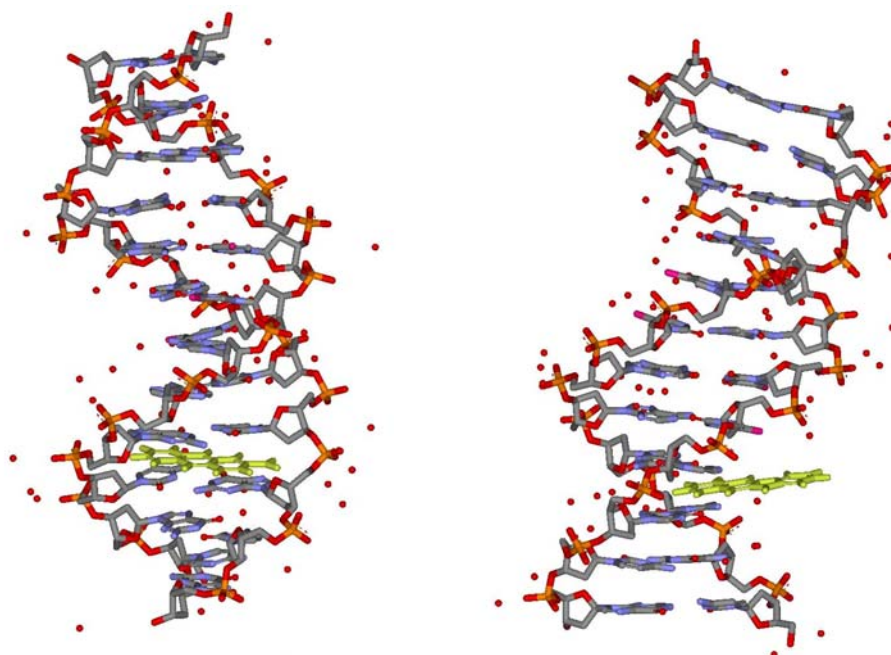


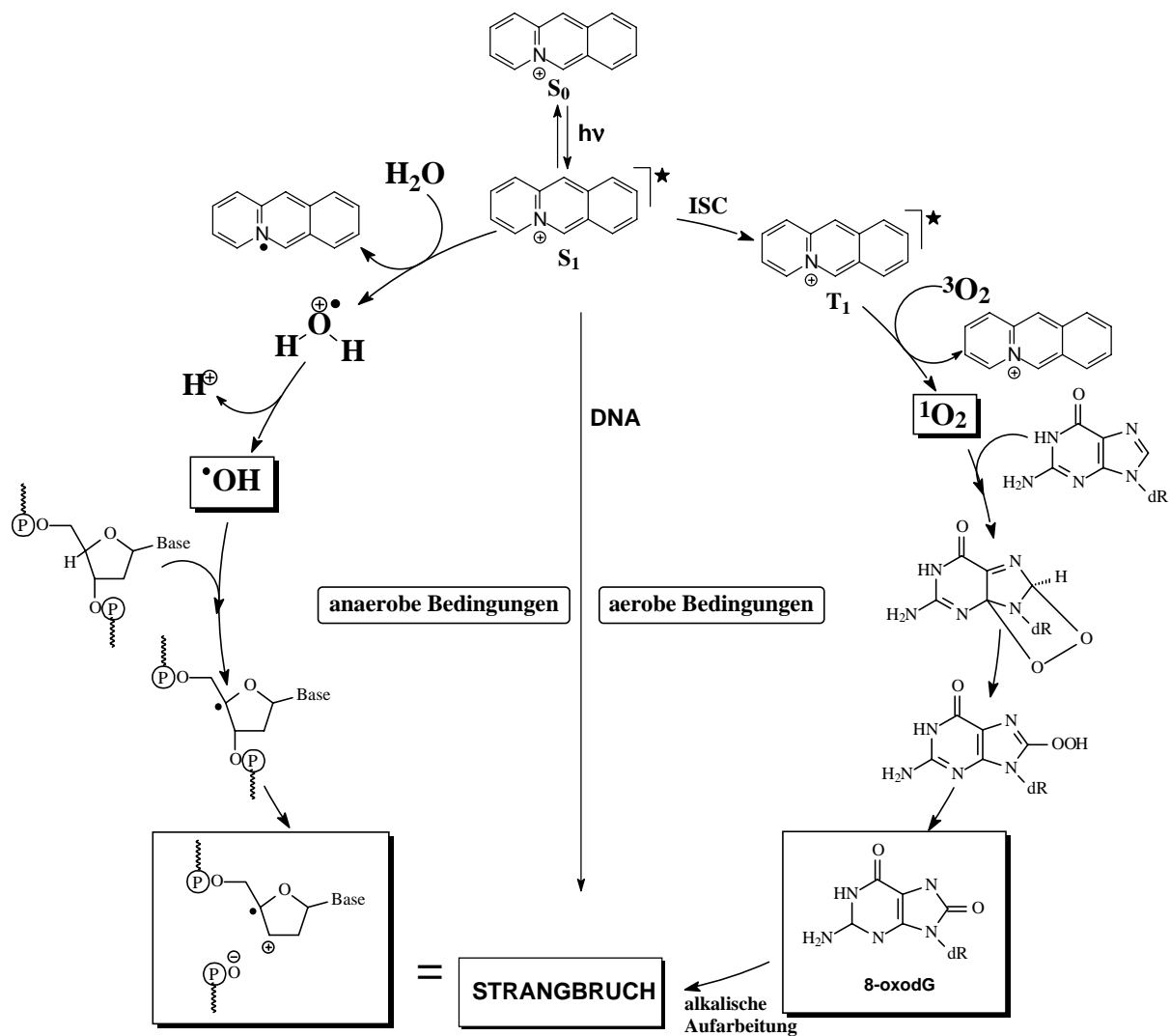
Abbildung A: Vermutliche Orientierung der Chinoliziniumsalze **Ia** (links) und **II** (rechts) in der bevorzugten Bindungstasche des Oligomers (5'-CGCGAATTCGCG-3')

Komplementär dazu bestätigen die LD-spektroskopischen Untersuchungen den intercalativen Bindungsmodus der Chinoliziniumderivate, jedoch weisen die so genannten reduzierten LD-Spektren, die die Wellenlängenabhängigkeit und damit die Homogenität der Bindung angeben, darauf hin, dass bei den Derivaten **Ia**, **Ic**, **Id**, **Ie** und **If** in geringem Ausmaß auch ein anderer Bindungsmodus (Furchenbindung, Rückgratassoziation) zum Tragen kommt.

Obwohl die Bindungseigenschaften aller untersuchten Chinoliziniumderivate mit DNA leicht variieren, konnte bei den Aminoacridiziniumsalzen keine eindeutige Korrelation zwischen der Position der Aminofunktionalität und den Bindungseigenschaften abgeleitet werden. Vermutlich weisen die untersuchten aminosubstituierten Acridiziniumsalze im Wesentlichen die gleichen qualitativen Wechselwirkungen mit DNA auf. Bei dem tetracyclischen Indolochinolizinium **II** findet aufgrund der stärkeren π - π -Wechselwirkungen mit den DNA-Basen eine stärkere Bindung mit der DNA statt als bei den meisten tricyclischen Acridiziniumderivaten.

Photosensibilisierte DNA-Schädigung in Gegenwart von Chinoliziniumsalzen

Bei Bestrahlung von DNA in Gegenwart von Chinoliziniumderivaten kann in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster eine DNA-Schädigung induziert werden. Diese ist unter anaeroben Bedingungen auf Wasserstoffabstraktion am Zuckerphosphatrückgrat durch Hydroxylradikale zurückzuführen (Schema A). Die Bildung von Hydroxylradikalen bei Bestrahlung der Chinoliziniumderivate **Ia** und **If** in wässriger Lösung wurde hierbei durch die Abfangreaktion mit Terephthalsäure nachgewiesen. Das Hydroxylradikal wird durch eine photoinduzierte Elektronentransferreaktion zwischen dem Chinoliziniumderivat und Wasser eingeleitet. Folglich steigt die Strangbrucheffizienz des Chinoliziniumsalzes mit seinem Reduktionspotential im angeregten Zustand an. Diese photosensibilisierte Generierung von Hydroxylradikalen ist eine neuartige und überaus milde Methode, die zur gezielten DNA-Schädigung genutzt werden kann. Die Ergebnisse von laserblitzspektroskopischen Studien zeigen, dass die Triplettenenergie der untersuchten Chinoliziniumsalze mit 159-219 kJ/mol deutlich über der von Sauerstoff (94 kJ/mol) liegen, so dass ein Energietransfer möglich ist. Die Reaktion des angeregten Tripletzustands mit Sauerstoff wurde mit zeitaufgelöster Transientenabsorptionsspektroskopie belegt. Der Singulett-Sauerstoff oxidiert im weiteren Verlauf der Reaktion nach einem bekannten Mechanismus die Guanosineinheiten zu 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin. Bei alkalischer Behandlung führt diese Basenoxidation zum DNA-Strangbruch (Schema A).

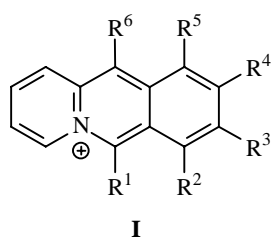


Schema A: Mechanismen zur lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Chinoliziniumsalze unter aeroben und anaeroben Bedingungen

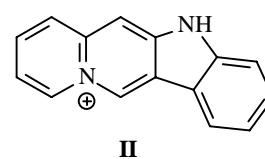
Fazit: Mit den Chinoliziniumderivaten I und II wurde eine neue Klasse von CG-selektiven DNA-Intercalatoren erschlossen, deren Bindungsaffinität und photoschädigende Wirksamkeit vom Substitutionsmuster abhängt. Die photosensibilisierte Induktion von DNA-Schäden erfolgt unter aeroben Bedingungen durch Singulett-Sauerstoff, während unter anaeroben Bedingungen Hydroxylradikale als reaktive Intermediate über eine Wasserstoffabstraktion am Zuckerphosphatrückgrat zu Strangbrüchen führen.

Summary

In this thesis the interaction of annelated quinolizinium salts **Ia-i** and **II** with DNA was investigated. The studies were focussed on the influence of the quinolizinium substitution pattern on the binding affinity and binding mode as well as on the mechanism of the photoinduced DNA-damage.



	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	Ih	Ii
R ¹	H	NH ₂	H	H	H	H	H	H	H
R ²	H	H	NH ₂	H	H	H	H	H	H
R ³	H	H	H	NH ₂	H	H	H	H	H
R ⁴	H	H	H	H	Cl	Br	NH ₂	H	H
R ⁵	H	H	H	H	H	H	H	NH ₂	H
R ⁶	H	H	H	H	H	H	H	H	NH ₂



Association of quinolizinium derivatives with DNA

Spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations revealed a strong binding interaction ($K = 10^4$ - 10^5 M^{-1}) of all quinolizinium derivatives with DNA. In the absorption spectra, isosbestic points, a significant hypochromicity and a bathochromic shift of the characteristic absorption bands were observed upon addition of DNA. The binding constants derived from the spectrophotometric titrations with native DNA and with the synthetic polynucleotides (poly[dAdT]-poly[dAdT]) and (poly[dCdG]-poly[dCdG]) showed a clear binding preference for CG base pairs. The addition of DNA to the compounds **I** and **II** resulted in a strong fluorescence quenching due to an electron transfer between the excited chromophore and the nucleic bases. Nevertheless, the emission intensity of 6-aminoacridizinium (**Ib**) significantly increases in the presence of DNA. Most notably, this effect is especially pronounced in the presence of AT base pairs. Therefore this compound constitutes a novel fluorescence probe to mark and to detect AT base pairs.

Moreover, the binding mode of the quinolizinium derivatives with DNA was investigated by circular-dichroism (CD), linear-dichroism (LD), and ¹H-NMR spectroscopy. The ¹H-NMR spectra in the presence of the dodecamer (5'-CGCGAATTCGCG-3') clearly indicate an intercalative binding mode and confirm the binding preference to CG base pairs. In the presence of DNA, a CD signal is induced in the absorption region of the quinolizinium derivatives. The shape of this induced CD signal (ICD) depends on the substitution pattern of

the investigated compounds and indicates a different orientation of the compounds in the binding pocket. The derivatives **Ia** and **II** show a positive ICD and a transition moment along the long molecular axis. This indicates an intercalative binding with the long molecular axis perpendicular to the long axis of the binding pocket. By contrast, the 9-aminoacridizinium (**Ig**) gives a negative ICD that indicates binding with the long molecular axis parallel to the intercalation pocket (Figure A).

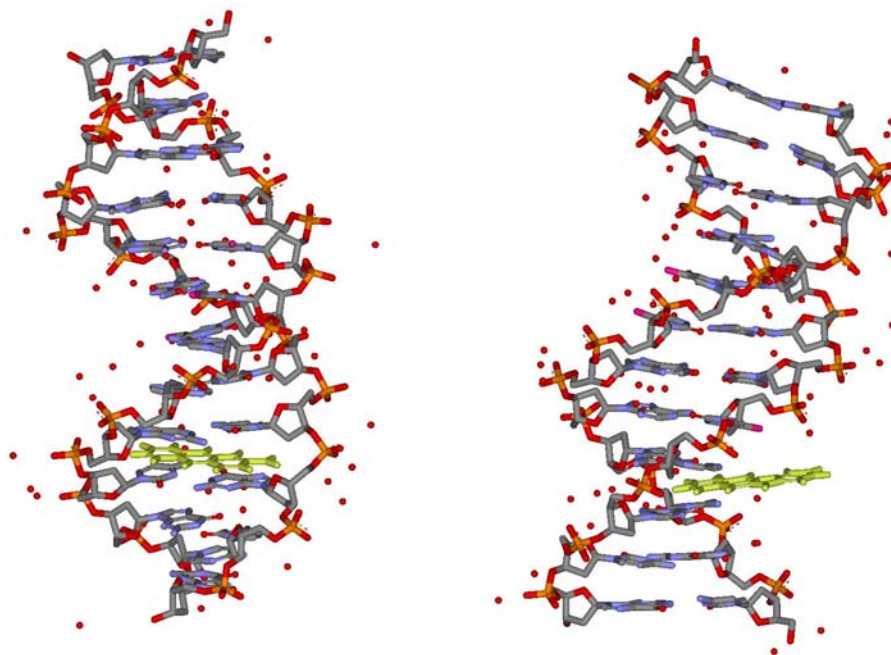


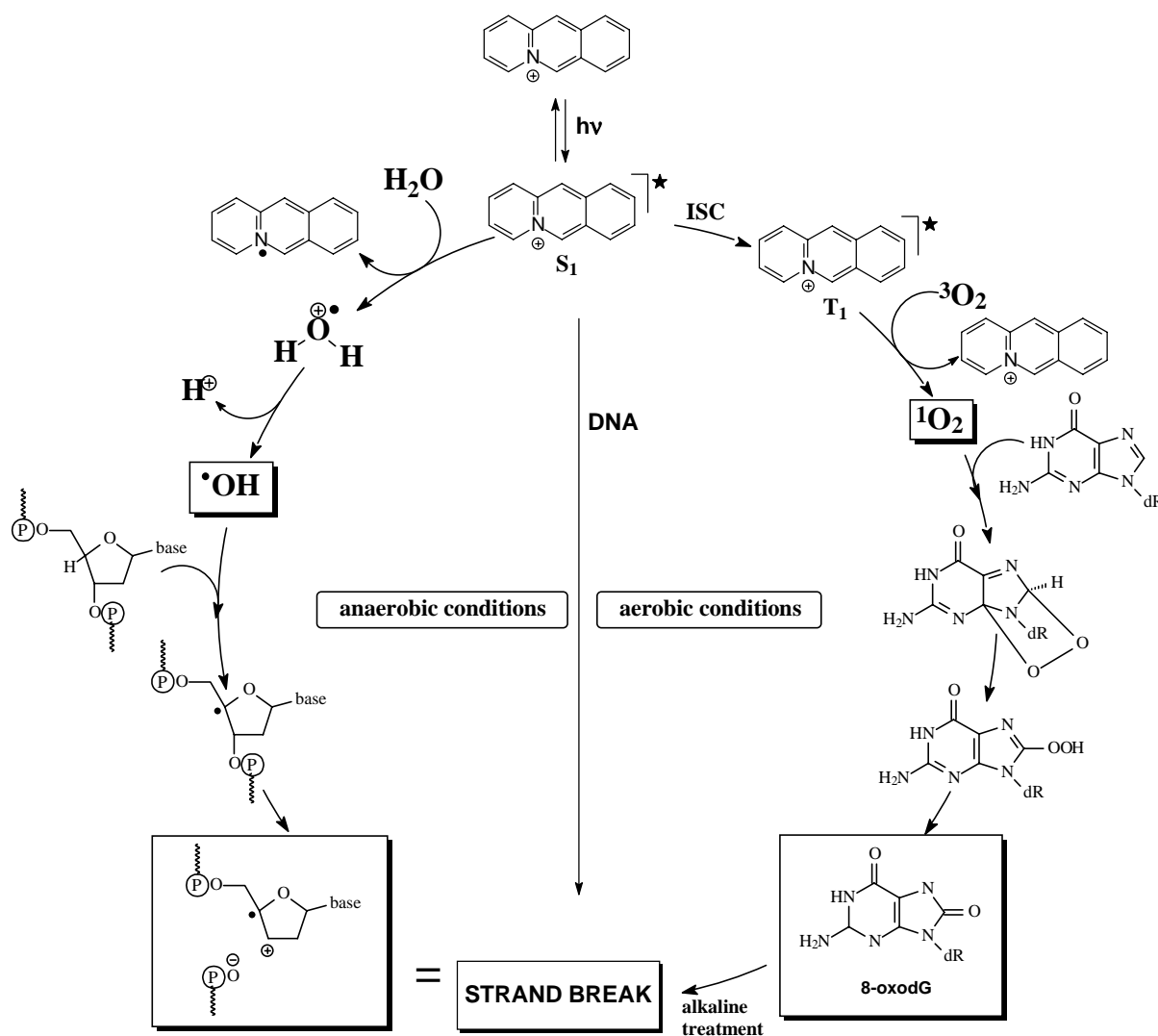
Figure A: Proposed orientation of quinolizinium salts **Ia** (left side) and **II** (right side) in the preferred binding pocket of the dodecamer (5'-CGCGAATTCGCG-3')

Additionally, the LD spectra of these compounds in the presence of DNA confirm the intercalative binding mode. However, a minor binding mode (groove binding or external association) was observed for the derivatives **Ia**, **Ic**, **Id**, **Ie**, and **If** was shown with the reduced LD spectra, which reveal wavelength dependency of the LD signal and, thus, the inhomogeneity of the binding mode in these cases.

Although the binding properties of compounds **I** and **II** with DNA are slightly different, a correlation between the position of the amino substituent and the binding properties could not be deduced for the amino-substituted acridizinium salts. Thus, it may be concluded that all amino-substituted acridizinium salts essentially exhibit the same binding properties. Because of stronger π - π -interactions with the nucleic bases, the tetracyclic indoloquinolizinium **II** shows a higher binding affinity to DNA than most of the tricyclic acridizinium derivatives.

Photoinduced DNA damage by quinolizinium derivatives

Upon irradiation of DNA in the presence of quinolizinium derivatives, strand breaks were induced, which depend on the substitution pattern of the quinolizinium. Under anaerobic conditions, hydrogen-atom abstraction from the deoxyribose by hydroxyl radicals takes place (scheme A).



Scheme A: Photoinduced DNA damage by quinolizinium derivatives under aerobic and anaerobic conditions

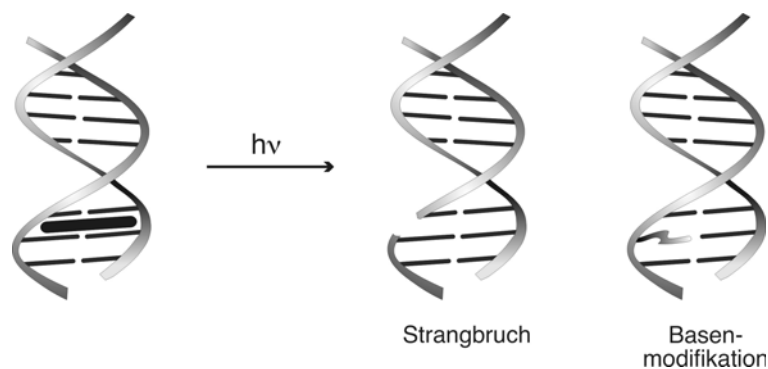
The generation of the hydroxyl radicals upon irradiation of quinolizinium derivatives in water was confirmed by trapping reactions with terephthalic acid. The generation of the hydroxyl radical results from a photoinduced electron transfer between the quinolizinium and water. For this reason the efficiency of the photoinduced DNA depends on the reduction potential of

the excited quinolizinium. This photosensitized generation of hydroxyl radicals is a novel and especially mild method to damage DNA. The triplet energies of the quinolizinium derivatives, determined by laser flash photolysis, reveal that the triplet energy of the quinolizinium salts is between 159 and 219 kJ/mol and, thus, significantly larger than the one of molecular oxygen (94 kJ/mol), so that an energy transfer is possible. The reaction of the excited triplet state with molecular oxygen was confirmed by time-resolved transient absorption spectroscopy. Subsequently, the resulting singlet oxygen oxidizes the guanosine units to 8-oxo-7,8-dihydroguanosine according to the known mechanism. After alkaline treatment this base modification eventually leads to a DNA cleavage (scheme A).

Conclusion: Quinolizinium derivatives I and II were shown to represent a novel class of DNA intercalators, whose binding affinity and DNA photodamaging properties depend on the substitution pattern. Under aerobic conditions, the photoinduced DNA lesions are caused by singlet oxygen. By contrast, under anaerobic conditions hydroxyl radicals are formed, which abstract hydrogen atoms from the sugar-phosphate backbone leading to frank DNA strand breaks.

1 Einleitung

Ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet ist die Untersuchung der Wechselwirkung synthetischer organischer Moleküle mit Biomolekülen und deren Auswirkung auf den menschlichen Organismus. Vor allem den Wechselwirkungen mit DNA und den dadurch hervorgerufenen Veränderungen des Erbmaterials wird hierbei großes Interesse entgegengebracht.¹ Die Bindung eines Moleküls an die DNA führt zu einer signifikanten Veränderung der DNA-Struktur und kann deshalb die physiologischen Funktionen der DNA, wie z.B. die Genexpression, stark beeinflussen.² Diese Komplexbildung kann im Extremfall zum Zelltod oder zum unkontrollierten Zellwachstum führen und damit schädliche Auswirkungen auf den Organismus haben. Verläuft die Assoziation eines Gastmoleküls an die DNA mit einer hinreichenden Selektivität, so kann die Unterdrückung der Proteinbiosynthese andererseits auch konstruktiv genutzt werden, um beispielsweise Tumore oder andere krankhaft veränderte Gewebe zu zerstören, ohne dabei gesunde Zellverbände zu beeinflussen. Mit diesem Ziel beschäftigt sich vor allem die Photobiologie. Denn die Bestrahlung von DNA in Anwesenheit eines DNA-bindenden Moleküls kann durch die Induktion eines Strangbruches oder einer Basenmodifikation häufig zu irreversiblen Schädigungen der Nucleinsäure führen (Schema 1.1).³



Schema 1.1: Photoinduzierte DNA-Schädigung in Gegenwart eines DNA-bindenden Moleküls

Derartige lichtinduzierte Prozesse können therapeutisch genutzt werden. So kann beispielsweise mit Mikroorganismen kontaminiertes Spenderblut in Gegenwart von Methylenblau (**1a**) aufgereinigt werden, ohne die Erythrocyten zu beschädigen.⁴ Ebenso zeigen der Farbstoff Methylviolett (**1b**) und dessen Derivate unter Bestrahlung eine selektive Reaktivität gegenüber viraler DNA.⁵ Zur Behandlung der Schuppenflechte haben sich Psoralen (**2**) und seine Derivate bewährt. Diese lagern sich zwischen die DNA-Basen ein und

gehen nach UVA-Bestrahlung eine [2+2]-Cycloaddition mit den Pyrimidinbasen ein, was die physiologische Wirksamkeit dieser Substanz bedingt.⁶ Ein weiteres Anwendungsgebiet derartiger photosensibilisierter DNA-Abbaureaktionen ist die photodynamische Chemotherapie (PDT),⁷ bei der unerwünschte Zellen in Gegenwart eines Sensibilisators zerstört werden.

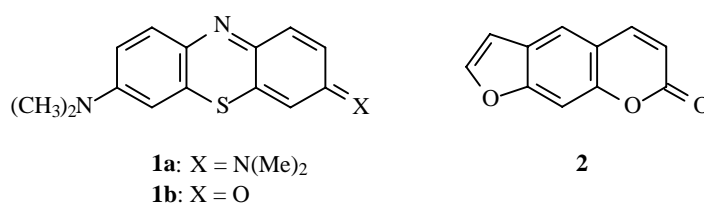


Abbildung 1.1: Strukturen der physiologisch aktiven DNA-Photosensibilisatoren Methylenblau (**1a**), Methylviolett (**1b**) und Psoralen (**2**)

Die oben angeführten Darstellungen machen deutlich, dass die Strukturmodifikation von Nucleinsäuren mit Hilfe bindender und photoschädigender Farbstoffe ein biologisch und medizinisch relevanter Prozess ist und dass ein Bedarf an neuartigen DNA-bindenden und DNA-photoschädigenden Verbindungen besteht, die es erlauben, diese Prozesse mit hinreichender Selektivität und Effizienz durchzuführen.

2 Kenntnisstand

2.1 Wechselwirkung von Farbstoffen mit DNA

2.1.1 Bindungsmoden

Im Allgemeinen können drei Bindungsmoden zwischen Gastmolekülen und der DNA unterschieden werden: Intercalation parallel zu den Basenpaaren der Doppelhelix, Bindung in der großen oder der kleinen Furche der DNA (Abbildung 2.1), und Assoziation am Zuckerphosphatrückgrat der DNA. Diese letztgenannte externe Bindung ist ausschließlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenen Substrat und dem negativ geladenen Zuckerphosphatrückgrat der DNA zurückzuführen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Intercalation und der Furchenbindung um eine supramolekulare Assoziation zwischen dem Gastmolekül und der DNA, dessen Zusammenhalt durch π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen gewährleistet wird.



Intercalation



Furchenbindung

Abbildung 2.1: Assoziation eines Gastmoleküls an die DNA durch Intercalation und Furchenbindung

Die Basenpaare in der DNA sind annähernd coplanar angeordnet. Diese Anordnung ermöglicht es planaren aromatischen Polycyclen, zwischen zwei Basenpaaren zu intercalieren.⁸ Die Triebkraft für diesen Bindungsmodus sind π - π -, Dipol-Dipol- und Dispersionswechselwirkungen zwischen dem Gastmolekül und den Nucleinbasen. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsmoden hat die Intercalation einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Struktur. Damit sich ein Molekül zwischen zwei Basenpaare einlagern kann,

muss sich die Helix aufwinden. Diese Aufwindung hat sowohl eine Verlängerung der Helix als auch eine Änderung der Konformation der Desoxyriboseeinheiten zur Folge.^{1c} Weiterhin wurde beobachtet, dass die Bindung eines Intercalators zwischen zwei Basenpaaren die Bindung eines weiteren Gastmoleküls zwischen den benachbarten Basenpaaren verhindert. Obwohl dieses so genannte „Nachbarausschlussprinzip“ noch nicht vollständig verstanden ist, geht man davon aus, dass die sterische Hinderung, die aus der Konformationsänderung der DNA resultiert, der Grund für diese Beobachtung ist.

Zwischen den beiden Zuckerphosphatsträngen der Doppelhelix bilden sich eine kleine und eine große Furche aus. Während relativ große Moleküle wie z. B. Proteine bevorzugt in die große Furche binden,^{1c} ist die kleine Furche in der Regel die Bindungsstelle für kleinere Moleküle.^{1c,9} Typische Furchenbinder, wie zum Beispiel das in der großen Furche assoziierende Methylgrün (3)¹⁰ und die in der kleinen Furche bindenden Chromophore DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindol (4)]¹¹ und Distamycin (5)¹² (Abbildung 2.2), bestehen meist aus mindestens zwei aromatischen oder heteroaromatischen Ringen, die über ihre flexible Verbindung eine halbmondförmige Struktur aufweisen, was eine Anpassung an die Windung der Helix ermöglicht. Darüber hinaus weisen Furchenbinder in der Regel Substituenten wie beispielsweise Amidin- oder Guanidinfunktionalitäten auf, die mit den DNA-Basen, die tief in der Furche liegen, bindende Wechselwirkungen eingehen. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen ermöglichen eine starke Bindung in der jeweiligen Furche.

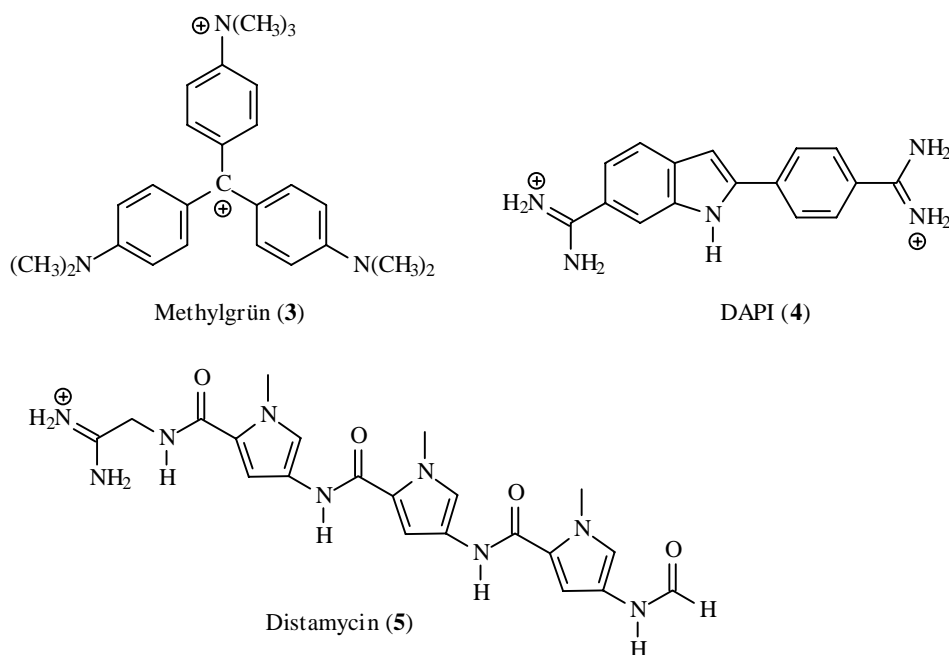


Abbildung 2.2: Beispiele für Verbindungen, die in den Furchen der DNA assoziieren

Die meisten Furchenbinder binden bevorzugt in AT-reichen Nucleotidsequenzen, da in diesen Bindungstaschen einerseits das elektrostatische Potential höher als in CG-reichen Sequenzen ist und weiterhin keine sterische Hinderung durch in die Furche ragende Substituenten (wie bei CG-Basenpaaren die Aminogruppe des Guanins) stattfindet. CG-selektive Furchenbinder zeichnen sich durch Substituenten aus, die mit der Aminogruppe des Guanins Bindungen eingehen können.¹³

2.1.2 Methoden zum Nachweis der Wechselwirkung mit DNA

In einem Komplex zwischen einem Wirt- und einem Gastmolekül zeigen sowohl die DNA als auch das Gastmolekül andere physikalische Eigenschaften als die jeweiligen unkomplexierten Verbindungen. Deshalb ist es möglich, eine Komplexbildung durch die Änderung bestimmter physikalischer Eigenschaften zu verfolgen. In vielen Fällen ist diese Änderung abhängig vom Bindungsmodus, weshalb Furchenbinder und Intercalatoren oft leicht unterschieden werden können. Zur Verfolgung der Änderungen der DNA-Eigenschaften bei der Komplexbildung sind die Messung der Viskosität, des Sedimentationskoeffizienten und der Schmelztemperatur hilfreiche Methoden.¹⁴ Vor allem durch die hydrodynamischen Messungen der Viskosität und des Sedimentations-Koeffizienten können Intercalatoren leicht von Furchenbindern unterschieden werden, da erstere durch die Assoziation die DNA-Struktur signifikant ändern und deshalb einen großen Einfluss auf die genannten DNA-Eigenschaften haben. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften aromatischer Farbstoffe bieten sich vor allem spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Methoden an, da die Assoziation an die Nucleinsäure meist eine signifikante Änderung der Absorptions- und Emissionseigenschaften des Gastmoleküls hat.

2.1.2.1 UV-Spektroskopie

In einem Komplex mit DNA befindet sich das Gastmolekül in einer Umgebung, die sich signifikant von der des freien Moleküls in Lösung unterscheidet. In vielen Fällen zeigen DNA-gebundene Moleküle andere Absorptionseigenschaften als in unkomplexierter Form, was vor allem bei solvatochromen organischen Farbstoffen häufig zu beobachten ist. Hierbei hat die Zugabe von DNA zu einer Lösung des Gastmoleküls meist eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums und eine signifikante Abnahme der Absorption

(Hypochromie) zur Folge.¹⁵ Weiterhin werden bei spektrophotometrischen Titrationsen mit DNA häufig isosbestische Punkte beobachtet, was darauf hinweist, dass nur zwei unterschiedliche absorbierende Spezies vorliegen, die im Gleichgewicht miteinander stehen.^{15b} Da in der Regel die Gastmoleküle je nach Bindungsmodus unterschiedliche Absorptionseigenschaften haben, weist ein isosbestischer Punkt auch darauf hin, dass ein Bindungsmodus bevorzugt wird.¹⁶

2.1.2.2 CD-Spektroskopie

Achirale organische Farbstoffe geben kein CD-Signal. Wenn ein Farbstoff jedoch in die chirale Umgebung einer Nucleinsäure gebracht wird, so findet bei entsprechend starker Bindung an die DNA eine nicht-degenerative Kopplung der Absorptionsübergänge des Farbstoffchromophors und der Nucleinbasen statt, die ein induziertes CD-Signal (ICD) im Bereich der Farbstoffabsorption zur Folge hat.¹¹ Derartige ICD-Signale werden in der Regel genutzt, um die nicht-kovalent bindende Wechselwirkung von organischen und metallorganischen Verbindungen an die DNA zu belegen. Weiterhin geben induzierte CD-Signale Aufschluss über die Lage des Liganden in der DNA, da sowohl die Intensität als auch die Phase des ICD von der Position und der Orientierung des Gastmoleküls relativ zu den Nucleinbasen abhängig ist. Im Allgemeinen weist ein Intercalator ein schwaches negatives ICD-Signal auf, wenn sein Übergangsdipolmoment entlang der langen Achse der Bindungstasche polarisiert ist. Andererseits ist die ICD-Bande positiv und relativ stark ausgeprägt, wenn das entsprechende Dipolmoment senkrecht zu dieser Achse steht. Furchenbinder zeigen in der Regel ebenfalls sehr stark ausgeprägte positive ICD-Signale.

2.1.2.3 LD-Spektroskopie

Mit der CD-Spektroskopie lassen sich zwar assoziative Wechselwirkungen von Farbstoffen mit DNA nachweisen, jedoch ist es bislang in den meisten Fällen noch nicht möglich, aus den CD-spektroskopischen Daten den konkreten Bindungsmodus zweifelsfrei abzuleiten. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen der Assoziation eines Moleküls an das Phosphatrückgrat der DNA, der Einlagerung in die große oder kleine Furche der DNA und der Intercalation in das Biomolekül kann in den meisten Fällen mit Hilfe von LD-Spektroskopie (LD = Lineardichroismus) gemacht werden.¹⁷ Dabei wird die differentielle Absorption von linear polarisiertem Licht bestimmt, dessen eine Polarisationssebene parallel und dessen andere

senkrecht zu einer definierten Referenzachse ausgerichtet ist.^{11,17} Um ein LD-Signal zu erhalten, muss jedoch die zu untersuchende Verbindung zumindest teilweise relativ zu einer Referenzachse ausgerichtet sein. Dazu legt man in der Regel ein elektrisches Feld an oder nutzt das hydrodynamische Feld einer rotierenden Küvette ("flow dichroism", Abbildung 2.3).¹⁸

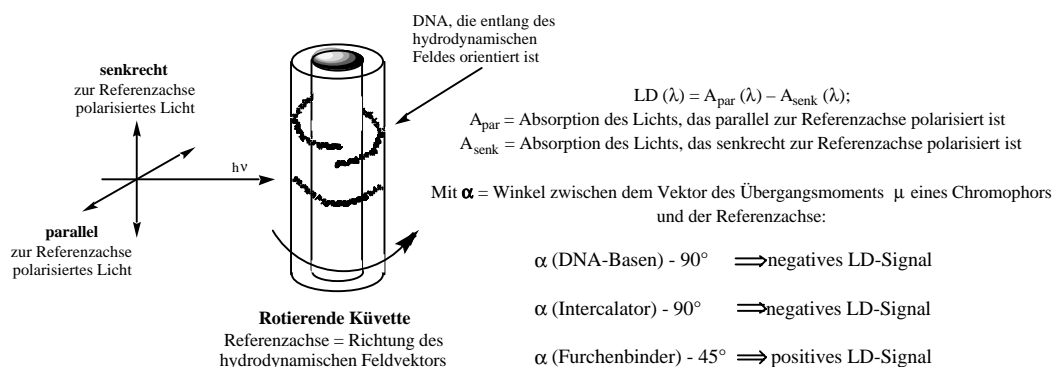


Abbildung 2.3: Skizze des Aufbaus zur Bestimmung von "flow"-Lineardichroismus und Definition der Parameter LD und α .

Der Vektor der hydrodynamischen Feldlinien wird dann als Referenzachse definiert. Die Phase des Signals eines Chromophors ist bei der Absorption von linear-polarisiertem Licht von der Orientierung des Übergangsdipolmomentes zur Ebene des polarisierten Lichtes abhängig.^{11,17} Chromophore, deren Vektor des elektronischen Übergangsdipolmomentes in einem Winkel $\alpha > 55^\circ$ zur Referenzachse steht, ergeben ein negatives Signal für diese Absorption. Übergänge, deren Vektor in einem kleineren Winkel zur Referenzachse stehen, ergeben positive LD-Signale.^{11,17} Kleine Moleküle richten sich normalerweise nicht in einem hydrodynamischen Feld aus. Da jedoch die DNA als Makromolekül teilweise entlang der Feldlinien orientiert ist, sind die Nucleinbasen und damit auch parallel zu den Basen intercalierte Moleküle annähernd senkrecht zur Referenzachse ausgerichtet ($\alpha \approx 90^\circ$). Moleküle, die in den Furchen der DNA eingelagert sind, weisen dagegen eine andere Ausrichtung zur Referenzachse auf ($\alpha \approx 45^\circ$).

Weil unter diesen Bedingungen bei der räumlichen Fixierung einer aromatischen Verbindung durch Intercalation zwischen die DNA-Basenpaare ein negatives LD-Signal zu detektieren ist, während rückgratassoziierte Moleküle ein positives LD-Signal mit geringerer Intensität ergeben, kann durch die Untersuchung der Phase des LD-Signals zwischen Intercalation und Rückgratassoziation unterschieden werden.^{11,17}

2.1.2.4 Emissionsspektroskopie

Auch die Emissionseigenschaften eines fluoreszierenden oder phosphoreszierenden Moleküls können durch die Anwesenheit von DNA signifikant beeinflusst werden. Meist sind eine bathochrome Verschiebung und eine signifikante Änderung der Emissionsintensität zu beobachten. Hierbei ist sowohl eine Erhöhung als auch eine Abnahme der Intensität möglich.¹⁹ Vor allem diejenigen Farbstoffe, deren Fluoreszenzintensität durch die Bindung an DNA stark zunimmt, haben als Detektormoleküle oder DNA-Sonden ein hohes Anwendungspotential. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das in der Molekularbiologie zur Detektion von DNA eingesetzte Ethidiumbromid (6). Andererseits zeigen viele Farbstoffe in Anwesenheit von DNA eine signifikante Fluoreszenzabnahme, die in der Regel auf Elektronen-, Energie- oder Wasserstofftransfer zwischen dem gebundenen Farbstoff und der DNA zurückzuführen ist.¹⁹ Da organische Farbstoffe bei höheren Wellenlängen als die Nucleinbasen absorbieren, ist ein Energietransfer energetisch nicht begünstigt. In den meisten Fällen ist ein Elektronentransfer zwischen dem angeregten Chromophor und der DNA für die Löschung der Fluoreszenz verantwortlich. Da Guanin das niedrigste Oxidationspotential der Nucleinbasen aufweist,²⁰ ist meist diese Base am Elektronentransfer beteiligt.

2.2 Photosensibilisierte DNA-Schädigung

2.2.1 Allgemeines

Allgemein wird bei DNA-Schädigungen zwischen Schäden an den DNA-Basen und Schäden am Zuckergerüst der DNA unterschieden.^{3b,3c} Basenmodifikationen sind der Ursprung von DNA-Mutationen und damit von Fehlern in physiologischen Prozessen wie der Proteinbiosynthese oder der DNA-Replikation, was oft letale Effekte zur Folge hat. Eine Schädigung der Desoxyribose ruft dagegen meist den Bruch des DNA-Stranges und/oder den Verlust einer Base hervor, was wiederum ähnliche Auswirkungen wie die Basenmodifikation hat.

Photosensibilisatoren sind Verbindungen, deren angeregte Zustände chemische Reaktionen initiieren können, die schließlich zu DNA-Strangbrüchen führen können. Die Bestrahlung einer Reihe von Verbindungen, von Ketonen über metallorganische Komplexe bis hin zu polycyclischen Heteroaromaten, kann in Gegenwart von DNA zur Spaltung des Phosphatrückgrates oder zu einer Basenoxidation führen.^{3a,6} Hierbei wird grundsätzlich

zwischen zwei Kategorien von Photosensibilisatoren unterschieden: Eine Reihe von Verbindungen initiieren bei der Photoreaktion mit der DNA Strangbrüche, die ohne weitere Behandlung der DNA in einem neutralen Agarosegel detektiert werden können (freie Strangbruchstellen). Andere Verbindungen schädigen nur die Basen der DNA, ohne dass es sofort zu einem Strangbruch kommt. Erst eine Behandlung mit basischen Verbindungen wie Piperidin oder Anilin bewirkt unter aeroben Bedingungen die in der Photoreaktion entstandenen Schäden durch Strangbrüche (alkalilabile Strangbruchstellen).

