

Synthese von Phenanthridin- und
Benzo[c]phenanthridin-Derivaten und Untersuchungen
auf ihre biologische Wirkung

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“
genehmigte Dissertation
(D 386)

vorgelegt von
Diplom Chemikerin
KERSTIN SCHULTE

Kaiserslautern 2000

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: **6. Juli 2000**

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

Referent: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Korreferent: Prof. Dr. E. Vilsmaier

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen November 1996 und September 1999 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke allen Personen, die durch ihre Bemühungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. W. C. Tang für die vielen hilfreichen Diskussionen und aufmunternden Worte während meiner Promotionszeit,

und meinen Freunden, die immer für mich da waren und da sein werden.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Matthias.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungen	ix
1 Einleitung	1
1.1 Entstehung von Krebs	2
1.2 Therapien von Krebserkrankungen	3
1.3 Lycorin	7
2 Grundlagen	9
2.1 DNA-Topoisomerasen	9
2.1.1 Topoisomerasen I	10
2.1.2 Topoisomerasen II	13
2.2 Topoisomerasen-Hemmstoffe	15
2.2.1 Topoisomerasen-I-Hemmung	17
2.2.2 Topoisomerasen-II-Hemmung	19
2.2.3 Topoisomerasen-Hemmstoffe mit Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridinstruktur	20
2.3 Intercalation in die DNA	21
3 Problemstellung	24
4 Ergebnisse und Diskussion	25
4.1 Lycorin und Lycobetain	25
4.1.1 Lycorin	25
4.1.1.1 Gewinnung	25
4.1.2 Lycobetain (Ungeremine)	28
4.1.2.1 Darstellung von Lycobetain aus Lycorin	28
4.1.3 Zusammenfassende Diskussion	31

4.2	Synthesen für die Darstellung von Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten	32
4.2.1	Radikalische Cyclisierung	32
4.2.1.1	Ausgangsmaterial	35
4.2.1.2	Zielverbindungen	36
4.2.1.2.1	1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)	37
4.2.1.2.2	2,3-Methylenedioxyphenanthridin (45)	39
4.2.1.2.3	Darstellung von Benzo[c]phenanthridin	43
4.2.1.3	Zusammenfassende Diskussion zur radikalischen Cyclisierung	44
4.2.2	Cyclisierung in flüssigem Ammoniak	44
4.2.2.1	Ausgangsmaterial	45
4.2.2.2	Zielverbindungen	46
4.2.2.2.1	Benzo[c]phenanthridin (47)	46
4.2.2.2.2	2-Methoxyphenanthridin (51)	49
4.2.2.2.3	2-Hydroxyphenanthridin (52)	51
4.2.2.2.4	Darstellung von 1,2,3,4,4a,6,10b-Octahydrophenanthridin	53
4.2.2.2.5	Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin	57
4.2.2.3	Zusammenfassende Diskussion zur Cyclisierung in flüssigem Ammoniak	58
4.2.3	Photochemische Cyclisierung	59
4.2.3.1	8,9-Dimethoxyphenanthridin (57)	59
4.2.3.2	Zusammenfassende Diskussion zur photochemischen Cyclisierung	62
4.2.4	N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (62)	63
4.2.5	2-Bromphenanthridin (63)	66
4.3	<i>in vitro</i> Untersuchungen	68
4.3.1	Wachstumshemmende Wirkung von Lycorin und Lycobetain	68
4.3.2	Interaktion von Lycorin und Lycobetain mit Kalbsthymus-DNA	70
4.3.3	Zusammenfassende Diskussion zu den <i>in vitro</i> Untersuchungen von Lycorin und Lycobetain	72
4.3.4	Wachstumshemmende Wirkung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate	73

4.3.5	Interaktion der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate mit Kalbsthymus-DNA	75
4.3.6	Zusammenfassende Diskussion zu den <i>in vitro</i> Untersuchungen der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate	78
5	Zusammenfassung	81
6	Experimenteller Teil	83
6.1	Lycorin und Lycobetain	83
6.1.1	Isolierung von Lycorin (9) aus Pflanzenmaterial	83
6.1.2	Lycobetainchlorid (10a)	86
6.2	Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate	89
6.2.1	Ausgangsmaterial: Aromatische sekundäre Amine	89
6.2.1.1	N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (37)	90
6.2.1.2	N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin (38)	91
6.2.1.3	N-(2-Brombenzyl)-4-methoxyanilin (39)	92
6.2.1.4	N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin (40)	93
6.2.1.5	N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (41)	94
6.2.1.6	N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (42)	95
6.2.1.7	N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (43)	96
6.2.2	Allgemeine Synthesevorschrift für die radikalische Cyclisierung	97
6.2.2.1	1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)	97
6.2.2.2	2,3-Methylenedioxyphenanthridin (45)	100
6.2.3	Allgemeine Synthesevorschrift für die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak	103
6.2.3.1	Benzo[c]phenanthridin (47)	104
6.2.3.2	2-Methoxyphenanthridin (51)	106
6.2.3.3	2-Hydroxyphenanthridin (52)	109
6.2.3.4	7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (55)	112
6.2.4	8,9-Dimethoxyphenanthridin (57)	115
6.2.5	N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (62)	117
6.2.6	2-Bromphenanthridin (63)	119

6.3	Methoden der Zellkultivierung	121
6.3.1	Kultivierung von Zellen	121
6.3.2	Passagieren von Zellen	121
6.3.3	Auszählen von Zellen	122
6.3.4	Einfrieren von Zellen	123
6.3.5	Auftauen von Zellen	123
6.3.6	Untersuchung auf Mykoplasmenkontamination	123
6.4	Methoden der <i>in vitro</i> Untersuchungen	124
6.4.1	Sulforhodamin-B-Assay	124
6.4.2	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay	126
6.4.3	Hoechst-H33258-Verdrängungsassay	127
6.5	Geräte und Materialien	128
6.5.1	Synthese	128
6.5.2	Zellkultivierung	129
7	Literaturverzeichnis	131
8	Anhang	146
8.1	¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR-Spektrum von Phenanthridin (31)	146
8.2	Ergebnisse der biologischen Tests	148
8.2.1	Wachstumshemmende Wirkung	148
8.2.2	DNA-Interaktion	149
8.3	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	150

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Krebsmortalität bei a) Männern und b) Frauen in Deutschland (Krebsatlas 1997)	2
Abb. 2	Strukturen einiger antineoplastischer Chemotherapeutika	5/6
Abb. 3	(a) <i>Sternbergia lutea</i> L. (Botanischer Garten Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Foto: R. Greissl), (b) <i>Zephyranthes candida</i> Herb. (Botanischer Garten Universität Kaiserslautern, Foto: Ch. Seus)	7
Abb. 4	Typ-I-Topoisomerase: (a) einzelsträngige Ringe verketten, (b) Duplex-DNA um eine Windung aufdrehen	11
Abb. 5	Topoisomerase I (Top 1) induziert Spaltung (cleavage) und Verknüpfung (religation) von DNA; Y 723 ist der Tyrosinrest der Top 1, der die Bindung mit der DNA eingeht; die DNA-Basen neben dem Strangbruch werden mit -1 und +1 für den 3'- und 5'-Terminus gekennzeichnet	12
Abb. 6	Modifizierte Domänenstruktur der Topoisomerase II	14
Abb. 7	Typ-II-Topoisomerase: (a) Durchtrennen des DNA-Doppelstrangs und Durchführen des Stranges durch den Bruch, (b) Längstrennung des Doppelstranges zeigt, dass dabei ein Strang zwei vollständige Umdrehungen um den anderen macht	14
Abb. 8	Bekannte Topoisomerase-Hemmstoffe	16/17
Abb. 9	Schematische Darstellung des Zusammentreffens des durch Camptothecin stabilisierten „cleavable-complex“ und der Replikationsgabel; DNA-Strangbrüche sind die Folge	18
Abb. 10	Schematische Darstellung des durch Doxorubicin stabilisierten „cleavable-complex“; DNA-Strangbrüche sind die Folge	19
Abb. 11	Abbildung einer B-DNA	22
Abb. 12	¹ H-NMR-Spektrum von Lycorin in d ₆ -DMSO, Bereich von 7,1-2,0 ppm	27
Abb. 13	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von Lycorin in d ₆ -DMSO, Bereich von 150,0-25,0 ppm	28
Abb. 14	Darstellung von Lycobetainhydro-selenid (29)	29
Abb. 15	¹ H-NMR-Spektrum von Lycobetainchlorid in d ₆ -DMSO, Bereich von 11,2-3,5 ppm	30
Abb. 16	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von Lycobetainchlorid in d ₆ -DMSO, Bereich von 165,0-25,0 ppm	31

Abb. 17	Schematische Darstellung des Mechanismus der radikalischen Cyclisierung	34
Abb. 18	Synthetisierte aromatische sekundäre Amine	35
Abb. 19	Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)	37
Abb. 20	^1H -NMR-Spektrum von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,6-1,7 ppm	38
Abb. 21	$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 155,0-15,0 ppm	39
Abb. 22	Reaktionsgleichung der radikalischen Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (41)	40
Abb. 23	^1H -NMR-Spektrum von 2,3-Methylenedioxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,4-6,0 ppm	41
Abb. 24	$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 2,3-Methylenedioxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 153,0-98,0 ppm	42
Abb. 25	Versuch der Darstellung von Benzo[c]phenanthridin (47)	43
Abb. 26	Schematische Darstellung des Mechanismus der Arin-Cyclisierung	45
Abb. 27	Darstellung von Benzo[c]phenanthridin (47)	46
Abb. 28	^1H -NMR-Spektrum von Benzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,6-7,6 ppm	47
Abb. 29	$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Benzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 153,0-119,0 ppm	48
Abb. 30	Darstellung von 2-Methoxyphenanthridin (51)	49
Abb. 31	^1H -NMR-Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,3-7,1 ppm	50
Abb. 32	$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 160,0-50,0 ppm	51
Abb. 33	Darstellung von 2-Hydroxyphenanthridin (52)	52
Abb. 34	Bildung von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (55)	54
Abb. 35	Mechanismus der Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (42)	55
Abb. 36	^1H -NMR-Spektrum von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien in d_6 -DMSO, Bereich von 7,8-1,0 ppm	56
Abb. 37	$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien in d_6 -DMSO, Bereich von 140,0-20,0 ppm	57
Abb. 38	Versuch der Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (57)	57

Abb. 39	Die Ausbildung eines Intermediates 58 durch Angriff von Kaliumamid an 43 ist aus energetischer Sicht unwahrscheinlich	58
Abb. 40	Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (57)	59
Abb. 41	Modifizierte Darstellung des Mechanismus der photochemischen Cyclisierung von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (43)	60
Abb. 42	¹ H-NMR-Spektrum von 8,9-Dimethoxyphenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 9,9-6,6 ppm	61
Abb. 43	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von 8,9-Dimethoxyphenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 160,0-45,0 ppm	62
Abb. 44	Darstellung von N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (62)	63
Abb. 45	¹ H-NMR-Spektrum von N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat in D ₂ O, Bereich von 9,6-7,8 ppm	64
Abb. 46	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von N-Methyl-phenanthridinium- methansulfonat in D ₂ O, Bereich von 155,0-35,0 ppm	65
Abb. 47	Darstellung von 2-Bromphenanthridin (63)	66
Abb. 48	¹ H-NMR-Spektrum von 2-Bromphenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 9,4-7,6 ppm	67
Abb. 49	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von 2-Bromphenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 158,0-117,0 ppm	68
Abb. 50	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Lycorin, Lycobetain und der Positivkontrolle Actinomycin D	71
Abb. 51	Hoechstfarbstoff-Kompetitionsassay von Lycorin, Lycobetain und der Positivkontrolle Netropsin	72
Abb. 52	Berechnete Molekülstruktur von Lycorin (9) und Lycobetain (10)	73
Abb. 53	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Actinomycin D (Positivkontrolle), Lycobetain (Referenzverbindung), N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (Methansulfonat-Salz), Phenanthridin, 2-Hydroxyphenanthridin und 8,9-Dimethoxyphenanthridin	76
Abb. 54	Hochstfarbstoff-Kompetitionsassay von Netropsin (Positivkontrolle), Lycobetain (Referenzverbindung), N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (Methansulfonat-Salz), 2,3-Methyldioxyphenanthridin, Benzo[c]phenanthridin und 2-Methoxyphenanthridin	77

Abb. 55	Berechnete Molekülstrukturen von Phenanthridin (31), Lycobetain (10) und N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (62)	79
Abb. 56	Berechnete Molekülstrukturen von Benzo[c]phenanthridin (47), Lycorin (9) und 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)	80
Abb. 57	¹ H-NMR-Spektrum von Phenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 9,3-7,6 ppm	146
Abb. 58	¹³ C- ¹ H-NMR-Spektrum von Phenanthridin in CDCl ₃ , Bereich von 159,0-117,0 ppm	147

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Die acht „Top“-Killer-Krebsarten weltweit 1998 (WHO-Jahresbericht 1999)	1
Tab. 2	Übersicht von Wirkstoffen und ihrem Wirkmechanismus	4
Tab. 3	Wachstumshemmende Wirkung von Lycorin und Lycobetain an drei humanen Tumorzelllinien; IC ₅₀ -Wert [μM]	69
Tab. 4	Wachstumshemmende Wirkung von Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten an drei humanen Tumorzelllinien; IC ₅₀ -Wert [μM]	74
Tab. 5	Wachstumshemmende Wirkung von Alkaloiden, Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten, Sulforhodamin-B-Assay, 72 Stunden Inkubation, IC ₅₀ -Wert [μM]	148
Tab. 6	Hinweise auf DNA-Intercalation im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, Hinweise auf Bindung an die kleine Furche der DNA im Hoechst-H33258-Verdrängungsassay, EC ₅₀ -Wert [μM]	149

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CXF	humaner colorectaler Tumorxenograft
δ	Verschiebung
d	Dublett
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ED ₅₀	Konzentration, bei der 50 % eines maximal möglichen Effekts eintritt (Effektive Dosis)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FKS	foetales Kälberserum
GXF	humaner gastrointestinaler Tumorxenograft
h	Stunde
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50 %ige Wachstumshemmung einer Zellkultur im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz bewirkt
LXFL	humaner Tumorxenograft: großzelliges Lungenkarzinom
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	Multipllett
MG	Molekulargewicht
min	Minute
NMR	Kernresonanzspektroskopie
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphat buffered saline)
ppm	Parts per Million

pt	Pseudotriplett
ps	Pseudosingulett
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
s	Singulett
SRB	Sulforhodamin B
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure

1 Einleitung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 1998 weltweit etwa 10 Millionen neue Krebsfälle aufgetreten und mehr als 7,2 Millionen Menschen an Krebs gestorben (Tab. 1). Da diese Zahlen auch weiterhin steigen werden, gibt es weltweit enorme Anstrengungen, den Krebs zu bekämpfen.

Tab. 1: Die acht „Top“-Killer-Krebsarten weltweit 1998 (WHO-Jahresbericht 1999)

Frauen	Todesfälle x 1000	Männer	Todesfälle x 1000
Brust	412	Lunge	911
Lunge	333	Magen	518
Magen	304	Leber	433
Colorektal	273	Ösophagus	289
Cervix	237	Colorektal	284
Leber	176	Prostata	239
Ösophagus	147	Mund-Rachen	233
Ovarien	122	Lymphsystem	144
Top 8 gesamt	2.004	Top 8 gesamt	3.051
Alle Krebsarten gesamt	3.113	Alle Krebsarten gesamt	4.115

Westeuropa weist eine der höchsten Krebssterblichkeiten in der Welt auf (18 % bei 7 % Anteil an der Weltbevölkerung), wobei in Deutschland ein kontinuierliches Ansteigen der absoluten Zahlen der jährlichen Krebstodesfälle zu verzeichnen ist. Die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen bei Männern ist Lungenkrebs, gefolgt von Darm- und Prostatakrebs. Bei Frauen dagegen ist Brustkrebs die häufigste Todesursache, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs (Abb. 1). Um die Gründe und Ursachen der Krebsentstehung besser erfassen zu können, wird seit 1995 ein neues flächendeckendes Krebsregister in Deutschland erstellt, um Krebserkrankungen in Zukunft präventiv und therapeutisch zu bekämpfen.

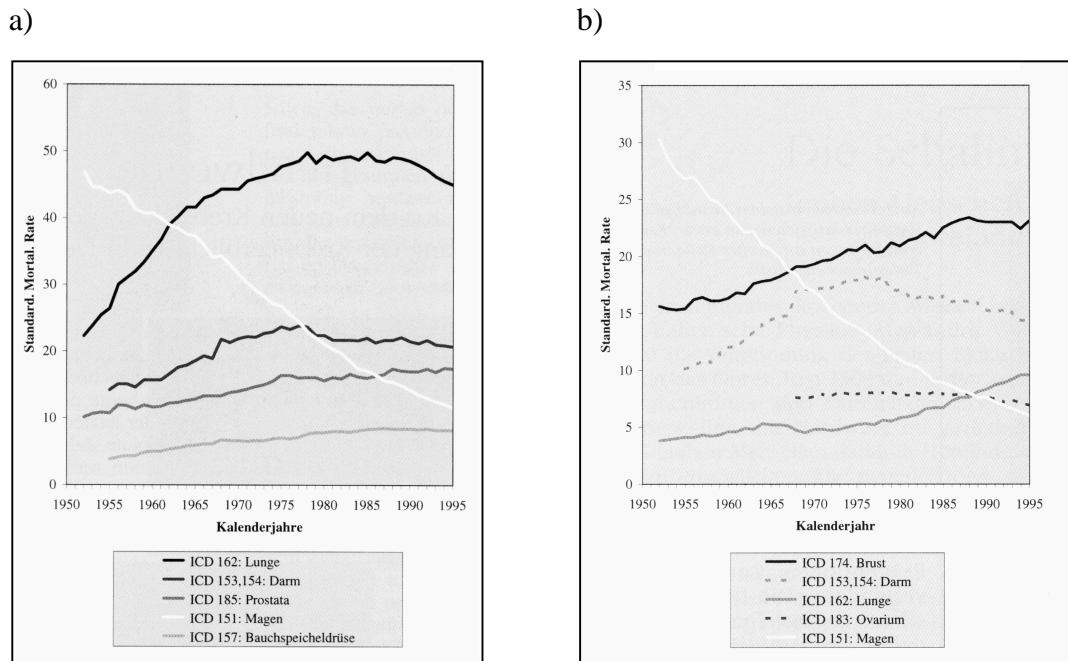


Abb. 1: Krebsmortalität bei a) Männern und b) Frauen in Deutschland (Krebsatlas 1997)

1.1 Entstehung von Krebs

Krebs ist die Bezeichnung für eine Reihe von bösartigen Geschwülsten in Geweben bzw. Organen, die sich durch Entstehung, Verlauf und Therapiemöglichkeiten unterscheiden. Die malignen Tumoren werden unterteilt in *Karzinome*, aus epitheliale Gewebe, in *Sarkome*, aus mesenchymalem Gewebe, in *Leukämien* und *Lymphome*, maligne Erkrankungen des Blut bildenden bzw. lymphatischen Systems, sowie in *Blastome* (Tumoren des Nervensystems). Sie sind charakterisiert durch ein enthemmtes, autonomes Überschusswachstum des Gewebes, welches zusätzlich durch schnelles, infiltratives und destruktives Wachstum mit der Fähigkeit zur Metastasierung gekennzeichnet ist.

Die Entstehung eines malignen Tumors wird durch endogene Faktoren wie z. B. Fehler bei der DNA-Replikation oder DNA-Reparatur oder durch exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung, Viren und Umweltchemikalien begünstigt. Die Zelle verliert dabei ihre

Wachstumskontrollmechanismen und geht in die so genannte Cancerogenese über, die im Wesentlichen aus drei Phasen besteht [Harris 1991]:

1. *Initiation*: Die Zelle wird durch endogene und/oder exogene Faktoren auf genetischer Ebene geschädigt; für die Tumorentstehung reicht die Initiation allein nicht aus.
2. *Promotion*: Die geschädigten Zellen werden durch Tumorpromotoren zu erhöhter Zellteilung angeregt; es bildet sich ein präneoplastischer Mikrotumor.
3. *Progression*: Über einen längeren Zeitraum dauernde Phase, in der sich der gebildete Mikrotumor manifestiert, gekennzeichnet durch Zunahme der Wachstumsautonomie und Malignität sowie Ausbildung von Metastasen und Sekundärtumoren.

Die Kenntnisse zum Verstehen von Krebsentstehung geben Anhaltspunkte, die in der Krebsprävention und Krebstherapie zu Erfolgen führen könnten.

1.2 Therapien von Krebserkrankungen

Als mögliche Behandlungsformen von soliden Tumoren gibt es die klassischen Methoden wie chirurgischen Eingriff und Radiobestrahlung. Lokal begrenzte, nicht metastasierende Geschwülste werden operativ entfernt, während die Strahlentherapie zur Abtötung strahlensensibler, lokaler Tumoren bzw. nach chirurgischen Eingriffen zurückgebliebener Tumorreste dient. Hierbei ist eine Frühdiagnose der Krebserkrankung eine wichtige Voraussetzung.

