

N-Hydroxypyridinthione als photochemische Hydroxylradikalquellen zur oxidativen DNA-Schädigung**

Waldemar Adam, Daniel Ballmaier, Bernd Epe, Günther N. Grimm und Chantu R. Saha-Möller*

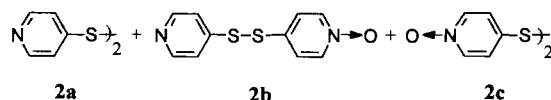
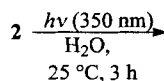
Seit ca. fünf Jahren ist bekannt, daß *N*-Hydroxypyridin-2-thion **1** bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht Hydroxylradikale freisetzt^[1] und daß diese Photoreaktion auch in wäßriger Pufferlösung stattfindet^[2]. Das Thion **1** wird als antibakterieller und fungizider Wirkstoff vielfältig verwendet. Darüber hinaus ist es in vitro gegenüber Leukämiezellen cytotoxisch und daher ein potentiell Cytostaticum^[3]. Vermutlich ist die biologische Wirkung dieses Reagens auf die photochemische Bildung von Hydroxylradikalen zurückzuführen. Kürzlich wurde die Genotoxizität von *N*-Hydroxypyridinthionen in Zellen untersucht^[4]. Die vorläufigen Untersuchungen ergaben, daß diese Reagentien in Mauszellen und in Fibroblasten des Chinesischen Hamsters nur unter Bestrahlung gentoxisch sind^[4].

Unter den reaktiven Sauerstoffspezies sind Hydroxylradikale von besonderer Bedeutung für die oxidative Schädigung von Biomolekülen (DNA, Proteine und Lipide) in Zellen^[5]. Da die herkömmlichen Methoden zur Bildung von Hydroxylradikalen für biochemische Untersuchungen nur bedingt geeignet sind^[6], wurden in den vergangenen Jahren neuartige, photochemische

Hydroxylradikalquellen, Photo-Fenton-Reagentien, entwickelt^[7]. Im Rahmen diesbezüglicher Untersuchungen zur Gentoxizität haben wir die Thione **1** und **2** getestet und dabei festgestellt, daß sie die zellfreie DNA deutlich schädigen können.

Die für Hydroxylradikale charakteristischen Schadensmuster – es kommt hauptsächlich zur Oxidation von DNA-Basen (besonders Guanin) und zu Strangbrüchen – sind in Abbildung 1 dargestellt. Analog dem 2-Thiopyridon **1**, das als photochemische Hydroxylradikalquelle etabliert ist^[1, 2], werden auch aus dem 4-Thiopyridon **2** durch Photolyse Hydroxylradikale effizient freigesetzt. Wir berichten hier über unsere bisherigen Ergebnisse.

Die Bestrahlung der *N*-Hydroxyverbindung **2** (60.0 mg, 4.70 mmol) bei 350 nm (Rayonet-Photoreaktor) in Wasser (10 mL)/Acetonitril (3 mL) lieferte nach säulenchromatographischer Trennung die Photolyseprodukte **2a–c** in 17, 32 bzw. 42 %



Ausbeute. Weitere Produkte, z. B. solche, die durch den Einbau von Acetonitrilradikalen (möglicherweise gebildet durch Reaktion von Hydroxylradikalen mit Acetonitril^[8]) entstehen könnten, wurden nicht festgestellt. Die Bildung der Photolyseprodukte läßt sich anhand des für die Photolyse von **1** postulierten Mechanismus^[1] erklären. Danach entstehen die Photolyseprodukte nicht nur durch die Spaltung der N-O-Bindung, sondern auch in einer radikalischen Kettenreaktion durch H-Abstraktion am Thiol-Tautomer des Edukts. An diesem Schritt könnten sicherlich auch Acetonitrilradikale beteiligt sein.

Folgende Ergebnisse belegen die Bildung von Hydroxylradikalen in der Photolyse von **2**. Sowohl nach der Photolyse ($\lambda = 350\text{ nm}$) von **1**^[9] als auch nach der von **2** (40 μmol) in entgastem und wasserfreiem Acetonitril (4 mL)/Benzol (5 mL) unter Schutzgas (N_2) wurde Phenol im Produktgemisch gaschromatographisch detektiert^[10] (5.1 bzw. 9.5%, bezogen auf die Menge an eingesetzter *N*-Hydroxyverbindung). In sauerstoffsättigter Lösung wurde jeweils ca. die fünffache Menge an Phenol erhalten. Die niedrigen Ausbeuten an Phenol bei rigorosem Sauerstoffausschluß erklären sich dadurch, daß nur ein geringer Teil der aus Benzol primär gebildeten Hydroxycyclohexadienylradikale zu Phenol reagiert, der größere Teil reagiert zu dimeren Produkten^[11].

