

Die C-H-Bindungen der Zuckerbausteine von DNA als Angriffspunkte für chemische Nucleasen und Wirkstoffe**

Geneviève Pratviel, Jean Bernadou* und Bernard Meunier*

Diese Übersicht befaßt sich mit den molekularen Aspekten der DNA-Spaltung durch synthetische chemische Nucleasen (Übergangsmetallkomplexe mit Redox-eigenschaften und Affinität zu DNA) und natürliche Wirkstoffe (cytotoxische Agentien wie Bleomycine und Endiine). Anders als die Desoxyribo-Nucleasen, die den nucleophilen Angriff von Wasser auf das Phosphoratom einer bestimmten Phosphodiester-Einheit katalysieren, oxidieren diese nicht hydrolytisch wirkenden Reagentien zur DNA-Spaltung die Zuckereinheiten, und zwar im allgemeinen durch H-Abstraktion. Je nach der Art und der Struktur des Spaltungsreagens sowie der Art seiner Aktivierung

und seiner Intercalation in DNA wird eine andere der fünf aktivierbaren C-H-Bindungen der Desoxyribose angegriffen. In Folgereaktionen an der ursprünglichen Schädigungsstelle werden Nucleobasen freigesetzt, Zuckerreste oxidiert, Basen-substituierte oxidierte Zucker oder an die endständige Phosphatgruppe gebundene oxidierte Zucker gebildet. In den meisten Fällen verursacht vor allem der Verlust eines Nucleosids oder zumindest eines Teils davon mit dem damit einhergehenden Verlust einer Baseninformation den DNA-Strangbruch. Für beide Arten von DNA-Spaltungsreagentien wird hier der derzeitige Wissensstand hinsichtlich der

Art der Aktivierung und der DNA-Bindung sowie des Mechanismus des oxidativen Desoxyribose-Abbaus vorgestellt. Dank eines genaueren Verständnisses der unterschiedlichen DNA-Spaltungsmechanismen und wegen der Nachfrage nach hocheffizienten und hochspezifischen Reagentien scheint die Entwicklung neuer künstlicher und selektiver DNA-Spaltungsreagentien ein herausforderndes Arbeitsgebiet auf dem Weg zu einem rationalen Design neuartiger Antitumor- und antiviraler Agentien sowie in der Molekularbiologie zu sein.

Stichworte: Bleomycin · DNA-Spaltung · Endiine · Übergangsmetallkomplexe

1. Einleitung

Während der letzten drei Jahrzehnte wurden viele Belege dafür gesammelt, daß der oxidative Abbau von biologischen Makromolekülen eine bedeutende Rolle spielt bei Alterungsphänomenen, chronischen Entzündungen, Ischämie, Krebs, Autoimmunkrankheiten, der Aktivierung der Transkription und – wie man neuerdings weiß – der Auslösung der HIV-Expression^[1, 2]. Lebende Organismen nutzen sowohl nichtenzymatische Systeme wie Vitamine [α-Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) oder β-Carotin (Vitamin A)] als auch enzymatische Systeme wie Superoxid-Dismutases, Glutathion-Peroxidase und Katalase^[2], um sich gegen oxidierende Einwirkungen („oxidativen Stress“) zu schützen.

In den vergangenen zwanzig Jahren sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen, die die chemischen und biochemischen Aspekte der durch oxidativen Stress hervorgerufenen Schädigung von Zellbestandteilen (DNA, Proteinen, Lipiden und

Kohlenhydraten beschreiben. Das aerobe Leben kann als ein hochorganisiertes System betrachtet werden, das einer oxidativen Schädigung durch Eliminierung der Oxidantien und/oder Reparatur der geschädigten Makromoleküle entgegenwirkt. Die Reparatur von DNA durch Reparaturenzyme kann auf mehrere Arten erfolgen: durch Nucleotid- oder Basenexcision, Behebung von Fehlpaarungen oder SOS-Antwort^[3]. Eine oxidative Schädigung der DNA läßt sich auf folgende Arten auslösen: durch ionisierende Strahlung^[4], durch Photooxidation (mit UV- oder sichtbarem Licht, mit oder ohne Photosensibilisator)^[5], durch Hydroperoxide, die durch Spuren von Übergangsmetallsalzen aktiviert sind^[6], durch Hydroxyl-Radikale^[7] oder durch eine Vielzahl anderer Oxidantien (eine neuere Übersicht über den oxidativen DNA-Abbau ist in Zitat [8] genannt). Unter die zuletzt genannte Kategorie fallen Wirkstoffe wie Bleomycin, cytotoxische Substanzen mit einer Endiin-Gruppierung und chemische Nucleasen, die überwiegend auf redoxaktive Übergangsmetallkomplexe zurückzuführen sind (neuere Übersichtsartikel zu diesem Thema sind in Zitat [9] aufgelistet). Eine Schädigung der DNA kann entweder an den Nucleobasen oder an den Zuckerbausteinen erfolgen. Es konnten mehr als zwanzig als Folge einer oxidativen Schädigung modifizierte Purin- und Pyrimidinbasen identifiziert werden^[10]. Derartige Basenmodifikationen bedrohen die Unversehrtheit des Genoms und sind der

[*] Prof. Dr. J. Bernadou, Dr. B. Meunier, Dr. G. Pratviel
Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse cedex (Frankreich)
Telefax: Int. + 61 55 30 03

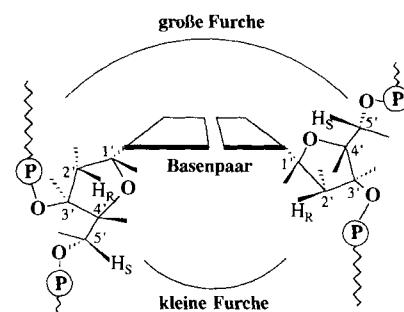
[**] Die in dieser Übersicht verwendeten Abkürzungen sind am Schluß des Haupttextes zusammengefaßt.

Ursprung lethaler Effekte oder von DNA-Mutationen. Eine Schädigung der Desoxyribose ruft dagegen den Verlust einer Baseninformation und/oder den Bruch eines DNA-Strangs hervor. Dies kann ebenfalls lethale Folgen haben, und zwar besonders in den Fällen, in denen die Oxidation zu einem Doppelstrangbruch (DSB), d. h. zu benachbarten Einzelstrangbrüchen (SSBs) führt.

Wir zeigen hier, daß viele stark cytotoxische Verbindungen und chemische Nucleasen in der Lage sind, durch die Oxidation von Zuckerbausteinen in beiden Strängen von B-DNA (ein Lehrbuch über DNA-Strukturen findet sich unter Zitat [11]) Doppelstrangbrüche auszulösen. All diese Zuckerabbau-Prozesse werden durch H-Abstraktionen ausgelöst, denn wegen des aliphatischen Charakters von Desoxyribose ist eine Oxidation durch Elektronenabstraktion nicht günstig. Die räumliche Anordnung der C-H-Bindungen in Desoxyribosen ist genau definiert, und ihre Ausrichtung relativ zu Wirkstoffen oder chemischen Nucleasen wird zusätzlich von der DNA selbst – über DNA-Wirkstoff-Wechselwirkungen – gesteuert. Darüber hinaus ist die Homolyse einer C-H-Bindung auch von den übrigen Substituenten am Kohlenstoffatom abhängig: Für die Abspaltung eines H-Atoms von einem tertiären C-Atom ist der Energieaufwand geringer als für die von einem sekundären C-Atom. Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch die Orientierung von Wirkstoff und Zucker-C-H-Bindungen zueinander. Für Wirkstoffe, die in der kleinen Furche der B-DNA wechselwirken, sind zwei tertiäre C-H-Bindungen leicht zugänglich: C4'-H und C1'-H. Die dritte tertiäre C-H-Bindung (C3'-H) ist nur von der großen Furche aus zugänglich. C2' und C5' sind sekundäre C-Atome, und bei beiden ist jeweils eine C-H-Bindung von der

kleinen Furche (das (*pro-R*)-H-Atom an C2' und das (*pro-S*)-H-Atom an C5'); für die Benennung der prochiralen H-Atome an C5' und C2' siehe Lit.^[12] und die andere von der großen Furche aus zugänglich. In Schema 1 ist die Anordnung der C-H-Bindungen von Desoxyribose relativ zur kleinen Furche dargestellt. Für ein rationales Design neuer Antitumormittel, antiviraler Wirkstoffe und anderer Arzneimittel, die auf DNA-Spaltungsreagentien basieren, ist es unerlässlich, den Mechanismus dieser Aktivierung von Zucker-C-H-Bindungen in DNA auf molekularer Ebene zu verstehen.

Bevor wir uns den molekularen Aspekten der Aktivierung von Desoxyribose-C-H-Bindungen näher zuwenden (Abschnitt 3), wollen wir zunächst die unterschiedlichen Arten der



Schema 1. Von den sieben C-H-Bindungen der Desoxyribose, die mögliche Zielgruppen für einen oxidativen Angriff sind, weisen vier in die kleine Furche (keilförmige Bindungen) und drei in die große Furche (die Indices R und S kennzeichnen die absoluten Konfigurationen *pro-R* bzw. *pro-S* der Wasserstoffatome an C2' und C5').

Geneviève Pratviel, geboren 1959 in Toulouse, Frankreich, studierte Biochemie an der Université Paul Sabatier und promovierte 1986 an derselben Universität bei B. Meunier in Pharmakologie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei A. Sartorelli an der Yale University kehrte sie 1988 als CNRS-Forscherin zu B. Meunier an das Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS zurück. Sie interessiert sich für den Mechanismus der DNA-Spaltung unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung biologisch aktiver Verbindungen und gentechnischer Werkzeuge.



G. Pratviel



J. Bernadou



B. Meunier

Jean Bernadou, geboren 1947 in Villefranche-de-Rouergue, Frankreich, studierte Chemie, Pharmazie (Promotion 1975) und Medizin (Promotion 1985) an der Université Paul Sabatier. 1987 wurde er dort zum Professor für Medizinische Chemie ernannt. 1980 bereits schloß er sich der Gruppe von B. Meunier an, da ihn der Wirkmechanismus von Antitumormitteln interessierte. Derzeit arbeitet er am Einsatz von Metalloporphyrinen in der Biologie, vor allem unter dem in dieser Übersicht diskutierten Aspekt.

Bernard Meunier, geboren 1947 in Poitiers, Frankreich, promovierte 1972 bei R. Corriu an der Université du Montpellier. Danach ging er zu H. Felkin an das Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS in Gif-sur-Yvette und schloß dort eine zweite Promotion ab (1977). Nach einem Postdoc-Jahr an der Oxford University bei K. Prout wechselte er 1979 an das Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, an dem er derzeit als CNRS-Forschungsdirektor tätig ist. Seine Forschungsschwerpunkte sind zur Zeit Metalloporphyrin-katalysierte Oxidationen, Ligninase-Modelle, die Oxidation von Umweltschadstoffen, die DNA-Spaltung durch kationische Manganporphyrine und Anti-HIV-Agentien, die von Metalloporphyrinen abgeleitet sind.

Aktivierung chemischer Nucleasen und Wirkstoffe, die an diesem oxidativen Desoxyribose-Abbau beteiligt sind, sowie ihrer Bindung an DNA beschreiben (Abschnitt 2).

2. Chemische Nucleasen und Wirkstoffe mit der Fähigkeit, DNA durch Oxidation eines Zuckerbausteins zu spalten

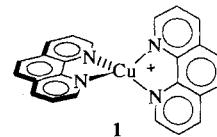
In diesem Abschnitt wollen wir einen Überblick über die nichthydrolytisch wirkenden chemischen Nucleasen und Wirkstoffe geben, die einen Bruch des DNA-Phosphodiester-Rückgrats durch Zuckeroxidation herbeiführen und damit völlig anders wirken als die Desoxyribo-Nucleasen, die DNA spalten, indem sie den nucleophilen Angriff von Wasser auf das Phosphoratom einer bestimmten Phosphodiester-Bindung katalysieren^[13]. In den vergangenen 15 Jahren wurden mehrere redoxaktive Koordinationskomplexe synthetisiert und natürlich vorkommende nucleolytische Substanzen entdeckt, die das Phosphodiester-Rückgrat von Nucleinsäuren unter physiologischen Bedingungen durch oxidativen Angriff auf die Desoxyribose-Bausteine spalten können. Die synthetischen nucleolytischen Substanzen sind Komplexe wie $\text{Cu}(o\text{P})_2$, Fe-EDTA^[4] oder Metalloporphyrine, die den DNA-Strang spalten, nachdem sie entweder durch Reduktionsmittel in Gegenwart von molekularem Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid oder durch Sauerstoffdonoren wie Iodosylbenzol, Magnesiummonoperphthalat oder Kaliummonopersulfat aktiviert worden sind. In einigen Fällen werden derartige DNA-Spaltungen auch durch photoaktivierbare Komplexe ausgelöst (Bipyridyl- oder Phenanthrolinkomplexe von Rhodium, Ruthenium oder Cobalt). Die ausgereiftesten nucleolytisch wirkenden Substanzen sind jedoch Naturstoffe, die aus Stämmen von *Streptomyces* (Bleomycin, Neocarzinostatin), *Micromonospora echinospora* (Calicheamicin) oder *Actinomadura verrucospora* (Esperamicin) isoliert werden konnten. Alle diese chemischen Nucleasen und Wirkstoffe können von anderen in der Nucleinsäure-Chemie verwendeten, DNA-modifizierenden Verbindungen^[14] durch ihre bevorzugt auf Desoxyribose gerichtete Reaktivität unterschieden werden. Als Illustration eines oxidativen Angriffs auf die C2'- und C3'-Positionen von Desoxyribose sind in dieser Übersicht auch einige neuere Informationen über die Resultate einer Bestrahlung von 5-Halogenuracil enthaltenden DNAs und die photolytische Spaltung von DNA durch Rhodiumkomplexe aufgenommen worden. Wir geben eine fast vollständige Beschreibung der Reaktionswege, über die fünf der insgesamt sieben Desoxyribose-C-H-Bindungen [C1'-H, eine der C2'-H-Bindungen ((*pro-R*)-H), C3'-H, C4'-H und eine der C5'-H-Bindungen ((*pro-S*)-H); siehe Schema 1] aktiviert werden können. Die Schemata 14–18 sind jeweils einer dieser fünf Möglichkeiten gewidmet und schildern Einzelheiten der anschließend beschreibbaren Reaktionswege. Sie zeigen auch die Reaktionsprodukte, die isoliert oder chemisch charakterisiert worden sind und die auf molekularer Ebene zur Identifizierung der von den DNA-Spaltungsreagentien angegriffenen Desoxyribose-Zentren beigetragen haben (eine ausgezeichnete Übersicht über die verschiedenen Wege der DNA-Spaltung gibt Lit.^[19b]).

[*] In diesem Beitrag wird auf eine IUPAC-konforme Komplexschreibweise verzichtet.

2.1. Bis(1,10-phenanthrolin)kupfer $\text{Cu}(o\text{P})_2$

2.1.1. Aktivierungsmechanismus

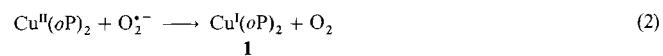
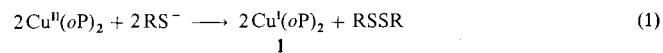
$\text{Cu}(o\text{P})_2$ **1** (Schema 2) war die erste chemische Nuclease mit einer effizienten nucleolytischen Aktivität an doppelsträngiger DNA^[15, 16]. Die Wirksamkeit wird durch das Zusammenspiel von zwei Reaktanten, dem Komplex **1** und Wasserstoffperoxid, erzielt^[15, 17]. Obwohl **1** häufig als Spaltungsreagens eingesetzt wird, ist die exakte Form der die DNA-Spaltung bewirkenden Spezies bisher noch nicht bekannt. Eine weit verbreitete Ansicht ist, daß der hydrophobe, kationische Komplex **1** an DNA bindet und ein Zwischenprodukt bildet, daß mit H_2O_2 unter Bildung eines Hydroxyl-Radikals (HO^\cdot) reagiert. Berichten über den detaillierten chemischen Ablauf der Spaltungsreaktion zufolge wird der DNA-Strang jedoch nicht durch frei bewegliche Hydroxyl-Radikale durchtrennt^[17, 18]. Williams et al.^[19] kamen zu dem Ergebnis, daß die DNA-spaltende Spezies etwas von der Bindungsstelle des Komplexes **1** wegdiffundieren kann, was es unwahrscheinlich erscheinen läßt, daß es sich bei ihr um einen Oxo-Kupfer-Komplex handelt. Ob die reaktive Spezies ein an ein Kupfer-Ion koordiniertes Hydroxyl-Radikal, crypto-OH genannt^[18], ist oder nicht, ist noch eine offene Frage. Die Art der Schädigung von DNA-Basen durch aktiviertes **1** ist typisch für Prozesse, die durch Hydroxyl-Radikale ausgelöst werden^[20], was zu der Vermutung Anlaß gibt, daß zumindest an einem Nebenreaktionsweg freie Hydroxyl-Radikale beteiligt sind.



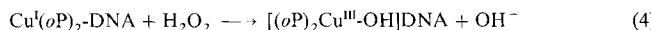
Schema 2. Struktur von Bis(1,10-phenanthrolin)kupfer **1**.

Die Einelektronen-Reduktion des Ausgangskomplexes $\text{Cu}^{II}(o\text{P})_2$ kann durch zugesetzte Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure^[21], Thiole wie Mercaptopropionsäure^[17, 21–23] und 2-Mercaptoethanol^[21] sowie NADH^[24]) oder durch Superoxid erzeugende Systeme (z.B. Xanthin/Xanthin-Oxidase^[17], ^{60}Co - γ -Strahlung) erzielt werden. Durch Einelektronen-Reduktionsmittel wie das Superoxid-Ion und Thiole wird $\text{Cu}^{II}(o\text{P})_2$ direkt reduziert, während mit Zweielektronen-Reduktionsmittel wie NADH vielstufige Reaktionen ablaufen, in denen Superoxid eine zentrale Rolle spielt^[24]. H_2O_2 kann entweder zugesetzt oder in situ durch spontane Disproportionierung des Superoxid-Ions erzeugt werden, das durch Oxidation des Kupfer(I)-Komplexes mit molekularem Sauerstoff, durch ^{60}Co - γ -Bestrahlung von Wasser oder über Xanthin/Xanthin-Oxidase entsteht^[17]. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid läuft die DNA-Spaltung unter anaeroben Bedingungen mit derselben Geschwindigkeit ab wie unter aeroben Bedingungen^[17]. In Abwesenheit von Wasserstoffperoxid wird Sauerstoff benötigt, der jedoch ausschließlich als Vorstufe für Wasserstoffperoxid in der durch $\text{Cu}^{II}(o\text{P})_2$ katalysierten Oxidation von Thiol dient^[17].

Wie Kinetikmessungen gezeigt haben, liegt der Nuclease-Aktivität von $\text{Cu}(o\text{P})_2$ ein strukturierter Mechanismus zugrunde: Frei bewegliches $\text{Cu}^{II}(o\text{P})_2$ wird zunächst zum Cu^I -Komplex reduziert [Gl. (1) oder (2)], der reversibel an DNA bindet [Gl. (3)]



und dort durch Wasserstoffperoxid unter Bildung der die DNA-Spaltung bewirkenden Spezies oxidiert wird^[25] [Gl. (4)].



1 selbst kann ebenfalls an DNA binden, doch die direkte Reduktion des $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{oP})_2$ -DNA-Komplexes durch O_2^- ist sehr langsam und daher zu vernachlässigen^[26].

2.1.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

Die in Gegenwart von **1** erhaltenen DNA-Spaltprodukte sind in Einklang mit einer Bindung der reaktiven Spezies in der kleinen Spalte einer rechtshändigen Doppelhelix. Die Reaktivität von $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{oP})_2$ in der kleinen Spalte der DNA^[27] konnte auch durch Footprinting-Untersuchungen an Netropsin- und EcoRI-Dodecamer-Komplexen bestätigt werden. Diese Komplexe werden durch $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{oP})_2$ oxidativ abgebaut (Netropsin bindet in der kleinen, EcoRI in der großen Furche^[15b, 28]). Die Bindung des Spaltungsreagens in der kleinen Furche wird auch durch den Reaktionsmechanismus gestützt, demzufolge die Wasserstoffatome an C1' und C4' der Desoxyribosen, die in der kleinen Furche angesiedelt sind, als Hauptangriffspunkte anzusehen sind^[15b]. Aufgrund der Beobachtung, daß die DNA-Spaltung durch intercalierende Agentien gehemmt wird, hat man zunächst vermutet, daß die Spaltung über einen Intercalationskomplex ablaufen könnte^[17]. Die nucleolytische Aktivität von **1** ist sequenzabhängig, aber nicht Nucleotid-spezifisch^[15c, 29]. Die unsubstituierten aromatischen Phenanthrolinliganden von **1** schließen Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen als entscheidende Faktoren für die Spezifität aus^[15e]. Die einzige beobachtete Spezifität ist eine bevorzugte Bindung an 5'-TAT-Triplets in der kleinen Furche, die insbesondere am Desoxyadenosin-Zucker gespalten wurden. Verwandte Sequenzen wie TGT, TAAT, TAGPyr und CAGT waren mäßig bevorzugt, während CAT- und TAC- sowie Polypurin- und Polypyrimidin-Sequenzen weniger häufig gespalten wurden^[30, 31]. Die Bevorzugung von TAT-Triplets durch **1** könnte teilweise mit sequenz-abhängigen Änderungen der B-Konformation von DNA zusammenhängen^[31]. Stapelwechselwirkungen finden bevorzugt mit einem Propeller-artig gedrehten Basenpaar statt. Veränderte Dreh- und Knickwinkel bewirken eine Öffnung der kleinen Furche der DNA an TA-Positionen und erleichtern das Eindringen eines oP-Rings in die Helix, was entweder durch partielle Intercalation oder durch Bindung in der Furche geschehen kann. Wegen der tetraedrischen Struktur von **1** ist eine vollständige Intercalation unmöglich, aber ein Modell, in dem ein Phenanthrolinligand teilweise bei TA eingeschoben ist, scheint plausibel^[32]. Da der Angriff von **1** auf die DNA von einer Bindungsstelle innerhalb der kleinen Furche erfolgt, muß die Spaltungsspezifität des Komplexes durch die Geometrie dieses Strukturbereichs bestimmt sein. Veränderungen durch Mutationen erzeugen möglicherweise zusätzliche Bindungsstellen, die mit Hilfe von **1** nachgewiesen werden können, während beispielsweise DNase I wesentliche Veränderungen, die mit einem derartigen Basenaustausch einhergehen, nicht anzeigt^[15b, 33].

Einsträngige DNA ist ein schlechtes Substrat für **1**^[17, 22, 33a]. Die Spaltung doppelsträngiger DNA durch **1** wird durch zwei aufeinanderfolgende Einzelstrangbrüche erzielt. Doppelstrangbrüche konnten mit einer halbsynthetischen Nuclease, die durch chemische Verknüpfung von **1** mit dem *E. coli-trp*-Repressor hergestellt wurde, ausgelöst werden^[34].

1 RNA kann ebenfalls als Substrat für die Nuclease durch **1** dienen. Der Kupferkomplex greift eher Einzelstrangschleifen als die in RNA-Strukturen vorhandenen doppelsträngigen A-Strukturen an. Der genaue Mechanismus der RNA-Spaltung ist jedoch noch nicht aufgeklärt^[35].

Das $1/\text{H}_2\text{O}_2$ -System spaltet die A-, B- und Z-Formen von DNA mit unterschiedlicher Geschwindigkeit: Am einfachsten ist die Spaltung der B-Form; die A-Form, die aus RNA-DNA-Hybridnen besteht, wird unter vergleichbaren Bedingungen an beiden Strängen etwa dreimal langsamer als B-DNA gespalten, während die linkshändige Z-Struktur, die eine tiefe und enge kleine Furche aufweist, völlig resistent gegenüber dem Abbau durch **1** ist^[15b, 22].

Die Nuclease-Aktivität von **1** kann auf spezifische DNA-Sequenzen gerichtet werden, indem man einen der oP-Liganden mit dem 5'-Ende des komplementären Oligodesoxynucleotids (ODN) verknüpft. Obwohl das oP-ODN nicht so gezielt eine einzige Stelle der DNA angreifen kann wie die Restriktionsenzyme, liefert die durch Hybridisierung gelenkte Nuclease-Aktivität eine Methode zur Analyse von einsträngiger DNA^[23, 36, 37] und RNA^[38]. Es wurden auch oP-ODNs entworfen, die durch Bildung einer Dreifachhelix spezifische Sequenzen auf doppelsträngiger DNA selektiv erkennen und spalten können^[37, 39]. Die Sequenz-gerichtete Spaltung von Nucleinsäuren durch Konjugate aus Phenanthrolinkomplexen und Oligo- α -desoxy-nucleotiden, die gegen Nucleasen resistent sind, könnte dazu verwendet werden, die Genexpression *in vivo* zu regulieren^[40].

Die Nucleolyse-Aktivität von **1** ist auch mit DNA-bindenden Proteinen als Trägersubstanzen auf spezifische Angriffspunkte gelenkt worden, mit dem Ziel, ortsspezifische Nucleasen zu entwickeln, die für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNA-bindenden Proteinen und Restriktionsfragmenten und für die Isolierung von langen DNA-Fragmenten zur Sequenzierung, Clonierung oder Chromosomen-Kartierung verwendet werden können^[34, 41]. Diese Strategie wurde auf das Design chemischer Nucleasen angewendet, die auf *tat* basieren und für die ortsspezifische Spaltung von HIV-TAR-RNA genutzt werden könnten^[42]. 1993 wurde die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch an RNA gebundenes **1** beschrieben^[43]. Konjugate aus 1,10-Phenanthrolin und einem in der kleinen Furche bindenden Farbstoff wie Hoechst 33258 wurden dazu verwendet, die Reaktivität zu erhöhen oder die Selektivität zu modifizieren^[44].