Eine weitere mögliche Behandlungsform ist die medikamentöse Therapie, die bei inoperablen, metastasierenden und systemischen Tumoren wie z. B. Leukämien und Lymphomen als Einzelsubstanz- oder als Kombinationstherapie verschiedener antineoplastischer Chemotherapeutika eingesetzt wird.

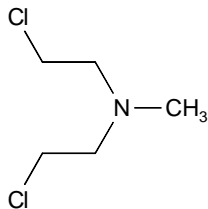
Die zahlreichen klinisch verwendeten Wirkstoffe, die für die Chemotherapie von Krebs zur Verfügung stehen, unterscheiden sich durch ihre Wirkmechanismen. Sie können z. B. an unterschiedlichen Stellen in den Zellstoffwechsel des Tumorgewebes eingreifen und diesen so verändern das der Tumor abstirbt, oder sie unterdrücken z. B. das Wachstum eines Tumors, indem sie wachstumsfördernde Zellenzyme inhibieren. Voraussetzung für den Einsatz von Chemotherapeutika ist die Tatsache, dass Tumorzellen eine höhere Proliferationsrate besitzen als normale (gesunde) Zellen und somit einen gezielten Angriffspunkt für Chemotherapeutika bieten. Die dosis-limitierenden Faktoren bei der Verwendung von Chemotherapeutika sind vor allem auf die Schädigung anderer relativ schnell proliferierender Zellsysteme wie Knochenmark, Magen-Darm-Epithelien, Blut bildendes System und Immunsystem zurückzuführen [Chabner et al., 1990]. Es ist deshalb immer der Wunsch gewesen, dass bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe tumorspezifische Angriffspunkte gefunden werden, die eine direkte Wirkung auf das Tumorgewebe ermöglichen.

Antineoplastische Chemotherapeutika werden in so genannte Wirkstoffgruppen eingeteilt, die in der folgenden Tabelle 2 als Übersicht aufgeführt sind. In Abbildung 2 sind einige Strukturformeln der Chemotherapeutika exemplarisch abgebildet.

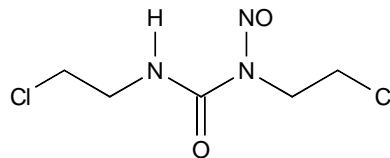
Tab. 2: Übersicht von Wirkstoffen und ihrem Wirkmechanismus

Wirkstoff	Wirkmechanismus
Alkylantien - Stickstoff-Lost-Verbindungen (1) - Nitrosoharnstoffe (2) - cis-Platin (3) - carbo-Platin	cytotoxische Substanzen, die nukleophile Zellbestandteile alkylieren und inter- und intrastrang DNA-Quervernetzungen verursachen [Fiebig et al., 1988] DNA-Schäden durch Quervernetzung im DNA-Strang (intrastrand crosslink) [Reed et al., 1996]
Antimetabolite - 5-Fluoruracil (4) - Methotrexat	chemisch modifizierte Stoffwechselprodukte, die die Biosynthese von Nucleinsäuren hemmen [Grem, 1996; Clark et al., 1996]

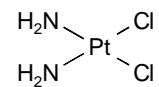
Wirkstoff	Wirkmechanismus
Hormone und Hormonantagonisten - Tamoxifen (5) - Flutamid	Beeinflussung des Tumorwachstums durch ablative oder additive Therapie mittels Sexualhormone [MacCallum et al., 2000]
Tubulinaktive Substanzen - Taxol (6) - Vincristin - Vinblastin	Hemmung der Polymerisation oder der Depolymerisation von Mikrotubuliproteinen Hemmung der Mitose durch Bindung an die Spindelproteine [Nicolaou et al., 1994; Diaz et al., 2000]
DNA-Topoisomerasen-Hemmstoffe - Camptothecin (7) - Topotecan - Doxorubicin (8) - Daunorubicin	binden spezifisch an zelluläre Topoisomerasen und hemmen das Wachstum von Tumorzellen [Hertzberg et al., 1989; Sandler et al., 1999] induzieren DNA-Strangbrüche durch Intercalation [Yang et al., 1999]



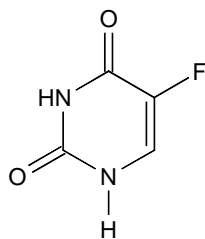
Chlormethin (1)



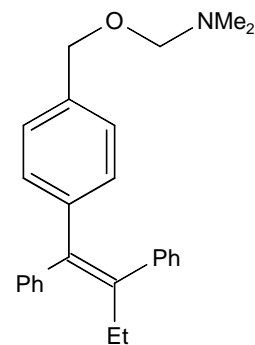
1,3-Bis-(2-Chlorethyl)-N-Nitrosoharnstoff (2)



cis-Platin (3)



5-Fluoruracil (4)



Tamoxifen (5)

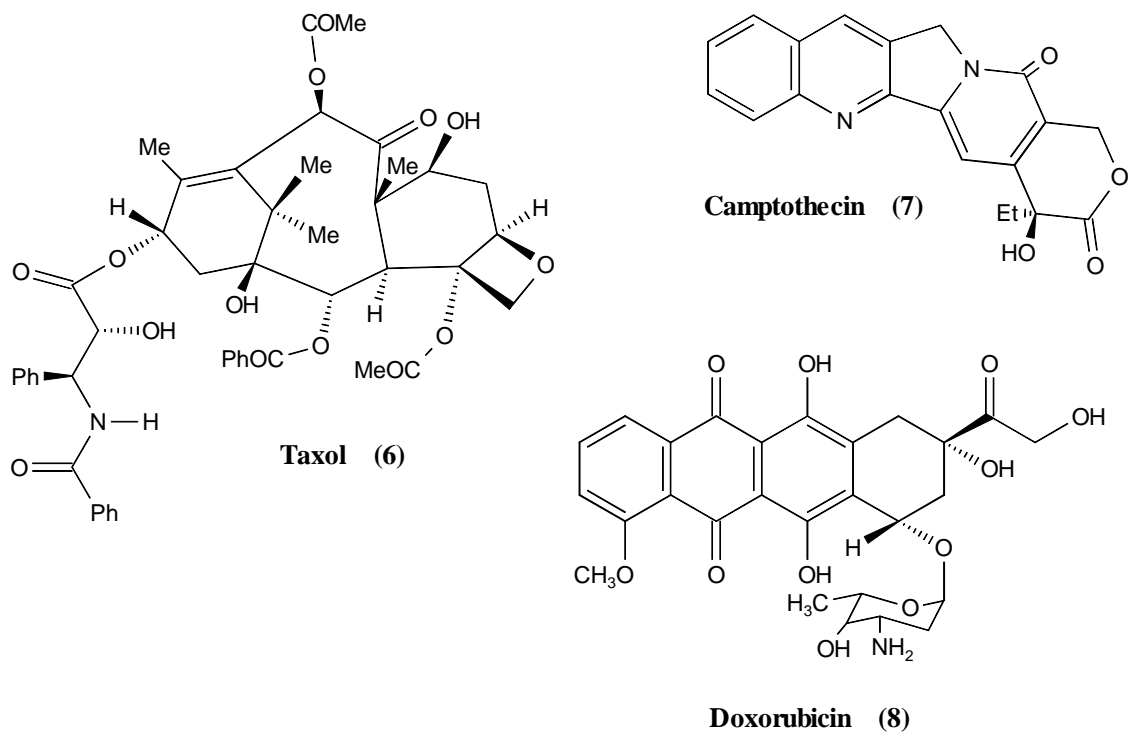


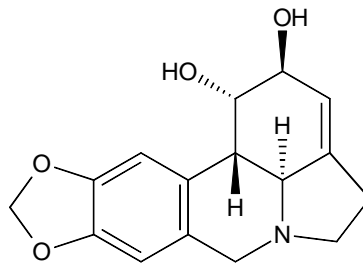
Abb. 2: Strukturen einiger antineoplastischer Chemotherapeutika

Durch die anwachsende Erkenntnis über Genetik und Biologie der Krebszelle ergeben sich immer neue und bessere Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika und neuer Chemotherapien bei Krebserkrankungen. So können z. B. Strategien für die somatische Gentherapie entwickelt werden, indem man wichtige Signaltransduktionsketten beeinflusst oder aus dem Wissen von fehlgesteuerten Proteinstoffwechseln bessere therapeutische Behandlungsformen konzipiert. Weitere Kenntnisse über immunologische Mechanismen, Unterdrückungsmöglichkeiten der Invasion von Krebszellen, Metastasierung und Anbindung des Tumors an Gefäßsysteme können zu einer Verbesserung der Krebsbekämpfung führen.

Welche Therapieform eingesetzt wird, hängt von der Art und Ausdehnung des Tumors ab. Neben synthetischen Agentien werden eine Reihe von Naturstoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Einige dieser Naturstoffe sind z. B. Taxol aus *Taxus brevifolia*, Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus roseus*, Camptothecin aus *Camptotheca acuminata* und Colchicin aus *Colchicum autumnale* (siehe Tab. 2).

1.3 Lycorin

In unserer Arbeitsgruppe wurde Lycorin (9), ein Alkaloid aus der Pflanzenfamilie *Amaryllidaceae* auf seine antineoplastischen Eigenschaften untersucht [Niederberger, 1998]. Bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten starke cytotoxische Effekte von Lycorin *in vitro* an elf verschiedenen humanen und murinen Tumorzelllinien beobachtet werden [Lin et al., 1995].



Lycorin (9)

Lycorin ist das am weitesten verbreitete Alkaloid in dieser Pflanzenfamilie und gilt als deren Leitalkaloid. Es wird in den unterschiedlichsten Geweben der Pflanze akkumuliert, wobei die größte Menge in den Zwiebeln zu finden ist. So werden z. B. *Sternbergia lutea* L. und *Zephyranthes candida* Herb. (Abb. 3) als pflanzliche Rohmaterialien zur Gewinnung von Lycorin wegen der relativ hohen Gehalte verwendet.

(a)



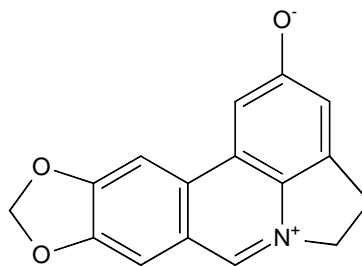
(b)



Abb. 3: (a) *Sternbergia lutea* L. (Botanischer Garten Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Foto: R. Greissl), (b) *Zephyranthes candida* Herb. (Botanischer Garten Universität Kaiserslautern, Foto: Ch. Seus)

Lycorin als Hauptalkaloid der Amaryllidaceae-Alkaloide ist pharmakologisch bzw. toxikologisch gut untersucht. Es wirkt stark emetisch, expektorierend und antipyretisch, verursacht eine Abnahme der Motilität oder eine Atmungsdepression, die sogar zum Tod durch Atemstillstand führen kann [Shimamoto et al., 1959; Matsui et al., 1962; Matsui et al., 1964]. Ferner hemmt Lycorin das Wachstum von Poliomyelitis-, Coxsackie-, Masern- und Herpes-Typ-I-Viren durch Blockierung der Synthese von viralen Proteinen [Ieven et al., 1982; Ieven et al., 1983; Vrijssen et al., 1986]. Die inhibitorische Wirkung bei der Protein-Biosynthese beruht wahrscheinlich auf der Blockierung eines Peptidyltransferasezentrums, welches die Elongation und Termination der Proteinsynthese hemmt [Kukhanova et al., 1983]. Die wachstumshemmende Aktivität von Lycorin scheint weitgehend auf der Hemmung der Protein-Biosynthese zu beruhen. Um den genauen Wirkmechanismus dieser Substanz jedoch aufzuklären, sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Andere biologische Effekte wie z. B. eine antibakterielle Wirkung können auf die *in situ* Metabolisierung von Lycorin zu Lycobetain (**10**), auch als Ungeremine bezeichnet, die unter bestimmten oxidativen Bedingungen stattfindet, zurückzuführen sein [Ghosal et al., 1988]. So haben vergleichende Untersuchungen [Niederberger, 1998] der beiden isolierten Substanzen gezeigt, dass Lycorin bei einer Reihe von humanen Tumorzelllinien zwar stark wachstumshemmend wirkt, aber keine Tubulin- oder Topoisomerase-Hemmung aufweist. Dagegen besitzt Lycobetain nicht nur eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber einer Reihe humaner und muriner Tumorzelllinien, sondern konnte auch als potenzieller Topoisomerase-Hemmstoff identifiziert werden (Kapitel 2.2.3).



Lycobetain (10)

2 Theoretische Grundlagen

2.1 DNA-Topoisomerasen

Wenn die in der Krebsbehandlung eingesetzten Chemotherapeutika gezielt ein bestimmtes Molekül oder eine Funktion im Zellstoffwechsel angreifen können, so wird die Effektivität einer Krebsbehandlung deutlich verbessert. In den frühen siebziger Jahren wurden derartige Zielstrukturen durch die Identifikation der Zellenzyme Topoisomerasen entdeckt [Wang et al., 1971; Gellert et al., 1976]. So ist z. B. bekannt, dass bei schnell proliferierenden oder transformierten Zellen die Topoisomerasen-II-Konzentration stark ansteigt [Sullivan et al., 1987; Potmesil et al., 1988; Giovanella et al., 1989; Kaufmann et al., 1991; Webb et al., 1991] und somit der Einsatz von Topoisomerasen-II-Hemmstoffen eine gezielte Wirkung in malignen Tumoren möglich macht [Chen et al., 1994]. Topoisomerasen sind für die DNA-Synthese unerlässlich, werden diese Zellenzyme durch Hemmstoffe inhibiert, so kann eine Zellteilung nicht mehr stattfinden und der daraus resultierende Zelltod ist die Folge.

Die DNA ist nur in der Lage, ihre biologischen Zellvorgänge auszuüben, wenn sie sich in einem adäquaten topologischen Zustand befindet. Somit können Vorgänge wie Transkription, Replikation und genetische Rekombination nur stattfinden, wenn die DNA eine entsprechende superhelicale Torsionsspannung besitzt. Fehlt diese Torsionsspannung, so verlaufen diese vitalen Prozesse nur sehr langsam oder finden gar nicht statt. Die Kontrolle dieser Superspiralisierung übernehmen die sogenannten Topoisomerasen, die den topologischen Zustand (Verwindungszahl) der zirkulären DNA beeinflussen, aber ihre kovalente Struktur nicht verändern. Mit ihrer Fähigkeit, Durchgänge durch die hochspiralisierte DNA zu öffnen und zu schließen, komplexe Strukturen zu entspiralisieren, zu entknoten bzw. zu entwirren und sie dann wiederherzustellen, regulieren sie die wichtigsten Vorgänge im Zellkern [Voet et al., 1994; Alberts et al., 1995].

Topoisomerasen kommen in allen eukaryontischen und prokaryontischen Zellen vor und sind im Zellkern lokalisiert. Es sind zwei Klassen von Topoisomerasen bekannt [Wang 1985; Osheroff 1989]:

1. Typ-I-Topoisomerasen: führen transiente Einzelstrangbrüche in der DNA aus
2. Typ-II-Topoisomerasen: führen transiente Doppelstrangbrüche in der DNA aus

2.1.1 Topoisomerasen I

Die Typ-I-Topoisomerasen sind monomere Proteine von 100 bis 120 kD und in Eukaryonten wie auch in Prokaryonten weit verbreitet. Diese „nicking-closing“-Enzyme katalysieren die Entspannung einer Superspiralisierung der DNA durch schrittweise Erniedrigung der Verwindungszahl, bis die Superspirale schließlich völlig entspannt ist. Topoisomerasen I verketteten einzelsträngige DNA-Ringmoleküle reversibel miteinander, indem sie einen Einzelstrang schneiden und anschließend eine Schleife des zweiten Einzelstranges durch die entstandene Lücke führen und den Bruch wieder verschließen (Abb. 4). Dadurch wird die gesamte Doppelhelix der DNA um eine Windung verdreht. Die aus dem Strangbruch hervorgehende Relaxation von negativen und positiven Verdrillungen ist für den Ablauf der nachfolgenden Replikation bzw. Transkription unerlässlich.

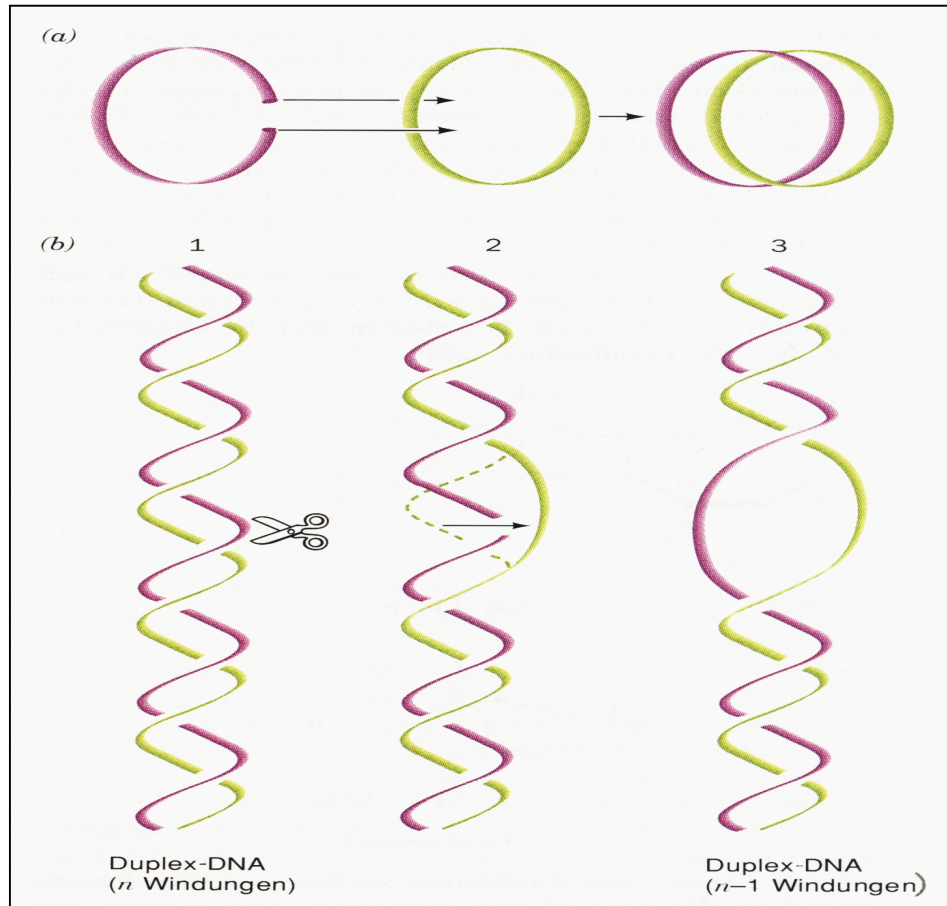


Abb. 4: Typ-I-Topoisomerase: (a) einzelsträngige Ringe verketteten, (b) Duplex-DNA um eine Windung aufdrehen [Voet et al., 1994]

Die Relaxationsreaktion ist in vier Schritte unterteilt:

Schritt 1) Bindung des Enzyms an Doppelstrang-DNA, wobei gebeugte oder superspiralisierte Abschnitte bevorzugt werden [Jaxel et al., 1991; Krogh et al., 1991]

Schritt 2) Induktion des Einzelstrangbruches, Ausbildung eines „cleavable-complex“ [Lynn et al., 1989; Pommier et al., 1998b]. Die Bildung des katalytischen Intermediates („cleavable-complex“) ist charakteristisch für Topoisomerasen I. Dabei wird eine kovalente Bindung zwischen einem katalytischen Tyrosinrest der Topoisomerase I und dem 3'-Ende der gespaltenen DNA ausgebildet (Abb. 5).

Schritt 3) Durchführen eines Einzelstrangs durch den Strangbruch

Schritt 4) Verschließen des Strangbruches durch nucleophilen Angriff der 5'-Hydroxylgruppe der gespaltenen DNA an die Phosphorylbindung des „cleavable-complex“. (Abb. 5) [Potmesil et al., 1994]

Die Energie, die bei der Trennung der Phosphordiesterbindungen im Relaxationsschritt 2 frei wird, wird bei der Bildung des kovalenten DNA-Enzym-Zwischenprodukt gespeichert und zum Verschließen des Strangbruches (Relaxationsschritt 4) wieder zugeführt.