Zum Nachweis der Bildung von Hydroxylradikalen in wäßriger Lösung wurden **1**^[9] sowie **2** (5.40 mg, 42.5 μmol) jeweils in wäßriger Benzoesäurelösung (51.2 mg (419 μmol) Säure in 20 mL Wasser) bestrahlt und die Reaktionsprodukte durch HPLC quantifiziert. Es wurden in beiden Fällen 2-, 3- und 4-Hydroxybenzoesäure in Gesamtausbeuten von 6.2 bzw. 8.8 % erhalten^[12].

Der direkte, qualitative Beweis für die Bildung von Hydroxylradikalen in der Photolyse von **2** wurde ESR-spektroskopisch durch Spinabfangexperimente mit 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) in Wasser erbracht. Man erhielt das für das Hydroxylradikaladdukt charakteristische Quartett^[13, 14] ($a_N = 14.8\text{ G}$, $g = 2.0054$). Der Abfang von Thylradikalen^[15] wurde unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht festgestellt. Über die ESR-spektroskopische Untersuchung der Photolyse von **1** wurde bereits ausführlich berichtet^[14, 15]. Unsere Befunde stimmen mit den beschriebenen überein. *N*-Hydroxypyridin-4-thion **2** ist nach diesen Ergebnissen also ebenso wie das bekannte 2-Thion **1** eine photochemische Hydroxylradikalquelle.

Als Indikator für die oxidative DNA-Schädigung wurde die Bildung von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-OxoGua) **3** bei der UVA-Bestrahlung ($\lambda = 350\text{ nm}$) von isolierter DNA in Gegen-

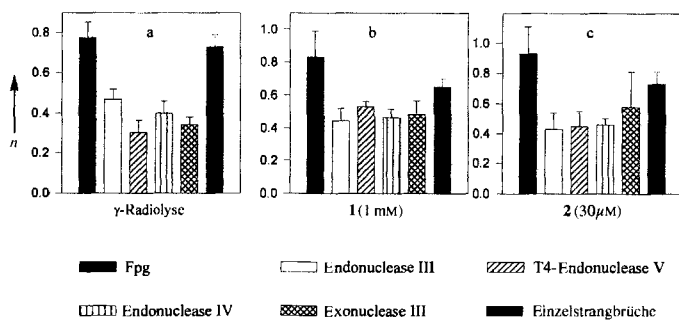
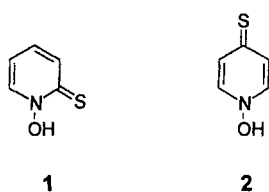


Abb. 1. DNA-Schadensprofile nach Behandlung von PM2-DNA mit a) ionisierender γ -Strahlung, b) Licht und **1** (1 mM) sowie c) Licht und **2** (30 μM). Die Balken geben jeweils die Zahl n der DNA-Schäden (Reparatur-Endonuclease-sensitive Modifikationen sowie Einzelstrangbrüche) pro 10 000 Basenpaare an^[17].

[*] Dr. C. R. Saha-Möller, Prof. Dr. W. Adam, Dipl.-Chem. G. N. Grimm
Institut für Organische Chemie der Universität
Am Hubland, D-97074 Würzburg
Telefax: Int. + 931/888-4756
E-mail: Adam@chemie.uni-wuerzburg.d400.de

Dipl.-Chem. D. Ballmaier, Prof. Dr. B. Epe
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg

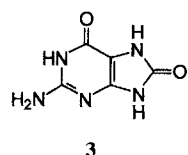
[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB172 „Molekulare Mechanismen kanzerogener Primärveränderungen“) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Tabelle 1. Photoinduzierte Bildung von 8-OxoGua **3** aus Kalbsthymus-DNA durch die *N*-Hydroxypyridinthione **1** und **2** mit und ohne Zusatz eines Hydroxylradikalfängers[a].