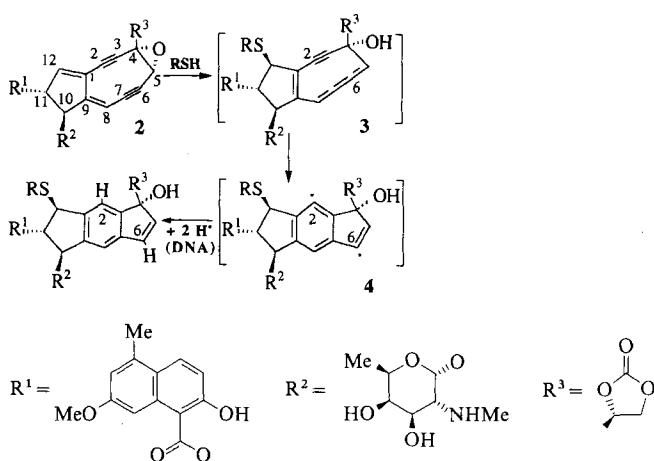
Eine effiziente Spaltung von DNA konnte mit einem zu **1** verwandten, chiralen System erzielt werden. In diesem System ist Kupfer(II) an eine Chelatbindungsstelle eines multifunktionalen Liganden (4',7'-Phenanthrolino[5',6':5,6]pyrazin) gebunden, während die zweite Bindungsstelle durch $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2$ besetzt ist. Die Spaltungsaktivität ist fast ausschließlich auf das *A*-Isomer dieses chiralen Dimetallkomplexes beschränkt^[45].

Die Reaktionsmechanismen der DNA-Spaltung mit **1** werden ausführlich in den Abschnitten 3.1.1 und 3.4.1 erörtert.

2.2. Endiin-Cytostatica/Antibiotica

2.2.1. Aktivierungsmechanismus

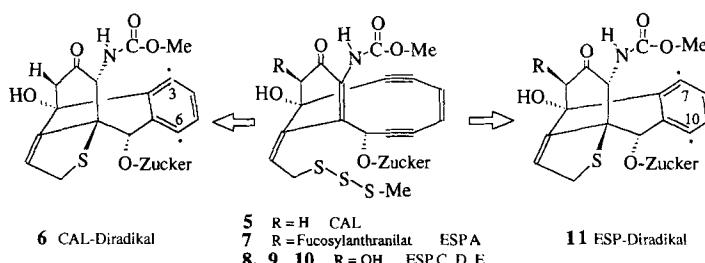
Natürlich vorkommende Endiin-Cytostatica/Antibiotica sind Prodrugs, die zu aktiven Diradikalen metabolisiert werden, welche in Gegenwart von Thiolen Wasserstoffatome von DNA-Zuckerbausteinen abstrahieren können^[9g]. Das zu diesen Endiin-Antibiotica zählende Neocarzinostatin (NCS) ist von Goldberg et al. gründlich studiert worden, und der am besten dokumentierte Reaktionsmechanismus einer DNA-Spaltung ist der dieses Antibioticums^[9d]. Neocarzinostatin bewirkt die DNA-Spaltung durch ein Nichtprotein-Chromophor, das NCS-chrom 2 (Schema 3). Die nucleophile Addition eines Thiols (oder Hydrids) an die C12-Position von **2** (\rightarrow **3**) löst eine Umlagerung



Schema 3. Die Bildung des Diradikals **4** aus **2** in Gegenwart eines Thiols und seine Weiterreaktion durch Abstraktion von zwei Wasserstoffatomen aus DNA-Desoxyriboson.

(Cycloaromatisierung) zum Indacen-Diradikal **4** mit C2 und C6 als Radikalzentren aus. Dieses Diradikal kann ein oder zwei Wasserstoffatome vom DNA-Rückgrat abstrahieren, was einen SSB bzw. einen DSB zur Folge hat. Das für die Aktivierung von **2** notwendige Thiol muß stark reduzierend wirken sowie eine gute Affinität zu DNA und/oder eine hohe Nucleophilie aufweisen, damit eine optimale Aktivierung gewährleistet ist^[4g].

Die anderen in den Schemata 4 und 5 abgebildeten Naturstoffe – Calicheamicin γ_1 **5** (CAL; für diesen Naturstoff wurde kürzlich eine Totalsynthese beschrieben^[47]), die Esperamicine **7–10** (ESP A, C, D, E) und Dynemicin **12** (DYN) enthalten eine Endiin-Einheit als Teil ihrer Gesamtstruktur, die außerdem ein an



Schema 4. Die Strukturen von CAL, ESP A, C, D, E und ihren diradikalischen Cyclisierungsprodukten (bezüglich der Numerierungen siehe Lit. [9f, 57]).

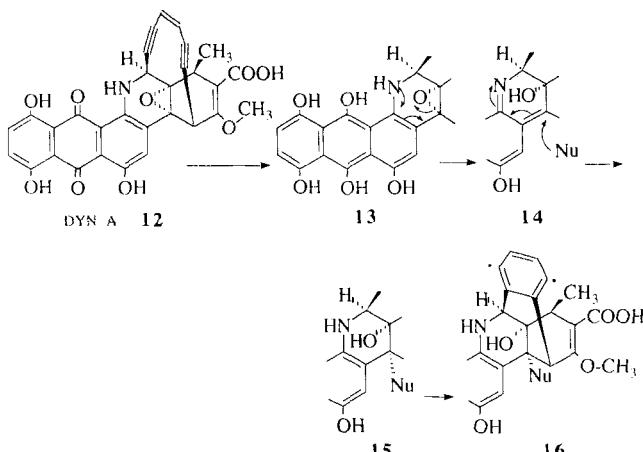
DNA bindendes Strukturelement (einen glycosylierten Aminozucker und/oder ein intercalierendes Strukturelement) und eine Startfunktion (eine Methyltrisulfid-Einheit bei CAL und ESP, eine Chinon-Einheit bei DYN) aufweist. Die Reduktion dieser Naturstoffe mit Thiolen löst eine Cycloaromatisierung (Bergmann-Typ^[48]; siehe Schemata 3–5) der Endiin-Einheit zu einem Diradikal aus, das die Ursache für die DNA-schädigenden Eigenschaften^[9g, 49] und die Cytotoxizität dieser Wirkstoffe ist. Mit aktiviertem CAL oder ESP bildet das reduzierende Thiol kein kovalentes Addukt, es entstehen vielmehr die 1,4-Phenyl-Diradikale **6** bzw. **11**.

Durch Endiine ausgelöste DNA-Spaltungen benötigen Sauerstoff, aber es sind weder reduzierte Formen von O_2 (wie das Superoxid-Ion, Wasserstoffperoxid oder ein freies Hydroxyl-Radikal) noch Übergangsmetalle an der DNA-Schädigung beteiligt (**2**^[50], **5**^[51]). In Gegenwart von DNA, Sulfhydrylen und O_2 durchlaufen die Endiine nur *einen* Oxidations-Reduktions-Cyclus, der zur DNA-Spaltung führt und den Wirkstoff in inaktiver Form ohne weiteres Redoxvermögen zurückläßt. Für den ersten Reaktionsschritt, die Erzeugung des Diradikals, das H-Radikale von der DNA abstrahiert, wird kein Sauerstoff benötigt. Der nächste Schritt, die DNA-Spaltung, ist – im Falle von **2** – mit der Aufnahme eines Äquivalents Sauerstoff pro Mol Wirkstoff (das DNA-Radikal reagiert mit O_2) verknüpft. Danach wird mindestens ein Äquivalent an Reduktionsmittel aufgenommen. Unter anaeroben Bedingungen kann Misonidazol molekularen Sauerstoff im Spaltungsschritt ersetzen (das DNA-Radikal wird durch Misonidazol abgefangen), und pro Mol **2** wird ein Äquivalent Thiol verbraucht^[52]. Bei anderen Endiinen ist der Bedarf an O_2 und Reduktionsmitteln nicht quantifiziert worden.

Bei **2** konnte gezeigt werden, daß das C6-Radikalzentrum der aktivierten Form **4** (siehe Schema 3) die dominierende H-Abstraktion (C5'-Chemie) durchführt^[53]. Das verbleibende C2-Radikalzentrum des Wirkstoffs reagiert entweder bei geeigneten DNA-Sequenzen auf der anderen Seite der kleinen Furche mit dem zweiten DNA-Strang (C1', C4'- oder C5'-Chemie) oder wird durch andere Komponenten abgefangen, so daß die DNA auf der Stufe des Einzelstrangbruchs verbleibt. Selektives Abfangen des C2-Radikalzentrums durch Aufnahme von H-Radikalen aus dem Lösungsmittel oder der gebundenen Thioleinheit verwandelt **4** in eine monofunktionelle Spezies^[54]. Dies könnte das für **2** beobachtete Vorherrschen von SSBs (80%) erklären.

Im Fall von CAL **5** (siehe Schema 4) bestehen 95 % der DNA-Schädigung aus Doppelstrangbrüchen^[55]. Die in die C3- und C6-Positionen des CAL-Diradikals **6** eingebauten Wasserstoffatome stammen ausschließlich aus DNA^[12a, 56]. Bei den Esperamicinen **7–10** (siehe Schema 4) sind die Radikalzentren der reaktiven Spezies **11** die Positionen C7 und C10^[9g, 57].

Dynemicin A **12** (Schema 5) kann beispielsweise durch die Reduktion der Chinon-Einheit zu Verbindung **13** aktiviert werden; die Öffnung des Epoxidrings ergibt **14**, und der nachfolgende Angriff eines Nucleophils führt zu **15**. Dieses wegen der Öffnung des Epoxidrings sterisch nicht mehr belastete aktivierte Zwischenprodukt reagiert leicht in einer Cycloaromatisierung zum Diradikal **16**, das die klassische DNA-H-Abstraktion bewirkt^[9g, 58]. Bisher wurden keine detaillierten Untersuchungen zur DNA-H-Abstraktion durch DYN **12** veröffentlicht.



Schema 5. Ein Vorschlag für die Bildung des Diradikals 16 aus DYN A 12 durch Bioreduktion (Nu = Nucleophil).

Daneben ist auch eine photochemische (2 und ESP 7–10^[59], DYN 12^[60]), radiolytische (2^[61]) oder thermische Aktivierung (ESP^[62]) möglich, die ebenfalls zur DNA-Spaltung führt.

2.2.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

2.2.2.1. NCS-chrom 2

Die starke Wechselwirkung von 2 mit DNA (Affinitätskonstante ca. $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) und die genaue Positionierung seiner aktivierte Form sind der Schlüssel für seine Spaltungseffizienz. 2 bindet an DNA durch Intercalation seiner Naphthoat-Einheit und externe Wechselwirkung seines protonierten Aminozuckerrests mit Phosphatgruppen. Die Diradikal-Einheit der aktivierte Form befindet sich in der kleinen Furche der DNA^[63], und der intercalierte Teil des Wirkstoffs erhöht den Abstand zwischen zwei Basenpaaren im Wechselwirkungsbereich. Dieses Faktum ist wichtig, wenn man für mehrere Endiin-Wirkstoffe die Verschiebung der Bruchstellen bei Doppelstrangbrüchen vergleicht. Mit 2 finden Doppelstrangbrüche im Abstand von zwei Basenpaaren (bps) zur kleinen Furche statt, während der Abstand bei anderen Endiin-Wirkstoffen drei bps beträgt. Einzelstrangbrüche erfolgen hauptsächlich an T-Resten ($T \gg A \gg C > G$), und die Basenspezifität ist ausgeprägter als die Sequenzspezifität^[64]. Doppelstrangbrüche sind dagegen sequenzspezifisch, wobei 5'-AGC und 5'-AGT die Hauptbruchstellen sind. Bei Doppelstrangbrüchen werden die einzelnen Stränge nach unterschiedlichen Mechanismen angegriffen: An einem Strang wird H5' durch das C6-Radikalzentrum abstrahiert, und bei einigen speziellen Sequenzen ist das C2-Radikalzentrum passend lokalisiert, um das zweite Wasserstoffatom vom anderen Strang zu abstrahieren, wobei es bevorzugt eine C1'- oder C4'-Chemie auslöst. Alle Einzelstrangbrüche erfolgen durch C5'-Chemie, und bei allen bisher untersuchten Doppelstrangbrüchen wird zumindest ein Strang als Folge einer H5'-Abstraktion gespalten.

Die Menge und Art der Spaltprodukte ändert sich in Abhängigkeit davon, welches Thiol bei der DNA-Spaltung mit 2 verwendet wird^[46, 64]. Das Thiol nimmt über eine kovalente Bindung an der nucleophilen Aktivierung von 2 teil und kann daher die Wechselwirkung des Wirkstoffs mit der kleinen Furche beeinflussen und so das Verhältnis von C4'- zu C5'-Chemie ebenso wie

den absoluten Anteil an C4'-Chemie an einigen Resten verändern^[64]. Die Art des Thiols ist außerdem wichtig für das Verhältnis von DSBs und SSBs^[46]. Ein bemerkenswertes Beispiel ist das Auslösen von direkten Doppelstrangbrüchen durch Glutathion. Es konnte gezeigt werden, daß Glutathion (GSH) ein tieferes Eindringen des Wirkstoffs in die kleine Furche der DNA an 5'-AGC/3'-TCG-Sequenzen bewirkt und damit eine verstärkte Reaktivität am C1'-Atom des Zuckers ermöglicht^[46, 65].

Die Ausrichtung von 2 in der kleinen Furche der DNA ist auch von der lokalen Mikrostruktur des Wechselwirkungsbereichs abhängig. Fehlpaarungen an den Doppelstrang-Bruchstellen oder der Ersatz von Guanin durch Inosin (das keine NH₂-Gruppe aufweist, die in die kleine Furche gerichtet ist) verändern die Zugänglichkeit der C1', C4' oder C5'-Zucker-Kohlenstoffatome der DNA für die Diradikal-Form des Wirkstoffs^[66].

Die Reaktionsmechanismen für die Spaltung mit 2 werden in den Abschnitten 3.1.2, 3.4.2.1 und 3.5.1.1 (C1', C4' bzw. C5'-Chemie) erörtert.

2.2.2.2. Weitere Endiine

Die anderen Endiine lösen Einzelstrangbrüche sowie eine beträchtliche Zahl von Doppelstrangbrüchen aus, die sich aus der einzigartigen Paßform dieser Wirkstoffe ergeben. Die Erzeugung eines Phenyl-Diradikals verursacht gestaffelte Doppelstrang-Bruchstellen, die auf synchrone homolytische H-Abstraktionen aus Desoxyribosen eines Strangpaars zurückzuführen sind. Auch bei dieser Verbindungsklasse wird die DNA in der kleinen Furche angegriffen.

Calicheamicin γ^I: CAL 5 verursacht in einem Plasmid oder in einer Modellverbindung^[55] DNA-Doppelstrangbrüche (zu mehr als 95%), wobei jeder Strang nach einem anderen Mechanismus gespalten wird. Bevorzugte Angriffspunkte sind das in Richtung des 5'-Endes vorletzte Pyrimidin C einer 5'-TCCT-Sequenz und das Nucleotid N, das drei Nucleotide weiter zum 3'-Ende liegt als das gepaarte G in der komplementären Sequenz 3'-NNAGGA^[51].

1992 wurden weitere Sequenzen vorgestellt, an denen eine Spaltung der DNA durch Calicheamicin erfolgen kann: 5'-CTCT, 5'-ACCT, 5'-TTTT^[67a]. CAL benötigt doppelsträngige, helicale DNA am 5'-Ende einer 5'-TCCT-Sequenz, um sich wirkungsvoll an der DNA verankern zu können. Es bindet an die kleine Furche von B-DNA, indem es seine Oligosaccharid-Seitenkette in Richtung des 3'-Endes einer 5'-TCCT-Sequenz ausrichtet. Unter Zitat [9f] ist ein Übersichtsartikel angegeben, der die Wechselwirkungen zwischen CAL und DNA beschreibt. Die Wechselwirkung des Wirkstoffs mit seiner Erkennungssequenz reagiert sehr empfindlich auf Änderungen, so daß vereinfachte oder modifizierte Wirkstoffe sofort ein anderes Spaltvermögen und/oder andere Erkennungsmerkmale aufweisen^[67]. Veränderungen der DNA-Sequenz innerhalb des bevorzugten Bindungsbereichs können die Spaltung ebenfalls beeinflussen^[67b]. Es scheint einen echten Synergismus der beiden Teile des intakten Wirkstoffs (Kohlenhydrat-Bereich und Aglycon) hinsichtlich seines sequenzselektiven Spaltungsvermögens bei doppelsträngiger DNA zu geben. CAL löst am TCCT-Strang C5'-Chemie aus (Abschnitt 3.5.1.2) und am komplementären Strang C4'-Chemie (Abschnitt 3.4.2.2). Möglicherweise ist auch etwas C1'-Chemie an den Doppelstrangbrüchen beteiligt^[55], da jedoch

keine genaueren Befunde vorliegen, wollen wir darauf nicht weiter eingehen.

Esperamicine: Die Esperamicine **7–10** (Schema 4) spalten DNA basenselektiv ($T > C > A > G$), zeigen jedoch trotz struktureller Ähnlichkeiten mit Calicheamicin **5** eine geringere Sequenzselektivität. ESP A **7** ist der einzige Vertreter der ESP-Familie, der Einzelstrangbrüche auslöst. Den Esperamicinen **8–10** fehlt das Fucosylantranilat-Strukturelement, und diese Wirkstoffe führen zu Doppelstrangbrüchen^[68]. Das Vorhandensein von zwei Seitenketten könnte somit die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen durch ESP A erklären, wohingegen offenbar eine geeignete einzelne Seitenkette zu Doppelstrangbrüchen führt (**8–10**). In der ESP-Reihe scheint der Trisaccharidrest für die Spaltungseffizienz sehr wichtig zu sein, denn ESP D **9** und ESP E **10**, denen eine bzw. zwei Zuckereinheiten fehlen, erwiesen sich als weitaus weniger effiziente DNA-Spaltungsreagenzien, obwohl sie dieselbe Sequenzselektivität zeigten^[57, 68a, 69].

Die Bindung von ESP an DNA ist nicht so genau festgelegt wie bei CAL **5** oder NCS-chrom **2**. ESP kann in zwei entgegengesetzten Orientierungen in der kleinen Furche gebunden werden^[57]. Sowohl für die durch ESP C **8** ausgelösten Doppelstrangbrüche als auch für die durch ESP A **7** an denselben Sequenzen ausgelösten Einzelstrangbrüche wurde ein 3'-gestaffeltes, asymmetrisches Spaltungsmuster beobachtet^[57, 68a]. ESP A löst Einzelstrangbrüche ausschließlich durch Angriff auf die C5'-Atome eines der beiden DNA-Stränge aus, während die Doppelstrangbrüche durch ESP C, D oder E nach unterschiedlichen Mechanismen an beiden Strängen verlaufen (zwei unterschiedliche Orientierungsmöglichkeiten des Wirkstoffs an der Angriffsstelle). Die Autoren schlagen vor, daß die H-Abstraktion von Desoxyribose für jedes der beiden Radikalzentren (C7 und C10) des aktivierten Wirkstoffs **11** nach einem eigenen Mechanismus abläuft: C7 würde ein H4'-Atom abstrahieren, C10 dagegen ein H5'-Atom. Da der aktivierte Wirkstoff **11** auf zwei Arten an DNA binden kann, kann ein Radikalzentrum entweder den einen oder den anderen der beiden Stränge angreifen und so die eine oder die andere Chemie in Gang setzen. Man vermutet, daß sich die durch ESP A ausgelösten Einzelstrangbrüche damit erklären lassen, daß die Reaktivität des C7-Radikalzentrums wegen der sterischen Hinderung durch die benachbarte Fucosylantranilat-Gruppe verloren geht, während die des C10-Radikalzentrums erhalten bleibt. Die Mechanismen der DNA-Spaltung durch ESP beinhalten sowohl C4'- als auch C5'-Chemie (siehe Abschnitt 3.4.2.3 bzw. 3.5.1.3).

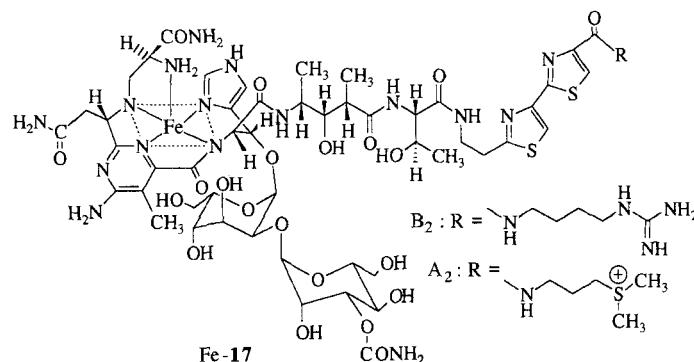
Dynemicine: Man nimmt an, daß die Wechselwirkung dieser Wirkstoffe mit DNA sowohl durch Intercalation als auch durch Bindung in der kleinen Furche erfolgt^[58b]. DYN A **12** verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche, ist aber nicht basenspezifisch. Die Dynemicine greifen bevorzugt Basen an, die auf der 3'-Seite von Purinbasen liegen, z.B. 5'-GC, 5'-GT, 5'-AT und 5'-AG. Sie lösen in den beiden DNA-Strängen im Abstand von drei Basenpaaren (in 3'-Richtung) Strangbrüche aus^[70].

Allgemeine Bemerkungen zu Endiin-Wirkstoffen: Der bifunktionelle Charakter der Endiin-Diradikale macht sie zu leistungsfähigen Reagentien für Doppelstrangbrüche. Die Umwandlung des Diradikals in ein Monoradikal kann auf eine veränderte Positionierung des aktivierten Wirkstoffs oder auf eine sterische Hinderung oder Auslöschung eines der Radikalzentren entweder durch die Fucosylantranilat-Seitenkette (ESP-Familie)

oder durch die Thioleinheit (**2**) zurückgeführt werden. Die Effizienz der Endiin-Wirkstoffe ist wegen der umgebenden Seitenketten somit nicht immer optimal^[55, 57]. Das Radikalzentrum, das nicht dem Einfluß einer solchen Seitenkette unterliegt, löst für gewöhnlich eine C5'-Chemie aus, während das andere Reaktionszentrum mit der C4'-^[19a, 55, 57] oder eventuell auch mit der C1'-^[66, 71] oder C5'-Position^[64] der Desoxyribose reagiert.

2.3. Bleomycine

Die Bleomycine **17** (Schema 6) sind eine von Glycopeptiden abgeleitete Antibiotika-Klasse, die 1966 von Umezawa et al. entdeckt worden ist^[72]. Sie wurden klinisch gegen Nicht-Hodgkin-Lymphome, squamöse Zellkarzinome und Hodentumore

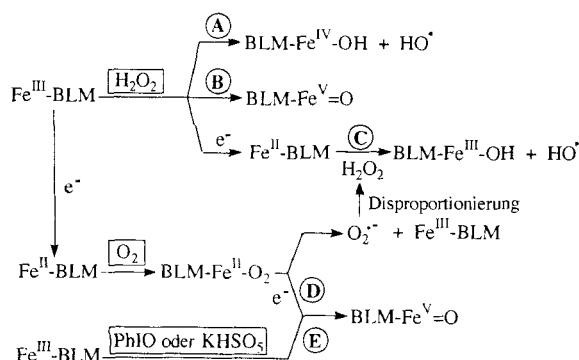


Schema 6. Struktur der Bleomycine A₂ und B₂ und ein Vorschlag für die Chelatisierung von Eisen durch sie.

eingesetzt^[73]. Man nimmt an, daß ihre cytotoxische Wirkung auf Säugetierzellen im Zusammenhang steht mit ihrer Fähigkeit, DNA zu binden und zu spalten^[74]. In neuerer Zeit ist RNA als mögliches Angriffsziel für die durch Bleomycin (BLM) ausgelöste Spaltung in den Vordergrund getreten (für weitere Einzelheiten siehe Abschnitt 3.4.3). Bleomycine weisen drei wesentliche Strukturbereiche auf^[9a, b]: die Bithiazol-Einheit und die positiv geladene terminale Kette tragen zur spezifischen Bindung an DNA bei; die Pyrimidin-, β -Aminoalanin- und Imidazol-Einheiten sind über die Chelatisierung von Eisen an der Sauerstoff-Aktivierung beteiligt; die Gulose- und carbamoylierten Mannosereste verursachen möglicherweise die selektive Anreicherung von BLM in bestimmten Krebszellen und tragen vermutlich auch zur Koordination von Eisen und zur Sauerstoff-Aktivierung bei^[75]. Um nähere Einblicke in die chemischen und biochemischen Aspekte der Wirksamkeit von BLM zu gewinnen, wurde eine große Vielzahl von BLM-Analoga synthetisiert. Auf diese Weise ist es beispielsweise gelungen, die Umgebung des Metallzentrums in Metallobleomycinen mit größerer Gewißheit zu bestimmen^[76], die Fähigkeit zur Aktivierung von Sauerstoff^[77] oder die Wirksamkeit der DNA-Spaltung^[78] zu verbessern, asymmetrische Epoxidierungen durchzuführen^[79], die Sequenzspezifität zu verändern^[80], die für die Sequenzspezifität entscheidenden Strukturelemente besser zu definieren^[81] und chirale Bleomycin-Modellverbindungen zu entwickeln, die bei der DNA-Spaltung nach dem Chiralitätssinn unterscheiden können^[82].

2.3.1. Aktivierungsmechanismus

BLM-induzierte DNA-Brüche können durch mehrere redoxaktive Metalle (Eisen, Cobalt, Kupfer) ausgelöst werden, die mit den Stickstoffatomen des Peptidteils von BLM ein festes Chelat bilden und mit molekularem Sauerstoff reagieren^[9a, b, 83]. Für die Aktivierung von Sauerstoff durch Fe^{II}-BLM wird ein zusätzliches Elektron benötigt, das durch Disproportionierung von zwei Molekülen Fe^{II}-BLM, aus Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure^[84] oder Alkylthiole^[84a, c] oder durch elektrochemische Reduktion^[85] erhalten werden kann. Ein Schlüsselschritt der DNA-Schädigung ist die Homolyse der C-4'-H-Bindung von Desoxyribose^[86] durch „aktiviertes“ Bleomycin^[84a, 87]. Über die genaue Struktur dieses aktivierten BLM wird noch debattiert. Alle Hypothesen über den H-4'-Abstraktionsschritt lassen sich zwei Kategorien zuordnen (Schema 7): einem Fenton-Weg (OH[·] als reaktive Spezies, Wege ① und ②^[84a]) oder einem P-450-artigen Weg (BLM-Fe^V=O als hydroxylierendes Agens, Wege ③, ④ und ⑤; dieser Weg wurde als erstes von Burger et al.^[87b] vorgeschlagen). Anhaltspunkte, um sich für einen dieser Reaktionswege zu entscheiden, können aus den verschiedenen Möglichkeiten, aktiviertes BLM zu erhalten, aus spektroskopischen Merkmalen der Zwischenprodukte und aus der beobachteten chemischen Reaktivität abgeleitet werden.