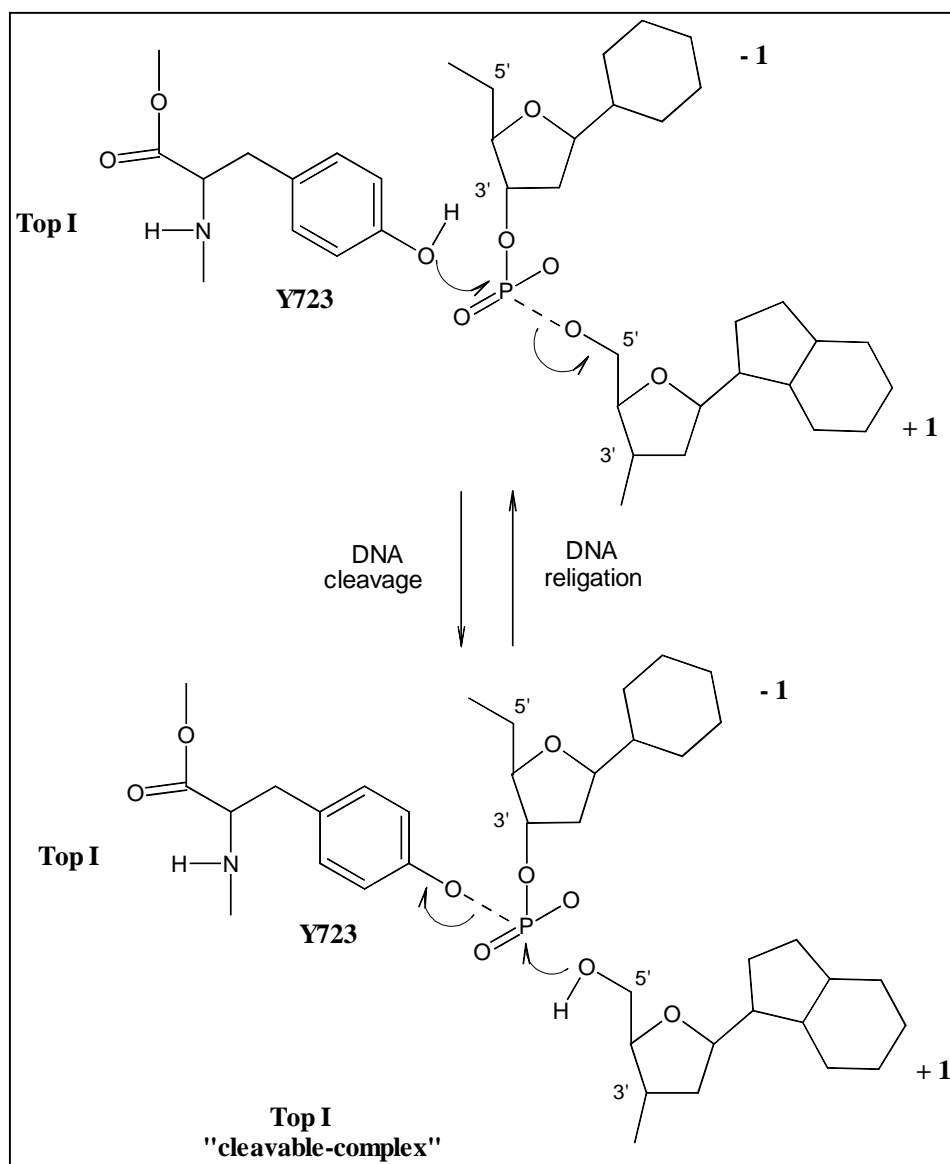


Abb. 5: Topoisomerase I (Top 1) induziert Spaltung (cleavage) und Verknüpfung (religation) von DNA; Y 723 ist der Tyrosinrest der Top 1, der die Bindung mit der DNA eingeht; die DNA-Basen neben dem Strangbruch werden mit -1 und +1 für den 3'- und 5'-Terminus gekennzeichnet [Pommier et al., 1998b]

2.1.2 Topoisomerasen II

Es gibt zwei Isoformen dieses Enzyms: Topoisomerasen II α mit einem Molekulargewicht von 170 kD und Topoisomerasen II β mit einem Molekulargewicht von 180 kD [Cozzarelli, 1980]. Sie besitzen ca. 70 % Sequenzhomologie der Aminosäuren und werden durch separate Gene auf den Chromosomen 17q21-22 und 3p24 codiert [Tsai-Pflugfelder et al., 1988; Jenkins et al., 1992]. Trotz dieser großen Übereinstimmung in der Sequenzhomologie besitzen diese Enzyme unterschiedliche Funktionen, werden auch verschieden reguliert und unterschiedlich im Gewebe angereichert. So steigt z. B. der Topoisomerasen-II α -Level im Verlauf des Zellzyklus an und erreicht seine größte Expression und seine höchste Aktivität in der G₂/M-Phase, während der Topoisomerasen-II β -Level im gesamten Zellzyklus und auch in ruhenden Zellen gleichmäßig exprimiert ist und seine höchste Aktivität in der Plateauphase des Wachstums erreicht [Giaccone, 1994]. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Lokalisation in der Zelle. Topoisomerasen II α sind im Nucleoplasma angereichert, während die Topoisomerasen II β sowohl im Nucleoplasma als auch im Nucleoli vorkommt [Isaacs et al., 1995].

Die Topoisomerasen-II-Enzyme benötigen für ihre Aktivität Adenosintriphosphat (ATP) und katalysieren schrittweise die Entspannung der Superspiralisierung der DNA unter gleichzeitiger Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i. Fehlt ATP, entspannen die Topoisomerasen die Superspirale nur sehr langsam.

Topoisomerasen II α und II β können in drei distinkte Domänen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne enthält die Sequenz für die ATP-Bindung, in der zentralen Domäne befindet sich der Tyrosinrest, der an die DNA bindet (Abb. 5), während die C-terminale Domäne sehr variabel ist und mehrere Phosphatbindungsstellen enthält, die für die physiologische Regulation des Enzyms notwendig sind [Corbett et al., 1993] (Abb. 6).

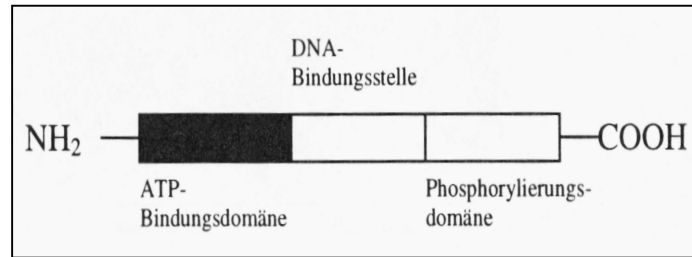


Abb. 6: Modifizierte Domänenstruktur der Topoisomerase II [Corbett et al., 1993]

Topoisomerasen-II-Enzyme durchtrennen die beiden Stränge der Duplex, schieben den Duplex durch die Lücke und versiegeln anschließend die Bruchstelle wieder (Abb. 7). Dabei kommt es zu einer Vorzeichenumkehrung (sign inversion mechanism), da aus einer rechtsgängigen toroidalen Superspirale eine linksgängige toroidale Superspirale wird [Cozzarelli, 1980; Oserhoff, 1986].

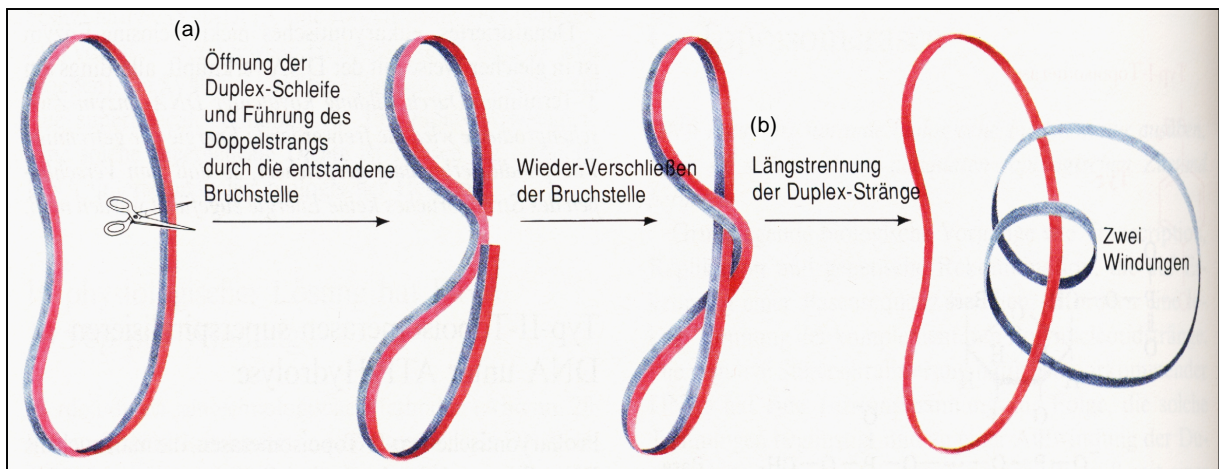


Abb. 7: Typ-II-Topoisomerase: (a) Durchtrennen des DNA-Doppelstrangs und Durchführen des Stranges durch den Bruch, (b) Längstrennung des Doppelstranges zeigt, dass dabei ein Strang zwei vollständige Umdrehungen um den anderen macht [Voet et al., 1994]

Topoisomerasen II bilden wie Topoisomerasen I ein katalytisches Intermediat zwischen Enzym und DNA in Form eines „cleavable-complex“. Das Enzym bindet an eine spezifische DNA-Sequenz unter Bildung eines Doppelstrang-Spaltungs- und Religationsgleichgewichtes, wobei die Bruchstelle am 5'-Phosphat/3'-Hydroxyl-Doppelstrangende mit einem Übergang von vier Basen am 5'-Ende liegt [Corbett et al., 1993].

2.2 Topoisomerasen-Hemmstoffe

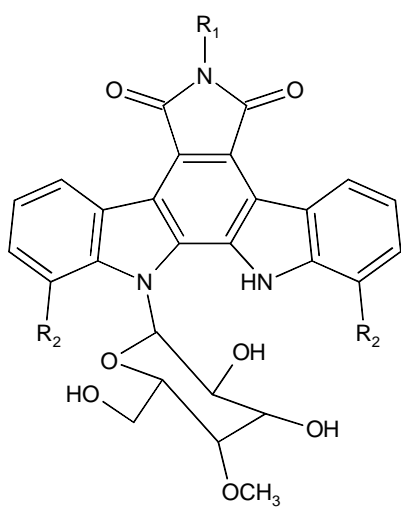
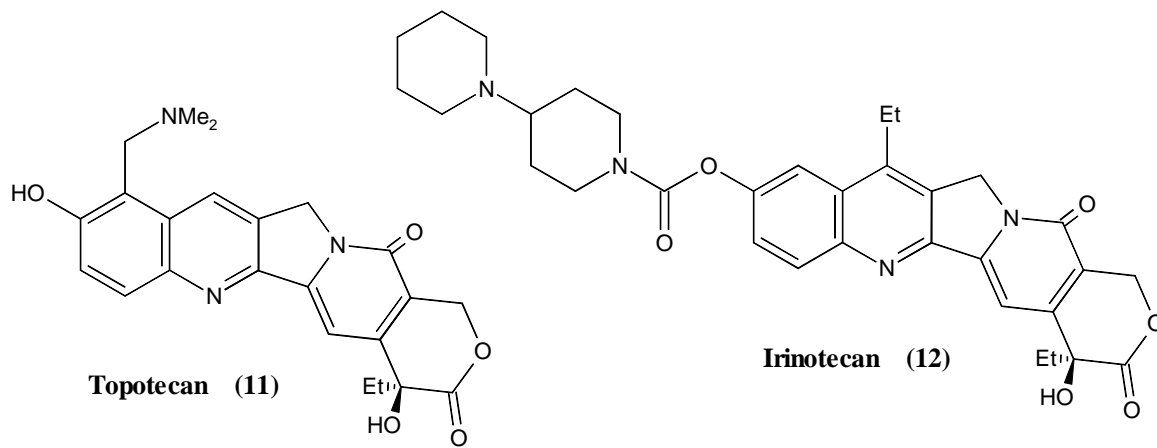
Bekannte Hemmstoffe gegen Topoisomerasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die sich durch ihren Mechanismus der Topoisomerasen-Hemmung unterscheiden [Capranico et al., 1997; Pommier, 1998a]:

- 1) Topoisomerasen-Hemmstoffe binden kovalent an das DNA-Topoisomerasen-Intermediat und stabilisieren dieses. Dadurch wird die katalytische Aktivität der Topoisomerasen gehemmt, DNA-Strangbrüche und Apoptose sind die Folge. Diese Hemmstoffe werden als *Topoisomerasen-Gifte* bezeichnet.
- 2) Topoisomerasen-Hemmstoffe blockieren die Bildung des DNA-Topoisomerasen-Intermediates indem sie kompetitiv an die Topoisomerasen binden und eine Spaltungsreaktion verhindern. Eine DNA-Relaxation kann nicht stattfinden, Apoptose ist die Folge. Diese Hemmstoffe werden als *Topoisomerasen-Inhibitoren* bezeichnet.

Die überwiegende Zahl der Topoisomerasen-Hemmstoffe sind aufgrund ihres Wirkmechanismus Topoisomerasen-Gifte, die in den unterschiedlichsten Substanzklassen zu finden sind, während nur ein geringer Teil der Hemmstoffe als Topoisomerasen-Inhibitoren bezeichnet werden können.

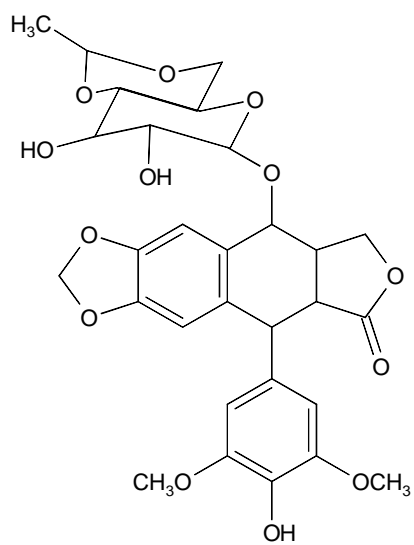
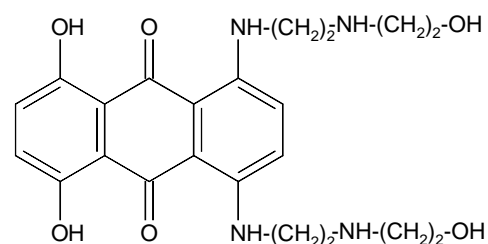
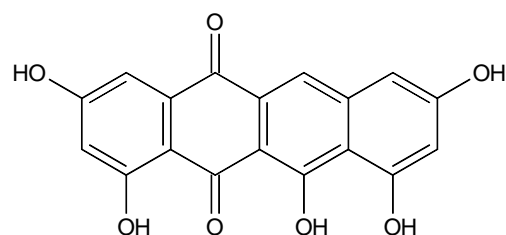
Zu den bekannten Topoisomerasen-I-Giften gehören z. B. Camptothecin (**7**) und seine synthetischen Derivate Topotecan (**11**) und Irinotecan (**12**), NB-506 (**13**), Rebeccamycin (**14**) und Saintopin (**15**). Zu den Topoisomerasen-II-Giften zählen Doxorubicin (**8**), Etoposid (**16**), Mitoxantron (**17**) und Amsacrin (**18**). Als Topoisomerasen-I-Inhibitoren sind β -Lapachon (**19**) und Quercetin (**20**) bekannt, während für Topoisomerasen-II-Inhibitoren Razoxan (**21**) und Chloroquin (**22**) als Beispiele zu nennen sind (Abb. 8).

Topoisomerasen-Hemmstoffe wie Saintopin [Fujii et al., 1997], Idarubicin [Guano et al., 1999], Macrostatin [Suzuki et al., 1998], Berberrubin [Sanders et al., 1998], TAS-103 [Fortune et al., 1999] und DACA [Bridewell et al., 1999] sind in der Lage, beide Topoisomerasen-Formen zu hemmen.

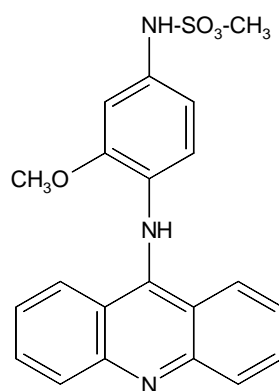


$R_1 = \text{HN-CHO}$, $R_2 = \text{OH}$

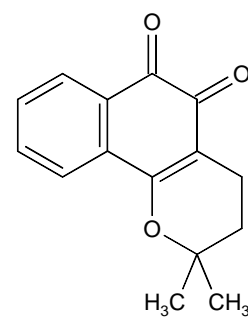
Rebeccamycin (14) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Cl}$



Etoposid (16)



Amsacrin (18)



β -Lapachon (19)

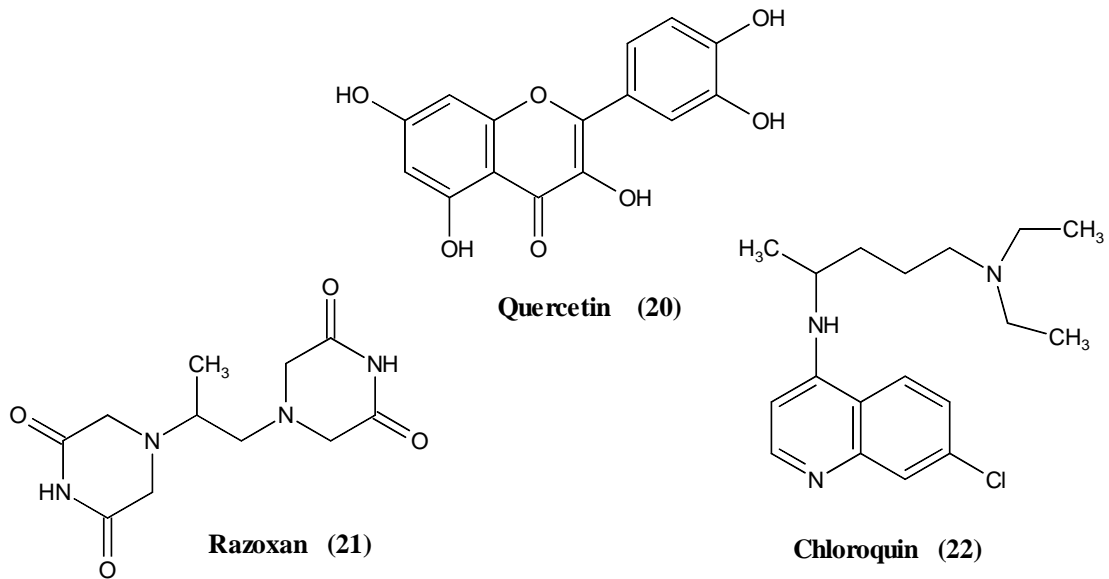


Abb. 8: Bekannte Topoisomerase-Hemmstoffe

2.2.1 Topoisomerasen-I-Hemmung

Einer der bekanntesten Topoisomerasen-I-Hemmstoffe ist das natürlich vorkommende Alkaloid Camptothecin (7), das aus der Baumrinde von *Camptotheca acuminata* isoliert wurde [Wall et al., 1966]. Camptothecin zeigte in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen starke wachstumshemmende Wirkung gegen eine Reihe humaner Tumorzelllinien und befand sich schon in den klinischen Testphasen I und II, die jedoch aufgrund von gravierenden Nebenwirkungen wie Myelotoxizität, hämorrhagische Zystitis, Diarrhöe und Emesis wieder eingestellt wurden [Gottlieb et al., 1970; Muggia et al., 1972; Moertel et al., 1972]. Mitte der achtziger Jahre fand Camptothecin erneut großes Interesse, als man durch Untersuchungen an gereinigter DNA-Topoisomerasen feststellte, dass Camptothecin ein spezifischer Topoisomerasen-I-Hemmstoff ist [Hsiang et al., 1985]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Camptothecin an die Topoisomerasen I bindet und ein stabiler ternärer Substrat-Topoisomerasen-DNA-Komplex entsteht [Hertzberg et al., 1989; Hsiang et al., 1989]. Camptothecin bindet reversibel an den Komplex zwischen DNA und Topoisomerasen I und stabilisiert dadurch das kovalente Intermediat (Abb. 9). Der durch Camptothecin stabilisierte

„cleavable-complex“ blockiert die Fortbewegung der Replikationsgabel, DNA-Schäden in Form von Strangbrüchen sind die Folge. Dies führt schließlich zu einem Zellzyklus-Arrest in der G₂-Phase und zur Apoptose [Hsiang et al., 1989].

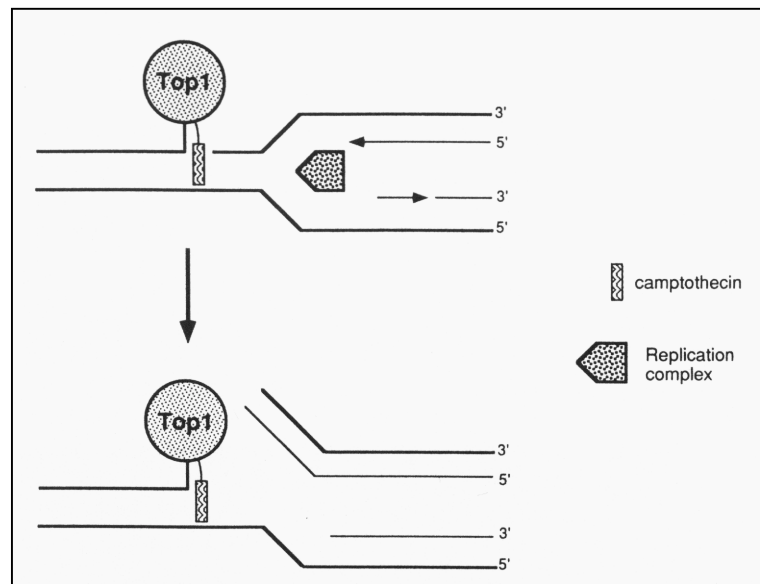


Abb. 9: Schematische Darstellung des Zusammentreffens des durch Camptothecin stabilisierten „cleavable-complex“ und der Replikationsgabel; DNA-Strangbrüche sind die Folge [Pommier et al., 1994]

Die spezifische Hemmwirkung von Camptothecin gegen Topoisomerasen I, seine in den klinischen Testphasen herausgestellte Unverträglichkeit und die schlechte Wasserlöslichkeit unter physiologischen Bedingungen waren Ansatzpunkte, semisynthetische Camptothecin-Analoga zu entwickeln, die ebenfalls Topoisomerasen I hemmen aber die unerwünschten Nebeneffekte reduzieren. So zeigte z. B. 10-Hydroxycamptothecin, das ebenfalls aus *C. acuminata* isoliert wurde, eine bessere Wirksamkeit als Camptothecin [Wani et al., 1987; Luzzio et al., 1995; Carrigan et al., 1997]. Aus diesem 10-Hydroxycamptothecin abgeleitet sind Topotecan (**11**) und das Prodrug Irinotecan (**12**) (Abb. 8), die vor allem bei der klinischen Behandlung von soliden Tumoren wie Eierstockkrebs, kleinzelliges Lungenkarzinom, gastrointestinalen Karzinomen, Cervixkarzinomen und Peritonalkarzinomen eingesetzt werden [Heron, 1998; Armand et al., 1999; Ghamande et al., 1999; Lhomme et al., 1999; Meert et al., 1999; Ormrod et al., 1999; Rothenberg et al., 1999; Sandler et al., 1999].