Nr.	Thion[b]	<i>t</i> BuOH [Vol.-%]	Mannit [mM]	<i>t</i> [min][c]	Ausb. (3) [%][d]
1	1	–	–	20.0	0.19 ± 0.03
2	1	2.00	–	20.0	0.11 ± 0.03
3	1	–	40.0	20.0	0.13 ± 0.02
4	1	–	–	60.0	0.46 ± 0.06
5	2	–	–	20.0	0.42 ± 0.09
6	2	2.00	–	20.0	0.26 ± 0.02
7	2	–	40.0	20.0	0.16 ± 0.06

[a] 200 µL DNA-Lösung in 5 mM Phosphatpuffer (pH = 7.0) wurden mit der angegebenen Menge an *N*-Hydroxypyridinthion versetzt und bei 6 °C bestrahlt (*t* = Bestrahlungsdauer). [b] Die Thionkonzentration betrug 62.5 µM, das entspricht 1 Äquiv., bezogen auf die Guanin-Konzentration in der DNA-Lösung. [c] Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm im Rayonet-Photoreaktor. [d] Quantifizierung durch HPLC (elektrochemische Detektion bei 350 mV); die Ausbeute – bezogen auf Guanin (nach Abzug des Blindwertes) – entspricht der auf *N*-Hydroxypyridinthion (1 Äquiv.) bezogenen Ausbeute.

wart der Thione **1** oder **2** untersucht. Dazu wurden Lösungen von Kalbsthymus-DNA ($0.1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$) zusammen mit **1** oder **2** in 5 mM Phosphatpuffer (400 µL, pH = 7.0) bei 6 °C 20–60 min bestrahlt. Danach wurde die modifizierte DNA gefällt und anschließend mit HF/Pyridin hydrolysiert. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse (elektrochemische Detektion bei 350 mV) sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Mit **2** wurde nach 20 min mehr



8-OxoGua **3** gebildet als mit **1**. Der Zusatz von 2 Vol.-% *tert*-Butylalkohol, einem Hydroxylradikalfänger^[16], führte sowohl mit **1** als auch mit **2** zu einer signifikanten Abnahme (ca. 40%) der Ausbeuten an **3** (Tabelle 1, Eintrag 2 bzw. 6). Auch durch Zugabe von 40 mM Mannit, ebenfalls ein Abfangreagens für Hydroxylradikale^[21],

wurde die Ausbeute an **3** deutlich verringert (Tabelle 1, Eintrag 3 bzw. 7). Daß keine größere Quenchwirkung eintritt, ist möglicherweise auf die Assoziation der *N*-Hydroxypyridinthione mit DNA zurückzuführen. Zusätzlich zu den Abfangexperimenten mit *tert*-Butylalkohol und Mannit wurden Kontrollreaktionen durchgeführt, die belegen, daß Hydroxylradikale die oxidative DNA-Schädigung bewirken. Ohne Bestrahlung wurde mit **1** oder **2** kein 8-OxoGua **3** gebildet, und auch bei längerer Belichtungszeit nimmt die Menge an **3** nicht zu, d. h. die aus den Thionen **1** und **2** gebildeten Photolyseprodukte führen nicht zu einer signifikanten DNA-Oxidation.

Weitere Beweise, daß Hydroxylradikale die schädigende Spezies sind, wurden durch ein Relaxationsassay mit PM2-DNA in Gegenwart von spezifischen Reparatur-Endonucleasen erhalten^[17]. Die Belichtung von superhelicalem PM2-DNA und **1** oder **2** führte zu Strangbrüchen, basenfreien Stellen (AP-Läsionen^[21]) und zahlreichen Basenoxidaationsprodukten^[18]. Die durch die Thione **1** und **2** bei Bestrahlung erhaltenen Schadensprofile zeigen die für Hydroxylradikale, die durch γ -Radiolyse von Wasser gebildet wurden, typische Schadensverteilung (Abb. 1). Das 4-Thion **2** ist hierbei deutlich reaktiver als das 2-Thion **1**: Bei gleicher Belichtungszeit (10 min) erhält man mit **2** bereits in einer Konzentration von 30 µM (Abb. 1c) etwa die gleiche Zahl an Schäden wie mit **1** in einer Konzentration von 1 mM (Abb. 1b).