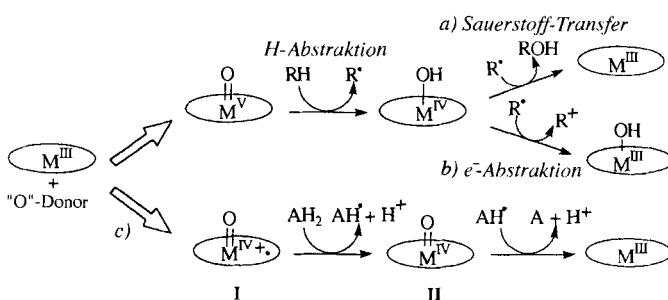
Schema 7. Mehrere denkbare Mechanismen zur Aktivierung von Fe-BLM-Komplexen in Gegenwart von O₂, H₂O₂ oder Sauerstoffdonoren (PhIO, KHSO₅).

Aktiviertes Bleomycin kann mit drei Arten von Sauerstoffquellen erzeugt werden: mit molekularem Sauerstoff und Elektronen, mit Wasserstoffperoxid oder Alkylhydroperoxiden und mit Sauerstoffdonoren. Die üblicherweise für die Aktivierung von Fe-BLM verwendeten Methoden – entweder Fe^{III}-BLM/O₂/2e⁻ oder Fe^{III}-BLM/H₂O₂ – führen zu aktiven Spezies, die sich gegenüber DNA gleichartig verhalten^[88]. Beide Methoden sind jedoch für die Klärung der mechanistischen Frage, ob der Fenton-Weg oder der P-450-Weg beschritten wird, nicht beweiskräftig, da sie jeweils für beide geeignet sind (Wege ② und ⑤ bzw. ① und ③). Die Bildung von Oxo-Eisen-Spezies ist für P-450 selbst durch die Verwendung von Sauerstoffdonoren wie NaIO₄, H₂O₂, ROOH oder Iodosylbenzol^[89] und für synthetische Metalloporphyrine durch die von Persäuren, Iodosylbenzol und NaOCl^[90] nachgewiesen worden. Die Reaktion von Iodosylbenzol mit Fe^{III}-BLM stützt die Bildung von BLM-Fe^V=O^[91] (Weg ⑤ in Schema 7), obwohl für diesen Fall auch eine Lewis-Säure-Katalyse, die nicht notwendigerweise ein

Fe^V=O-Zwischenprodukt erfordert, diskutiert worden ist^[92]. Überdies ist Iodosylbenzol kein harmloser Sauerstoffsatz bei Umsetzungen mit BLM, besonders wegen der gewöhnlich langen Inkubationszeiten. Die Ergebnisse sollten daher mit Vorsicht bewertet werden^[93]. Mit Kaliummonopersulfat (KHSO₅), einem wasserlöslichen Donor von Sauerstoffatomen bei physiologischem pH-Wert, konnte gezeigt werden, daß aktivierte Fe-BLM Einzel- und Doppelstrangbrüche auslösen^[94] und Sauerstoff auf Olefine übertragen kann^[95]. Wird Fe^{III}-BLM durch Alkylhydroperoxide aktiviert, die nachweislich einer homolytischen O-O-Bindungsspaltung unterliegen (Weg ④ in Schema 7)^[96a], so spaltet die aktivierte Spezies DNA nicht^[96b]. Diese Ergebnisse stützen die Vorstellung, daß aktivierte BLM ein Bleomycin-Oxo-Eisen-Komplex mit Eisen in einer hohen Oxidationsstufe ist (die Bildung solcher Oxo-Eisen-Verbindungen durch Umsetzung mit Alkylhydroperoxiden erfordert eine heterolytische Spaltung der peroxidischen O-O-Bindung). Die Unwirksamkeit von Radikalfängern^[97] bei diesen Reaktionen läßt vermuten, daß der tatsächliche Spaltungsmechanismus hauptsächlich über einen Oxo-Eisen-Komplex verläuft.

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz einer BLM-Fe^V=O-Spezies liefert die Umsetzung von aktiviertem Fe-BLM mit kleinen Molekülen^[9a, b]. Auch die unterschiedlichen DNA-Spaltungsmuster mit Fe-BLM (siehe Abschnitte 3.4.2 und 3.4.4) und Fe-MPE, einer Verbindung, die als Lieferant von OH-Radikalen bekannt ist, sprechen dafür, daß die DNA-Spaltung mit Fe-BLM nicht über denselben Oxidationsweg verläuft wie die mit Fe-MPE. Freie Hydroxyl-Radikale können daher als Hauptreaktanten der Fe-BLM-induzierten Spaltung ausgeschlossen werden^[98a].

Die nicht frei bewegliche, aktivierte BLM-Spezies, die sich von nichtaktiviertem Fe^{III}-BLM um zwei Redoxäquivalente unterscheidet, wird als BLM-Fe^V=O formuliert und ist in der Lage, Wasserstoffatome von Desoxyribose zu abstrahieren, so daß ein Kohlenstoff-Radikal entsteht. Der dabei gebildete BLM-Komplex BLM-Fe^{IV}-OH ist noch immer ein starkes Oxidationsmittel (eine Redoxstufe über Fe^{III}-BLM) und kann mit dem Kohlenstoff-Radikal über einen typischen P-450-artigen Weg (Sauerstoff-Rückbindungsmechanismus^[89a]) zu einem hydroxylierten Derivat (Schema 8, Weg a) reagieren. Das eingebaute Sauerstoffatom stammt jedoch – wie man vor einigen Jahren an DNA nachweisen konnte^[99] – aus dem Lösungsmittel. Dieses Ergebnis spricht für einen alternativen Reaktionsverlauf: Aktiviertes BLM kann sich im zweiten Reaktionsschritt wie eine Peroxidase (Schema 8, Weg c) verhalten und anstelle eines OH-



Schema 8. Drei mögliche oxidative Reaktionswege für BLM- und Porph-Komplexe (M = Fe, Mn): a) P-450-Weg, b) veränderter P-450-Weg, c) klassischer Peroxidase-Weg. I ist Verbindung I, II ist Verbindung II.

Transfers die Abstraktion eines Elektrons bewirken (veränderter P-450-Weg, Schema 8, Weg b). Anschließend kann ein Wasserstoffmolekül mit dem so erzeugten Carbokation unter Bildung des hydroxylierten Derivats reagieren.

Bei der Inkubation von DNA mit Fe-BLM unter Spaltungsbedingungen wird auch eine geringfügige Basenschädigung beobachtet^[100]. 1993 wurde berichtet, daß DNA mit Ni^{III}-BLM in Gegenwart von Kaliummonopersulfat als Oxidationsmittel ebenfalls gespalten werden kann^[101].

2.3.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

Die Assoziationskonstante für die Wechselwirkung von Fe-BLM mit doppelsträngiger DNA liegt in der Größenordnung von 10^5 M^{-1} ^[102]. Die DNA-Spaltung mit BLM zeigt eine charakteristische Sequenzselektivität: Die meisten Strangbrüche finden an 5'-G-pyr-Sequenzen statt. Eine geringe Veränderung der terminalen Aminokette in BLM und das Fehlen des Guanos-Mannose-Zuckerbausteins beeinflussen die Sequenzspezifität der DNA-Spaltung nur geringfügig. Die Bindung des Wirkstoffs erfolgt zum Teil über elektrostatische Wechselwirkungen und vermutlich zusätzlich durch Intercalation oder teilweise Intercalation der Bithiazol-Einheit. Metallo-BLM binden wahrscheinlich in der kleinen Furche der B-DNA-Doppelhelix und überdecken dabei zwei oder drei Basenpaare der DNA. Die 2*-Aminogruppe der Guaninbase, die sich in 5'-Richtung neben der gespaltenen Pyrimidinbase befindet, ist ein Schlüsselement für die spezifische 5'-GC- oder 5'-GT-Erkennung durch die Metallobleomycine. Die Bithiazol-Einheit scheint eine wichtige Rolle bei der Anbindung des Wirkstoffs an B-DNA zu spielen^[103]. Strukturell veränderte DNA – wie methylierte DNA^[104] oder platinierter DNA-Oligomere^[105] – bewirkt vermutlich eine veränderte Spezifität oder Reaktivität.

Es konnte gezeigt werden, daß BLM weit häufiger DNA-Doppelstrangbrüche auslöst, als bei einem zufälligen Zusammentreffen von Einzelstrangbrüchen zu erwarten wäre. Auf einem Strang ist die Bruchstelle ein Pyrimidin in einer 5'-G-pyr-Sequenz, während auf dem komplementären Strang die Spaltung an einer für Einzelstrangbrüche ungewöhnlichen Stelle stattfindet^[106]. Beide Brüche sind das Ergebnis eines spezifischen Angriffs an C4'^[107].

Man hat versucht, durch Kopplung von BLM an Nucleotide dessen Spezifität zu verändern. Diese Konjugate spalten DNA wirkungsvoll an der GT-Sequenz in der Nähe der Oligonucleotid-Bindungsstelle^[108].

Einige Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß es sehr unwahrscheinlich ist, daß die Spaltung von RNA für die therapeutische Wirkung von Fe-BLM von Bedeutung ist^[109], doch andere Studien lassen das Gegenteil vermuten^[81, 110]: Entgegen neueren Berichten, daß RNA durch BLM nicht gespalten wird^[111], konnte schon nachgewiesen werden, daß die drei Hauptarten von RNA durch Fe-BLM abgebaut werden^[110, 112]. Die RNA-Spaltung scheint viel selektiver zu verlaufen als die DNA-Spaltung. RNA wird zwar auch überwiegend an 5'-G-pyr-3'-Sequenzen gespalten, doch findet die Spaltung hauptsächlich in einsträngigen Abschnitten oder am Übergang von einsträngigen zu doppelsträngigen Bereichen

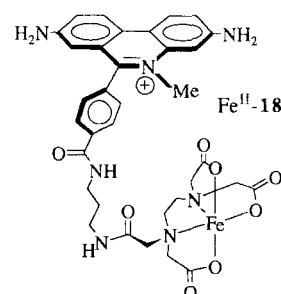
statt, was vermuten läßt, daß die RNA-Tertiärstruktur und nicht spezifische Sequenzen als Erkennungsmerkmal dienen.

Mit BLM ist bisher ausschließlich C4'-Oxidation von Desoxyribose beobachtet worden (für Einzelheiten siehe Abschnitt 3.4.3).

2.4. Fe-EDTA und Fe-MPE

Methidiumpropyl-EDTA **18** (MPE, Schema 9) ist ein frühes Beispiel für DNA-bindende Moleküle mit der Fähigkeit, die Redoxaktivität eines Metall-Ions auf ein bestimmtes Ziel zu lenken und auf diese Weise eine DNA-Spaltung herbeizuführen.

18 besteht aus der Methidium-Einheit als DNA-Intercalator, die über eine kurze Kohlenwasserstoffkette mit dem Metall-Ionen chelatisierenden EDTA verknüpft ist^[113, 114].



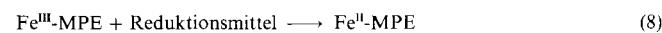
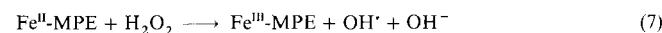
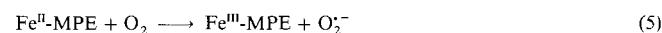
Schema 9. Struktur des Eisen(II)-Komplexes von Methidiumpropyl-EDTA **18**.

2.4.1. Aktivierungsmechanismus

Sowohl MPE als auch EDTA sind in Gegenwart von Eisen(II)

und molekularem Sauerstoff in der Lage, das DNA-Rückgrat vermutlich durch H-Abstraktion von Desoxyribose zu spalten^[113, 115, 116]. Fe-MPE spaltet Plasmid-DNA bei Konzentrationen, die zwei Größenordnungen (10^{-6} M) niedriger sind als die für die Spaltung mit Fe-EDTA benötigten (10^{-4} M). Durch Zusatz von Reduktionsmitteln wie Dithiothreit, Natriumascorbat oder NADH, die Fe^{II} aus Fe^{III} regenerieren, verbessert sich die Effizienz der DNA-Spaltung bis zu Konzentrationen, die denen von Bleomycin (10^{-8} M) entsprechen^[113].

Die Reaktion verläuft vermutlich so, daß zunächst Fe^{II} mit Sauerstoff unter Bildung von Fe^{III} und O₂^{·-} reagiert [Gl. (5)]. In protischen Medien disproportioniert das Superoxid-Ion schnell unter Bildung von H₂O₂ [Gl. (6)]. Anschließend reagieren Fe^{II} und H₂O₂ über die bekannte Fenton-Chemie unter Bildung von Hydroxyl-Radikalen [Gl. (7)]^[113]. Wird Natriumascorbat in Gegenwart von Sauerstoff als Reduktionsmittel eingesetzt, so resultiert ein Katalysecyclus, in dem geringere Konzentrationen an Eisen zur DNA-Spaltung genügen [Gl. (5)–(8)]^[115, 117].



Die durch Fe-MPE ausgelöste DNA-Spaltung wird durch Superoxid-Dismutase, ein Enzym, das dem System freies Superoxid entzieht, und Katalase, ein Enzym, das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert, gehemmt. Diese Tat-

sache unterstreicht die Bedeutung von freiem Wasserstoffperoxid als Schlüssel-Intermediat für den Strangbruch. Außerdem wurde in Abwesenheit von Sauerstoff keine DNA-Spaltung beobachtet^[98, 113, 115]. Die Konzentration an Hydroxyl-Radikalen nimmt mit wachsender Entfernung zu ihrem Entstehungszentrum ab. Somit ist die Abnahme der DNA-Spaltung mit zunehmendem Abstand von der EDTA-Gruppe gut mit einem Mechanismus in Einklang, an dem OH-Radikale beteiligt sind^[118].

Fe^{III}-MPE wurde ebenfalls auf DNA-Spaltungsaktivität untersucht. Seine direkte Oxidation mit Iodosylbenzol verbessert die Spaltung von Plasmid-DNA. Ob an dieser Spaltung eine MPE-Fe^V=O-Spezies oder ein Hydroxokomplex beteiligt ist, wird noch diskutiert^[9b, 98, 113].

2.4.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

Fe-EDTA ist ein negativ geladener Komplex, der nicht elektrostatisch an DNA bindet. Die DNA-Spaltung über Hydroxyl-Radikale ist daher kaum sequenzabhängig^[98, 119, 120]. Dieses System ist ein nützliches Reagens, um „Footprints“ von Proteinen^[117, 120, 121] oder kleinen Molekülen (Distamycin und Actinomycin^[122]) und um Informationen über DNA-Strukturen zu erhalten (ungewöhnliche Konformationen in den Adeninbereichen von DNA^[123], vierarmige Holliday-Strukturen^[124] und gekrümmte DNA^[116]).

Fe-MPE spaltet DNA mit relativ geringer Sequenzspezifität. Dies entspricht den Erwartungen, denn die Methidium-Einheit ist ein Intercalator mit einer geringen Basenspezifität. Die einzige bekannte Spezifität dieses Systems ist eine schwache Vorliebe für GC-reiche DNA-Abschnitte. Die Sequenzspezifität von Fe-MPE ist deutlich geringer als die von DNase I, und die Vielseitigkeit dieses Reagens hat sich für viele Anwendungen als sehr nützlich erwiesen, z.B. bei der Bestimmung von Position, Größe und relativer Bedeutung der Bindungsstellen für kleine Moleküle auf nativer DNA^[120, 125] oder für Proteine auf Restriktionsfragmenten^[121, 126] und bei der Untersuchung von RNA^[127] und Chromatin-Strukturen^[128]. Die relativen Vorzüge von Fe-EDTA und Fe-MPE in Footprinting-Experimenten werden in Lit. [129] erörtert. Die DNA-Affinitäten von Ni^{II}- und Mg^{II}-MPE ähneln denen des Ethidiumbromids (10^5 M^{-1}), die von Fe^{II}- und Fe^{III}-MPE können wegen deren DNA-Spaltungseffizienz nicht ermittelt werden. Die Bindungsstelle besteht vermutlich aus zwei Basenpaaren^[98].

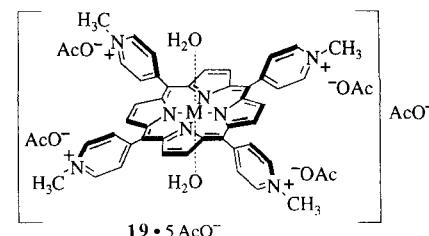
Verknüpft man Fe-EDTA mit Molekülen, die sequenzspezifisch an DNA binden, wie Antibiotika, Polypeptide, Oligonucleotide oder Proteine, so erhält man neue Klassen von DNA-Spaltungsreagentien („DNA affinity cleaving molecules“). Solche Verbindungen sind Grundlage für das Design und den Aufbau künstlicher Restriktions-Endonukleasen mit definierten Zielsequenzen und definierter Größe der Bindungsstellen^[98, 130]. Analog wurden Hybridmoleküle durch die Verknüpfung von EDTA mit Distamycin^[91, 98, 131], einem chiralen Derivat des Netropsins^[130, 132], Oligopeptiden^[119, 133] oder Oligonucleotiden hergestellt, um einzelsträngige DNA (oder RNA) unter milden Bedingungen^[118, 134] oder doppelsträngige DNA (über die Bildung einer Tripelhelix)^[135] zu spalten.

Auf die Umsetzungen von Fe-EDTA-Komplexen mit DNA wird in Abschnitt 3.4.4 genauer eingegangen.

2.5. Kationische Metalloporphyrine

2.5.1. Aktivierungsmechanismus

Synthetische Metalloporphyrine können Oxygenierungs- und Oxidationsreaktionen, die von Häm-Enzymen katalysiert werden, nachahmen^[90a]. Neben dieser Art von Reaktivität zeigen Eisen- und Manganporphyrine mit positiven Ladungen in der Peripherie, z.B. die Fe- und Mn-*meso*-Tetra(*N*-methylpyridinio-4-yl)porphyrine **19** (Fe- bzw. Mn-TMPyP, Schema 10; für kri-



Schema 10. Struktur von M-TMPyP-pentaacetat, M = Fe, Mn [136].

stallographische Daten zu Mn-TMPyP siehe Lit. [136]), eine starke Wechselwirkung mit DNA, wodurch ein starkes Oxidationsmittel in die Nähe der Zielgruppe gebracht wird. An der DNA-Spaltung ist vermutlich dieselbe aktive oxidierende Spezies beteiligt wie an den sonstigen durch Metalloporphyrine katalysierten Oxygenierungs- und Oxidationsreaktionen, nämlich ein Oxo(porphyrinato)-Komplex mit dem Metallzentrum in einer hohen Oxidationsstufe, der in der Lage ist, C-H-Bindungen zu hydroxylieren oder Olefine zu epoxidieren^[90a]. Diese aktive Spezies entsteht in Gegenwart von Sauerstoffdonoren wie Iodosylbenzol^[137], Wasserstoffperoxid^[138a], Kaliummonopersulfat^[138a, b] oder Magnesiummonoperphthalat^[138c]. Eine weitere Möglichkeit, Oxo-Metalloporphyrine herzustellen, ist – wie beim Cytochrom P-450^[89a, 137, 139] – die Verwendung von molekularem Sauerstoff in Verbindung mit einer Elektronenquelle. Die im Hinblick auf die DNA-Spaltung effizienteste dieser Methoden ist die Oxidation kationischer Mn-Porphyrine mit KHSO_5 ^[138, 140]. Die Ergebnisse der mit diesem System erzielten DNA-Spaltungen lassen vermuten, daß an dieser Reaktion keine frei beweglichen Radikale beteiligt sind, denn die Bruchstellen sind genau definiert, und H_2O_2 ist bei der Erzeugung der aktiven Spezies um mindestens drei Größenordnungen weniger wirksam^[138a]. TMPyP-Mn^V=O ist ein monoreaktives DNA-Spaltungsreagens (im Gegensatz zu den direkten Diringradikalen der Endiin-Wirkstoffe)^[138a]. Eine katalytische Aktivität wird nur dann beobachtet, wenn der Komplex durch starke Wechselwirkungen mit dem Zielmolekül vor Selbstdioxidation (die ein Ausbleichen des Chromophors bewirkt) geschützt ist. Bei einem hohen DNA/Mn-Porphyrin-Verhältnis (75 μM bp/5 nm Mn-Porphyrin) wurden bis zu fünf Einzelstrangbrüche pro Mn-TMPyP-Molekül beobachtet^[138a]. In Schema 8 ist ein denkbarer Aktivierungs/Reaktionsablauf dargestellt. Die für die DNA-Spaltung ursächliche TMPyP-Mn^V=O-Spezies ist zu reaktiv, um charakterisiert zu werden. Wie in Abschnitt 2.3.1 für BLM-Fe^V=O erörtert worden ist, konnte für diese Verbindung weder eine Reaktivität nach dem P-450-Weg (Weg a in Schema 8) noch eine nach dem veränderten P-450-Weg (Weg b) bewiesen werden. Ob das aktivierte Zwischenprodukt TMPyP-

M^{IV} -OH das DNA-Substrat durch Rückbindung des gebundenen OH-Äquivalents direkt oxygeniert (Weg a) oder ob ein Elektronentransfer erfolgt (Weg b), ist noch nicht geklärt. Untersuchungen zur Herkunft des in die DNA-Zucker eingebauten Sauerstoffs könnten zur Beantwortung dieser Frage beitragen (siehe Abschnitt 2.3.1) [199].

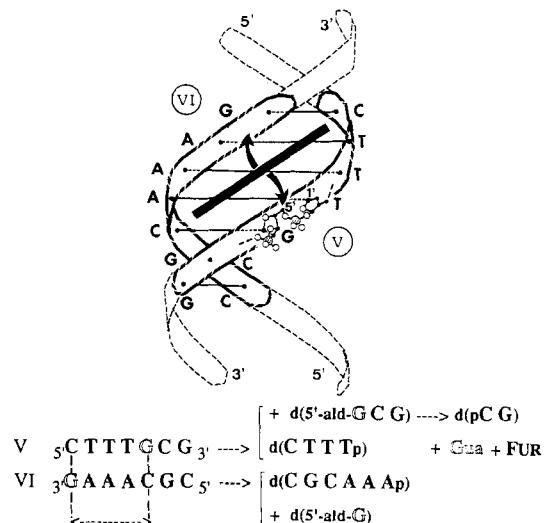
Elektrochemisch aktivierte Mn^{III} - und Fe^{III} -TMPyP ist in Gegenwart von O_2 zur DNA-Spaltung verwendet worden [141]. Der dabei beobachtete Aktivierungs- und Spaltungsmechanismus ist möglicherweise auch relevant für das, was über die chemische Aktivierung berichtet worden ist. Photochemisch aktivierte Porphyrine sind – vermutlich über die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff – ebenfalls in der Lage, DNA zu spalten [142].

2.5.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

Mn -TMPyP gehört zu einer Klasse kationischer Metalloporphyrine, die nicht zwischen DNA-Basenpaare intercalieren, sondern statt dessen in der kleinen Furche an AT-reiche DNA-Regionen binden [140, 141, 143]. Das Mn -Porphyrin-Gerüst enthält keine Donor- oder Acceptorstellen für Wasserstoffbrückenbindungen, und die Intercalation wird durch die Gegenwart eines axialen Liganden am Manganzentrum verhindert [136]. Die Fähigkeit von Mn -TMPyP, selektiv AT-reiche DNA-Regionen anzugreifen, muß somit auf elektrostatischen oder sterischen Effekten beruhen. Beispielsweise wurde vorgeschlagen, daß das kationische Metalloporphyrin durch das stark negative Potential an der Oberfläche der kleinen Furche AT-reicher Sequenzen angezogen wird [144]. Untersuchungen, bei denen die Gesamtladung oder die Ladungsverteilung in der Peripherie des Makrocyclus verändert wurden, haben gezeigt [143a–c, 145], daß ein enger Kontakt mit der kleinen Furche notwendig ist, um die Bindungswechselwirkung und die Spaltungseffizienz zu verbessern. Bei hoher Ionenstärke kann das Reagens nicht an DNA binden, und es erfolgt keine Spaltung [138a, 146].

In Anbetracht seiner Größe könnte Mn -TMPyP fünf bis sechs Basenpaare in der kleinen Furche von B-DNA überspannen, die bevorzugte Spaltungsstelle besteht jedoch aus drei aufeinanderfolgenden AT-Basenpaaren, die eine passende „Box“ für eine hochselektive DNA-Spaltung bilden [137, 138d, e, 143a, 143d]. In dieser Position bewirkt Mn -TMPyP eindeutig eine C5'-Oxidation der Nucleoside an beiden 3'-Seiten der AT-Box [147]: Ein Einzelstrangbruch auf jedem der beiden Stränge führt insgesamt zu einem Doppelstrangbruch mit einer Verschiebung um vier Basenpaare in 3'-Richtung auf dem komplementären DNA-Strang (Schema 11). Bislang gibt es keinen eindeutigen Beweis dafür, daß dieses Spaltungsmuster durch zwei Einzelstrangbrüche entsteht, die von ein und demselben Metalloporphyrin in der kleinen Furche durch zweifache Aktivierung ausgelöst werden, oder daß zwei verschiedene aktivierte Metalloporphyrine an der Spaltung beteiligt sind. Bei großen DNA-Substraten überwiegen Einzelstrangbrüche [138a], während bei Oligonucleotiden (mit einer oder zwei AT-Boxen) sehr leicht Doppelstrangbrüche stattfinden [147].

Neben der Spaltung an $(A \cdot T)_3$ -Bruchstellen sind auch einige sekundäre Reaktionssequenzen beobachtet worden. Bei diesen ist ein Basenpaar der $(A \cdot T)_3$ -Bindungsstelle durch ein G · C-Basenpaar ersetzt, wobei die Position des G · C-Paars keine Rolle spielt [143a]. Diese sekundäre Reaktivität ist unter drastischen



Schema 11. Bei Verwendung des Mn -TMPyP/ $KHSO_4$ -Systems zeigt die Bruchstelle auf der Doppelhelix V/VI eine Verschiebung um vier Basenpaare (gestrichelter Doppelpfeil unten links) in Richtung auf die 3'-Enden, wie anhand der Analyse der Spaltprodukte (unten rechts) nachgewiesen werden konnte [147].