2.2.2 Topoisomerasen-II-Hemmung

Bekannte Hemmstoffe für Topoisomerasen II sind Doxorubicin (**8**) (Abb. 2) und Etoposid (**16**) (Abb. 8). Das Epipodophyllotoxin Etoposid wird klinisch als Kombinationspräparat mit cis-Platin gegen kleinzellige Lungenkarzinome eingesetzt, während Doxorubicin als Zytostatikum gegen Leukämien, Lymphomen und Brustkrebs in der klinischen Behandlung von Krebspatienten Verwendung findet [Kushner et al., 1998; Jarvinen et al., 1998; Rossi et al., 1999; Kayser et al., 1999; Hortobagyi et al., 2000].

Auch bei den Topoisomerasen-II-Hemmstoffen liegt der inhibierende Effekt in der Stabilisierung des Topoisomerasen-II-DNA-Komplexes (Abb. 10). Doch wird hier nicht die katalytische Aktivität des Enzyms gehemmt, sondern der irreversibel bleibende „cleavable-complex“ führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen und zum Zelltod [Corbett et al., 1993; Pommier et al., 1994; Chen et al., 1994].

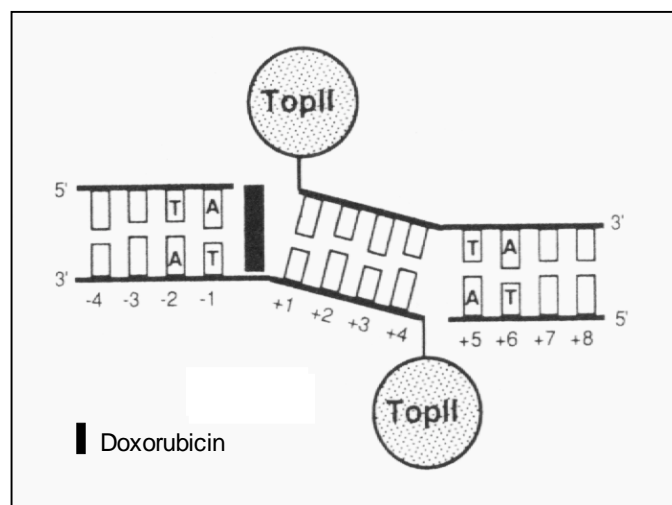
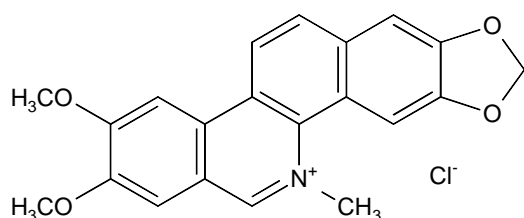


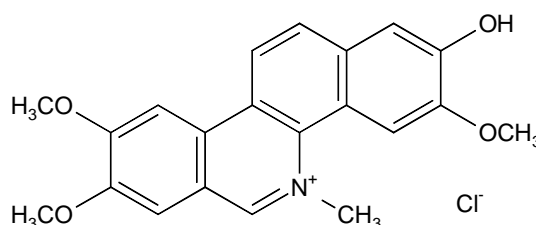
Abb. 10: Schematische Darstellung des durch Doxorubicin stabilisierten „cleavable-complex“; DNA-Strangbrüche sind die Folge [Kohn, 1996]

2.2.3 Topoisomerasen-Hemmstoffe mit Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Struktur

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist Lycobetain (**10**) ein Topoisomerasen-Hemmstoff, der sowohl Topoisomerasen I als auch Topoisomerasen II bei einer Konzentration von 10 μM unter Ausbildung eines stabilen Intermediates vollständig hemmt [Niederberger, 1998]. Nitidin (**23**), ein aus der Pflanze *Zanthoxylum nitidum* Roxb. (Rutaceae) isoliertes Alkaloid [Arthur et al., 1958], und Fagaronin (**24**), isoliert aus *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae) [Messmer et al., 1972], sind ebenfalls Topoisomerasen-I-Hemmstoffe [Janin et al., 1993; Larsen et al., 1993; Wang et al., 1993]. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Benzo[c]phenanthridin-Alkaloide die durch Topoisomerasen induzierte DNA-Relaxation hemmen, indem sie den Enzym-DNA-Komplex stabilisieren [Wang et al., 1993; Fang et al., 1993]. Weitere Untersuchungen an zwei humanen Camptothecin-resistenten Tumorzelllinien (CPT-K5 und A2780/CPT-2000) zeigten, dass Nitidin die Topoisomerasen-Aktivität dieser Zelllinien hemmt [Gatto et al., 1996; Makhey et al., 1996]. Die Synthese neuer Nitidin- und Fagaronin-Analogen im Hinblick auf Camptothecin-Resistenz ist somit eine sinnvolle Alternative in der Entwicklung neuer antineoplastischer Substanzen.



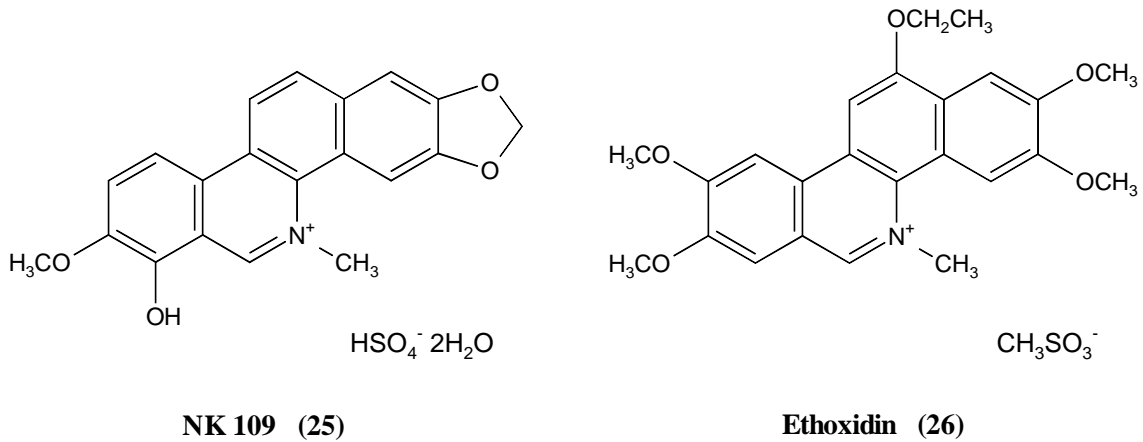
Nitidin (23)



Fagaronin (24)

Ein semisynthetisches Nitidin-Analog ist das 2,3-Methylenedioxy-5-methyl-7-hydroxy-8-methoxy-benzo[c]phenanthridiniumhydrogensulfatdihydrat NK109 (**25**), das durch Stabilisierung des „cleavable-complex“ die Topoisomerasen-II-Aktivität hemmt [Fukuda et al., 1996; Kabasawa et al., 1996]. Ferner ist **25** ein potenzieller Wachstumsinhibitor [Nakanishi et al., 1999] und bei einer Reihe von resistenten Tumorzelllinien aktiv [Kanzawa et al., 1997]. Ein weiteres semisynthetisches Benzo[c]phenanthridin-Derivat ist Ethoxidin (**26**), das, vom Fagaronin abgeleitet, eine Ethoxy-Gruppe in Position 12 und eine Methoxy-Gruppe in

Position 2 besitzt. Ethoxidin hemmt die DNA-Relaxation im Vergleich zum Fagaronin schon bei einer 10-fach niedrigeren Konzentration [Fleury et al., 2000].



Viele Topoisomerasen-Hemmstoffe besitzen aufgrund ihrer Struktur die Fähigkeit an die DNA zu binden. Es wird deshalb angenommen, dass durch die Intercalation der Substanzen diese die optimale Position für die Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes einnehmen und somit ein Auflösen des „cleavable-complex“ verhindert wird [Corbett et al., 1993].

2.3 Intercalation in die DNA

Substanzen mit vollständiger oder teilweise planarer Struktur, die sich in die Doppelhelix der DNA einschleiben können, bezeichnet man als Intercalatoren (lat.: *intercalare* = einschleiben). Die Einlagerung der Substanz führt zu einer lokalen Veränderung der DNA-Struktur und behindert die DNA-Replikation und -Transkription.

Reine Intercalatoren lagern sich zwischen zwei Basenpaaren in die große Furche der DNA ein, während andere wiederum an die kleine Furche der DNA binden und als Liganden bezeichnet werden. In der folgenden Abbildung ist eine B-DNA schematisch dargestellt (Abb. 11). Sie besteht aus zwei Polynucleotidketten, die sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse winden und eine Doppelhelix bilden. Die vier DNA-Basen besetzen die

Innenseite der Helix, und jede Base ist über Wasserstoffbrücken mit einer Base des komplementären Stranges zu einem so genannten Basenpaar verbunden [Dickerson et al., 1982]. Die Form der großen Furche ist breit und tief, so dass planare Substanzen sich einfach zwischen zwei Basenpaaren einschieben können, während bei der engen und tiefen Form der kleinen Furche nur eine Anlagerung der Substanzen möglich ist.

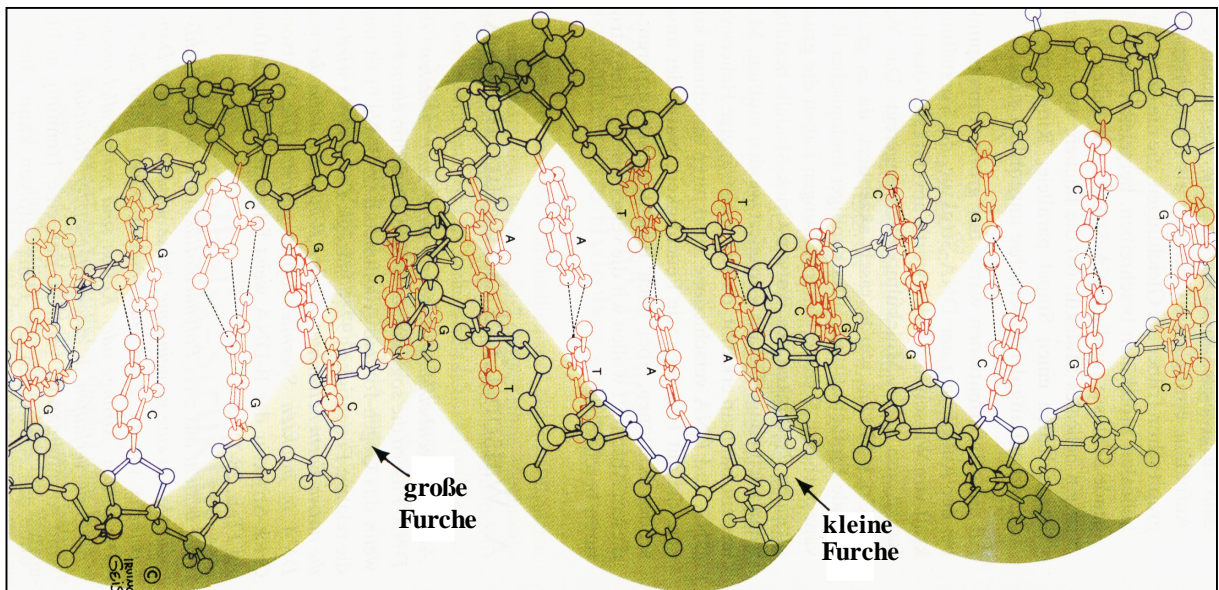
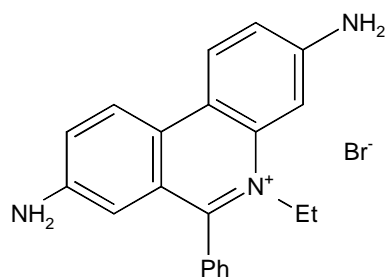
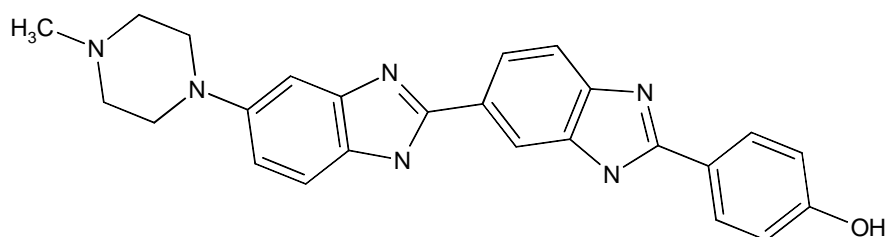


Abb. 11: Abbildung einer B-DNA [Voet et al., 1994]

Ein bekannter Intercalator ist Ethidiumbromid (**27**), das sich zwischen die gestapelten Basen der DNA schiebt und aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften als Nachweis von Duplex-DNA eingesetzt wird [Morgan et al., 1979]. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst H33258 (**28**) dagegen bindet an die kleine Furche der DNA mit einer speziellen Affinität für A-T-reiche Regionen [Wang et al., 1994]. Beide Substanzen dienen als Referenzverbindungen zur Untersuchung von Substanzen auf ihre Interaktion mit der DNA.



Ethidiumbromid (27)



Hoechst H33258 (28)

Viele Topoisomerasen-I- und Topoisomerasen-II-Hemmstoffe sind gleichzeitig auch Intercalatoren, wie z. B. NB-506 (**13**), Mitoxantron (**17**), Amsacrin (**18**) und Ethoxidin (**26**) [Gimenez-Arnau et al., 1998; Bailly et al., 1999; Fortune et al., 1999; Fleury et al., 2000]. Camptothecin (**7**) und seine synthetischen Analoge Topotecan (**11**) und Irinotecan (**12**) sowie der Topoisomerasen-II-Hemmstoff Etoposid (**16**) sind dagegen keine DNA-Intercalatoren [Langer et al., 1999; Strumberg et al., 1999]. Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie zur Interaktion von Substanzen mit der DNA können bei der Suche und Synthese von neuen Wirkstoffen helfen [Yang et al., 1999].

3 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Synthesewege zu etablieren, die eine einfache Darstellung von bekannten und neuen Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten mit unterschiedlichem Substitutionsmuster möglich machen. Im Anschluss an die synthetischen Arbeiten sollten Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen mittels cytotoxischer Testmethoden Aufschluss über die wesentlichen für die cytotoxische Wirkung verantwortlichen Strukturelemente geben.

Mittels Sulforhodamin-B-Assay sollte die wachstumshemmende Wirkung der synthetischen und kommerziellen Verbindungen an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht werden.

Da Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate die Fähigkeit zur Intercalation oder Bindung an die kleine Furche der DNA besitzen, sollte überprüft werden, ob die synthetisierten Substanzen eine nichtkovalente Wechselwirkung mit der DNA eingehen. Dazu sollte die Konkurrenz mit bekannten Intercalatoren wie Ethidiumbromid (intercaliert in den Doppelstrang der DNA) und dem Hoechst-Farbstoff H33258 (bindet an die kleine Furche der DNA) Aufschluss über die Affinität der Substanzen zur Doppelstrang-DNA geben. Zusätzlich sollte mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) untersucht werden, ob die Verbindungen DNA-Strangbrüche verursachen.

Unter Berücksichtigung der Daten aus den Wachstums- und Intercalationstests sollte dann die Beeinflussung von humanen Topoisomerasen mit den verschiedenen Substanzen untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Lycorin und Lycobetain

Lycorin ist ein Alkaloid der Pflanzenfamilie *Amaryllidaceae* und kommen in den verschiedensten Gattungen wie z. B. *Narcissus pseudonarcissus* L., *Hymenocallis littoralis* Salisb., *Crinum latifolium* L., *Galanthus elwesii* Hook. sowie *Lycoris radiata* Herb. vor. Durch Oxidation von Lycorin entsteht das Alkaloid Lycobetain (Ungeremine). Chemisch kann man *Amaryllidaceae*-Alkaloide als Pyrrolo[3,2,1-de]phenanthridine bezeichnen.

4.1.1 Lycorin

4.1.1.1 Gewinnung

Lycorin (**9**) wurde als Ausgangsverbindung für die Darstellung von Lycobetain (**10**) eingesetzt. Da aufgrund der chiralen Zentren im Molekül die Synthese sehr aufwendig ist [Irie et al., 1970; Tsuda et al., 1975; Stephenson et al., 1991; Grotjahn et al., 1993; Gonzalez et al., 1995; Hoshino et al., 1995; Perez et al., 1996; Schultz et al., 1996], wird normalerweise Lycorin aus Pflanzenmaterial gewonnen.

In der Literatur ist Lycorin vielfach beschrieben, doch ist das Vorkommen von Lycorin in den Pflanzen mit 0,005 – 0,01% bezogen auf das eingesetzte Pflanzenmaterial sehr gering [Ieven et al., 1982; Tato et al., 1988; Suau et al., 1990; Likhitwitayawuid et al., 1993; Bastida et al., 1995; Bastida et al., 1996; Campbell et al., 1998]. Einzig aus der Pflanze *Sternbergia lutea* L. wurde Lycorin mit einer Ausbeute von mehr als 1 % isoliert [Amico et al., 1978; Evidente et al., 1984a]. Somit lag es nahe, die Pflanze *Sternbergia lutea* L. (Abb. 4) für die Gewinnung von Lycorin einzusetzen.

Anhand von Vorversuchen mit der Pflanze *Zephyranthes candida* Herb. (Abb. 3) aus dem botanischen Garten der Universität Kaiserslautern sollte geprüft werden, ob die Vorschrift zur Isolierung von Lycorin nach Evidente et al. in unserem Labor geeignet ist. Dazu wurden die getrockneten Zwiebeln der Pflanze zerkleinert und mit 1%iger Schwefelsäure mazeriert. Die breiige Masse wurde durch ein Tuch gepresst und die Pressflüssigkeit zum Nachweis von Lycorin mittels HPLC (Säule: RP-18; Fließmittel: Methanol/0,2 M Ammoniumacetatlösung; Gradientenlauf: 4 min 100 % MeOH, 2 min 75 % MeOH, 25% NH₄Ac-Lösung) kontrolliert. Der Vorgang der Mazeration wurde so oft wiederholt, bis kein Lycorin mehr in der Pressflüssigkeit nachzuweisen war. Die vereinigte Extraktionslösung wurde mit Natriumhydroxidlösung auf pH 10 eingestellt und zum Ausfällen von Lycorin im Dunkeln aufbewahrt. Die alkalische Lösung wurde zentrifugiert, das ausgefällte Lycorin gesammelt und durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt.

Aus 1 kg *Z. candida* wurden 200 mg reines Lycorin isoliert, das mittels ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektren eindeutig charakterisiert werden konnte. Mit der gleichen Isolierungsmethode wurden aus 1 kg *St. lutea* 2 g Lycorin gewonnen.

In den Abbildungen 12 und 13 sind die NMR-Spektren von Lycorin abgebildet, die mit entsprechenden Literaturdaten übereinstimmen [Ali et al., 1981; Evidente et al., 1983a; Likhitwitayawuid et al., 1993].