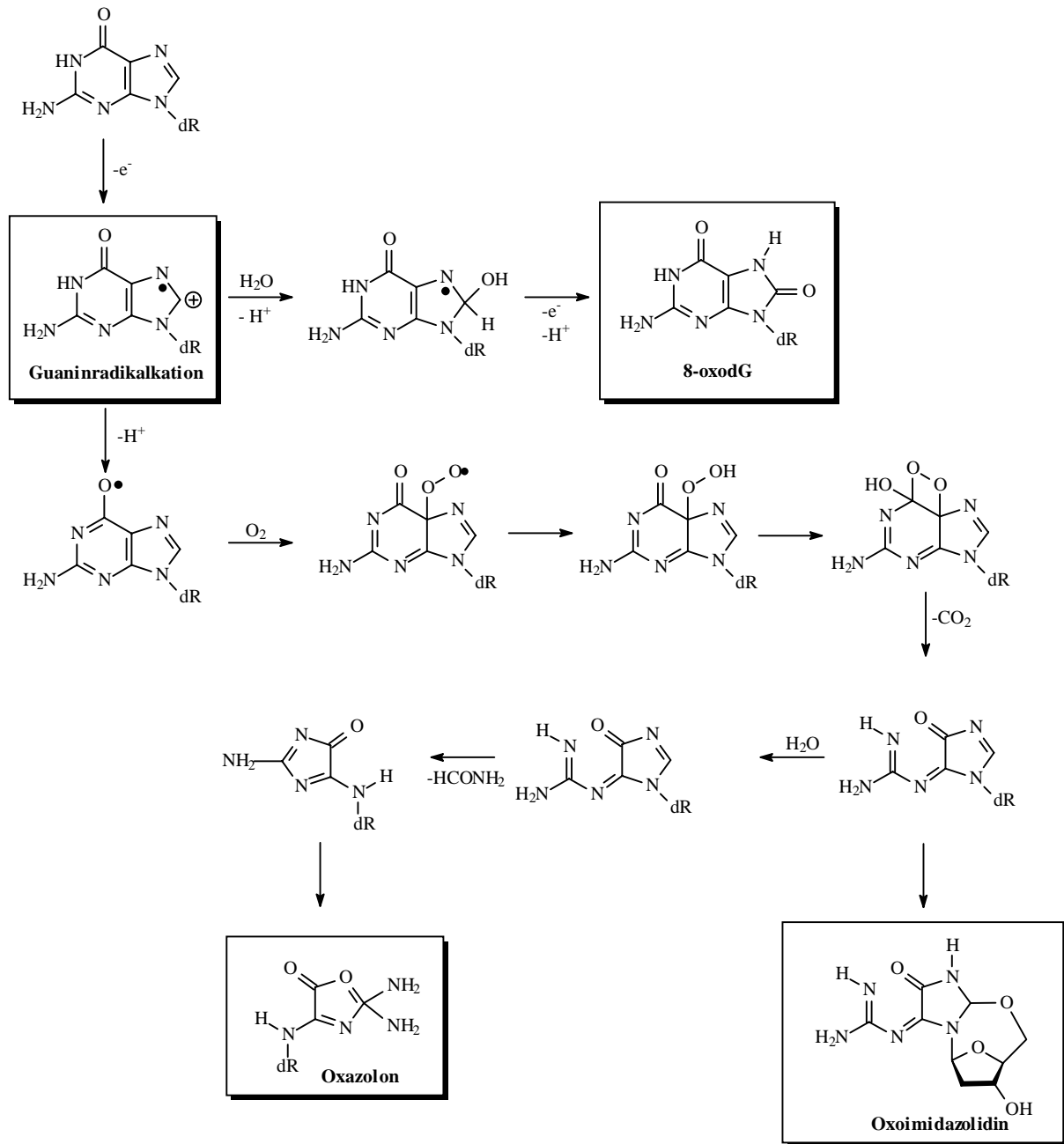
2.2.2 Mechanismen der photosensibilisierten DNA-Spaltung

2.2.2.1 Photosensibilisierung nach dem Typ-I-Mechanismus

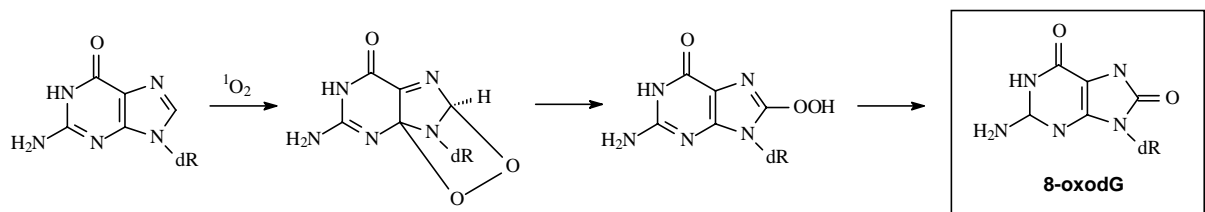
Wird ein endogener oder exogener Sensibilisator in Anwesenheit von DNA bestrahlt, so kann er im angeregten Zustand mit der DNA reagieren. Hierbei kann der angeregte Sensibilisator mit den Nucleinbasen entweder über H-Abstraktion oder über Elektronentransfer reagieren.²¹ Da Guanin das niedrigste Oxidationspotential der Nucleinbasen aufweist, wird es besonders leicht durch Typ-I-Sensibilisatoren zum Guaninradikalkation oxidiert (Schema 2.1). Nach der Deprotonierung des entstandenen Guaninradikalkations erfolgt die Bildung des neutralen Guaninradikals. Dieses kann nach Addition von molekularem Sauerstoff zu Oxazolone²² und Oxoimidazolidinderivaten²³ weiterreagieren.²⁴ Weiterhin kann das Guaninradikalkation durch die Addition von Wasser und nachfolgende Oxidation und Deprotonierung zu 8-oxodG umgesetzt werden.

2.2.2.2 Photosensibilisierung nach dem Typ-II-Mechanismus

Überträgt der angeregte Sensibilisator seine Energie auf molekularen Triplett-Sauerstoff, so entsteht unter Erhaltung des Gesamtpins elektronisch angeregter Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Dieser Energietransfer kann nur dann stattfinden, wenn die Triplett-Energie des Sensibilisators energetisch höher liegt als der Triplett-Zustand des Sauerstoffs (94 kJ/mol).²⁵ Dies ist bei den bekannten Sauerstoff-Sensibilisatoren Methylenblau (**1a**),²⁶ Bengalrosa²⁷ und auch bei Porphyrinderivaten²⁸ bekannt, die auch als Typ-II-Sensibilisatoren bezeichnet werden.²¹ Der sehr reaktive Singulett-Sauerstoff reagiert mit Guanin in einer [4+2]-Cycloaddition unter Bildung eines Endoperoxids als Zwischenstufe. Durch anschließende Reduktion entsteht aus diesem 8-oxodG (Schema 2.2).^{29, 30}



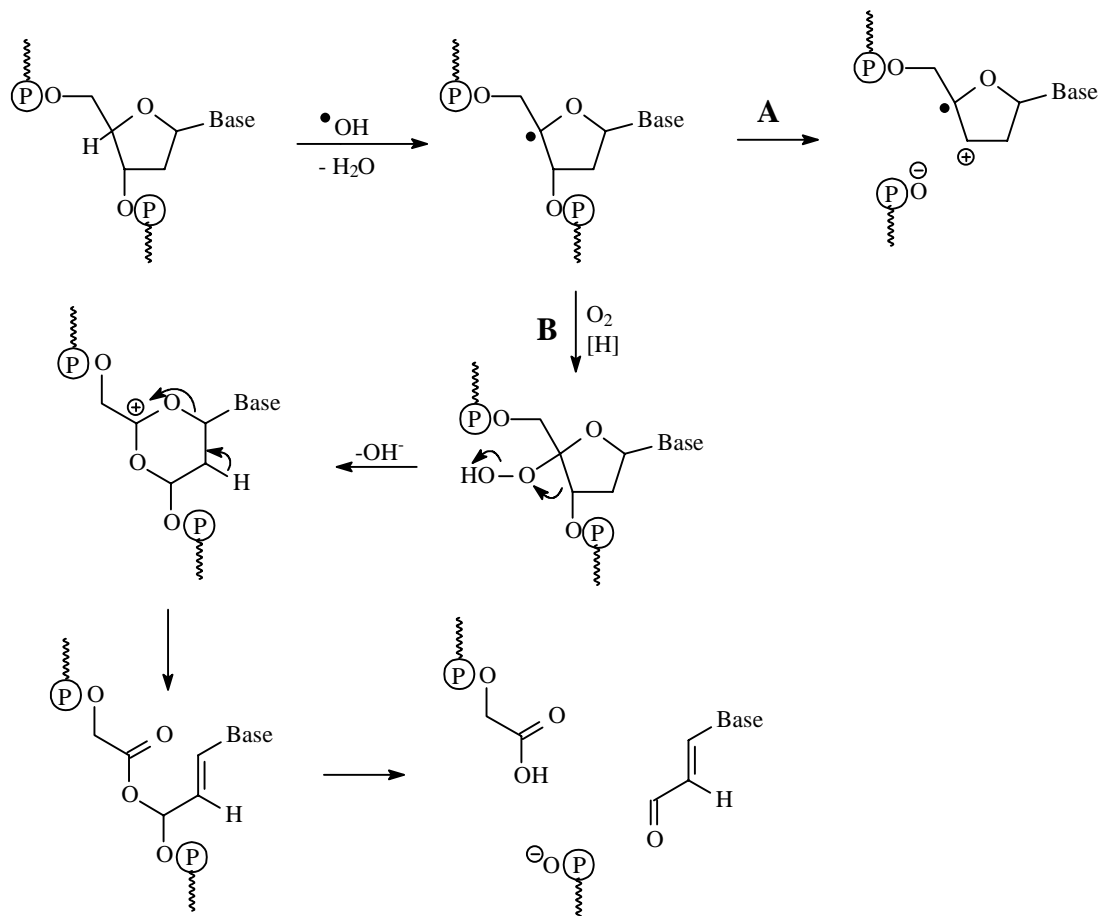
Schema 2.1: Oxidationsprodukte von dG durch Typ-I-Photosensibilisatoren



Schema 2.2: Bildung von 8-oxodG durch Oxidation von Guanosin mit Singulett-Sauerstoff

2.2.2.3 DNA-Schäden durch Radikale

Photosensibilisatoren können ihre Energie nicht nur direkt auf die DNA oder auf molekularen Sauerstoff übertragen, sondern auch Radikale freisetzen, welche die DNA meist durch H-Abstraktion am Zuckerphosphatrückgrat schädigen. Bekannte DNA-schädigende Radikale sind Hydroxyl-, Peroxyl- und Alkoxyradikale, aber auch kohlenstoffzentrierte Radikale schädigen DNA. Hierbei sind die Hydroxylradikale die kurzlebigsten und reaktivsten Intermediate.³¹ Die hohe Reaktivität dieser Radikale zeigt sich in ihrem Verhalten gegenüber DNA. Neben den Nucleinbasen, von denen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Typ-I und Typ-II photosensibilisierten Reaktionen alle betroffen sind,³² wird auch das Zuckergerüst der Doppelhelix durch H-Abstraktion angegriffen. Aufgrund der Zugänglichkeit der Wasserstoffatome in doppelsträngiger und superhelikaler DNA werden hierbei vor allem die Positionen C-4' und C-5' der Desoxyribose angegriffen.³³ In Schema 2.3 ist exemplarisch der Zerfallsweg des nach H-4'-Abstraktion entstehenden C-4'-Radikals unter anaeroben und aeroben Bedingungen dargestellt.



Schema 2.3: Strangbruchbildung durch H-Abstraktion an C-4' unter anaeroben (A) und aeroben (B) Bedingungen

In Gegenwart von molekularem Sauerstoff bildet sich ein Hydroperoxid, das über eine Umlagerung und anschließende Eliminierungs- und Substitutionsschritte den Bruch der Zucker-Phosphat-Bindung bewirkt, was als Strangbruchbildung bezeichnet wird.³⁴ Andererseits kann das entstandene Radikal auch direkt fragmentieren, indem die Phosphatesterinheit am C3 der Ribose als Nucleofug vom Molekül abspaltet. Das verbleibende Radikalkation reagiert mit Wasser unter weiterer β -C-O-Bindungsspaltung oder wird weiter durch Elektronenaufnahme zum entsprechenden Alken reduziert.³⁵ Die Strangbruchbildung durch Hydroxylradikale kann nicht nur durch einen direkten Angriff der Hydroxylradikale an der Zuckereinheit erfolgen, sondern auch über Basenschäden vermittelt werden.^{3a} Hierbei sind die Pyrimidinbasen mit der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 besonders empfindlich für einen Angriff von Hydroxylradikalen, da diese an die genannte Doppelbindung addieren. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff entstehen die entsprechenden Hydroperoxide.³⁶

2.3 Farbstoffe als Photosensibilatoren

Neben Proteinen,⁹ Polyamiden,³⁷ Oligosacchariden³⁸ und organometallischen Komplexen³⁹ sind auch zahlreiche organische Farbstoffe bekannt, die mit DNA wechselwirken. Diese sind sowohl in der Lage über Intercalation, Furchenbindung oder Assoziation an das Biopolymer zu binden als auch DNA-Schäden durch Bestrahlung zu induzieren. Das wohl bekannteste Beispiel eines photosensibilisierenden Farbstoffs ist Ethidiumbromid (**6**) (Abbildung 2.4).⁴⁰ Es wechselwirkt mit der DNA hauptsächlich durch Intercalation, aber auch die Einlagerung in die DNA-Furchen kommt in manchen Fällen vor. Ethidiumbromid gehört auch zu einem der wenigen Beispiele, bei denen die Fluoreszenzintensität und damit die Quantenausbeute des Chromophors durch die Anwesenheit von DNA um ein Vielfaches ansteigen. Dies wird in der Molekularbiologie zur Detektion von DNA genutzt. Die Induktion von Strangbrüchen in DNA durch Ethidiumbromid läuft nach einem sauerstoffabhängigen Mechanismus ab.^{3c}

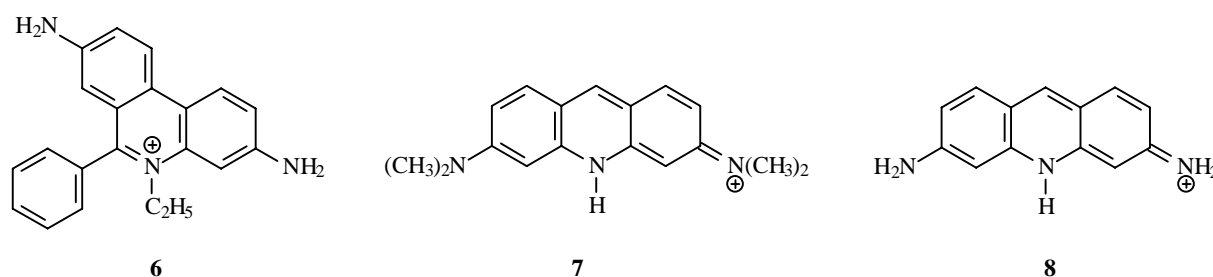


Abbildung 2.4: Photosensibilisierende Farbstoffe

Methylenblau (**1a**) intercaliert bei kleinen Farbstoff-DNA-Verhältnissen in die DNA, während bei größeren Farbstoffkonzentrationen auch Assoziation zu beobachten ist.⁴¹ Methylenblau (**1a**) gehört zu den Typ-II-Photosensibilisatoren und schädigt die DNA durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff.²⁶

Zu den bekanntesten photosensibilisierenden Acridinfarbstoffen gehören Acridinorange (**7**)⁴² und Proflavin (**8**) (Abbildung 2.4).^{8a} Wie bei Methylenblau (**1a**) ist auch bei diesen Verbindungen der Bindungsmodus von der Farbstoffkonzentration abhängig. Diese beiden gut untersuchten DNA-Sensibilisatoren sind bei kleinen Farbstoff-DNA-Verhältnissen in die DNA intercaliert, während es bei größeren Verhältnissen auch Beweise für die Rückgratassoziation mit der DNA gibt.^{41a,43} Acridinorange spaltet DNA nachweislich nach einem Singulett-Sauerstoff-Mechanismus,⁴⁴ dahingegen ist der Mechanismus und das Ausmaß der Strangbruchbildung im Fall von Proflavin von der Bestrahlungswellenlänge abhängig. Bei einer Bestrahlung bei 440 nm treten hauptsächlich alkalilabile Strangbruchstellen auf, deren Bildung sauerstoffabhängig ist, was ebenfalls auf einen $^1\text{O}_2$ -Mechanismus schließen lässt. Eine Bestrahlung bei 360 nm ist zwar auch sauerstoffabhängig, ein Singulett-Sauerstoff-Mechanismus kann jedoch ausgeschlossen werden. Kombiniert man die beiden Wellenlängen in einem Bestrahlungsexperiment, so treten hauptsächlich freie Einzelstrangbrüche auf, zu deren Detektion keine weitere Behandlung der DNA mehr nötig ist.^{3c,45}

3 Problemstellung

Die oben angeführten Darstellungen machen deutlich, dass die Strukturmodifikation von Nucleinsäuren mit Hilfe bindender und photoschädigender Farbstoffe ein biologisch und medizinisch relevanter Prozess ist und dass ein Bedarf an neuartigen DNA-bindenden und DNA-photoschädigenden Verbindungen besteht, die es erlauben, diese Prozesse mit hinreichender Selektivität und Effizienz durchzuführen. Besonders sinnvoll dürfte in diesem Zusammenhang die systematische Untersuchung der Strukturparameter sein, die die Wechselwirkungen mit der Nucleinsäure wesentlich beeinflussen (Struktur-Eigenschafts-Korrelation). Dazu muss zunächst ein leicht zugängliches und variables Stammsystem gewählt werden, das generell an DNA bindet und photochemisch DNA-Schäden induziert. Über die Variation des Substitutionsmusters der Basis- oder Referenzverbindung sollten dann die photobiologischen Eigenschaften modifiziert werden. Das Basissystem sollte also zunächst die charakteristischen Strukturmerkmale von Intercalatoren und Photosensibilisatoren wie Ethidiumbromid (**6**) oder Metylenblau (**1a**) aufweisen. Die Grundstruktur derartiger Verbindungen wird durch einen polycyclischen Aromaten oder Heteroaromaten bestimmt, der in der Regel eine endocyclische oder exocyclische positive Ladung enthält. Letzteres Strukturmerkmal wird meistens durch ein quartäres Stickstoffatom eingeführt und gewährleistet eine attraktive ionische Wechselwirkung des Intercalators mit dem Phosphatrückgrat der DNA. Darüber hinaus tragen diese Verbindungen oftmals Donorsubstituenten, wie beispielsweise Amino-, Hydroxy- oder Alkoxyfunktionen.

Acridiziniumderivate (IUPAC-Name: Pyrido[1,2-*b*]isochinolinium) der generellen Struktur **9** (Abbildung 3.1) stellen daher potentielle Intercalatoren und Photosensibilisatoren dar. Weiterhin haben diese Verbindungen den Vorteil, dass sie sehr einfach synthetisch zugänglich sind und dass sich ihr Substitutionsmuster sehr weit variieren lässt. Somit dürften sie eine angemessene Plattform für die oben angeführten Struktur-Eigenschafts-Beziehungen darstellen. Zwar wurden Acridiziniumsalze noch nicht systematisch auf ihre DNA-bindenden und DNA-schädigenden Eigenschaften untersucht, jedoch wurden die Acridiziniumderivate **9a**, **9d**, **9f** und **9g** bereits exemplarisch unter diesem Aspekt untersucht.⁴⁶ Bei allen genannten Verbindungen wurde durch spektrophotometrische, spektrofluorimetrische und CD-spektroskopische Untersuchungen eine bindende Wechselwirkung zur DNA festgestellt und auch lichtinduzierte DNA-Schädigung wurde beobachtet. Allerdings unterscheiden sich die Derivate **9a** und **9f** in ihren spektroskopischen Eigenschaften in Anwesenheit von DNA

signifikant von den aminosubstituierten Acridiziniumsalzen **9d** und **9g**, was auf Unterschiede im Bindungsmodus schließen lässt. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich die lichtinduzierten Strangbruchraten der Aminoacridiziniumsalze **9d** und **9g** signifikant unterscheiden, was einen Einfluss der Position des Aminosubstituenten auf die photobiologischen Eigenschaften dieser Verbindungen vermuten lässt.

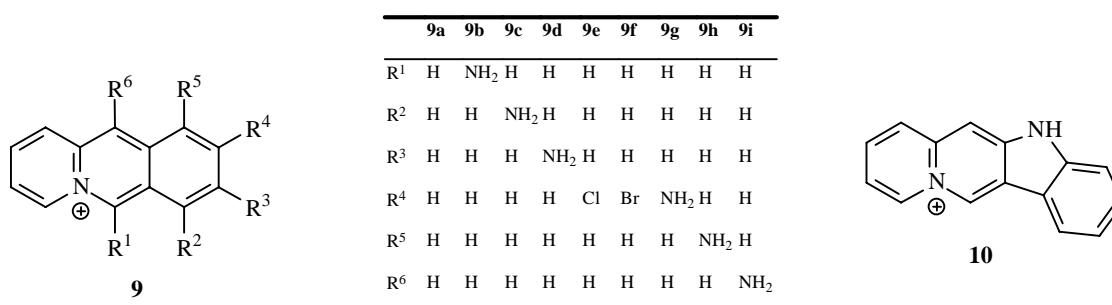


Abbildung 3.1: Struktur der untersuchten Acridiziniumderivate **9a-i** und des Indolochinoliziniums **10**

Aus diesem Grund sollten weitere aminosubstituierten Acridiziniumsalze **9b**, **9c**, **9h** und **9i** sowie das indoloanellierte Chinoliziniumderivat **10** synthetisiert werden (Abbildung 3.1). Das indoloanellierte Derivat wurde gewählt, da der Pyrrolring eine ähnliche Elektronendichte aufweist wie Anilin und somit der Unterschied zwischen endocyclischer und exocyclischer Stickstoffsubstitution erörtert werden kann. Da eine Anellierung mit Pyrrol synthetisch sehr aufwendig ist, wurde das leichter zugängliche indoloanellierte Derivat gewählt. Anschließend sollten die Strukturparameter, die die Wechselwirkung der Acridiziniumsalze mit der DNA wesentlich beeinflussen, systematisch untersucht werden (Struktur-Eigenschafts-Korrelation). Dabei sollten vor allem folgende Aspekte besonders berücksichtigt werden:

- *Einfluß des Substitutionsmusters der Aminoacridiziniumsalze auf die photochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen*

Mit Hilfe der Absorptions- und Emissionsspektroskopie kann eventuell auftretendes solvatochromes Verhalten der neu zu synthetisierenden Aminoacridiziniumsalze untersucht werden. Eine vorhandene Solvatochromie wäre optimal für die Anwendung dieser Verbindungen als UV- oder Fluoreszenzsonden.

- *Einfluß des Substitutionsmusters auf die photobiologischen Eigenschaften*

In diesem Teilaspekt der Arbeit sollte mit Hilfe von spektroskopischen Methoden (UV-, Fluoreszenz-, CD-, LD- und NMR-Spektroskopie) untersucht werden, ob die Stärke, bzw. die Art der Wechselwirkung mit der DNA vom Substitutionsmuster des Acridiziniumderivates abhängt. Hierzu gehört auch die genaue Strukturbestimmung des DNA-Acridizinium-Komplexes durch LD- bzw. NMR-Spektroskopie, die Bestimmung der jeweiligen Bindungskonstanten sowie das Auffinden einer eventuell vorhandenen Basenselektivität der Bindung der Chinoliziniumderivate an die DNA. Für derartige Experimente sollte DNA verwendet werden, die eine definierte Basensequenz aufweist.

- *Mechanismus der Strangbruchbildung*

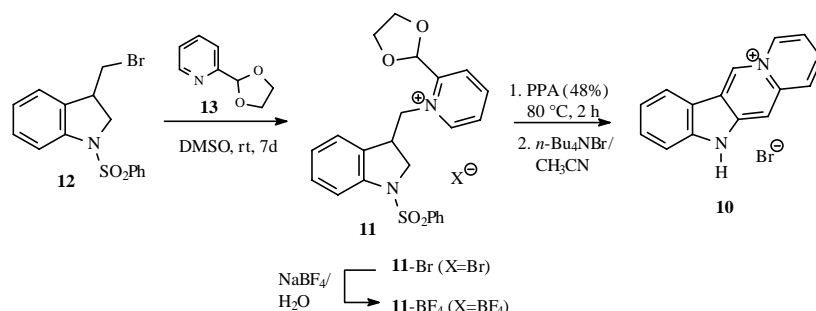
Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit sollte die genaue Untersuchung des Strangbruchmechanismus sein. Zunächst sollte untersucht werden, ob die neuen Chinoliziniumderivate photolytisch wirksam sind und ob die Photoschädigung der DNA sauerstoffabhängig ist. Weiterhin sollte der genaue mechanistische Ablauf der DNA-Schädigung mit Hilfe von Laserblitzspektroskopie, zeitaufgelöster Fluoreszenz und weiteren Bestrahlungsexperimenten untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Synthese der Chinoliziniumsalze

4.1.1 Darstellung des Indolochinoliziniumbromids **10** (VS1)

Das Indolochinolizinium **10** wurde durch Cyclodehydratisierung des Pyridiniumderivats **11** ($X = \text{BF}_4$) synthetisiert, welches durch Quarternisierung von 2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin (**13**)⁴⁷ mit Brommethylindol (**12**)⁴⁸ und anschließender Ionenmetathese erhalten wurde (Schema 4.1). Das entsprechende Pyridiniumbromid **11** ($X = \text{Br}$) konnte für die Cyclisierung nicht verwendet werden, da in Anwesenheit von Bromid eine nucleophile Substitution an der C2-Position des Stammsystems stattfand.⁴⁹ Nach der Kristallisation des Rohproduktes aus Methanol wurde das Indolochinolizinium **10** in einer Ausbeute von 39 % erhalten.



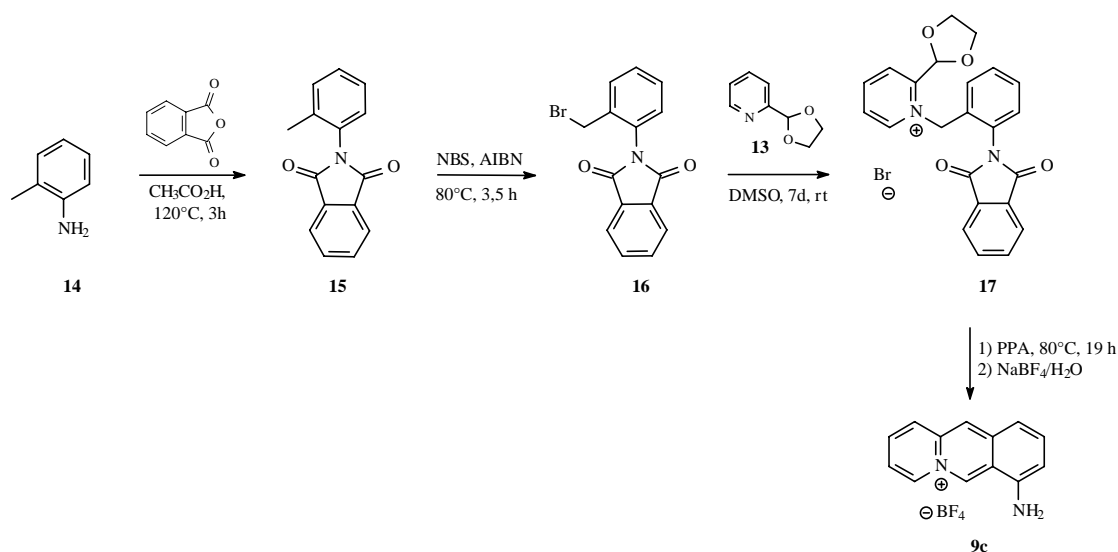
Schema 4.1.: Darstellung von Indolochinoliziniumbromid **10** (VS1)

Der Austausch der Gegenionen erfolgte nach literaturbekannten Methoden.⁵⁰ Das Pyridiniumderivat **11** sowie das Indolochinoliziniumbromid **10** wurden durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie sowie durch Verbrennungsanalyse eindeutig charakterisiert.

4.1.2 Synthese der aminosubstituierten Acridiziniumsalze **9c** und **9h** (VS2, VS3)

Das 7-Aminoacridiziniumbromid (**9c**) wurde wie die 8- und 9-substituierten Acridiziniumderivate⁵⁷ mit der säureinduzierten Cyclodehydratisierungs-Methode von

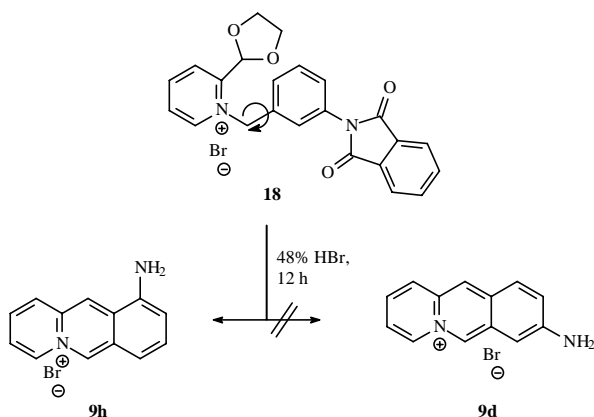
Bradsher⁴⁷ dargestellt (Schema 4.2). Hierzu wurde die Aminofunktion von ortho-Aminotoluol (**14**) durch die Umsetzung mit Phthalsäureanhydrid geschützt.



Schema 4.2: Synthese von 7-Aminoacridizinium **9c** (VS2)

Das erhaltene *N*-Tolylphthalimid **15** wurde in einer Wohl-Ziegler-Bromierung an der Methylgruppe monobromiert. Die Umsetzung des bromierten Phthalimids **16** mit 2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin (**13**) ergab das Pyridiniumbromid **17**, welches mit Polyphosphorsäure cyclisiert und anschließend durch Zugabe von NaBF₄ zum 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat (**9c**) umgesetzt wurde. Das entsprechende Bromid wurde durch Ionenmetathese mit Tetrabutylammoniumbromid erhalten.

Das 10-Aminoacridiziniumbromid (**9h**) wurde als Nebenprodukt bei der Synthese des bekannten 8-Aminoacridiziniums (**9d**)^{45,46} isoliert (Schema 4.3). Letzteres kann durch Cyclisierung in Polyphosphorsäure erhalten werden. Bei der Cyclisierung des Pyridiniumsalzes **18** in 48% HBr wurde jedoch ausschliesslich das 10-Aminoacridizinium **9h** in minimalen Ausbeuten (2 %) isoliert (VS3). Das erwartete Hauptprodukt, 8-Aminoacridizinium (**9d**), zersetzte sich unter diesen Reaktionsbedingungen.



Schema 4.3.: Synthese des 10-Aminoacridiziniumbromids **9h** (VS3)

4.2 Lösungsmittelabhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften von anellierten Chinoliziniumsalzen

4.2.1 Allgemeines

Die Chinoliziniumderivate **9a-i** und **10** sind im Festkörper sowie in Lösung farbige Verbindungen (Abbildung 4.1). Die Verbindungen **10**, **9b** und **9i** sind im Festkörper gelb, und auch die Lösungen dieser Verbindungen zeigen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration eine mehr oder weniger intensive gelbe Farbe. Das 7-Aminoacridizinium **9c** dagegen ist im Festkörper dunkelrot, und die Farbe der Lösungen ist sowohl konzentrations- als auch lösungsmittelabhängig. Bei einem Vergleich von Lösungen des 7-Aminoacridiziniums gleicher Konzentration variiert der Farbton lösungsmittelabhängig von einem sehr dunklen rot bis zu gelborange. Bei gleich bleibendem Lösungsmittel ist die Intensität des im jeweiligen Lösungsmittel beobachteten Farbtones konzentrationsabhängig.

Lösungen aller Acridiziniumderivate in Methanol sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Die Farbe der Lösungen variiert hierbei in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Salze von nahezu farblos (**9a**, **9e** und **9f**) bis dunkelrot (**9c**).

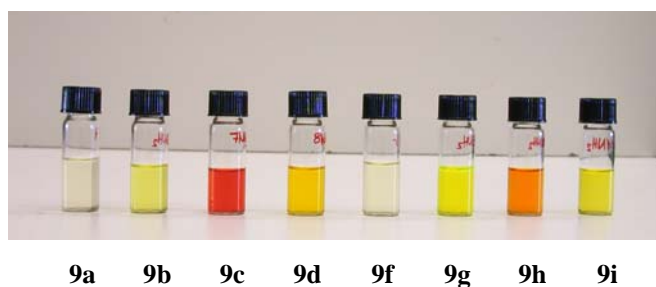


Abbildung 4.1: Lösungen der Acridiziniumsalze **9a-i** in Methanol (1 mM)

4.2.2 Solvatochromie der Chinoliziniumsalze

4.2.2.1 Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften (V1, V2)

Um die solvatochromen Eigenschaften der Chinoliziniumsalze **10**, **9b**, **9c** und **9i** exemplarisch zu überprüfen, wurden deren Absorptions- und Emissionsspektren in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen (Abbildung 4.2).

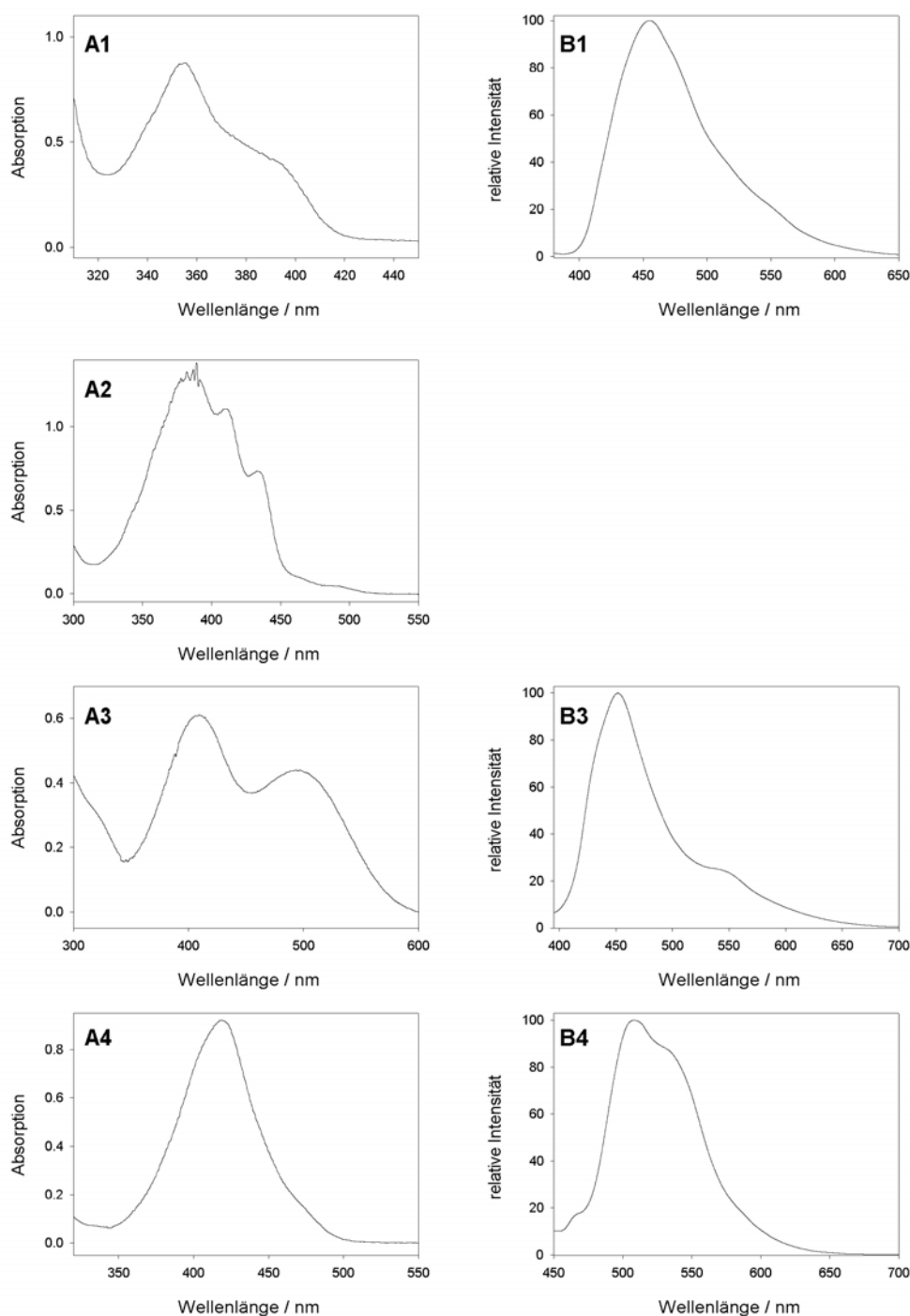


Abbildung 4.2: Repräsentative Absorptions- (**A**) und Emissionsspektren (**B**) der Chinoliziniumderivate **10** (1, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm), **9b** (2; B2 fehlt aufgrund der sehr schwachen Fluoreszenz von **9b**), **9c** (3, $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm) und **9i** (4, $\lambda_{\text{ex}} = 410$ nm) in DMSO (V1, V2)

ERGEBNISSE

Bei der Auswahl der Lösungsmittel wurde darauf geachtet, dass sich diese in Eigenschaften wie z.B. Polarität, Donornummer o. ä. unterscheiden.⁵¹ Die Lage der Absorptions- und der Emissionsmaxima in Abhängigkeit vom Lösungsmittel ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Absorptions- und Emissionsmaxima der Chinoliziniumderivate **10**, **9b**, **9c** und **9i** in verschiedenen Lösungsmitteln (V1, V2)

Lösungs- mittel	λ_{abs} (10)	$\log \epsilon$	λ_{em} (Φ_{em}) ^b	λ_{abs} (9b) ^d	$\log \epsilon$	λ_{abs} (9c)	$\log \epsilon$	λ_{em} ^c	λ_{abs} (9i)	$\log \epsilon$	λ_{em} (Φ_{em}) ^e
H ₂ O	350	4.07	452	402	4.01	388	3.82	444	407	4.14	507
			(0.05)	424	3.84	463	3.65			(0.01)	
CH ₃ OH	352	4.06	452	404	4.00	405	3.84	424,	414	4.20	501
			(0.15)	427	3.83	493	3.68	446		(0.01)	
C ₂ H ₅ OH				405	4.00	404	3.99				
				428	3.84	498	3.85				
CH ₃ COOH				404	3.81	395	3.81	453,	412	4.01	501
				427	3.63	468	3.66	468		(0.01)	
n-C ₄ H ₉ OH ^a				407	3.59	407	3.98				
				428	3.41	504	3.84				
i-C ₃ H ₇ OH				404	3.66	408	3.81	455	413	4.03	498
				426	3.50	506	3.65			(>0.01)	
CH ₃ CN	350	4.04	450	403	4.03	398	3.80	424,	409	4.08	497
			(0.10)	426	3.88	475	3.63	444		(0.01)	
DMSO	356	3.94	455	411	4.04	409	3.79	451	419	3.93	508
			(0.09)	433	3.87	494	3.64			(0.01)	
DMF	355	3.99	454	407	4.09	403	3.77	453	417	3.97	505
			(0.05)			495	3.61			(0.01)	
C ₅ H ₅ N				411	4.08	413	3.81	424,	418	3.72	508
						502	3.66	448		(0.01)	
CHCl ₃				406	3.39	406	3.94				
				428	3.21	494	3.78				
THF ^a				406	3.88	408	4.01				
				430	3.69	498	3.88				
Δ_{max}	6 nm		5 nm	9 nm		25 nm		11 nm	12 nm		12 nm
				9 nm		43 nm					

^a Destillierte Lösungsmittel, alle anderen Lösungsmittel spektroskopisch rein; ^b $c(\text{Acr}) = 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, Spaltbreite 5/5, Quantenausbeute bestimmt gegen Chininsulfat (10^{-5} M in $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$); ^c $c(\text{Acr}) = 10^{-4} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, Spaltbreite 5/5; aufgrund der sehr schwachen Fluoreszenz wurden keine Quantenausbeuten bestimmt; ^d es wurde die Lage der beiden langwelligsten Maxima bestimmt; ^e $c(\text{Acr}) = 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, Spaltbreite 5/5, Quantenausbeute bestimmt gegen 9-Aminoacridizinium 10^{-5} M in Methanol

Bei allen untersuchten Verbindungen verschieben sich sowohl die Maxima der Absorptions- als auch die der Emissionssignale in Abhängigkeit vom Lösungsmittel. Die größte Differenz

zwischen den langwelligen Absorptionsbanden wurde beim 7-Aminoacridizinium **9c** beobachtet. Hier verschieben sich die Maxima der langwelligen Absorptionsbande um 25 nm (von 388 nm in Wasser zu 413 nm in Pyridin) und um 43 nm (von 463 nm in Wasser zu 506 nm in 2-Propanol). Die Differenz zwischen den Absorptionsmaxima der Chinoliziniumderivate **10**, **9b** und **9i** ist eher gering und in ihrer Größenordnung zu vergleichen mit dem schon untersuchten 9-Aminoacridizinium (**9g**) (**10**: 6 nm, **9b**: 9 nm, **9i**: 12 nm, **9g**: 14 nm). Die höchsten Verschiebungen der Maxima der Chinoliziniumsalze **10**, **9b** und **9i** sind in DMSO zu beobachten (**10**: 350 nm, **9b**: 411 nm, **9i**: 407 nm), während die kurzwelligsten beim Indolochinolizinium **10** in Acetonitril (350 nm) und bei den Aminoacridiziniumsalzen **9b** und **9i** in Wasser auftreten (**9b**: 402 nm, **9i**: 407 nm).

Da die Lösungsmittel in Tabelle 4.1 nach abnehmender Polarität angeordnet sind, die im Allgemeinen durch den ET(30)-Wert beschrieben wird,⁵² ist ersichtlich, dass eine Korrelation der Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsmaxima mit der Polarität des verwendeten Lösungsmittels für alle untersuchten Chinoliziniumderivate ausgeschlossen werden kann. Weiterhin wurde versucht, die Verschiebungen mit Lösungsmittelparametern wie der normalisierten Polarität (ET(30)_norm), der Donornummer (DN), der Akzeptornummer (AN) und mit Funktionen der Dielektrizitätskonstanten und der Brechungsindices [$f(D)$, $f(n^2)$] zu korrelieren. Eine Korrelation konnte jedoch für die Absorptionsmaxima der Chinoliziniumderivate **10**, **9b** und **9c** sowie für die Emissionsmaxima aller untersuchten Verbindungen nicht gefunden werden. Vergleicht man dagegen die Verschiebung der Absorptionsmaxima des 11-Aminoacridiziniums **9i** mit der Donor- bzw. der Akzeptornummer des entsprechenden Lösungsmittels,^{49,53} so wird bei einer Unterscheidung zwischen protischen und aprotischen Lösungsmitteln eine Korrelation gefunden werden (Abbildung 4.3).

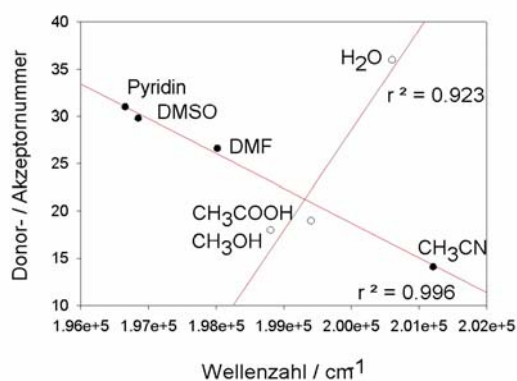


Abbildung 4.3: Korrelationen der Absorptionsmaxima des 11-Aminoacridiziniums **9i** mit der Donornummer der aprotischen Lösungsmittel (A) und der Akzeptornummer der protischen Lösungsmittel (V2)

Aufgrund der sehr schwachen Fluoreszenz des 6-Aminoacridiziniums (**9b**) ($\Phi_{em} \ll 0.01$) wurde die Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften nicht systematisch untersucht. Die Lage der Emissionsmaxima der Chinoliziniumderivate **10**, **9c** und **9i** ist lösungsmittelabhängig. Hierbei ist die Differenz zwischen den Maxima bei dem Indolochinolizinium **10** eher klein ($\Delta\lambda$: 5 nm; 450 nm in Acetonitril, 455 nm in DMSO), während sie bei dem 11-Aminoacridizinium **9i** etwas stärker ausgeprägt ist ($\Delta\lambda$: 12 nm; 497 nm in Acetonitril, 508 nm in DMSO und Pyridin). Bei dem 7-Aminoacridizinium **9c** ist nicht nur die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums lösungsmittelabhängig, sondern auch die Struktur der Fluoreszenzbanden (Abbildung 4.2). Bei einer Betrachtung vergleichbarer Maxima liegt eine Differenz von 11 nm vor (444 nm in Wasser und Acetonitril, 455 nm in 2-Propanol). Die Verschiebungen der Emissionsmaxima der untersuchten Chinoliziniumderivate konnte nicht mit gängigen Lösungsmittelparametern korreliert werden.

Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute (V4) der Chinoliziniumderivate **10** und **9i** zeigte, dass das Indolochinolizinium **10** unter identischen Bedingungen (gleiche Spektrometereinstellungen und Konzentration der Probelösungen) stärker fluoresziert als das 11-Aminoacridizinium (**9i**) (Tabelle 4.1), bei dem aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeuten keine Aussage über die Lösungsmittelabhängigkeit der Quantenausbeute getroffen werden kann. Die Fluoreszenzquantenausbeuten des Indolochinoliziniums **10** sind dagegen stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängig. Von den untersuchten Lösungsmitteln wurde in Methanol die höchste Quantenausbeute beobachtet ($\Phi_{em} = 0.15$). In DMF und Wasser liegt die Fluoreszenzquantenausbeute dagegen nur noch bei 0.05. Aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensität der Acridiziniumsalze **9b** und **9c** wurden die zugehörigen Fluoreszenzquantenausbeuten nicht bestimmt.