Spaltungsbedingungen besonders auffällig [147]; sie ist um eine Größenordnung schwächer als die an $(A \cdot T)_3$ -Zentren.

Auch G · C-reiche Sequenzen können mit Mn -TMPyP abgebaut werden, allerdings ist die Reaktivität um zwei Größenordnungen schwächer als die für den Abbau von $(A \cdot T)_3$ -Zentren. Der Mechanismus der DNA-Spaltung in diesen Bereichen ist nicht vollständig verstanden; ihm könnte eine Zucker- (C5' oder C1') und/oder eine Basenoxidation zugrunde liegen. Für Mn -TMPyP an $(A \cdot T)_3$ -Bindungsstellen sind Affinitätskonstanten bis zu 10^7 M^{-1} veröffentlicht worden [138e], für solche an A · T-Sequenzen erhielt man 10^5 M^{-1} und für solche an G · C-Sequenzen 10^3 M^{-1} [148].

Durch die Verknüpfung eines Metalltris(methylpyridinioyl)-porphyrins mit Oligonucleotiden konnten Hybride Moleküle hergestellt werden, die die Fähigkeit haben, eine einsträngige 35mer-DNA, die dem Initiations-Codon-Bereich des *tat*-Gens von HIV-1 entspricht, selektiv zu spalten [149].

Die Reaktionsmechanismen der DNA-Spaltung mit Mn -TMPyP durch C1'- und/oder C5'-Oxidation sind in den Abschnitten 3.1.3 bzw. 3.5.2 beschrieben.

2.6. Photoaktivierbare DNA-Spaltungsreagentien am Beispiel von Phenanthrenchinondiimin-Rhodium(m)-Komplexen

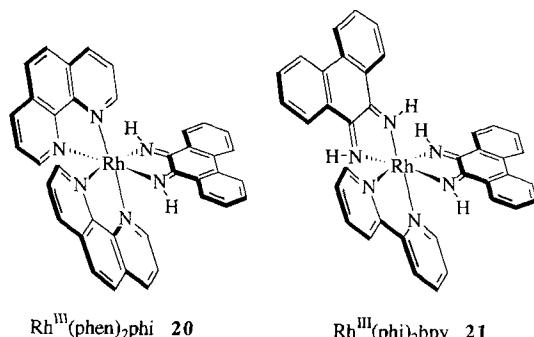
Eine Reihe von Untersuchungen befaßten sich mit der Verwendung von Metallkomplexen oder Wirkstoffen zur Entwicklung spektroskopischer DNA-Sonden und/oder photoaktivierbarer DNA-Spaltungsreagentien [150a–d]. Nur bei einigen dieser Moleküle ist eine Beschleunigung des Strangbruchs durch Photoaktivierung festgestellt worden [150e]. Neben Metalloporphyrinen und Endiinen (Abschnitte 2.5.1 bzw. 2.2) können auch einige einfache, anorganische, oktaedrische Moleküle Einzelstrangbrüche herbeiführen, und zwar nach Einstrahlung in bestimmte Absorptionsbanden. Eine derartige Spaltung wird durch Metallkomplexe induziert, von denen man weiß, daß

sie hauptsächlich über zwei nichtkovalente Bindungsarten an DNA binden: 1) durch eine Art Furchenbindung, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Liganden und der kleinen oder großen Furche der DNA stabilisiert ist^[150, 151], und 2) durch Intercalation^[152]. Bei einigen dieser photoaktivierbaren Komplexe ist die genaue Art der Bindung an DNA noch nicht geklärt^[153]. Rhodium-^[154], Ruthenium-^[155] und Cobaltkomplexe^[156] wurden als Spaltungsreagentien bei der Untersuchung von Nucleinsäure-Konformationen und zur Erkennung spezifischer Bindungsstellen auf einem DNA-Strang verwendet.

Kürzlich ist für Phenanthrenchinondiimin-Rhodium(III)-Komplexe ein genauer Mechanismus abgeleitet worden, der einen oxidativen Angriff auf die C3'-H-Bindung enthält und auf den wir hier im Detail eingehen wollen.

2.6.1. Aktivierungsmechanismus

Das Auftreten scharfer und genau definierter Gelbanden nach der Spaltung von Restriktionsfragmenten oder Oligonucleotiden durch photoaktivierte Rhodiumkomplexe lässt vermuten, daß diese DNA-Spaltung nicht durch ein frei bewegliches Oxidationsmittel erfolgt. Vielmehr scheint es sich um eine Spezies zu handeln, die genau an der Bindungsstelle erzeugt wird und dort den Strangbruch induziert. Die Bestrahlung der Rhodiumkomplexe bei der Wellenlänge der Ligand → Metall-Charge-Transfer(LMCT)-Bande führt zu einem angeregten Zustand mit einer Lebensdauer im μ s-Bereich. Die aktive Radikalspezies, die die DNA-Spaltung durch **20** und **21** (Schema 12) verursacht, ist vermutlich das Radikalkation des phi-Liganden, das fest an DNA gebunden ist und durch Einstrahlung in die LMCT-AbSORPTIONSbande entsteht. Die Ausrichtung des phi-Radikalkations in der Bindungsstelle ermöglicht eine schnelle H-Abstraktion vom Desoxyribosering, die die Spaltung einleitet^[157].



Schema 12. Strukturen der beiden (9,10-Phenanthrenchinondiimin)rhodium(III)-Komplexe **20** und **21**.

2.6.2. Wechselwirkung mit Nucleinsäuren

Bei Photoaktivierung spaltet **20** doppelsträngige DNA an 5'-Pyrimidin-Purin-Übergängen und bevorzugt an der kanonischen Sequenz 5'-Pyrimidin-Purin, während der analoge Komplex **21** DNA – trotz zusätzlicher, für Wasserstoff-Brückenbindungen potentiell geeigneter Iminogruppen – zwar effizient, aber im allgemeinen sequenzneutral spaltet. Die Asymmetrie des Spaltungsmusters zum 5'-Ende eines jeden Stranges lässt vermuten,

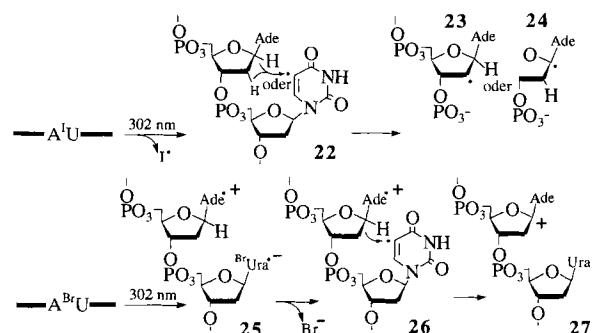
daß der starre Komplex B-DNA aus der großen Furche der Helix angreift. Da der phi-Ligand leicht intercaliert, sollten bei **20** die Phenanthrolinliganden nichtintercalative Positionen entlang der Furche einnehmen und bei **21** ein phi- und der bpy-Ligand die Nebenbindungsstellen besetzen^[154a]. NMR-Untersuchungen haben inzwischen einen direkten Beleg für eine spezifische Intercalation des chiralen oktaedrischen Komplexes **4-20** geliefert und weisen auf eine bevorzugte partielle Intercalation des phi-Liganden hin und darauf, daß sich die Phenanthrolinliganden an den Nebenbindungsstellen befinden^[158]. Die Intercalation in die große Furche ist in Einklang mit den Ergebnissen mechanistischer Untersuchungen zur DNA-Spaltung durch Rhodiumkomplexe, denen zufolge der erste Reaktionsschritt einer H3'-Abstraktion ist (siehe Schema 16 und Abschnitt 3.3). Photospaltungsexperimente haben gezeigt, daß **4-20** 5'-GC-Übergänge enantioselektiv angreift.

3. Wasserstoff-Abstraktion von verschiedenen Desoxyribose-C-H-Bindungen und dadurch bedingte DNA-Spaltung

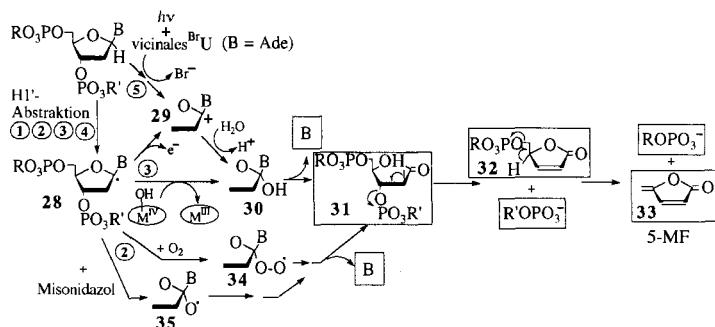
Jeder Desoxyribose-Baustein von DNA enthält sieben C-H-Bindungen als mögliche Zielgruppen für einen oxidativen Angriff. Davon sind vier in der kleinen Furche und drei in der großen Furche lokalisiert (siehe Schema 1). Bei allen in Abschnitt 2 vorgestellten chemischen Nucleasen und Wirkstoffen ist der erste Reaktionsschritt die Abstraktion eines Wasserstoffatoms, die zu einem Radikalzentrum am entsprechenden Kohlenstoffatom des Zuckers führt. Wir zeigen im folgenden, auf welche Weise dieser erste Bindungsbruch in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und in Einklang mit den experimentellen Belegen für die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen zur DNA-Spaltung führt^[159].

3.1. H1'-Abstraktion: Cu(oP)₂, NCS-chrom, Mn-TMPyP und Halogenuracil enthaltende Nucleotide

Der oxidative Angriff von Cu(oP)₂ **1**, NCS-chrom **2** und Mn-TMPyP **19**, M = Mn, auf DNA bewirkt eine H1'-Abstraktion, die zum Radikal **28** führt (siehe Schema 14). Bei der Photolyse 5-Halogenuracil enthaltender Oligonucleotide entstehen über **22** entweder an C1' oder an C2' lokalisierte Radikale (**23** bzw. **24**, Schema 13), oder es bildet sich über **25** und **26** das 1'-Kation



Schema 13. Mögliche Reaktionsmechanismen für den oxidativen Angriff auf C1'- und C2'-H-Bindungen im Fall Halogenuracil enthaltender Oligonucleotide [159].



Schema 14. Mögliche Reaktionsmechanismen, wenn der erste Angriff der oxidierenden Spezies (①: 1, ②: 2, ③: 19, ④: vicinales ^1U , ⑤: vicinales ^{31}BrU) auf das C1'-Atom der Desoxyribose erfolgt [159].

27 (Schema 13; siehe auch 29 in Schema 14). Die nachfolgenden Schlüsselschritte der DNA-Spaltung sind für gewöhnlich 1) die Freisetzung einer Base unter Bildung der oxidierten Verbindung 31, 2) die erste β -Eliminierung, die den Strangbruch einleitet, der zu einem 5'-Phosphat-Ende und zu einem metastabilen α, β -ungesättigten Lacton 32 am 3'-Ende führt und 3) die zweite und schnelle β -Eliminierung, durch die 3'-phosphorylierte DNA-Fragmente und 5-Methylenfuranon 33 als Hauptzuckerrest entstehen. Je nach verwendeten DNA-Spaltungsreagens sind einzelne Aspekte dieses allgemeinen Reaktionsverlaufs unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch im Fall von Fe^{II} -EDTA, Fe^{II} -MPE und verwandten Verbindungen kann die C1'-Chemie als Erklärung für einige experimentelle Befunde herangezogen werden; auf diesen Punkt werden wir in Abschnitt 3.4.4 kurz eingehen.

3.1.1. $\text{Cu}(\text{oP})_2$

Die Analyse der Reaktionsprodukte der DNA-Spaltung mit 1 und Wasserstoffperoxid ergab, daß sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende Phosphomonoester entstanden waren (3'-Phosphomonoester-Enden sind starke Inhibitoren der *E. coli*-DNA-Polymerase, was der erste Nachweis für eine DNA-Spaltung war^[15a, d]) und daß außerdem Basen freigesetzt wurden. Zunächst nahm man an, daß die oxidative Spaltung der Desoxyribose zu einem resonanzstabilisierten Furanderivat führt^[129a]. Später gelang es dann – indem kein Reduktionsmittel als Coreagens eingesetzt wurde – 5-Methylen-2-furanon 33 zu identifizieren^[160]. Ein denkbarer Reaktionsweg, der die Bildung dieser Produkte aus dem C1'-Radikal 28 erklären könnte, ist in Schema 14 wiedergegeben. Das angenommene Zwischenprodukt 32 am 3'-Ende wurde bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) während der Spaltung eines synthetischen Dodecamers und eines Restriktionsfragments, das den Lactose-Kontrollbereich enthielt, beobachtet^[128]. Es gibt keine weiteren Informationen über Zwischenschritte, abgesehen davon, daß für die Spaltung kein molekularer Sauerstoff benötigt wird^[17].

80–90 % der durch 1 induzierten DNA-Spaltungsereignisse können mit dem C1'-Oxidationsweg erklärt werden (10–20 % mit C4'-Oxidation, siehe Abschnitt 3.4.1)^[15b]. Die relative Bedeutung beider Reaktionswege, die auf unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten an den beiden Angriffsstellen hinweist, ist abhängig von der DNA-Sequenz^[28], wie die Bestimmung des Verhältnisses von 3'-Phosphoglycolat (C4'-Angriff) zu 3'-Phosphat (C1'-Angriff) verdeutlicht.

3.1.2. NCS-chrom 2

C1'-Chemie tritt insbesondere an den C-Resten von Doppelstrang-Schnittstellen, z.B. an 5'-AGC/3'-TCG-Sequenzen, auf^[19a, 71, 161]. Dort ist der Angriff an C1' der bevorzugte Reaktionsweg (72 %), obwohl auch ein geringer Anteil an C4'- und C5'-Chemie beobachtet wurde^[166a, 71]. Mit der C1'-Chemie ist immer ein Bruch des komplementären 3'-TCG-Strangs verbunden, der über einen Angriff auf C5' des T-Rests erfolgt. Bei Doppelstrangbrüchen treten somit Spaltprodukte mit einer Verschiebung um zwei Nucleotide nach 3' auf, was der klassischen 3'-Verschiebung entspricht, die mit dem von 2 abgeleiteten aktivierten Diradikal 4 beobachtet wird (siehe auch Abschnitt 3.4.2). Ein wichtiges Kennzeichen dieser Spaltung ist die starke Bevorzugung von Glutathion (gegenüber neutralen Thiolen wie ME oder DTT) bei der durch 2 induzierten C1'-Chemie (siehe Abschnitt 2.2.2.1).

Da die Nucleolyse-Aktivität von 2 an das Vorhandensein von molekularem Sauerstoff gebunden ist, könnte zunächst das Peroxy-Radikal 34 (Schema 14) entstehen, das anschließend unter Freisetzung von Base zum oxidierten Zwischenprodukt 31 reagierte. Derartige Oligonucleotide 31, denen eine Base fehlt (abasische ODNs), sind auf Polyacrylamid-Gelen beobachtet worden^[161]. Sie wandern etwas schneller als die vollständige DNA und konnten durch alkalische Behandlung in die entsprechenden Fragmente mit Phosphat-Ende umgewandelt werden. DNA-Fragmente 32 mit einem α, β -ungesättigten Lacton am 3'-Ende (die durch eine β -Eliminierung aus 31 entstehen) wurden ebenfalls auf Polyacrylamid-Gelen von 5'-[^{32}P]-markierten Oligonucleotiden nachgewiesen^[166a, 71]; sie wandern den entsprechenden 3'-Phosphatfragmenten voraus. Durch enzymatische Abbau des Zwischenprodukts 31 ist es gelungen, 2-Desoxyribonolacton, das unter Freisetzung von Cytosin erzeugt wurde, zu isolieren und zu charakterisieren^[162]. 5-MF 33, das angenommene Endprodukt dieser Reaktionsfolge, konnte dagegen wegen der Gegenwart reduzierender Cofaktoren noch nie nachgewiesen werden. Mit NaBH_4 als Aktivator für 2 wurde die alkalische Spaltung des C-Rests nicht verhindert, was darauf hinweist, daß NaBH_4 nicht in der Lage ist, das oxidierte Zwischenprodukt 31 zu reduzieren^[161]. Die genaue Untersuchung von 5'-[^{32}P]-markierten DNA-Fragmenten durch PAGE zeigte neue Banden, die eine geringere Mobilität aufwiesen als die entsprechenden Phosphatbanden. Diese Banden, die durch Umsetzung mit Piperidin in die Banden der 3'-Phosphat-Enden überführt werden konnten, wurden den durch Michael-Addition entstandenen Addukten aus Thiol und 3'-terminalem α, β -ungesättigtem Lacton 32 zugeordnet^[166b, 163]. Die Mobilität dieses Thioladdukts ändert sich mit der Struktur des Thiols^[166b]. Derartige Banden wurden auch im Zusammenhang mit der C4'-Chemie von 2 beobachtet (siehe Abschnitt 3.4.2).

Unter anaeroben Bedingungen kann Misonidazol anstelle von molekularem Sauerstoff den Schnitt am C-Rest herbeiführen^[161]. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht vollständig verstanden. So ist es noch eine offene Frage, ob an der Produktbildung als Zwischenprodukt ein Oxy-Radikal 35 oder ein Peroxy-Radikal 34 beteiligt ist (siehe Abschnitt 3.4.2).

Einen direkten Beleg für die H1'-Abstraktion lieferten auch Experimente, in denen H1' durch Deuterium ersetzt war. Aus Untersuchungen der alkalischen Spaltung oxiderter Zwischen-

produkte **31** konnten Werte für den Deuterium-Isotopeneffekt von $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} \approx 4$ ermittelt werden^[71]. ¹H-NMR-Spektroskopie des reagierten Chromophors ergab ebenfalls, daß das C2'-Atom von **2** am Angriff auf den C-Rest der 5'-AGC-Sequenz beteiligt ist^[54a].

3.1.3. Mn-TMPyP

Bei mehreren DNA- und Oligonucleotid-Spaltungen mit Mn-TMPyP/KHSO₅ konnten folgende stabile Reaktionsprodukte identifiziert werden: 5'- und 3'-phosphorylierte Endstücke, freie Basen und 5-Methylenfuranon **33**^[164]. Der Mechanismus, der als Erklärung für die Bildung von 5-Methylenfuranon vorgeschlagen wurde, geht von einer Hydroxylierung des C1'-Atoms aus, wie sie in Schema 14 dargestellt ist. Die Spaltung erfordert keinen molekularen Sauerstoff (M. Pitié et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Es gibt zwei Hypothesen, die die Entwicklung nach dem ersten Bindungsbruch erklären könnten: 1) Das C1'-Radikal **28** überträgt ein Elektron auf das Mn^{IV}(OH)-Porphyrin und geht so ins Carbokation **29** über, das mit Wasser unter Bildung des 1'-hydroxylierten Derivats **30** reagiert (veränderter P-450-Weg; Schema 8, Weg b), oder 2) das Radikal wird direkt durch das Mn^{IV}(OH)-Porphyrin hydroxyliert (Cytochrom-P-450-Chemie; Schema 8, Weg a; Abschnitt 2.5.1). Bisher konnten weder die oxidierten Oligonucleotide **31** noch die das α, β -ungesättigte Lacton tragenden Oligonucleotide **32** direkt nachgewiesen werden. Ein indirekter Hinweis auf sie liefert nur das Endprodukt **33**.

Mit Mn-TMPyP/KHSO₅ als Spaltungsreagens erfolgt ein oxidativer Angriff an C1' hauptsächlich bei einsträngiger oder GC-reicher doppelsträngiger DNA, während DNA mit AT-reichen Sequenzen weniger an C1' angegriffen wird (hier ist C5' die Hauptzielgruppe, siehe Abschnitt 3.5.2)^[164b].

3.1.4. Halogenuracil enthaltende Oligonucleotide

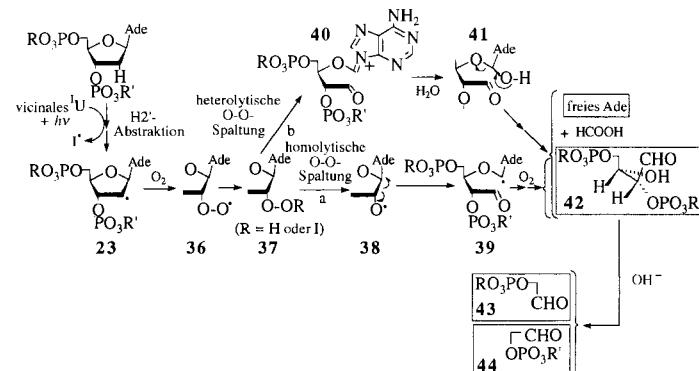
Eine reizvolle Hypothese besagt, daß bei der UV-Photoreaktion kleiner Oligonucleotide, die die 5'-A^{Br}U-Sequenz enthalten, das 1'-Kation **27** auftreten könnte (siehe Schema 13). Dabei sollte das durch einen intramolekularen Elektronentransfer zwischen einem Adenin auf der 5'-Seite und dem benachbarten Bromuracil gebildete ^{Br}U-Radikal anion **25** Br⁻ abspalten, so daß ein Uracyl-Radikal **26** entstünde, was dann das benachbarte C1'-Wasserstoffatom des Desoxyadenosin-Radikalkations unter Bildung des 1'-Kations **27** abstrahieren könnte. Die Addition eines Wassermoleküls, die Abspaltung eines Protons und die Freisetzung der Base (Schema 14) würden zum Desoxyribonolacton **31** führen, das hochdruckflüssigkeitschromatographisch nachgewiesen und mit heißer NaOH in die entsprechenden Fragmente mit Phosphat-Ende umgewandelt werden konnte. Ohne alkalische Behandlung und nach enzymatischem Abbau des Oligonucleotids **31** konnte das 2-Desoxyribonolacton (bei gleichzeitiger Freisetzung von Ade) isoliert und spektroskopisch sowie chemisch charakterisiert werden^[165]. Das aus **31** erwartete Endprodukt 5-MF **33** wurde – vermutlich wegen seiner Instabilität unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen (heiße NaOH) – nicht beobachtet.

Die Photoreaktion 5-Ioduracil enthaltender Oligonucleotide^[166] läuft nach einem völlig anderen Mechanismus ab und führt zu einer Konkurrenz zwischen C1'- und C2'-Oxidation an

dem Zuckerrest, der auf der 5'-Seite dem Ioduracil-Rest benachbart ist. Diese Reaktionsfolge ist in den Schemata 13 und 15 wiedergegeben. Die Photoreaktion von 5-Ioduracil verläuft über eine homolytische Spaltung der C5-I-Bindung im Uracil. Das dabei gebildete Uracil-5-yl-Radikal **22** (siehe Schema 13) abstrahiert entweder das C2'- (Bildung von **23**) oder das C1'-Atom (Bildung von **24**) der Desoxyribose auf der 5'-Seite von ¹U. Es wurden sowohl C1'- als auch C2'-Oxidationsprodukte, **31** bzw. **42**, nachgewiesen (Schema 14 bzw. 15).

3.2. H2'-Abstraktion: Ioduracil enthaltende Oligonucleotide

Während DNA-Schäden, die durch H-Abstraktion von C1', C3', C4' und C5' entstehen, gut dokumentiert sind, ist die DNA-Schädigung durch H-Abstraktion von C2' kaum untersucht worden. Durch H-Abstraktion von C2' entstandene, Erythrose enthaltende Derivate wurden ausschließlich als einer der Hauptschäden charakterisiert, die bei der γ -Bestrahlung von DNA induziert werden^[167]. 1993 erst wurde ein weiteres Beispiel für eine Desoxyribose-C2'-Oxidation in DNA beschrieben: Bei der Photoreaktion mehrerer Ioduracil enthaltender Oligonucleotide wurden C2'-Oxidationsprodukte beobachtet und erstmalig direkt isoliert^[166]. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Schema 15) geht vom Peroxy-Radikal **36** aus, das über **37**



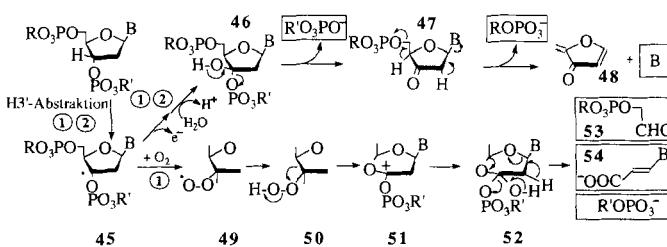
Schema 15. Mögliche Reaktionsmechanismen, wenn der erste Angriff der oxidierenden Spezies auf das C2'-Atom der Desoxyribose gerichtet ist [159].

durch homolytische Spaltung der O-O-Bindung (Weg a) in das Oxy-Radikal **38** übergehen könnte. Dessen β -Spaltung lieferte das Zwischenprodukt **39**. Bei DNA-Doppelstrang-Schäden, die durch Endiine ausgelöst werden, hat man die Bildung von Oxy-Radikalen aus Peroxy-Radikalen durch die Fragmentierung einer O₄-Brücke, die die kleine Furche überspannt, erklärt (Abschnitte 3.4.2 und 3.5.1). Im vorliegenden Fall scheint dagegen die Kombination von zwei A-C2'-Peroxy-Radikalen in 5'-A¹U/3'-A¹U sterisch nicht möglich zu sein. **39** reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Freisetzung von Adenin weiter zu **42**. Als Alternative ist eine heterolytische Spaltung der O-O-Bindung denkbar, die über ein R'OOI-Intermediat **37** verlaufen könnte (Weg b) und über die Zwischenprodukte **40** und **41** ebenfalls zu **42** führen würde. Unter alkalischen Bedingungen wird die instabile Verbindung **42** über eine Retroaldol-Reaktion gespalten, wobei sich die Fragmente **43** und **44** bilden, die Phosphoglycol-

aldehyd-Endgruppen enthalten. Die Verbindungen **42–44** konnten charakterisiert werden, der genaue Reaktionsweg zu ihnen ist jedoch noch nicht geklärt.

3.3. H3'-Abstraktion: die Rhodiumkomplexe **20** und **21**

Die DNA-Spaltung mit photoaktivierbaren DNA-Spaltungsreagentien ist ein ausführlich bearbeitetes Thema. In Hinblick auf den molekularen Mechanismus der Spaltung haben die Phenanthrenchinondiimin-Komplexe von Rhodium(III) **20** und **21** besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen (Schema 16^[154a, 157]).