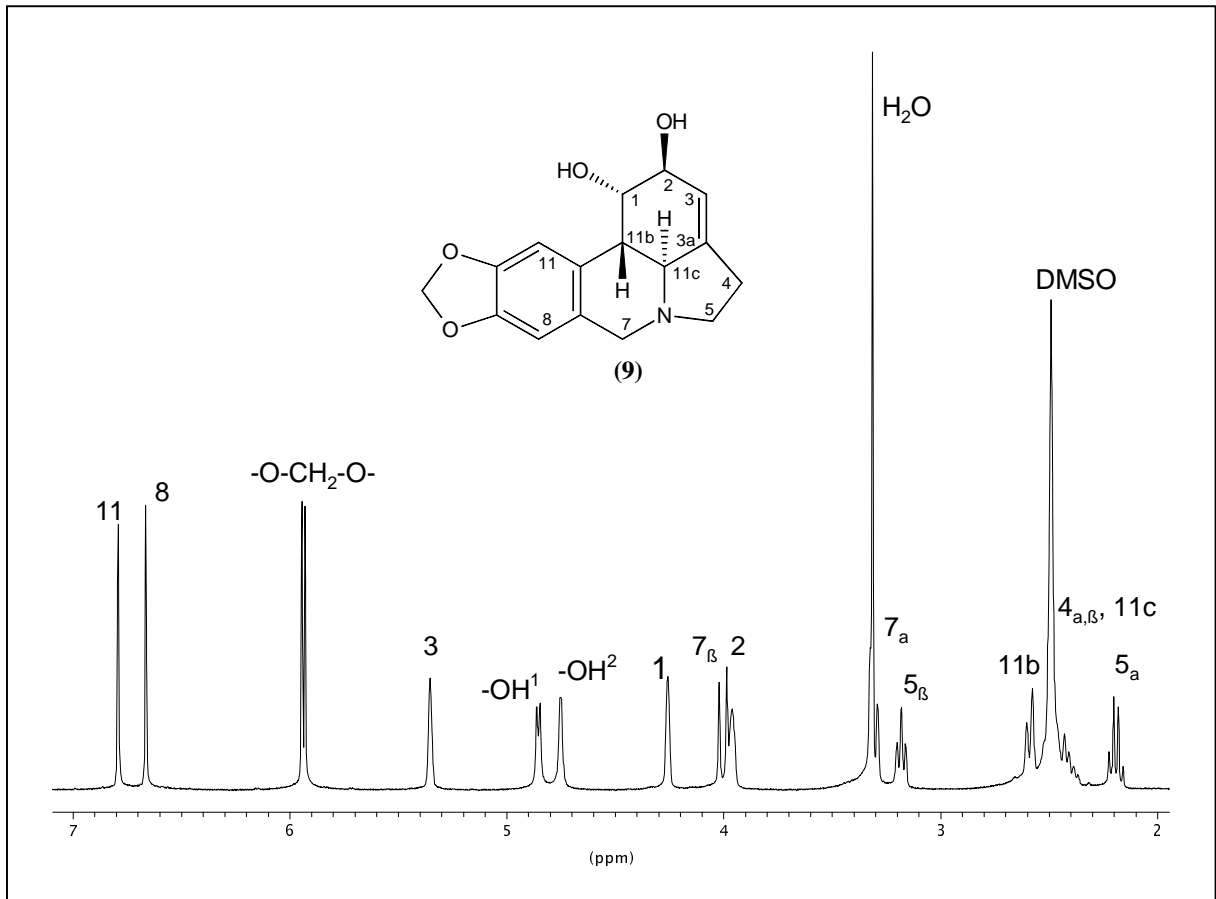


Abb. 12: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Lycorin in $d_6\text{-DMSO}$, Bereich von 7,1-2,0 ppm

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind sämtliche Protonensignale für Lycorin vorhanden und können eindeutig zugeordnet werden [Likhitwitayawuid et al., 1993]. Die Zuordnung der Protonen unter den Signalen von DMSO und H₂O erfolgte durch Vermessen der Verbindung in $d_4\text{-Methanol}$ und Vergleich mit der Literatur [Evidente et al., 1983a].

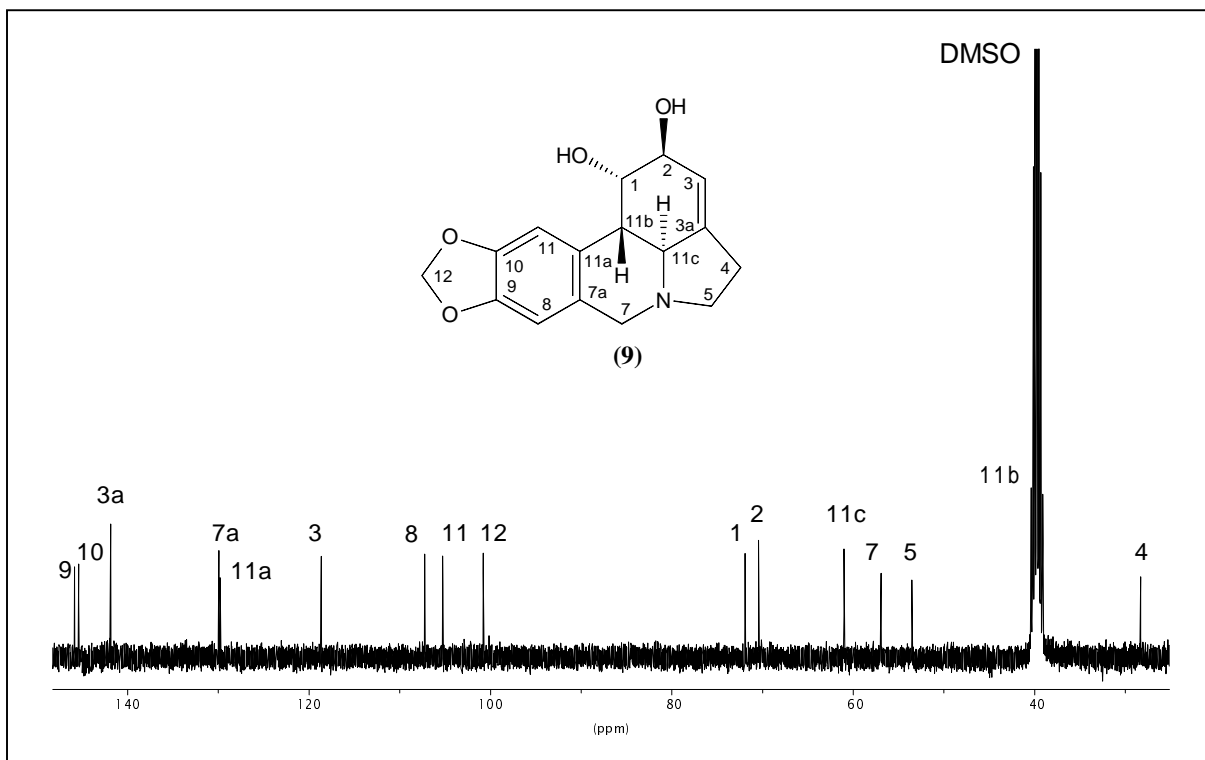


Abb. 13: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Lycorin in d_6 -DMSO, Bereich von 150,0-25,0 ppm

Die Signale im $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum konnten den Kohlenstoffatomen des Lycorins mithilfe von Inkrementberechnungen zugeordnet werden. Die Zuordnung wurde durch Literaturdaten bestätigt [Evidente et al., 1983; Likhitwitayawuid et al., 1993].

4.1.2 Lycobetain (Ungeremine)

4.1.2.1 Darstellung von Lycobetain aus Lycorin

Für Lycobetain (**10**) gibt es eine Reihe von Totalsynthesen [Siddiqui et al., 1990; Meiras et al., 1990; Lauk et al., 1991; Gonzalez et al., 1995; Gonzalez et al., 1996], die alle über mehrere Stufen mit geringer Gesamtausbeute verlaufen. Nur durch Oxidation von Lycorin ist Lycobetain in guten Ausbeuten leicht zugänglich [Fales et al., 1955, 1956, 1958; Takeda et al., 1957; Ghosal et al., 1986].

Für die Darstellung von Lycobetain legte man Lycorin (**9**) und Selendioxid in Ethanol vor und erhitzte die Lösung zwei Stunden am Rückfluss (Abb. 14). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt.

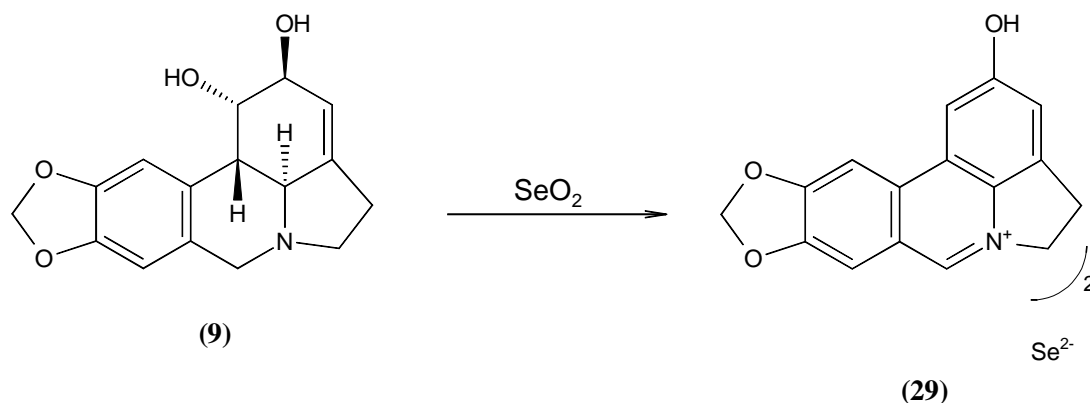


Abb. 14: Darstellung von Lycobetainhydro-selenid (**29**) [Ghosal et al., 1986]

Zur Isolierung von Lycobetain als Acetat wurde Lycobetainhydro-selenid (**29**) in wenig bidestilliertem Wasser gelöst und für den Austausch des Gegenions Selen über einen mit Acetat-Ionen beladenen Ionenaustauscher (Amberlite IRA-400) gegeben. Acetat als Gegenion war deshalb gewählt worden, weil bei den biologischen Tests mit Referenzsubstanzen Lycobetainacetat besser löslich war als Lycobetainchlorid. Der Austausch des Gegenions mittels eines Ionenaustauschers reduzierte die Ausbeute an Lycobetain sehr stark.

Die Darstellung von Lycobetainchlorid (**10a**) erfolgte direkt aus der Lösung des Lycobetainhydro-selenids (**29**) durch Zusatz von verdünnter Salzsäure. Lycobetainchlorid fiel als gelber Niederschlag aus, der auf einem Filter gesammelt und im Vakuum getrocknet wurde. Die Ausbeute an Lycobetainchlorid durch Fällung mit verdünnter Salzsäure ist wesentlich höher als die Ausbeute an Lycobetainacetat. Die spektroskopische Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigte die Struktur von **10a** [Abou-Donia et al., 1992].

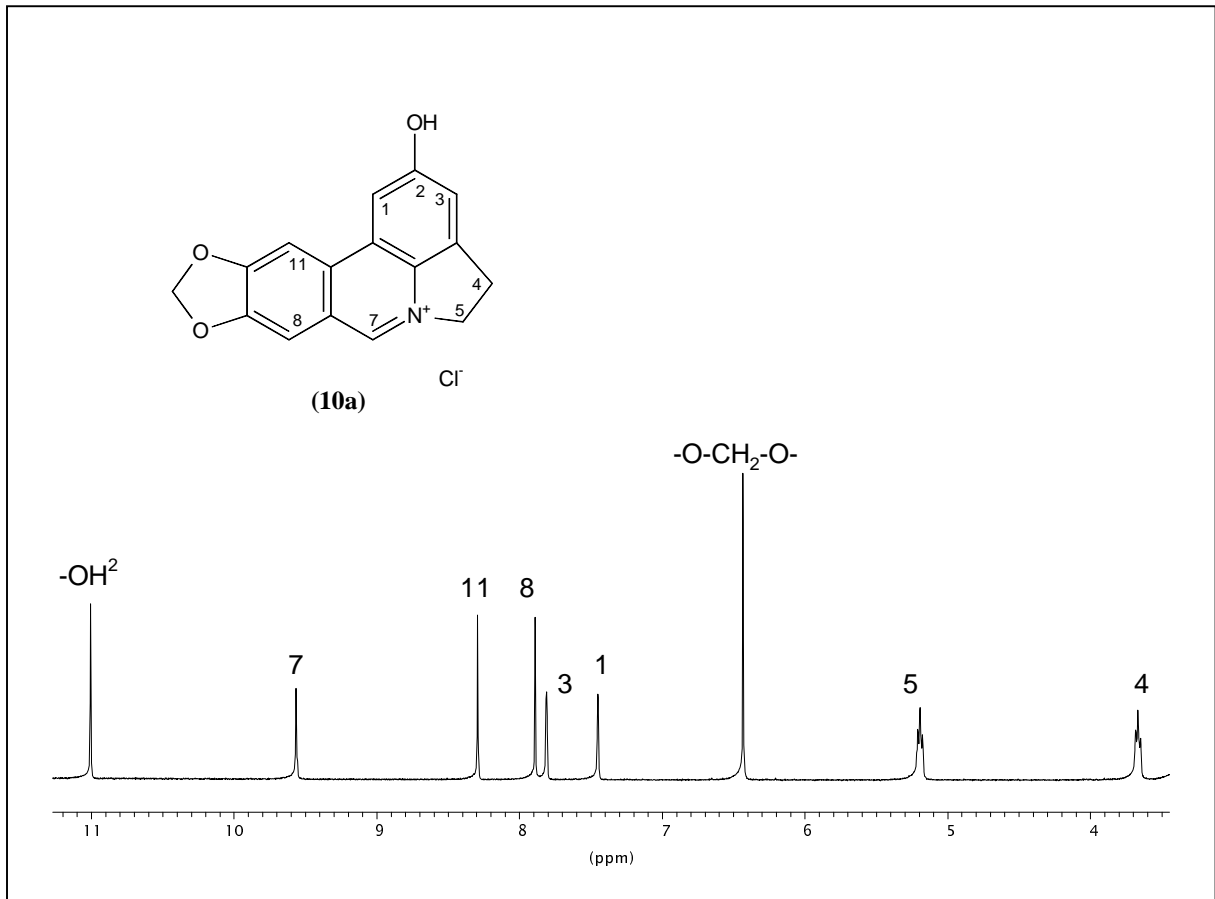


Abb. 15: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Lycobetainchlorid in d_6 -DMSO, Bereich von 11,2-3,5 ppm

Sämtliche Protonensignale des Lycobetainchlorids im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ sind im Vergleich zu Lycorin (Abb. 12) Tieffeld verschoben. Dies ist auf das konjugiert aromatische System im Lycobetain zurückzuführen. So ist statt des olefinischen Protonensignals am C-3 bei 5,35 ppm im Lycorin ein aromatisches Protonensignal bei 7,81 ppm in Resonanz. Auch an Position 7 ist statt der beiden aliphatischen Protonen (4,00 und 3,31 ppm) ein Signal für ein aromatisches Proton bei 9,56 ppm in Resonanz. Die beiden aliphatischen Protonensignale am C-11b (2,52 – 2,36 ppm) und C-11c (2,59 ppm) und die OH-Gruppe bei 4,86 ppm in Position 1 von Lycorin sind beim Lycobetain nicht mehr vorhanden. Der Vergleich mit Literaturdaten hat die Zuordnung der Protonensignale bestätigt [Ghosal et al., 1986; Lauk et al., 1991].

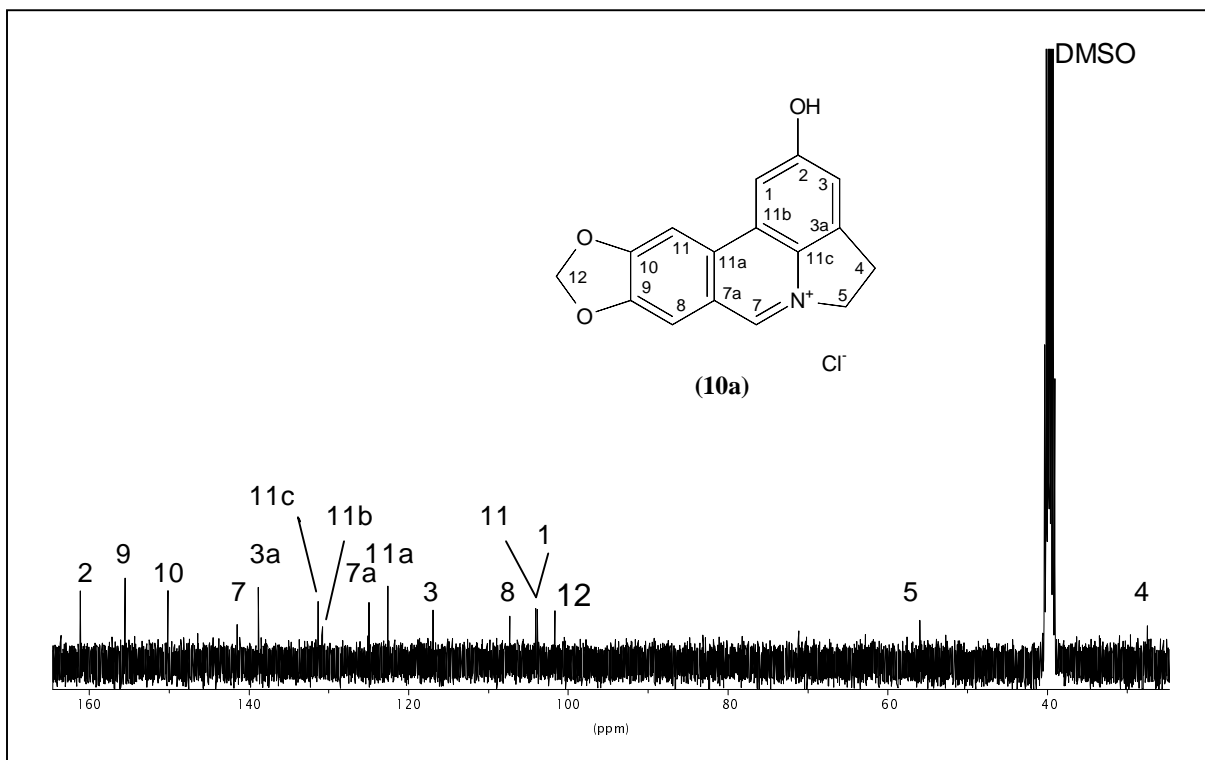


Abb. 16: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Lycobetainchlorid in d_6 -DMSO, Bereich von 165,0-25,0 ppm

Im ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Lycobetainchlorid fehlen die Signale für die aliphatischen Kohlenstoffatome wie beim Lycorin in den Positionen 1, 2, 7, 11b und 11c (Abb. 13). Stattdessen treten diese Signale wie zu erwarten beim Lycobetain (Abb. 16) alle im aromatischen ppm-Bereich in Resonanz. Eindeutig zu erkennen ist das Signal für das aromatische Kohlenstoffatom mit einer Hydroxid-Gruppe als Substituent bei 161,1 ppm und das Signal für Position 7 bei 141,5 ppm. Alle weiteren Signale wurden mithilfe von Inkrementabschätzungen und Literaturdaten zugeordnet [Ghosal et al., 1986].

4.1.3 Zusammenfassende Diskussion

Reines Lycorin (9) konnte durch Isolierung aus Pflanzenmaterial von *Sternbergia lutea* L. und *Zephyranthes candida* Herb. gewonnen und für die Darstellung von Lycobetainchlorid (10a) verwendet werden. Bei der Oxidation von Lycorin zu Lycobetain mit

Selendioxid (Abb. 14) erwies sich die Isolierung des Lycobetains als Hydrochlorid als die bessere Variante, da hier eine höhere Ausbeute erzielt werden konnte.

4.2 Synthesen für die Darstellung von Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten

Für eine mögliche Charakterisierung der für die biologischen Wirkungen wichtigsten Strukturelemente der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate sollte eine Reihe von Strukturanalogen synthetisiert werden. Dazu wurden aus einer Vielzahl von Synthesewegen die radikalische Cyclisierung, die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak und die photochemische Cyclisierung ausgewählt, da für diese Reaktionen die Ausgangsverbindungen leicht zugänglich sowie durch Variation der Substituenten eine ganze Reihe von Verbindungen dargestellt werden können. Zusätzlich sollte das bereits vorhandene Ringsystem von Phenanthridin durch Modifizierung chemisch verändert werden. Somit kann ein breites Stoffspektrum für die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung synthetisiert werden.

4.2.1 Radikalische Cyclisierung

Eine einfache Methode zur Darstellung von polycyclischen Verbindungen einschließlich Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten ist die radikalische Cyclisierung. In der Literatur wird diese Synthesevariante für eine Reihe von polycyclischen Verbindungen verwendet [Rosa et al., 1990; Schultz et al., 1996; Rosa et al., 1997a,b,c; Nakanishi et al., 1998; Cho et al., 1999].

Für die Darstellung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate werden aromatische sekundäre Amine unter Zusatz von Organozinnhydriden radikalisch cyclisiert [Rosa et al., 1997]. Der Mechanismus dieser Radikalreaktion ist schematisch am Beispiel der Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-anilin (**30**) zum Phenanthridin (**31**) in Abbildung 17 gezeigt. Durch thermische Spaltung von Azobisisobutyronitril (AIBN) wird der Kettenstart der radikalischen Cyclisierung initiiert. Das gebildete Butyronitril-Radikal abstrahiert das Proton vom Tributylzinnhydrid, und das entstandene Tributylzinn-Radikal reagiert mit dem halogenierten Aromaten unter homolytischer Spaltung der Kohlenstoff-Halogen-Bindung zum Aryl-Radikal (**32**). Das Radikal **32** kann entweder über eine 1,6-Addition (Variante A) zum 5,6-Dihydrophenanthridin-Radikal (**33**) cyclisieren, aus dem durch Abgabe eines Wasserstoff-Radikals 5,6-Dihydrophenanthridin (**34**) entsteht. Oder es findet eine 1,5-Addition (Variante B) zum Radikal **35** statt, das direkt durch intramolekulare Umlagerung zu **36** wird. Durch anschließende Abgabe eines Wasserstoff-Radikals wird aus **36** ebenfalls 5,6-Dihydrophenanthridin (**34**) gebildet. Durch anschließende Oxidation mit Mangandioxid entsteht Phenanthridin (**31**). Ob der Mechanismus über Variante A oder B verläuft, lässt sich in verschiedenen Fällen mithilfe von Substituenten klären [Rosa et al., 1997], kann aber aufgrund der in dieser Arbeit eingesetzten sekundären Amine nicht entschieden werden.