Durch γ -Strahlung gebildete Hydroxylradikale führen zu einem DNA-Schadensprofil (Abb. 1a), das sich von dem durch Photosensibilisatoren hervorgerufenen unterscheidet^[17c]. Diese

schädigen DNA vorwiegend durch Typ-II-Photooxidation über Singulett-Sauerstoff und Typ-I-Photooxidation durch Radikal- und Elektronentransferreaktionen. Während beispielsweise Singulett-Sauerstoff vorwiegend Fpg-sensitive^[19] Basenmodifikationen verursacht, führen Hydroxylradikale auch zu beachtlichen Mengen an Einzelstrangbrüchen und AP-Läsionen^[17b, c, 20, 21].

Um auszuschließen, daß bei den Reaktionen mit **1** und **2** weitere reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind, wurden Superoxid-Dismutase und Katalase zugesetzt. Beide führen zu keiner meßbaren Änderung; mit *tert*-Butylalkohol hingegen nimmt sowohl die Zahl der Einzelstrangbrüche als auch die der Fpg-sensitiven Modifikationen deutlich ab. Demzufolge sind weder Superoxidanionen noch Wasserstoffperoxid beteiligt, sondern allein Hydroxylradikale die schädigende Spezies.

N-Hydroxypyridin-2-thion **1** und mehr noch das *para*-Regioisomer **2** sind also effiziente photochemische Quellen für Hydroxylradikale. Zum ersten Mal wurde ihre DNA-schädigende Wirkung nachgewiesen. Wegen ihrer günstigen Eigenschaften, wie die gute Wasserlöslichkeit, die leichte Zugänglichkeit und die Absorption im sichtbaren Bereich des Lichts, eignen sie sich vorzüglich für die Bildung von Hydroxylradikalen und zur Untersuchung von biochemisch sowie biologisch wichtigen Reaktionen, an denen diese Radikale beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung ist die erwartete cytotoxische Wirkung der *N*-Hydroxypyridinthione **1** und **2** für die potentielle Nutzung dieser und verwandter Verbindungen als Chemotherapeutica, bei der Biomoleküle durch photochemisch gebildete reaktive Sauerstoffspezies gezielt oxidativ verändert werden.

Eingegangen am 1. April,
veränderte Fassung am 13. Juli 1995 [Z7861]

Stichworte: DNA-Oxidationen · Hydroxylradikal · *N*-Hydroxypyridinthione

- [1] a) J. Boivin, E. Crépon, S. Z. Zard, *Tetrahedron. Lett.* **1990**, 37, 6869–6872; b) *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1992**, 129, 145–150.
- [2] K. M. Hess, T. A. Dix, *Anal. Biochem.* **1992**, 206, 309–314.
- [3] a) J. Blatt, S. R. Taylor, G. J. Kontoghiorghes, *Cancer Res.* **1989**, 49, 2925–2927; b) G. J. Kontoghiorghes, A. Piga, A. V. Hoffbrand, *Hematol. Oncol.* **1986**, 4, 195–204.
- [4] B. Epe, D. Ballmaier, W. Adam, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, Universität Würzburg, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [5] a) *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1985**; b) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1991**.
- [6] a) C. Walling, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 125–131; b) D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in Lit. [5b], Kap. 1.
- [7] a) I. Saito, M. Takayama, T. Matsuura, S. Matsugo, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 883–884; b) W. Adam, J. Cadet, F. Dall'Acqua, B. Epe, D. Ramaiah, C. R. Saha-Möller, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 91–94. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 107–110.
- [8] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, 17, 513–886.
- [9] Das Thion **1**, das bekanntermaßen eine photochemische Hydroxylradikalquelle ist, wurde zu Vergleichszwecken verwendet.
- [10] Die Ausbeuten an Phenol sind auf die Stoffmenge an eingesetzter *N*-Hydroxyverbindung bezogen und wurden mit Naphthalin als Standard (nach der Reaktion zugesetzt) gaschromatographisch quantifiziert (relativer Fehler ca. ± 10%).
- [11] G. W. Klein, R. H. Schuler, *Radiat. Phys. Chem.* **1978**, 11, 167–171.
- [12] Es wurde weder ein Oxidationsmittel zugesetzt, noch Sauerstoff zur Oxidation der primär gebildeten Produkte eingeleitet, was die niedrigen Ausbeuten erklärt.
- [13] E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 200, 1–16.
- [14] Vor kurzem wurde über die ESR-spektroskopische Untersuchung der photolytischen Hydroxylradikalbildung aus dem Thion **1** berichtet: K. J. Reszka, C. F. Chignell, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 61, 269–275.