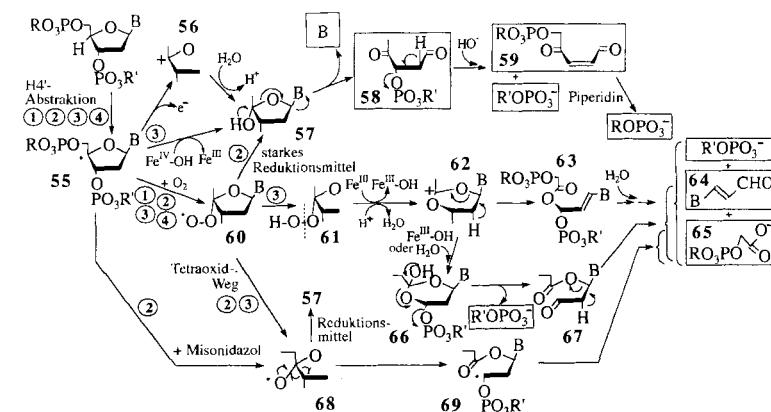
Schema 16. Mögliche Reaktionsmechanismen, wenn der erste Angriff der oxidierenden Spezies (①: **21**, ②: **20**) auf das C3'-Atom der Desoxyribose gerichtet ist [159].

Obwohl sich diese Komplexe in ihren photochemischen Eigenschaften, ihrem Bindungsverhalten und ihren Bindungsaaffinitäten ähnlich sind, verweisen ihre Spaltungsmuster auf unterschiedliche Erkennungsmerkmale (siehe Abschnitt 2.6.1.2), was wohl auf die unterschiedlichen Molekülformen dieser beiden Komplexe zurückzuführen ist. Die Molekülform beeinflusst auch die Chemie der Strangtrennung. Bei beiden Komplexen entstehen als Primärprodukte Oligomere mit 3'- und 5'-Phosphat-Enden und Nucleinsäurebasen. Diese Tatsache lässt vermuten, daß die Zuckerbausteine die Reaktionszentren sind^[154a]. Bei Rh(phi)₂bpy **21** machen letztere Produkte etwa 70% der Reaktion aus, zusätzlich entstehen jedoch zu etwa 30% Basen-substituierte Propensäuren **54** („Basenpropensäuren“) und Oligomere **53**, die eine Phosphoglycolaldehyd-Endgruppe tragen^[157]. Die erhaltenen Produkte sprechen dafür, daß die Photoreaktion an Rhodiumkomplexen stattfindet, die in der großen Furche der DNA intercaliert sind. Von dort haben sie einen direkten Zugang zu H3'. Als erster Reaktionsschritt wurde deshalb eine H3'-Abstraktion angenommen. Diese Annahme konnte durch die Verwendung spezifisch tritiierter DNA bestätigt werden^[157]. In einem von Sauerstoff unabhängigen Reaktionsweg (Schema 16) wird das C3'-Radikal **45** in die 3'-hydroxylierte Verbindung **46** umgewandelt. Diese Umsetzung verläuft möglicherweise über eine Einelektronen-Abstraktion durch den Rhodiumkomplex (der angeregte Zustand des Komplexes könnte ausreichend oxidierend wirken) und die anschließende Addition von Wasser an das 3'-Kation. Durch Eliminierung des phosphorylierten 5'-Endes bildet sich die eine Keton-Endgruppe enthaltende Verbindung **47**, aus der durch zwei aufeinanderfolgende β-Eliminierungen das phosphorylierte 3'-Ende, freie Base und 2-Methylen-3-furanon **48** entstehen. In einem von Sauerstoff abhängigen Reaktionsweg (Schema 16) bilden sich aus dem 3'-Radikal **45** nacheinander das Peroxy-Radikal **49** und das Hydroperoxid **50**. Aus diesem entstehen über mehrere Reaktionsschritte zunächst **51** und **52** (Umlagerung vom Criegee-Typ **50** → **52**), und anschließend das phosphorylierte 5'-Ende, der Phosphoglycolaldehyd **53** und die Basenpropensäure **54**. Die Suche nach metastabilen Zwischenprodukten, wie sie beim Angriff auf andere Kohlenstoffatome der Desoxyribose beobachtet worden sind, war bisher erfolglos.

C3'-Chemie könnte auch als Erklärung für einige experimentelle Befunde im Zusammenhang mit der DNA-Spaltung durch Fe^{II}-EDTA und verwandte Verbindungen dienen; auf diesen Punkt werden wir in Abschnitt 3.4.4 kurz eingehen.

3.4. H4'-Abstraktion: Cu(oP)₂, Endiine, BLM und Fe-EDTA/MPE

Der oxidative Angriff der Spaltungsreagentien NCS-chrom **2**, CAL **5**, BLM **17**, Cu(oP)₂ **1** und Fe-MPE Fe-**18** auf die C4'-Position wird vermutlich durch die Abstraktion des H4'-Atoms ausgelöst (Schema 17). Das dabei entstehende radikalische Zwischenprodukt **55** kann entweder an C4' hydroxyliert werden (**57**), was nach der Spaltung zu einem phosphorylierten 5'-Ende und zum 3'-Ende **59**, das den Zuckerrest trägt, führt oder ein Sauerstoffmolekül addieren, wodurch das Peroxy-Radikal **60** gebildet wird, aus dem auf mehreren Wegen das Basenpropenal **64**, das 3'-Phosphoglycolat **65** und das phosphorylierte 5'-Ende entstehen. Welcher dieser beiden Hauptreaktionswege vor allem eingeschlagen wird, hängt von der Sauerstoffkonzentration und/oder von der Art der zu spaltenden DNA-Moleküle sowie von deren aktivierenden Cofaktoren ab.



Schema 17. Mögliche Reaktionsmechanismen, wenn der erste Angriff der oxidierenden Spezies (①: **1**, ②: Endiine, ③: M-17, ④: Fe-**18**) auf das C4'-Atom der Desoxyribose erfolgt. Das Endprodukt **64** wurde bei Spaltungen mit **1** und Fe-**18** nie beobachtet und konnte bei solchen mit Endiinen nicht charakterisiert werden [159]. Das C4'-hydroxylierte **58** ist in seiner offenkettigen Form dargestellt.

3.4.1. Cu(oP)₂ 1

Die elektrophoretische Analyse der Spaltung von 5'- und 3'-[³²P]-markierten Oligomeren und langen DNA-Fragmenten gewährt wichtige Einblicke in die Chemie der DNA-Spaltung mit

$\text{Cu}(\text{oP})_2$ **1**. Die Haupt-Endgruppen, die durch diesen Komplex erzeugt werden, sind – durch $\text{C}1'$ -Oxidation (Abschnitt 3.1.1 und Schema 14) – 3'- und 5'-Phosphomonoester. Zusätzlich entstehen 3'-Phosphoglycolate **65**, die eine C4'-Oxidationschemie anzeigen (Schema 17)^[15b, 28]. Während bei der ^{60}Co -Bestrahlung (einem weiteren Weg für eine $\text{H}1'$ - oder $\text{H}4'$ -Abstraktion) gleiche Mengen an 3'-Phosphomonoestern und 3'-Phosphomoglycolaten erzeugt werden^[28, 168], ist der bei der durch **1** katalysierten Spaltung produzierte Anteil an 3'-Phosphoglycolat wesentlich geringer als der an 3'-Phosphomonoester, was dafür spricht, daß die C4'-Oxidation hier nur einen untergeordneten Reaktionsweg darstellt. Bisher konnte weder das Basenpropenal **64** noch andere Fragmente des Zuckers mit drei oder fünf Kohlenstoffatomen isoliert werden. Der exakte Reaktionsweg vom C4'-Radikal **55** zum Phosphoglycolat **65** ist somit noch nicht geklärt, und der Mechanismus muß noch bewiesen werden (siehe auch Abschnitte 3.4.2 und 3.4.4).

3.4.2. Endiine

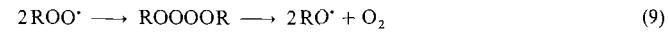
3.4.2.1. NCS-chrom **2**

Eine $\text{H}4'$ -Abstraktion von Desoxyribosen mit NCS-chrom **2** wurde vor allem an den T-Resten von 5'-GT-Sequenzen in synthetischen Oligonucleotiden beobachtet^[64, 169, 170]. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieser untergeordnete Oxidationsmechanismus hauptsächlich bei versetzten Doppelstrangbrüchen an den T-Resten von 5'-AGT/3'-TCA-Sequenzen auftritt^[46b, 171]. NCS-chrom **2** kann jedoch – in Abhängigkeit vom Thiol^[64, 170], einer Deuterierung^[64, 170] oder der DNA-Sequenz^[66b] – am selben T-Rest zwischen $\text{H}4'$ - und $\text{H}5'$ -Abstraktion hin- und herpendeln. Auf dem komplementären Strang erfolgt der Angriff auf die T-Reste an 5'-AGT/3'-TCA-Stellen überwiegend durch $\text{H}5'$ -Abstraktion, eine Verschiebung zur C4'-Chemie ist jedoch nicht ausgeschlossen^[66b].

Die durch C4'-Chemie von **2** erzeugten Produkte (Schema 17) sind die 4'-hydroxylierte, abasische Verbindung **58** (alkalisch abbaubar) und das 3'-Phosphoglycolat **65** (direkter DNA-Brunsch); beide Produkte leiten sich vom 4'-Radikal **55** ab. Anders als bei BLM-Komplexen (siehe Abschnitt 3.4.3)^[64] sind Basenpropenale **64**^[9d, 66b] oder Malonaldehyd-ähnliche Verbindungen, die $\text{C}1'$ und $\text{C}2'$ der Desoxyribose enthalten^[172], zwar erwähnt, aber bisher noch nicht eindeutig beschrieben worden. Das Schicksal des Radikals **55** hängt nicht von der O_2 -Konzentration ab (O_2 ist an beiden Arten der DNA-Schädigung beteiligt), ist jedoch abhängig von der Art des **2** aktivierenden Thiols und von der Art der Schädigung (SSB oder DSB): An Doppelstrang-Bruchstellen treten mehr Phosphoglycolate auf^[46, 66b]; saure oder negativ geladene Thiole (die eine geringe Affinität zu DNA haben wie GSH und MPA) ergeben ein Höchstmaß an Phosphoglycolat-Bildung, wohingegen Thiole mit hoher Reduktionskraft oder der Fähigkeit, H-Radikale zu spenden (diese Fähigkeit hängt von der Stabilität des erzeugten Sulfanyl-(Thiyl)-Radikals ab), die Produktion von 3'-Phosphoglycolaten nicht auslösen. An der Entscheidung über den einzuschlagenden Reaktionsweg ist somit ein reduktionsempfindliches DNA-Zwischenprodukt beteiligt. Wird dieses Intermediat reduziert, so entsteht die 4'-hydroxylierte Verbindung **58**, anderenfalls entsteht das Phosphoglycolat **65**. Dieses Zwischenprodukt könnte das Peroxy-Radikal **60** oder das Oxy-Radikal **68** sein.

Handelt es sich bei dem reduktionsempfindlichen Zwischenprodukt um das Peroxy-Radikal **60**, so könnte dieses auf einfache Weise zum Hydroperoxid **61** reduziert werden (entweder durch das Reduktionsmittel selbst oder durch intramolekulare Übertragung eines H-Radikals^[64]), welches für gewöhnlich als Phosphoglycolat-Vorstufe (Criegee-artige Umlagerung) angenommen wird^[57, 173]. In Gegenwart eines stark reduzierenden Thiols könnte das Peroxy-Radikal **60** allerdings auch bevorzugt zur 4'-hydroxylierten Vorstufe **57** des 4'-hydroxylierten Derivats **58** reagieren.

Eine zweite Hypothese, die von Goldberg und Mitarbeitern vertreten wird, besagt, daß es sich bei dem reduktionsempfindlichen Zwischenprodukt um das C4'-Oxy-Radikal **68** handelt. Wird dieses zur C4'-hydroxylierten Verbindung **57** reduziert, so führt dies schließlich zum Produkt **58**. Findet keine Reduktion statt, so sollte das Oxy-Radikal **68** über den klassischen β -Spaltungsmechanismus von Sauerstoff-Radikalen (über **69**) zum Phosphoglycolat^[46b] umlagern^[174]. Derselbe Mechanismus wird auch in den Abschnitten 3.2 und 3.5.1.1. zur Erklärung experimenteller Befunde herangezogen. Drei Aspekte lassen das Oxy-Radikal als die bessere Vorstufe für die Phosphoglycolat-Bildung erscheinen: 1) Die bevorzugte Erzeugung von Phosphoglycolaten an DSB-Stellen könnte durch die Bildung und anschließende Russel-Fragmentierung einer denkbaren O_4 -Brücke quer über die kleine Furche erklärt werden [Gl. (9)]^[46, 64, 174, 175]; 2) im Fall der DNA-Spaltung mit NCS-



chrom **2** erscheint eine Criegee-artige Umlagerung des Peroxids nicht wahrscheinlich (kein Metall, keine sauren Bedingungen)^[9d, 176]; 3) wird das Kohlenstoff-Radikal **55** anstelle von Sauerstoff von Misonidazol abgefangen, so bildet sich direkt das Oxy-Radikal **68**, und der Anteil an Phosphoglycolat **65** steigt an^[46b, 64, 66].

Für die C4'-Oxidation bei der DNA-Spaltung mit **2** gibt es folgende experimentellen Belege:

1) Den hochdruckflüssigkeitschromatographischen Nachweis des Oligonucleotids **58**, das die volle Länge, aber eine basische, 4'-hydroxylierte Stelle aufweist^[169]: Die Struktur dieses alkalabilen, geschädigten Oligonucleotids wurde durch die Charakterisierung des Pyridazins, das sich durch Umsetzung mit Hydrazin ergibt, und durch den Vergleich der Retentionszeiten derartiger Oligonucleotide nach ihrer Reduktion zu Diolen (zwei Diastereomere) mit der eines synthetischen (*R*)-Isomer-Standards ermittelt^[169].

2) Die Ergebnisse der PAGE-Analyse von 5'- ^{32}P -markierten Oligonucleotiden mit 3'-Phosphat-Endgruppe, 3'-Phosphoglycolaten **65** und dem Intermediat **59**^[170]: Letztere Verbindung wird wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Elektrophorese-Bedingungen für gewöhnlich auf Polyacrylamid-Gelen nicht direkt beobachtet^[170]. Ist der pH-Wert der aufladenden Pufferlösung größer als 8, so kann eine zweite β -Eliminierung stattfinden (insbesondere während der Hitze-Denaturierung vor dem Laden der Probe), die die Bande von **59** in die entsprechende 3'-Phosphatbande umwandelt. Eine eindeutige Quantifizierung der 4'-alkalabilen Oligonucleotide **58** kann demnach ausschließlich nach Überführung von **58** mit Hydrazin in ein stabiles 3'-(3-Pyridazinylmethyl)phosphat, das langsamer wandert als der ent-

sprechende Maxam-Gilbert-Sequenzmarker, erfolgen^[46b, 64] (Einzelheiten zu dieser Methode finden sich in Lit.^[177]). 3'-[³²P]-markierte Substrate führten typischerweise nur unter alkalischen Bedingungen zu Fragmenten mit 5'-Phosphat-Endgruppen^[46b].

3) Die nach Deuterierung der 4'-Position von Desoxyribosen erhaltenen Befunde^[64, 170]: Für die Glycolatbildung wurde ein kinetischer Isotopeneffekt k_H/k_D von 4 und für die Bildung des Pyridazins (Reaktionsweg über die 4'-hydroxylierte, abasische Stelle) einer von 3.7 ermittelt^[64]. Eine Analyse des kinetischen Isotopeneffekts an den T-Resten verschiedener GT-Sequenzen ergab für k_H/k_D Werte zwischen 2.5 und 5.5^[170].

4) Eine schwache Bande, die auf Polyacrylamid-Gelen nur langsam wandert: Sie wurde einem Addukt aus dem zur Aktivierung von **2** verwendeten Thiol und dem 3'-terminalen ungesättigten Zuckerrest in **59** (Michael-Addition) zugeordnet^[66b, 163].

3.4.2.2. CAL 5

Eine durch CAL **5** hervorgerufene H4'-Abstraktion von DNA-Zuckern ist an Doppelstrangschäden an der häufig vorkommenden, symmetrischen Spaltungsstelle 5'-GATCCT/3'-CTAGGA beteiligt. Die oxidierten Bindungen sind die C5'-H-Bindung des C-Rests auf dem TCCT-Strang und die C4'-H-Bindung des C-Rests auf dem anderen Strang^[12a, 55, 67b]. Als DNA-Spaltprodukte des 5'-[³²P]-markierten AGGA-Strangs wurden die 3'-Phosphoglycolat **65** und die 4'-hydroxylierten, abasischen Derivate **58** identifiziert, die als Pyridazinderivate durch PAGE-Analyse nachgewiesen werden konnten. Die Bildung eines Basenpropenals **64** konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die Bildung von Phosphoglycolat auf dem einen Strang immer an eine C5'-Chemie auf dem komplementären Strang gekoppelt. Diese Beobachtung stützt die Beteiligung einer O₄-Brücke an der Glycolatbildung (Russel-Fragmentierung, siehe Abschnitt 3.4.2.1)^[46b, 55]. Deuterierungsversuche mit anschließender ¹H-NMR-Spektroskopie^[12a] zeigten, daß das Deuteriumatom an C4' des letzteren C-Rests auf die C3-Position des reduzierten CAL-Diradikals **6** (siehe Schema 4) übertragen wird.

3.4.2.3. ESP 7-10

Eine H4'-Abstraktion tritt hier nur bei Doppelstrang-Spaltungen auf. Das Phosphoglycolat **65**, das 4'-hydroxylierte Derivat **59** und das 3'-Phosphat-Ende konnten durch Sequenzierung 5'-[³²P]-markierter DNA-Fragmente identifiziert werden^[57]. In Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen ESP C **8** und CAL **5** nimmt man an, daß die H4'-Abstraktion durch das C7-Radikalzentrum des aktivierte Wirkstoffs **11** (siehe Schema 4) erfolgt. Wie bei der C5'-Chemie (Abschnitt 3.5.1.3) wurde auch bei der C4'-Chemie kein Isotopeneffekt beobachtet^[57].

3.4.3. Bleomycin 17

Bei der DNA-Spaltung mit Metallbleomycinen sind zwei Produktgruppen identifiziert worden, die beide auf einen oxidativen Abbau von Zuckerbausteinen zurückzuführen und mittlerweile in allen Einzelheiten bekannt sind: Eine Produktgruppe setzt sich aus den Basenpropenalen **64**^[86, 178], den 3'-Phospho-

glycolaten **65**^[179] und 5'-Phosphat-Enden zusammen, und die zweite Gruppe besteht aus freien Basen^[180] und dem Folgeprodukt einer alkalilabilen Schädigung (4'-hydroxyliertes Derivat **58**)^[177a]. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist in Schema 17 als ③ dargestellt.

Wie anhand von Tritium- und Deuterium-Isotopeneffekten bei der H4'-Abstraktion gezeigt werden konnte^[19b, 181], ist die Bildung von freien Basen und Basenpropenalen vermutlich die Folge einer geschwindigkeitsbestimmenden C4'-H-Bindungsspaltung als erstem Reaktionsschritt und der sauerstoffabhängigen Weiterreaktion des Zwischenprodukts **55** im zweiten Schritt. Für die Freisetzung von Basen ist kein Zusatz von Sauerstoff erforderlich; es entsteht der oxidativ geschädigte Zucker **58**, der nur unter alkalischen Bedingungen (pH 12) zur Strangspaltung führt. Die Bildung von Basenpropenalen **64** erfordert – zusätzlich zu dem zur Überführung von BLM in seine aktivierte Form benötigten Sauerstoff – noch weiteren Sauerstoff und ist mit einer spontanen DNA-Strangtrennung und der Bildung von 3'-Phosphoglycolaten verbunden. Die Größe des 4'-Isotopeneffekts wird nicht von der Verteilung der Reaktion auf die beiden vorgeschlagenen Spaltungswege beeinflußt, reagiert jedoch empfindlich ($k_H/k_D = 2-7$) auf strukturelle und elektronische Veränderungen am Metallbleomycin, was die Bedeutung von die Ausrichtung des Übergangszustands begünstigenden Parametern unterstreicht^[182].

Die DNA-Spaltung von Substraten, die an anderen Positionen des Desoxyriboseringen deuteriert waren, ergab keinen Isotopeneffekt, was eine hohe Regiospezifität der BLM-katalysierten C-H-Bindungsspaltung vermuten läßt^[182].

*Mechanistischer Vorschlag für die Bildung von Basenpropenalen **64** und 3'-Phosphoglycolat-Enden **65**:* Unter aeroben Bedingungen reagiert das 4'-Radikal **55** schnell mit O₂ unter Bildung des 4'-Peroxy-Radikals **60**. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen diffusionskontrollierten Prozeß^[183a]. Das Schicksal des Peroxy-Radikals ist eingehend untersucht worden^[9b, 183]. Es hat eine Vielzahl von Reaktionsmöglichkeiten. Dazu zählen die Bildung von O₄-Verbindungen [Gl. (9)], die H-Abstraktion von Reduktionsmitteln wie Thiolen [Gl. (10)] oder ein Kettenabbruch als Folge einer Reduktion durch ein niedervalentes Übergangsmetall-Ion [Gl. (11)].



Das Peroxy-Radikal reagiert also hauptsächlich zum 4'-Hydroperoxid **61** und gegebenenfalls zum 4'-Oxy-Radikal **68**. Man vermutet, daß die weitere Umsetzung von **61** über eine säurekatalysierte, heterolytische Spaltung der Peroxid-O-O-Bindung in einer Criegee-artigen Umlagerung verläuft. Anstelle von Protonen als Katalysatoren könnte das Fe^{III}-BLM-Intermediat als Lewis-Säure katalytisch wirken. Ein Wassermolekül oder ein an Eisen gebundenes Hydroxid-Ion könnten das Carbokation-Zwischenprodukt **62** absangen, wobei zunächst **66** und anschließend das Dicarbonylderivat **67** als Vorstufe für **64** und **65** entsteht.

Die stereospezifische Abspaltung des 2'-(*pro-R*)-Protons aus Desoxyribose und die Tatsache, daß diese Freisetzung kinetisch günstiger ist als die Freisetzung des Basenpropenals **64** aus DNA^[178] führen zu einem alternativen Vorschlag für den Re-

aktionsmechanismus: Vom Carbokation **62** wird das 2'-(*pro-R*)-Proton abgespalten und gleichzeitig findet eine *anti*-Eliminierung an O4' statt, bei der das Zwischenprodukt **63** entsteht. Durch weitere Reaktionen können daraus **64**, **65** und das 5'-Phosphat-Ende entstehen. Dieser Mechanismus konnte durch den Einbau von ^{18}O in die Carbonylgruppe der 3'-Phosphoglycolate **65** (bei Versuchen, die mit $^{18}\text{O}_2$ durchgeführt wurden) und in die Aldehydfunktion von **64** (bei Versuchen, die mit H_2^{18}O durchgeführt wurden) bestätigt werden^[173].

Mechanistischer Vorschlag für die Abspaltung von Nucleobasen: Analog wie von Groves und McMurry^[89a] für P-450-Systeme vorgeschlagen (siehe auch Schema 8, Weg a) kann das C4'-Radikal **55** nach einem Radikal-Rückbindungsmechanismus reagieren, bei dem das C4'-hydroxylierte Zwischenprodukt **57** entsteht. Alternativ könnte auch eine Oxidation des Radikals **55** durch BLM-Fe^{IV}-OH (Elektronentransfer, siehe auch Schema 8, Weg b, und Abschnitt 2.3.1) zum C4'-Carbenium-Ion **56** erfolgen, aus dem durch Addition von Wasser das Zwischenprodukt **57** entstehen könnte. Dieses Zwischenprodukt kann zu freier Base und dem um eine Base ärmeren, C4'-hydroxylierten Derivat **58**, zerfallen. Unter alkalischen Bedingungen kann **58** gespalten werden, wobei 5'-Phosphat-Enden und 3'-Phosphat-Enden **59**, die einen ungesättigten, oxidierten Zuckerrest enthalten, entstehen. Oligonukleotide mit einem derartigen Zuckerrest sind vor wenigen Jahren bei der PAGE-Analyse der Produkte aus der Spaltung eines 5'-[^{32}P]-markierten DNA-Fragments mit BLM nachgewiesen worden^[170]. Das Zwischenprodukt **59** konnte auf mehrere Arten identifiziert werden: 1) Nach Stabilisierung durch Reduktion mit NaBH_4 , Reinigung und Hydrolyse mit P1-Nuclease und alkalischer Phosphatase entstand ein Gemisch aus *erythro*- und *threo*-2-Desoxypentitolen^[9b, 184]. 2) Bei der Umsetzung mit NaOH bildete sich ein 2,4-Dihydroxycyclopentenon^[177a, 185]. 3) Die Umsetzung mit wäßrigen Alkylaminen (z.B. Piperidin) führte zu freien 3'-Phosphat-Enden^[177a]. Die Reaktion von **58** mit Hydrazin, bei der 3'-(3-Pyridazinylmethyl)phosphat-Enden entstehen, ermöglicht eine quantitative Bestimmung dieses C4'-hydroxylierten Derivats^[177].

Um die Herkunft des Sauerstoff (aus molekularem Sauerstoff oder aus Wasser, je nachdem ob ein Rückbindungs- oder ein Elektronentransfer-Mechanismus vorliegt) im oxidierten Kohlenhydratbaustein des Derivats **58** zu ermitteln, hat man Versuche mit ^{18}O -markiertem Sauerstoff und Wasser unternommen^[9b, 99]. Es zeigte sich, daß das an C4' eingeführte Sauerstoffatom fast ausschließlich aus Wasser stammte, was den C4'-Carbeniumweg stützt.

DNA-Spaltungen mit photoaktiviertem Co^{III}-BLM zeigen Muster, die von der Bestrahlungsfrequenz abhängen, Sauerstoff-unabhängig sind und den mit Fe-BLM beobachteten sehr ähneln. Dies läßt vermuten, daß 3'-Phosphoglycolat-modifizierte Enden^[186], freie Basen und alkalilabile Derivate, die zu 3'-Phosphat-modifizierten Enden führen^[187], entstehen. Alle Fakten weisen auf eine C4'-Oxidation des Desoxyribose-Bausteins hin; der zu den beobachteten Produkten führende Mechanismus muß jedoch noch eindeutig nachgewiesen werden.