4.2.2.2 Auswirkung der Zugabe von Halogenidionen auf die Fluoreszenzeigenschaften des 7-Aminoacridiziniums (V3)

Da das Fluoreszenzspektrum des 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborats (**9c**) sich von dem des Bromids unterscheidet, wurden Lösungen verschiedener Alkalihalogenide zu einer Lösung des Tetrafluoroborates titriert und die Änderung im Fluoreszenzspektrum verfolgt. Es wurde allerdings nur bei Zugabe von Iodid eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 4.4). Die Zugabe von Chlorid oder Bromid hatte keinen Einfluß auf das Spektrum dieser Verbindung. Bei dieser Intensitätsabnahme handelt es sich jedoch nicht

um eine besondere Eigenschaft des 7-substituierten Acridiziniums, da ein Kontrollexperiment mit 9-Aminoacridizinium (**9g**) zum gleichen Ergebnis führte, d.h. zu einer stetigen Abnahme der Emissionsintensität bei Iodidzugabe.

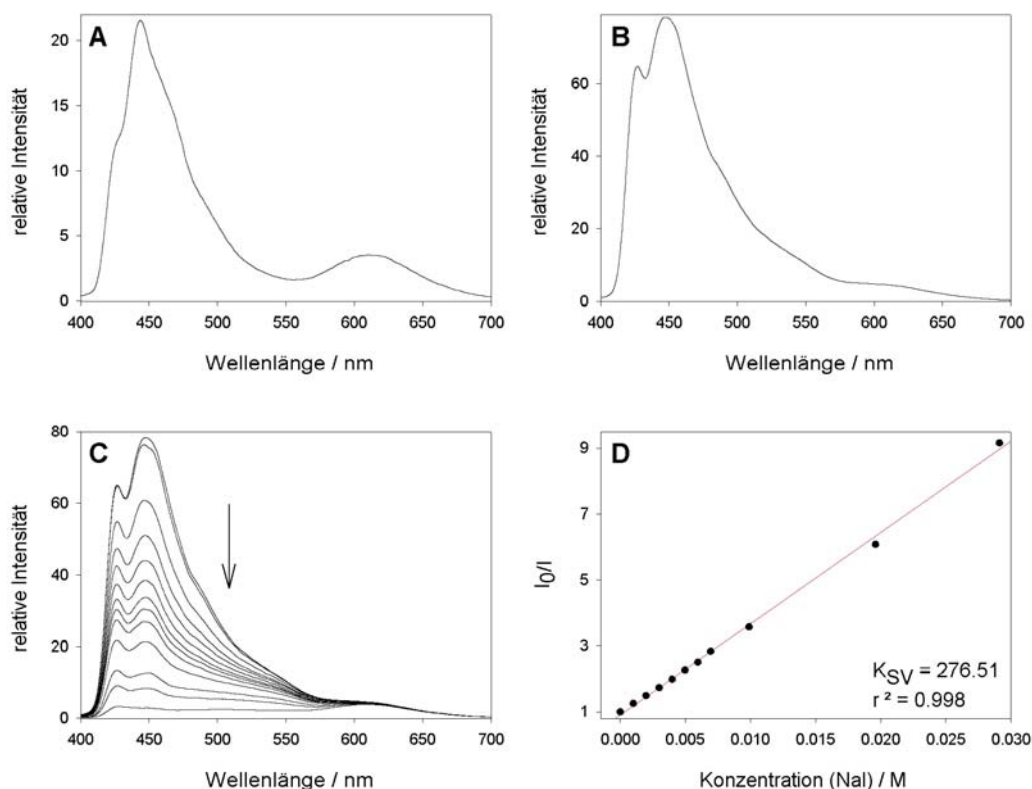


Abbildung 4.4: Fluoreszenzspektren des 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborats (**9c-BF₄**) (A) und des entsprechenden Bromids **9c-Br** (B). C zeigt die spektrofluorimetrische Titration von Iodid zu einer Lösung von **9c-BF₄** und D die zugehörige Stern-Volmer-Auftragung (V3)

4.3 Wechselwirkung mit DNA

4.3.1 Spektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung des Bindungsmodus

4.3.1.2 Spektrophotometrische Titrations (V5)

Gepufferte wässrige Lösungen der Chinoliziniumderivate **9a-i** und **10** wurden mit wässrigen Lösungen von KT-DNA Doppelsträngen sowie mit Lösungen der synthetischen Polynucleotide (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) titriert, und die Änderungen wurden durch Absorptionsspektroskopie verfolgt (V5, V6). Bei allen untersuchten Verbindungen wurde bei der Zugabe der Nucleinsäuren eine signifikante

Verringerung des Extinktionskoeffizienten und das Auftreten mehrerer isosbestischer Punkte beobachtet. Weiterhin wurde in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Verbindungen eine Rotverschiebung der charakteristischen langwelligen Absorptionsbande beobachtet. Diese Verschiebung tritt bei den aminosubstituierten Acridiziniumsalzen **9b**, **c**, **d**, **g**, **h**, **i** sowie beim Indolochinolizinium **10** auf (Tabelle 4.2). Die UV-Spektren der Acridiziniumderivate **9a**, **9e** und **9f** weisen bei DNA-Zugabe neben einer sehr geringen Verschiebung der Maxima (3-4 nm) nur eine Intensitätsabnahme und isosbestische Punkte auf. In Abbildung 4.5 sind repräsentativ die spektrophotometrischen Titrations von **9a** und **9i** mit KT-DNA gezeigt (weitere Titrations im Experimentalteil in Abbildung 6.1 und 6.2).

Tabelle 4.2: Rotverschiebungen^a der langwelligen Absorptionsbande der Chinoliziniumderivate bei DNA-Zugabe (V5)

	9b	9c	9d	9g	9h	9i	10
KT-DNA	8 nm	10 nm	20 nm	12 nm	18 nm	13 nm	4 nm
(Poly[dCdG]-Poly[dCdG])	4 nm	4 nm				6 nm	
(Poly[dAdT]-Poly[dAdT])	5 nm	7 nm				3 nm	

^a es wurde jeweils die Lage der typischen langwelligen Absorptionsbande bestimmt

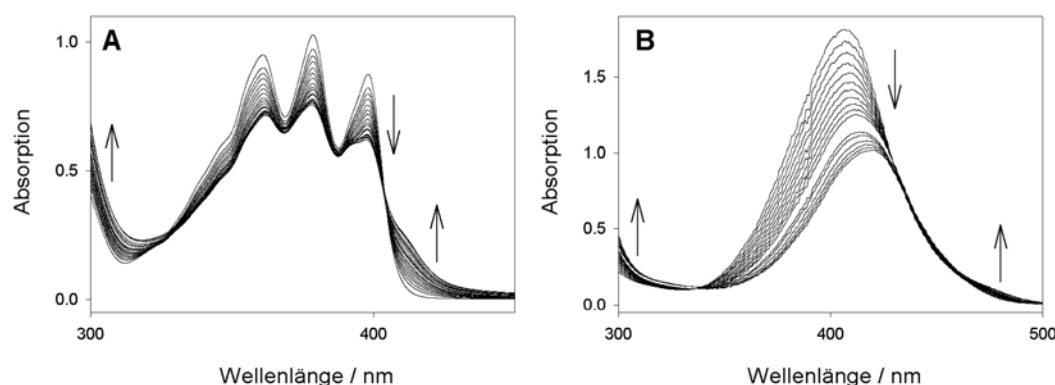


Abbildung 4.5: Spektrophotometrische Titrations der Acridiziniumderivate **9a** (A) und **9i** (B) mit KT-DNA (V5). Titration A steht stellvertretend für die Acridiziniumderivate **9a**, **9e** und **9f**, B wurde exemplarisch für die aminosubstituierten Acridiziniumderivate **9b-d** und **9g-i** gewählt.

Die Auftragung der Daten der spektrophotometrischen Titrations in einem Scatchard-Plot⁵⁴ (Abbildung 6.1 und 6.2 im Experimentalteil) und die Analyse der Daten nach der Gleichung von McGhee und von Hippel⁵⁵ ermöglichte die Abschätzung der intrinsischen Bindungskonstanten K der Chinoliziniumderivate **9a**, **9b**, **9c**, **9g**, und **9i** mit KT-DNA und den zugehörigen Ausschlussparameter n , der die an der Bindung beteiligte Basenzahl angibt (Tabelle 4.3). In einigen Fällen (**9b** und **10**) wurde die Titration exemplarisch mit den synthetischen Polynucleotiden durchgeführt. Die Bindungskonstanten der meisten untersuchten Chinoliziniumderivate liegen bei 10^4 M^{-1} , nur die Aminoacridiziniumsalze **9b**

und **9c** sowie das Indolochinolizinium **10** fallen durch ihre vergleichsweise hohen Bindungskonstanten auf. Die Bindungskonstante des 7-Aminoacridiziniums (**9c**) an KT-DNA beträgt $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, und das 6-Aminoacridizinium (**9b**) hat eine besonders hohe Bindungsaffinität zu (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) ($K = 2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), während die Affinitäten zu KT-DNA und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) um etwa den Faktor 10 erniedrigt sind. Die Bindungskonstanten der übrigen Chinoliziniumsalze konnten nicht bestimmt werden, da die UV-Titrationsen nicht bis zur Sättigung durchgeführt wurden.

Tabelle 4.3: Bindungskonstanten (K) und zugehörige Ausschussparameter (n) der Chinoliziniumderivate **10**, **9a**, **9b**, **9c**, **9g** und **9i**

	KT-DNA		(Poly[dCdG]-Poly[dCdG])		(Poly[dAdT]-Poly[dAdT])	
	$K \times 10^4 \text{ [M}^{-1}\text{]}$	n	$K \times 10^4 \text{ [M}^{-1}\text{]}$	n	$K \times 10^4 \text{ [M}^{-1}\text{]}$	n
9a ^a	8.8	3.2				
9b ^a	2.6	3.0	11.7	1.8	2.8	3.8
9c ^a	11.2	2.6				
9g ^a	1.6	3.2				
9h ^a	5.3	5.6				
9i ^a	1.9	3.8				
10 ^b	14.7	3.4	42	3.2	12.4	7.8

^a Bindungskonstanten berechnet aus den Daten der spektrophotometrischen Titrationsen (V5); Acridiziniumderivate in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0); Zugabe von KT-DNA; ^b Bindungskonstanten aus spektrofluorimetrischer Titration berechnet; Chinolizinium in ETN-Puffer; Zugabe von ST-DNA

4.3.1.3 CD-Spektroskopie (V6)

Da in den UV-spektroskopischen Untersuchungen der Chinoliziniumsalze eine Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen und DNA beobachtet wurde, sollte weiterhin untersucht werden, welcher Art die Wechselwirkung mit dem Biomolekül ist. Unter anderem hat sich für diesen Zweck die CD-Spektroskopie als sinnvolle Analysenmethode erwiesen.⁵⁶ Deshalb wurden zusätzlich zu den schon vorliegenden CD-Spektren der Acridiziniumsalze **9d-f**⁵⁷ die CD-Spektren der Chinoliziniumsalze **9a**, **9g** und **10** bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Bringmann in Zusammenarbeit mit Dr. Kim Messer aufgenommen (V6). Die schrittweise Erhöhung der Chinoliziniumkonzentration in Probelösungen mit dem Acridizinium (**9a**) und dem Indolochinolizinium **10** hat die Induktion eines positiven CD-Signals im Absorptionsbereich des Chinoliziniums zur Folge, dessen Intensität mit zunehmender Chinoliziniumkonzentration n der Probelösung ansteigt. Dagegen kann beim 9-Aminoacridizinium (**9g**) bei kleinen

Farbstoffkonzentrationen ein negatives Signal im langwelligen Absorptionsbereich beobachtet werden. Bei großen Acridizinium-DNA-Verhältnissen wechselt das induzierte CD-Signal bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums vom positiven in den negativen CD-Bereich. Wichtig ist hierbei, dass die DNA im zu beobachtenden Wellenlängenbereich nicht selbst absorbiert. Die Signale können daher eindeutig den entsprechenden Chinoliziniumsalzen zugeordnet werden. In Abbildung 4.6 sind die CD-Spektren der Chinoliziniumsalze **9a**, **9g** und **10** bei unterschiedlicher Chinoliziniumkonzentration dargestellt.

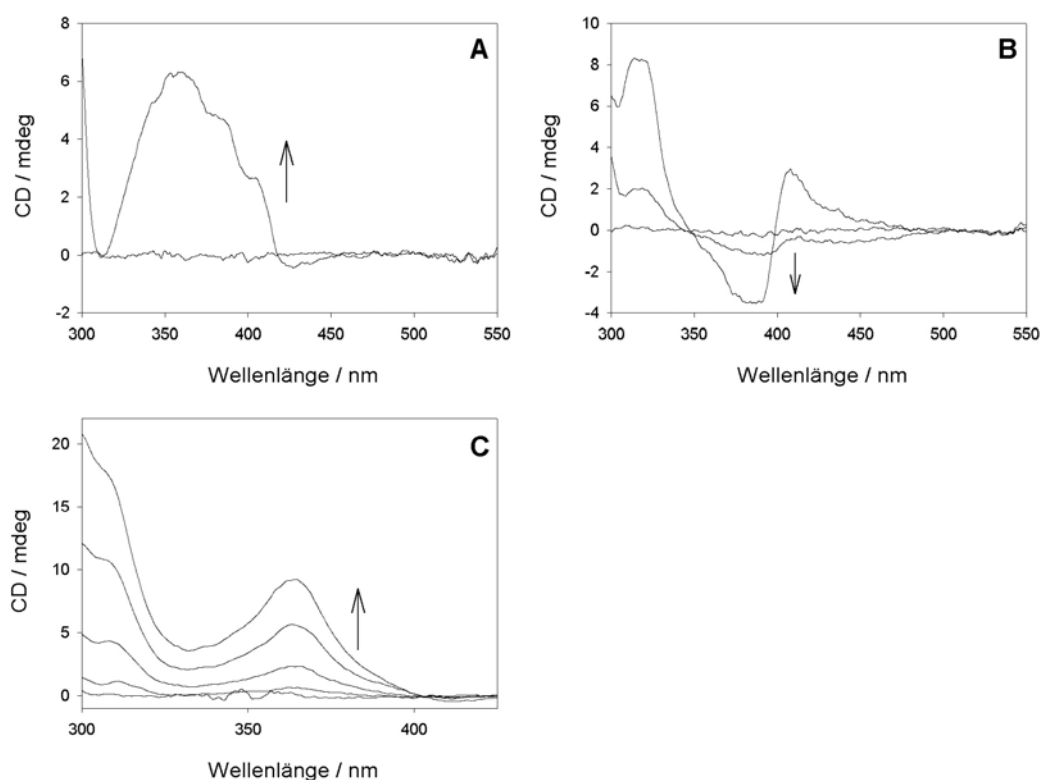


Abbildung 4.6: CD-Spektren der Chinoliziniumsalze **9a** (A), **9g** (B) und **10** (C) bei steigendem DNA-Chinolizinium-Verhältnis (Chinolizinium:DNA von unten nach oben: A: 0, 0.1; B: 0, 0.05, 0.1; C: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2)

4.3.1.4 LD-Spektroskopie (V7)

Eine weitere Analysenmethode zur Aufklärung des Bindungsmodus von DNA-assoziiierenden Molekülen an das Biopolymer stellt die LD-Spektroskopie dar.¹⁷ Deshalb wurden während eines Forschungsaufenthalts an der Universität Padua im Arbeitskreis von Prof. F. Dall'Acqua und Prof. D. Vedaldi LD-Spektren von den Chinoliziniumderivaten **9a**, **9b**, **9c**, **9d**, **9f**, **9g**, **9i** und **10** bei verschiedenen Chinolizinium-DNA-Verhältnissen aufgenommen und die entsprechenden reduzierten LD-Spektren (LD_r) berechnet (V7). Die Versuche wurden in einem Aufbau mit rotierender Küvette durchgeführt (siehe Abbildung 2.3 im Kenntnisstand).

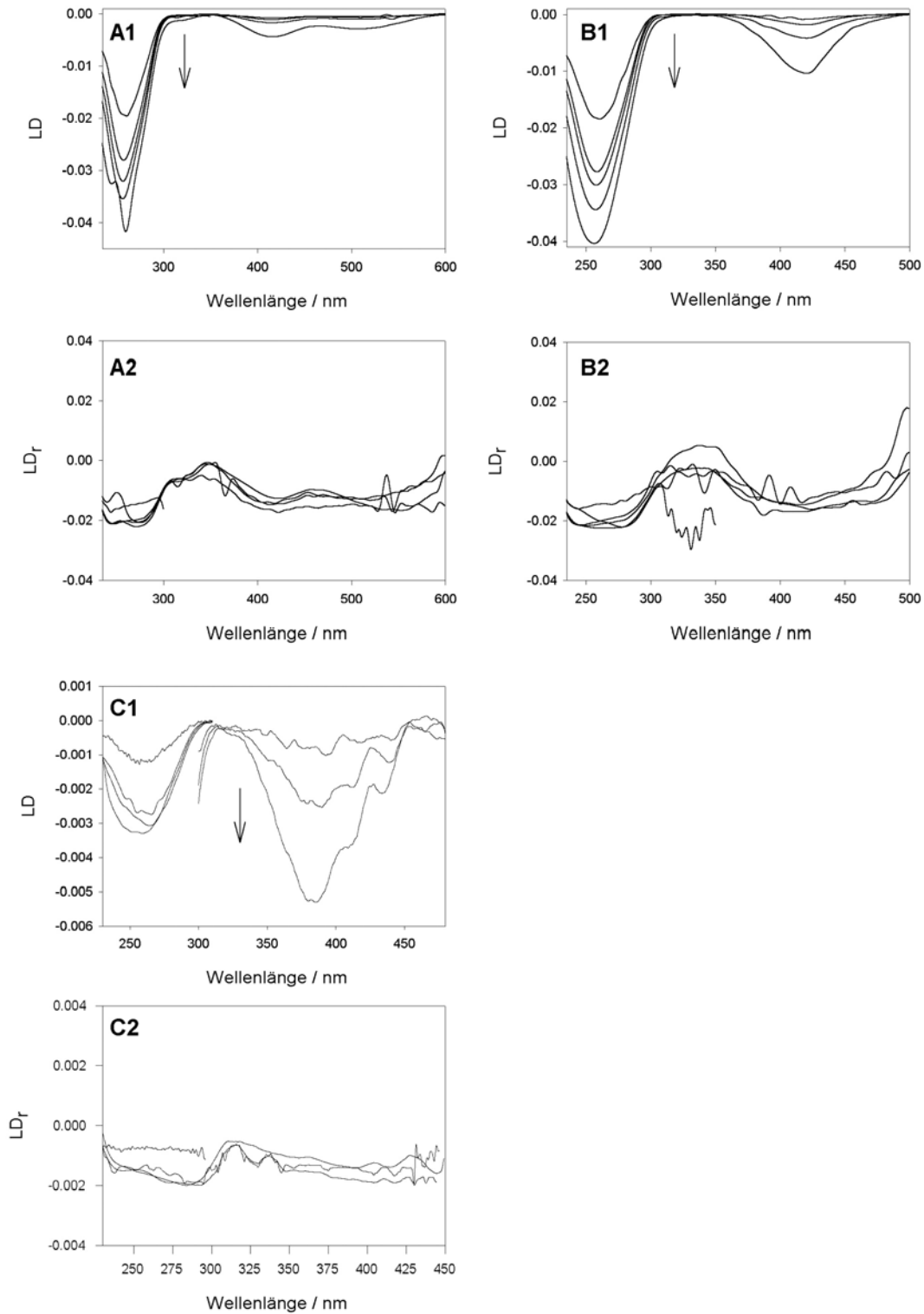


Abbildung 4.7: LD-Spektren (1) und LD_r (2) der Chinoliziniumderivate **9c** (A) und **9i** (B) und **9b** (C)

Die Chinoliziniumderivate **9b**, **9e**, **9i** und **10** zeigen in Anwesenheit von DNA negative LD-Signale im langwelligen Absorptionsbereich, deren Intensität mit steigender DNA-Konzentration zunimmt. Im Absorptionsbereich der DNA (230-300 nm) wurde weiterhin ein signifikanter Anstieg der negativen LD-Bandenintensität beobachtet, die im Wesentlichen der

Absorption der Nucleinbasen entspricht. Die LD_r-Signale sind über den gesamten Absorptionsbereich der Chinoliziniumderivate weitestgehend wellenlängenunabhängig. Die LD-Spektren der Acridiziniumderivate **9a**, **9c**, **9d**, und **9f** zeigen in Anwesenheit von DNA ebenfalls ein negatives LD-Signal. Jedoch steigt die Intensität der DNA-Bande mit dem Maximum bei 260 nm nur leicht an, und das Signal des reduzierten LD ist im Absorptionsbereich der Acridiziniumsalze abhängig von der Wellenlänge. In Abbildung 4.7 sind exemplarisch die Spektren der Acridiziniumderivate **9b** und **9i** dargestellt. Die LD-Spektren der übrigen Chinoliziniumderivate sind im Experimentaltail in Abbildung 6.3 gezeigt.

4.3.1.5 NMR-Spektroskopie (V8, V9)

Eine sehr genaue Methode, die exakte Lage und Orientierung der Acridiziniumderivate in der DNA zu bestimmen, ist die hochaufgelöste NMR-Spektroskopie, insbesondere die 2D-NMR-Spektroskopie. Um die Ergebnisse über den bevorzugten Bindungsmodus aus den CD- und LD-spektroskopischen Untersuchungen zu bestätigen und mehr Informationen über die genaue Orientierung der Chinoliziniumderivate in der Bindungsstelle zu erhalten, wurden ¹H-NMR-Spektren eines synthetischen, selbstkomplementären Dodecamers bekannter Nucleotidsequenz (5'-CGCGAATTCGCG-3')^{58a} in Anwesenheit der Acridiziniumsalze **9a** und **9g** in Wasser und in D₂O aufgenommen (V8, V9).

Zwar sind die Verschiebungen der wichtigsten Nucleotidsignale des Dodecamers mehrfach in der Literatur beschrieben,⁵⁸ jedoch stimmten die in dieser Arbeit bestimmten Signalverschiebungen nicht vollständig mit den Literaturwerten überein, was auf unterschiedliche Temperatur, Konzentration und Pufferzusammensetzung zurückgeführt werden kann. Deshalb wurden die Signale des reinen Dodecamers mit Hilfe von COSY und NOESY-Spektren erneut den entsprechenden Wasserstoffatomen zugeordnet. Die Protonen der Desoxyriboseeinheiten des Zuckerphosphatrückgrates konnten bisher aufgrund von Signalüberlappungen noch nicht alle eindeutig zugeordnet werden. Die Verschiebungen der Wasserstoffatome der Nucleinbasen und der die Stränge verbrückenden Iminprotonen sind in Tabelle 4.4 angegeben.

ERGEBNISSE

Tabelle 4.4: Zuordnung der NMR-Signale des Dodecamers (5'-CGCGAATTCGCG-3')^{a, b} (V8)

	H8	H6 ^c	H5 ^c	H2	CH3	NH ₂	Imino
C1		7.47 (d)	5.77 (d)				
G2	7.90 (s)					8.31	12.90
C3		7.11 (d)	5.21 (d) ^a			6.27	12.75
G4	7.70 (s)					8.27	12.54
A5	7.95 (s)			7.10 (s)			13.62
A6	7.95 (s)			7.49 (s)			13.47
T7		6.94 (s)			1.12 (s)		
T8		7.21 (s)			1.37 (s)		
C9		7.31 (d)	5.47 (d)			6.66	
G10	7.75 (s)					8.23	
C11		7.17 (d)	5.29 (d)			6.43	
G12	7.90 (s)						

^a c(DNA) = 1 mM, Lösungsmittel: wässriger Phosphatpuffer; ^b Verschiebungen der Signale in ppm, Multiplizitäten sind in Klammern angegeben; ^c alle Kopplungskonstanten der Dubletts der Cytosine liegen im Bereich zwischen 6.0 und 7.5 Hz.

Die NMR-Signale des Dodecamers in Anwesenheit der Acridiziniumsalze **9a** und **9g** wurden ebenfalls mit Hilfe der COSY und NOESY-Spektren den entsprechenden Wasserstoffatomen zugeordnet. Auch hier konnten bisher nur die Protonen der Nucleinbasen zugeordnet werden (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6), da die Signale der Wasserstoffatome der Zuckerphosphateinheiten wie in der Probe des reinen Dodecamers stark überlappen.

Tabelle 4.5: Verschiebungen der NMR-Signale des Dodecamers (5'-CGCGAATTCGCG-3') in Anwesenheit von Acridiziniumbromid **9a**^{a, b} (V9)

	H8	H6 ^c	H5 ^c	H2	CH3	NH ₂	Imino
C1		7.63 (d)	5.87 (d)			6.98	
G2	7.91 (s)					8.24	12.70
C3		7.26 (d)	5.34 (d)			6.45	12.44
G4	7.87 – 7.89 ^c					8.20	12.23
A5	8.10 (s)			7.16 (s)			13.49
A6	8.10 (s)			7.60 (s)			13.43
T7		7.08 (s)			1.26 (s)		
T8		7.30 (s)			1.51 (s)		
C9		7.48 – 7.42 ^c	5.62 (d)			6.84	
G10	7.87 – 7.89 ^c					8.14	
C11		7.31 (d)	5.37 (d)			6.54	
G12	7.93 (s)						

^a c(DNA) = c(**9a**) = 1 mM, wässriger Phosphatpuffer; ^b Verschiebungen der Signale in ppm, Multiplizitäten sind in Klammern angegeben; ^c Signale liegen unter Multiplett der genannten Verschiebung

ERGEBNISSE

Tabelle 4.6: Verschiebungen der NMR-Signale des Dodecamers (5'-CGCGAATTCGCG-3') in Anwesenheit von 9-Aminoacridiziniumbromid **9g**^a (V9)

	H8	H6	H5	H2	CH3	NH ₂	Imino
C1		7.63 (d)	5.89 (d)				
G2	7.92 (s)					8.29	12.78
C3		7.26 (d)	5.36 ^b			6.45	12.54
G4						8.24	12.34
A5	8.11 (s)			7.20 ^c			13.50-13.58 ^c
A6	8.11 (s)			7.60			13.43
T7		7.09 (s)			1.27		
T8		7.31 (s)			1.52		
C9		7.44 (d)	5.62 (d)			6.83	
G10	7.88 (s)					8.15-8.20 ^c	
C11		7.33 (d)	5.42 (d)			6.57	
G12	7.93 (s)						

^a c(DNA) = c(**9g**) = 1 mM, Lösungsmittel H₂O; Verschiebungen der Signale in ppm, Multiplizitäten sind in Klammern angegeben; ^b sehr breites Dublett, kleines Signal-Rausch-Verhältnis; ^c sehr breites Singulett

Ein Vergleich der Spektren des reinen Dodecamerdoppelstrangs mit den Spektren der äquimolaren Mischungen aus Oligomer und Acridiziniumsalz **9a** bzw. **9g** zeigt, dass die Lage der Signale aller zugeordneten Nucleinsäure-Protonen durch die Anwesenheit der Acridiziniumderivate signifikant beeinflusst wird. Die Signale der die beiden Stränge verbindenden Iminoprotonen werden verbreitert und in beiden Fällen zwischen 0.02 und 0.31 ppm hochfeldverschoben. Dabei wurden die Verbrückungen zwischen Cytosin-Guanin-Basenpaaren stärker beeinflusst (**9a**: C-G2: -0.20 ppm, C-G3: -0.31 ppm, C-G4: -0.31 ppm,; **9g**: C-G2 -0.12 ppm, C-G3 -0.21 ppm, C-G4 -0.20 ppm) als zwischen Adenin-Thymin-Basenpaaren (**9a**: A-T5 -0.13 ppm, A-T6 -0.04 ppm; **9g**: A-T5 -0.04, A-T6 sehr breit). Eine besonders starke Verschiebung ist bei den Iminoprotonen zwischen dem dritten und dem vierten Basenpaar zu beobachten. Die Aminofunktionalitäten der Cytosin- und Guaninbasen sind wie die Iminoprotonen durch ihre zentrale Lage zwischen den Nucleinbasen ausgezeichnet und sind deshalb als Indikatoren für eine intercalierte Verbindung gut geeignet. Die Zugabe der Acridiziniumsalze **9a** und **9g** bewirkte bei den Aminofunktionen der Cytosine eine Tieffeldverschiebung, während die Aminogruppen der Guanine hochfeldverschoben wurden. Bei allen übrigen Protonen der Nucleinbasen wurde eine Tieffeldverschiebung bis 0.2 ppm beobachtet.

4.3.2 Lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Chinoliziniumderivate

Da eine Bindung der Chinoliziniumderivate an die DNA durch die oben beschriebenen Experimente eindeutig nachgewiesen wurde, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob diese Verbindungen darüber hinaus eine lichtinduzierte Schädigung der DNA, wie z.B. Strangbrüche, hervorrufen können. Zur Bestimmung der photoschädigenden Wirkung wurde ein Plasmid-Assay herangezogen, bei dem der DNA-Strangbruch eine Überführung der Superhelix in die offen-zirkuläre Form zur Folge hat und durch anschließende quantitative Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen wird. Die Bestrahlung der Proben wurde hierbei zunächst unter Kühlung durchgeführt, weshalb die Probelösungen aufgrund des erforderlichen Versuchsaufbaus nur von oben bestrahlt werden konnten. Dies erforderte in der Regel eine sehr lange Bestrahlungszeit von 1-2 h. Deshalb wurde der Versuchsaufbau derart geändert, dass die Probelösungen nicht mehr gekühlt wurden und von allen Seiten gleichmäßig bestrahlt werden konnten. Durch diese Änderung konnte die Reaktionszeit in den Experimenten erheblich gesenkt werden (meist 15 min). Die Strangbruchexperimente mit dem Indolochinolizinium **10** wurden ausschließlich unter den erstgenannten Bedingungen durchgeführt, während die meisten Photoreaktionen mit den Acridiziniumsalzen **9a-i** unter den geänderten Bedingungen durchgeführt wurden. Aus diesem Grund sind die im Folgenden angegebenen Strangbruchraten des Indolochinoliziniums und der Acridiziniumsalze untereinander nicht vergleichbar und deshalb getrennt voneinander aufgeführt.

4.3.2.1 Indolochinolizinium (V10)

Die Bestrahlung von superhelikaler DNA (Plasmid pBR322) in Anwesenheit von mindestens 5×10^{-5} M Chinoliziniumsalz **10** führte zu einer Induktion von Strangbrüchen im Biomolekül, welche durch Gelelektrophorese nachgewiesen wurden. Hierbei wurde unter den verwendeten Versuchsbedingungen eine Zeitabhängigkeit der Photoreaktion festgestellt (V11). Es wurde beobachtet, dass nach einer Stunde die Reaktion vollständig abgelaufen ist und eine weitere Bestrahlung (bis 2 h) keine weitere DNA-Schädigung bewirkt (Abbildung 4.8).

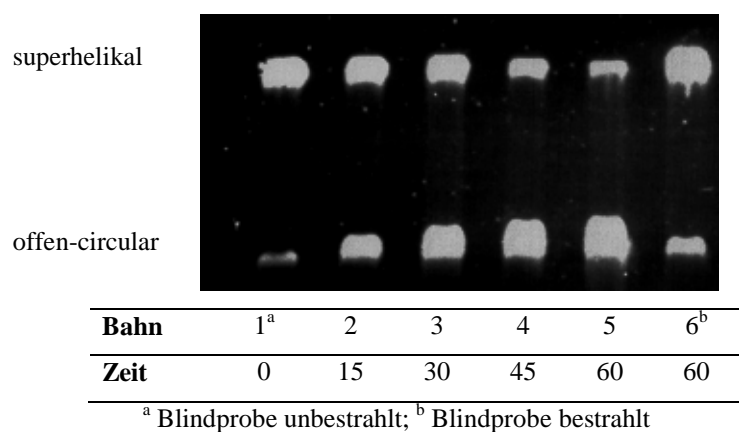


Abbildung 4.8: Lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Indolochinolizinium in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (V10)

4.3.2.2. Acridiziniumderivate

Zunächst sollte der Einfluss des Substituenten und dessen Position auf die lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Acridiziniumderivate untersucht werden (V11). Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit der photoschädigenden Wirkung vom Substitutionsmuster. Während die Aminoacridiziniumsalze **9b**, **9c**, **9g** und **9h** keine Strangbrüche induzieren, haben das unsubstituierte Acridizinium (**9a**) und das 8-Aminoacridizinium (**9d**) eine schwache photoschädigende Wirkung. Das bromsubstituierte Derivat **9f** und das 11-Aminoacridizinium (**9i**) zeigen dagegen eine sehr ausgeprägte lichtinduzierte DNA-Schädigung.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Photodimere der Acridiziniumsalze, die unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls gebildet werden können, einen Beitrag zur lichtinduzierten Schädigung der DNA leisten. Deshalb wurden Strangbruchexperimente mit den Verbindungen **9e-g** und deren Dimeren durchgeführt und die Effektivität der photoschädigenden Wirkung zwischen den Monomeren und den Dimeren verglichen (V12). Hierbei zeigte sich, dass die Dimere in Abhängigkeit von der Versuchsdurchführung genauso viel oder weniger Strangbrüche induzierten als die entsprechenden Monomere.

4.3.3 Untersuchungen zur Bestimmung des Strangbruchmechanismus

4.3.3.1 Fluoreszenzmessungen

Spektrofluorimetrische Titrationsen mit DNA, Mononucleotiden und –nucleosiden (V13)

Lösungen der Chinoliziniumderivate **10**, **9a-g** und **9i** in Phosphatpuffer (10 mM, pH = 7.0) wurden mit einer wässrigen KT-DNA-Lösung titriert, und die Änderungen wurden durch

Fluoreszenzspektroskopie verfolgt (V15). Mit Ausnahme vom 6-Aminoacridizinium (**9b**), bei dem ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist, nimmt die Fluoreszenzintensität bei DNA-Zugabe bei allen untersuchten Verbindungen signifikant ab. Exemplarische Titrationspektren sind in Abbildung 4.9 gezeigt. Da die Fluoreszenzintensität der sehr schwach emittierenden Aminoacridiziniumsalze **9c** und **9h** bei DNA-Zugabe abnimmt und damit das Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren zu klein wird, wurden weitere spektrofluorimetrische Untersuchungen mit diesen Verbindungen nicht durchgeführt.

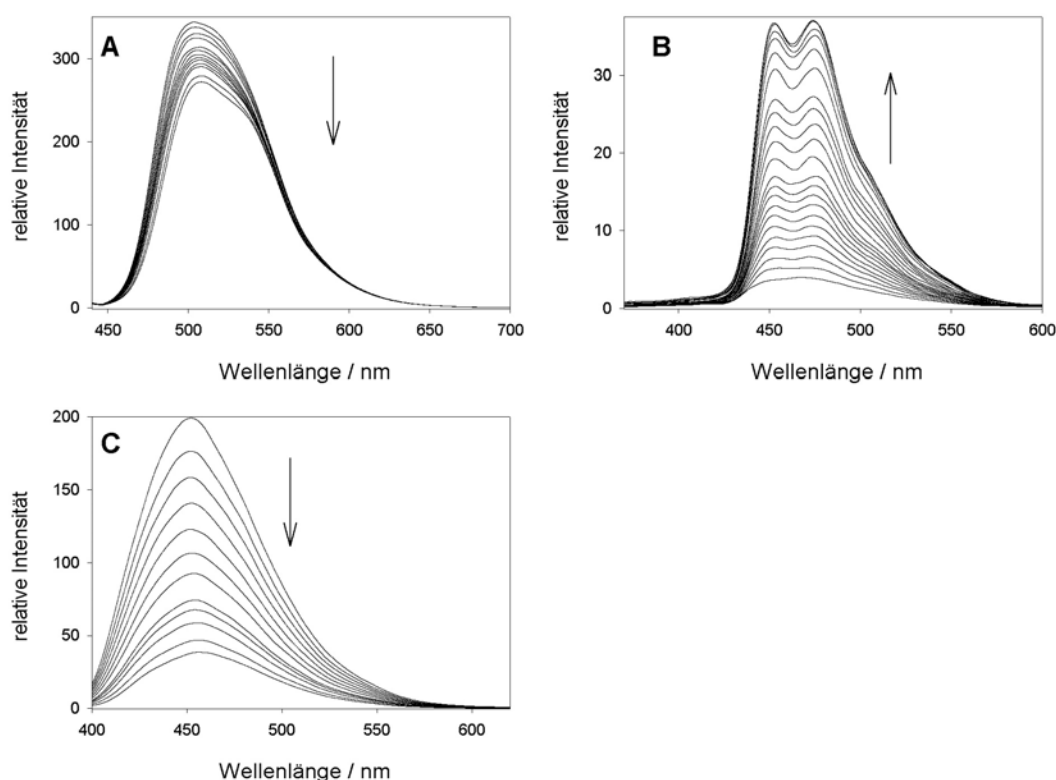


Abbildung 4.9: Spektrofluorimetrische Titrations der Chinoliziniumderivate **9i** (A), **9b** (B) und **10** (C) bei Zugabe von KT-DNA (V13)

Die Zugabe von Lösungen der synthetischen Polynucleotiddoppelstränge (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) zu den Derivaten **9a**, **9d**, **9f**, **9g** und **9i** hat qualitativ denselben Einfluss auf die Fluoreszenzspektren der genannten Acridiziniumsalze wie die Zugabe von KT-DNA, d.h. die Fluoreszenzintensität nimmt bei Zugabe der Polynucleotide ab. Beim 6-Aminoacridizinium **9b** führt die schrittweise Erhöhung der Konzentration der Polynucleotide jedoch zu einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute (Abbildung 4.10).

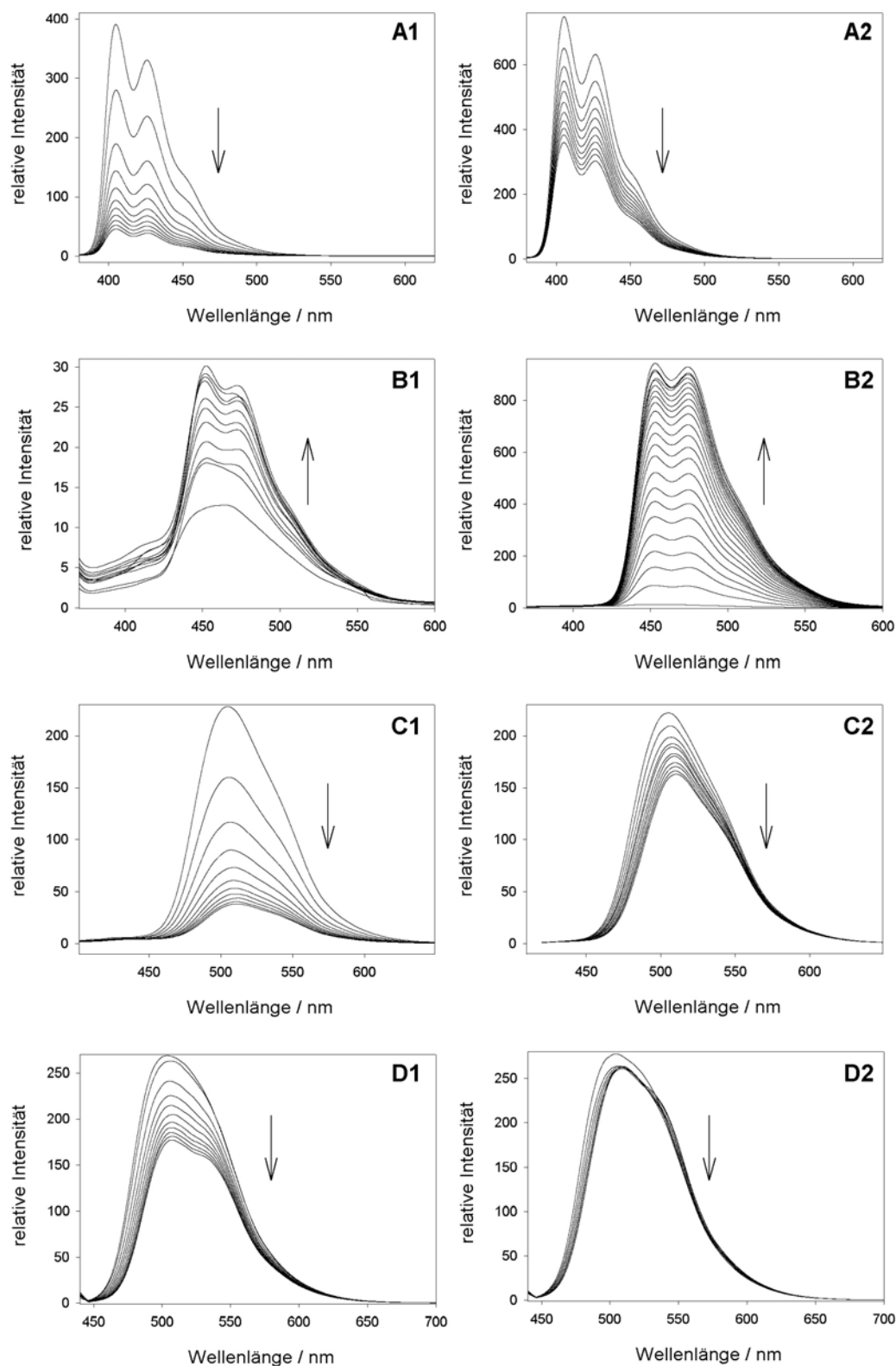


Abbildung 4.10: Spektrofluorimetrische Titrations der Acridiziniumsalze **9a** (A), **9b** (B), **9g** (C) und **9i** (D) mit den synthetischen Polynucleotiden (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (**1**) und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (**2**) (V13)

Bei der Titration der beiden Polynucleotiddoppelstränge zum Indolochinolinium **10** wurden dagegen zwei gegenläufige Tendenzen beobachtet. Die Zugabe von (Poly[dCdG]-

Poly[dCdG]) führt zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität, während die Titration von (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) zu einer leichten Intensitätssteigerung der Emission führt (Abbildung 4.11).