Untersuchungen zur radikalischen Cyclisierung haben gezeigt, dass ohne Zugabe von Organozinnhydriden die eingesetzten aromatischen sekundären Amine sich zersetzen und eine Cyclisierung nicht stattfindet [Nakanishi et al., 1998]. Die Cyclisierungsreaktion der gebildeten organischen Radikalintermediate verläuft schneller als z. B. das Abstrahieren eines Protons vom Organozinnhydrid [Curran, 1988]. Die Isolierung der 5,6-Dihydro-Cyclisierungsprodukte wie **34** (Abb. 17) ist nicht möglich, da sofort eine Rearomatisierung stattfindet, die über einen Pseudo-S_{RN1}-Mechanismus verläuft [Bowman et al., 1991].

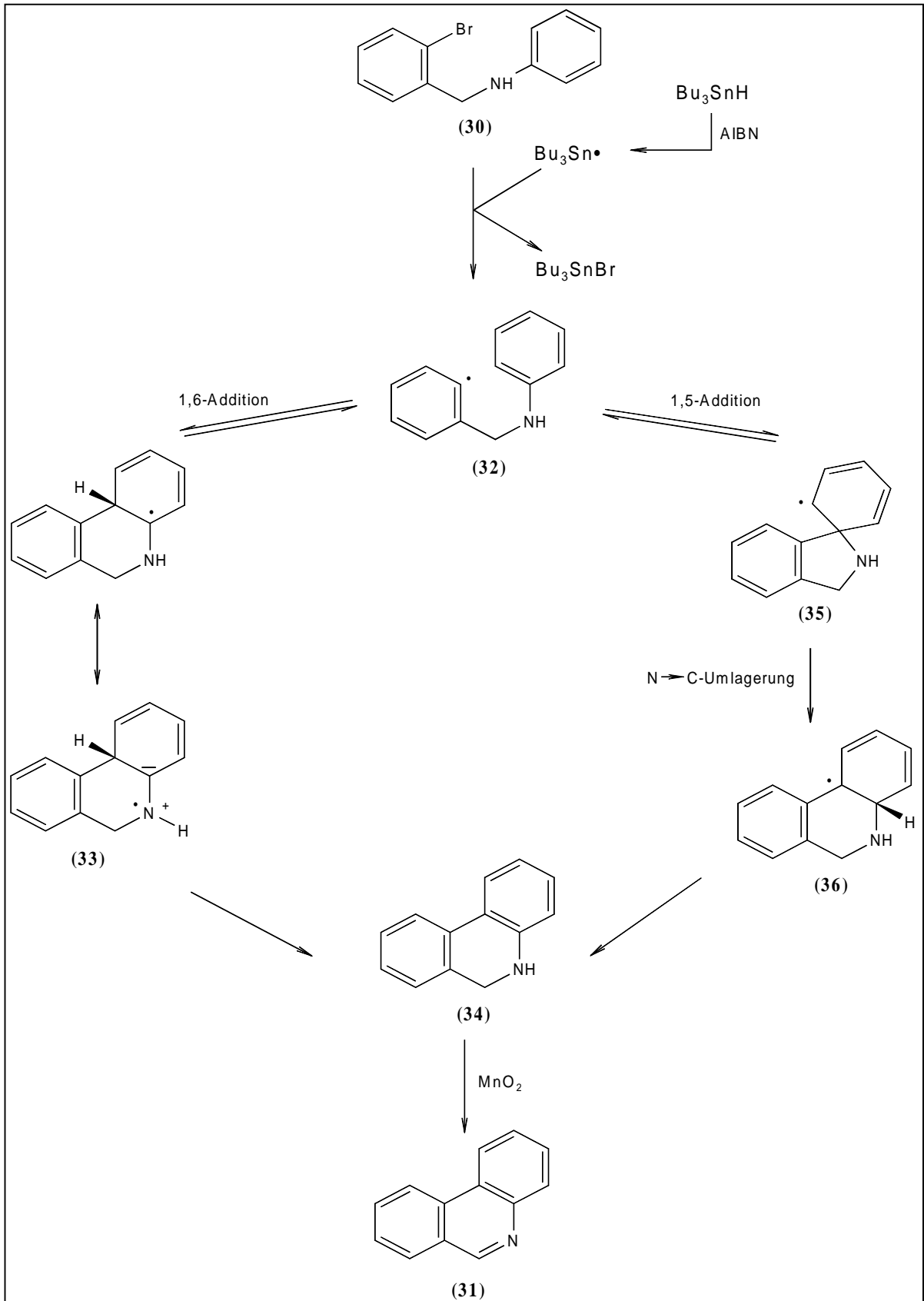
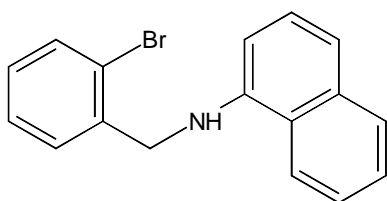


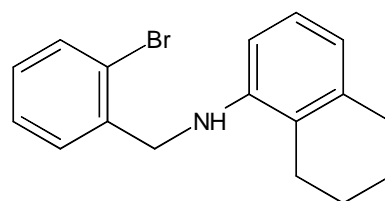
Abb. 17: Schematische Darstellung des Mechanismus der radikalischen Cyclisierung [Rosa et al., 1997]

4.2.1.1 Ausgangsmaterial

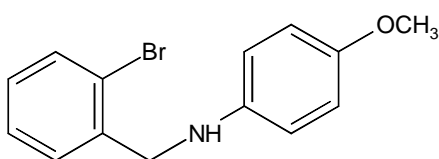
Die für die Cyclisierung eingesetzten aromatischen sekundären Amine können durch Reduktion von entsprechenden Schiff'schen Basen mit Natriumborhydrid dargestellt werden. Die Schiff'schen Basen sind aus aromatischen Aldehyden und aromatischen primären Aminen leicht zugänglich. Die folgenden aromatischen sekundären Amine wurden für die radikalische Cyclisierungsreaktion synthetisiert (Abb. 18).



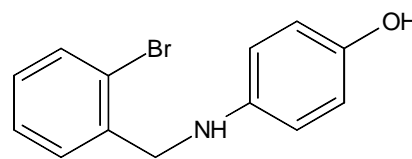
N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (37)



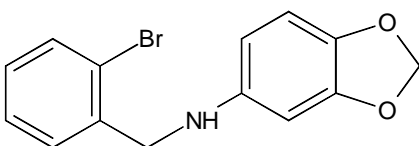
N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin (38)



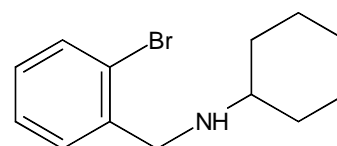
N-(2-Brombenzyl)-4-methoxyanilin (39)



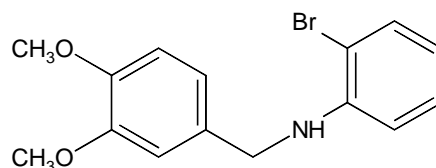
N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin (40)



N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (41)



N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (42)



N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (43)

Abb. 18: Synthetisierte aromatische sekundäre Amine

Die Charakterisierung der synthetisierten sekundären Amine erfolgte im $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$, wobei das Signal für die CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft zum Stickstoff im $^1\text{H-NMR}$ je nach Amin zwischen 4,00 und 6,00 ppm in Resonanz trat und auch das Proton am Stickstoff in diesem ppm-Bereich als breites Signal zu erkennen war. Im $^{13}\text{C-NMR}$ war das Signal für die CH_2 -Gruppe zwischen 40,0-50,0 ppm eindeutig zuzuordnen. Sämtliche anderen zu erwartenden Signale waren vorhanden und konnten entsprechend zugeordnet werden.

4.2.1.2 Zielverbindungen

Zur Darstellung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate wurde das synthetisierte aromatische sekundäre Amin und Tributylzinnhydrid in absolutem Toluol gelöst und die Lösung zum Sieden erhitzt. In der Siedehitze wurde gelöstes AIBN langsam zutropft. Nach zwei Stunden wurde die Reaktionslösung abgekühlt, mit Mangandioxid versetzt und erneut eine Stunde gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Toluol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in n-Pentan aufgenommen und zum Entfernen der gebildeten Tributylzinnverbindungen mit verdünnter Salzsäure gewaschen. Nach dem Trocknen der Lösung über Natriumsulfat wurde n-Pentan im Vakuum abdestilliert. Zur Reinigung der Zielverbindung wurde der Rückstand entsprechend aufgearbeitet.

4.2.1.2.1 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)

Mit der radikalischen Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin (38) gelang die Synthese und vollständige Charakterisierung der Verbindung 44 (Abb. 19).

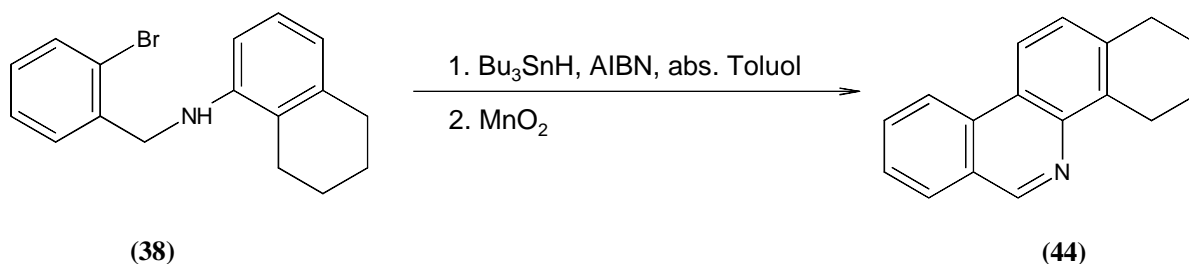


Abb. 19: Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)

Das Rohprodukt wurde zur weiteren Aufarbeitung säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/n-Hexan (1:1) als Fließmittel gereinigt. Da immer noch Spuren von Tributylzinnhydrid als Verunreinigung vorhanden waren, wurde als letzter Reinigungsschritt eine Sublimation im Vakuum durchgeführt. Im Folgenden sind die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren dieser neu synthetisierten Substanz abgebildet und die Signale entsprechend zugeordnet (Abb. 20 und Abb. 21).

Die Signale im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 20) sind den Protonen der Verbindung eindeutig zuzuordnen. Charakteristisch ist das Singulett bei 9,31 ppm für das aromatische Proton am C-6 in Nachbarschaft zum Stickstoff. Die Protonen am C-10 und C-11 treten bei 8,56 und 8,33 ppm als Dublett in Resonanz, während die aromatischen Protonen am C-7 (Dublett), C-8 (Pseudotriplett), C-9 (Pseudotriplett) und C-12 (Dublett) zwischen 8,10 und 7,30 ppm in Resonanz treten. Die aliphatischen Protonen am C-1, C-2, C-3 und C-4 zeigen das gleiche Aufspaltungsmuster wie die aliphatischen Protonensignale von 5,6,7,8-Tetrahydronaphthalin.

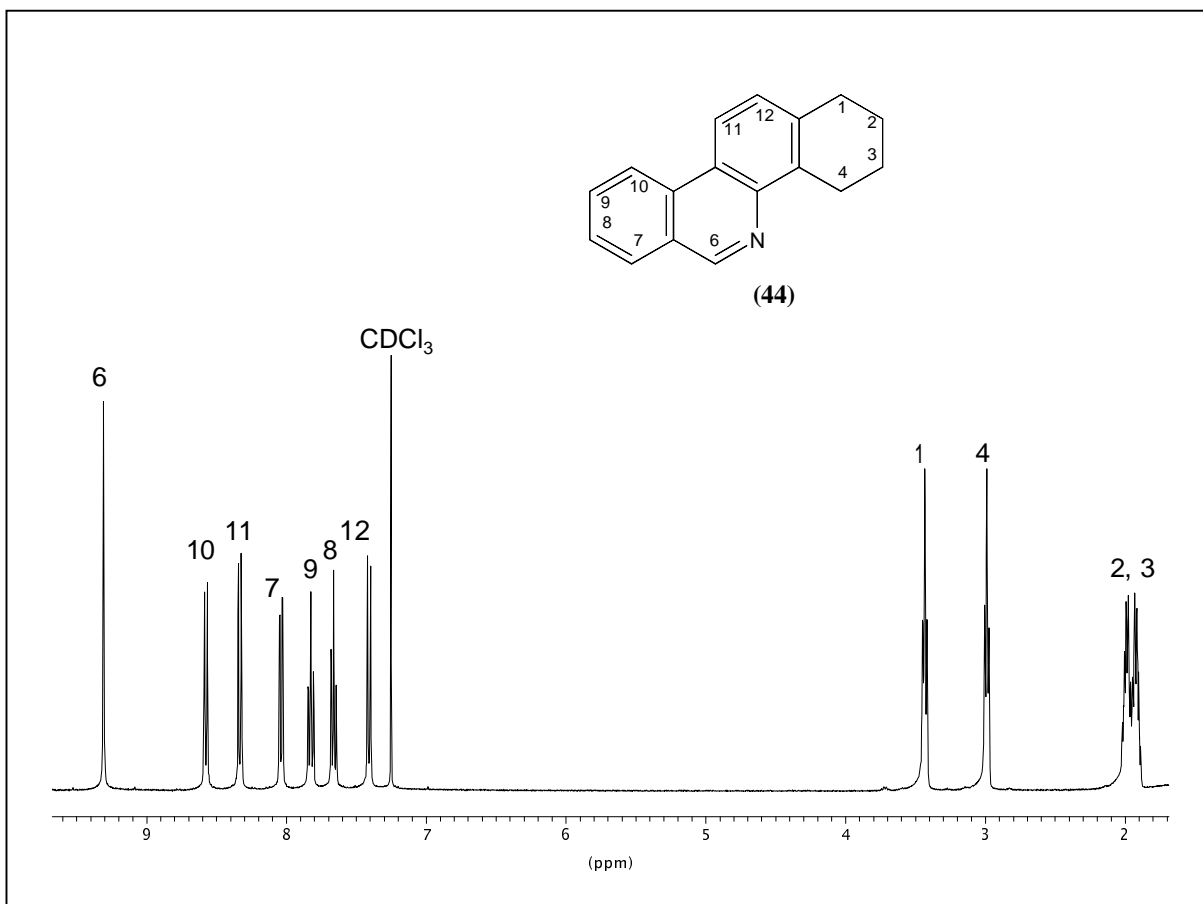


Abb. 20: ¹H-NMR-Spektrum von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin in CDCl₃, Bereich von 9,6-1,7 ppm

Die Signale im ¹³C-¹H-NMR-Spektrum (Abb. 21) entsprechen den Kohlenstoffatomen der Verbindung **44** und sind mithilfe von Inkrementberechnungen und durch Vergleich mit dem ¹³C-NMR-Spektrum von Benzo[c]phenanthridin (Abb. 29) zugeordnet worden. Das Signal für C-6 tritt bei 151,8 ppm in Resonanz und ist charakteristisch für ein aromatisches Kohlenstoffatom in Nachbarschaft zum Stickstoff. Die anderen Signale treten als Dublett bzw. als Singulett im aromatischen Bereich zwischen 143,0 und 119,0 ppm in Resonanz, während die Kohlenstoffatome des gesättigten Ringes (C-1 bis C-4) im aliphatischen Bereich des ¹³C-NMR-Spektrums in Resonanz treten und ebenfalls durch Inkrementberechnungen und Vergleich mit Literaturdaten von 5,6,7,8-Tetrahydronaphthalin zugeordnet werden konnten.

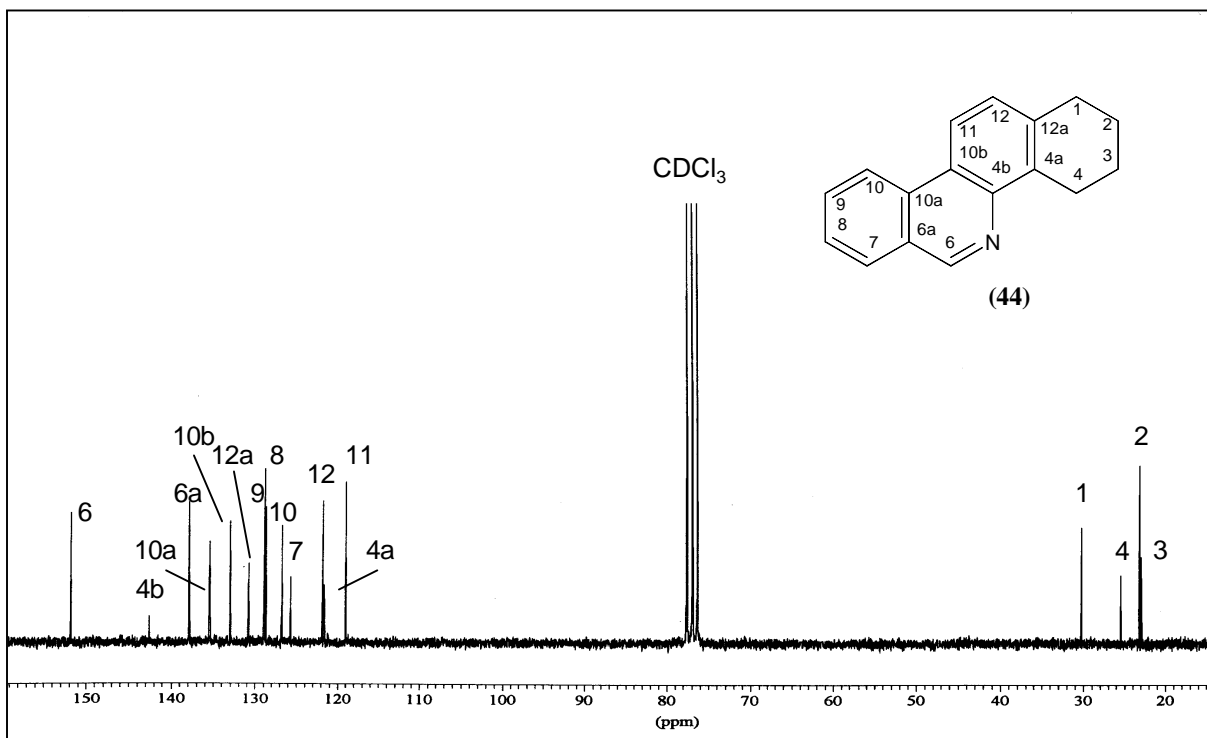


Abb. 21: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]-phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 155,0-15,0 ppm

4.2.1.2.2 2,3-Methyldioxyphenanthridin (45)

Analog zur Synthese von 5,6,7,8-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) wurde das Phenanthridin-Derivat **45** synthetisiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Dichlormethan/n-Hexan 1:1 als Fließmittel zeigten die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren, dass beide möglichen Verbindungen, 1,2-Methyldioxyphenanthridin (**46**) und 2,3-Methyldioxyphenanthridin (**45**), entstanden waren (Abb. 22). Aufgrund der Signalintensität im ^{13}C -NMR-Spektrum war **45** das Hauptprodukt und **46** das Nebenprodukt.

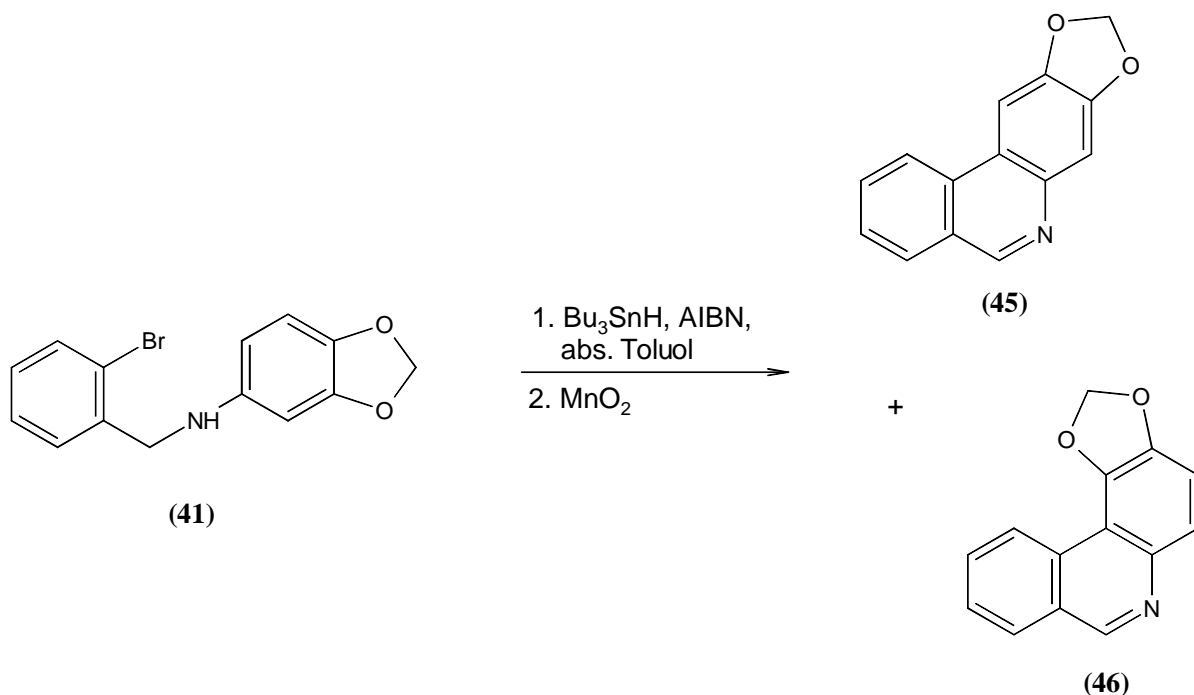


Abb. 22: Reaktionsgleichung der radikalischen Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (**41**)

Während im ¹H-NMR-Spektrum die Unterscheidung zwischen den beiden Verbindungen nicht eindeutig war, weil die beiden Dublett-Signale für die Protonen am C-3 und C-4 von **46** im aromatischen Bereich von 7,50–7,90 ppm lagen und sich mit den Singulett-Signalen von **45** am C-1 und C-4 sowie den Protonensignalen von C-8 und C-9 von beiden Verbindungen überlagerten, konnte im ¹³C-NMR-Spektrum die Existenz beider Verbindungen (**45** und **46**) nachgewiesen werden. Durch Inkrementabschätzungen wurden die Signale des Hauptproduktes **45** für C-1 und C-4 den chemischen Verschiebungen bei 107,6 ppm und 99,4 ppm zugeordnet, und die Signale für C-3 und C-4 des Nebenproduktes **46** traten bei 110,2 ppm und 102,0 ppm in Resonanz.