Was die Chemie der RNA-Spaltung betrifft^[110–112], so hat man vermutet, daß der Fe-BLM-gesteuerte RNA-Abbau oxidativ erfolgt. Experimentelle Daten weisen darauf hin, daß wäh-

rend der RNA-Spaltung Basen freigesetzt werden. Die PAGE-Analyse an den Enden markierter RNAs zeigt Spaltungsbanden, von denen man annimmt, daß sie 3'-Phosphoglycolat- und 5'-Phosphat-Enden zugeordnet werden können. Wegen der Empfindlichkeit von RNA gegen alkalische Bedingungen (alkalilabile Schäden sind schwierig nachzuweisen) und der Verschiedenartigkeit der Zuckerbausteine von RNA und DNA (falls 2-hydroxylierte Basenpropenale entstehen sollten, wären diese wahrscheinlich instabil und würden unter Freisetzung der Basen schnell hydrolysiert) ist es bisher nicht gelungen, für die RNA-Spaltung in gleicher Weise wie für die DNA-Spaltung einen molekularen Mechanismus aufzustellen.

Es stellt sich die Frage, ob beim BLM-gesteuerten DNA-Abbau zusätzlich noch eine „untergeordnete“ Chemie ablaufen kann. Sowohl für DNA^[188] als auch für den DNA-Strang eines RNA-DNA-Heterodoppelstranges^[189] ist zusätzlich eine H1'-Abstraktion postuliert worden. Obwohl diese Annahme berechtigt ist (die Aufweitung der kleinen Furche in derartigen Heterodoppelsträngen verbessert den Zugang von aktiviertem BLM zu H1' und zu H4'), konnte bisher kein Nachweis für einen DNA-Abbau durch C1'-Angriff erbracht werden^[190]. 1993 wurde berichtet, daß selbstkomplementäre Octadesoxyribonucleotide, die ein Ribo- oder ein Arabinonucleosid in einer Position enthalten, die dem Abbau durch Fe^{II}-BLM leicht zugänglich ist, aus einer C1'-Chemie hervorgehende Produkte ergaben^[191].

Es konnte auch nachgewiesen werden, daß aktiviertes BLM in einer Nebenreaktion Basen angreift. Die modifizierten Basen (wie 8-Hydroxyguanin, das in einer Menge entsteht, die etwa einem Hundertstel der Menge an Basenpropenal entspricht^[85]) sind identisch mit den Basen, die bei der Reaktion von Hydroxyl-Radikalen mit DNA entstehen. Dies läßt vermuten, daß auch an der Reaktion von BLM Hydroxyl-Radikale beteiligt sind, die wahrscheinlich durch eine teilweise Zersetzung des Oxo-Eisen-Komplexes entstehen, der den Hauptreaktionsweg, den oxidativen Abbau an C4' der DNA, bewirkt^[100].

3.4.4. Fe-EDTA, Fe-MPE und verwandte Verbindungen

Der Mechanismus der DNA-Spaltung mit Fe-EDTA und seinen Derivaten in Gegenwart von molekularem Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid ist nur für Fe-MPE genau untersucht worden. Was den Mechanismus der Spaltung mit Fe-EDTA selbst betrifft, so gibt es in der Literatur kaum Informationen darüber^[98]. Man nimmt allgemein an, daß sie ähnlich verläuft wie mit Fe-MPE. Einige ausgewählte Aspekte der Spaltung wurden mit Hybridmolekülen, in denen Fe-EDTA an sequenzspezifisch DNA-bindende Moleküle geknüpft ist, untersucht.

Der Mechanismus der DNA-Spaltung mit Fe-MPE ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden, es sind jedoch einige Charakteristika aufgedeckt worden^[98a]. Die aus Kalbsthymus-DNA freigesetzten Produkte entsprechen den vier Nucleotidbasen mit einem Ade + Thy/Gua + Cyt-Verhältnis, das mit den bekannten Werten für die Zusammensetzung der DNA übereinstimmt. Diese Beobachtung bestätigt die geringe Spezifität der Spaltung durch Fe-MPE. Basenfreisetzung und Strangtrennung sind stöchiometrisch. Als DNA-Endgruppen entstehen bei der Spaltung 5'-Phosphate und etwa gleiche Anteile an 3'-Phosphaten und 3'-Phosphoglycolaten. Es sind nur geringe Mengen an Basenpropenalen gefunden worden; da β -Mercaptoethanol (und wahr-

scheinlich auch DTT) mit Basenpropenalen reagiert^[198a], ließen sich diese Nucleosidreste – auch wenn sie gebildet würden – unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht nachweisen.

Alle Befunde weisen auf einen oxidativen Abbau der Desoxyriboseringe im DNA-Rückgrat hin. Dieser Abbau erfolgt höchstwahrscheinlich durch Hydroxyl-Radikale, die ein H-Atom abstrahieren und auf diese Weise die DNA-Spaltung einleiten können. Die Produktverteilung ließe sich mit C4'-Chemie als Hauptreaktionsweg und C1'-Chemie in der kleinen Furche oder C3'-Chemie in der großen Furche erklären.

Im Falle von Fe-MPE könnte der Hauptangriffspunkt das 4'-Wasserstoffatom der Desoxyribose sein, im Falle von Fe-EDTA konnte dies dagegen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine H4'-Abstraktion als erster Reaktionsschritt könnte die Freisetzung von Nucleobasen sowie die Bildung von 5'-Phosphaten und 3'-Phosphoglycolat-Enden **65** über einen Sauerstoff-abhängigen Reaktionsmechanismus erklären (siehe Schema 17). Das Fehlen von Basenpropenalen **64** (oder die erfolglosen Versuche, sie zu charakterisieren) erinnert an die Ergebnisse mit Cu(*o*P)₂ **1** und Endiinen. Für die untergeordnete C4'-Spaltung mit diesen Reagentien muß die Art der bei der C3'-C4'-Bindungsspaltung gebildeten monomeren Spezies noch geklärt werden (siehe Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2).

Das Vorhandensein signifikanter Mengen an 3'-Phosphat-Enden lässt sich möglicherweise durch eine C1'-Chemie erklären (siehe Schema 14). Wegen der Gegenwart von Reduktionsmitteln konnte jedoch kein 5-Methylen-2-furanon **33** nachgewiesen werden, so daß dieser Mechanismusvorschlag noch nicht bestätigt werden konnte^[19b, 98a]. Beide oben beschriebenen Reaktionen sollten sich in der kleinen Furche abspielen.

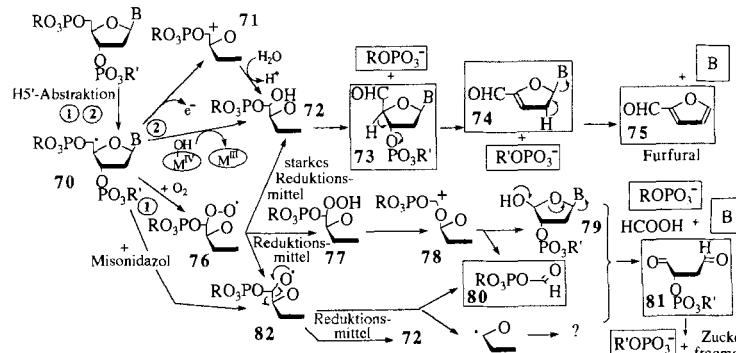
Es sind auch Reaktionen postuliert worden, die in der großen Furche ablaufen^[19b]. Durch H3'-Abstraktion (siehe Schema 1) wird das Radikal **45** (Schema 16) erzeugt. Sauerstoff-unabhängige Folgereaktionen dieser Spezies sollten zu freien Basen, 2-Methylen-3-furanon **48** sowie 3'-Phosphat- und 5'-Phosphat-Enden führen. In Gegenwart von Sauerstoff sollten 5'-Phosphat-Enden, 3'-Phosphoglycoaldehyd-Enden **53** (die zu Glycolsäure-Enden oxidiert würden) und Basenpropensäuren **54** (die nicht mit Thiobarbitursäure, dem üblicherweise zur Charakterisierung von Basenpropenalen verwendeten Reagens, reagieren sollten) entstehen. Diese Produkte würden einige von Hertzberg und Dervan^[198a] berichtete Ergebnisse erklären. Unwahrscheinlich ist ein derartiger Reaktionverlauf hingegen für Fe-EDTA-Derivate, die an Distamycin^[91, 113, 131a], Oligopeptide^[119, 131a, 133a] oder einige Proteine^[192] gebunden sind und deren oxidativer Angriff – PAGE-Analysen zufolge – eindeutig in der kleinen Furche stattfindet. Dagegen weist das Muster von Spaltungen durch Fe-EDTA-Konjugate mit Oligonucleotiden^[135] oder anderen Proteinen^[193] auf einen oxidativen Angriff aus der großen Furche heraus hin, so daß in diesen Fällen ein Mechanismus über eine H3'-Abstraktion denkbar ist. In ähnlicher Weise muß H5' (*pro R*) (H5' ist auf den Eingang der großen Furche gerichtet) als mögliche Zielgruppe einer oxidativen H-Abstraktion in Betracht gezogen werden (siehe Schema 18).

Als Alternative zu direkten, durch Hydroxyl-Radikale ausgelösten Wasserstoff-Abstraktion von Desoxyribose könnte auch zunächst die Base angegriffen werden. Dabei könnte entweder

eine radikalische Basenspezies erzeugt werden, die zur Abstraktion eines H-Atoms von Desoxyribose in der Lage wäre, oder es könnte eine basenlose Position entstehen, durch die ein Strangbruch herbeigeführt würde. Dieser alternative Reaktionsverlauf basiert auf der Vorstellung, daß mit dem Strangbruch eine Basenschädigung einhergeht^[19b].

3.5. H5'-Abstraktion: Endiine und kationische Manganporphyrine

Ein oxidativer Angriff auf die C5'-Position von Desoxyribose ist bisher nur für Endiine und Mn-TMPyP nachgewiesen worden. Die Oxidation der Desoxyribose wird von diesen Verbindungen durch H5'-Abstraktion ausgelöst, wodurch das C5'-Radikal **70** entsteht (Schema 18).



Schema 18. Mögliche Reaktionsmechanismen, wenn der erste Angriff der oxidierenden Spezies (①: Endiine (2, 5, 7–10), ②: 19) auf das C5'-Atom der Desoxyribose gerichtet ist [159].

3.5.1. Endiine

3.5.1.1. NCS-chrom 2

C5'-Chemie ist die wichtigste Art der DNA-Spaltung mit **2**: Alle Einzelstrangbrüche und zumindest die Spaltung eines Stranges bei Doppelstrangbrüchen gehen auf sie zurück.

SSB-Schäden bestehen zu 80% aus Brüchen, bei denen ein 5'-Aldehyd (**73**, Schema 18) einem 3'-Phosphat-Ende gegenübersteht, während in 20% der Fälle ein Desoxyribosebaustein abgespalten wird und freie Basen zusammen mit 3'-Phosphat- und 5'-Phosphat-Enden resultieren.

Das durch aktiviertes **2** erzeugte C5'-Radikal **70** reagiert mit O₂ (wie durch den Einbau von ¹⁸O₂ nachgewiesen werden konnte^[194]) zum 5'-Peroxy-Radikal **76**. Dessen Reduktion durch einen Überschuß an Thiol (oder an einem anderen starken Reduktionsmittel) könnte Literaturangaben zufolge zum 5'-Hydroxy-Radikal **72** führen. Eine mögliche Alternative zu diesem Reaktionsweg wäre die Bildung von **72** aus **82**. Durch spontane Spaltung von **72** bildet sich der 5'-Aldehyd **73**. Nucleoside mit einer 5'-Aldehydfunktion konnten nach enzymatischer Hydrolyse durch HPLC nachgewiesen werden^[195]. Außerdem hat man bei der PAGE-Analyse 3'-[³²P]-markierter DNA-Fragmente festgestellt, daß die 5'-Aldehyde **73** ein abnormes Laufverhalten zeigen^[196]. Aldehyde laufen etwa gleich schnell wie die durch chemische Umsetzung nach dem Maxam-Gilbert-Verfahren herge-

stellten Marker mit einem 5'-Phosphat-Ende und zwei Nucleotiden mehr. Wegen der Anwesenheit von Reduktionsmitteln wurde weder das Zwischenprodukt **74** noch das Endprodukt **75** (Schema 18) beobachtet. Einige Banden auf Polyacrylamid-Gelen konnten 5'-COOH-endenden Fragmenten zugeordnet werden, deren Bildung vermutlich auf der Gegenwart von Metallspuren beruht^[19e, 196].

Ein gewisser Anteil der C5'-Chemie (10–20 %) führt zu Spalten („gaps“) bei gleichzeitigem Verlust einer Base. Die Fragmente enden als 5'- und 3'-Phosphat^[196]. Als Erklärung für derartige Schädigungen sind zwei Mechanismen vorgeschlagen worden: 1) Das Peroxy-Radikal **76** wird zum Hydroperoxid **77** reduziert, das in einer Criegee-artigen Umlagerung über die Zwischenprodukte **78** und **79** zu den beobachteten Produkten **80** und **81** reagiert. Dieser Mechanismus scheint nicht sehr wahrscheinlich, da weder eine Säure- noch eine Metallkatalyse beteiligt ist^[19d, 64, 173]. 2) Das Peroxy-Radikal **76** geht in das Oxy-Radikal **82** über, aus dem durch β -Fragmentierung unter C4'-C5'-Bindungsspaltung das instabile, als 3'-Formylphosphat endende Fragment **80** entsteht, das zu Ameisensäure und einem 3'-Phosphat-Ende hydrolysiert. Bei Doppelstrangbrüchen kann die Bildung des Oxy-Radikals **82** über eine O₂-Brücke erklärt werden [siehe Gl. (9)]^[46b]. Wird Sauerstoff durch Misonidazol ersetzt, so sind diese Spalten fast die einzige Form der DNA-Schädigung^[52, 197]. Ein ¹⁸O-Transferexperiment ergab darüber hinaus, daß der Carbonyl-Sauerstoff der aktivierte Formylgruppe (abgefangen als Formyl-Tris-Addukt) von einem Sauerstoffatom aus der Nitrogruppe des Misonidazols stammt^[198]. Die spontane Übertragung des Formylrests in **80** auf Nucleophile (Tris oder Hydroxylamin)^[197, 198] und ein durch Reduktion mit NaBH₄ stabilisiertes Derivat von **81**^[199] konnten nachgewiesen werden.

Da C5' an der Peripherie des DNA-Doppelstrangs lokalisiert ist, sollten die empfindlichen Zwischenprodukte **76** und **82** leicht zur C5'-hydroxylierten Verbindung **72** reduziert werden können, was die bevorzugte Bildung des 5'-Aldehyds **73** und die Unabhängigkeit von der Reduktionskraft des Thiols erklären würde.

Kleine Isotopeneffekte wurden bei der Abstraktion von Deuterium aus der 5'-Position von T-Resten doppelsträngiger Oligonucleotide beobachtet, die eine TGTTTGA-Sequenz ($k_H/k_D = 1.6$)^[64], eine 5'-AGC/3'-TCA-Sequenz (1.25) oder ein Restriktionsfragment des pBr322-Plasmids (1–1.6 bei T-Resten von 5'-GT-Sequenzen, andere T-Reste zeigten dagegen eine veränderliche Empfindlichkeit gegenüber der 5'-Deuterierung) enthielten^[170]. Das H5'-Atom aus der Desoxyribose wird vom C6-Radikalzentrum des aktivierte NCS-chrom-Diradikals **4** aufgenommen (siehe Schema 3)^[53].

3.5.1.2. CAL 5

CAL **5** steuert Doppelstrangbrüche an bevorzugten Wechselwirkungsstellen: Das C6-Radikalzentrum von aktiviertem CAL, **6** (siehe Schema 4)^[12a, 56] spaltet das *pro-S*-H5' vom zweiten Nucleotidrest der Vier-Basen-Sequenzen 5'-TCCT und 5'-TTT ab^[51, 67a]. Bei der PAGE-Analyse der Spaltung des TCCT-Strangs zeigten die 5'-[³²P]-markierten Fragmente daselbe Laufverhalten wie die entsprechenden Maxam-Gilbert-Sequenzmarker, was auf das Vorhandensein von 3'-Phosphat-Enden hinweist^[51, 67b]. Zwei 3'-markierte Hauptfragmente konnten analysiert werden, eines mit einem 5'-Aldehyd-Ende,

73 (Schema 18), und eines mit einem 5'-Carbonsäure-Ende (in Abhängigkeit davon, ob Metallspuren vorhanden waren, wie für NCS-chrom **2** beschrieben)^[51].

3.5.1.3. ESP 7–10

Durch ESP A **7** ausgelöste Einzelstrangbrüche verlaufen ausschließlich über C5'-Umsetzungen, und auch an durch ESP C **8** ausgelösten Doppelstrangbrüchen ist C5'-Chemie beteiligt^[57]. Im zweiten Fall löst der aktivierte Wirkstoff eine H4'- und eine H5'-Abstraktion an den beiden DNA-Strängen aus. An einigen Resten tritt ausschließlich C5'-Chemie auf, während an anderen beide Reaktionsformen beobachtet werden. Die PAGE-Analyse der Spaltung 5'-[³²P]- oder 3'-[³²P]-endmarkierter DNA-Substrate ergab 3'-Phosphat-Enden und die Fragmente **73** mit einer 5'-Aldehyd-Endgruppe. Die 5'-Aldehyd-Funktion wurde durch die übliche Reduktion mit NaBH₄ zum 5'-Alkohol oder durch die Umsetzung mit Piperidin (wodurch zwei aufeinanderfolgende β -Eliminierungen an **73** unter Verlust der Desoxyribose-Einheit katalysiert werden) zum 5'-Phosphat-Ende nachgewiesen.

Die Werte sequenzspezifischer Isotopeneffekte bei der DNA-Spaltung erweisen sich als sehr niedrig (nur unwesentlich verschieden von 1). Darüber hinaus hatte – anders als bei NCS-chrom **2** – die Deuterierung der C5'- oder der C4'-Position keinen Einfluß auf die Verteilung des oxidativen Angriffs^[57]. Die H5'-Abstraktion erfolgt durch das C10-Radikalzentrum des Diradikals **11** (siehe Schema 4)^[57].

3.5.2. Kationische Manganporphyrine

Mit aktiviertem Mn-TMPyP ist die oxidative Aktivierung der C5'-H-Bindung^[147] – neben dem oxidativen C1'-H-Angriff – der Hauptmechanismus für die Spaltung AT-reicher Sequenzen doppelsträngiger DNA^[137, 138d] (② in Schema 18). Bei der HPLC-Analyse der Produkte, die nach einem Erhitzungsschritt in Lösung vorlagen, wurden freie Basen, oxidierte Nucleoside **74**^[200] und Furfural **75**^[164] beobachtet und charakterisiert. Durch HPLC-Trennverfahren oder durch PAGE-Analyse ist es gelungen, die Spaltfragmente kleiner Oligonucleotide zu analysieren^[137, 138e, 146, 147, 201], und nach Umwandlung durch chemische oder enzymatische Reaktionen konnten diese identifiziert werden: Fragmente mit 3'-Phosphat-Ende wurden alkalischer Phosphatase ausgesetzt, um die entsprechenden Oligonucleotide mit 3'-OH-Ende zu erhalten; Fragmente mit 5'-Aldehyd-Endgruppe wurden erhitzt (wodurch zwei aufeinanderfolgende β -Eliminierungen ausgelöst werden, siehe unten), mit I₂ im Alkalischen oxidiert (5'-COOH-Endgruppe oder mit NaBH₄ reduziert (5'-CH₂OH-Endgruppe). In Abhängigkeit vom Spaltungsgrad und von der am 3'-Ende der (A · T)₃-Stelle befindlichen Sequenz konnten direkt nach der Spaltung von 3'-[³²P]-markierten Oligonucleotiden Fragmente mit 5'-COOH-Endgruppe nachgewiesen werden^[201, 202].

Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist in Schema 18 dargestellt. Das aktivierte kationische Metalloporphyrin startet die Oxidation der Desoxyribose durch H5'-Abstraktion, die zum C5'-Radikal **70** führt. Selbst in Abwesenheit von Sauerstoff (mit und ohne Sauerstoff wurde dieselbe Spaltungsreaktivität beobachtet: M. Pitié et al., unveröffentlichte Ergebnisse) kann **70** entweder direkt durch TMPyP-Mn^{IV}-OH oder in zwei Schrit-

ten durch Einelektronentransfer und anschließende Reaktion des dabei gebildeten Carbokations **71** mit Wasser zum 5'-OH-Derivat **72** hydroxyliert werden. Es folgt eine spontane Spaltung, bei der ein 3'-Phosphat-Ende und der Aldehyd **73** entstehen (direkter Bruch des DNA-Rückgrats). Eine erste β -Eliminierung führt zu einem zweiten Bruch am DNA-Rückgrat, bei dem ein 5'-Phosphat-Ende und der α,β -ungesättigte Aldehyd **74** freigesetzt werden. Durch eine zweite β -Eliminierung werden schließlich die freie Base und Furfural **75** als das Zuckerabbau-Produkt erhalten. Die manchmal nachgewiesenen Fragmente mit 5'-COOH-Endgruppe sind vermutlich auf eine zweite Oxidation durch das regenerierte aktivierte Mn-TMPyP an derselben Stelle zurückzuführen.

Die vollständige Charakterisierung des Zwischenprodukts **74** gelang durch Reduktion mit NaBH_4 (selektive Reduktion der Aldehydfunktion an C5' zur Alkoholfunktion, ohne daß die Doppelbindung angegriffen wird) und anschließende Pd/C-Hydrierung, die zu 2',3'-Didesoxyribonucleosiden führte, die entweder die natürlich vorkommende β - oder die nichtnatürliche α -Konfiguration an C4' zeigten^[200]. ^{31}P -NMR-spektroskopisch konnte die Bildung von zwei 3'- und 5'-Phosphatmonoester-Endgruppen in etwa gleichen Mengen bestätigt werden, ein Befund, der den oben beschriebenen Mechanismus stützt^[164d].

Es sollte noch erwähnt werden, daß die selektive C5'-Chemie des Mn-TMPyP/ KHSO_5 -Systems an beiden 3'-Enden der (A · T)₃-Doppelstrang-Bruchstelle stattfinden kann. Dies führt zu einer 3'-Verschiebung der Spaltstücke um vier Basenpaare^[147], wodurch der oxidative Angriff des aktivierten Metallporphyrins aus der kleinen Furche der DNA heraus bestätigt wird (siehe Schema 11).

3.6. Abschließende Bemerkungen zu Abschnitt 3

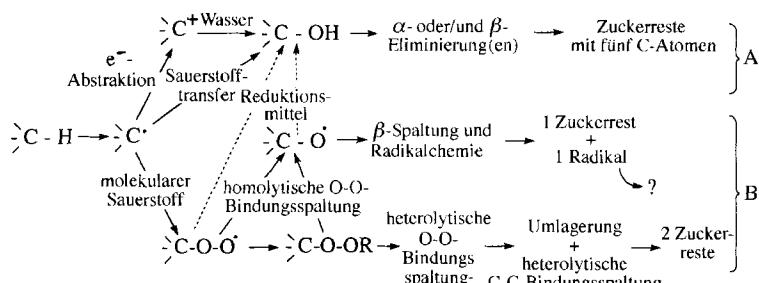
Der in diesem Teil beschriebene oxidative Angriff chemischer Nucleasen und Wirkstoffe auf DNA beginnt mit der Bildung eines Kohlenstoff-Radikalzentrums in der 1', 2', 3', 4'- oder 5'-Position von Desoxyribose (Schema 19). Dieser erste Reaktionsschritt entspricht formal einer Einelektronen-Oxidation ($\text{H}^+ = \text{H}^+ + \text{e}^-$). Einige DNA-Spaltungsreagentien sind dagegen zu Zweielektronen-Oxidationen fähig, und nur in diesen Fällen ist eine direkte Hydroxylierung des C-Radikalzentrums entweder durch Sauerstoff- oder durch Elektronentransfer möglich (siehe Schema 8, Wege a und b). Findet keine C-C-Bindungsspaltung statt, so kann das instabile hydroxylierte Derivat zu einem der folgenden, aus fünf Kohlenstoffatomen bestehenden Zuckerresten weiterreagieren, von denen jeder für einen be-

stimmten ersten Oxidationsschritt charakteristisch ist (Schema 19 oben): 5-Methylen-2-furanon **33** (Angriff auf C1'), 3-Methylen-2-furanon **48** (C3'), C4'-hydroxyliertes, abasisches Derivat **58** (C4') und Furfural **75** (C5').

Ist der Sauerstoff- oder Elektronentransfer zu langsam (wie im Fall von BLM) oder ist das DNA-Spaltungsreagens nur zu einer Einelektronen-Oxidation fähig (wie im Fall von Endiinen und photoaktivierbaren Halogenuracil-Oligonucleotiden), dann reagiert das C-Radikalzentrum mit molekularem Sauerstoff (auf neuere Arbeiten über die Kinetik der Sauerstoff-Rückbindung bei Hydroxylierungen ist unter Zitat [203] verwiesen). Das dabei entstehende instabile Peroxy-Radikal kann durch Reduktionsmittel [siehe Gl. (10) und (11)] oder durch intramolekulare Wasserstoff-Übertragung (siehe Lit. [64]) zu einem Hydroperoxid ($\text{R} = \text{H}$) reduziert werden. Durch heterolytische Spaltung der Peroxid-O-O-Bindung können eine Umlagerung und die anschließende heterolytische Spaltung einer benachbarten C-C-Bindung des Zuckers (beispielsweise durch eine Criegee-artige Umlagerung) ausgelöst werden. In der Regel werden zwei Zuckerfragmente beobachtet (oder können beobachtet werden). In Abhängigkeit davon, welches der Zucker-Kohlenstoffatome ursprünglich angegriffen wurde und welche der benachbarten C-C-Bindungen gespalten wird, können zwei Sets aus jeweils zwei Zuckerfragmenten entstehen: entweder Einkohlenstoff- plus Vierkohlenstoff-Fragmente (C2'-Chemie: Ameisensäure und **42**; C5'-Chemie: **80** und **81**) oder Zweikohlenstoff- plus Dreikohlenstoff-Fragmente (C3'-Chemie: **53** und **54**; C4'-Chemie: **65** und **64**). Alternativ kann – beispielsweise nach Kombination von zwei Peroxy-Radikalen (O_2 -Weg) – eine homolytische Spaltung der Peroxid-O-O-Bindung stattfinden, wodurch ein Oxy-Radikal erzeugt wird, das zu einer homolytischen Spaltung derselben benachbarten C-C-Bindung führen kann. Die β -Spaltung des Oxy-Radikals würde zwei Arten von Fragmenten ergeben: Eines davon ist identisch mit dem auf dem zuvor beschriebenen Weg erzeugten Fragment: **42** (C2'), **54** (C3'), **65** (C4') und **80** (C5'), während es sich bei dem anderen Fragment um ein Radikal handelt, dessen Schicksal unbekannt ist und dessen Endprodukte bisher noch nicht beschrieben sind.