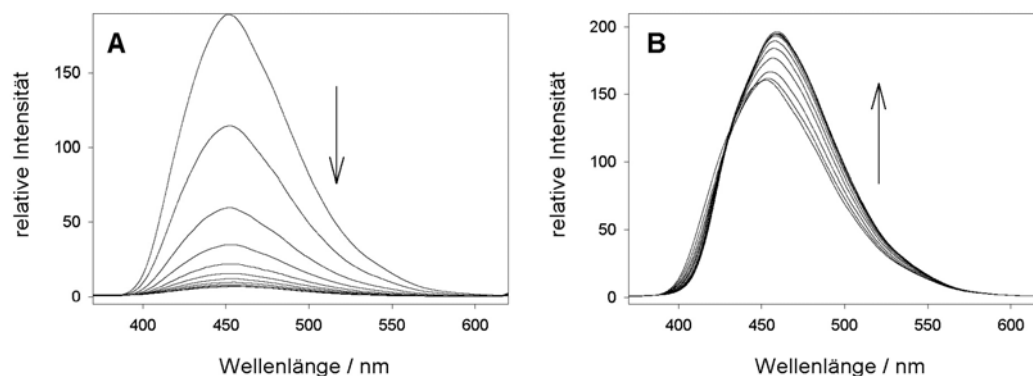


Abbildung 4.11: Fluoreszenzspektren des Indolochinoliziniums **10** bei Zugabe der synthetischen Polynucleotide (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (A) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (B) (V13)

Besonders bemerkenswert ist die signifikante Abhängigkeit der relativen Intensitätsänderung (I_0/I) aller Chinoliziniumderivate von der Basenzusammensetzung des Polynucleotids. Diese Abhängigkeit ist besonders ausgeprägt beim Indolochinolizinium **10** und beim 6-Aminoacridizinium (**9b**). Während die Zugabe von (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) bei der letztgenannten Verbindung sowohl eine Änderung der Bandenstruktur des Spektrums als auch eine Intensitätssteigerung um den Faktor 3 bewirkt, führt die Zugabe von (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) zu einer 70-fachen Fluoreszenzzunahme, ohne die Struktur der Emissionsbande zu beeinflussen (Abbildung 4.1 und 4.12). Auch bei den Acridiziniumderivaten **9a**, **9d**, **9f**, **9g** und **9i** sind die Unterschiede der Fluoreszenzlöschung durch (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) signifikant. In diesen Fällen löscht (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) die Fluoreszenz deutlich mehr als (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]). Zur Quantifizierung der Löscheffizienz wurden für die spektrofluorimetrischen Titrations von den Acridiziniumderivaten **9a**, **9b**, **9d**, **9f** und **9g** die relativen Intensitäten I_0/I gegen die DNA-Konzentration aufgetragen (Abbildung 6.5 im Experimentalteil). Der lineare Abschnitt dieser Stern-Volmer-Auftragungen wurde genutzt, um aus der Steigung die Löschkonstante K_{SV} zu bestimmen (Gleichung 4.1; Tabelle 4.7).

$$\frac{I_0}{I} \approx 1 + K_{SV}[DNA] \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

ERGEBNISSE

Tabelle 4.7: Beträge der Stern-Volmer-Konstanten, K_{SV} , aus den spektrofluorimetrischen Titrations der Acridiziniumsalze mit DNA

	K_{SV} (9a) ^a	K_{SV} (9b) ^b	K_{SV} (9d) ^a	K_{SV} (9f) ^a	K_{SV} (9g) ^a
KT-DNA	4.0×10^3	5.4×10^3		6.6×10^3	7.1×10^3
(Poly[dCdG]-Poly[dCdG])	2.9×10^4	6.2×10^3	1.6×10^4		5.1×10^4
(Poly[dAdT]-Poly[dAdT])	1.3×10^4	5.4×10^5	7.6×10^3		5.7×10^3

^a Erhalten aus der Steigung des linearen Teils der Auftragung I_0/I ; ^b erhalten aus der Steigung des linearen Teils der Auftragung I/I_0

Um zu erörtern, ob isolierte DNA-Komponenten denselben Einfluss auf die Emissionseigenschaften von Chinoliziniumderivaten haben wie die DNA, wurden weiterhin fluorimetrische Titrations mit den Mononucleotiden Guanosinmonophosphat (GMP) und Adenosinmonophosphat (AMP) sowie mit dem Nucleosid 8-oxo-dG durchgeführt (V14). Hierbei wurde mit steigender Nucleosid- bzw. Nucleotidkonzentration eine geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität des 9-Bromacridiziniums **9f** beobachtet. Die zugehörigen Stern-Volmer-Auftragungen und die daraus abgeleiteten Löschkonstanten (K_{SV}) zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der Fluoreszenzlöschung durch die zugegebenen DNA-Komponenten (Abbildung 4.12). Die Zugabe von GMP-Lösung zu den Acridiziniumderivaten **9a**, **9d** und **9g** ergab hingegen keine Löschung der Fluoreszenzintensitäten. Weiterhin konnte der Einfluss von GMP auf die Fluoreszenzspektren der Acridiziniumderivate **9a**, **9d**, **9f** und **9g** nicht zuverlässig reproduziert werden.

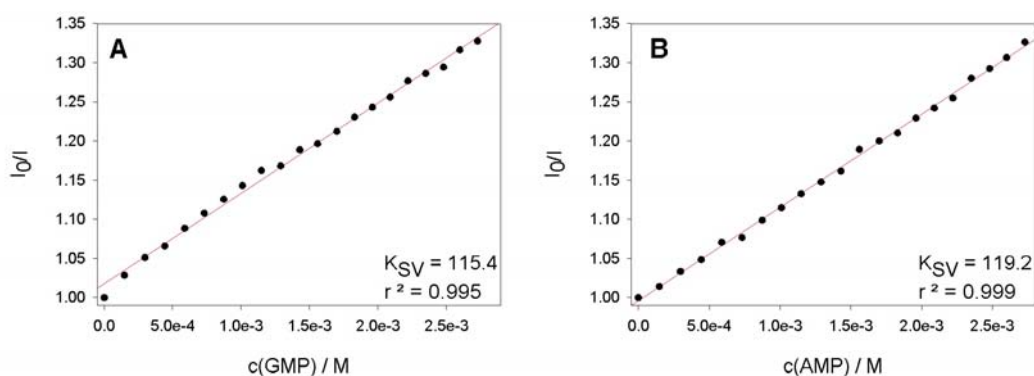


Abbildung 4.12: Stern-Volmer-Auftragungen der spektrofluorimetrischen Titrations von 9-Bromacridizinium **9f** mit GMP (A) und AMP (B) (V14)

Da in den Strangbruchexperimenten die Chinoliziniumbromide eingesetzt wurden, ist ein Bromradikal als reaktive Spezies bei der Induktion von Strangbrüchen in der DNA durch Chinoliziniumderivate eine denkbare Möglichkeit. Dieses Bromradikal könnte durch Elektronentransfer zwischen angeregtem Chinolizinium und einem Bromid-Ion entstehen. In diesem Fall sollte die Zugabe von Bromid-Ionen zu einer Chinoliziniumlösung die Fluoreszenzintensität des Chromophors löschen. Durch eine spektrofluorimetrische Titration

mit NaBr sollte deshalb untersucht werden, ob ein solcher Elektronentransfer stattfindet (V15). Die Zugabe einer konzentrierten wässrigen Lösung von NaBr zu einer Lösung von 9-Bromacridiziniumbromid (**9f**) führte zu einer sehr geringen Abnahme der Fluoreszenzintensität ($K_{sv} = 25$). Die Zugabe von Chlorid-Ionen hatte dagegen keinen Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute des 9-Bromacridiziniums (**9f**).

Bestimmung von Fluoreszenzlebenszeiten

Die Fluoreszenzlebenszeiten der Chinoliziniumderivate **10**, **9a** und **9g** in Anwesenheit verschiedener DNA-Konzentrationen wurden im Arbeitskreis von Prof. F. W. Schneider in Zusammenarbeit mit Dr. Angelika Häfner bestimmt (V16). Beim Indolochinolizinium **10** wurde neben der relativ langen Lebenszeit der angeregten Verbindung (7 ns) in Anwesenheit von 5 Moläquivalenten DNA eine zweite, kürzere Lebenszeit detektiert (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Fluoreszenzlebenszeiten^a der Chinoliziniumderivate **10**, **9a** und **9g** in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration (V16)

Moläquivalente DNA	$\tau(\mathbf{10})$ [ns] ^b (%)	$\tau(\mathbf{9a})$ [ns] ^c (%)	$\tau(\mathbf{9g})$ [ns] ^d (%)
0	7.5 (100)	6.0 (100)	14.4 (100)
5	5.1 (35)	3.1 (7)	5.1 (7)
	9.5 (65)	6.2 (93)	14.6 (93)
10		2.6 (4)	5.2 (13)
		6.1 (96)	15.1 (87)
20		2.5 (4)	-
		6.2 (96)	
40		3.5 (8)	5.6 (27)
		6.2 (92)	16.6 (73)

^a Standardabweichung < 1 %⁵⁹; ^b $\lambda_{ex} = 358$ nm, $\lambda_{det} = 452$ nm, $c(\mathbf{10}) = 10^{-5}$ M; ^c $\lambda_{ex} = 358$ nm, $\lambda_{det} = 405$ nm, $c(\mathbf{9a}) = 9 \times 10^{-6}$ M; ^d $\lambda_{ex} = 358$ nm, $\lambda_{det} = 507$ nm, $c(\mathbf{9g}) = 9 \times 10^{-6}$ M

Der gleiche Effekt wurde bei der Untersuchung des unsubstituierten Acridiziniums (**9a**) und des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) beobachtet (Tabelle 4.8). In diesen Fällen wurde jedoch die Lebenszeit bei vier verschiedenen Acridizinium-DNA-Verhältnissen bestimmt. Im Fall des 9-Aminoacridiziniumbromids (**9g**) steigt der Anteil der Spezies mit der kürzeren Lebenszeit mit zunehmender DNA-Konzentration an, während beim unsubstituierten Acridizinium der Anteil der kurzlebigeren Komponente bei unterschiedlichen Acridizinium-DNA-Verhältnissen weitestgehend konstant bleibt.

Zur weiteren Auswertung der Daten wurde die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit ($\langle\tau\rangle$) bei jedem DNA-Acridizinium-Verhältnis berechnet. Dazu wurde der präexponentielle Faktor

a und die Fluoreszenzlebenszeit (τ) für jedem Titrationsschritt neu bestimmt, indem die längere Lebenszeit des angeregten Acridiziniumsalzes in Abwesenheit von DNA bei den jeweiligen Titrationsschritten konstant gehalten wurde (**9a**: $\tau = 6.0$ ns; **9g**: $\tau = 14.0$ ns). Die kürzere Lebenszeit, die vermutlich auf eine gebundene Form des Acridiziniums zurückzuführen ist, wurde relativ dazu neu bestimmt. Aus den so ausgewerteten Daten wurden nach Gleichung 4.2 die durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeiten ($\langle \tau \rangle$) berechnet (Tabelle 4.9).⁶⁰

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i a_i \tau_i}{\sum_i a_i} \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

Tabelle 4.9: Fluoreszenzlebenszeiten und durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeiten der Acridiziniumsalze **9a** und **9g**

Äquivalente DNA	9a ^a				9g ^b			
	τ (ns)	a	%	$\langle \tau \rangle$ (ns) ^c	τ (ns)	a	%	$\langle \tau \rangle$ (ns) ^c
0	6.0		100	6.0	14.0		100	14.0
5	0.6	0.006	1.0	5.5	2.4	1.017	2.7	12.39
	6.0	0.064	99		14.0	0.106	97.3	
10	0.71	0.007	1.2	5.5	2.7	0.023	5.1	11.49
	6.0	0.065	98.8		14.0	0.081	94.1	
20	0.5	0.010	1.0	5.4				
	6.0	0.077	99					
40	1.7	0.004	1.6	5.8	2.8	0.045	10.8	9.81
	6.0	0.073	98.4		14.0	0.075	89.2	

^a Fluoreszenzlebenszeit des reinen Acridiziniums bei jeder DNA-Konzentration konstant auf 6.0 ns festgelegt; ^b Fluoreszenzlebenszeit des reinen Acridiziniums bei jeder DNA-Konzentration konstant auf 14.0 ns festgelegt; ^c berechnet mit Gleichung 4.2

Die berechneten durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeiten des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) werden mit zunehmender DNA-Konzentration in der Probe kürzer. Der lineare Teil der Auftragung der relativen durchschnittlichen Lebenszeit $\langle \tau \rangle / \tau$ gegen die DNA-Konzentration wurde genutzt, um aus der Steigung die Konstante für dynamisches Löschen zu bestimmen (Abbildung 4.13). Die durchschnittlichen Singulettlebenszeiten des unsubstituierten Acridiziniums (**9a**) ändern sich dagegen bei steigender DNA-Konzentration nicht signifikant, so dass auch in der Auftragung $\langle \tau \rangle / \tau$ kein einheitlicher Trend beobachtet werden kann.

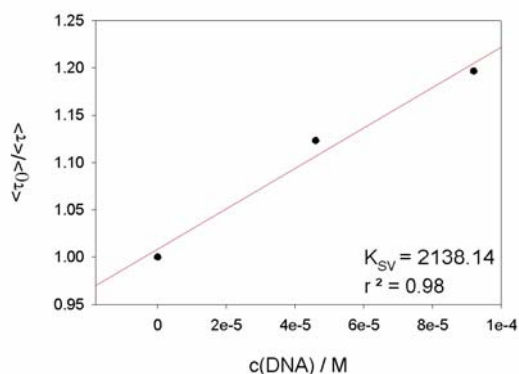


Abbildung 4.13: Bestimmung der Löschkonstante K_{SV} aus den durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeiten des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) in Anwesenheit von 0, 5 und 10 Moläquivalenten KT-DNA (V16)

4.3.3.2 Laserblitzspektroskopie

Mit zeitaufgelöster Laserblitzspektroskopie lassen sich kurzlebige reaktive Intermediate über ihre Transientenabsorptionsspektren charakterisieren.⁶¹ Daher eignet sich diese Methode zur weiteren spektroskopischen Untersuchung primärer Wechselwirkungen von angeregten Chromophoren mit DNA.⁶² Darüber hinaus erlaubt die Laserblitzspektroskopie häufig die spektrokinetische Analyse von dynamischen Wirt-Gast-Gleichgewichten in organisierten Medien. Da die Fluoreszenzlöschung der Acridiziniumsalze durch DNA und die photoinduzierte DNA-Schädigung über eine Reaktion des angeregten Zustandes der Acridiziniumsalze verläuft, sollte die Laserblitzspektroskopie, insbesondere die Triplett-Transientenabsorptionsspektren, genutzt werden, um die Primärreaktion des angeregten Zustandes mit der DNA spektroskopisch zu verfolgen. Die laserblitzspektroskopischen Untersuchungen wurden während eines Forschungsaufenthaltes an der University of Victoria, Canada, im Arbeitskreis von Prof. C. Bohne durchgeführt.

Untersuchung der reinen Acridiziniumsalze

Wässrige Lösungen der reinen Acridiziniumsalze **9a**, **9d**, **9e**, **9f**, **9g** und **9i** wurden bei verschiedenen Wellenlängen angeregt. Direkt nach dem Laserpuls wurden die Absorptionsspektren der Transienten aufgenommen, und deren Lebenszeit wurde in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bestimmt (Abbildung 6.6 im Experimentalteil; V17). Die langwelligen Absorptionsbanden in den entsprechenden Transientenspektren sind nicht auf solvatisierte Elektronen zurückzuführen, da diese Absorptionsbanden auch in N_2O -gesättigten Lösungen zu beobachten sind. Während bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm und 355 nm beim 9-Aminoacridizinium **9g** noch vier beziehungsweise zwei Transienten (Tabelle 6.4) beobachtet wurden, konnte bei einer Anregungswellenlänge von

455 nm bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nur noch ein Transient detektiert werden. Die Sauerstoff-Löschkonstante k_q ($1.4 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$), die aus den Lebenszeiten unter stickstoffgesättigten, atmosphärischen und sauerstoffgesättigten Bedingungen nach Gleichung 4.3 berechnet wurde, unterscheidet sich nicht signifikant von der theoretischen Konstante diffusionskontrollierter Reaktionen ($k_q = 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Daher handelt es sich bei diesem Transienten um das Acridiziniumtriplett, d.h. die Absorption entspricht einem T_1-T_n -Übergang.

$$k_{obs} = k_0 + k_q [Q] \quad (\text{Gleichung 4.3})$$

Um den störenden Einfluss der anderen Transienten zu vermeiden, wurden die weiterführenden Experimente mit dem 9-Aminoacridizinium (**9g**) bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm durchgeführt. Das Triplettabsorptionsspektrum dieser Verbindung zeigt eine Absorptionsbande von 460 bis 550 nm und eine Bande bei Wellenlängen kleiner als 350 nm. (Abbildung 4.14, Tabelle 4.10). Bei diesem, wie auch bei allen anderen untersuchten Acridiziniumderivaten entspricht der negative Bereich der Transientenspektren, die sogenannte „bleaching region“, in dem die Extinktionskoeffizienten des Grundzustandes größer sind als die des Transienten, der charakteristischen Absorptionsbande des Grundzustandes.

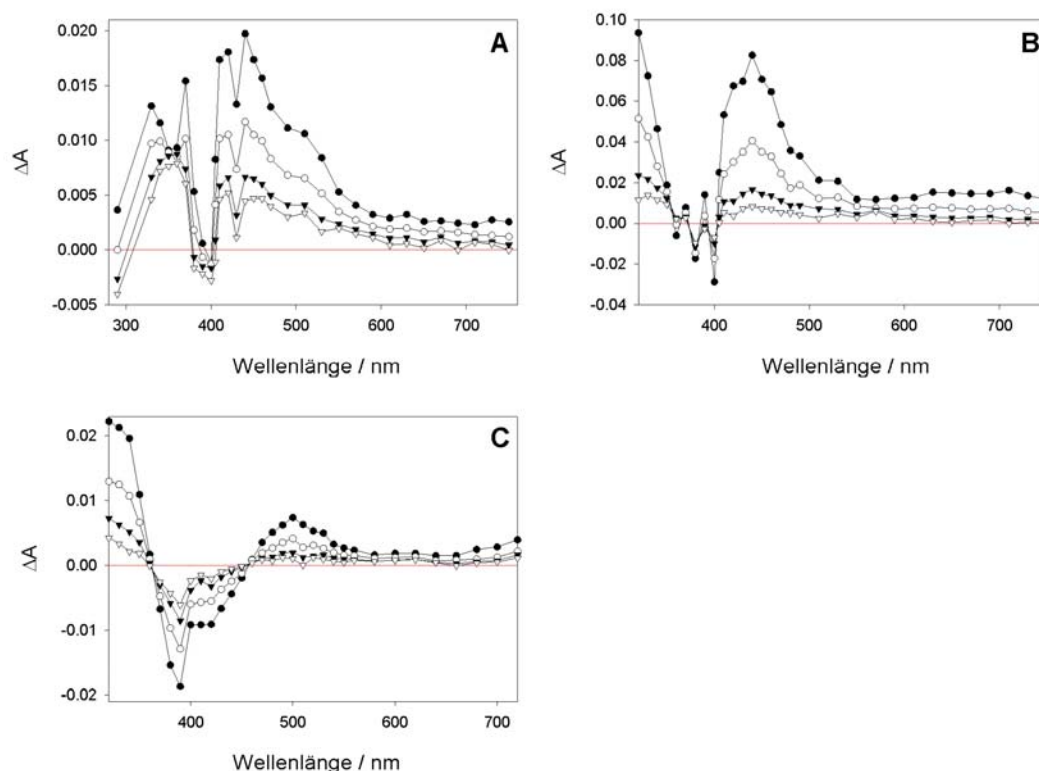


Abbildung 4.14: Triplettabsorptionsspektren der Acridiziniumsalze **9a** (A), **9f** (B) und **9g** (C) in wässriger Lösung (V17) (A: $\lambda_{ex} = 308 \text{ nm}$, Abklingzeiten: ● $3 \mu\text{s}$, ○ $14 \mu\text{s}$, ▼ $36 \mu\text{s}$, ▽ $72 \mu\text{s}$; B: $\lambda_{ex} = 308 \text{ nm}$, Abklingzeiten: ● $3 \mu\text{s}$, ○ $13 \mu\text{s}$, ▼ $32 \mu\text{s}$, ▽ $70 \mu\text{s}$; C: $\lambda_{ex} = 308 \text{ nm}$, Abklingzeiten: ● $10 \mu\text{s}$, ○ $26 \mu\text{s}$, ▼ $62 \mu\text{s}$, ▽ $140 \mu\text{s}$)

Beim unsubstituierten Acridizinium **9a** wurde bei Anregungswellenlängen von 308 nm und 355 nm nur ein Transient detektiert. Die Lebenszeiten dieses Transienten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zeigen, dass es sich hierbei um den angeregten Triplettzustand handelt ($k_q = 1.4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). Das zugehörige Triplettabsorptionsspektrum zeigt eine starke Absorption unter 390 nm, von 410 bis 430 nm und über 440 nm (Abbildung 4.14, Tabelle 4.10).

Beim 9-Bromacridizinium **9f** wurde ebenfalls bei Anregungswellenlängen von 308 nm und 355 nm ein Transient detektiert, dessen Löschung durch Sauerstoff annähernd diffusionskontrolliert ist ($k_q = 3.6 \times 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) und der daher einer Triplettabsorption zugeordnet wird. Das zugehörige Spektrum zeigt eine starke Absorptionsbande unter 350 nm und von 405 nm bis 550 nm (Abbildung 4.14, Tabelle 4.10).

Weiterhin wurden die Lebenszeiten der Acridiziniumderivate **9d**, **9e** und **9i** bestimmt, und die zugehörigen Absorptionsspektren aufgenommen (Abbildung 6.7 im Experimententeil). Allerdings zersetzten sich die Aminoacridiziniumsalze **9d** und **9i** während der Messung, während das 9-Chloracridizinium (**9e**) keine signifikanten Unterschiede zum 9-Bromacridizinium (**9f**) zeigte. Aus diesem Grund wurden alle weiterführenden Experimente nur mit den Verbindungen **9a**, **9f** und **9g** durchgeführt.

Eine Erhöhung der Acridiziniumkonzentration in der Probelösung hatte bei den Acridiziniumderivaten **9a**, **9f** und **9g** eine Verringerung der jeweiligen Triplettlebenszeiten zur Folge. Dies ist auf eine Selbstlöschung des Triplets durch die Reaktion mit einem im Grundzustand befindlichen Acridiziniummolekül zurückzuführen (Gleichung 4.4).



Die entsprechenden Selbstlöschkonstanten k_{sq} wurden durch die Bestimmung der Transientenlebenszeiten bei verschiedenen Acridiziniumkonzentrationen erhalten (V18). Mit Hilfe von Gleichung 4.3 und einer Auftragung der Acridiziniumkonzentration gegen die Lebenszeiten wurde die Selbstlöschkonstante k_{sq} als Steigung der resultierenden Gerade bestimmt (Abbildung 4.15).

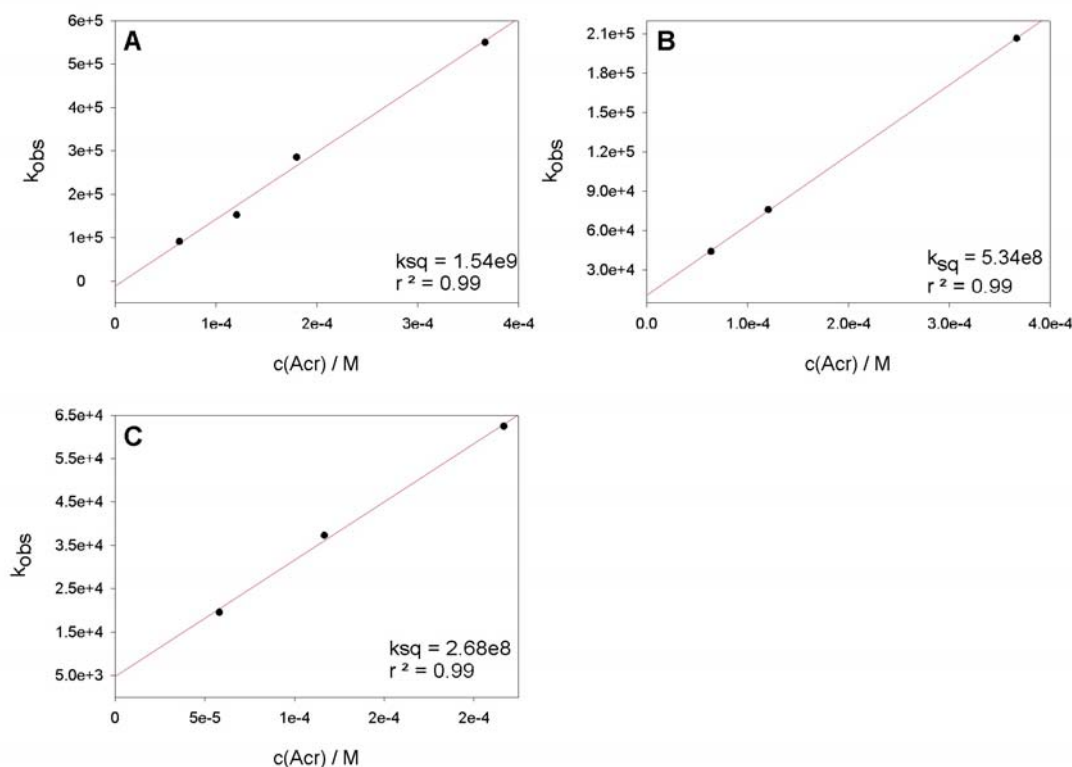


Abbildung 4.15: Bestimmung der Selbstlöschkonstanten k_{sq} der Acridiziniumderivate **9a** (A), **9f** (B) und **9g** (C) (V18)

Aufgrund dieser Konzentrationsabhängigkeit der Triplettlebenszeiten konnten die Triplettlebenszeiten verschiedener Acridiziniumlösungen nicht reproduziert werden. Deshalb wurden die in Tabelle 4.10 angegebenen Transientenlebenszeiten der Acridiziniumderivate **9a**, **9f** und **9g** aus den in Abbildung 4.15 gezeigten Auftragungen durch Extrapolation der Acridiziniumkonzentration auf 0 M erhalten.

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Daten der Laserblitzexperimente mit den Acridiziniumderivaten **9a**, **9f** und **9g**

	9a	9f	9g
τ [μ s] ^{a, b}	> 500	100	200
$k_q(O_2)$ [$s^{-1}M^{-1}$] ^b	1.4×10^9	3.6×10^9	1.4×10^9
k_{sq} [$s^{-1}M^{-1}$]	1.5×10^9 ^b	5.3×10^8 ^b	2.7×10^8 ^c
$k_q(\text{Ferrocen})$ [$s^{-1}M^{-1}$]	1.8×10^{10} ^b	1.4×10^{10} ^b	9.9×10^6 ^c
ΔA_{max} [nm] ^b	>390 410-430 <440	>350 405-550	>350 460-550

^a Bestimmt durch Extrapolation der Lebenszeit auf $c(Acr) = 0$ M; ^b $\lambda_{ex} = 308$ nm; ^c $\lambda_{ex} = 455$ nm;

Weiterhin wurden die Triplettenergien der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** durch Lösversuche mit Verbindungen bekannter Triplettenergie bestimmt (V19). Als

Löschsubstanzen wurden 1,3-Cyclohexadien (219 kJ/mol) und Ferrocen (159 kJ/mol) verwendet.⁶³ Die Experimente wurden aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Löschsubstanzen in Acetonitril durchgeführt. Bei der Zugabe von Ferrocen zu Lösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** konnte eine lineare Korrelation zwischen der Ferrocenkonzentration und der jeweiligen Triplettlebenszeit beobachtet werden (Abbildung 4.16, Tabelle 4.10). Dagegen hat die Zugabe von 1,3-Cyclohexadien keinen Einfluss auf die Lebenszeit des 9-Aminoacridiziniums (**9g**). Die Lebenszeit des Acridiziniumtripletts **9a** wird durch die Zugabe von 1,3-Cyclohexadien leicht verkürzt, jedoch konnte kein linearer Zusammenhang beobachtet werden. Die Triplettlebenszeit des 9-Bromacridiziniums **9f** wird durch 1,3-Cyclohexadien signifikant gelöscht. Aus der Auftragung der Cyclohexadienkonzentration gegen die Triplettlebenszeit tritt bis zu einer Cyclohexadienkonzentration von bis 100 mM eine lineare Abhängigkeit der Löschung auf (Abbildung 4.16).

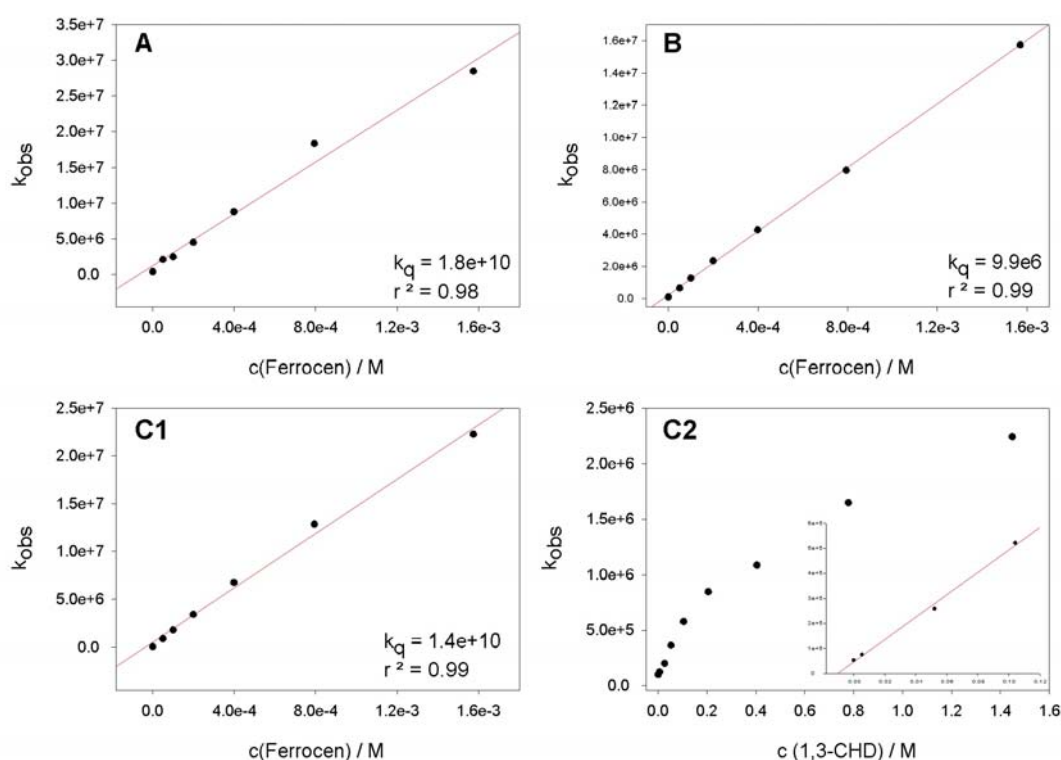


Abbildung 4.16: Löschung der Triplettlebenszeit der Acridiziniumderivate **9a** (A), **9g** (B) und **9f** (C) durch Ferrocen (1) und 1,3-Cyclohexadien (2) (V19)

4.3.3.2.1. Zugabe von DNA und deren Komponenten

Die Anwesenheit von KT-DNA hat bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm keinen signifikanten Einfluss auf die Triplettlebenszeiten der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** (V20A). Eventuell auftretende leichte Unterschiede in den Lebenszeiten sind auf

Konzentrationsunterschiede in den jeweiligen Probelösungen zurückzuführen (siehe k_{sq}). Die Löschkonstanten für die Löschung der Triplettlebenszeit durch Sauerstoff unterscheiden sich in DNA-haltigen Proben nicht von den Konstanten der Probelösungen reiner Acridiziniumsalze (V21). Die Lage der Maxima in den Triplettenspektren wird durch die Zugabe von DNA nicht beeinflusst, allerdings nimmt die Intensität der Transientenabsorption mit zunehmender DNA-Konzentration in der Probelösung bei allen untersuchten Verbindungen deutlich ab.

Da die Spektren und Lebenszeiten nicht signifikant von denen der reinen Acridiziniumsalze abweichen, handelt es sich bei den in Anwesenheit von DNA beobachteten Signalen um das ungebundene Acridizinium. Deshalb sollte die Anregungswellenlänge derart variiert werden, dass je nach Wellenlänge hauptsächlich ungebundene oder gebundene Acridiziniummoleküle angeregt werden (V20B). Bei den spektrophotometrischen Titrations von KT-DNA zu 9-Aminoacridizinium **9g** bildet sich bei 455 nm ein isosbestischer Punkt aus, an dem gebundenes und freies Acridizinium denselben Extinktionskoeffizienten aufweisen (Abbildung 4.17). Bei kürzeren Wellenlängen ($\lambda < 455$ nm) absorbiert demnach mehr ungebundenes Acridizinium, während bei längeren Wellenlängen ($\lambda > 455$ nm) das gebundene Acridizinium mehr zur Gesamtabsorption beiträgt. Deshalb sollte in den laserblitzspektroskopischen Untersuchungen bei einer Wellenlänge von 465 nm vor allem gebundenes Acridizinium angeregt werden, während bei einer Anregungswellenlänge von 445 nm mehr ungebundenes als gebundenes Acridizinium angeregt wurde.

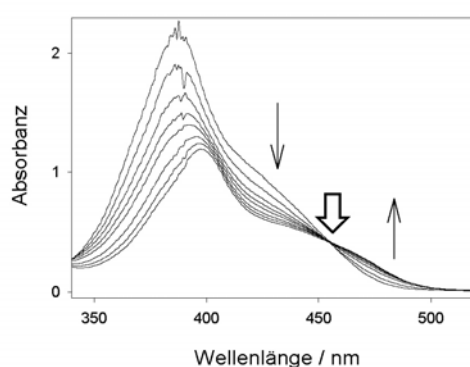


Abbildung 4.17: Spektrophotometrische Titration des 9-Aminoacridiziniums mit KT-DNA; (dünne Pfeile: verdeutlichen die Änderung im Absorptionsspektrum durch DNA-Zugabe; dicker Pfeil: Lage des isosbestischen Punktes)

Bei einem Vergleich der Triplettabsorptionsspektren und der Transientenlebenszeiten des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) wurde jedoch keine Wellenlängenabhängigkeit der Bandenstruktur oder der Intensität der Spektren sowie der Triplettlebenszeiten beobachtet. Dies bedeutet, dass

bei jeder der verwendeten Anregungswellenlängen das ungebundene Acridiziniumtriplett detektiert wurde.

Analoge Untersuchungen wurden mit den Acridiziniumsalzen **9a** und **9f** durchgeführt. Bei dem Versuch, die jeweiligen gebundenen Chromophore bei einer Wellenlänge von 420 nm anzuregen, wurden allerdings keine Signale detektiert. Dies ist vermutlich auf die geringe Laserintensität und den geringen Extinktionskoeffizienten beider Verbindungen bei dieser Wellenlänge zurückzuführen.

Weiterhin wurden Experimente zur Löschung der Tripletzustände der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** mit Desoxyribose, GMP, Ribose-5-Phosphat und Guanodin durchgeführt (V22). Allerdings hatte die Zugabe keiner der genannten Verbindungen einen Einfluss auf die jeweiligen Tripletlebenszeiten und Absorptionsspektren. Jedoch wurde nach der Bestrahlung einer Lösung des 9-Aminoacridiniums **9g** bei 350 nm in Gegenwart von Ribose-5-Phosphat kein 9-Aminoacridinium mehr im UV-Spektrum des Grundzustandes detektiert.

4.3.3.3 Auffinden reaktiver Intermediate unter anaeroben Bedingungen (V23)

Die laserblitzspektroskopischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass Singulett-Sauerstoff das reaktive Intermediat ist, das unter aeroben Bedingungen die DNA schädigt. Unter anaeroben Bedingungen hingegen kann $^1\text{O}_2$ nicht gebildet werden, so dass ein anderes reaktives Intermediat den DNA-Strangbruch induzieren muss. Sauerstoffzentrierte Radikale sind bekannt für ihre DNA-schädigenden Eigenschaften,^{3a} so dass es nahe lag, nach derartigen Radikalen zu suchen. Unter den Reaktionsbedingungen dürfte das Hydroxylradikal die wahrscheinlichste Zwischenstufe sein, da es nach mehreren Mechanismen aus Wasser gebildet werden kann.⁶⁴ Hydroxylradikale können durch Abfangreaktionen mit Benzoesäurederivaten abgefangen werden, wobei Terephthalsäure den Vorteil hat, dass sie leicht fluoreszenzspektroskopisch nachweisbar ist und bei der Reaktion mit Hydroxylradikalen anders als Benzoesäure nur ein Reaktionsprodukt ergibt.⁶⁵ Weiterhin kann diese Reaktion unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurde das Chinolizinium **9a** in wässriger Lösung in Gegenwart von Terephthalsäure als Abfangreagenz bestrahlt, und das Photolysat wurde spektrofluorimetrisch analysiert. Damit die Fluoreszenz des Chinoliziniums nicht stört, wurde die Analyseprobe mit wässriger NaOH versetzt. Unter diesen Bedingungen zersetzen sich Chinoliziniumsalze zu nicht fluoreszierenden

Produktgemischen. Darüber hinaus liegt im basischen Milieu das Anion der Hydroxyterephthalsäure vor, das die eigentliche emittierende Spezies ist. Bei zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt eine Fluoreszenzbande der Analyseprobe mit $\lambda_{\max} = 427$ nm stetig zu. Diese Fluoreszenzbande tritt nicht auf, wenn nur Terephthalsäure oder nur Chinolizinium **9a** unter identischen Bedingungen bestrahlt und aufgearbeitet wird.

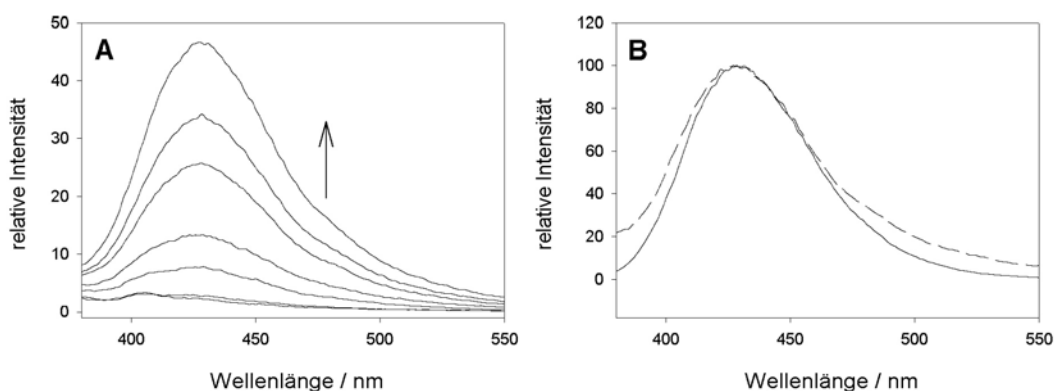


Abbildung 4.18: Bildung der Hydroxyterephthalsäure aus der Photoreaktion von Acridiziniumtetrafluorborat **9a** und Terephthalsäure (A) und Vergleich des Spektrums A mit dem Emissionsspektrum einer authentischen Probe Hydroxyterephthalsäure (B) (V23: Bestrahlung bei 350 nm, Probenentnahme nach 0, 15, 40, 60, 85, 105 und 120 min, $\lambda_{\text{ex}} = 322$ nm) (V23)

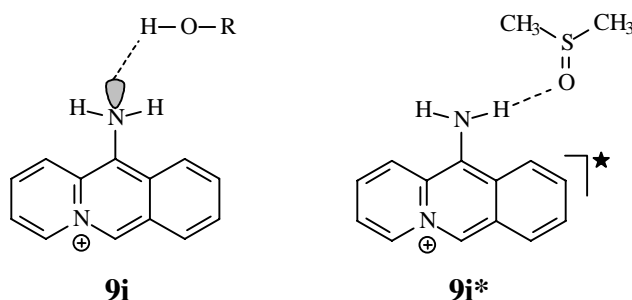
Die Zuordnung der Fluoreszenzbande zum Anion der Hydroxyterephthalsäure wurde durch den Vergleich mit einer authentischen Probe bestätigt (Abbildung 4.18 B).⁶⁶

5 Diskussion

5.1 Photophysikalische Eigenschaften der Chinoliziniumderivate

Die photophysikalischen Eigenschaften der Chinoliziniumderivate **9** und **10** sind vom Substitutionsmuster abhängig. Besonders auffällig sind die unterschiedlichen Absorptionsmaxima sowie die langwellige Bandenstruktur der Amine. Während einige Derivate eine ausgeprägte Charge-Transfer-Bande aufweisen (**9c**, **9d**, **9g**, **10**), sind bei anderen Derivaten diese Übergänge eher schwach (**9b**, **9i**). Darüber hinaus variiert das Maximum des S_0 - S_1 -Übergangs (auch p-Bande oder 1L_a -Übergang genannt) signifikant innerhalb der Aminoacridiziniumderivate. Ähnlich wie bei Donor-Akzeptor-substituierten Benzolderivaten⁶⁷ besteht jedoch keine ersichtliche Korrelation der Absorptionseigenschaften mit der Position der Aminogruppe. Weder die Ausdehnung des π -Systems zwischen der Aminfunktion (Donor) und dem quartären Stickstoffatom (Akzeptor) noch die Unterscheidung zwischen linear konjugiertem und kreuzkonjugiertem Donor-Akzeptor-System weisen auf einen entsprechenden Trend hin. Offensichtlich ist es zur genaueren, differenzierenden Erörterung der Absorptionseigenschaften notwendig, die entsprechenden Molekülorbitale auf hohem Niveau zu berechnen. Derartige Studien sollten jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Weiterhin zeigen alle aminosubstituierten Acridiziniumderivate und das Indolochinolizinium **10** ein ausgeprägtes solvatochromes Verhalten. Die höchste Rotverschiebung der jeweiligen Maxima ist hierbei in DMSO oder Pyridin zu beobachten, die beide eine hohe Donornummer haben. Diese Donornummer ist ein Maß für die Fähigkeit eines Moleküls, freie Elektronen für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung zu stellen. Die Rotverschiebung gegenüber den Absorptionsmaxima in Lösungsmitteln mit geringerer Donornummer dürfte deshalb auf die Stabilisierung des angeregten Zustandes durch freie Elektronenpaare des Lösungsmittels zurückzuführen sein (Schema 5.1). Beim 11-Aminoacridizinium (**9i**) konnte weiterhin eine Korrelation der Akzeptornummer der protischen Lösungsmittel mit der Lage der Absorptionsmaxima festgestellt werden, die durch eine Stabilisierung des angeregten Zustands durch Wasserstoffbrückenbindungen erklärt werden kann (Schema 5.1). Ein ähnlicher Effekt tritt beim Anilin auf und wird als "Blauverschiebungsanomalie" bezeichnet.⁴⁹



Schema 5.1: Assoziative, stabilisierende Wechselwirkungen von protischen Lösungsmitteln mit dem Grundzustand des Acridiziniumderivats **9i** und von polaren aprotischen Lösungsmitteln mit hoher Donornummer (hier: DMSO) mit dem angeregten Zustand **9i***

Bemerkenswert ist allerdings die Feststellung, dass die Absorptions- und Emissionseigenschaften der meisten Acridiziniumderivate nur mäßig oder oft gar nicht mit einer bestimmten Lösungsmiteigenschaft korreliert werden können. Vermutlich sind es daher verschiedene Lösungsmiteigenschaften, die je nach Lösungsmittel in unterschiedlichem Ausmaß zu den Absorptions- und Emissionseigenschaften beitragen.

Auch die Fluoreszenzquantenausbeute ist vom Substitutionsmuster der Chinoliziniumderivate abhängig. Während in verdünnten Lösungen der Acridiziniumderivate **9a**, **9d** und **9g** die Fluoreszenz bereits mit bloßem Auge erkennbar ist, fluoreszieren die Chromophore **9f** und **9i** nur mäßig, während die 6-, 7- und 10-substituierten Aminoacridiziniumsalze **9b**, **9c** und **9h** kaum emittieren (Abbildung 5.1).

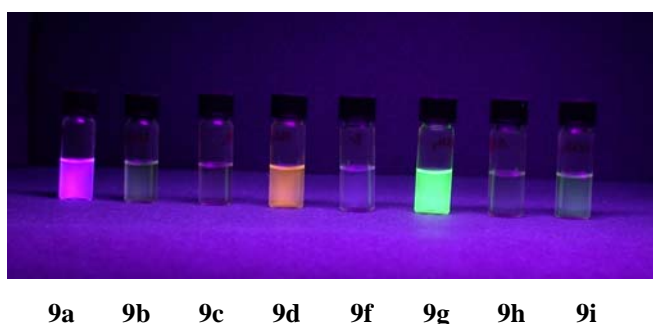


Abbildung 5.1: Fluoreszenz der Acridiziniumbromide **9a-i** in Methanol (10^{-5} M, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm); die Emissionsfarbe von **9a** ist durch die Farbe des Anregungsstrahls leicht verfälscht.