Eine dünnschichtchromatographische Trennung der Produkte gelang auf Kieselgel mittels Dichlormethan. Bei der anschließenden säulenchromatographischen Auftrennung wurde jedoch nur 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) isoliert. In den Abbildungen 23 und 24 sind die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren von der reinen Verbindung **45** abgebildet.

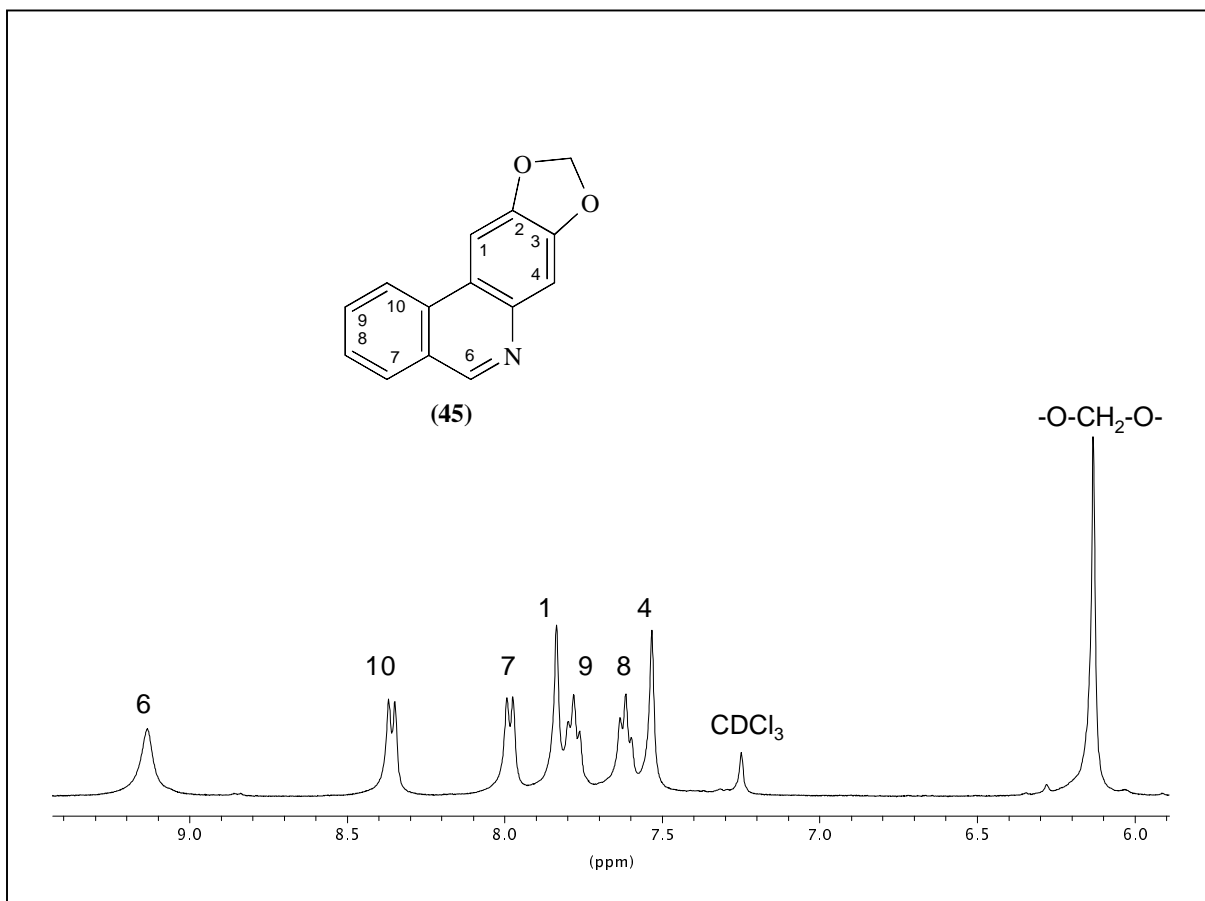


Abb. 23: ¹H-NMR-Spektrum von 2,3-Methylenedioxyphenanthridin in CDCl₃,
Bereich von 9,4-6,0 ppm

Die Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 23) sieht wie folgt aus. Das Signal für das Proton am C-1 ist durch den Methylenedioxy-Substituenten zu höherem Feld verschoben und tritt bei 7,84 ppm als Singulett in Resonanz. Das gleiche Verhalten ist auch für das Proton am C-4 (7,53 ppm) zu beobachten. Da der Methylenedioxy-Substituent keinen Einfluss auf die Protonen am C-7, C-8, C-9 und C-10 ausübt, treten diese Signale bei 8,36 ppm, 7,98 ppm, 7,84 ppm und 7,62 ppm in Resonanz und stimmen mit Literaturdaten von Phenanthridin überein [Titman et al., 1989]. Das Signal für die CH₂-Gruppe des Methylenedioxy-Substituenten ist im erwarteten ppm-Bereich (6,13 ppm) zu beobachten.

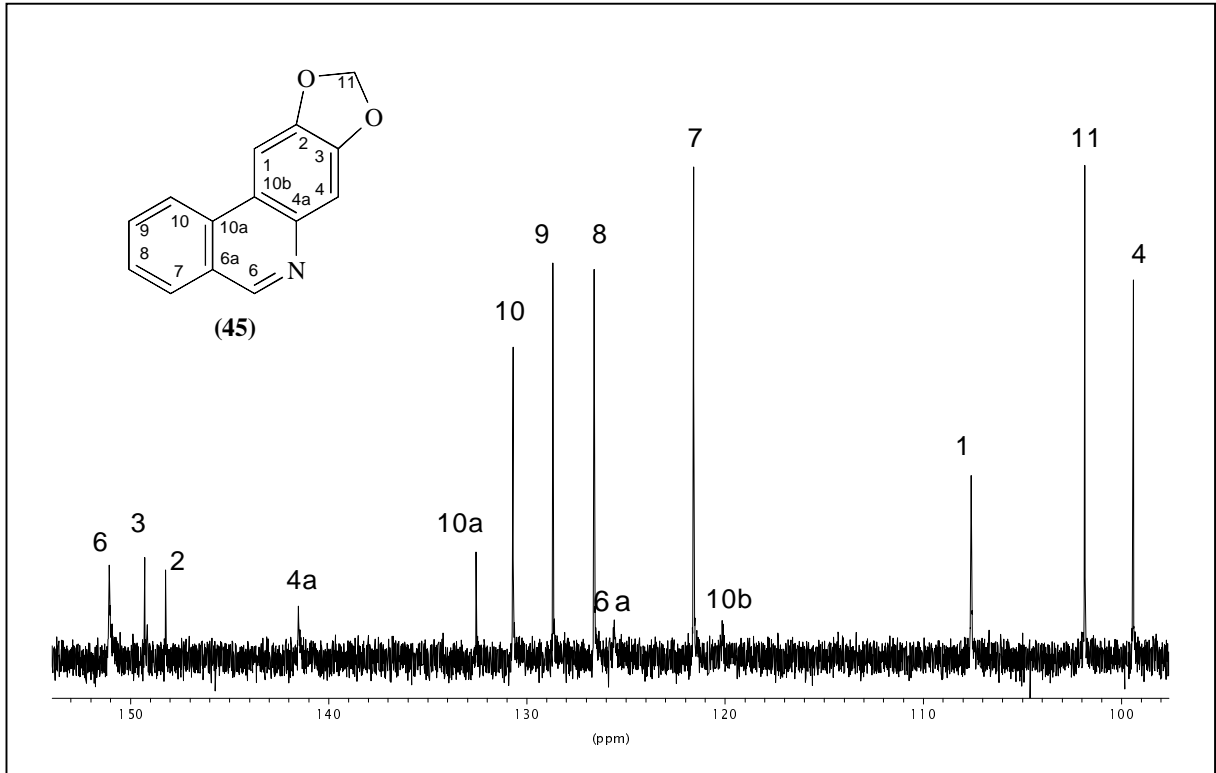


Abb. 24: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 2,3-Methylenedioxyphenanthridin in CDCl_3 ,
Bereich von 153,0-98,0 ppm

Auch im ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 24) konnten sämtliche Signale mithilfe von Inkrementberechnungen zugeordnet werden. Der Vergleich mit ^{13}C -NMR-Spektren der Ausgangsverbindung **41** und Phenanthridin (siehe Anhang) bestätigten die Zuordnung.

4.2.1.2.3 Darstellung von Benzo[c]phenanthridin

Bei der radikalischen Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (**37**) konnte **47** nicht isoliert werden (Abb. 25). Auf dem Dünnschichtchromatogramm waren eine ganze Reihe von Flecken zu beobachten, die die Bildung von verschiedenen Cyclisierungsprodukten vermuten lassen.

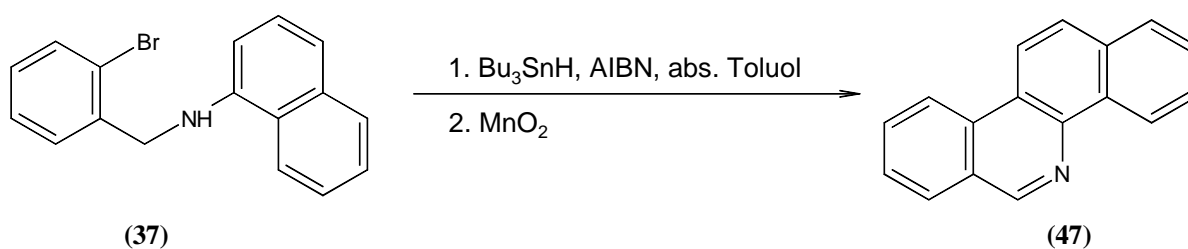


Abb. 25: Versuch der Darstellung von Benzo[c]phenanthridin (**47**)

Trotz Austauschens des Lösungsmittels gegen absolutes Benzol, Veränderung der Reaktionszeit und -temperatur sowie Variation der molaren Verhältnisse von Tributylzinnhydrid und Azobisisobutyronitril war es nicht möglich, die Verbindung **47** zu isolieren.

Da auf diesem Wege die Darstellung von Benzo[c]phenanthridin nicht gelang, wurde die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak als Alternative zur radikalischen Cyclisierung mit Amin **37** versucht (siehe Kapitel 4.2.2).

4.2.1.3 Zusammenfassende Diskussion zur radikalischen Cyclisierung

Mit der radikalischen Cyclisierung gelang die Darstellung von zwei neuen Verbindungen, 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) und 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**). Zahlreiche Versuche, Benzo[c]phenanthridin (**47**) durch radikalische Cyclisierung von **37** darzustellen, führten nicht zum Erfolg.

Nachteile der radikalischen Cyclisierung waren die geringe Ausbeute und die Schwierigkeit, die gebildeten Zinnorganylrückstände vollständig durch die Aufarbeitung der Reaktionslösung zu entfernen [Bowman et al., 1991].

4.2.2 Cyclisierung in flüssigem Ammoniak

Die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak ist als Herstellungsmethode für polycyclische Verbindungen wie Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate beschrieben [Kessar et al., 1973a,b,c; Kessar et al., 1978; Kessar et al., 1988] und wurde in dieser Arbeit neben der radikalischen Cyclisierung eingesetzt. Der Vorteil dieser Synthesevariante ist im Vergleich zur radikalischen Cyclisierung die einfache Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, da keine Zinnorganyle als Verunreinigungen auftreten.

In Abbildung 26 ist der Mechanismus dieser auch als Arin-Cyclisierung bezeichneten intramolekularen Ringschlussreaktion wieder am Beispiel von N-(2-Brombenzyl)-anilin (**30**) schematisch dargestellt. Das bei der Cyclisierung eingesetzte Kaliumamid ist eine starke Base und greift sowohl am halogenierten Benzolring A unter Ausbildung eines Arins, als auch am Stickstoffatom des Amins an. Der elektronische Zustand von Zwischenprodukt **48** kann durch die mesomeren Grenzstrukturen **48a** und **48b** schematisch wiedergegeben werden, wobei der eigentliche intramolekulare Ringschluss über Intermediat **49** zur Base **50** verläuft. Die Verbindung **50** nimmt ein Proton aus der Reaktionslösung auf, und das entstandene 5,6-Dihydrophenanthridin (**34**) kann durch Oxidation zum Phenanthridin (**31**) umgewandelt werden.

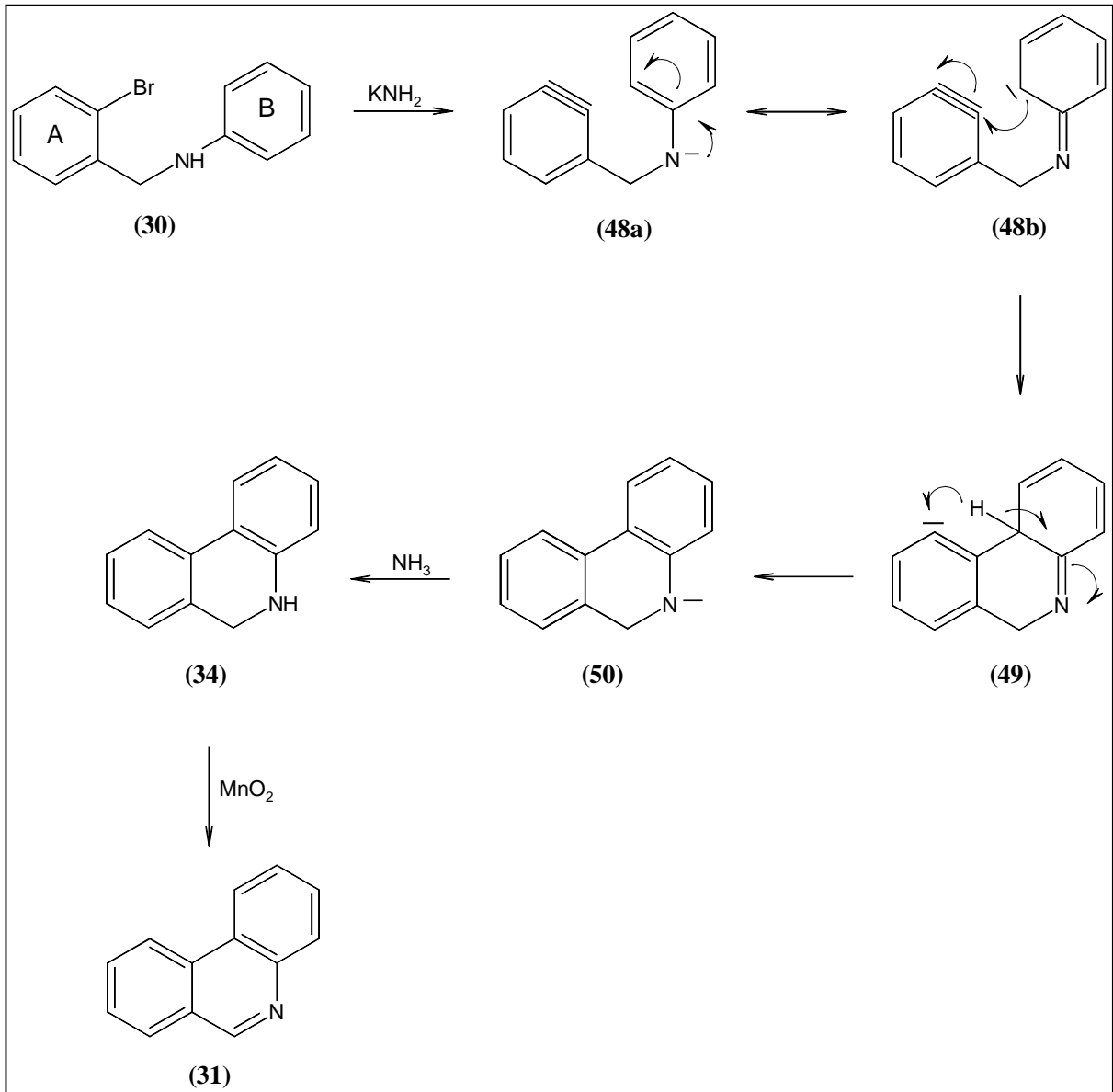


Abb. 26: Schematische Darstellung des Mechanismus der Arin-Cyclisierung [Kessar et al., 1973a]

4.2.2.1 Ausgangsmaterial

Für die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak wurden die gleichen aromatischen sekundären Amine wie bei der radikalischen Cyclisierung als Ausgangsmaterial eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.1.1).

4.2.2.2 Zielverbindungen

Für die Darstellung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate wurde Ammoniak in einen Rundkolben einkondensiert und Kalium portionsweise zugegeben. Nachdem sich das Kalium vollständig gelöst hat, wurden der Lösung einige Kristalle Eisen(III)nitrat als Katalysator zur Bildung von Kaliumamid hinzugefügt. Anschließend wurde das jeweilige Amin, gelöst in absolutem Ether, in die Kaliumamidlösung eingebracht und die Reaktionslösung bis zur vollständigen Abreaktion des Eduktes gerührt (DC-Kontrolle). Nach Reaktionsende wurde der Ansatz aufgearbeitet und die entsprechende Zielverbindung isoliert.

4.2.2.2.1 Benzo[c]phenanthridin (47)

Die Darstellung von **47**, ausgehend von N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (**37**), gelang mit der Cyclisierung in flüssigem Ammoniak mit einer Ausbeute von 63 % (Abb. 27). Nach drei Stunden war die Reaktion nach DC-Kontrolle (Kieselgel, Dichlormethan/n-Hexan 1:2, $R_f = 0,4$) beendet. Nach entsprechender Aufarbeitung der Reaktionslösung erfolgte die Reinigung des Benzo[c]phenanthridins (**47**) durch Sublimation.

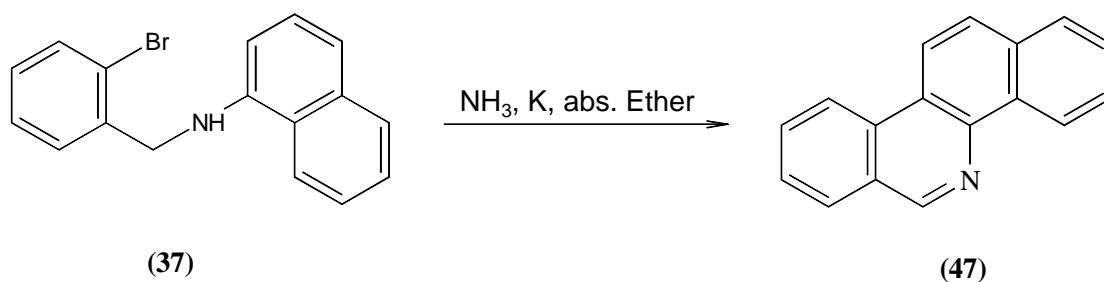


Abb. 27: Darstellung von Benzo[c]phenanthridin (**47**)

Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (Abb. 28) ist der aromatische Bereich herausgespreizt, in dem die Protonen der Verbindung in Resonanz treten. Charakteristisch sind die Signale der Protonen am C-6 und C-4, die durch den Einfluss des Stickstoffes zu tiefem Feld verschoben sind [Tilak et al., 1969]. Die Signale für die Protonen am C-10 und C-11 zeigen das gleiche typische Verhalten wie die entsprechenden Signale beim Phenanthridin (siehe Anhang), und auch die restlichen Signale der aromatischen Protonen konnten mithilfe von Inkrementberechnungen zugeordnet werden.