- [15] K. J. Reszka, C. F. Chignell, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 442–449.
 [16] B. Epe, M. Häring, D. Ramaiah, H. Stopper, M. M. Abou-Elzahab, W. Adam, C. R. Saha-Möller, *Carcinogenesis* **1993**, *4*, 2271–2276.
 [17] a) S. Boiteux, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *19*, 87–96; b) B. Epe, J. Hegler, *Methods Enzymol.* **1994**, *234*, 122–131; c) B. Epe, M. Pflaum, M. Häring, J. Hegler, H. Rüdiger, *Tox. Lett.* **1993**, *67*, 57–72.
 [18] a) C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, 1. Aufl., Taylor & Francis, London, **1987**; b) N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *20*, 203–209; c) A. J. S. C. Vieira, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6986–6994; d) S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503–520.
 [19] Fpg-Protein: Reparatur-Endonuclease Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase aus *Escherichia coli*.
 [20] E. Müller, S. Boiteux, M. R. P. Cunningham, *Nucleic Acid Res.* **1990**, *18*, 5969–5973.
 [21] AP-Läsion: basenfreie (apurinische/apyrimidinische) Position in der DNA.

Bildung von enantiomerenangereicherten Lithiumindeniden mit (–)-Sparteine – Strukturen, stereospezifische Substitution, Einfluß des Lösungsmittels**

Inga Hoppe, Michael Marsch, Klaus Harms, Gernot Boche* und Dieter Hoppe*

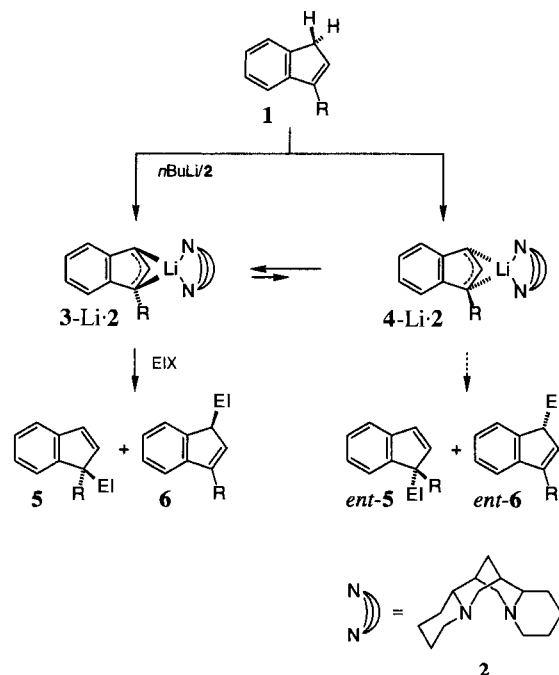
Professor Manfred Regitz zum 60. Geburtstag gewidmet

Mehrere enantiomerenangereicherte carbanionische Synthesebausteine, deren metalltragendes C-Atom stereogen ist, konnten in den vergangenen Jahren durch Deprotonierung gebildet und durch Elektrophile stereospezifisch substituiert werden^[1]. Dabei wurden vier Methoden erfolgreich eingesetzt: 1) Die stereospezifische Deprotonierung von chiralen Vorstufen unter Bildung konfigurationsstabiler Ionenpaare^[2]; 2) die asymmetrische Deprotonierung von achiralen Vorstufen mit einer chiralen Base unter Differenzierung zwischen enantiotopen Protonen^[3]; 3) die asymmetrische Deprotonierung unter kinetischer Racematspaltung^[4] sowie 4) die thermodynamisch kontrollierte Gleichgewichtseinstellung zwischen diastereomeren, konfigurationslabilen Ionenpaaren in Gegenwart eines durch einen chiralen Liganden komplexierten Kations wie $\text{Li}^+ \cdot (-)\text{-Sparteine}$ ($\text{Li}^+ \cdot \mathbf{2}$)^[5], bei der häufig das begünstigte Diastereomer kristallisiert^[5a, b] (asymmetrische Umwandlung zweiter Ordnung^[6]). Von einem mit $\text{Li}^+ \cdot \mathbf{2}$ erhaltenen Allyllithium-Komplex liegt eine Einkristall-Röntgenstrukturanalyse vor^[7].