Die geringen Quantenausbeuten der Aminoacridiziniumderivate **9b**, **9c** und **9h** sind unabhängig vom Lösungsmittel und vom Gegenion, so dass eine externe Deaktivierung des angeregten Zustands ausgeschlossen werden kann. Bei diesen Derivaten ist vermutlich eine Verlängerung der exocyclischen C-N-Einfachbindung und die anschließende Rotation der Aminogruppe um diese Bindung für die strahlungslose Deaktivierung verantwortlich. Durch diese Bindungsrotation könnte eine sterische Abstoßung der Aminoprotonen durch die *peri*-

ständigen Protonen vermieden. Tatsächlich zeigen kristallographische Untersuchungen am Amin **9b**, dass die C(6)-N-Bindungslänge mit nur 132 pm einen hohen Doppelbindungscharakter hat und deshalb die sterische Abstoßung zwischen den genannten Protonen tatsächlich relativ hoch ist.⁶⁸ Im angeregten Zustand findet vermutlich eine Bindungsverlängerung statt, die eine Rotation um die entstandene Einfachbindung ermöglicht.

Das 9-Bromacridizinium **9f** hat im Vergleich zum Stammsystem ebenfalls eine relativ geringe Fluoreszenzquantenausbeute. Es wurde bereits von Bendig *et al.* demonstriert, dass dies im Wesentlichen auf ein effizientes Intersystem-Crossing durch einen internen Schweratomeffekt zurückzuführen ist.⁶⁹

5.2 Wechselwirkung mit DNA

5.2.1 Bestimmung des Bindungsmodus

Die signifikante Abnahme der Absorbanz (Hypochromie) und die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der aminosubstituierten Chinoliziniumderivate bei Zugabe von natürlicher und synthetischer DNA weisen auf eine starke Assoziation zwischen der Nucleinsäure und den Chinoliziniumsalzen hin.⁹ Weiterhin deuten die isosbestischen Punkte, die bei steigender DNA-Konzentration in den Probelösungen aller untersuchten Verbindungen beobachtet wurden, an, dass ein bestimmter Bindungsmodus bevorzugt wird. Die aus den Daten der spektrophotometrischen Titrations mit DNA berechneten intrinsischen Bindungskonstanten liegen für die meisten der untersuchten Verbindungen im Bereich von 10^4 M^{-1} . Nur das Indolochinolizinium **10** und das 7-Aminoacridizinium (**9c**) haben eine um den Faktor 10 erhöhte Bindungsaffinität zur DNA. Ein Vergleich der Bindungskonstanten des 6-Aminoacridiziniums **9b** und des Indolochinoliziniums **10** zwischen KT-DNA und den synthetischen Polynucleotiden zeigt weiterhin, dass die Bindungsaffinität zu CG-Basenpaaren geringfügig, aber signifikant höher ist als zu AT-reichen Sequenzen. Diese Präferenz für Cytosin-Guanin-Basenpaare und die beobachteten Ausschlußparameter, die fast ausschließlich einen Wert von etwa 4 aufweisen, deuten bereits darauf hin, dass die untersuchten Verbindungen bevorzugt durch Intercalation mit der DNA wechselwirken. Der Ausschlußparameter gibt an, wieviele Bindungsstellen ein Gastmolekül in der DNA belegt.

Unter Berücksichtigung des "Nachbarausschlussprinzips" kann bei einer Intercalation nur jede zweite Bindungsstelle besetzt werden, so dass im Idealfall vier Basen ($n = 4$) belegt werden.^{1c}

Die CD-Spektren der Chinoliziniumderivate **9a**, **9g**, **10** und der kürzlich untersuchten Acridiziniumderivate **9d**, **9e** und **9f**,⁵⁷ in Anwesenheit von DNA beweisen die starken bindenden Wechselwirkungen zur Doppelhelix, da im Absorptionsbereich der achiralen Chromophore ein starkes positives CD-Signal induziert wird.^{11,17} Zwar sind positive induzierte CD-Signale für Furchenbinder bekannt, jedoch zeigen auch Intercalatoren stark ausgeprägte positive ICD-Signale, wenn ihr Übergangsdipolmoment senkrecht zur langen Achse der Bindungstasche polarisiert ist. Im Gegensatz dazu ist das ICD-Signal des 9-Aminoacridiziniums (**9g**)⁵⁷ bei kleinen DNA-Konzentrationen negativ, was für Intercalatoren, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Bindungstasche liegt, charakteristisch ist.¹¹ Berechnungen des Acridiziniumderivates **9a** zeigen, (Berechnungen nach ZINDO (INDO/S), in Zusammenarbeit mit Prof. Christoph Lambert, Universität Würzburg) dass das Übergangsdipolmoment der langwelligen Absorptionen im Gegensatz zu symmetrischen Anthracenderivaten⁷⁰ entlang der langen Molekülachse polarisiert ist. Diese Rechnungen reproduzieren zwar die Absorptionswellenlängen und die Orthogonalität der ¹L_a- und der ¹L_b-Banden sehr gut, jedoch sollte aufgrund der unbestimmten Genauigkeit der Werte die Richtung des Übergangsdipols mit Vorsicht zur weiteren Interpretation genutzt werden. Anders verhält es sich bei den Donor-Akzeptor-Systemen **9a** und **10**, in denen das Übergangsdipolmoment der langwelligen Absorption durch die Donor-Akzeptor-Wechselwirkung entlang der langen Molekülachse polarisiert ist.^{71,72} Daraus wird gefolgert, dass das 9-Aminoacridizinium (**9g**) mit der langen Molekülachse entlang der Bindungstasche intercaliert (Schema 5.2), während das Indolochinolizinium **10** und vermutlich ebenso das Stammsystem **9a** mit ihrer langen Molekülachse senkrecht zur langen Achse der Basenpaare in die Bindungstasche hineinragen. Im Falle des intercalierten Indolochinolizinium **10** wurde diese Komplexgeometrie ebenfalls durch Molecular-Modelling-Rechnungen bestätigt.⁷³



Schema 5.2: Relative Lage der Chinoliziniumderivate **9a** bzw. **9g** (links) und **10** (rechts) in der Bindungstasche

Die LD-Spektren aller untersuchten Verbindungen zeigen im langwelligen Absorptionsbereich der Chinoliziniumderivate ein negatives LD-Signal, welches ein typisches Merkmal von Intercalatoren ist.¹¹ Die Annahme, dass alle untersuchten Verbindungen in die DNA intercalieren, wird weiterhin dadurch gestützt, dass die Intensität des DNA-Signals zwischen 230 und 300 nm mit steigender Chinoliziniumkonzentration zunimmt, was auf eine bessere Ausrichtung der DNA im hydrodynamischen Feld durch eine Versteifung und Verlängerung der Helix zurückzuführen ist. Eine derartige Strukturänderung der DNA wird in der Regel nur bei einer Intercalation beobachtet.¹¹ Dieser Effekt ist bei den Chinoliziniumderivaten **9b**, **9g**, **9i** und **10** stärker ausgeprägt als bei den Verbindungen **9a**, **9c**, **9d**, **9e** und **9f**, was ein Hinweis für geringe Unterschiede im Bindungsmodus ist.

Zur weiteren Erörterung des Bindungsmodus wurde die Wellenlängenabhängigkeit des reduzierten LD untersucht, da nur präferentiell intercalierte Moleküle ein wellenlängenunabhängiges LD-Spektrum ergeben, während Moleküle, die zusätzlich auch am Rückgrat gebunden sind, ein wellenlängenabhängiges Spektrum ergeben.¹¹ Eine Unabhängigkeit des LD-Signals von der Wellenlänge sollte demnach theoretisch eine Nulllinie ergeben. Die Sensibilität des Gerätes und die in der Regel statistisch am DNA-Rückgrat verteilten nicht intercalierenden Moleküle führen zu einer leichten Fluktuation des LD_r-Signals. Ebenso können geringfügige mikroskopische Unterschiede im Intercalationsmodus zu einer Schwankung der LD_r-Signale führen. Solange diese Signalvariation sich jedoch im Bereich von ± 0.005 befindet, darf noch von einem wellenlängenunabhängigen Signal gesprochen werden. Die LD-Spektren der Acridiziniumderivate **9b**, **9g**, **9i** und **10** zeigen im langwelligen Absorptionsbereich ein weitestgehend von der Wellenlänge unabhängiges LD-Signal, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Moleküle ausschließlich durch Intercalation an die DNA binden. Im Gegensatz dazu zeigen die Verbindungen **9a**, **9c**, **9d**, **9e** und **9f** eine Wellenlängenabhängigkeit des LD-Signals der langwelligsten Absorption. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass neben der Intercalation noch ein zweiter, untergeordneter Bindungsmodus wie z.B. die Furchenbindung oder externe Assoziation durch elektrostatische Wechselwirkungen existiert.

Die Ergebnisse der ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen des synthetischen selbstkomplementären Dodecanucleotids (5'-CGCGAATTCGCG-3') in Anwesenheit der Chinoliziniumderivate **9a** und **9g** bestätigen die oben genannten Vermutungen über den Bindungsmodus der Chinoliziniumderivate. Alle Signale der Iminoprotonen, d.h. der aromatischen Protonen, die die Wasserstoffbrückenbindung des Basenpaares konstituieren,

wurden in Anwesenheit der Acridiziniumsalze hochfeldverschoben, während keine neuen, dem Oligomer zuzuordnenden Signale detektiert wurden. Neben der Verschiebung der Signale wurde weiterhin in Anwesenheit der Chinoliziniumsalze eine signifikante Verbreiterung der DNA-Resonanzen beobachtet. Diese Befunde sind charakteristisch für einen intercalativen Bindungsmodus und lassen auf einen schnellen Austausch zwischen gebundener und freier Form der Chromophore schließen, d.h. dass die Assoziationsrate/Dissoziationsrate kleiner ist als die NMR-Zeitskala und die beobachteten Signale einen gemittelten Wert aus denen des gebundenen und ungebundenen Chinolizinium darstellen.⁷⁴ Da weiterhin die Symmetrie des Doppelstranges nicht verloren geht, darf gefolgert werden, dass prinzipiell jede Bindungstasche belegt wird.^{75,76} Eine Bindungspräferenz kann jedoch aus dem Vergleich der Verschiebungen der in der Mitte der Bindungstasche liegenden Iminoprotonen abgeleitet werden: Der größte Einfluss der gebundenen Acridiziniumsalze auf die Verschiebung der Iminosignale tritt beim dritten und vierten CG-Basenpaar auf. Beide Signale werden signifikant weiter zum Hochfeld verschoben als die übrigen Iminoressonanzen (CG-Basenpaare: **9a**: C-G2: -0.20 ppm, C-G3: -0.31 ppm, C-G4: -0.31 ppm; **9g**: C-G2 -0.12 ppm, C-G3 -0.21 ppm, C-G4 -0.20 ppm; AT-Basenpaare: **9a**: A-T5 -0.13 ppm, A-T6 -0.04 ppm; **9g**: A-T5 -0.04, A-T6 sehr breit). Diese relative Lage der Signale zueinander wurde auch bei den Aminofunktionen der Cytosine und Guanine beobachtet (Abbildung 5.2). Da die Hochfeldverschiebung der Iminoprotonen in der Regel mit zunehmender Bindungspräferenz und Bindungsstärke zunimmt, darf geschlossen werden, dass die beiden untersuchten Acridiziniumsalze **9a** und **9g** eine Intercalation zwischen dem dritten und dem vierten Basenpaar bevorzugen und somit eine Präferenz zur Assoziation an CG-reiche Sequenzen aufweisen.⁷⁷

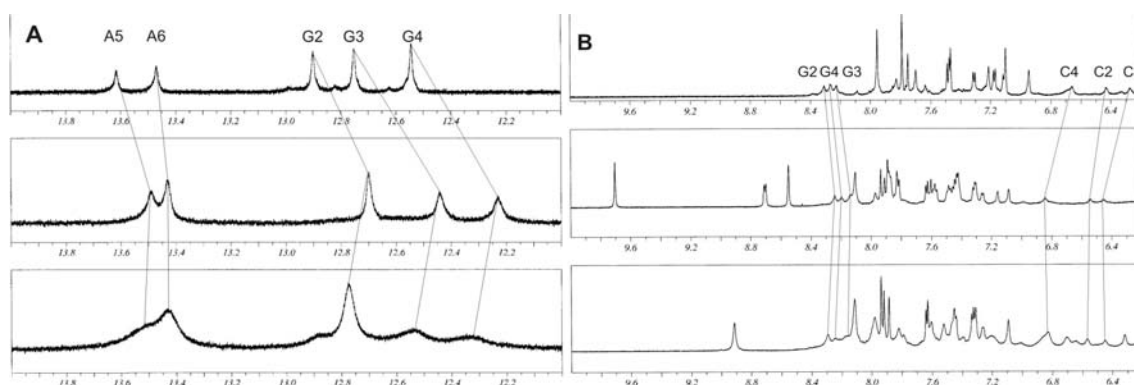


Abbildung 5.2: Verschiebungen der Imino- (A) und der Aminoresonanzen (B) des reinen Dodecamers (5'-CGCGAATTCGCG-3') (oben), in Anwesenheit von Acridiziniumbromid (**9a**) (Mitte) und 9-Aminoacridiziniumbromid (**9g**) (unten)

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass anellierte Chinoliziniumderivate grundsätzlich an DNA binden und dass diese Heterocyclen bevorzugt intercalieren. Während jedoch einige Chinoliziniumsalze annähernd ausschließlich intercalieren, gehen andere Derivate auch in geringem Ausmaß einen Bindungsmodus ein, bei dem sie am DNA-Rückgrat assoziiert sind. Aus dem Vergleich der verschiedenen aminosubstituierten Chinoliziniumderivate läßt sich bezüglich der Bindungseigenschaften keine konsistente Struktur-Eigenschafts-Korrelation ableiten, weil die Unterschiede in den meisten Fällen eher marginal sind. Da fast alle Amine annähernd gleiche Eigenschaftsänderungen während der Assoziation an die DNA aufweisen und vergleichbare Bindungskonstanten haben, wird angenommen, dass der Bindungsmodus und die Komplexgeometrie dieser Derivate weitestgehend identisch sind. Lediglich das 7-Aminoacridizinium (**9c**) und das Indolochinolizinium **10** weisen eine um eine Größenordnung höhere Bindungskonstante auf. Im Falle des Indolochinoliziniums **10** sind vermutlich stärkere π - π -Wechselwirkungen mit den Nucleinbasen relevant, da tetracyclische naphthoanellierte Chinoliziniumderivate, die ungefähr dieselbe Ausdehnung des π -Systems aufweisen wie **10**, vergleichbare Bindungskonstanten haben.⁷⁸ Diese Befunde stehen im Einklang mit Beobachtungen von Rebek *et al.* dass die Einführung einer weiteren Benzoleinheit in einem aromatischen π -Stapel bestehend aus Nucleinbasenpaar und anellierten Benzolderivaten die Bindungsenergie um etwa 400 cal/mol erhöht.⁷⁹ Das 7-Aminoacridizinium (**9c**) könnte möglicherweise etwas stärker als die anderen Amine binden, weil die Aminogruppe sich an einer Position befindet, die bei der Intercalation keine abstoßende sterische Wechselwirkung erfährt.

5.2.2 Lichtinduzierte DNA-Schädigung

Die Bestrahlung superhelikaler DNA in Anwesenheit der Chinoliziniumderivate führte unter anaeroben Bedingungen in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster zur lichtinduzierten Schädigung des Biomoleküls. Während die Chinoliziniumsalze **9b**, **9c**, **9g** und **9h** keine oder wenig Strangbrüche induzieren, haben die Acridiziniumsalze **9a** und **9d** eine mäßige und die Chinoliziniumsalze **9f**, **9i** und **10** eine sehr ausgeprägte photoschädigende Wirkung. In Tabelle 5.1 sind die qualitativen Strangbruchraten der Chinoliziniumderivate zusammen mit den physikalischen Eigenschaften (Absorptionseigenschaften, Reduktionspotential im angeregten Zustand) und den Kenndaten zur Evaluierung der Wechselwirkung mit DNA (Verschiebung des Absorptionsmaximums, Bindungskonstante) angegeben.

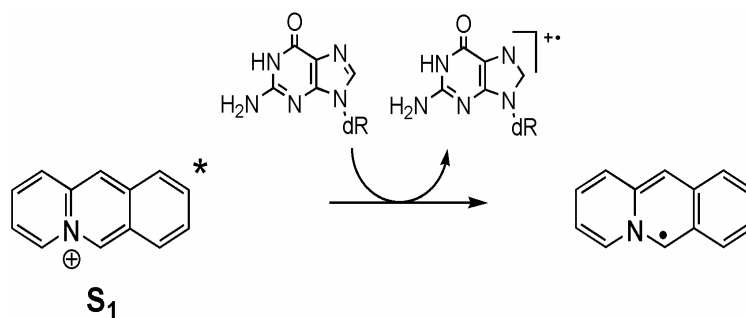
Tabelle 5.1: Ergebnisse der spektrophotometrischen Titrations mit DNA, physikalische und photolytische Eigenschaften der Chinoliziniumsalze **9a-i**

	$\lambda_{\text{abs,max}}^{\text{a}}$	$E_{\text{red}}^{\text{b}}$	$\Delta\lambda^{\text{c}}$	K^{d}	DNA Strangbruchaktivität ^e
9a	396	2.4	4 ^f	8.8	+/-
9b	424	2.0	8	2.6	-
9c	388	2.1	10	11	-
9d	369	n.b. ^g	20	5.2 ^f	+/-
9f	398	2.6	4 ^f	2.0	+
9g	385	1.9	12	1.6	-
9h		n.b.	18	5.3	-
9i	407	n.b.	13	1.9	+

^a Langwelliges Absorptionsmaximum in nm; in H₂O (**b, c, d, e, g, h, i**) oder EtOH (**a, f**)⁸⁰; ^b $E_{\text{red}}^{\text{*}} = E_{0-0} + E_{\text{red}}$, in V, **a, f**: Gegenion ClO₄⁻, in 0.1 M Tetraethylammoniumperchlorat in DMF⁸¹; **b, c**: Gegenion BF₄⁻, in CH₃CN; **g**: Gegenion BF₄⁻, in DMF⁸²; ^c Maximale Verschiebung des Absorptionsmaximums bei DNA-Zugabe bis zur Sättigung, in nm; ^d Bindungskonstante mit DNA in M⁻¹ × 10⁴; ^e Strangbruchreaktion unter anaeroben Bedingungen, Photoinduzierter DNA-Strangbruch bei Bestrahlung: + = hohe Strangbruchrate; +/-: mäßige Strangbruchrate; -: keine oder wenig Strangbrüche; ^f siehe auch Literatur 57a; ^g n.b. = nicht bestimmt.

5.2.2.1 Steady-state-Fluoreszenzspektroskopie

Wesentliche Hinweise auf den Strangbruchmechanismus können durch die Fluoreszenzspektroskopie gewonnen werden, die nicht nur dem Nachweis einer bindenden Wechselwirkung zwischen Wirt- und Gastmolekül dient, sondern auch der Beobachtung der Primärreaktion zwischen dem angeregten Singulettzustand des Gastmoleküls und der DNA. In den spektrofluorimetrischen Titrations von DNA zu den Chinoliziniumderivaten wurde in den meisten Fällen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender DNA-Konzentration beobachtet. Die Löschung der Fluoreszenz bei organischen Farbstoffen in Gegenwart von DNA ist in der Regel auf einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) zwischen dem angeregten Chromophor und den Nucleinbasen zurückzuführen (Schema 5.3).¹⁹ Abschätzungen der Reduktionspotentiale der Acridiziniumderivate (Tabelle 5.1) im ersten angeregten Singulettzustand weisen darauf hin, dass der PET exergonisch ist, wenn man die bislang zugänglichen Oxidationspotentiale der Nucleinbasen in Acetonitril zugrunde legt (G: 1.5 V; A: 1.9 V; C: 2.1 V; T: 2.1 V).⁸⁴ Dieses Lösungsmittel dürfte das hydrophobe Innere der DNA besser repräsentieren als Wasser, in dem ebenfalls Oxidationspotentiale der Nucleinbasen bestimmt wurden.⁸³ Weiterhin wird die Emission der Chinoliziniumsalze durch die Zugabe von (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) signifikant stärker gelöscht als durch die Zugabe von (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]). Da Guanin das niedrigste Oxidationspotential der Nucleinbasen besitzt und daher in der Regel an der Elektronentransferreaktion beteiligt ist,⁷⁷ ist diese Beobachtung ein weiteres Indiz für einen Elektronentransfer zwischen angeregtem Chinolizinium und den Nucleinbasen.



Schema 5.3: Photinduzierter Elektronentransfer zwischen angeregtem Chinoliziniumsalz **9a** und Guanin

Eine Ausnahme von den beschriebenen Beobachtungen bildet das 6-Aminoacridizinium **9b**, dessen Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von DNA signifikant zunimmt. Hierbei ist vor allem bemerkenswert, dass die Zugabe von (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) eine sehr viel höhere Steigerung der Fluoreszenz bewirkt als die Zugabe von (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) und KT-DNA - ein Effekt, der mit bloßem Auge beobachtet werden kann (Abbildung 5.3).

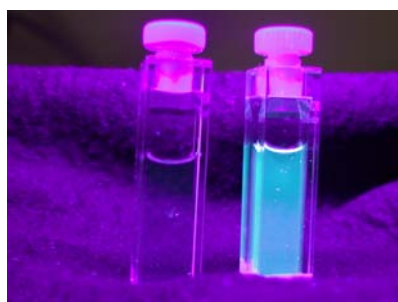


Abbildung 5.3: Fluoreszenzintensität des 6-Aminoacridiziniums **9b** in Anwesenheit von (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (links) und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (rechts)

Die Steigerung der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von DNA könnte durch eine signifikante Einschränkung der Flexibilität des Chromophors durch die Bindung an die DNA begründet werden.¹⁹ Hierbei ist vermutlich die Rotation der C-N-Bindung zur Aminofunktion durch die Assoziation mit DNA eingeschränkt und somit die strahlungslose Deaktivierung nicht mehr möglich (siehe Kap. 5.1). Das Ausmaß der Fluoreszenzsteigerung könnte mit einem Elektronentransfer zwischen angeregtem 6-Aminoacridizinium und den Nucleinbasen erklärt werden. Dieser ist dann exergonisch, wenn das Reduktionspotential des angeregten Chromophors größer als das Oxidationspotential der Nucleinbasen ist.⁸⁴ Das Reduktionspotential des angeregten Acridiziniums wurde auf ca. 2.0 V bestimmt, und der reale Wert dürfte mindestens 200 mV anodisch verschoben sein, da die irreversible Reduktion einer kinetischen Verschiebung unterliegt. Damit ist ein Elektronentransfer nur zwischen Guanin, das ein Oxidationspotential von 1.5 V hat, energetisch vorteilhaft. Dagegen ist der Elektronentransfer zwischen dem Acridiziniumsingulett und Adenin energetisch nicht

begünstigt, da das Oxidationspotential des Adenins bei 1.9 V liegt.⁸³ Deshalb finden in DNA und in (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) vermutlich zwei gegenläufige Prozesse statt: die Fluoreszenz wird einerseits durch die Verhinderung der strahlungslosen Deaktivierung gesteigert, während sie andererseits durch einen Elektronentransfer zwischen dem angeregten Acridiziniumsingulett und Guanin gelöscht wird. Da der Elektronentransfer in (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) endergonisch ist, ist in diesen Basensequenzen keine derartige Fluoreszenzlöschung möglich, und eine sehr viel höhere Fluoreszenz wird beobachtet.

5.2.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Die Untersuchungen der Fluoreszenzlebenszeiten des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) haben gezeigt, dass in Anwesenheit von DNA ein zweiter, kurzlebiger Transient auftritt, dessen Beitrag mit steigender DNA-Konzentration anwächst. Vergleicht man die statische Löschung des Singulett (I_0/I) mit der dynamischen Löschung ($\langle\tau_0\rangle/\langle\tau\rangle$), so ist die statische Löschung deutlich effektiver (Abbildung 5.4).

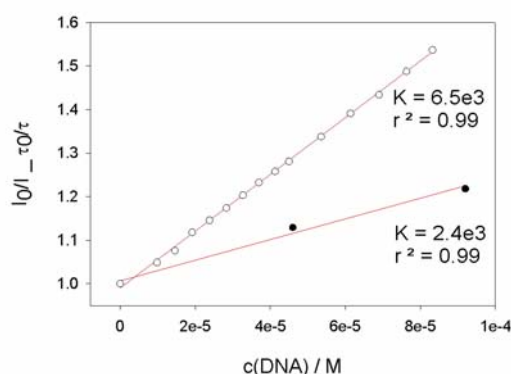


Abbildung 5.4: Relative Emissionsintensitäten und relative durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) bei Zugabe von KT-DNA

Aus diesem Grund wird vermutet, dass neben einem untergeordneten Löschprozess, der das Auftreten der kurzen Lebenszeit verursacht, ein weiterer, sehr schneller Löschprozess stattfindet, der aufgrund der begrenzten zeitlichen Auflösung des Messgerätes nicht beobachtet werden konnte. Da Elektronentransferreaktionen zwischen intercalierten organischen Farbstoffen und den DNA-Basenpaaren sehr schnelle Reaktionen sind, die sich in der Femtosekunden-Zeitskala bewegen,⁸⁵ dürfte es sich bei dem schnelleren Löschprozess um einen Elektronentransfer zwischen dem angeregten 9-Aminoacridizinium (**9g**) und den Nucleinbasen handeln.

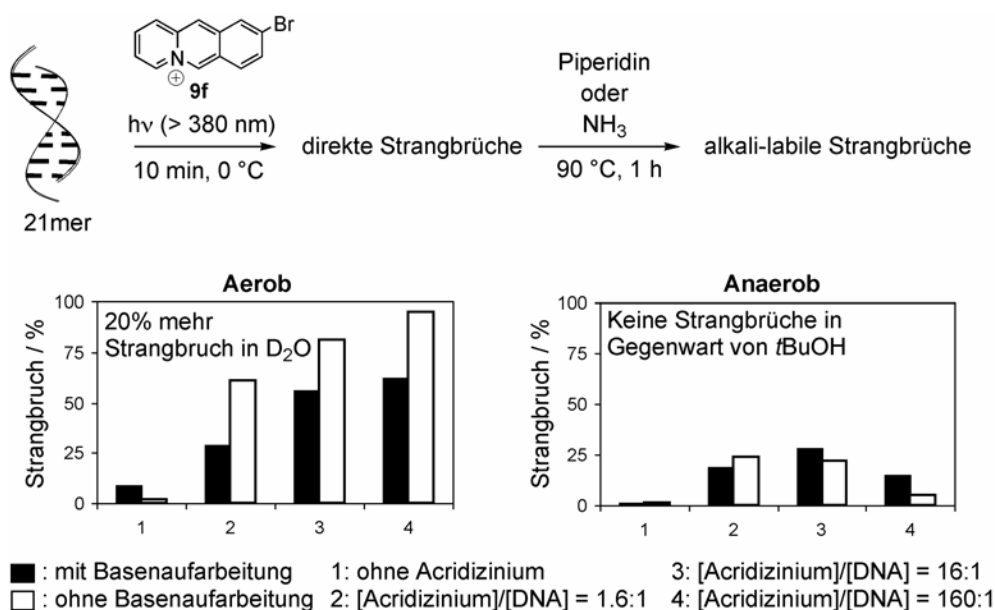
5.2.2.3 Laserblitz-Transientenspektroskopie

In den Laserblitzexperimenten wurde für alle untersuchten Acridiziniumderivate ein angeregter Triplettzustand detektiert, dessen Lebenszeit effizient durch Sauerstoff gelöscht wurde. Das 9-bromsubstituierte Acridizinium **9f** bildet hierbei, vermutlich aufgrund eines internen Schweratomeffekts des Bromsubstituenten, signifikant mehr Triplett als die übrigen Acridiziniumsalze. Die Abnahme der Anzahl der Transienten des 9-Aminoacridiziniums (**9g**) mit steigender Anregungswellenlänge ist darauf zurückzuführen, dass bei kurzen Anregungswellenlängen auch höhere angeregte Zustände zum Gesamtspektrum beitragen. Bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm wird z.B. auch der S_0 - S_3 -Übergang induziert. Die detailliert untersuchten Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** zeigen eine konzentrationsabhängige Selbstlöschung des jeweiligen Triplets, die annähernd diffusionskontrolliert ist. Aus diesem Grund können die Triplettlebenszeiten unabhängiger Experimente wegen der unterschiedlichen Konzentrationen der Probelösungen untereinander nicht direkt verglichen werden. Die Triplettenergien der genannten Verbindungen liegen zwischen 159 und 219 kJ/mol. Damit ist ein Energietransfer zu den Nucleinbasen der DNA nicht möglich, da deren Singulett- und Triplettenergien deutlich höher liegen. Zu molekularem Sauerstoff ist dagegen ein Energietransfer möglich, da dessen Triplettenergie nur 94 kJ/mol beträgt.²²

Mit steigender DNA-Konzentration in der Probe nimmt zwar die Intensität der Triplettabsorption ab, jedoch wurde weder die Triplettlebenszeit noch die Bandenstruktur der jeweiligen Triplettenspektren der Acridiziniumderivate **9a**, **9f** und **9g** durch die DNA beeinflusst. Weiterhin konnte in Anwesenheit von DNA kein neuer Transient detektiert werden, und die Löschung der Triplettlebenszeiten durch Sauerstoff verlief mit der gleichen Rate wie in Proben reiner Acridiziniumlösungen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch in den Experimenten mit DNA ausschließlich das unkomplexierte Acridiziniumtriplett beobachtet wird. Diese Beobachtung kann zwei Ursachen haben: Entweder findet eine sehr schnelle Reaktion des angeregten Triplets mit der DNA statt, deren Rate unterhalb der Detektionsgrenze der Apparatur liegt, oder der angeregte Triplettzustand wird gar nicht ausgebildet aufgrund von effizienten Konkurrenzreaktionen im angeregten Singulettzustand. Da mit den emissionsspektroskopischen Untersuchungen gezeigt wurde, dass der angeregte Singulettzustand effizient durch einen schnellen PET-Prozess mit der DNA gelöscht wird, darf geschlossen werden, dass dieser PET das Intersystem-Crossing zum Triplettzustand unterbindet. Deshalb kann eine Reaktion des jeweiligen Triplets mit der DNA weitgehend ausgeschlossen werden, da es in der DNA gar nicht gebildet wird. Die Abnahme

der Triplettabsorption ist dann auf die Abnahme der ungebundenen Form des Acridiziniums in der Probelösung zurückzuführen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das an die DNA gebundene Acridiziniumtriplett nicht mit der DNA reagiert und somit nicht direkt für die photoschädigende Wirkung verantwortlich ist. Allerdings kann das Triplett der ungebundenen Form ein entscheidendes Intermediat bei der Induktion von Strangbrüchen sein, weil die Reaktion eines Acridiziniumtripleetts mit Sauerstoff in der Regel zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt, der nach dem in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Typ-II-Mechanismus die DNA durch Oxidation von Guanin zu 8-oxodG schädigt. Diese Basenmodifikation wurde durch die Bestrahlung von DNA in Anwesenheit von 9-Bromacridizinium (**9f**) unter aeroben Bedingungen im Arbeitskreis von Prof. Bernd Giese, Universität Basel, mit dem im Gesamtkontext der vorliegenden Dissertation eine Kooperation bestand, tatsächlich beobachtet (Schema 5.4).



Schema 5.4: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Arbeitskreis Giese (Quelle: A.-K. Köhler, B. Giese, Universität Basel, persönliche Mitteilung)

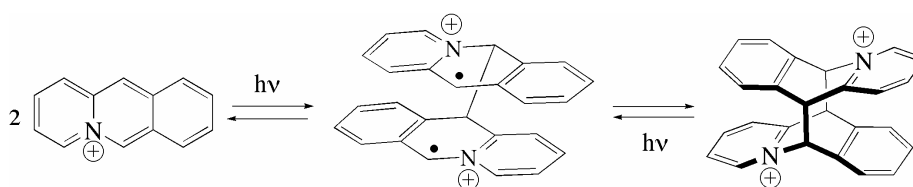
Besonders deutlich wird der Einfluss von Sauerstoff beim Vergleich der direkt induzierten DNA-Strangbrüche (so genannte "frank strand breaks") mit den alkaliinduzierten Strangbruchstellen. Letztere resultieren aus einer Basenoxidation zu 8-oxodG und Folgeoxidationsprodukten, die bei Basenbehandlung zu einem Strangbruch führen. Sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen werden direkte Strangbrüche detektiert. Während jedoch bei Bestrahlungen unter anaeroben Bedingungen keine weiteren

Strangbrüche bei Basenbehandlung des Photolysates auftreten, führt diese Behandlung nach Bestrahlung unter aeroben Bedingungen zur Detektion zusätzlicher Strangbrüche. Darüber hinaus ist das Ausmaß der basenlabilen Strangbrüche unter aeroben Bedingungen höher, wenn die Photoreaktion in D₂O stattfindet, in dem Singulett-Sauerstoff eine wesentlich längere Lebenszeit hat als in H₂O. Andererseits nimmt der Anteil an direkten Strangbrüchen nur unter anaeroben Bedingungen ab, wenn *t*-Butanol als Radikalfänger zugesetzt wird. Weiterhin ist bemerkenswert, dass unter aeroben Bedingungen wesentlich mehr DNA-Schädigung auftritt als unter anaeroben Bedingungen und dass die Schädigungsrate unter aeroben Bedingungen mit zunehmendem Acridizinium-DNA-Verhältnis ansteigt, während sie unter anaeroben Bedingungen im Rahmen der Fehlergrenze weitestgehend gleich bleibt. Zusammen mit den Laserblitzexperimenten, die die photosensibilisierte Bildung von ¹O₂ anzeigen, geben diese Experimente einen Hinweis darauf, dass unter aeroben Bedingungen die DNA-Schädigung im Wesentlichen über ¹O₂ verläuft. Die Ergebnisse der Strangbruchexperimente mit dem Plasmid-Assay und anschließender Analyse mittels Gelelektrophorese scheinen zunächst gegen diesen Mechanismus zu sprechen, da üblicherweise mit dieser Methode fast ausschließlich Strangbrüche und keine Basenmodifikationen detektiert werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass ¹O₂ in Plasmiden ebenfalls Strangbrüche induzieren.⁸⁶

Studien zum Strangbruch durch reaktive Intermediate unter anaeroben Bedingungen

Die bisherigen Ergebnisse und deren Interpretation weisen darauf hin, dass Singulett-Sauerstoff das reaktive Intermediat ist, das unter aeroben Bedingungen die DNA schädigt. Unter anaeroben Bedingungen hingegen kann ¹O₂ nicht gebildet werden, so dass ein anderes reaktives Intermediat den DNA-Strangbruch induzieren muss. Im Folgenden sollen die möglichen Reaktionsmechanismen erörtert werden, nach denen Radikalzwischenstufen gebildet werden, die mit der DNA reagieren könnten.

Da ein DNA-Strangbruch üblicherweise mit einer Wasserstoffabstraktion an der Desoxyribose durch ein intermediäres Radikal eingeleitet wird, war es nahe liegend, eine derartige Zwischenstufe bei der Bestrahlung von Acridiziniumderivaten in Anwesenheit von DNA aufzuspüren und zu identifizieren. Eine mögliche Quelle schien zunächst ein Diradikal zu sein, das bei der Photodimerisierung eines Acridiziniums oder bei der Cycloreversion entsteht (Schema 5.5).⁸⁷



Schema 5.5: Möglichkeiten der Entstehung eines Diradikals des Acridiziniums **9a** über Photocyclisierung oder Photodimerisierung

Da bei der photoinduzierten Cycloreversion der Dimere eine wesentlich höhere Konzentration der Diradikale vorliegen sollte als bei der Photodimerisierung, die ein bimolekularen Prozess ist, sollte bei der Bestrahlung des Dimers mehr DNA gespalten werden als in Gegenwart des Monomers. Da jedoch die Photodimere der Acridiziniumsalze **9e-g** bei der Induktion von Strangbrüchen nicht effektiver sind als die jeweiligen Monomere, kann eine tragende Rolle der Dimere am Mechanismus der lichtinduzierten DNA-Schädigung ausgeschlossen werden.

Weiterhin könnte die Vermutung naheliegen, dass das angeregte Acridizinium oder das Folgeprodukt des ET mit den DNA-Basen wesentliche Intermediate auf der Reaktionskoordinate des DNA-Strangbruchs, d.h. bei der Wasserstoffabstraktion an der Desoxyribose, darstellen. Bei näherer Betrachtung scheiden diese Möglichkeiten jedoch aus: Nach Bestrahlung liegt das Acridizinium im $\pi\pi^*$ -angeregten Singulett- oder Triplett-Zustand vor, die beide nur eine geringe Tendenz zur Wasserstoffabstraktion aufweisen.⁸⁸ Das Acridizinylnradikal ist ein π -Radikal, das ebenfalls nur begrenzt zur Wasserstoffabstraktion fähig ist. Das bedeutet, dass eine Basenmodifikation, die bei weiterer Umsetzung des Guaninradikalkations mit Wasser stattfindet, die einzige DNA-Schädigung ist, die als Folge des PET möglich ist. (Schema 2.3 im Kenntnisstand). Diese DNA-Schädigung ist allerdings nur als Strangbruch zu detektieren, wenn das Photolysat mit Base behandelt wird. Unter anaeroben Bedingungen wurde jedoch keine Erhöhung der Strangbrüche nach Basenaufarbeitung beobachtet, so dass dieser Mechanismus zur DNA-Schädigung ausgeschlossen werden darf. Sehr wahrscheinlich kommt es daher zu einem raschen Elektronenrücktransfer (BET), der die beiden Reaktionspartner in die Ausgangsverbindungen überführt, so dass letztlich die Elektronentransferreaktion zwischen dem Acridizinium und den Basenpaaren keine Relevanz für den DNA-Strangbruch hat. Das heißt weiterhin auch, dass intercalierte Acridiziniumderivate die DNA unter Bestrahlungsbedingungen nicht wesentlich schädigen.

Es gibt zwar Berichte, nach denen Halogenatome, die durch ET-Reaktion der entsprechenden Halogenidionen mit angeregten Chromophoren entstehen, einen DNA-Strangbruch induzieren können. Tatsächlich wurde durch Lösversuche mit Bromidionen, die auch in den

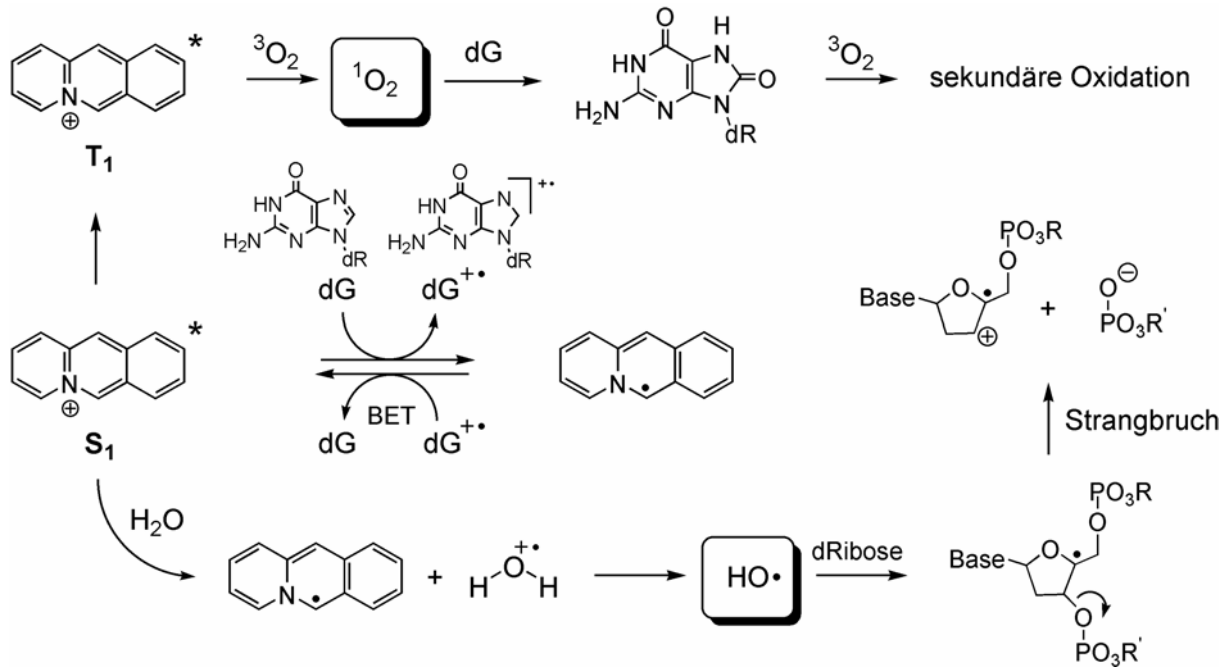
Strangbruchexperimenten als Gegenion anwesend sind, gezeigt, dass der angeregte Singulettzustand von Acridiziniumsalzen von Bromid gelöscht wird. Da Chloridionen, die ebenfalls die oben angeführte PET-Reaktion eingehen können, den angeregten Zustand nicht löschen, darf man davon ausgehen, dass die Bromidionen nur einen externen Schweratomeffekt ausüben und damit ein Intersystem-Crossing bewirken. Darüber hinaus wurde in den bisher publizierten Arbeiten zur DNA-Schädigung durch Halogenradikale explizit darauf hingewiesen, dass eine derartige Reaktion mit Bromid nicht stattfindet. Daher dürfte auch dieser Reaktionsweg mit großer Wahrscheinlichkeit nicht für den DNA-Strangbruch verantwortlich sein.

Da die oben genannten Reaktionswege ausgeschlossen werden konnten, wurde nach sauerstoffhaltigen reaktiven Intermediaten gesucht, die dafür bekannt sind, dass sie DNA schädigen. Dabei wurde die Aufmerksamkeit auf das bekannte Hydroxylradikal fokussiert, das mit der DNA besonders effizient durch Wasserstoffabstraktion reagiert und damit zu einem Strangbruch führt. Tatsächlich wurde die Bildung dieser reaktiven Zwischenstufe bei der Bestrahlung des Acridiziniumderivats **9a** in Wasser durch Abfangreaktionen mit Terephthalsäure nachgewiesen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Giese et al., die eindeutig zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen ein Radikal für die DNA-Schädigung verantwortlich ist, da in Gegenwart des Radikalfängers *tert*-Butanol kein Strangbruch stattfindet (Schema 5.4). Damit wurde demonstriert, dass der photoinduzierte DNA-Strangbruch unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Acridiziniumderivaten über Wasserstoffabstraktion durch Hydroxylradikale stattfindet. Die Hydroxylradikale werden vermutlich durch einen PET zwischen angeregtem Acridizinium und Wasser gebildet. Das entstandene Radikalkation von Wasser wird deprotoniert und generiert so das Hydroxylradikal. Die Beobachtung, dass die Strangbruchrate bei zunehmendem Acridizinium-DNA-Verhältnis nicht linear steigt (Schema 5.4), ist vermutlich auf die Reaktion der Acridiziniumsalze selbst mit Hydroxylradikalen zurückzuführen.

Dieser Mechanismus erklärt auch die unterschiedliche Reaktivität der Chinoliziniumderivate gegenüber DNA. Der einleitende Schritt der Hydroxylradikalbildung ist ein photoinduzierte Elektronentransfer zwischen dem angeregten Chinolizinium und Wasser. Nach der Rehm-Weller-Gleichung⁸⁹ ist damit die Höhe des Reduktionspotentials des angeregten Chinoliziniumsalze ausschlaggebend, ob die Reaktion exergonisch verläuft. Mit steigendem Reduktionspotential sollte demnach die DNA-Schädigung zunehmen. Tatsächlich wird dieser

Trend bei den Chinoliziniumsalzen beobachtet, denn mit steigendem Reduktionspotential nimmt die Strangbruchrate qualitativ zu (Tabelle 5.1).