Zusätzlich können das Oxy- und das Peroxy-Radikal auch als reduktionsempfindliche Intermediate betrachtet werden, deren mögliche Reduktion auf einem Konkurrenzweg zum hydroxylierten Zucker führt.

Alle diese Reaktionswege sind in den Schemata 17 und 18 für die C4'- bzw. C5'-Chemie in Einzelheiten dargestellt. In Schema 15 ist die C2'-Hydroxylierung (die zu Ribo- oder Arabino-Derivaten führen würde) nicht wiedergegeben, da unter den gegebenen experimentellen Bedingungen weder eine Zweielektronen-Oxidation durch Halogenuracil-Derivate noch eine Reduktion eines reduktionsempfindlichen Intermediats stattfinden können. Zusätzlich sei darauf hingewiesen, daß bisher keine chemischen Reagentien beschrieben worden sind, die C2' direkt hydroxylieren. Das hydroxylierte Produkt in Schema 16 muß in Abwesenheit von Sauerstoff nach einer Einelektronen-Oxidation des Zwischenprodukts **45** (vermutlich durch den angeregten Zustand des Rhodiumkomplexes) entstehen; die genaue



Schema 19. Die durch den Wirkstoff ausgelöste Ein- (B) oder Zweielektronen-Oxidation (A) führt zu drei Hauptreaktionswegen für den Zuckerabbau ($\text{R} = \text{H}, \text{OOR}'$).

Form der zur H3'-Abstraktion fähigen Spezies ist bisher jedoch noch nicht bekannt. Die in Schema 14 aufgeführten Produkte können auf einfache Weise über eine Hydroxylierung von C1' erklärt werden. Außer oxidierten abasischen Stellen sind keine weiteren DNA-Abbauprodukte beschrieben worden, vermutlich weil die glycosidische Bindung leichter gespalten wird als die Zucker-C-C-Bindung.

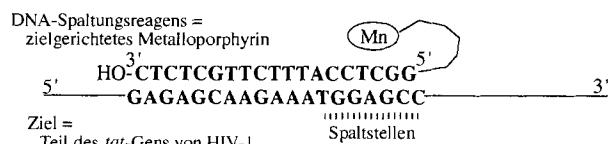
4. Schlußbemerkungen

Außer den Nuclease-Enzymen sind keine natürlich vorkommenden, niedermolekularen Verbindungen bekannt, die die Hydrolyse von Phosphodiester-Bindungen des DNA-Rückgrats wirkungsvoll katalysieren. Die von der Natur für cytotoxische Wirkstoffe (Bleomycine, Endiine) gewählte Spaltungsweise ist eine Zuckeroxidation und keine Phosphodiester-Hydrolyse. Es ist somit nicht überraschend, daß sich Übergangsmetallkomplexe mit Redoxeigenschaften und einer gewissen Affinität zu DNA als „chemische Nucleasen“ herausgestellt haben (die Bezeichnung ist nicht ganz treffend; wie wäre es mit „chemische DNA-Zucker-Oxidasen“?) Die Desoxyribose ist ein Hauptangriffspunkt für DNA-Spaltungsreagentien, und wir haben hier eine Übersicht über den derzeitigen Kenntnisstand hinsichtlich der verschiedenen Arten, Desoxyribose-Einheiten zu oxidieren, gegeben. Die Entwicklung künstlicher und selektiver DNA-Spaltungsreagentien ist sowohl im Hinblick auf das rationale Design von Antitumormitteln und antiviralen Agentien als auch im Bereich der Molekularbiologie ein zukunftsträchtiges Gebiet. Der Bedarf an äußerst effizienten (es muß eine quantitative Spaltung der Zielgruppe erfolgen) und sehr spezifischen (Sequenzspezifität bei großen DNA-Fragmenten) Spaltungsreagentien ist einleuchtend, und es sind diesbezüglich bereits beachtliche Erfolge erzielt worden. In einigen Bereichen sind noch Verbesserungen erforderlich:

1) Spaltungseffizienz: Um neue cytotoxische Agentien und gute Werkzeuge für die Gen-Technik zu erhalten, bedarf es der Entwicklung von DNA-Spaltungsreagentien (und von hocheffizienten RNA-Spaltungsreagentien), die katalytisch wirken und eindeutig Doppelstrangbrüche herbeiführen. Die Endiine sind auf dem Gebiet der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs ein Beispiel dafür, wie das Verständnis von Chemie und Wirkungsweise das Design von hocheffizienten In-vitro-Wirkstoffen (siehe die von Nicolaou und Smith^[19b] beschriebenen synthetischen Dynemicin-Analoga) unterstützt. Es bleibt jedoch offen, ob derartige In-vitro-Wirksamkeiten auf In-vivo-Bedingungen übertragen werden können.

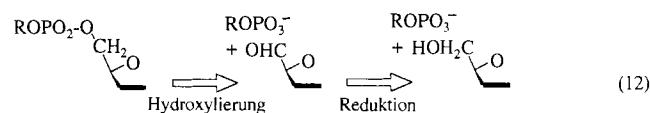
2) Spezifität: Der spezifische Angriff auf eine bestimmte Molekülstelle, ohne daß eine Streuung der Schädigung auftritt, stellt ebenfalls eine besondere Herausforderung dar, insbesondere wenn doppelsträngige Genom-DNA das eigentliche Ziel ist. In einigen Anwendungsbereichen ist diese Eigenschaft nicht erforderlich: Einige nichtselektive chemische Nucleasen finden Verwendung als Footprinting-Reagentien für DNA oder RNA und haben gewisse Vorteile gegenüber DNase. Durch kovalente Bindung der DNA-spalgenden Reagentien an Oligonucleotide oder an DNA-bindende kleine Moleküle, Peptide oder Proteine konnte die Sequenzselektivität drastisch erhöht werden. Besonders die Verknüpfung effizienter DNA-Spaltungsreagentien mit

Desoxynucleotiden sollte zu einer Klasse synthetischer Restriktionsenzyme mit maßgeschneiderter Spezifität führen. Diese könnten bei der Analyse komplexer Genome hilfreich sein oder die Fähigkeit eines Antisense-Oligonucleotids, die Expression des Zielgens zu blockieren, verbessern. Als Beispiel für die letztere, medizinische Anwendung haben wir kürzlich die Verknüpfung des Spaltungsreagens {Tris(methylpyridinoyl)porphinato}-mangan(III) mit cytotoxischen Eigenschaften^[1204] mit einem ausgewählten 19mer-Vektor beschrieben. Das dabei entstandene Addukt konnte eine einsträngige 35mer-DNA, die das Initiations-Codon des *tat*-Gens von HIV-1 enthielt, selektiv erkennen und spalten (Schema 20)^[149].



Schema 20. Selektive Spaltung einer einsträngigen 35mer-DNA, die das Initiations-Codon des *tat*-Gens von HIV-1 enthält, durch ein maßgeschneidertes Manganporphyrin [149].

3) Oxidierende Agentien mit der Fähigkeit, DNA-Fragmente mit geeigneten Endgruppen für eine weitere enzymatische Aufarbeitung zu produzieren: Obwohl mittlerweile die Spaltung einer jeden ausgewählten DNA-Sequenz möglich ist, so wurde doch bis heute noch keine effiziente chemische Modellverbindung für ein Restriktionsenzym gefunden, die gezielt eine Phosphodiester-Bindung hydrolysiert. Dieser Hydrolyseschritt sollte jedoch über einen anderen Reaktionsweg nachgeahmt werden können, nämlich durch Hydroxylierung des 3'- oder 5'-Kohlenstoffatoms der Desoxyribose und eine unmittelbar anschließende Reduktion des entstandenen 3'-Ketons bzw. 5'-Aldehyds (Oxidationsschritt + Reduktionsschritt = „Pseudohydrolyse“). Dies konnte kürzlich mit Hilfe des Mn-TMPyP/KHSO₅-Systems, das spezifisch die C5'-Position von Desoxyribose hydroxyliert, nachgewiesen werden [Gl. (12)]. Die auf diese Weise entstehenden Fragmente könnten durch chemische Methoden wieder verknüpft werden, so daß dieses System als Alternative zu Restriktions-Endonuclease/Ligase-Systemen anzusehen ist^[1202].



Selbst nach einem Jahrzehnt erfolgreicher Forschung auf dem Gebiet chemischer Nucleasen bietet dieses Gebiet noch viele Möglichkeiten, nach neuen, effizienten Spaltungsreagentien für RNA und doppelsträngige DNA zu suchen mit dem Ziel, neue, selektive cytotoxische Agentien und/oder Werkzeuge für die Gen-Technik zu erhalten.

5. Addendum

Im folgenden sei, jeweils unter Angabe des betreffenden Abschnitts, auf Veröffentlichungen zum Thema dieser Übersicht hingewiesen, die seit dem Einreichen des Originalmanuskripts erschienen sind.

Abschnitt 2.1: Es ist gelungen, Megabasen-DNA-Substrate mit einem Cu(*o*P)-modifizierten DNA-bindenden Protein zu spalten^[205]. Mit Hilfe eines Kupferphenanthrolin-modifizierten Proteins konnte die Struktur des *Escherichia coli*-Fis-DNA-Komplexes ermittelt werden^[206].

Abschnitt 2.2: Kürzlich wurde die Beteiligung von Diradikalen an der Spaltung von DNA mit dem Neocarzinostatin-Chromophor **2** diskutiert^[207]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der Iod-Substituent des Calicheamicin-Oligosaccharids und die Guanin-C2-NH₂-Gruppe in der kleinen Furche der Ziel-DNA eine wichtige Funktion haben^[208].

Abschnitt 2.3: Die Stabilität der oxygenierten Form von Fe^{II}-BLM ist erforscht worden^[209]. Elektrospray-Massenspektren von aktiviertem Bleomycin führen zu der Annahme, daß die aktive Spezies ein Eisenperoxid, BLM-Fe^{III}-OOH ist^[210]. Daselbe Eisenperoxid wurde auch bei Bleomycin-Modellverbindungen vorgeschlagen^[211]. Ein aus Bleomycin und dem DNA-bindenden Bereich der Rekombinase Hin zusammengesetztes Hybridmolekül konnte als DNA-Spaltungsreagens verwendet werden^[212]. Beide Stränge einer DNA-RNA-Heterodoppelhelix konnten mit Fe-BLM gespalten werden^[213].

Abschnitt 2.4: Fe-MPE und Fe-EDTA wurden verwendet, um RNA-Bereiche in eukaryontischen Ribosomen zu kartieren. Die RNA-Fragmente wurden durch Primer-Verlängerung mit reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligodesoxynukleotid-Primern analysiert^[214]. Die Selbstspaltung von RNA-EDTA-Fe^{II} wurde zur Untersuchung der Tertiärstruktur von tRNA^{Phe} eingesetzt^[215].

Abschnitt 2.5: Die Übertragung eines Sauerstoffatoms in Wasser von TMPyP-Mn^{V=O} auf ein wasserlösliches Olefin wurde untersucht. Als Erklärung für den Einbau von Sauer-

stoffatomen aus dem Wasser und dem Peroxid im Verhältnis 50:50 wurde eine „Redoxtautomerie“ unter Beteiligung eines axialen Wassermoleküls vorgeschlagen^[216]. Die Wechselwirkung kationischer Porphyrinderivate mit Kalbsthymus-DNA wurde durch Lineardichroismus und Fluoreszenz-Energietransfer untersucht^[217].

Abschnitt 2.6: Die Bindung von *Δ*- und *Λ*-[Ru(phen)₃]²⁺ an ein selbstkomplementäres Decamer ist NMR-spektroskopisch untersucht worden^[218]. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die enantioselektive Erkennung von DNA durch Rh^{III}(phen)₂(phi) **20** über die durch Veränderungen infolge eines Propeller-artigen Drehens eines Basenpaares entstehende Öffnung in der tiefen Furche gesteuert wird^[219].

Die Autoren sind zahlreichen Mitarbeitern, deren Namen in den Literaturzitaten zu finden sind, zu tiefem Dank verpflichtet. Wir danken außerdem dem Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), der Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, Villejuif), der Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS, Paris), der Region Midi-Pyrénées und Gensem (Paris) für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit sowie Lisa Rosenberg (University of British Columbia) für ihre Unterstützung beim Erstellen des Manuskripts.

Eingegangen am 3. September 1993,

veränderte Fassung am 12. Februar 1994,

Addendum am 31. Oktober 1994 [A 21]

Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen, Boffzen

- [1] B. N. Ames, *Science* **1983**, *221*, 1256–1264; W. Troll, R. Wiesner, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *25*, 509–528; P. A. Cerutti, *Science* **1985**, *237*, 375–381; M. K. Shigenaga, C. J. Gimeno, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9697–9701; *Methods Enzymol.* **1990**, *186* (A und B) (beide Bände sind Sauerstoff-Radikalen in biologischen Systemen gewidmet); T. Kalebic, A. Kinter, G. Poli, M. E. Anderson, A. Meister, A. Fauci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 986–990; J. R. Wagner, C. C. Hu, B. N. Ames, *ibid.*

Anhang: Wichtige im Text verwendete Abkürzungen

A:	2'-Desoxyadenosin
Ade:	Adenin
bpy:	Bipyridin
BLM:	Bleomycin
bp:	Basenpaar
C:	2'-Desoxycytidin
CAL:	Calicheamicin
Cyt:	Cytosin
DSB:	Doppelstrangbruch
DTT:	Dithiothreit
DYN:	Dynemicin
e ⁻ :	Elektron
EDTA:	Ethyldiamintetraacetat
ESP:	Esperamicin
G:	2'-Desoxyguanosin
Gua:	Guanin
GSH:	Glutathion
ME:	Mercaptoethanol
5-MF:	5-Methylen-2-furanon
MPA:	3-Mercaptopropionsäure
MPE:	Methidiumpropyl-EDTA
N:	Nucleotid
NADH:	Nicotinamidadenin-Dinucleotid, reduzierte Form
NCS:	Neocarzinostatin
NCS-chrom:	Neocarzinostatin-Chromophor

ODN:	Oligodesoxyribonucleotid ^[*]
<i>o</i> P:	ortho-Phenanthrolin = 1,10-Phenanthrolin ^[**]
PAGE:	Polyacrylamid-Gelektrophorese
phi:	Phenanthrenchinonidiimin
phen:	1,10-Phenanthrolin
Porph:	Porphyrinatoligand
pu:	Purin
Py:	Pyridin
pyr:	Pyrimidin
TMPyP:	<i>meso</i> -Tetrakis(<i>N</i> -methylpyridinio-4-yl)porphyrinato
SSB:	Einzelstrangbruch
T:	Thymidin
TAR:	transaktivierbarer Bereich
tat:	Transaktivator der Transkription
Thy:	Thymin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ura:	Uracil

[*] Die Desoxyribo-Vorsilbe wurde in diesem Beitrag in der Regel weggelassen, da er sich weitgehend auf DNA konzentriert.

[**] Die klassische Abkürzung ist phen (siehe J. Reedijk, *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: G. Wilkinson), Pergamon, 1987, S. 73–98). Wir haben uns jedoch entschlossen, für den Bis(1,10-phenanthrolin)kupfer-Komplex die Abkürzung Cu(*o*P)₂, die durch Forschungsarbeiten von D. Sigman über oxidative DNA-Spaltungen populär geworden ist, beizubehalten.

- 1992, 89, 3380–3384; zit. Lit.; M. Becana, R. Klucas, *ibid.* 1992, 89, 8958–8962; A. W. Khan, Y. H. Mei, T. Wilson, *ibid.* 1992, 89, 11426–11427; S. Xanthoudakis, G. Miao, F. Wang, Y. C. E. Pan, T. Curran, *EMBO J.* 1992, 11, 3323–3335; D. I. Feig, L. A. Loeb, *Biochemistry* 1993, 32, 4466–4473; S. Legrand-Poels, M. Hoebeke, D. Vaira, B. Rentier, J. Piette, *J. Photochem. Photobiol. B* 1993, 17, 229–237.
- [2] H. Sies, *Angew. Chem.* 1986, 98, 1061–1075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986, 25, 1058–1071; I. Fridovich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1983, 23, 239–257.
- [3] E. C. Friedberg, *DNA Repair*, Freeman, New York, 1985; M. M. Cox, I. R. Lehman, *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56, 229–262; A. Sancar, G. B. Sancar, *ibid.* 1988, 57, 29–67; R. M. Story, I. T. Weber, T. A. Steitz, *Nature (London)* 1992, 355, 318–325; S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* 1992, 31, 106–110.
- [4] J. Cadet, M. Berger, C. Decarroz, J. R. Wagner, J. E. van Lier, Y. M. Ginot, P. Vigny, *Biochimie* 1986, 68, 813–834; C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, Philadelphia, 1987; C. von Sonntag, H.-P. Schuchmann, *Methods Enzymol.* 1994, 233, 3–19.
- [5] H. Urata, K. Yamamoto, M. Akagi, H. Hiroaki, S. Uesugi, *Biochemistry* 1989, 28, 9566–9569; J. Piette, *J. Photochem. Photobiol. B* 1991, 11, 241–260; H. Kasai, Z. Yamaizumi, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9692–9694; L. P. Candeias, S. Steenken, *ibid.* 1993, 115, 2437–2440; N. Paillois, P. Vicendo, J. *Photochem. Photobiol. B* 1993, 20, 203–209.
- [6] B. Demple, J. Halbrook, *Nature (London)* 1983, 304, 466–468; J. F. Mouret, F. Odin, M. Polverelli, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* 1990, 3, 102–110.
- [7] S. Steenken, *Chem. Rev.* 1989, 89, 503–520; A. J. S. C. Vieira, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6986–6994.
- [8] D. G. Knorre, O. S. Federova, E. I. Frolova, *Russ. Chem. Rev. (Engl. Transl.)* 1993, 62, 65–86.
- [9] a) S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* 1986, 19, 383–391; b) J. Stubbe, J. W. Koza-rich, *Chem. Rev.* 1987, 87, 1107–1136; c) D. H. Petering, R. W. Byrnes, W. E. Antholine, *Chem. Biol. Interact.* 1990, 73, 133–182; d) I. H. Goldberg, *Acc. Chem. Res.* 1991, 24, 191–198; e) *Free Radical Biol. Med.* 1987, 3, 41–54; f) M. D. Lee, G. A. Ellestad, D. B. Borders, *Acc. Chem. Res.* 1991, 24, 235–243; g) K. C. Nicolaou, W. M. Dai, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1453–1481; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1387–1416; K. C. Nicolaou, A. L. Smith, E. W. Yue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 5881–5888; h) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 497–503; i) J. S. Taylor, P. G. Schultz, P. B. Dervan, *Tetrahedron* 1984, 40, 457–465; j) I. Lee, J. K. Barton, *Biochemistry* 1993, 32, 6121–6127, zit. Lit.; k) D. S. Sigman, T. W. Bruice, A. Mazumder, C. L. Sutton, *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 98–104; l) T. Tanaka, M. Hirama, K.-I. Fujita, M. Ishiguro, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993, 1205–1207.
- [10] A. P. Grollman, M. Moriya, *Trends Genet.* 1993, 9, 246–249.
- [11] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, 1984.
- [12] a) A. Mazumder, J. A. Gerlt, M. J. Absalon, J. Stubbe, R. P. Cunningham, J. Withka, P. H. Bolton, *Biochemistry* 1991, 30, 1119–1126; b) J. J. Hangeland, J. J. De Voss, J. A. Heath, C. A. Townsend, W. D. Ding, J. S. Ashcroft, G. A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9200–9202.
- [13] D. Suck, C. Oefner, *Nature (London)* 1986, 321, 620–625; J. A. McClarin, C. A. Frederick, B. C. Wang, P. Greene, H. W. Boyer, J. Grable, J. M. Rosenberg, *Science* 1986, 234, 1526–1541.
- [14] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 1980, 65, 499–560.
- [15] a) D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 12269–12272; b) D. S. Sigman, *Acc. Chem. Res.* 1986, 19, 180–186; c) C. Yoon, M. D. Kuwabara, R. Law, R. Wall, D. S. Sigman, *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 8458–8463; d) D. S. Sigman, *Biochemistry* 1990, 29, 9097–9105; e) J. M. Veal, R. L. Hill, *ibid.* 1991, 30, 1132–1140; f) A. Spassky, *ibid.* 1992, 31, 10502–10509.
- [16] V. M. Downey, B. G. Que, A. G. So, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 93, 264.
- [17] L. E. Marshall, D. R. Graham, K. A. Reich, D. S. Sigman, *Biochemistry* 1981, 20, 244–250.
- [18] G. R. Alastair Johnson, N. B. Nazhat, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 1990–1994.
- [19] L. D. Williams, J. Thivierge, I. H. Goldberg, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 11607–11615.
- [20] M. Dizdaroglu, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *Biochemistry* 1990, 29, 8447–8451.
- [21] J. M. Veal, K. Merchant, R. L. Rill, *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 3383–3388.
- [22] L. E. Pope, D. S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 3–7.
- [23] J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, M. Chassignol, N. T. Thuong, J.-S. Sun, C. Hélène, *Biochemistry* 1988, 27, 2272–2276.
- [24] K. A. Reich, L. E. Marshall, D. R. Graham, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 3582–3584.
- [25] T. B. Thederahn, M. D. Kuwabara, T. A. Larsen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 4941–4946.
- [26] S. Goldstein, G. Czapski, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2244–2250.
- [27] H. Drew, A. Travers, *Cell* 1984, 37, 491–502.
- [28] M. Kuwabara, C. Yoon, T. Goyne, T. Thederahn, D. S. Sigman, *Biochemistry* 1986, 25, 7401–7408.
- [29] a) L. Marshal Pope, K. A. Reich, D. R. Graham, D. S. Sigman, *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 12121–12128; b) D. S. Sigman, C. B. Chen, *Metal-DNA Chemistry* (Hrsg.: T. D. Tullius) (ACS Symp. Ser. 1989, 402, 24–47).
- [30] J. M. Veal, R. L. Rill, *Biochemistry* 1988, 27, 1822–1827.
- [31] C. Yoon, M. D. Kuwabara, A. Spassky, D. S. Sigman, *Biochemistry* 1990, 29, 2116–2121.
- [32] J. M. Veal, R. L. Rill, *Biochemistry* 1991, 30, 1132–1140.
- [33] a) D. S. Sigman, A. Spassky, S. Rimsky, H. Buc, *Biopolymers* 1985, 24, 183–197; b) A. Spassky, D. S. Sigman, *Biochemistry* 1985, 24, 8050–8056.
- [34] C. B. Chen, D. S. Sigman, *Science* 1987, 237, 1197–1201.
- [35] G. J. Murakawa, C. B. Chen, M. D. Kuwabara, D. P. Nierlich, D. S. Sigman, *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 5361–5375.
- [36] C. B. Chen, D. S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83, 7147–7151.
- [37] J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 5891–5898.
- [38] C. B. Chen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6570–6572.
- [39] J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Barbier, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 9702–9706.
- [40] J.-S. Sun, J.-C. François, R. Lavery, T. Saison-Behmoaras, T. Montenay-Garestier, N. T. Thuong, C. Hélène, *Biochemistry* 1988, 27, 6039–6045.
- [41] R. H. Ebright, Y. W. Ebright, P. Shannon, Pendergrast, A. Gunasekera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 2882–2886; C. L. Sutton, A. Mazumder, C.-h. B. Chen, D. S. Sigman, *Biochemistry* 1993, 32, 4225–4230.
- [42] S. D. Jayasena, B. H. Johnston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 3526–3530.
- [43] C. B. Chen, M. B. Gorin, D. S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 4206–4210.
- [44] C. B. Chen, A. Mazumder, J.-F. Constant, D. S. Sigman, *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 69–77.
- [45] A. D. Baker, R. J. Morgan, T. C. Strekas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992, 1099–1100.
- [46] a) P. C. Dedon, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 1992, 31, 1909–1917; b) P. C. Dedon, Z.-W. Jiang, I. H. Goldberg, *ibid.* 1992, 31, 1917–1927.
- [47] R. D. Groneberg, T. Miyazaki, N. A. Stylianides, T. J. Schulze, W. Stahl, E. P. Schreiner, T. Suzuki, Y. Iwabuchi, A. L. Smith, K. C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 7593–7611; A. L. Smith, E. N. Pitsinos, C.-K. Hwang, Y. Mizuno, H. Saimoto, G. R. Scarlato, T. Suzuki, K. C. Nicolaou, *ibid.* 1993, 115, 7612–7624; K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, M. Nakada, K. Shibayama, E. N. Pitsinos, H. Saimoto, Y. Mizuno, K.-U. Baldenius, A. L. Smith, *ibid.* 1993, 115, 7625–7635; siehe auch K. C. Nicolaou, *Angew. Chem.* 1993, 105, 1462–1471; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 1377–1385.
- [48] R. G. Bergman, *Acc. Chem. Res.* 1973, 6, 25–31.
- [49] N. Zein, W. J. McGahren, G. O. Morton, J. Ashcroft, G. A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 6888–6890.
- [50] D.-H. Chin, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 1986, 25, 1009–1015.
- [51] N. Zein, A. M. Sinha, W. J. McGahren, G. A. Ellestad, *Science* 1988, 240, 1198–1201.
- [52] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 3312–3316.
- [53] S. M. Meschwitz, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 3047–3051.
- [54] a) S. M. Meschwitz, R. G. Schultz, G. W. Ashley, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 1992, 31, 9117–9121; b) D.-H. Chin, I. H. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 1914–1915; c) *Biochemistry* 1993, 32, 3611–3616.
- [55] P. C. Dedon, A. A. Salzberg, J. Xu, *Biochemistry* 1993, 32, 3617–3622.
- [56] J. J. De Voss, C. A. Townsend, W.-D. Ding, G. O. Morton, G. A. Ellestad, N. Zein, A. B. Tabor, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 9669–9670.
- [57] D. F. Christner, B. L. Frank, J. W. Kozarich, J. Stubbe, J. Golik, T. W. Doyle, I. E. Rosenberg, B. Krishnan, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 8763–8767.
- [58] a) M. F. Semmelhack, J. Gallagher, D. Cohen, *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 1521–1522; b) P. A. Wender, R. C. Kelly, S. Beckam, B. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 8835–8839; c) Y. Sugiura, T. Arakawa, M. Uesugi, T. Shiraki, H. Ohkuma, M. Konishi, *Biochemistry* 1991, 30, 2989–2992.
- [59] Y. Uesawa, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 164, 903–911.
- [60] T. Shiraki, Y. Sugiura, *Biochemistry* 1990, 29, 9795–9798.
- [61] V. Favaudon, R. L. Charnas, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 1985, 24, 250–259.
- [62] Y. Uesawa, Y. Sugiura, *Biochemistry* 1991, 30, 9242–9246.
- [63] D. Dasgupta, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 1985, 24, 6913–6920.
- [64] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, B. L. Frank, L. Worth, Jr., D. F. Christner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Biochemistry* 1991, 30, 2034–2042.
- [65] A. Galat, I. H. Goldberg, *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 2093–2099.
- [66] a) L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 6706–6710; b) *Biochemistry* 1992, 31, 9081–9089.
- [67] a) S. Walker, R. Landovitz, W. D. Ding, G. A. Ellestad, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 4608–4612; b) N. Zein, M. Poncin, R. Nilakantan, G. A. Ellestad, *Science* 1989, 244, 697–699; c) J. Drak, N. Iwasawa, S. Danishesky, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 7464–7468; d) J. Aiyar, S. J. Danishesky, D. M. Crothers, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114,