Alkalimetallindenide sind wichtige Zwischenstufen für den Aufbau von chiralen Katalysatoren vom Metallocentyp^[8]. Zwar weisen frühe Befunde darauf hin, daß die gegenseitige Umwandlung von enantiomeren Indeniden mit chiralen Trialkylammonium-Gegenionen und die Protonierung der Anionen mit ähnlich großen Geschwindigkeiten verlaufen^[9, 10], doch sind enantiomerenangereicherte Metallindenidderivate bislang unbekannt. Im folgenden berichten wir über die hoch stereo-

selektive, stark lösungsmittelabhängige Bildung von Lithium-1-alkylindeniden nach der unter 4. genannten Strategie sowie über die Struktur und die stereospezifische Umsetzung dieser Verbindungen mit Elektrophilen.

1-Methylinden **1a** wurde mit *n*-Butyllithium/(–)-Sparteine^[11] ($n\text{BuLi}/\mathbf{2}$) in Diethylether/Hexan bei -70°C deprotoniert. Beim Erwärmen auf Raumtemperatur setzte Kristallisation ein, und nach Zugabe von Säurechloriden oder – in Gegenwart von Tetra(isopropoxy)titan (TIPT) – Aldehyden sowie Ketonen erhielt man die 1-Substitutionsprodukte **5a–g** und **5i** mit >95% ee und deutlich bevorzugt (>97:3) gegenüber den jeweiligen 3-Regioisomeren **6** (Schema 1, Tabelle 1). Die Produkte **5a–g**



Schema 1. Synthese der funktionalisierten Indene **5** und **6** in Gegenwart des chiralen Liganden (–)-Sparteine **2** (R, EI siehe Tabelle 1).

und **5i** sind (1*R*)-konfiguriert. Dies wurde durch eine Kristallstrukturanalyse des aus dem Ester **5a** erhaltenen (*R*)-1-Phenylethylamids^[12] sowie durch chemische Korrelation der Verbindungen **5i** und **5m** mit **5d** bzw. **5a** nachgewiesen^[13]. Wie **5a**, **5i** und **5m** weisen auch die übrigen Verbindungen **5** hohe negative spezifische Drehwerte $[\alpha]_D$ auf, so daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit der gleichen stereochemischen Reihe angehören. Die α -verzweigten Aldehyde 2-Methylpropanal und 2,2-Dimethylpropanal liefern dagegen überwiegend die regioisomeren Addukte **6k** bzw. **6l**, denen wir wegen der stark positiven Drehwerte die (1*S*)-Konfiguration (am ehemaligen C3) zuschreiben.

Ausgehend von **1b**, das wie **1a** in Diethylether/Hexan deprotoniert wurde, erhielten wir den Lithium/(–)-Sparteine-1-Butyllindenid-Komplex **3b-Li·2**, der laut Kristallstrukturanalyse ebenfalls (1*R*)-konfiguriert ist (Abb. 1)^[14]. Der Abstand C1–Li1 ist mit 243.2 pm länger als der Abstand C3–Li1 (233.4 pm); der Abstand C2–Li1 beträgt 229.9 pm. Zu den Atomen C4 und C9 des anellierte Benzolrings bildet Li1 nur schwache Bindungen (C4–Li1 251.0, C9–Li1 254.5 pm).

Die Umsetzung von **3b-Li·2** mit Benzoylchlorid führte zu dem ebenfalls stark linksdrehenden 1-Addukt **5g** (Schema 1, Tabelle 1). Daraus folgt, daß die Lithiumindenid-Komplexe **3a-Li·2** und **3b-Li·2** im Kristall (1*R*)-konfiguriert sind und mit

[*] Prof. Dr. D. Hoppe, Dr. I. Hoppe
Organisch-chemisches Institut der Universität
Corrensstraße 40, D-48149 Münster
Telefax: Int. + 251/83-9772

Prof. Dr. G. Boche, M. Marsch, Dr. K. Harms
Fachbereich Chemie der Universität
D-35032 Marburg

[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung, vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (G. B., SFB260) unterstützt.