Dieser Mechanismus für die anaerobe DNA-Schädigung ist besonders bemerkenswert, da dies eine bislang noch nicht systematisch untersuchte Methode zur Hydroxylradikalgenerierung darstellt. Bislang wurden diese Radikale im Wesentlichen durch die Fenton-Reaktion oder durch Radiolyse von Wasser hergestellt.⁹⁰ Nur wenige Beispiele sind bekannt, bei denen Hydroxylradikale durch Bestrahlung im relativ milden UV-VIS-Bereich generiert werden, wobei die meisten Vorläufermoleküle ein Hydroxyperoxidfunktion enthalten,⁹¹ die aufgrund ihrer Labilität sicherlich einen wesentlichen Nachteil bei dieser Methode ausmachen. Hydroxypyridone und Derivate davon sind ebenfalls als Hydroxylradikalquellen eingesetzt worden,⁹² jedoch weisen sie keine starke Bindung zu DNA auf oder absorbieren im gleichen Bereich wie die DNA-Basen, so dass die DNA bereits durch die Bestrahlung selbst geschädigt wird. Kürzlich wurde über die photoinduzierte Bildung von Hydroxylradikalen mittels eines PET-Prozesses berichtet, jedoch wurde diese Reaktion noch nicht detailliert untersucht.⁹³ Die photoinduzierte Hydroxylradikalgenerierung durch Farbstoffe und anschließenden Nutzung dieser Intermediate zur DNA-Schädigung ist nur ansatzweise in der Literatur beschrieben und bislang noch nicht systematisch untersucht worden.^{3a} Diese Methode dürfte jedoch neue Perspektiven in diesem Forschungsgebiet aufweisen, da sie vergleichsweise mild ist und bei entsprechendem Sensibilisatordesign effizient und selektiv durchführbar sein sollte. Die Farbstoffe sollten unter Berücksichtigung gängiger Strukturprinzipien so variiert werden, dass sie mit hoher Bindungspräferenz an bestimmte Basensequenzen binden und weiterhin gegenüber einer Reaktion der Hydroxylradikale weitestgehend inert sein. Sollten diese Strukturvariationen realisiert werden, so könnte eine neue, bemerkenswerte Klasse von DNA-schädigenden Farbstoffen auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse etabliert werden.



Schema 5.6: Mögliche Mechanismen der lichtinduzierten DNA-Schädigung durch Acridiniumderivate unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Zusammenfassung

Wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Strangbruchmechanismen in geringem Ausmaß zum Tragen kommen, so kann augenblicklich jedoch zusammengefasst werden, dass die photoinduzierte DNA-Schädigung im Wesentlichen auf zwei Mechanismen beruht (Schema 5.6): a) Unter aeroben Bedingungen wird durch Photosensibilisierung 1O_2 gebildet, der die DNA-Basen oxidativ schädigt. b) Unter anaeroben Bedingungen werden Hydroxylradikale gebildet, die einen DNA-Strangbruch verursachen.

6 Experimententeil

6.1 Allgemeine Vorbemerkungen

6.1.1 Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker AC200 (^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz), einem Bruker Avance 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) und einem Bruker DMX 600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) aufgenommen. Als interner Standard wurde soweit nicht anders angegeben TMS benutzt. Die spektrophotometrischen Untersuchungen wurden an einem Hitachi U-3200, einem Perkin Elmer Lambda 40 und einem Jasco V-570 UV/VIS/NIR-Spektrophotometer durchgeführt. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren diente ein Perkin Elmer LS 50 Lumineszenz Spektrometer, für die CD-Spektren ein Jasco J715 und für die LD-Spektren ein Jasco J500A Spektropolarimeter mit rotierendem Probenhalter. Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem Edinburgh Instruments 199S bestimmt, ESI-Massenspektren an einem Finnigan TSQ 7000 Massenspektrometer (35eV; Stoßgas Argon; Kapillartemperatur 200 °C; Hilfsgas Stickstoff) aufgenommen.

Bei den Strangbruchexperimenten wurden DNA-Horizontal-Elektrophoresekammern der Firmen Pharmacia (GNA 100) und Shelton Scientific benutzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Kamera (Herolab E.A.S.Y. 429 K) und einem UV-Schirm mit der Anregungswellenlänge von 366 nm. Als Software zur quantitativen Auswertung wurde Herolab E.A.S.Y. Plus enhanced Analysis System (Herolab GmbH Laborgeräte) verwendet.

Bei der Laserblitzspektroskopie wurden ein Lumonics EX-510 Excimer Laser (308 nm) und ein Spectra physics GCR-12 YAG Laser Messungen bei konstanten Anregungswellenlängen benutzt. Für Experimente mit $\lambda_{\text{ex}} > 420$ nm wurde ein Coherent Infinity OPO-Laser mit variabler Anregungswellenlänge verwendet. Die Probelösungen für die Laserblitzspektroskopie befanden sich in Suprasil-Küvetten der Schichtdicke 7×7 mm. Als Lichtquelle diente eine Xe-Lampe (150 W Oriel 66057), die Signale wurden auf einem Tektronix TDS520 Oszilloskop detektiert.

Zur Bestimmung von pH-Werten diente ein pH-Meter der Wissenschaftlich Technischen Werke (WTW, Weilheim) kombiniert mit einer pH-Elektrode LIQ-GLASS der Firma Hamilton. Schmelzpunkte wurden an einem Büchi B-545 bestimmt und sind unkorrigiert. Das

Lyophilisieren der NMR-Proben wurde an einem Christ Alpha 1-4 Vakuumkonzentrator durchgeführt. Zum Durchmischen von Probelösungen wurde ein Reaktionsgefäßschüttler der Firma Hartenstein (GLW L46) verwendet. Zentrifugiert wurde mit einer Hettich Mikroliter Zentrifuge. In den spektrometrischen Titrationsen wurden die Reagenzien mit kontinuierlich einstellbaren Mikroliterpipetten der Firmen Gilson (1000 μ l) und Socorex (20 und 200 μ l) zugegeben. In den Absorptionsmessungen wurden spektral ausgemessene Hellma Quarzglasküvetten 110-QS mit einer Schichtdicke von 10 mm und in den Fluoreszenzmessungen Hellma Quarzglasküvetten 222-QS und 117.100F-QS mit einer Schichtdicke von 10×10 mm verwendet.

6.1.2 Bestrahlungsapparaturen

Alle Photoreaktionen einschließlich der Strangbruchexperimente wurden in einem Rayonet-Photoreaktor RPR-100 der Firma Southern New England Ultraviolet Company, Branford, CT 06405, USA mit 16 UV-Lampen der Wellenlänge 350 nm (RPR 3500), Leistung 24 W durchgeführt. Zur Kühlung der Probelösungen wurde ein Kryostat RKT-20-D der Firma Wobser GmbH, Lauda Königshofen, verwendet.

6.1.3 Reagenzien, Lösungsmittel und Nucleotide

Kommerziell erhältliche Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Reinigung und Trocknung der nicht käuflich erworbenen Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden. Für spektroskopische Untersuchungen und Experimente mit DNA wurden ausschließlich Reagenzien von höchstem Reinheitsgrad eingesetzt, die vor allem frei von DNA-schädigenden Verunreinigungen waren.

Die folgenden Reagenzien sind kommerziell erhältlich und wurden von den angegebenen Firmen bezogen: DMF für die Spektroskopie wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Pyridin von Merck (Darmstadt) erworben. Alle anderen spektroskopisch reinen Lösungsmittel für die UV- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden von Fluka Chemie AG (Buchs, CH) erstanden.

Für die Herstellung von Pufferlösungen benötigtes KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, EDTA und NaN_3 sowie der in den NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit dem synthetischen Dodecanucleotid verwendete Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.0) wurden von Fluka Chemie AG

(Buchs, CH) gekauft. Borsäure wurde von Merck (Darmstadt) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisbase) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) angeschafft. Die Herstellung der Pufferlösungen ist bei den jeweiligen allgemeinen Arbeitsvorschriften aufgeführt.

Bei der Gelelektrophorese verwendete Agarose wurde von Serva Feinbiochemika GmbH (Heidelberg) und der Gel-Ladepuffer (Bromphenolblau „gel loading solution“ von Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) erworben.

Die natürlichen und synthetischen Nucleotide sind von folgenden Firmen bezogen worden: KT-DNA von Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) und superhelikale pBR322 DNA (MW 2.9×10^6 D, 4365 bp) von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) und das in den NMR-spektroskopischen Untersuchungen benutzte synthetische Dodecanucleotid (5'-CGCGAATTCGCG-3') in HPLC-Reinheit von Microsynth (Balgach, CH). Wässrige Lösungen für die analytischen Untersuchungen wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt.

6.1.3 Arbeitsmethoden

Reaktionslösungen wurden mit einem Magnetrührer gerührt. Die angegebenen Reaktionstemperaturen beziehen sich auf das das Reaktionsgefäß umgebende Medium. Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Alle in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen wurden aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit unter Lichtausschluss gelagert. Reaktionslösungen in Eppendorf-Gefäßen wurden nach Zugabe von Reagenzien gründlich geschüttelt (Vortex) und anschließend zentrifugiert. Weitere detaillierte Angaben bezüglich der Arbeitsmethoden finden sich bei den im Folgenden aufgeführten *Allgemeinen Arbeitsvorschriften*.

6.2 Synthese der Acridiziniumderivate

Die folgenden Verbindungen wurden nach literaturbekannten Methoden synthetisiert: Acridiziniumbromid (**9a**),⁹⁴ 6-Aminoacridiziniumbromid (**9b**),⁹⁵ 8-Aminoacridiziniumbromid (**9d**), 9-Chloracridiziniumbromid (**9e**), 9-Bromacridiziniumbromid (**9f**),⁹⁶ 9-Aminoacridiziniumbromid (**9g**),⁴⁵ und 11-Aminoacridiziniumbromid (**9i**).⁹⁷

6.2.1 Indolochinolizinium (VS1)

2-(1-3-Dioxolan-2-yl)-1-[[1-(phenylsulfonyl)-1H-indol-3yl]methyl]pyridiniumbromid (11)

Eine Lösung von 1.40 g (4.00 mmol) 3-Brommethylindol⁹⁸ und 0.69 g (4.60 mmol) 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)pyridin in 6 ml DMSO wurde bei Raumtemperatur für 7 Tage unter Argonatmosphäre gerührt. Unter starkem Rühren wurde das Pyridinium-Derivat **11** durch Zugabe von Ethylacetat gefällt. Der Niederschlag wurde abgetrennt und mit Ethylacetat gewaschen. Kristallisation aus Methanol ergab 1.20 g (60 %) Pyridiniumbromid **11** als weiße kubische Kristalle. Das Bromid wurde in Methanol gelöst und mit einer gesättigten Lösung von NaBF₄ versetzt. Das entsprechende Tetrafluorborat fiel annähernd quantitativ aus. Kristallisation aus Ethanol ergab analytisch reines Tetrafluorborat als weiße Nadeln. -**11-Br**: Schmp. 116-117 °C; ¹H-NMR (200 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 4.20 (s, 4 H), 6.04 (s, 2 H), 6.43 (s, 1 H), 7.29-8.96 (m, 14 H). - ¹³C-NMR (50 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 54.1, 67.6, 99.2, 115.1, 115.3, 120.5, 125.6, 127.2, 127.6, 128.4, 129.8, 130.0, 130.3, 131.0, 136.0, 136.8, 139.1, 146.9, 148.5, 154.. - C₂₃H₂₁BrN₂O₄S·H₂O (519.4) ber. C 53.19, H 4.46, N 5.39, S 6.17; gef. C 53.63, H 4.26, N 5.50, S 6.27. - **11-BF₄**: Schmp. 168-170 °C (Zers.); El. Anal. ber. (%) für C₂₃H₂₁B₁F₄N₂O₄S₁ (508.3): C 54.35, H 4.16, N 5.51, S 6.31; gef. C 54.13, H 4.32, N 5.55 S 6.40.

Indolo[2,3-b]chinoliziniumbromid

194 mg (0.38 mmol) des Pyridiniumtetrafluoroborates **11** wurden bei 80 °C in kleinen Portionen zu 2.5 g Polyphosphorsäure (84%) gegeben. Die viskose Lösung wurde bei 100 °C für 3 h gerührt. Nach vorsichtiger Zugabe von 20 ml Wasser wurde die Lösung für 90 min bei 90 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (ca. 20 °C) wurden langsam 5 ml einer gesättigten wässrigen NaBF₄-Lösung zugegeben. Der ausgefallenen gelb-orange Niederschlag wurde abgetrennt und mit 2 × 25 ml Wasser und 20 ml Diethylether gewaschen. Kristallisation aus Methanol ergab 46 mg (39 %) Indolochinolizinium-tetrafluorborat **10** als gelben Feststoff. Das entsprechende Bromid wurde durch Zugabe einer gesättigten Lösung von Tetrabutylammoniumbromid in Acetonitril zu einer Lösung des Indolo[2,3-b]chinolizinium-tetrafluoroborates **10** in Acetonitril erhalten. Kristallisation aus Methanol ergab Indolochinoliziniumbromid **10** als gelben mikrokristallinen Feststoff, Schmp. 290-295 °C (Zers.). - ¹H-NMR (200 MHz, [D₄]-MeOD): δ = 7.26 (ddd, J = 8 Hz, J = 7 Hz,

$J = 1$ Hz, 1 H), 7.42 (dd, $J = 8$ Hz, $J = 1$ Hz, 1 H), 7.48-7.58 (m, 2 H), 7.80 (ddd, $J = 9$ Hz, $J = 7$ Hz, $J = 1$ Hz, 1 H), 8.03 (s, 1 H), 8.11-8.18 (m, 2 H), 8.89 (d, $J = 7$ Hz, 1 H), 9.88 (s, 1 H). - ^{13}C -NMR (50 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 104.7, 113.3, 120.3, 120.5, 123.6, 123.6, 123.7, 127.1, 131.5, 132.2, 132.4, 135.6, 141.7, 144.6, 145.0$. - El. Anal. ber. (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (353.2): C 53.75, H 4.51, N 8.33, gef. C 54.38, H 4.32, N 8.33.

6.2.2 7-Aminoacridiziniumbromid (VS2)

N-[2-Methylphenyl]phthalimid (**15**)

11.0 g (103 mmol) *ortho*-Toluidin (**14**) und 17.6 g (118 mmol) Phthalsäureanhydrid wurden in 200 ml Essigsäure suspendiert und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen fielen aus der Reaktionslösung 21.2 g (87 %) Phthalimid **15** als weiße Nadeln aus, Schmp. 181-182 °C. - ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.21$ (s, 3 H, CH₃), 7.22-7.39 (m, 4 H, Ar-H), 7.78-7.82 (m, 2 H, Ar-H), 7.94-7.99 (m, 2 H, Ar-H). - ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.5$ (CH₃), 127.2, 130.3, 132.2, 132.87, 134.0 (C_q), 134.6, 135.5 (C_q), 137.7, 140.0 (C_q), 170.8 (C_q). - El. Anal. ber. (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (237.3): C 75.94, H 4.67, N 5.90, gef. C 76.27, H 4.78, N 6.09.

N-[2-(Brommethyl)phenyl]phthalimid (**16**)

19.3 g (81.3 mmol) *N*-[2-Methylphenyl]phthalimid (**15**), 14.4 g (80.9 mmol) NBS und eine Spatelspitze AIBN wurden in 150 ml CCl_4 suspendiert und die Reaktionsmischung für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die Suspension wurde heiß filtriert. ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung des abgetrennten weißen Rückstandes zeigte, dass Succinimid und das Produkt **16** im Verhältnis 1:1 vorlagen. Durch Waschen des Niederschlags mit kochendem Wasser wurde das Succinimid vollständig entfernt, und es wurden 16.1 g (63 %) *N*-[2-(Brommethyl)phenyl]phthalimid (**16**) als weißer Feststoff erhalten, Schmp. 180-181 °C. - ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.43$ (s, 2 H, CH₂), 7.23-7.58 (m, 4 H, Ar-H), 7.78-7.87 (m, 2 H, Ar-H), 7.94-8.02 (m, 2H, Ar-H). - ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 32.9$ (CH₂), 127.4, 133.2, 133.2, 133.3, 134.3 (C_q), 134.5, 135.3 (C_q), 137.9, 139.3 (C_q), 170.6 (C_q).

– El. Anal. ber. (%) für $C_{15}H_{10}BrNO_2$ (316.2): C 56.99, H 3.19, N 4.43, gef. C 56.96, H 3.16, N 4.51.

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-N-(2'-phthalimidylbenzyl)pyridiniumbromid (17)

Eine Lösung von 5.00 g (15.8 mmol) *N*-(2-Brommethylphenyl)phthalimid (**16**) und 3.00 g (19.8 mmol) 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)pyridin in 15 ml DMSO wurde bei Raumtemperatur für 7 Tage unter Argonatmosphäre gerührt. Unter starkem Rühren wurde das Pyridiniumderivat **17** durch Zugabe von Ethylacetat gefällt. Der Niederschlag wurde abgetrennt und mit Ethylacetat gewaschen. Kristallisation aus Methanol ergab 4.19 g (60 %) Pyridiniumbromid **17** als weißen, mikrokristallinen Feststoff, Schmp. 165-166 °C (Zers.). - 1H -NMR (200 MHz, $[D_4]$ -MeOD): δ = 3.79-3.97 (m, 4 H, CH_2), 7.45-7.55 (m, 2 H, Ar-H), 7.64-7.71 (m, 2 H, Ar-H), 7.88-7.97 (m, 4 H, Ar-H), 8.07-8.15 (m, 1 H, Ar-H), 8.29 (d, J = 10 Hz, 1 H, Ar-H), 8.66 (ddd, J = 16 Hz, J = 8 Hz, J = 1 Hz, 1 H, Ar-H), 8.85 (d, J = 8 Hz, 1 H, Ar-H). - ^{13}C -NMR (100 MHz, $[D_4]$ -MeOD): δ = 60.4 (CH_2), 69.2 (CH_2), 100.8, 126.9, 129.2, 131.6, 133.8, 133.9, 134.0, 134.4, 134.4 (C_q), 135.0 (C_q), 135.4 (C_q), 138.1, 150.1, 150.5, 155.7 (C_q), 170.9 (C_q). - El. Anal. ber. (%) für $C_{23}H_{19}BrN_2O_4 \times 0.5 H_2O$ (476.3): C 58.00, H 4.23, N 5.88, gef. C 58.27, H 4.49, N 5.97.

7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat (9c)

1.00 g (2.14 mmol) des Pyridiniumsalzes **17** wurde bei 80 °C in kleinen Portionen zu 11 g Polyphosphorsäure (84%) gegeben. Die viskose Lösung wurde bei 90 °C für 19 h gerührt. Nach vorsichtiger Zugabe von 11 ml Wasser wurde die Lösung bei 80 °C für 30 min gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (ca. 20 °C) wurde die wässrige Lösung mehrmals mit Chloroform extrahiert und mit $NaHCO_3$ neutralisiert. Anschließend wurde eine wässrige Lösung HBF_4 (50%) zugegeben, bis ein tieferer Niederschlag ausfiel. Kristallisation aus Methanol ergab 189 mg (32 %) 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat als tiefrote Nadeln, Schmp. 217-218 °C (Zers.). - 1H -NMR (200 MHz, $[D_4]$ -MeOD): δ = 7.07 (d, J = 6 Hz, 1 H), 7.48 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.65 (ddd, J = 16 Hz, J = 8 Hz, J = 2 Hz, 1 H), 7.78-7.91 (m, 2 H), 8.26 (d, J = 8 Hz, 1 H), 8.75 (s, 1 H); 8.86 (d, J = 8 Hz, 1 H), 10.23 (s, 1 H). - ^{13}C -NMR (100 MHz, $[D_4]$ -MeOD): δ = 124.9, 127.4, 130.4, 133.8, 137.7 (C_q), 140.7 (C_q), 141.0 (C_q), 141.7, 151.7 (C_q). - El. Anal. ber. (%) für $C_{13}H_{11}BF_4N_2$ (282.1): C 55.36, H 3.93, N 9.93, gef. C 55.64, H 3.78, N 9.57.

6.2.3 10-Aminoacridiziniumbromid (VS3)

4.00 g (8.56 mmol) Pyridiniumbromid **18**⁴⁷ wurden in 40.0 ml 48 % HBr gelöst und für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die entstandene Phthalsäure abfiltriert und die resultierende rote Lösung für weitere 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es fiel 10-Aminoacridizinium **9h** als gelb-oranger Niederschlag aus. Das erwartete Hauptprodukt der Cyclisierung, 8-Aminoacridiziniumbromid **9d** zersetzte sich bei der Reaktion oder bei der Aufarbeitung vollständig. Kristallisation des Niederschlages aus Methanol/Essigester ergab 45 mg (2 %) 10-Aminoacridiziniumbromid **9h** als orange-rote Kristalle, Schmp. 237-238 °C (Zers.). - ¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 6.80 (s, 2 H, NH₂), 7.20 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-9), 7.66 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-7), 7.81 (t, J = 8 Hz, 1 H, H-8), 7.96 (m, 2 H, H-2 und H-3), 8.39 (d, J = 9 Hz, 1 H, H-4), 9.23 (d, J = 7 Hz, 1 H, H-1), 9.44 (s, 1 H, H-11), 10.31 (s, 1 H, H-6). - ¹³C-NMR (100 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 112.2, 114.4, 121.1, 122.6, 126.4 (C_q), 127.3, 127.4 (C_q), 130.0, 133.1, 133.7, 135.9 (C_q), 139.6, 145.1 (C_q). - MS (ESI): m/z (rel. Intensität) = 195 (100) [M⁺].

6.3 Lösungsmittelabhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften von Acridiziniumsalzen

6.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Aufgrund der Messgenauigkeit wurden bei allen Absorptions- und Fluoreszenzmessungen ausschließlich spektroskopisch reine Lösungsmittel und MILLI-Q Wasser verwendet. THF und 1-Butanol wurden durch Destillation gereinigt.

Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Probelösungen für die UV- und Fluoreszenzspektroskopie (AAV1)

Die Absorptionsspektren der Acridiziniumsalze wurden, soweit nicht anders angegeben, von 10⁻⁴ M Lösungen aufgenommen, die aus einer 10⁻³ M Stammlösung erhalten wurden.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M durchgeführt. Da der in den Proben enthaltene Sauerstoff die Fluoreszenz erheblich löschen kann, wurden die Maßlösungen vor der Messung jeweils 20-30 Minuten mit Argon gesättigt. Bei quantitativen Messungen wie der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit und der Fluoreszenzquantenausbeute wurden die Probelösungen zusätzlich direkt in der Küvette (mit

Schraubverschluß und Septum) von Sauerstoff befreit, indem abwechselnd über einer Kanüle Argon eingeleitet und Vakuum angelegt wurde.

Messung der Absorptions- und Emissionsspektren

Zur Messung des UV-Spektrums wurde ein Messbereich von 600 bis 200 nm und je nach verwendetem Spektrometer eine Messgeschwindigkeit von 120 bis 200 nm/min gewählt. Da die Absorptionsspektren der verschieden substituierten Acridiziniumsalze ein Maximum zwischen 380 nm und 400 nm aufweisen, wurde, soweit nicht anders angegeben, für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren eine Anregungswellenlänge von 380 nm gewählt. Der Messbereich lag in der Regel zwischen 400 und 700 nm. Vor der Bestimmung des Fluoreszenzmaximums wurden die Spektren mit der im Fluoreszenzspektrophotometer implementierten "Smooth"-Funktion mit dem Faktor 5 geglättet.

6.3.2 Untersuchung der Solvatochromie

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Lösungsmittel auf die Lage der Fluoreszenz- und Absorptionsmaxima wurden die Proben nach der oben beschriebenen allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV1) hergestellt. Soweit nicht anders angegeben wurden für die folgenden Versuche die jeweiligen Acridiziniumtetrafluoroborate verwendet.

V1: Absorptionsspektren (*I-01-1, I-47-1, III-11-1, III-70-1*)

Es wurden nach AAV1 Lösungen der Acridiziniumsalze (10^{-4} M) hergestellt und UV-Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen. Die Lage der charakteristischen langwelligen Absorptionsbande der untersuchten Acridiziniumderivate ist in Tabelle 6.1 aufgeführt.

V2: Fluoreszenzspektren (*I-01-1, I-47-2, III-11-2*)

Gemäß AAV1 wurden Probelösungen der Acridiziniumtetrafluoroborate (10^{-5} M) in verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt und deren Fluoreszenzeigenschaften bestimmt. Aufgrund der sehr schwachen Fluoreszenz des 6-Aminoacridiziniums (**9b**) wurden von dieser Verbindung keine Fluoreszenzspektren in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen. Die lösungsmittelabhängige Lage der Emissionsmaxima der Acridiziniumsalze **9b**, **9c**, **9i** und **10** ist in Tabelle 6.2 angegeben.

EXPERIMENTALTEIL

Tabelle 6.1: Absorptionsmaxima, λ_{\max} in nm, und dekadischer Logarithmus des Extinktionskoeffizienten, $\log \epsilon$, der Acridiziniumderivate (**9**) des Indolochinoliniziniums **10**

LM ^a	λ_{abs} (9b) ^b	$\log \epsilon$	λ_{abs} (9c)	$\log \epsilon$	λ_{abs} (9i)	$\log \epsilon$	λ_{abs} (10)	$\log \epsilon$
H ₂ O	402	4.01	388	3.82	407	4.14	350	4.07
	424	3.84	463	3.65				
CH ₃ OH	404	4.00	405	3.84	414	4.20	352	4.06
	427	3.83	493	3.68				
C ₂ H ₅ OH	405	4.00	404	3.99				
	428	3.84	498	3.85				
CH ₃ COOH	404	3.81	395	3.81	412	4.01		
	427	3.63	468	3.66				
1-C ₄ H ₉ OH	407	3.59	407	3.98				
	428	3.41	504	3.84				
2-C ₃ H ₇ OH	404	3.66	408	3.81	413	4.03		
	426	3.50	506	3.65				
CH ₃ CN	403	4.03	398	3.80	409	4.08	350	4.04
	426	3.88	475	3.63				
DMSO	411	4.04	409	3.79	419	3.93	356	3.94
	433	3.87	494	3.64				
DMF	407	4.09	403	3.77	417	3.97	355	3.99
			495	3.61				
C ₃ H ₅ N	411	4.08	413	3.81	418	3.72		
			502	3.66				
THF	406	3.88	408	4.01				
	430	3.69	498	3.88				
CHCl ₃	406	3.39	406	3.94				
	428	3.21	494	3.78				

^aLM = Lösungsmittel, geordnet nach abnehmender Polarität gemäß der ET₃₀-Skala; ^b es wurden die beiden gut aufgelösten langwelligen Banden bestimmt, eine weitere Bande bei etwa 380 nm konnte aufgrund der ungenügenden Auflösung der Bandenstruktur nicht genau bestimmt werden

V3: Einfluss verschiedener Halogenide auf die Fluoreszenzeigenschaften von 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat **9c** (*III-24-1*, *III-25-1*, *III-26-1*)

Zu Lösungen von 7-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat **9c** in Wasser (10^{-4} M) wurden in kleinen Titrationsschritten wässrige Lösungen von NaF, NaCl, NaBr, NaI und Na₂HPO₄ (100 mM) zugegeben. Die Anregungswellenlänge war jeweils 380 nm, das Probenvolumen betrug 2 ml. Darüber hinaus wurden als Kontrollexperimente Titrationen von NaF, NaBr, NaI und Na₂HPO₄ zu 9-Aminoacridiziniumtetrafluoroborat (**9g**) durchgeführt (*III-32-1*, *III-33-1*, *III-34-1*)

6.3.3 Fluoreszenzquantenausbeute in verschiedenen Lösungsmitteln

Allgemeines

Die Fluoreszenzquantenausbeute der zu untersuchenden Substanz wurde unter konstanten Messbedingungen relativ zu der Fluoreszenzquantenausbeute eines Standards mit bekannter Quantenausbeute bestimmt.⁹⁹ Um zu gewährleisten, dass die zu bestimmende Probe und der Standard unter identischen Bedingungen gemessen werden, wurden jeweils die gleichen Küvetten verwendet und die Messung bei konstanter Temperatur und bei gleichen Einstellungen am Spektrometer (Messbereich, Anregungswellenlänge, Spaltweite, Einfallswinkel des Anregungsstrahls, Messgeschwindigkeit) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden durch die Integration des Fluoreszenzsignals ermittelt. Die Quantenausbeute der zu bestimmenden Substanz wurde nach Gleichung 6.1 berechnet:¹⁰⁰

$$\Phi_{em} = \frac{I_{fa} \epsilon_s c_s}{I_{fs} \epsilon_a c_a} \Phi_{em_fs} \quad (\text{Gleichung 6.1})$$

Hierbei sind I_{fa} und I_{fs} die Fluoreszenzintensitäten des Acridiziniumsalzes (Index a) und der Standard-Verbindung (Index s), ϵ_a und ϵ_s die molaren Absorptionskoeffizienten des Acridiziniumsalzes und des Standards, c_a und c_s die Konzentrationen (jeweils 10^{-5} M) und Φ_{fs_em} die Fluoreszenzquantenausbeute der Standard-Verbindung. Da der Quotient aus den Quadraten der Brechungsindices der verwendeten Lösungsmittel, der gewöhnlich in Gleichung 1 als Faktor eingeht, für Acridizinium und Fluoreszenzstandard in der Regel nicht signifikant von 1 abweicht, wurde er bei der Berechnung der Fluoreszenzquantenausbeuten vernachlässigt.

V4: Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten der Acridiziniumsalze (I-01-I, I-52-I)

Die Quantenausbeute wurde von den Acridiziniumderivaten **10** und **9i** bestimmt. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Kryostaten auf 20°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) gehalten, und die Proben wurden sowohl vor als auch nach dem Abfüllen in die Küvette gründlich von Sauerstoff befreit. Als Fluoreszenzstandard wurde beim Indolochinoliniumtetrafluoroborat **10** eine Lösung von Chininsulfat in 1 N H_2SO_4 benutzt (10^{-5} M, $\Phi_{fs} = 0.546$, $\log \epsilon_{370\text{ nm}} = 369$, $I_{fs} = 78500$).¹⁰¹ Bei der Bestimmung der Quantenausbeute des 11-Aminoacridiziniums (**9i**) konnte Chininsulfat als Fluoreszenzstandard nicht benutzt werden, da die benötigte

Anregungswellenlänge von 410 nm in die Fluoreszenzbande des Chininsulfats fällt. Aus diesem Grund diente bei dieser Verbindung eine methanolische Lösung des 9-Aminoacridiziniumtetrafluoroborats (**9g**) als Standard (10^{-5} M, $\Phi_{fs} = 0.18$, $\log \epsilon_{410\text{ nm}} = 4.00$, $I_{fs} = 70700$). Die Konzentration der Acridiziniumsalze in den verschiedenen Lösungsmitteln betrug 10^{-5} M, die Extinktionskoeffizienten bei den jeweiligen Anregungswellenlängen wurden bei der Aufnahme der UV-Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt. Die Spaltbreite am Fluoreszenzspektrometer wurde bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren beider Verbindungen auf 5 eingestellt. Von den Acridiziniumderivaten **9b** und **9c** wurden aufgrund der sehr geringen Fluoreszenz keine Quantenausbeuten bestimmt. Die Ergebnisse der Fluoreszenzquantenausbeutebestimmung der Acridiziniumsalze **10** (*I-01-1*) und **9i** (*I-47-2*, *I-52-1*) in verschiedenen Lösungsmitteln sind in Tabelle 6.2 angegeben.

Tabelle 6.2: Fluoreszenzmaxima, λ_{fl} in nm, und relative Fluoreszenzquantenausbeuten, ϕ_{em} , der Chinoliziniumderivate **9c**, **9i** und **10**

LM	λ_{em} (10) ^b	ϕ_{em} (10) ^c	λ_{em} (9c) ^d	λ_{em} (9i) ^e	ϕ_{em} (9i) ^f
H ₂ O	452	0.05	444	507	0.01
CH ₃ OH	452	0.15	424	501	0.01
			446		
CH ₃ CO ₂ H			453	501	0.01
			468		
2-C ₃ H ₇ OH			455	498	>0.01
CH ₃ CN	450	0.10	424	497	0.01
			444		
C ₅ H ₅ N			424	508	0.01
			448		
DMSO	455	0.09	451	508	0.01
DMF	454	0.05	453	505	0.01

^a LM = Lösungsmittel, geordnet nach abnehmender Polarität gemäß der ET₃₀-Skala; ^a Probevolumen bei allen Verbindungen 2 ml, Temperatur 20 °C; ^b c(**10**) = 10^{-5} M, $\lambda_{ex} = 370$ nm, Spaltbreite 5/5; ^c bestimmt gegen Chininsulfat 10^{-5} M in 1 M H₂SO₄ ^d c(**9b**) = 10^{-4} M, $\lambda_{ex} = 380$ nm, Spaltbreite 5/5; ^e c(**9i**) = 10^{-5} M, $\lambda_{ex} = 410$ nm, Spaltbreite 5/5; ^f bestimmt relativ zu 9-Aminoacridizinium (**9g**) 10^{-5} M in Methanol.

6.4 Wechselwirkung mit DNA

6.4.1 Spektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung des Bindungsmodus

6.4.1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Bei allen nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zum Verhalten der Acridiziniumderivate in Anwesenheit von DNA wurden stets Lösungen der Acridiziniumbromide verwendet.

Herstellung der DNA-Lösungen (AAV2)

Zur Herstellung einer KT-DNA-Lösung wurden wenige Milligramm KT-DNA mit einem Plastikspatel¹ in ein Präparateglas eingewogen und ein halbes Grammäquivalent MILLI-Q Wasser zugegeben, so dass eine Konzentration von 2 mg/ml resultierte. Die erhaltene Suspension wurde dann für mindestens 18 h im Kühlschrank aufbewahrt. Hierbei löste sich die DNA. Die erhaltene Lösung wurde anschließend durch einen sterilen Einmalfilterhalter der Porengröße 0.45 µm filtriert, um ungelöste Bestandteile sowie Verunreinigungen zu entfernen. Die Herstellung der Lösungen der synthetischen Polynucleotide (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise, der abschließende Filtrationsschritt wurde jedoch nicht durchgeführt. Die DNA-Lösungen wurden grundsätzlich sofort nach jedem Gebrauch gut verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt. Nach einer maximalen Aufbewahrungszeit von vier Wochen wurden die DNA-Lösungen erneuert.

Bestimmung der Konzentration der Nucleotidlösungen (AAV3)

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl der jeweiligen DNA-Lösung zweimal 1:10 verdünnt, so dass 1 ml einer 100fach verdünnten Lösung entstand. Nach beiden Verdünnungsschritten wurde mindestens 10 min gewartet und die Lösung gut durchmischt. Die Konzentration der verdünnten DNA-Lösungen wurde jeweils UV-spektrophotometrisch bestimmt. Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten (KT-DNA und (Poly[dAdT]-

¹ Jeglicher Kontakt der DNA mit Metallen ist zu vermeiden, da dies zu Oxidationen und damit zu Schädigungen im Biomolekül führen kann.

Poly[dAdT]): $\epsilon_{260} = 6600$; (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]): $\epsilon_{254} = 8400$) wurde die Konzentration der DNA Lösung in Basen gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz (Gleichung 6.2) berechnet:

$$[DNA]_b = \frac{Abs_{260/254}}{\epsilon \times d} \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

Hierbei ist $[DNA]_b$ die Konzentration der DNA-Basen in M, $Abs_{260/254}$ die gemessene Absorption bei 260 nm (KT-DNA und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT])) oder 254 nm ((Poly[dCdG]-Poly[dCdG])), ϵ der Extinktionskoeffizient der jeweiligen DNA und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm). Die Konzentration der unverdünnten DNA Stammlösung wird durch Multiplikation der errechneten Konzentration mit dem Faktor 100 erhalten.

Herstellung der Pufferlösung (AAV4)

Sowohl bei den UV- als auch bei den CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden die Acridiziniumsalze in einem 10 mM Phosphatpuffer mit dem pH-Wert 7.0 gelöst. Zur Herstellung des Puffers wurden 10 mM Stammlösungen von K_2HPO_4 und KH_2PO_4 hergestellt und so gemischt, dass die resultierende Lösung einen pH-Wert von 7.0 hatte.

6.4.1.2 UV-Spektroskopie

Probenvorbereitung und Messung der Absorptionsspektren (AAV5)

Die Konzentration der Probelösungen für die Absorptionsspektroskopie mit KT-DNA betrug 10^{-4} M bei einem Probevolumen von 2 ml. Bei Titrationen mit den synthetischen Polynucleotiden wurde mit Acridiziniumkonzentrationen von 5×10^{-5} M und einem Probevolumen von 1 ml gearbeitet. Um Verdünnungseffekte auszuschließen, wurde bei Titrationen mit KT-DNA die zu titrierende DNA-Lösung mit dem jeweiligen Acridiziniumsalz versetzt, so dass die Acridiziniumkonzentration in der DNA-Lösung der Acridiziniumkonzentration in der Probelösung (10^{-4} M) entsprach. Bei Titrationen mit den synthetischen Polynucleotiden (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) wurden aus Kostengründen die Nucleotidlösungen nicht mit Acridizinium versetzt. Die spektrophotometrischen Titrationen dienten sowohl der Bestimmung der Bindungskonstante als auch der Ermittlung der Lage der isosbestischen Punkte, die bei der Messung der Fluoreszenzspektren als Anregungswellenlängen benutzt wurden.

Berechnung der Bindungskonstanten

Aus den Daten der UV-Titrationsen wurden die Bindungskonstanten der Chinoliziniumderivate **9** und **10** berechnet. Voraussetzung hierfür ist, dass die Titrationsen bis zur Sättigung durchgeführt werden. Zunächst wurde für jeden Titrationssschritt die Absorption bei einer konstanten Wellenlänge (in der Regel am Absorptionsmaximum der reinen Acridiziniumlösung) bestimmt. Aus diesen Daten wurde für jeden Titrationssschritt nach Gleichung 6.3 die so genannte Sättigungsfraction SF berechnet.

$$SF = \frac{Abs - Abs_F}{Abs_S - Abs_F} \quad (\text{Gleichung 6.3})$$

Hierbei ist Abs die für jeden Titrationssschritt beobachtete Absorption, Abs_F die Absorption des freien Acridiziniums, das heißt die Absorption der reinen Acridiziniumlösung vor DNA-Zugabe, und Abs_S die Absorption des gebundenen Acridiziniums, d.h. die beobachtete Absorption am Ende der Titration.

Mit der Sättigungsfraction ist es nun möglich, die Stoffmenge gebundenen Acridiziniums pro mol DNA, r , und die Stoffmenge freier Substanz, c , nach den Gleichungen 6.4 und 6.5 zu berechnen:

$$r = \frac{SF \times C_0}{C_{DNA}} \quad (\text{Gleichung 6.4})$$

$$c = (1 - SF) \times C_0 \quad (\text{Gleichung 6.5})$$

C_0 ist die Konzentration der reinen Acridiziniumlösung und C_{DNA} die DNA-Konzentration beim jeweiligen Titrationssschritt. Mit einer Auftragung r/c gegen r (Scatchard-Auftragung)⁵² kann nun mit Hilfe der Gleichung von McGhee und von Hippel⁵³ (Gleichung 6.6) die Bindungskonstante abgeschätzt werden, indem mit Hilfe der Statistiksoftware Sigma Plot 4.01 eine bestmögliche Ausgleichskurve durch die experimentellen Daten gelegt wird.

$$\frac{r}{c} = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right] \quad (\text{Gleichung 6.6})$$

Man erhält als Parameter die intrinsische Bindungskonstante K und den Ausschlussparameter n , der die an der Bindung beteiligte Basenzahl angibt. Um systematische Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurden bei der Auftragung r/c gegen r nicht alle experimentell gesammelten Daten verwendet, sondern nur die Daten die in der Sättigungsfraction Werten zwischen 0.15 und 0.85 zugeordnet werden können.

V5: DNA-Titrationen der Acridiziniumsalze **9a-i** und des Indolochinoliziniums **10** mit KT-DNA und synthetischen Polynucleotiden

Nach AAV 5 wurden wässrige Pufferlösungen der Acridiziniumderivate **9a-i** und des Indolochinoliziniums **10** mit KT-DNA (*I-04-1, I-56-1, III-12-1, IV-29-, IV-41-1, 2IV-40-1, IV-50-1*) und mit den synthetischen Polynucleotiden (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (*I-21-1, I-25-1, I-27-1, I-29-1, III-93-1, IV-10-1, IV-08-1*) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (*I-19-1, I-14-1, I-16-1, I-19-2, III-91-1, IV-11-1, IV-09-1, IV-33-1*) titriert (Abbildung 6.1 und 6.2). Die DNA-Zugabe erfolgte in Halbäquivalentschritten. Aus den Daten wurde die Lage der isosbestischen Punkte bestimmt und die Bindungskonstante der Acridiziniumsalze an die jeweilige DNA berechnet (Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4).