- 7552–7554; c) K. C. Nicolaou, S.-C. Tsay, T. Suzuki, G. F. Joyce, *ibid.* **1992**, *114*, 7555–7557.
- [68] a) Y. Sugiura, Y. Uesawa, Y. Takahashi, J. Kuwahara, J. Golik, T. W. Doyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7672–7676; b) B. H. Long, J. Golik, S. Forenza, B. Ward, R. Rehfuss, J. C. Dabrowiak, J. J. Catino, S. T. Musial, K. W. Brookshire, T. W. Doyle, *ibid.* **1989**, *86*, 2–6; c) H. Kishikawa, Y.-P. Jiang, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5434–5440.
- [69] M. Uesugi, Y. Sugiura, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4622–4627.
- [70] Y. Sugiura, T. Shiraki, M. Konishi, T. Oki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3831–3835.
- [71] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, S. H. Wu, J. Stubbe, L. Worth, Jr., J. W. Koza-rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2797–2798.
- [72] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot. Ser. A* **1966**, *19*, 200–209.
- [73] H. Umezawa in *Bleomycin: Current Status and New Developments* (Hrsg.: S. K. Carter, S. T. Crooke, H. Umezawa), Academic Press, New York, **1978**, S. 15–19.
- [74] H. Suzuki, K. Nagai, H. Yakami, N. Tanaka, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 446–448; Y. Fujiwara, T. Kondo, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 323–333.
- [75] A. Kénani, C. Bailly, N. Helbecque, J.-P. Catteau, R. Houssin, J.-L. Bernier, J.-P. Hénichart, *Biochem. J.* **1988**, *253*, 497–504.
- [76] S. J. Brown, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1996–1997.
- [77] A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2811–2820; A. Suga, T. Sugiyama, Y. Sugano, A. Kittaka, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, K. Maeda, *Synlett* **1989**, 70–71.
- [78] A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2821–2833.
- [79] Y. Kaku, M. Otsuka, M. Ohno, *Chem. Lett.* **1989**, 611–614; A. Suga, T. Sugiyama, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, K. Maeda, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1191–1204.
- [80] M. Otsuka, T. Masuda, A. Haupt, M. Ohno, T. Shiraki, Y. Sugiura, K. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838–845.
- [81] B. J. Carter, K. S. Reddy, S. M. Hecht, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2463–2474.
- [82] K. Shinozuka, H. Morishita, T. Yamazaki, Y. Sugiura, H. Sawai, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6869–6872.
- [83] L. F. Povirk in *Molecular Aspects of Anti-cancer Drug Action* (Hrsg.: S. Neidle, M. J. Waring), Verlag Chemie, Weinheim, **1983**, S. 157–181.
- [84] a) E. A. Sausville, J. Peisach, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2740–2746; b) H. Sugiyama, R. E. Kilkuskie, L.-H. Chang, L.-T. Ma, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3852; c) G. R. Buettner, P. L. Moseley, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9784–9788.
- [85] a) R. B. Van Atta, E. C. Long, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2722–2724; b) K. Kohda, H. Kasai, T. Ogawa, T. Suzuki, Y. Kawazoe, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1028–1030.
- [86] L. Giloni, M. Takeshita, F. Johnson, C. Iden, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 8608–8615.
- [87] a) Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5208–5215; b) R. M. Burger, J. Peisach, S. B. Horwitz, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11636–11644; c) R. M. Burger, J. S. Blanchard, S. B. Horwitz, J. Peisach, *ibid.* **1985**, *260*, 15406–15409.
- [88] A. Natrajan, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3997–4002.
- [89] a) T. J. McMurry, J. T. Groves in [89d], S. 1–28; b) V. Ullrich, *Top. Curr. Chem.* **1979**, *83*, 67–104; c) R. E. White, M. J. Coon, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 315–356; d) *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Hrsg.: P. Ortiz de Montellano), Plenum, New York, **1985**; e) A. Sorokin, A. Robert, b) Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7293–7299.
- [90] a) B. Meunier, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411–1456; b) J. T. Groves, R. C. Haushalter, M. Nakamura, T. E. Nemo, B. J. Evans, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884–2886; c) D. Mandon, R. Weiss, K. Jayaraj, A. Gold, J. Terner, E. Bill, A. X. Trautwein, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4404–4409; d) O. Bortolini, B. Meunier, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 1364–1365; e) O. Bortolini, M. Ricci, B. Meunier, P. Friant, I. Ascone, J. Goulon, *Nouv. J. Chim.* **1986**, *10*, 39–49.
- [91] a) N. Murugesan, G. M. Ehrenfeld, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8600–8603; b) N. Murugesan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 493–500; c) *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 3835–3836.
- [92] R. M. Moriarty, R. Pennasta, I. Prakash, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4699–4702; E. C. Long, S. A. Hecht, *ibid.* **1988**, *29*, 6413–6416.
- [93] R. S. Magliozzo, J. Peisach, *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 608–611.
- [94] G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *136*, 1013–1020; *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 133–140; B. Meunier, *New J. Chem.* **1992**, *16*, 203–211.
- [95] M. Girardet, B. Meunier, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2955–2958.
- [96] a) G. Padbury, S. G. Sligar, R. Labeque, L. J. Marnett, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7846–7852; b) A. Natrajan, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4532–4538.
- [97] R. E. Shepherd, T. J. Lomis, R. R. Koepsel, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 222–224.
- [98] a) R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3934–3945; b) D. W. Celander, T. R. Cech, *ibid.* **1990**, *29*, 1355–1361; c) R. V. Prigodich, C. T. Martin, *ibid.* **1990**, *29*, 8017–8019.
- [99] L. E. Rabow, G. H. McGall, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3203–3208.
- [100] E. Gajewski, O. I. Aruoma, M. Dizdaroglu, B. Halliwell, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2444–2448.
- [101] L. L. Guan, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6141–6145.
- [102] J. C. Dabrowiak in *Advances in Inorganic Biochemistry* (Hrsg.: G. L. Eichhorn, L. G. Marzilli), Elsevier, New York, **1982**, S. 69–113.
- [103] J. Kuwahara, Y. Sugiura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2459–2463.
- [104] R. P. Hertzberg, M. J. Caranfa, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3164–3174; E. C. Long, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5272–5276.
- [105] B. Gold, V. Dange, M. A. Moore, A. Easstman, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2347–2349.
- [106] L. F. Povirk, Y.-H. Han, R. J. Steighner, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5808–5814.
- [107] R. J. Steighner, L. F. Povirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8350–8354.
- [108] D. S. Sergeyev, V. F. Zarytova, S. V. Mamaev, T. S. Godovikova, V. V. Vlasov, *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 235–241; V. F. Zarytova, D. S. Sergeyev, T. S. Godovikova, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 189–193.
- [109] A. Hüttnerhofer, S. Hudson, H. F. Noller, P. K. Mascharak, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24471–24475.
- [110] B. J. Carter, E. de Vroom, E. C. Long, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, S. M. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9373–9377.
- [111] C. E. Holmes, B. J. Carter, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4293–4307, zit. Lit.
- [112] R. S. Magliozzo, J. Peisach, M. R. Ciriolo, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 428–432.
- [113] R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 313–315.
- [114] C. H. L. Kennard, *Inorg. Chim. Acta* **1967**, *1*, 347–354.
- [115] T. D. Tullius, B. A. Dombroski, *Science* **1985**, *230*, 679–681.
- [116] T. D. Tullius, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 297–300.
- [117] T. D. Tullius, *Nature (London)* **1988**, *332*, 663–664.
- [118] S.-B. Lin, K. R. Blake, P. S. Miller, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1054–1061.
- [119] R. S. Youngquist, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2565–2569.
- [120] R. P. Hertzberg, S. M. Hecht, V. L. Reynolds, I. J. Molineux, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1249–1258.
- [121] S. I. Gunderson, K. A. Chapman, R. R. Burgess, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1539–1546.
- [122] M. E. A. Churchill, J. J. Hayes, T. D. Tullius, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6043–6050.
- [123] M. A. Price, T. D. Tullius, *Biochemistry* **1993**, *32*, 127–136; A. M. Burkhoff, T. D. Tullius, *Cell* **1987**, *48*, 935–943.
- [124] M. E. A. Churchill, T. D. Tullius, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4653–4656.
- [125] M. W. Van Dyke, R. P. Hertzberg, P. B. Derwan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 5470–5474; L. H. Hurley, C.-S. Lee, J. P. McGovern, M. A. Warpehoski, M. A. Mitchell, R. C. Kelly, P. A. Aristoff, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3886–3892.
- [126] M. Sawadogo, R. G. Roeder, *Cell* **1985**, *43*, 165–175; H.-M. Jantzen, U. Strähle, B. Gloss, F. Stewart, W. Schmid, M. Boshart, R. Miksicek, G. Schütz, *ibid.* **1987**, *49*, 29–38; N. F. Landolfi, X.-M. Yin, J. D. Capra, P. W. Tucker, *Biotechniques* **1989**, *7*, 500–504.
- [127] C. P. H. Vary, J. N. Vourakas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6978–6982.
- [128] I. L. Cartwright, R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, S. C. Elgin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 3213–3217; H. Richard-Foy, G. L. Hager, *EMBO J.* **1987**, *6*, 2321–2328.
- [129] T. D. Tullius, B. A. Dombroski, M. E. A. Churchill, L. Kam, *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 537–558.
- [130] P. B. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464–471.
- [131] a) R. S. Youngquist, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5528–5529; b) W. S. Wade, P. B. Dervan, *ibid.* **1987**, *109*, 1574–1575; c) P. G. Schultz, J. S. Taylor, P. B. Dervan, *ibid.* **1982**, *104*, 6861–6863.
- [132] J. H. Griffin, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5008–5009.
- [133] a) J. P. Sluka, S. J. Horvath, M. F. Bruist, M. I. Simon, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 1129–1132; b) R. S. Youngquist, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7564–7566.
- [134] a) A. S. Boutorin, V. V. Vlassov, S. A. Kazakov, I. V. Kutiavin, M. A. Podyminogin, *FEBS Lett.* **1984**, *172*, 43–46; b) B. C. F. Chu, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 963–967; c) G. B. Dreyer, P. B. Dervan, *ibid.* **1985**, *82*, 968–972; d) M. Boidot-Forget, N. T. Thuong, M. Chassignol, C. Hélène, *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* **1986**, *302*, 75–80.
- [135] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650; S. A. Strobel, H. E. Moser, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7927–7929; T. J. Povis, P. B. Dervan, *ibid.* **1989**, *111*, 3059–3061; S. A. Strobel, P. B. Dervan, *ibid.* **1989**, *111*, 7286–7287; D. A. Horne, P. B. Dervan, *ibid.* **1990**, *112*, 2435–2436.

- 2437; S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Science* **1990**, *249*, 73–75; L. C. Griffin, L. L. Kiessling, P. A. Beal, P. Gillespie, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7976–7982; H. Han, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3806–3810.
- [136] S. Prince, F. Körber, P. R. Cooke, J. R. Lindsay Smith, M. A. Mazid, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1993**, *49*, 1158–1160.
- [137] B. Ward, A. Skorobogaty, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6875–6883.
- [138] a) J. Bernadou, G. Pratviel, F. Bennis, M. Girardet, B. Meunier, *Biochemistry* **1989**, *28*, 7268–7275; b) E. Fouquet, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1169–1171; c) G. Pratviel, J. Bernadou, M. Ricci, B. Meunier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 1212–1218; d) B. Ward, R. Rehfuss, J. C. Dabrowiak, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *4*, 685–695; e) J. C. Dabrowiak, B. Ward, J. Goodisman, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3314–3322.
- [139] R. J. Fiel, T. A. Beerman, E. H. Mark, N. Datta-Gupta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *107*, 1067–1074.
- [140] R. W. Byrnes, R. J. Fiel, N. Datta-Gupta, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *67*, 225–241.
- [141] M. Rodriguez, T. Kodadek, M. Torres, A. J. Bard, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 123–131.
- [142] J. M. Kelly, M. J. Murphy, D. J. McConnell, C. OhUigin, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 167–184; D. Praseuth, A. Gaudemer, J. B. Verlhac, I. Kraljic, I. Sissoeff, E. Guille, *Photochem. Photobiol.* **1986**, *44*, 717–724; C. Sentagne, B. Meunier, N. Pailloux, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *16*, 47–59; D. T. Croke, L. Perrouault, M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Mansuy, C. Hélène, T. Le Doan, *ibid.* **1993**, *18*, 41–50; T. Le Doan, L. Perrouault, M. Rougee, R. Bensasson, C. Hélène in *Photodynamic Therapy of Tumours and Other Diseases* (Hrsg: G. Jori, C. Perria), Libreria Progetto, Padova, Italien, **1985**, S. 56–58.
- [143] a) S. D. Bromley, B. Ward, J. C. Dabrowiak, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 9133–9148; b) B. Ward, A. Skorobogaty, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7827–7833; c) G. Raner, B. Ward, J. C. Dabrowiak, *J. Coord. Chem.* **1988**, *19*, 17–23; d) *Porphyrins as Probes of DNA Structure and Drug-DNA Interactions*; G. Raner, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *ACS Symp. Ser.* **1989**, *402*, 74–89; e) R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, *ibid.* **1989**, *402*, 59–73; f) R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, J. J. Villafranca, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5409–5417; g) J. A. Strickland, L. G. Marzilli, K. M. Gay, W. D. Wilson, *ibid.* **1988**, *27*, 8870–8878; h) R. J. Fiel, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *6*, 1259–1273; i) L. G. Marzilli, *New J. Chem.* **1990**, *14*, 409–420.
- [144] X. Hui, N. Gresh, B. Pullman, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1109–1114; R. Lavery, B. Pullman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *2*, 1021–1032; P. K. Weiner, R. Langeridge, J. M. Blaney, R. Schaefer, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3754–3758.
- [145] L. G. Marzilli, G. Pethö, M. Lin, M. S. Kim, D. W. Dixon, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7575–7577; M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Dupré, D. Mansuy, J. B. Le Pecq, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4205–4215.
- [146] R. B. Van Atta, J. Bernadou, B. Meunier, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4783–4789.
- [147] M. Pitié, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3967–3971.
- [148] L. Ding, J. Bernadou, B. Meunier, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 201–206.
- [149] C. Casas, C. J. Lacey, B. Meunier, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 366–371; M. Pitié, C. Casas, C. J. Lacey, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 607–609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 557–559.
- [150] a) A. M. Pyle, J. K. Barton, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, *38*, 413–475; b) N. J. Turro, J. K. Barton, D. A. Tornalia, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 332–340; c) J. K. Barton, *Science* **1986**, *233*, 727–734; d) C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5518–5523; e) M. B. Fleisher, K. C. Waterman, N. J. Turro, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 3551–3552.
- [151] E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 273–279.
- [152] J. P. Rehmann, J. K. Barton, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1701–1709, 1710–1717.
- [153] S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2573–2584; S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *ibid.* **1992**, *31*, 9319–9324; C. Hiort, B. Nordén, A. Rodger, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1971–1982; C. Hiort, P. Lincoln, B. Nordén, *ibid.* **1993**, *115*, 3448–3454; A. E. Friedman, C. V. Khumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2595–2602.
- [154] a) A. M. Pyle, E. C. Long, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4520–4522; b) M. R. Kirshenbaum, R. Tribble, J. K. Barton, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7943–7960.
- [155] N. Grover, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7030–7031; N. Grover, N. Gupta, P. Singh, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2014–2020; H. Y. Mei, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1339–1343; J. M. Kelly, D. J. McConnell, C. OhUigin, A. B. Tossi, A. Kirsch-De Mesmaeker, A. Masschelein, J. Nasiecki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1821–1823; H. Y. Mei, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7414–7416.
- [156] B. C. Müller, A. L. Raphael, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1764–1768; R. J. Baseman, D. W. Pratt, M. Chow, P. Dowd, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5726.
- [157] A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2303–2312.
- [158] S. S. David, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2984–2985.
- [159] Die in den Schemata 13–18 eingerahmten Produkte sind tatsächlich nachgewiesen und vollständig (oder zumindestens teilweise) charakterisiert worden. Die negativen Ladungen an Phosphodiester-Einheiten und terminalen Phosphatgruppen wurden weggelassen.
- [160] T. E. Goyne, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2846–2848.
- [161] L. S. Kappen, C. Chen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4331–4340.
- [162] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1027–1032.
- [163] M. Manoharan, A. Mazumder, S. C. Ransom, J. A. Gerlt, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2690–2691; V. Bailly, W. G. Verly, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9489–9496.
- [164] a) J. Bernadou, B. Lauretta, G. Pratviel, B. Meunier, *C.R. Acad. Sci. Ser. 3* **1989**, *309*, 409–414; b) G. Pratviel, M. Pitié, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 718–720; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 702–704; c) G. Pratviel, M. Pitié, J. Bernadou, B. Meunier, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6283–6288; d) G. Gasmi, M. Pasdeloup, G. Pratviel, M. Pitié, J. Bernadou, B. Meunier, *ibid.* **1991**, *19*, 2835–2839.
- [165] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6720–6721.
- [166] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, K. Fujimoto, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4443–4448.
- [167] M. Dizdaroglu, D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag, *Z. Naturforsch. C* **1977**, *32*, 1021–1022.
- [168] W. D. Henner, S. M. Grunberg, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 11750–11754; W. D. Henner, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, W. A. Haseltine, *ibid.* **1983**, *258*, 711–713.
- [169] I. Saito, H. Kawabata, T. Fujiwara, H. Sugiyama, T. Matsuura, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8302–8303.
- [170] B. L. Frank, L. Worth, Jr., D. F. Christner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2271–2275.
- [171] P. C. Dedon, I. H. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14713–14716.
- [172] T. Hatayama, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5890–5898.
- [173] G. H. McGall, L. E. Rabow, G. W. Ashley, S. H. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4958–4967.
- [174] D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1985**, S. 11–40.
- [175] C. von Sonntag, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1980**, *37*, 7–77.
- [176] G. H. McGall, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 48–55.
- [177] a) H. Sugiyama, C. Xu, N. Murugesan, S. M. Hecht, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Biochemistry* **1988**, *27*, 58–67; b) H. Sugiyama, H. Kawabata, T. Fujiwara, Y. Dannoue, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5252–5257.
- [178] R. M. Burger, S. J. Projan, S. B. Horwitz, J. Preisach, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15955–15959.
- [179] N. Murugesan, C. Xu, G. M. Ehrenfeld, H. Sugiyama, R. E. Kilkuskie, L. O. Rodriguez, L. H. Chang, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1985**, *24*, 5735–5744.
- [180] J. C. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4694–4697.
- [181] J. W. Kozarich, L. Worth, Jr., B. L. Frank, D. F. Christner, D. E. Vanderwall, J. Stubbe, *Science* **1989**, *245*, 1396–1398.
- [182] L. Worth, Jr., B. L. Frank, D. F. Christner, M. J. Absalon, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2601–2609.
- [183] a) K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 1–9; b) C. von Sonntag, *Int. J. Radiat. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1984**, *46*, 507–518; c) E. Bothe, G. Behrens, E. Böhm, B. Sethuram, D. Schulte-Frohlinde, *ibid.* **1986**, *49*, 57–66.
- [184] L. E. Rabow, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3169–3203.
- [185] H. Sugiyama, C. Xu, N. Murugesan, S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4104–4105.
- [186] T. G. Wenzel, C. H. Chang, C. F. Meares, *Biochemistry* **1985**, *24*, 3060–3069.
- [187] I. Saito, T. Morii, H. Sugiyama, T. Matsuura, C. F. Meares, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2307–2308.
- [188] S. M. Hecht in *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects* (Hrsg.: S. M. Hecht), Springer, New York, **1979**, S. 1–23.
- [189] C. R. Krishnamoorthy, D. E. Vanderwall, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2008–2009.
- [190] M. J. Absalon, C. R. Krishnamoorthy, G. McGall, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4179–4185.
- [191] R. J. Duff, E. de Vroom, A. Geluk, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3350–3351.
- [192] J. P. Sluka, S. J. Horvath, A. C. Glasgow, M. I. Simon, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6551–6561; D. P. Mack, J. P. Sluka, J. A. Shin, J. H. Griffin, M. I. Simon, P. B. Dervan, *ibid.* **1990**, *29*, 6561–6567.
- [193] M. G. Oakley, P. B. Dervan, *Science* **1990**, *248*, 847–850; M. G. Oakley, M. Mrksich, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10969–10975.
- [194] D.-H. Chin, S. A. Carr, I. H. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 9975–9978.
- [195] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1988**, *22*, 4872–4878.
- [196] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1983**, *22*, 4872–4878.
- [197] D.-H. Chin, L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7070–7074.

- [198] L. S. Kappen, T. R. Lee, C. Yang, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4540–4542.
- [199] H. Kawabata, H. Takeshita, T. Fujiwara, H. Sugiyama, T. Matsuura, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4263–4266.
- [200] G. Pratviel, M. Pitié, C. Périgaud, G. Gosselin, J. Bernadou, B. Meunier, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 149–151.
- [201] M. Pitié, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier in *The Activation of Dioxigen and Homogeneous Catalytic Oxidation* (Hrsg.: D. H. R. Barton, A. E. Martell, D. T. Sawyer), Plenum, New York, **1993**, S. 333–346.
- [202] G. Pratviel, V. Duarte, J. Bernadou, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7939–7943.
- [203] V. W. Bowry, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5699–5707; J. K. Atkinson, K. U. Ingold, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9209–9214.
- [204] L. Ding, G. Etemad-Moghadam, B. Meunier, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7868–7875; L. Ding, G. Etemad-Moghadam, S. Cros, C. Auclair, B. Meunier, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 900–906.
- [205] P. S. Pendergrast, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *Science* **1994**, *265*, 959–962.
- [206] C. Q. Pan, J. A. Feng, S. E. Finkel, R. Landgraf, D. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1721–1725.
- [207] O. D. Hensens, D.-H. Chin, A. Stassinopoulos, D. L. Zink, L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4534–4538;
- A. G. Myers, S. B. Cohen, B. M. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1670–1682.
- [208] T. Li, Z. Zeng, V. A. Estevez, K. U. Baldenius, K. C. Nicolaou, G. F. Joyce, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3709–3715.
- [209] P. Fulmer, D. H. Petering, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5319–5327.
- [210] J. W. Sam, X. J. Tang, J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5250–5256.
- [211] R. J. Guajardo, S. E. Hudson, S. J. Brown, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7971–7977.
- [212] M. G. Oakley, K. D. Turnbull, P. B. Dervan, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 242–247.
- [213] M. A. Morgan, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10286–10293.
- [214] H. Han, A. Schepartz, M. Pellegrini, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9831–9844.
- [215] H. Han, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4955–4959.
- [216] J. Bernadou, A. S. Fabiano, A. Robert, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9375–9376.
- [217] U. Sehlstedt, S. K. Kim, P. Carter, J. Goodisman, J. F. Vallano, B. Nordén, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 417–426.
- [218] M. Eriksson, M. Leijon, C. Hiort, B. Nordén, A. Gräslund, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5031–5040.
- [219] D. Campisi, T. Morii, J. K. Barton, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4130–3139.

Vom Wasser

Band 84 (1995)

Herausgegeben von der Fachgruppe
Wasserchemie in der GDCh

Deutsche Einheitsverfahren

32. Lieferung (1995)

Herausgegeben von der Fachgruppe
Wasserchemie in der GDCh
in Gemeinschaft mit dem Normenausschuß
Wasserwesen (NAW) im DIN
Deutsches Institut für Normung e. V.

Bitte fordern Sie unseren
ausführlichen Prospekt an!

1995. Ca. 500 Seiten. Gebunden.
DM 278.-/ÖS 2169.-/sFr 270.-
ISBN 3-527-28677-2

Die Schriftenreihe informiert zweimal jährlich
gründlich und umfassend über den Stand der
Wasserforschung. "Vom Wasser" ist Organ der
Fachgruppe Wasserchemie.

1995. Loseblattwerk.
Ergänzungslieferung mit ca IXXX, 110 Seiten.
DM 125.-/ÖS 975.-/sFr 125.-
ISBN 3-527-28673-X

Mit mittlerweile rund 300 Verfahrensvorschriften,
weit über 100 davon DIN-Normen, ist diese Lose-
blattsammlung das unentbehrliche Standardwerk
für alle wasseranalytischen Laboratorien.

Ihre Bestellung richten Sie bitte
an Ihre Buchhandlung oder an:

VCH
Postfach 10 11 61
D-69451 Weinheim
Fax: 0 62 01 / 60 61 84