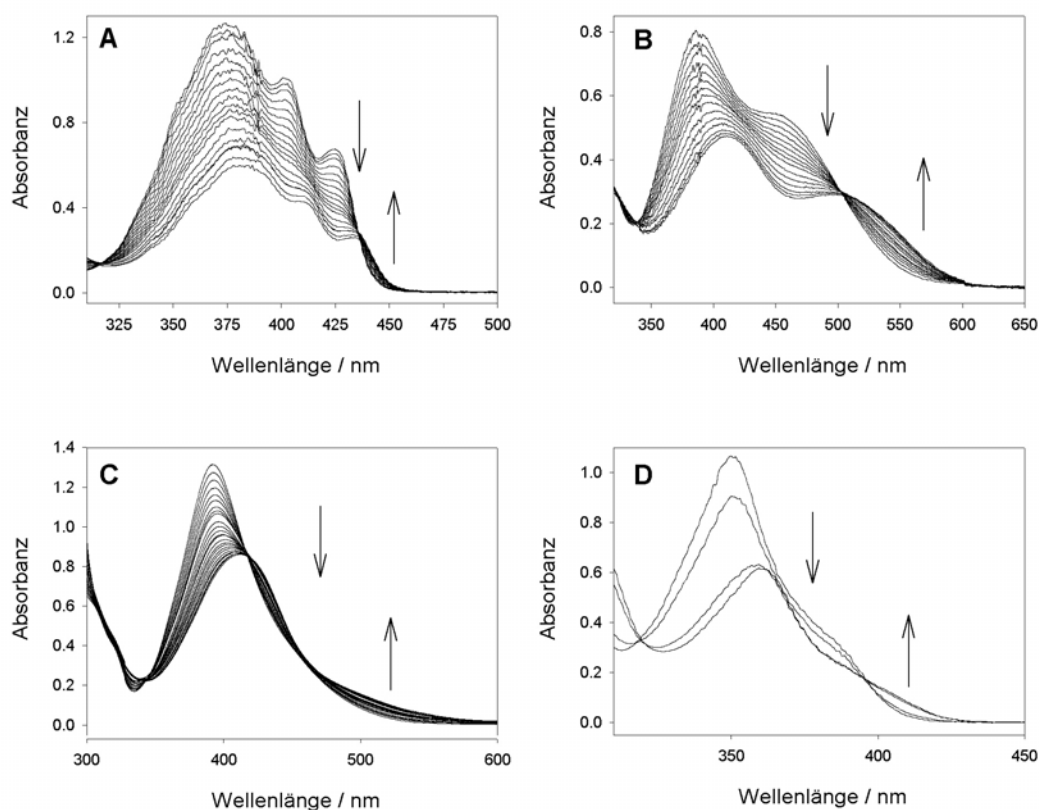


Abbildung 6.1: Spektrophotometrische Titrationen der Chinoliziniumderivate **9b** (A), **9c** (B), **9h** (C) und **10** (D) mit KT-DNA (V5)

EXPERIMENTALTEIL

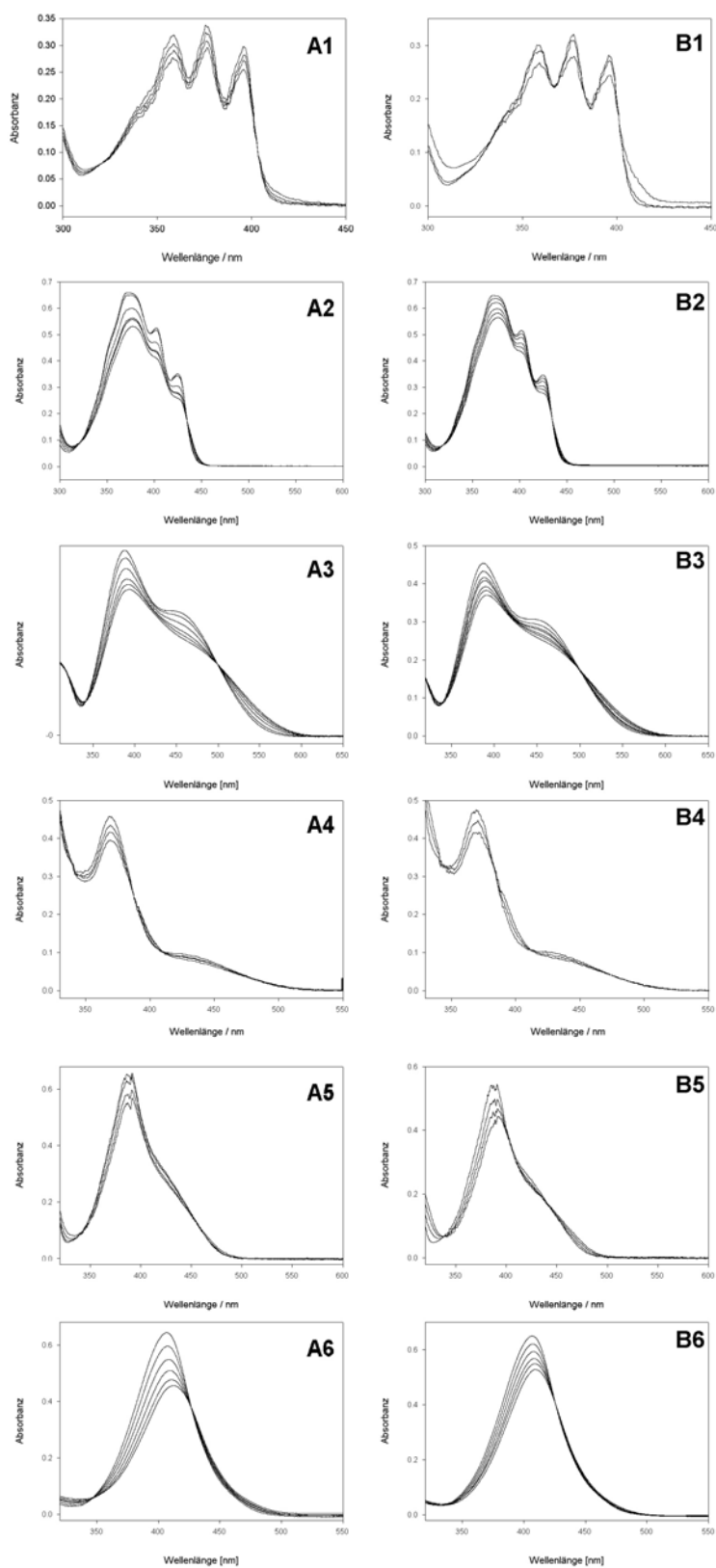


Abbildung 6.2: Spektrophotometrische Titrations der Chinoliniumderivate **9a** (1), **9b** (2), **9c** (3), **9d** (4), **9g** (5) und **9i** (6) mit (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (A) und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (B)

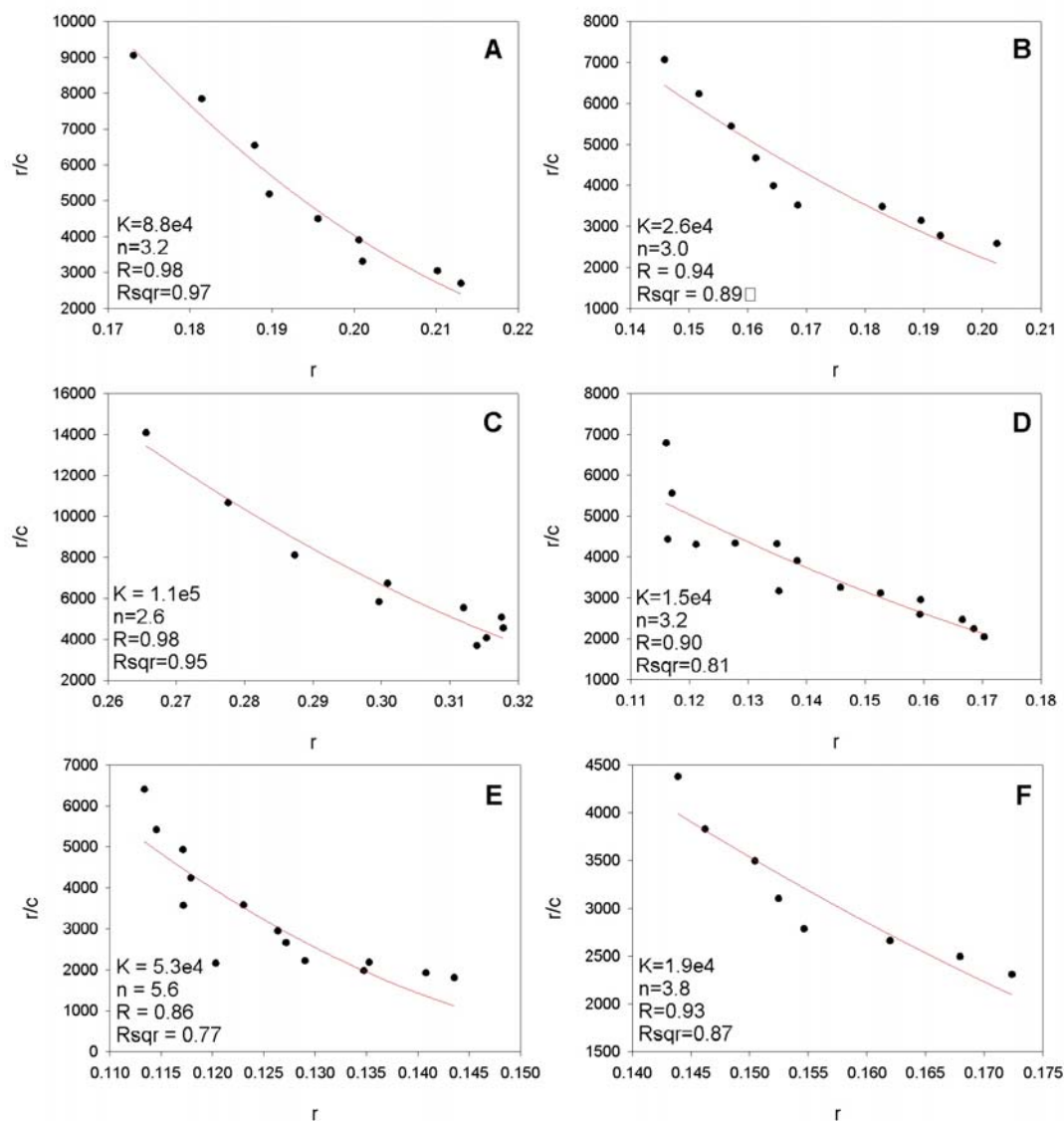


Abbildung 6.3: Scatchard-Auftragungen der spektrophotometrischen Titrations der Chinoliziniumderivate **9a** (A), **9b** (B), **9c** (C), **9g** (D), **9h** (E) und **9i** (F) zur Bestimmung der intrinsischen Bindungskonstante K und des Ausschussparameters n mit KT-DNA

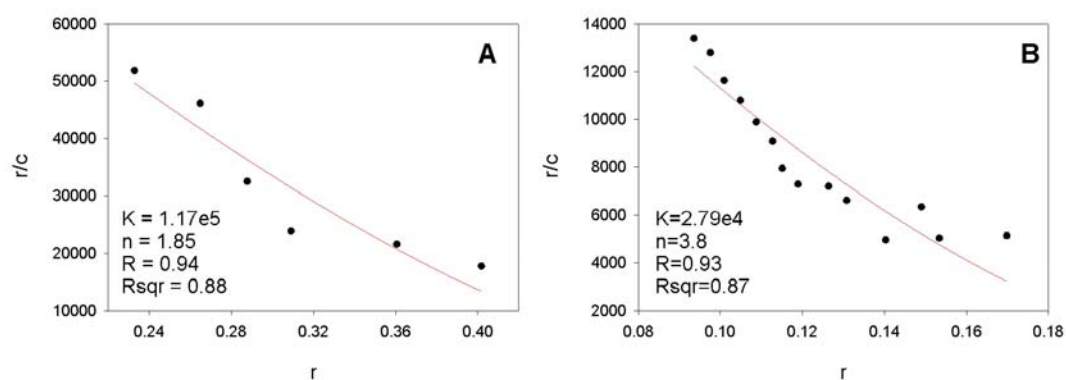


Abbildung 6.4: Scatchard-Auftragungen der spektrophotometrischen Titrations von (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (A) und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (B) zu 6-Aminoacridizinium (**9b**) zur Bestimmung der intrinsischen Bindungskonstante K und des Ausschussparameters n

6.4.1.3 CD-Spektroskopie

Die Aufnahme der CD-Spektren des Indolochinoliziniums **10** wurde im Arbeitskreis von Prof. G. Bringmann unter der Anleitung von Dr. Kim Messer durchgeführt.

V6: CD-spektroskopische Untersuchung der Chinoliziniumsalze **9a**, **9g** und **10** in Anwesenheit von KT-DNA (*I-05-I*)

Aus einer 3 mM KT-DNA Lösung und einer 1 mM wässrigen Chinoliziniumlösung wurden Probelösungen mit Chinolizinium/DNA-Verhältnissen von 0, 0.05, 0.1, 0.15 und 0.2 hergestellt und die zugehörigen CD-Spektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

6.4.1.4 LD-Spektroskopie

Die Messung der LD-Spektren wurde im Arbeitskreis von Prof. Francesco Dall'Acqua und Prof. Daniela Vedaldi unter der Anleitung von Dr. Giampietro Viola an der Universität Padua durchgeführt.

Herstellung der Puffer- und Probelösungen (AAV6)

Alle Messungen wurden in ETN-Puffer (pH = 7.0) durchgeführt. Dieser enthält 1 mM EDTA und 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan. Weiterhin wurde NaCl zugefügt, um die gewünschte Ionenstärke des Puffers einzustellen. Soweit nicht anders vermerkt betrug die NaCl-Konzentration im Puffer 10 mM.

Es wurden Probelösungen mit Konzentrationsverhältnissen Acridizinium/DNA von 0, 0.02, 0.04, 0.08 und 0.2 hergestellt. Die DNA-Konzentration sowie das Gesamtvolumen der Proben von 4 ml wurden nicht geändert. Das DNA-Acrizinium-Verhältnis wurde durch Zugabe unterschiedlicher Volumina einer konzentrierten Stammlösung des Acridiziniumsalzes in DMSO eingestellt. Exemplarisch sind in Tabelle 6.3 die benötigten Volumina für eine 22.7 mM Stammlösung des 11-Aminoacridiziniums **9i** angegeben.

Die Proben des 7-Aminoacridiziniumbromids **9c** wurden nach analoger Vorgehensweise hergestellt. Im Gegensatz zu allen anderen spektroskopischen Untersuchungen mit DNA wurde bei der Aufnahme der LD-Spektren ST-DNA anstatt KT-DNA verwendet.

Tabelle 6.3: Zusammensetzung der Probelösungen für die Aufnahme der LD-Spektren

c(Acr)/c(DNA)	DNA ^a	9i ^b	ETN ^c
0	1.89 ml	0	2.10 ml
0.02	1.89 ml	8 µl	2.10 ml
0.04	1.89 ml	16 µl	2.09 ml
0.08	1.89 ml	32 µl	2.08 ml
0.2	1.89 ml	80 µl	2.03 ml

^a DNA-Stammlösung in MILLI-Q-Wasser, Konzentration 4.8 mM; ^b Acridizinium-Stammlösung in DMSO, Konzentration 22.7 mM; ^c Ionenstärke/Natriumkonzentration im ETN-Puffer 10 mM

Aufnahme der LD-Spektren

Von allen zu messenden Probelösungen wurden zunächst Absorptionsspektren aufgenommen, um den Messbereich für die LD-spektroskopischen Untersuchungen zu bestimmen. Zur Aufnahme der LD-Spektren wurden die Probelösungen in die Küvette, die fest im Spektrometer installiert ist, eingefüllt. Anschließend wurde zunächst jede Probe mit rotierender Küvette, dann noch einmal ohne Rotation über den gesamten Absorptionsbereich des jeweiligen Acridiziniumsalzes (in der Regel 200-600 nm) bei geringer Auflösung gemessen. Danach wurde die gleiche Probelösung noch einmal gemessen. Diesmal jedoch nur im Bereich der langwelligen Acridiziniumabsorption und bei zehnmal höherer Auflösung des Spektrometers. Nach der Messung wurde die Probe aus der Küvette entnommen und die Küvette durch mehrmaliges Spülen mit Wasser gereinigt. Die Geschwindigkeit der Rotation der Küvette betrug etwa 800 Umdrehungen/min.

Auswertung und Berechnung des reduzierten LD^{102,17}

Bei der LD-Spektroskopie wird die differentielle Absorption von linear polarisiertem Licht bestimmt, dessen eine Polarisations Ebene parallel und dessen andere senkrecht zu einer definierten Referenzachse ausgerichtet ist. Der LD ist dabei definiert als die Differenz aus der Absorption des parallel zur Referenzachse polarisierten Lichtes, $A_{//}$, und der Absorption des senkrecht polarisierten Lichtes, A_{\perp} (Gleichung 6.7).

$$LD = A_{//} - A_{\perp} \text{ (Gleichung 6.7)}$$

Das LD-Spektrum der Acridiziniumsalze wurde als das Differenzspektrum aus dem Spektrum ohne Rotation und dem Spektrum mit rotierender Küvette erhalten.

Das reduzierte LD-Spektrum, das die Wellenlängenabhängigkeit des Lineardichroismus reflektiert, wird erhalten, indem die Messbereiche der Absorptionsspektren mit denen der LD-Spektren abgeglichen und dann die LD-Werte durch die Absorptionen bei entsprechenden Wellenlängen dividiert werden (Gleichung 6.8).

$$LD_r = \frac{LD}{Abs} \quad (\text{Gleichung 6.8})$$

V7: LD-Spektren der Acridiziniumsalze **9c** und **9i**

Nach oben beschriebener Vorschrift wurden die Probelösungen der Acridiziniumderivate **9c** (III-17-1) und **9i** (III-14-1) hergestellt und deren LD-Spektren bei steigender DNA-Konzentration aufgenommen. Die Ionenstärke des verwendeten ETN-Puffers war 10 mM. Die Messung der LD-Spektren der Verbindungen **9a**, **9b**, **9d**, **9f**, **9g** und **10** wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Giampietro Viola durchgeführt (Abbildung 6.5).

6.4.1.5 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren des selbstkomplementären Dodecanucleotids (5'-CGCGAATTCGCG-3') wurden von Dr. Matthias Grüne am Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, durchgeführt. Zunächst wurden ¹H-NMR-Spektren der reinen Oligonucleotidlösung aufgenommen, die im Vergleich mit Literaturdaten eine Zuordnung der Signale zur DNA ermöglichten. Nach diesen Referenzmessungen wurden Spektren von Probelösungen gemessen, in denen der Strang des Oligonucleotids und ein Acridiziniumsalz in äquimolaren Mengen vorlagen. Alle Messungen wurden sowohl in D₂O als auch in H₂O durchgeführt. Als interner Standard wurde TSP (3-(Trimethylsilyl)-propionsäure, 0.6 mM) benutzt.

Herstellung und Gefriertrocknung der Probelösungen für die NMR-Spektroskopie (AAV7)

Es wurde eine gepufferte Lösung des Dodecamers hergestellt. Hierfür wurde der käuflich erworbene Phosphatpuffer (10 mM, pH = 7.0) mit 10 μM NaN₃ und 5 μM EDTA versetzt. Hierzu wurden in 50 ml des Phosphatpuffers 10 μl einer 50 mM NaN₃-Lösung und 10 μl einer 25 mM EDTA-Lösung gegeben. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuumkonzentrator (Lyophilisieren) wurden dem mit Puffersalzen vermischten Doppelstrang die entsprechenden reinen Lösungsmittel zugesetzt.

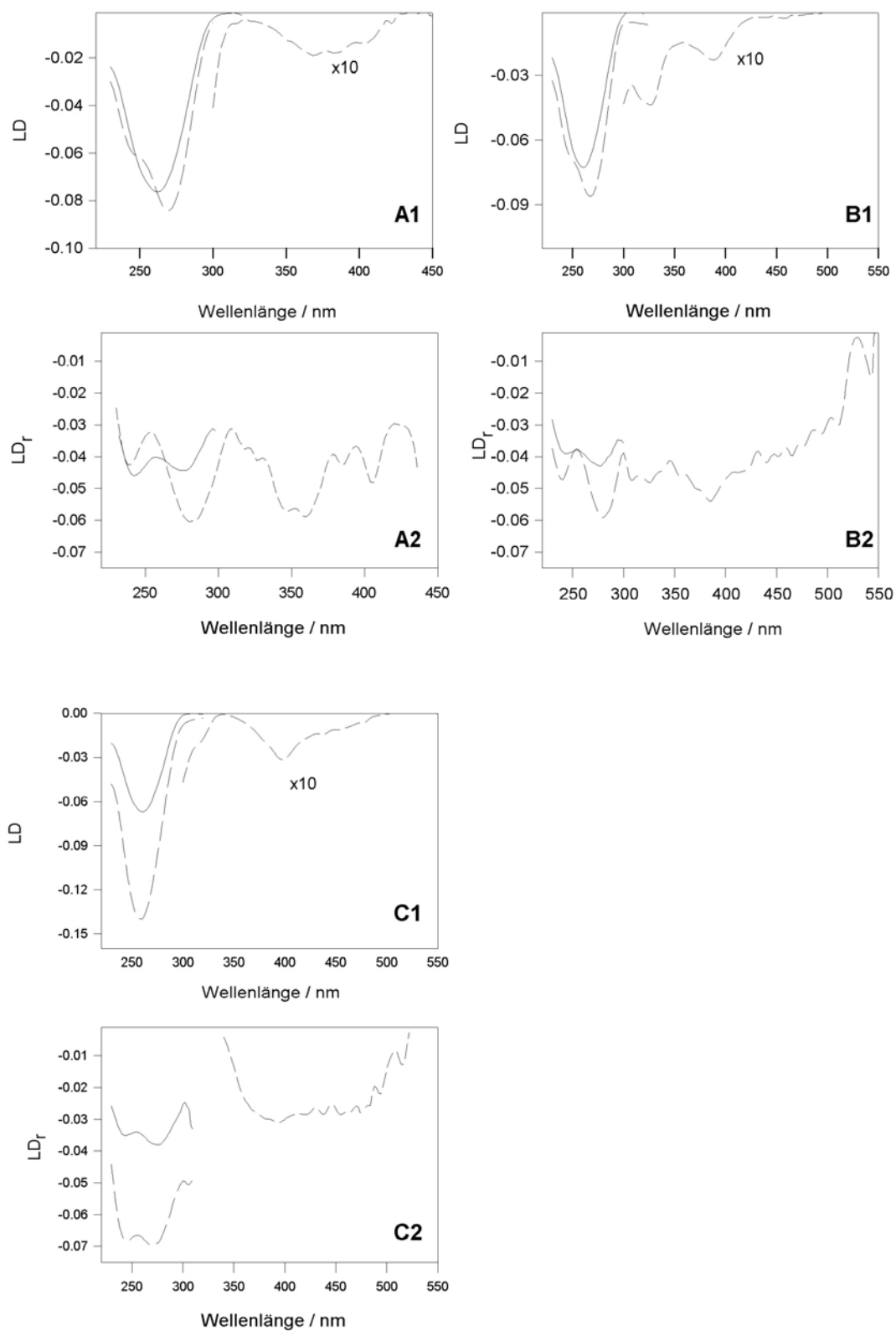


Abbildung 6.5: LD-Spektren (1) und LD_r (2) der Acridizinumderivate **9a** (A), **9d** (B) und **9g** (C)

Nach der Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren einer konzentrierten Lösung des reinen DNA-Stranges wurde das lyophilisierte Dodecamer in 1 ml MILLI-Q Wasser aufgenommen und die resultierende Lösung gleichmäßig auf vier Proben verteilt. Alle vier Fraktionen wurden mit 380 μl Puffer und 7 μl D_2O , das 1% TSP als internen Standard enthielt, versetzt und dann lyophilisiert. Aus diesen Fraktionen wurden die verdünnte Referenzlösung und die acridiziniumhaltigen Proben durch Lösen im entsprechenden Lösungsmittel hergestellt. Das Gesamtvolumen der Probelösungen für die NMR-Spektroskopie betrug bei allen Messungen 700 μl . Proben, bei denen die Signale der mit dem Lösungsmittel austauschenden Protonen bestimmt werden sollten, wurden in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) aufgenommen. Alle Proben wurden durch abwechselndes Anlegen von Vakuum und Überleiten von Argon von Sauerstoff befreit.

Zum Gefriertrocknen der Proben wurden die Probelösungen durch mehrmaliges Nachspülen mit Wasser vollständig in Präparategläser überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Je nach Lösungsmittelmenge wurde die Probe für 3-6 h bis zur vollständigen Trockenheit an einem Vakuumkonzentrator lyophilisiert. Beim Wechseln des Lösungsmittels von H_2O zu D_2O wurde das Wasser durch mindestens vier aufeinander folgende Gefriertrocknungszyklen sukzessiv entfernt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde die Substanz immer wieder in wenig D_2O (ca. 500 μl) aufgenommen.

Messung der NMR-Spektren

Die Spektren wurden an einem 600-MHz-Spektrometer und bei einer konstanten Temperatur von 298.5 K aufgenommen. Bei der Messung der Proben in H_2O wurden folgende Sequenzen zur Wasserunterdrückung verwendet: p3919gp (^1H -Spektroskopie) und gtp19 (NOESY-Spektren)¹⁰³ sowie zggpw5 (^1H -Spektroskopie) und gpstw5 (NOESY-Spektren).¹⁰⁴

V8: Messung der NMR-Spektren des reinen Dodecamers (*III-77-1*)

2.96 μmol Dodecanucleotid wurden in 630 μl Phosphatpuffer, dem 10 μM NaN_3 und 5 μM EDTA zugesetzt wurden, gelöst. Zu dieser Lösung wurden 70 μl D_2O zugegeben, und von der resultierenden 4.2 mM Lösung wurden die NMR-Spektren aufgenommen. Nach mehrmaligem Lyophilisieren der Probe wurde diese in 700 μl D_2O aufgenommen, und von der 4.2 mM Lösung wurden die ^1H -NMR-Spektren der nicht austauschenden Protonen aufgenommen.

Weiterhin wurden Spektren einer verdünnten Referenzlösung gemessen. Hierzu wurde eine der vier nach AAV7 hergestellten Fraktionen in 700 μl reinem Lösungsmittel aufgenommen

und die entsprechenden Spektren der erhaltenen 1 mM Lösung gemessen. Diese Probe wurde auch nach der Aufnahme der Spektren als Referenzprobe aufbewahrt.

V9 NMR-Spektren in Anwesenheit von Acridiziniumsalzen (IV-07-1)

Durch Zugabe von 630 μl 1 mM Acridiziniumstammlösungen der Verbindungen **9a** und **9g** zu den nach AAV7 hergestellten DNA-Fractionen wurden äquimolare Mischungen aus den jeweiligen Acridiziniumsalzen und dem Dodekamer erhalten. Spektren dieser Lösungen wurden in D_2O und in H_2O aufgenommen.

6.4.2 Lichtinduzierte DNA-Schädigung durch Acridiziniumderivate

6.4.2.1 Sicherheitsmaßnahmen und allgemeine Versuchsvorbereitung

Sicherheitsmaßnahmen

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass jeder Hautkontakt mit dem sehr giftigen und kancerogenen Ethidiumbromid, das zur Anfärbung der Gele verwendet wird, vermieden wird. Deshalb wurden alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen durchgeführt. Auch zur Herstellung eines Gels sind gesonderte Geräte (Kolben, Spatel usw.) verwendet worden. Die Gele wurden gesammelt und über die giftigen Feststoffabfälle entsorgt.

Verwendete Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden im Dunkeln bei 5 °C gelagert und regelmäßig alle drei Monate erneuert. Die verwendeten Puffer- und Stammlösungen wurden wie folgt hergestellt:

TBE-Puffer:

Der TBE-Puffer besteht aus 17.8 mM Trisbase [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], 17.8 mM Borsäure und 0.4 mM EDTA (pH = 8.0). Zur Herstellung einer fünffach konzentrierten Stammlösung wurden 54.0 g (89.0 mmol) Trisbase, 27.5 g (89.0 mmol) Borsäure und 10 mmol EDTA (20 ml 0.5 M EDTA in Wasser, pH 8) mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt.

I_{1/2}-Puffer:

Der I_{1/2}-Puffer (pH = 7.4) besteht aus 5.00 mM KH_2PO_4 und 50 mM NaCl. Eine zehnfach konzentrierte Stammlösung wurde aus 20 ml einer 500 mM KH_2PO_4 -Lösung (13.6 g KH_2PO_4

in 200 ml H₂O mit 10 M KOH auf pH 7.4 eingestellt), 100 ml 1.0 M NaCl (11.7 g NaCl in 200 ml H₂O) und 80 ml H₂O hergestellt.

pBR322-Lösungen

Für die Herstellung der Stammlösung wurden 10 µL der käuflich erworbenen Plasmidlösung der Konzentration 500 mg/L auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt, um eine DNA-Konzentration von 100 mg/L einzustellen. Zur Herstellung der in den Strangbruch-experimenten eingesetzten DNA-Reaktionslösungen wurde die pBR322-Stammlösung auf eine DNA-Konzentration von 40 mg/l verdünnt und I_{1/2}-Puffer zugesetzt (Phosphat-Endkonzentration in der Reaktionslösung: 2-fach). Bei einem Gel mit 11 Probestaschen entspricht dies 24 µL der DNA-Stammlösung, 12 µl I_{1/2}-Puffer-Stammlösung und 24 µl Wasser.

Herstellung der Agarosegele (AAV8)

600 mg Agarose wurden in 12 mL der Stammlösung des TBE-Puffers und 48 mL Wasser suspendiert und in einem siedenden Wasserbad so lange erhitzt, bis eine klare Lösung entstand (etwa 4-5 min). Diese Lösung wurde mit 30 µL einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml; Ethidiumbromidkonzentration im Gel: 0.50 mg/L) versetzt und in einen Gelträger gegossen, in den ein Gelkamm zur Bildung der Probestaschen eingehängt war. Das Gel polymerisierte beim Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von 1 h. Danach wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer überführt. Diese enthielt soviel Laufpuffer (TBE-Puffer 1fach), dass das Gel mindestens 1 mm bedeckt war (ca. 300 mL Puffer).

Um den Kontrast der DNA-Spots im Gel bei der Auswertung zu verbessern, kann dem Laufpuffer 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt werden.

Herstellung der Probelösungen (AAV9)

Die Reaktionen wurden in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Die Reaktionslösungen des Gesamtvolumens von 10 µL setzten sich aus 5 µL der pBR322-Reaktionslösung und 5µl einer wäßrigen Lösung des jeweiligen Chromophors in der gewünschten Konzentration (meist 10⁻⁴ M) zusammen. Nach dem Zusammengeben der Reagenzien wurde die Probelösung gut durchmischt (Vortex) und zentrifugiert. Bei Reaktionen unter anaeroben Bedingungen wurde sowohl die DNA-Reaktionslösung als auch die Acridiziniumsalz-Lösungen über eine

Teflonkanüle mit Argongas gesättigt.² Weiterhin wurden die zusammenpipettierten Probelösungen vor und nach dem Durchschütteln (Vortex) und Zentrifugieren mit Argongas gesättigt. Analog wurde bei den Versuchen in gesättigter Sauerstoff-Atmosphäre vorgegangen. Neben den Probelösungen wurden analog bei jedem Versuch mehrere Blindproben sowie bei einigen Versuchen eine Probe mit Metylenblau (**1a**) als Referenzsystem hergestellt.

6.4.2 Versuchsdurchführung und Auswertung

Durchführung der Photoreaktion (AAV10)

Die Bestrahlung bei 350 nm erfolgte in einem Rayonet-Photoreaktor mit zwölf UV-Lampen. Dabei wurden die Experimente unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

A: Bei einigen Strangbruchexperimenten standen die Proben in einem Eisbad und die Temperatur wurde mit Hilfe eines Kryostaten konstant auf 0 °C gehalten (AAV10a). Bei diesem Versuchsaufbau betrug die Bestrahlungszeit in der Regel 2 h.

B: In den übrigen Experimenten wurden die Probelösungen nicht gekühlt und die Proben wurden in der Lampe mit Hilfe von Reagenzgläsern in einem Reagenzglasgestell so angebracht, dass sie von allen Seiten gleichmäßig bestrahlt werden konnten (AAV10b). Die Bestrahlungszeit betrug unter diesen Versuchsbedingungen in der Regel 15 min. Die jeweils verwendeten Bedingungen sind bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

Nach der Reaktion wurden die Proben mit 2.5 µL Ladepuffer versetzt, durchmischt und zentrifugiert. Dieser Ladepuffer besteht aus Glycerin, der das Absinken der Proben in die Geltaschen ermöglicht, Bromphenolblau, das bei der Gelelektrophorese eine Beobachtung der Lauffront ermöglicht, und einem DNase-hemmendem Zusatz.

Durchführung der Gelelektrophorese (AAV11)

Jeweils 10 µL der mit 2.5 µL Ladepuffer versetzten Proben wurden vorsichtig in die einzelnen Taschen des in der Elektrophoresekammer liegenden Gels pipettiert. Daraufhin wurde für mindestens 2 h eine Spannung von ungefähr 80 V angelegt. Diese Spannung bewirkt, dass sich die DNA in Richtung des positiven Pols des angelegten elektrischen Feldes bewegt, wobei sich das im Gel befindliche Ethidiumbromid in die DNA einlagert. Die Lauffront wurde mittels des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblau beobachtet. Da diese

² Für die Deoxygenierung der Lösungen wurde eine Kanüle mit Teflonschlauch verwendet, um Metallspuren zu vermeiden, die die Oxidation der DNA verursachen.

schneller im Gel läuft als die DNA, wurde so lange Spannung angelegt, bis die blaue Front am Rand des Gels angekommen war. Aufgrund ihrer Größe trennen sich die einzelnen DNA-Formen. Die kompakte, ungeschädigte superhelikale DNA läuft im elektrischen Feld schneller als die nach Einzelstrangbruchbildung voluminösere, geschädigte, offen-zirkulare DNA. Die teilweise auch beobachtete lineare Form der DNA, die auf Doppelstrangbrüche zurückzuführen ist, liegt in ihrem Laufverhalten zwischen den beiden oben genannten Formen.

Auswertung

Zur Quantifizierung der offen-zirkularen und superhelikalen DNA wurde das Gel auf einem UV-Schirm ($\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$) von unten beleuchtet. Dabei fluoreszieren die DNA-Banden aufgrund der Anregung des in der DNA intercalierten Ethidiumbromids. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden fotografiert und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Banden bestimmt. Die Ausbeute an offen-zirkularerer bzw. linearer DNA wurde jeweils auf die Gesamtmenge an DNA in der Probe bezogen. Erfahrungsgemäß liegt der Fehler dieser quantitativen Auwertung innerhalb eines Gels bei $\pm 5\%$. Zwischen verschiedenen Gels ist ein Vergleich identischer Proben trotz unveränderter Versuchsparameter z. B aufgrund verschiedener Kameraeinstellungen, Ethidiumkonzentration im Gel und Fehlerquellen bei der manuellen Integration mit einem großen Fehler behaftet. In Abbildung 6.6 sind die Werte aller Strangbruchexperimente die nach *AAV10b* durchgeführt (etwa 10) wurden zusammengefasst.

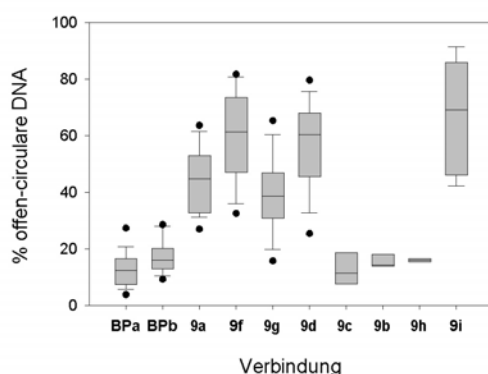


Abbildung 6.6: Strangbruchraten der Acridiziniumderivate **9a-d** und **9f-i**. Gezeigt sind ist der Median, die 25- und 75%-Quartile, die 5- und 95%-Percentile sowie Extremwerte. Für alle Experimente gilt: $c(\text{Acr}) = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, Proben unter anaeroben Bedingungen, Durchführung der Photoreaktion nach *AAV10b*

Nachfärben der Gele

Wenn bei der Auswertung die Helligkeit der Banden zu gering war, so wurde ein Gel nachgefärbt. Hierfür wurde das Gel für 30 min in eine Mischung aus Laufpuffer (TBE-Puffer) und Ethidiumbromid (0.50 mg/l) gelegt und ab und zu darin bewegt. Da bei der Auswertung nachgefärbter Gele der Kontrast der Banden oft nicht ausreichend ist, können diese 20-30 Minuten in einem Gemisch aus Wasser und einer 1 M MgSO₄-Lösung teilweise wieder entfärbt werden. Das Volumen der MgSO₄-Lösung sollte dabei ungefähr 1/1000 des Gesamtvolumens sein. Durch diese Vorgehensweise verbleibt nur das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid im Gel und der Rest wird ausgewaschen. Das Nachfärben ist jedoch meist nicht notwendig, wenn dem Laufpuffer vor der Gelelektrophorese Ethidiumbromid zugesetzt wurde.

6.4.2.3 Strangbruchexperimente zur Quantifizierung der photoschädigenden Wirksamkeit

6.4.2.3.1 Indolochinolizinium

Alle Proben für die Strangbruchexperimente mit dem Indolochinolizinium **10** wurden gemäß AAV9 hergestellt und nach AAV10-A bestrahlt. Die Konzentration der eingesetzten Stammlösung des Farbstoffs betrug 10⁻⁴ M. Die Photoreaktion wurde unter Kühlung durchgeführt und die Probelösungen wurden nur von oben bestrahlt (AAV10-A).

V10: Untersuchung der Strangbruchinduktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (I-02-1, I-50-1)

Bei einer Bestrahlungszeit von 2 h wurden in einem Zeitintervall von jeweils 15 min Proben entnommen und diese sofort nach der Entnahme mit Ladepuffer versetzt. Die Durchführung der Gelelektrophorese sowie die Auswertung erfolgten nach AAV11.

6.4.2.3.2 Acridiziniumderivate

V11: Untersuchung der Strangbruchinduktion in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Acridiziniumsalze (II-26-1, IV-59-1)

Es wurden Probelösungen der verschieden substituierten Acridiziniumsalze unter atmosphärischen (II-26-1) sowie unter sauerstofffreien Bedingungen hergestellt (IV-59-1). Die Konzentration der eingesetzten Acridizinium-Stammlösung betrug 10⁻⁴ M

(Acridiziniumkonzentration in der Probelösung 5×10^{-5} M). Die Probelösungen wurden gemäß *AAV10-B* gleichmäßig und ohne Kühlung für jeweils 15 min bei 350 nm bestrahlt.

V12: Strangbruchexperimente mit Acridiziniumdimeren (*I-63-1*, *I-65-1*, *I-70-1*)

Es wurden Probelösungen der 9-substituierten Acridiziniumsalze **9e-g** und deren Photodimere hergestellt. Die Konzentration der eingesetzten Stammlösungen betrug 10^{-4} M bei den Monomeren und 5×10^{-5} M bei den Dimeren, so dass die Konzentration des Acridiziniummonomers in beiden Fällen gleich war. Die Photoreaktion wurde sowohl gemäß *AAV10-A* bei 0 °C und einer Bestrahlungszeit von 1 h als auch nach *AAV10-B* ohne Kühlung und einer Bestrahlungszeit von 30 min durchgeführt. Beide Experimente wurden nach AAV-11 ausgewertet.

6.4.3 Mechanistische Untersuchungen zur Bestimmung des Strangbruchmechanismus

6.4.3.1 Fluoreszenzmessungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Probelösungen für Fluoreszenzmessungen in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7.0) hergestellt. Die Acridiziniumkonzentration betrug in den meisten Experimenten 10^{-5} M. Alle Proben wurden vor den Messungen gründlich mit Argon gesättigt. Die Herstellung und Konzentrationsbestimmung der verwendeten DNA Lösungen erfolgte nach AAV2 und AAV3.

6.4.3.1.1 Spektrofluorimetrische Titrations mit DNA, Mononucleotiden und – nucleosiden

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit einer Messgeschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen. Die Spaltbreiten für den Anregungsstrahl sowie für den Detektionsstrahl wurden so gewählt, dass eine Intensität von mindestens 100 Einheiten überschritten wurde. Der Anfang des Messbereichs lag 10 bis 15 nm höher als die Anregungswellenlänge. Alle Spektren wurden mit dem Faktor 5 der „Smooth“-Funktion geglättet. Soweit nicht anders angegeben wurden die Experimente in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7.0) durchgeführt.

V13 Titration mit KT-DNA und synthetischen Polynucleotiden

Die Acridiziniumkonzentration in den Probelösungen für Titrations mit KT-DNA betrug bei einem Probevolumen von 2 ml 10^{-5} M (*I-03-1, I-03-2, I-05-2, I-06-1, I-07-1, I-32-1, I-04-1, I-56-1, II-49-1, III-23-1, IV-51-1*). Die Spektren des schwach fluoreszierenden 6-Aminoacridiziniums (**9b**) wurden sowohl mit einer 10^{-5} M als auch mit einer 5×10^{-5} M Lösung aufgenommen (*III-73-1, III-82-1, III-83-1*).

Titrationen mit den synthetischen Polynucleotiden (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) und (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) wurden mit einer Acridiziniumkonzentration von 5×10^{-5} M und einem Probevolumen von 1 ml durchgeführt (*I-20-1, I-22-1, I-24-1, I-25-1, I-26-1, I-28-1, I-29-1, I-30-1, I-32-1, IV-12-1, IV-13-1, IV-15-1, IV-16-1, IV-17-1, IV-20-1, IV-21-1*).

Als Anregungswellenlängen dienten die in den spektrophotometischen Titrations ermittelten Wellenlängen der isosbestischen Punkte. In allen Versuchen wurde in Halbäquivalentschritten oder in Äquivalentschritten bis zur Sättigung titriert. In Abbildung 6.7 sind die zugehörigen Stern-Volmer-Auftragungen dargestellt.

V14: Zugabe von GMP, AMP und 8-oxo-dG

Zu einer gepufferten wässrigen Lösung des 9-Bromacridiziniums (**9f**) 0^{-5} M) wurden in 10 μ l Schritten gepufferte wässrige Lösungen von GMP und AMP (jeweils 30 mM) sowie eine Lösung von 8-oxo-dG (10^{-5} M) in DMSO zugegeben, und die zugehörigen Fluoreszenzspektren wurden aufgenommen (*IV-34-1, IV-34-2, IV-35-1, IV-37-1, IV-38-1*). Die Titration mit GMP wurde mit den Acridiziniumderivaten **9a** und **9f** aufgrund von Löslichkeitsproblemen in DMSO und Acetonitril als Lösungsmittel durchgeführt (*III-95-1, IV-06-1, IV-18-1, IV-19-1, IV-22-1*). Die Anregungswellenlänge bei diesen Experimenten betrug 370 nm.

Weiterhin wurden Fluoreszenzspektren reiner gepufferter wässriger Lösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9d**, **9f** und **9g** (10^{-5} M) mit den entsprechenden Spektren von 10^{-5} M Lösungen dieser Verbindungen in 1 mM GMP-Lösung verglichen. Als Anregungswellenlängen wurden die Wellenlängen der isosbestischen Punkte aus den jeweiligen Titrations mit (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) benutzt (*I-39-1*).

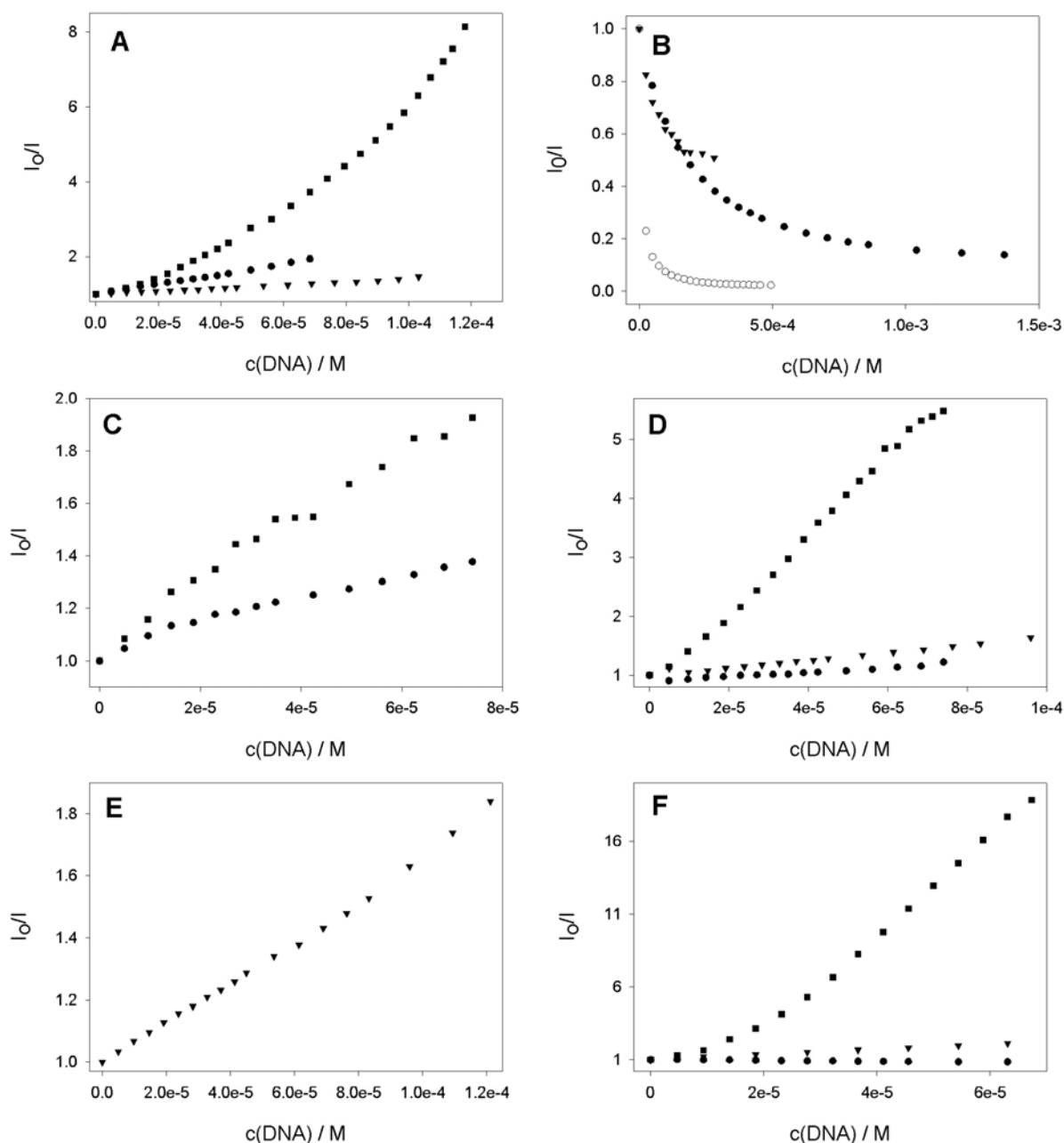


Abbildung 6.7: Stern-Volmer-Auftragungen aus den spektrofluorimetrischen Titrations der Chinoliziniumderivate **9a** (A), **9b** (B), **9d** (C), **9g** (D), **9f** (E) und **10** (F) mit KT-DNA (\blacktriangledown), (Poly[dCdG]-Poly[dCdG]) (\blacksquare) und (Poly[dAdT]-Poly[dAdT]) (\bullet)

V15: Spektrofluorimetrische Titrations von Bromid- und Chloridionen zu Acridiziniumderivaten

Zu gepufferten wässrigen Lösungen des 9-Bromacridiziniumbromids **9f** (10^{-5} M) wurden jeweils eine Spatelspitze festes Natriumbromid und Natriumchlorid gegeben und die zugehörigen Emissionsspektren gemessen (IV-43-1, IV-44-1).

Zu einer weiteren Lösung dieser Verbindung wurde eine 100 mM wässrige Lösung von NaBr titriert, wobei bei jedem Titrationschritt 10 Äquivalente Bromid zugegeben wurden (IV-43-

2). Das Probevolumen betrug bei allen Experimenten 2 ml, und die Anregungswellenlänge lag bei 380 nm.

6.4.3.1.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten

Die Fluoreszenzlebenszeiten des Indolochinoliziniums **10** sowie der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** in Anwesenheit verschiedener DNA-Konzentrationen wurden im Arbeitskreis von Prof. F. W. Schneider in Zusammenarbeit mit Angelika Häfner bestimmt.

V16: Fluoreszenzlebenszeiten in Anwesenheit von KT-DNA

Es wurde zunächst die Fluoreszenzlebenszeit der reinen Acridiziniumlösungen bestimmt und dann die Lebenszeiten der Chromophore **9a** (*III-30-1*), **9f** (*III-10-1*), **9g** (*II-92-1*, *III-09-1*) und **10** (*I-35-1*) in Anwesenheit von 5, 10, 20 und 40 Äquivalenten DNA ($c(\text{Acr})/c(\text{DNA}) = 0.5, 0.1, 0.05, 0.025$). Hierbei wurde die Acridiziniumkonzentration in allen Probelösungen einer Versuchsreihe konstant 10^{-5} M gehalten. Die Probelösungen mit einem Gesamtvolumen von 2 ml wurden durch abwechselndes Anlegen von Vakuum und Überleiten von Argon sorgfältig von Sauerstoff befreit. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit wurden die Verbindungen bei einer Wellenlänge von 358 nm angeregt und die Emissionssignale wurden am Fluoreszenzmaximum der jeweiligen Verbindungen detektiert. Die Auswertung der gesammelten Daten erfolgt nach literaturbekannten Methoden.¹⁰⁵

6.4.3.2 Laserblitzspektroskopie

Die Aufnahme der Transientenabsorptionsspektren der Acridiziniumsalze wurde in Kooperation im Arbeitskreis von Prof. Cornelia Bohne an der Universität in Victoria, Kanada, durchgeführt.

6.4.3.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Der Aufbau der verwendeten Systeme für die Laserblitzspektroskopie wurde bereits in der Literatur beschrieben.¹⁰⁶

Herstellung der Proben für die Laserblitzspektroskopie (AAV12)

Soweit nicht anders angegeben wurden die Proben der Acridiziniumbromide in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7.0, Herstellung des Puffers: AAV4) gelöst. Die Konzentration der Probelösung wurde durch Verdünnung einer 1 mM Stammlösung so eingestellt, dass die Absorption in einer Küvette der Schichtdicke 7×7 mm bei der in der Laserblitzspektroskopie benötigten Anregungswellenlänge Werten zwischen 0.2 und 0.4 entsprach. Alle Probelösungen wurden entsprechend den gewünschten Versuchsbedingungen für mindestens 15 min mit N_2 , O_2 oder zum Nachweis von solvatisierten Elektronen mit N_2O gesättigt.

Bei der Vorbereitung von Proben für Löschversuche wurden die Acridiziniumlösungen sowie die Lösungen der zu titrierenden Substanz für die gleiche Zeitspanne mit Stickstoff gesättigt. Bei der Titration wurde die sauerstofffreie Lösung des zu titrierenden Reagenzes mit Hilfe einer luftdichten Spritze in die Acridiziniumprobelösung gegeben.¹⁰⁷

Bestimmung der Transientenlebenszeit (AAV13)

Bei allen Messungen wurde zunächst die Transientenabsorption zwischen 600 und 700 nm bestimmt. Bei der Detektion von Signalen im Bereich solvatisierter Elektronen, wurde die verwendete Probelösung zusätzlich mit N_2O gesättigt. Anschließend wurde bei konstanter Detektionswellenlänge die Lebenszeit der Transienten bestimmt, indem bei dieser Wellenlänge das Signal von mindestens zehn Abklingkurven gemittelt wurde. Die Transientenlebenszeiten jeder Verbindung wurden bei mehreren Detektionswellenlängen und mit verschiedenen zeitlichen Auflösungen bestimmt, da nur so gewährleistet werden konnte, dass alle existierenden Transienten detektiert wurden. Bei Transientenlebenszeiten über 20 μ s wurde die Messung grundsätzlich mit einer Basislinienkorrektur durchgeführt.

Aufnahme der Transientenspektren (AAV14)

Das Transientenspektrum der Acridiziniumsalze wurde über den gesamten Absorptionsbereich der Verbindungen gemessen (Messbereich soweit nicht anders angegeben 200-600 nm). Der Bereich nahe der Anregungswellenlänge wurde ausgespart, um Störungen durch den Anregungsstrahl zu vermeiden. Zur Aufnahme eines Spektrums wurde exemplarisch an einer Detektionswellenlänge das Transientensignal aufgenommen, und innerhalb dieses Signals wurden vier Zeitfenster gesetzt, an denen ΔA gemessen werden sollte. In einem Intervall von 10 nm wurde anschließend über den gesamten Messbereich das Transientensignal aufgenommen. Hierbei wurden wie bei der Bestimmung der Transientenlebenszeit an jeder Wellenlänge mindestens 10 Abklingkurven gemessen, die

automatisch gemittelt wurden. Nach der Aufnahme dieses Überblickspektrums wurden im Bereich des Absorptionsmaximums des Transienten weitere Messpunkte zwischen den schon vorhandenen Datenpunkten aufgenommen, so dass der Bereich des Maximums gut aufgelöst war und die Lage des absoluten Maximums möglichst genau bestimmt werden konnte.

6.4.3.2.2 Untersuchung der reinen Acridiziniumsalze

V17: Transientenlebenszeiten und –spektren der reinen Acridiziniumsalze (*I-75-1, I-76-1, I-77-1, I-78-1, I-79-1, I-80-1, I-81-1, I-87-1, I-87-2, I-92-1, I-92-2, I-94-1, I-94-2, II-01-1, II-02-1, II-03-1, II-03-2, II-52-1, II-53-1*)

Zunächst wurden gemäß *AAV12* Probelösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9d**, **9e**, **9f**, **9g** und **9i** in Phosphatpuffer (10 mM, pH = 7.0) und von Acridiziniumbromid **9a** in Methanol unter sauerstoffgesättigten, atmosphärischen und stickstoffgesättigten Bedingungen hergestellt. Bei Anregungswellenlängen von 308 nm, 355 nm und 455 nm wurden anschließend bei verschiedenen Detektionswellenlängen und Sauerstoffkonzentrationen die Lebenszeiten der beobachteten Transienten nach *AAV13* bestimmt (Abbildung 6.8). Die Transientenlebenszeiten der genannten Acridiziniumsalze in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

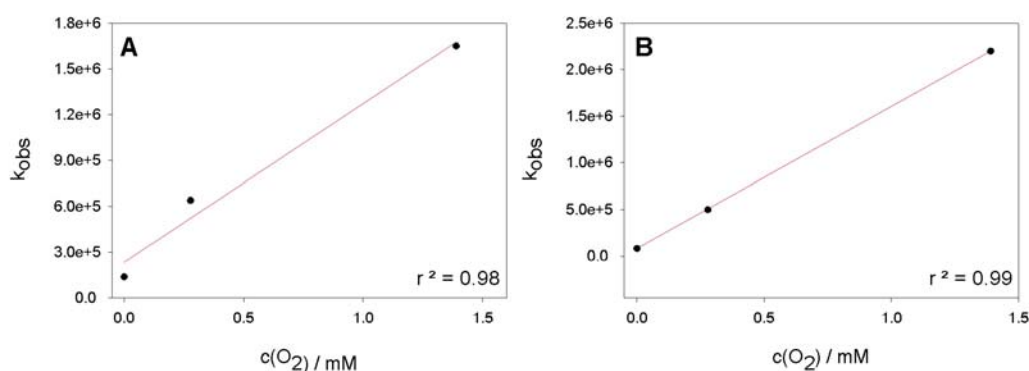


Abbildung 6.8: Abhängigkeit der Lebenszeiten des Bromacridiziniums **9f** (A) und des 9-Aminoacridiziniums **9g** (B) von der Sauerstoffkonzentration der Probelösung

Mit den für die Bestimmung der Transientenlebenszeit hergestellten Probelösungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration wurden die Transientenspektren der genannten Acridiziniumderivate nach *AAV14* aufgenommen (Abbildung 6.9 und 4.14). Da sich die

Acridiziniumderivate **9d** und **9i** während der Messung zersetzen, wurde bei diesen Verbindungen unter ständiger Erneuerung der Probelösung gearbeitet („flow-system“).

Tabelle 6.4. Transientenlebenszeiten ausgewählter Acridiziniumderivate in Abwesenheit und in Gegenwart von DNA

Konz.	1a ^a	1a	1c ^b	1c	1d ^c	1d	1f ^d	1f
		+ DNA		+ DNA		+ DNA		+ DNA
0 ^e	20 μ s	20 μ s	10 μ s	10 μ s	17 μ s	30 μ s	3 μ s	10 μ s
0.3 ^f	-	-	1.5 μ s	1.5 μ s	2 μ s	-	-	-
1.4 ^g	0.5 μ s	0.5 μ s	0.4 μ s	0.4 μ s	0.5 μ s	3 μ s	0.3 μ s	5 μ s

^a $\lambda_{\text{abs}} = 450$ nm. – ^b $\lambda_{\text{abs}} = 450$ nm. – ^c $\lambda_{\text{abs}} = 500$ nm. – ^d $\lambda_{\text{abs}} = 500$ nm. – ^e Unter Stickstoffgasatmosphäre. – ^f Unter atmosphärischen Bedingungen. – ^g Lösung mit Sauerstoff gesättigt

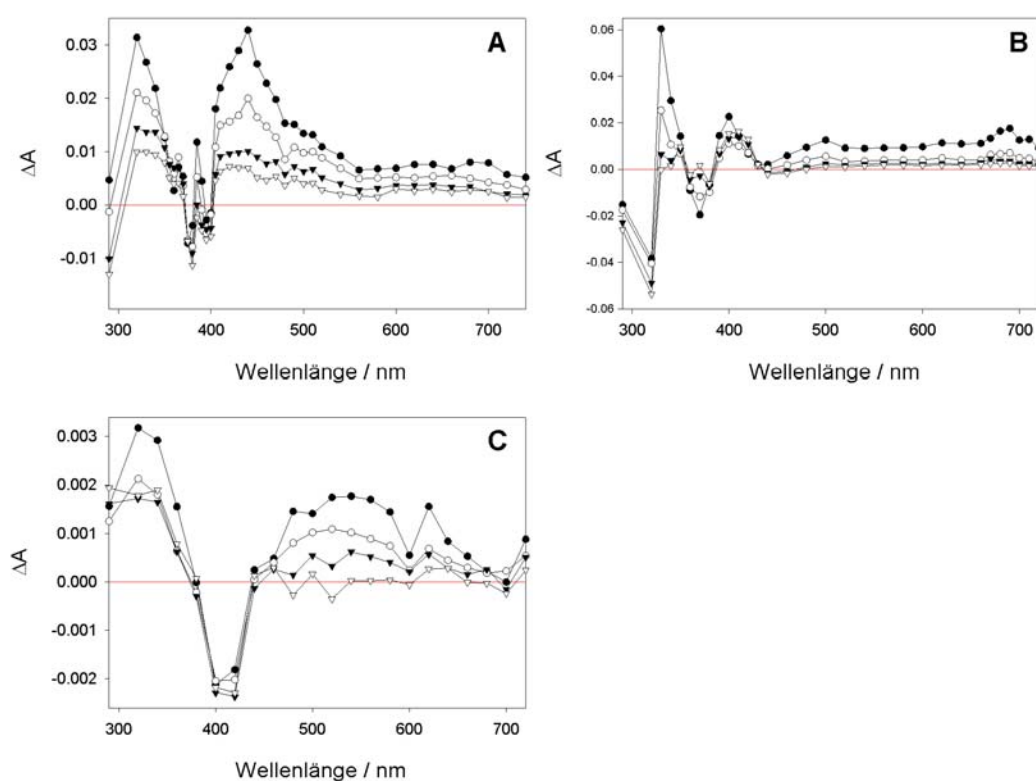


Abbildung 6.9: Triplettspektren der Acridiziniumsalze **9e** (A), **9d** (B) und **9i** (C) in wässriger, stickstoffgesättigter Lösung; (Anregungswellenlänge: 308 nm; Abklingzeiten: A: siehe I-83-1; B: ● 2 μ s, ○ 12 μ s, ▼ 37 μ s, ▽ 47 μ s; C: ● 10 μ s, ○ 47 μ s, ▼ 134 μ s, ▽ 345 μ s)

V18: Bestimmung der Selbstlöschkonstante, k_{sq} (*II-70-1*, *II-71-1*, *II-72-1*)

Es wurden gesättigte wässrige Lösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** hergestellt. Diese Lösungen wurden so verdünnt, dass die Absorption bei der jeweilig benutzten Anregungswellenlänge (**9a** und **9f**: 308 nm, **9g**: 455 nm) ungefähr 0.7 betrug. Diese Lösung

wurde schrittweise zweifach verdünnt, bis die Konzentration der verdünntesten Lösung bei der verwendeten Anregungswellenlänge eine Absorption von ungefähr 0.1 hatte. Die exakten Konzentrationen der jeweils vier erhaltenen Lösungen wurden mit Hilfe der bekannten Extinktionskoeffizienten der Acridiziniumsalze berechnet (Tabelle 6.5).

Tabelle 6.5: Konzentrationen der Probelösungen der Acridiziniumderivate **9a**, **9f** und **9g** zur Bestimmung der Selbstlöschkonstante k_{sq}

Probe	Abs ₃₀₈ 9a	c(9a) ^{a,c}	LZ 9a ^b	Abs ₃₀₈ 9f	c(9f) ^{a,d}	LZ 9f ^b	Abs ₄₅₅ 9g	c(9g) ^{a,e}	LZ 9g ^b
1	0.6685	3.67	1.8	0.6939	7.00	4.8	0.6390	2.17	16
2	0.3282	1.80	3.5	0.3736	3.77	2.4	0.3438	1.17	35
3	0.2199	1.20	6.5	0.2058	2.08	13	0.1714	0.58	51
4	0.1163	0.64	12.3	0.1267	1.28	22	0.0879	0.30	-

^a Konzentration in $M \times 10^{-4}$; ^b Lebenszeit in μs ; ^c $\epsilon_{308} = 2605$, ^d $\epsilon_{308} = 1415$, ^e $\epsilon_{455} = 4213$

Bei einer konstanten Detektionswellenlänge wurde dann von jeder Lösung die Triplettebenszeit nach *AAV13* bestimmt und diese gegen die jeweilige Acridiziniumkonzentration in der Probelösung aufgetragen.

V19: Bestimmung der Triplettenenergie (*II-60-2*, *II-61-1*, *II-61-2*, *II-63-1*, *II-63-2*, *II-64-1*, *II-64-2*, *II-65-1*)

Nach *AAV12* wurden Lösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** in Acetonitril hergestellt. Weiterhin wurden jeweils eine Lösung von 1,3-Cyclohexadien (10.5 M) und Ferrocen (100 mM) in Acetonitril hergestellt. Die Probe sowie die Lösungen der Löscher wurden sorgfältig für die gleiche Zeit mit Stickstoff gesättigt. Bei einer konstanten Detektionswellenlänge wurden die Kinetiken der Acridiziniumsalze bei steigender Konzentration von Ferrocen oder von 1,3-Cyclohexadien verfolgt. Hierbei wurde der Löscher mit Hilfe von Spritzen in die Probelösung gegeben, wodurch gewährleistet wurde, dass bei der Zugabe kein Sauerstoff in die Probe gelangt.

6.4.3.2.3 *Zugabe von DNA und DNA-Komponenten*

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche mit KT-DNA wurde nach *AAV3* eine Lösung von KT-DNA in MILLI-Q Wasser hergestellt und deren Konzentration nach *AAV4* bestimmt. Auch die Stammlösungen der verwendeten DNA-Bestandteile, wurden soweit nicht anders angegeben in MILLI-Q-Wasser gelöst. Die Acridiziniumkonzentration in DNA-haltigen

Probelösung wurde so eingestellt, dass die DNA-enhaltende Probe an der jeweiligen Anregungswellenlänge eine Absorption zwischen 0.1 und 0.7 aufwies.

V20: Triplettlebenszeiten und –spektren in Anwesenheit von KT-DNA

A: Anregungswellenlänge 308 nm (*I-84-1, I-85-1, I-86-1, I-86-2, I-88-1, I-88-2, I-90-1, I-90-2, I-91-1, I-93-1, I-93-2, I-95-1, I-95-2*)

Je nach Intensität des in **V19** beobachteten Triplettsignals wurden gepufferte wässrige Probelösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9d**, **9e**, **9f**, **9g** und **9i** mit 2.5, 5 oder 10 Moläquivalenten KT-DNA hergestellt. Von allen Verbindungen wurden jeweils eine stickstoffgesättigte und eine sauerstoffgesättigte Probe hergestellt.

Bei den halogensubstituierten Acridiziniumderivaten **9e** und **9f** wurden in **V16** große Triplett-Quantenausbeuten beobachtet, weshalb die Proben dieser Verbindungen mit 10 Moläquivalenten DNA versetzt wurden. Die Probelösungen der aminosubstituierten Acridiziniumsalze **9d** und **9i** enthielten jeweils 5 Äquivalente DNA und die Probelösungen des unsubstituierten Acridiziniums **9a** wurden mit 2.5 Äquivalenten DNA versetzt. Vom 9-Aminoacridiziniumbromid **9g** wurden stickstoffgesättigte Probelösungen mit 2.5, 5 und 10 Moläquivalenten DNA hergestellt. Von den beschriebenen Proben wurden die Transientenlebenszeiten und die zugehörigen Spektren nach *AAVI3* und *AAVI4* bestimmt (Tabelle 6.4, Abbildung 6.10).

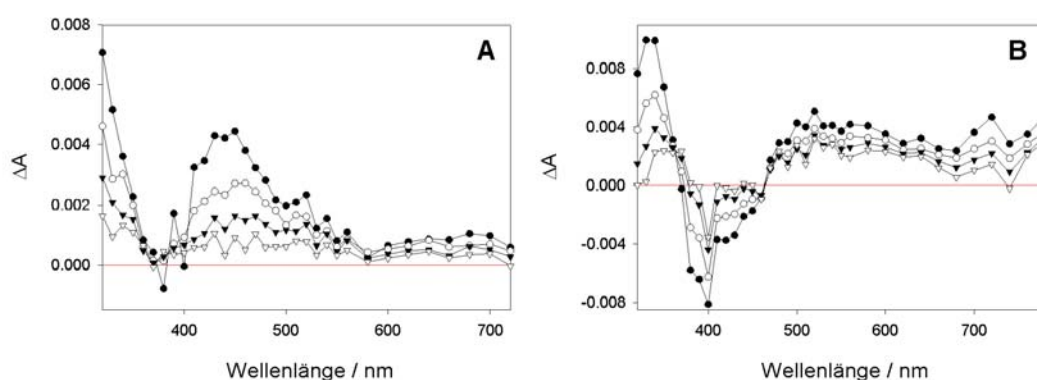


Abbildung 6.10: Triplettspektren der Acridiziniumderivate **9f** (A) und **9g** (B) in Anwesenheit von KT-DNA; (Anregungswellenlänge: 308 nm, A: 10 Äquivalente DNA; Abklingzeiten: ● 3.4 μ s, ○ 11 μ s, ▼ 28 μ s, ▽ 62 μ s B: 5 Äquivalente DNA; Abklingzeiten: ● 11 μ s, ○ 52 μ s, ▼ 147 μ s, ▽ 344 μ s)

B: Variation der Anregungswellenlänge (*II-55-1, II-55-2, II-56-1, II-56-2, II-59-2, II-57-1, II-57-2, II-58-1, II-58-2, II-59-1, II-59-2*)

Es wurden nach *AAVI2* stickstoffgesättigte Probelösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** mit jeweils 5 und 7 Moläquivalenten KT-DNA hergestellt. Die Lösungen der

Acridiziniumderivate **9a** und **9f** wurden bei 420 nm angeregt. Für das 9-Aminoacridizinium (**9g**) wurden Anregungswellenlängen von 445 nm, 455 nm und 465 nm benutzt (Abbildung 6.11).

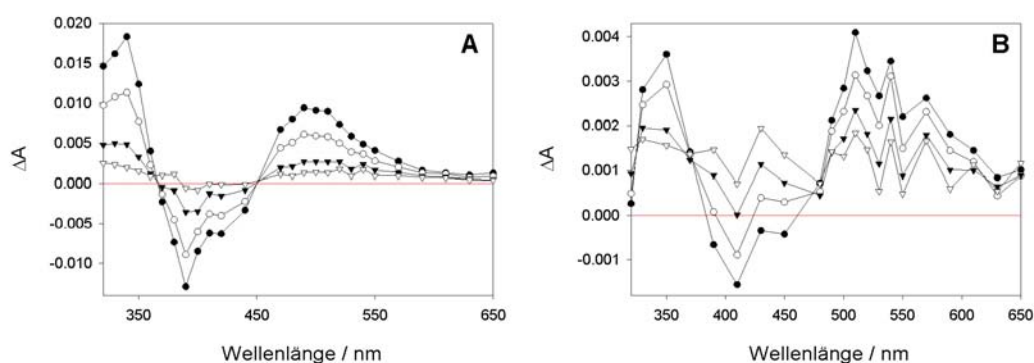


Abbildung 6.11: Absorptionsspektren des 9-Aminoacridiziniumtripletts in Anwesenheit von 5 Äquivalenten KT-DNA bei $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$ (A) und $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$ (B); (Abklingzeiten: ● 11 μs , ○ 53 μs , ▼ 155 μs , ▽ 356 μs)

V21: Kinetische Untersuchung zur Sauerstoffabhängigkeit der Triplettlebenszeiten der Acridiziniumsalze **9f** und **9g** in Anwesenheit von DNA (*II-04-1*, *II-05-1*, *II-06-1*, *II-07-1*, *II-08-1*, *II-09-1*)

Von den Acridiziniumbromiden **9f** und **9g** wurden jeweils drei gepufferte wässrige Lösungen mit 0, 2,5, 5 und 10 Moläquivalenten DNA hergestellt. Die Acridiziniumkonzentration wurde hierbei in allen Proben konstant gehalten. Jeweils eine der Lösungen wurde mit Stickstoff und eine mit Sauerstoff gesättigt. Die dritte wurde unverändert unter atmosphärischen Bedingungen belassen. Die Transientenlebenszeiten und -spektren wurden nach *AAV13* und *AAV14* bestimmt.

V22: Kinetische Untersuchungen bei Zugabe von DNA-Komponenten (*II-11-1*, *II-12-1*, *II-15-1*, *II-16-1*, *II-74-1*, *II-75-1*, *II-76-1*, *II-77-1*, *II-78-1*, *II-79-1*, *II-80-1*, *II-88-1*)

Die Transientenlebenszeiten der Acridiziniumderivate **9a**, **9f** und **9g** wurden bei schrittweiser Zugabe von DNA- bzw. RNA-Komponenten untersucht. Hierfür wurden 100 mM wässrige Lösungen von Desoxyribose, Guanosinmonophosphat (GMP), Ribose-5-Phosphat und eine gesättigte Lösung von Guanosin in Acetonitril hergestellt. Diese Lösungen sowie nach *AAV12* hergestellte gepufferte wässrige Lösungen der Acridiziniumsalze **9a**, **9f** und **9g** wurden gründlich für die gleiche Zeit mit Stickstoff gesättigt. Daraufhin wurden die Transientenlebenszeiten der jeweiligen Acridiziniumsalze bei schrittweiser Zugabe der Lösungen der DNA-Komponenten nach *AAV13* bestimmt. Acridizinium **9a** und 9-Bromacridizinium (**9f**) wurden bei diesen Experimenten bei einer Wellenlänge von 308 nm

angeregt. Für Proben des 9-Aminoacridiziniums **9g** wurden Anregungswellenlängen von 308 nm, 355 nm und 450 nm benutzt.

6.4.3.3 Auffinden reaktiver Intermediate unter anaeroben Bedingungen (V23)

V23: Abfangreaktion von OH-Radikalen bei der Photolyse von **9a** in Wasser¹⁰⁸

Eine Lösung von Acridiziniumtetrafluorborat **9a** (2.67 mg, 10.0 μmol) und Terephthalsäuredinatriumsalz (2.10 mg, 10.0 μmol) in Wasser (10 ml) wurde mit Wasser 1:10 verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung (10^{-4} M) wurden 10 ml entnommen und für 2 h bei Raumtemp. bestrahlt (Rayonet Photoreaktor, $\lambda = 350$ nm). In Zeitintervallen von 20 min wurden jeweils 750 μl aus dem Photolysat entnommen und mit 100 μl wässriger NaOH (2 M) versetzt. Diese Probe wurde fluoreszenzspektroskopisch untersucht ($\lambda_{\text{ex}} = 323$ nm). Die Bildung von Hydroxyterephthalsäure wurde über die charakteristische Emissionsbande des entsprechenden Anions bei $\lambda = 428$ nm verfolgt. Die Zuordnung der Fluoreszenzbande wurde durch den Vergleich mit einer authentischen Probe gewährleistet. In Kontrollexperimenten wurde unter identischen Bedingungen getrennt Terephthalsäure oder **9a** bestrahlt und analog fluoreszenzspektroskopisch analysiert. In beiden Fällen wurde keine Bildung der Hydroxyterephthalsäure beobachtet.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ a) I. Haq, J. Ladbury, *J. Mol. Recogn.* **2000**, *13*, 188. b) P. B. Dervan, R. W. Bürli, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *3*, 688. c) W. D. Wilson in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), IRL Press, Oxford, U. K. **1996**, 329. d) B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 463. e) *Recent advances in DNA binding agents. Symposia in print number 4, Bioorg. Med. Chem.* (Hrsg.: R. S. Coleman), **1995**, *3*, 611. f) T. H. Krug, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 351. g) E. M. Tuite, J. M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **1993**, *21*, 103-124. h) L. M. Hurley, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2027. i) M. J. Waring, *Drugs Exptl. Clin. Res.* **1986**, *12*, 441.
- ² a) *Cancer Chemotherapeutic Reagents* (Hrsg.: W. O. Foye), American Chemical Society, Washington D.C., **1995**; b) *Nucleic Acid targeted Drug design* (Hrsg.: C. L. Probst, T. L. Perun), Marcel Dekker, New York, **1992**.
- ³ a) C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109. b) B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171. c) I. E. Kochevar, D. D. Dunn in *Bioorganic Photochemistry*, (Hrsg.: H. Morrison), John Wiley and Sons, New York, 1990, S. 273.
- ⁴ a) N. Dardare, M. S. Platz, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 561. b) S. J. Wagner, A. Skripchenko, D. Robinette, J. W. Foley, L. Cincotta, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 343.
- ⁵ H. Morrison, T. Mohammad, R. Kurukulasuriya, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 245.
- ⁶ I. E. Kochevar, C. Garcia, N. E. Geactinov, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 692.
- ⁷ a) G. Canti, A. DeSimone, M. Korbelik, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 79. b) T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889.
- ⁸ a) L. S. Lermann, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18. b) L. S. Lerman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1963**, *49*, 94.
- ⁹ *DNA and RNA binders*, (Hrsg.: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- ¹⁰ S. K. Kim, B. Norden, *FEBS Lett.* **1993**, *315*, 61.
- ¹¹ B. Norden, T. Kurucsev, *J. Mol. Recognition* **1994**, *7*, 141.
- ¹² a) J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 5723. b) J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Biochemistry* **1989**, *27*, 8088.

- 13 C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 513.
- 14 a) E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 273. b) D. Suh, J. B. Chaires, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 723.
- 15 a) A. Molina, J. J. Vaquero, J. L. Garcia-Navio, J. Alvarez-Builla, B. de Pascual-Teresa, F. Gago, M. M. Rodrigo, M. Ballasteros, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5587. b) A. Molina, J. J. Vaquero, J. L. Garcia-Navio, J. Alvarez-Builla, B. de Pascual-Teresa, M. M. Rodrigo, O. Castano, J. L. de Andres, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1453. c) J. Pastor, J. G. Siro, J. L. Garcia-Navio, J. J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, F. Gago, B. de Pascual-Teresa, M. Pastor, M. M. Rodrigo, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5476.
- 16 W. D. Wilson, A. N. Gough, J. J. Doyle, M. W. Davdson, *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 1261.
- 17 B. Nordén, M. Kubista, T. Kurucsev, *Q. Rev. Biophys.* **1992**, 25, 51.
- 18 A. Wada, S. Kozawa, *J. Polymer Sci. Part A* **1964**, 2, 853.
- 19 G. Löber, *J. Luminescence* **1981**, 22, 221.
- 20 L. Kittler, G. Löber, F. A. Gollmick, H. J. Berg, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, 116, 503.
- 21 C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 659.
- 22 J. Cadet, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, S. Raoul, J.-L. Ravanat, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7403.
- 23 G. W. Buchko, J. Cadet, J.-L. Ravanat, P. Labataille, *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, 63, 669.
- 24 H. Kasai, Z. Yamaizumi, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9692.
- 25 R. Bonnet, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19.
- 26 R. A. Floyd, M. S. West, K. L. Eneff, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 273, 106.
- 27 J. Cadet, C. Decaroroz, S. Y. Wang, W. R. Midden, *Isr. J. Chem.* **1983**, 23, 420.
- 28 D. T. Croke, L. Perrouault, M. A. Sari, J.-B. Battioni, D. Masuy, C. Helene, T. Le Doan, *J. Photochem. Photobiol.* **1993**, 18, 41.
- 29 C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6439.
- 30 S. Marquardt, Dissertation, Universität Würzburg **2002**.
- 31 C. Walling, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 125.
- 32 N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, 20, 203.
- 33 a) W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1089. b) D. Sy, C. Savoye, M. Begusova, V. Michalik, M. Charlier, M. Spothem-Maurizot, *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, 72, 147.
- 34 A. Dussy, E. Meggers, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7399.

- 35 B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, M. Petretta, U. Schwitter, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 367.
- 36 R. J. Wagner, J. E. v. Lier, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2235.
- 37 J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1997**, 387, 202.
- 38 T. Takahashi, H. Tanaka, A. Matsuda, T. Doi, H. Yamada, T. Matsumoto, D. Sasaki, Y. Sugiura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3303. b) K. C. Nicolaou, B. M. Smith, J. Pastor, Y. Watanabe, D. S. Weinstein, *Synlett* **1997**, 401. c) K. M. Depew, S. M. Zeman, S. H. Boyer, D. J. Denhardt, N. Ikemoto, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 108, 2972.
- 39 a) Y. Xiong, L. N. Ji, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185/186, 711. b) K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2777.
- 40 J.-B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87.
- 41 E. Tuite, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7548.
- 42 a) R. W. Armstrong, T. Kurucsev, U. P. Strauss, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 3174. b) Y. Kubota, Y. Fujisaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, 50, 297.
- 43 B. Norden, F. Tjerneld, *Biopolymers* **1982**, 21, 1713.
- 44 I. Saito, K. Inoue, T. Matsuura, *Photochem. Photobiol.* **1975**, 21, 27.
- 45 J. Piette, C.-M. Calberg-Bacq, A. van de Vorst, *Photochem. Photobiol.* **1981**, 33, 325.
- 46 H. Ihmels, B. Engels, K. Faulhaber, C. Lennartz, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 2854.
- 47 C. K. Bradsher, J. C. Parham, *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 83.
- 48 R. Lui, P. Zhang, T. Gan, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7447.
- 49 K. Wissel, Bericht F-Praktikum, Universität Würzburg **2000**.
- 50 W.-K. Gries, E. Günther, S. Hünig, *Liebigs Ann.* **1991**, 1021.
- 51 P. Suppan. N. Ghoneim, *Solvatochromism*, The Royal Society of Chemistry, London, **1997**.
- 52 a) C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2319. b) C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, **1988**.
- 53 Y. Marcus, *J. Solution Chem.* **1984**, 13, 599.
- 54 G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660.
- 55 J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **1974**, 86, 469.
- 56 R. Winter, F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1998**.

- 57 a) H. Ihmels, K. Faulhaber, C. Sturm, G. Bringmann, K. Messer, N. Gabellini, D. Vedaldi, G. Viola, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 505. b) Katja Faulhaber, Zulassungsarbeit zum Ersten Staatsexamen.
- 58 Siehe beispielsweise a) D. R. Hare, D. E. Wemmer, S.-H. Chou, G. Droubny, *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 319. b) D. T. Breslin, C. Yu, D. Ly, G. B. Schuster, *Biochem.* **1997**, *36*, 10463.
- 59 H. Lanig, M. Hof, G. Bringmann, F. W. Schneider, *Chem. Phys. Letters* **1997**, *272*, 478.
- 60 a) S. E. Webber, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 33. b) A. Sillen and Y. Engelborghs, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 475-486. c) J. H. Clements and S. E. Webber, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 2513-2523.
- 61 C. Bohne, R. W. Redmont, J. C. Scaiano in *Photochemistry in Organized and Constrained Media*, (Hrsg.: V. Ramamurthy), VCH-Publishers, New York, **1991**, S. 79
- 62 a) C. Knapp, J.-P. Lecomte, A. Kirsch-De Mesmaeker, G. Orellana, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, *96*, 67. b) M.-P. Fontaine-Aupart, E. Renault, C. Videlot, F. Tfibel, R. Pansu, M. Charlier, P. Pernot, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 829. c) E. D. A. Stamp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2921. d) B. Armitage, C. Yu, C. Dvados, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9847. e) S. J. Atherton, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1816.
- 63 S. L. Murov, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, New York, **1973**.
- 64 a) B. Meunier, G. Pratviel, J. Bernadou, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1994**, *131*, 933. b) N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **1993**, *20*, 203.
- 65 M. Saran, K. H. Summer, *Free Rad. Res.* **1999**, *31*, 429.
- 66 Y. Miura, E. Torres, C. A. Panetta, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 439.
- 67 R. Grinter, E. Heilbronner, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 2496.
- 68 Kristallographische Untersuchung: Kathrin Wissel, Universität Würzburg, persönliche Mitteilung.
- 69 J. Bendig, J. Wagner, W. Buchwitz, D. Kreysig, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 437.
- 70 a) J. Michl, E. W. Thulstrup, J. H. Eggers, *Ber. Bunsenges.* **1974**, *78*, 575. b) T. Brotin, J. Waluk, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, J. Michl, *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 335.
- 71 R. Lyng, T. Hård, B. Nordén, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1327.
- 72 H. C. Becker, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11947.

- 73 G. Viola, F. Dall'Acqua, N. Gabellini, S. Moro, D. Vedaldi, H. Ihmels, *Chem. Bio. Chem.* **2002**, *3*, 550.
- 74 D. Breslin, C. Yu, D. Ly, G. B. Schuster, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10463.
- 75 W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Mol. Phys.* **1977**, *34*, 1311.
- 76 J. Feigon, W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 450.
- 77 A. D. Favier, M. Blackledge, J. P. Simorre, S. Crouzy, V. Dabouis, A. Gueiffier, D. Marion, J. C. Debouzy, *Biochemistry*. **2001**, *40*, 8717.
- 78 G. Viola, M. Bressanini, N. Gabellini, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, H. Ihmels, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 882.
- 79 J. Rebek, *Angew. Chem.* **1990**, *29*, 261.
- 80 J. Bendig, J. Wagner, W. Buchwitz, D. Kreysig, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 437.
- 81 R. Mitzner, J. Bendig, R. Ziebig, F. Graichen, D. Kreysig, F. Pragst, *J. Prakt. Chem.* **1985**, *327*, 241.
- 82 M. Schmittel, W. Demuth, R. Lal, Universität Siegen, persönliche Mitteilung.
- 83 S. Steenzen and S. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 617.
- 84 C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541.
- 85 G. D. Reid, D. J. Whittaker, M. A. Day, D. A. Turton, V. Kayser, J. M. Kelly, G. S. Beddard, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5518.
- 86 E. R. Blazek, J. G. Peak, M. J. Peak, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 607.
- 87 G. Kaupp, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, 844.
- 88 *Einführung in die Photochemie*, Hrsg.: H. G. O. Becker, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1991**.
- 89 G. J. Kavarnos, *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, VCH, Weinheim, **1993**.
- 90 Siehe beispielsweise: a) B. Epe, D. Ballmaier, W. Adam, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 1625. b) T. Douki, S. Spinelli, J. L. Ravant, J. Cadet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1875, und darin zitierte Literatur.
- 91 Siehe beispielsweise: S. Maatsugo, S. Kawanishi, K. Yamamoto, H. Sugiyama, T. Matsuura, I. Saito, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1343.
- 92 W. Adam, S. Marquardt, C. R. Saha-Möller, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 287.
- 93 M. Goez, M. Schiewek, M. H. O. Musa, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1606.
- 94 C. K. Bradsher, L. E. Beavers, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4812.
- 95 C. K. Bradsher, J. P. Sherer, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 733.

- ⁹⁶ C. K. Bradsher, J. P. Sherer, J. H. Parham, *J. Chem. Eng. Data* **1965**, *10*, 180.
- ⁹⁷ C. K. Bradsher, L. S. Davies, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 4167.
- ⁹⁸ R. Lui, P. Zhang, T. Gan, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7447.
- ⁹⁹ J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991.
- ¹⁰⁰ B. Juskowiak, M. Ohba, M. Sato, S. Takenaka, M. Takagi, H. Kondo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 265.
- ¹⁰¹ D. F. Eaton, *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1108.
- ¹⁰² B. Nordén, *Appl. Spectrosc. Rev.* **1978**, *14*, 157.
- ¹⁰³ a) M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661. b) V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson. Series A* **1993**, *102*, 241.
- ¹⁰⁴ M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J. K. Nicholson, *J. C. Lindon, J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 125.
- ¹⁰⁵ a) M. Hof, J. Schleicher, F. W. Schneider, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1377.
b) P. Buet, F. Kastenholz, E. Grell, G. Käb, A. Häfner, F. W. Schneider, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 5871.
- ¹⁰⁶ Y. Liao, C. Bohne, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 734.
- ¹⁰⁷ C. Yu, C. Bohne, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3847.
- ¹⁰⁸ Diese Versuche wurden von Andrea Hofmann im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit zum Ersten Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien durchgeführt.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katja Theresia Faulhaber
Adresse: Veiter Berg 14; 97294 Unterpleichfeld
Geburtsdatum/-ort: 07.03.1976 in Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1982-1986 Grunds chule Unterpleichfeld
1986-1995 Siebold-Gymnasium Würzburg
05/1995 Abitur

Studium

WS 1995/96 Beginn des Studiums der Biologie und der Chemie (Lehramt an Gymnasien) an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Februar 1998 Zwischenprüfung Biologie
April 1998 Zwischenprüfung Chemie
04/1999 – 10/99 Examensarbeit in Organischer Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Waldemar Adam unter der wissenschaftlichen Anleitung von Dr. Heiko Ihmels
03/2000 Erstes Staatsexamen nach LPO I in Biologie und Chemie
seit SS 1998 Begleitstudium der Geschichte
seit 08/2000 Anfertigung der Dissertation im Arbeitskreis von Dr. H. Ihmels

Auslandsaufenthalte/Praktika

03/1999 und 09/99	Betreuung des Tierphysiologischen Praktikums für Studenten der Biologie und des Lehramts an Gymnasien
02-04/2001 und 07-09/2001	Auslandsaufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit an der University of Victoria, British Columbia, Canada im Arbeitskreis von Prof. Cornelia Bohne
11/2001	Auslandsaufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit an der Universität Padua im Arbeitskreis von Prof. Francesco Dall'Acqua und Prof. Daniela Vedaldi
Sommersemester 2002	Betreuung des Tutoriums zum Organisch Chemischen Praktikum II für Studenten des Lehramts an Gymnasien
Wintersemester 2002/2003	Betreuung des Chemischen Grundpraktikums für Studenten der Medizin

Würzburg, den

(Katja Faulhaber)

Erklärung

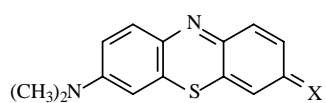
Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Untersuchungen der Wechselwirkungen von anellierten Chinoliziniumsalzen mit DNA“ selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

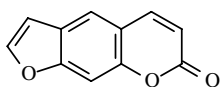
Würzburg, den 18.07.2003

(Katja Faulhaber)

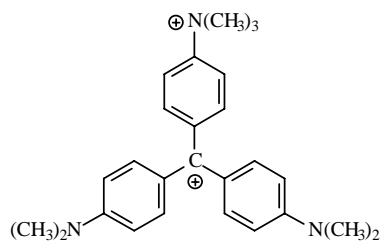


1a: X = N(Me)₂

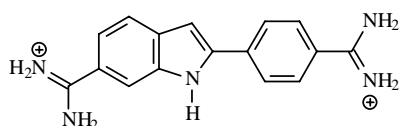
1b: X = O



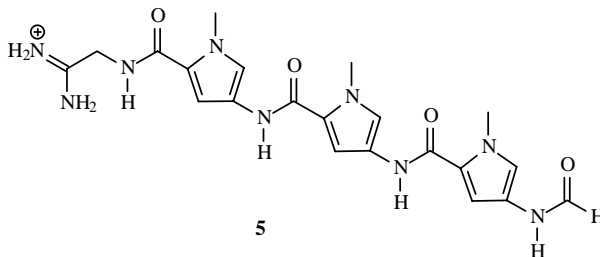
2



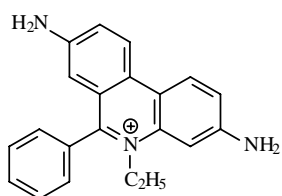
3



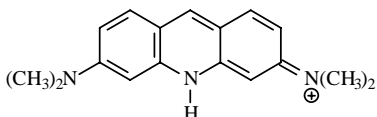
4



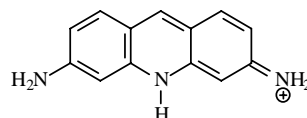
5



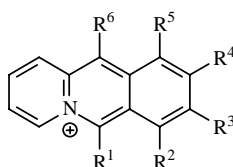
6



7

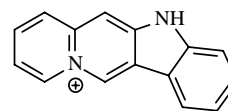


8

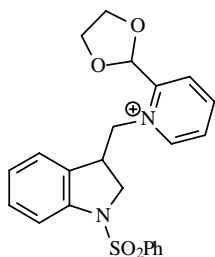


9

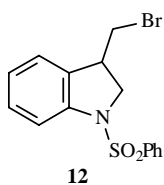
	9a	9b	9c	9d	9e	9f	9g	9h	9i
R ¹	H	NH ₂	H	H	H	H	H	H	H
R ²	H	H	NH ₂	H	H	H	H	H	H
R ³	H	H	H	NH ₂	H	H	H	H	H
R ⁴	H	H	H	H	Cl	Br	NH ₂	H	H
R ⁵	H	H	H	H	H	H	H	NH ₂	H
R ⁶	H	H	H	H	H	H	H	H	NH ₂



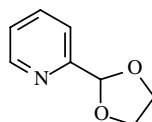
10



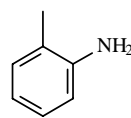
11



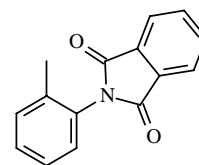
12



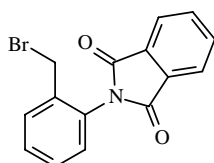
13



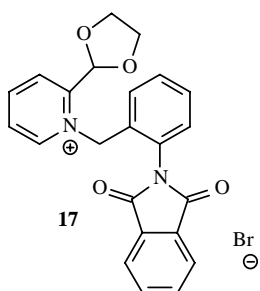
14



15

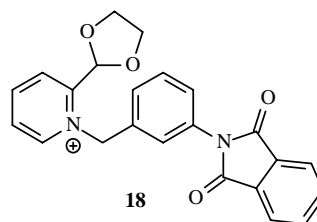


16



17

Br[⊖]



18