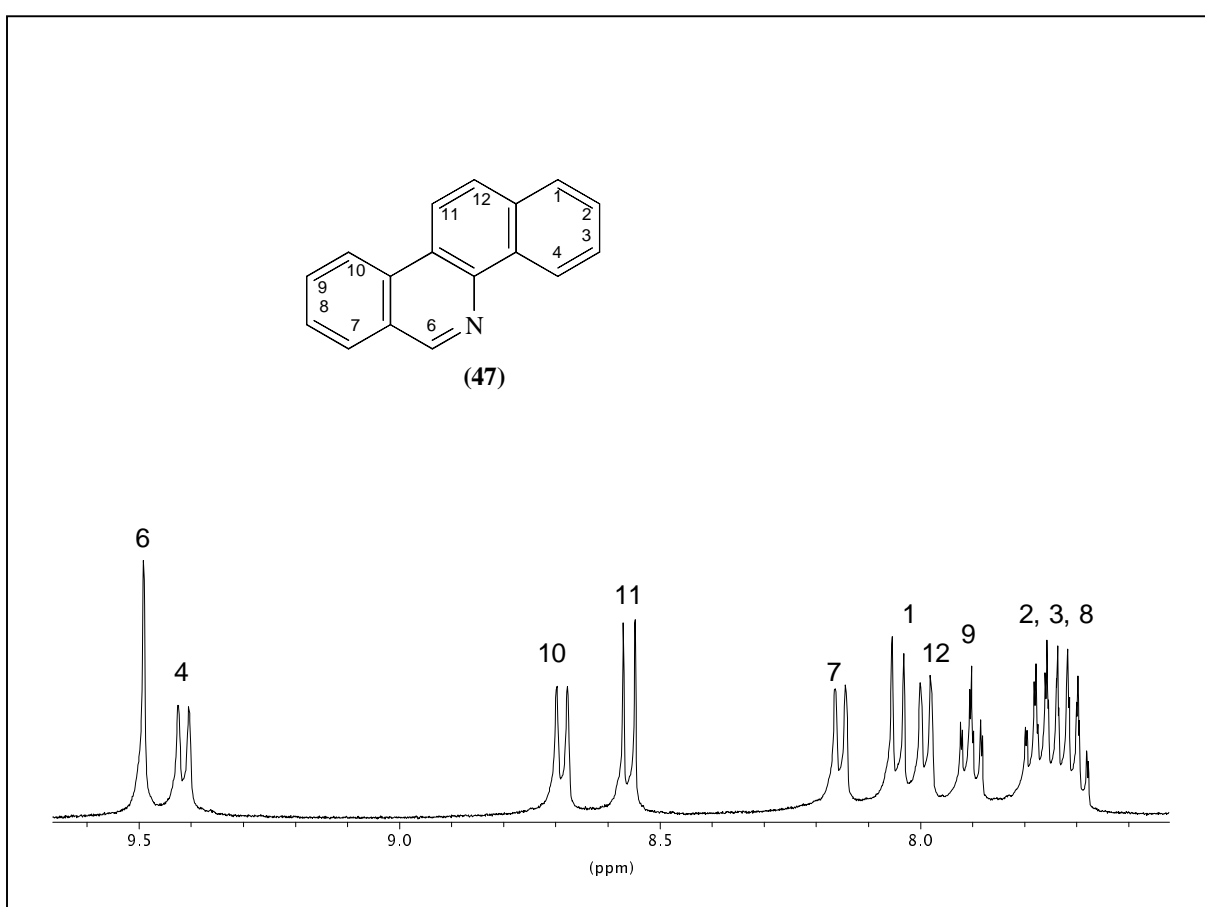


Abb. 28: $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von Benzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,6-7,6 ppm

Abbildung 29 zeigt das $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Benzo[c]phenanthridin (**47**). Die Signale entsprechen in ihren chemischen Verschiebungen den Kohlenstoffatomen von **47** und wurden durch Inkrementberechnungen bestimmt. Ein Vergleich mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) und NMR-Daten von Naphthalin bestätigte die Zuordnung.

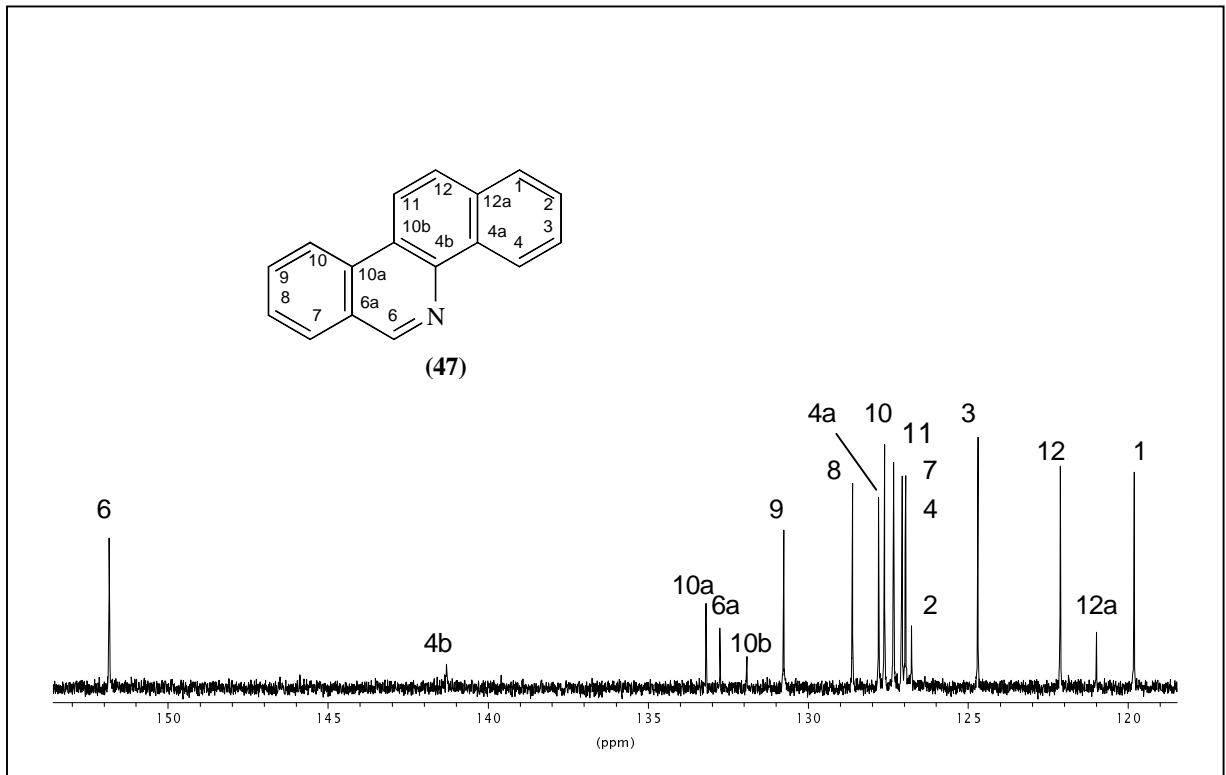


Abb. 29: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Benzo[c]phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 153,0-119,0 ppm

4.2.2.2.2 2-Methoxyphenanthridin (51)

Unter der analogen Reaktionsführung wie die Synthese von Benzo[*c*]phenanthridin wurde **51** in einer Ausbeute von 56 % dargestellt (Abb. 30). Auch hier war die Reaktion nach DC-Kontrolle (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 1:2, $R_f = 0,4$) nach drei Stunden abgeschlossen. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert. Im Folgenden sind zur Charakterisierung der Verbindung das $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 31 und 32) von 2-Methoxyphenanthridin abgebildet.

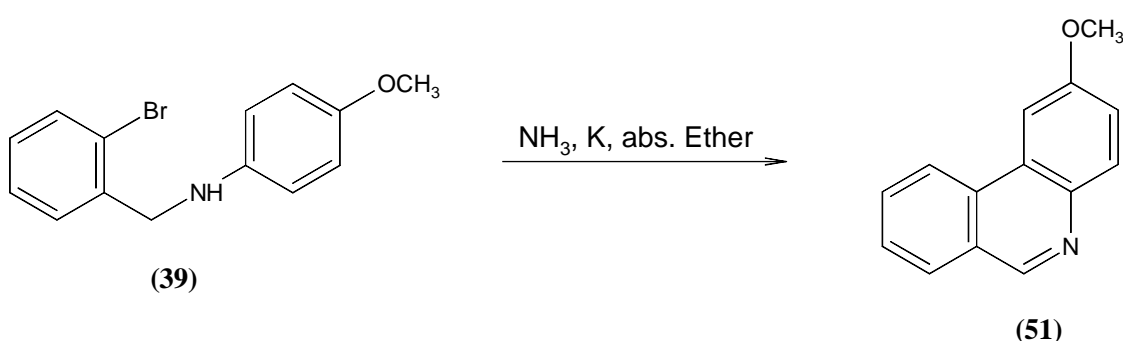


Abb. 30: Darstellung von 2-Methoxyphenanthridin (**51**)

Das in Abbildung 31 dargestellte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **51** zeigt den aromatischen Bereich. Das Signal für die Methoxy-Gruppe trat bei 3,98 ppm in Resonanz. Die Signale für die aromatischen Protonen am C-10, C-4, C-7, C-9 und C-8 sind im Vergleich zum $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) um $\sim 0,2$ ppm verschoben. Die Signale der Protonen am C-1 und C-3 erfahren aufgrund der Methoxy-Gruppe in Position 2 eine stärkere Abschirmung und treten bei höherem Feld in Resonanz, während gleichzeitig eine Aufspaltung der Signale durch die Protonen der Methoxy-Gruppe zu beobachten ist. So ist das Signal für das Proton in Position 1 gleich einem Dublett ($^4J_{\text{H,H}} = 2,7$ Hz) und das Signal für das Proton in Position 3 ein Dublett vom Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $^4J_{\text{H,H}} = 2,8$ Hz.

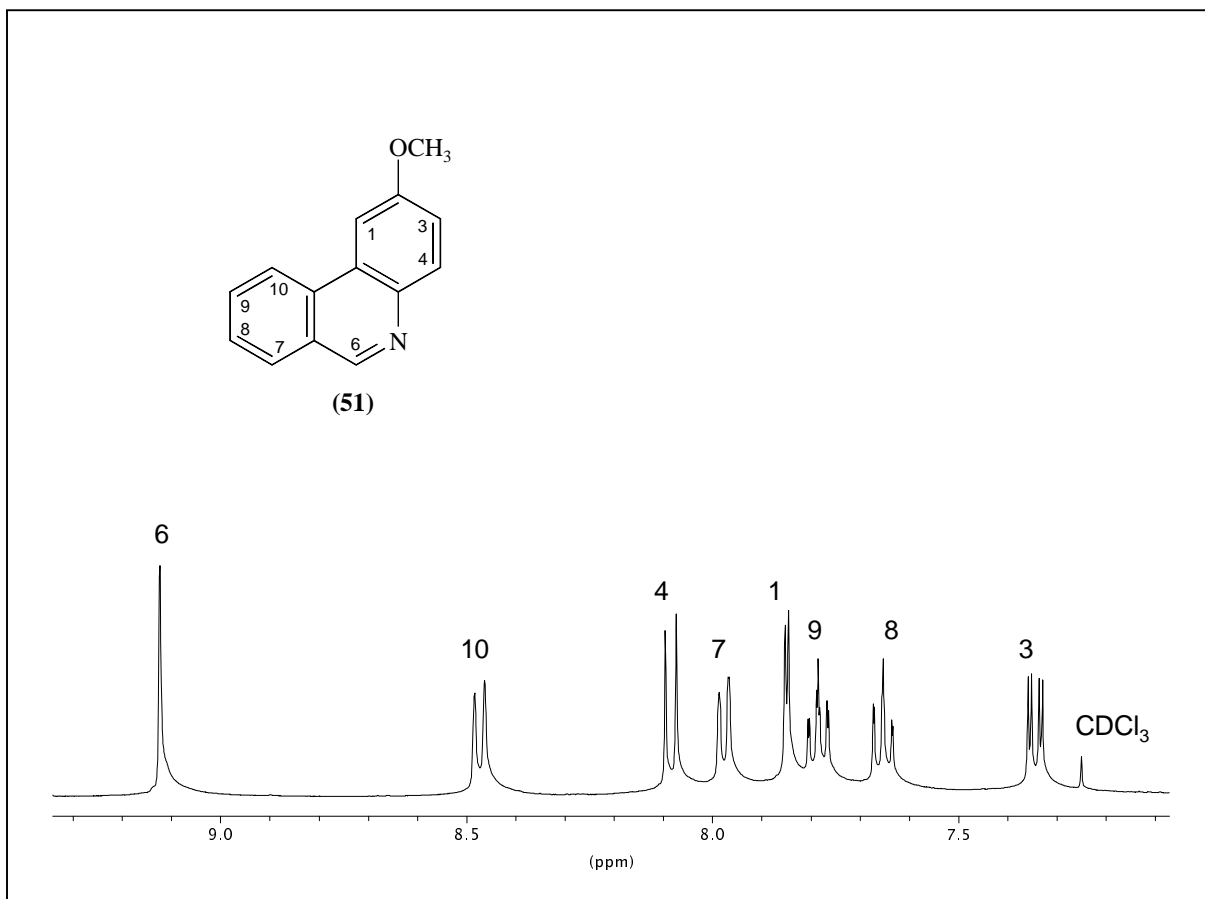


Abb. 31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,3-7,1 ppm

Alle Signale im $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von **51** (Abb. 32) lassen sich durch Inkrementabschätzungen und Vergleich mit dem $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) zuordnen. Charakteristisch sind die Signale von C-2 (Singulett) bei 158,4 ppm, von C-3 (Dublett) bei 118,4 ppm und von C-1 (Dublett) bei 103,0 ppm, die bei einer Methoxy-Substitution am aromatischen Ring bei diesen Resonanzen auftreten.

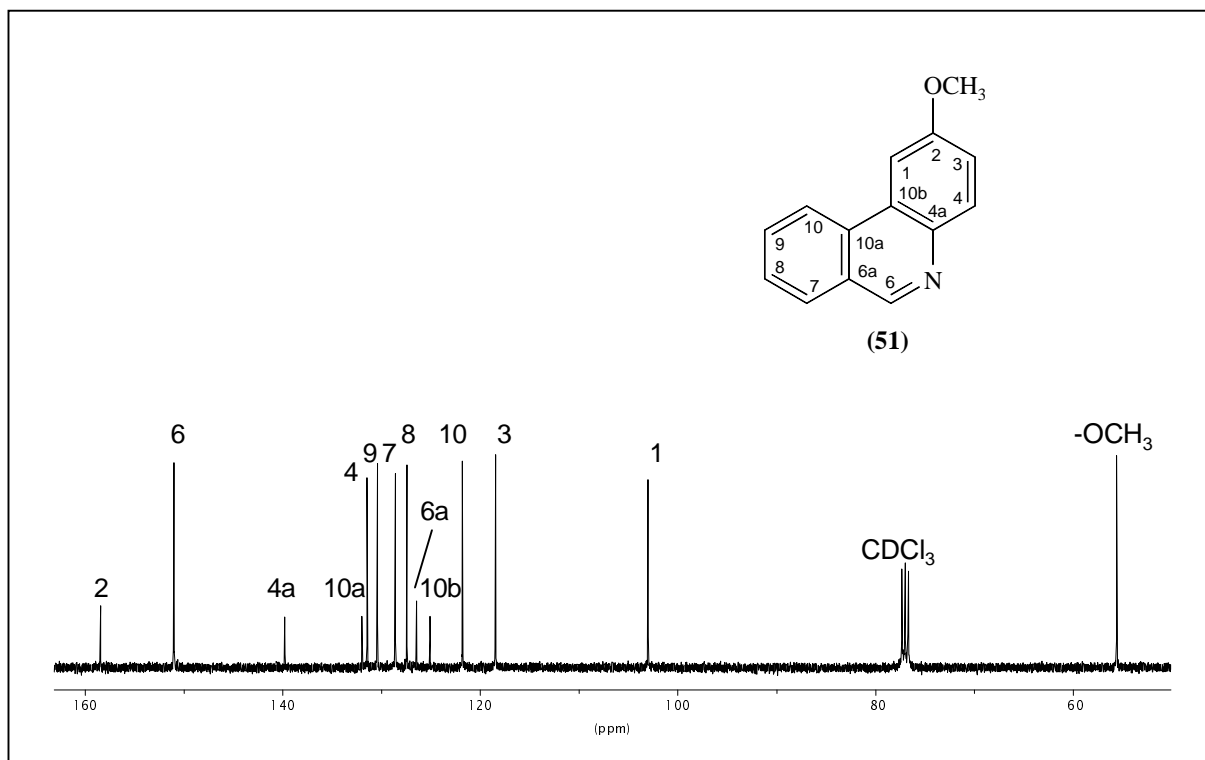


Abb. 32: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin in CDCl_3 ,
Bereich von 160,0-50,0 ppm

4.2.2.2.3 2-Hydroxyphenanthridin (52)

Bei der Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin (**40**) wurde **52** im Vergleich zu Benzo[c]phenanthridin (Ausbeute 63 %) und 2-Methoxyphenanthridin (Ausbeute 56 %) nur mit einer Ausbeute von 27 % isoliert (Abb. 33). Dies ist vermutlich auf den Hydroxy-Substituenten zurückzuführen, da das Kaliumamid auch an der Hydroxy-Gruppe angreift und das Proton abstrahiert. Durch den negativ geladenen Sauerstoff ist der elektronische Zustand des Zwischenproduktes nicht mehr wie in Abbildung 26 vorgeschlagen und andere Cyclisierungswege können auftreten. Nach fünf Stunden wurde die Reaktion abgebrochen, da auf dem Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 1:2) eine ganze Reihe von Produktflecken zu beobachten war. Der intensivste Fleck auf dem Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0,6$) wurde durch Säulenchromatographie isoliert und als 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) identifiziert.

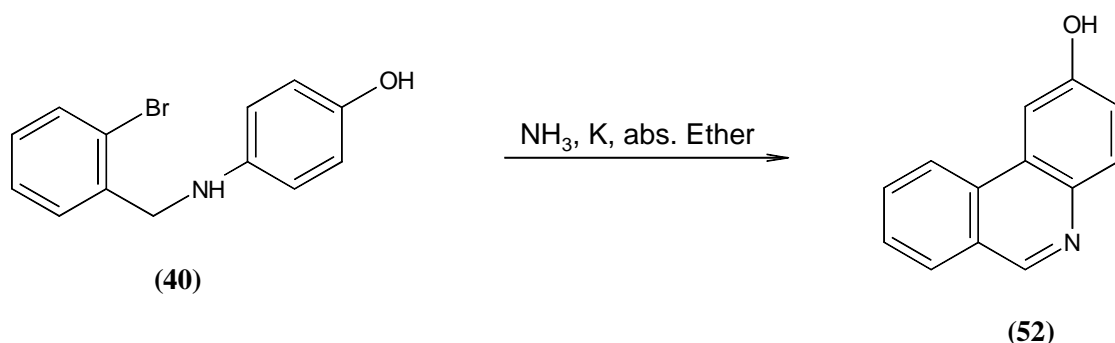


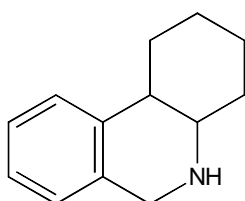
Abb. 33: Darstellung von 2-Hydroxyphenanthridin (52)

Alle Protonensignale der Verbindung liegen im erwarteten Bereich von 9,00-6,00 ppm. Da das $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von 2-Hydroxyphenanthridin von dem Signalmuster her mit dem Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin (Abb. 31) nahezu identisch ist, wurde auf eine Abbildung verzichtet. Im Vergleich zum $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ in Abbildung 31 ist eine Verschiebung aller Signale zu höherem Feld zu beobachten. So tritt das C-6H-Signal als Singulett bei 8,38 ppm, das C-10H-Signal als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 8,8 Hz bei 7,77 ppm, die C-4H- und C-7H-Signale als Dublett ($^3J_{\text{H,H}} = 8,8 \text{ Hz}$) bei 7,35 ppm, das C-1H-Signal als Singulett bei 7,06 ppm, das C-9H-Signal (Pseudotriplett) bei 6,77 ppm, das C-8H-Signal (Pseudotriplett) bei 6,57 ppm und das C-3H-Signal bei 6,47 ppm (Dublett, $^3J_{\text{H,H}} = 8,6 \text{ Hz}$) in Resonanz. Für die Hydroxy-Gruppe in Position 2 ist ein breites Signal bei 8,64 ppm zu beobachten.

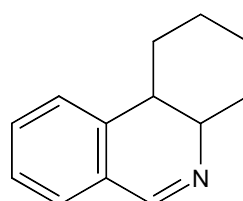
Auch das $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR-Spektrum}$ von 2-Hydroxyphenanthridin zeigt das gleiche Signalmuster wie das Spektrum von 2-Methoxyphenanthridin in Abbildung 32, weshalb auch hier auf eine Abbildung verzichtet wurde. Als Unterschiede sind zu nennen, dass das Signal für C-2 bei 155,9 ppm in Resonanz tritt, weil statt der Methoxy-Gruppe eine Hydroxy-Gruppe an Position 2 sich befindet, und dass das Signal für die Methoxy-Gruppe bei 55,6 ppm nicht mehr vorhanden ist. Die Signale für die jeweiligen Kohlenstoffatome treten im Vergleich zu den Signalen in Abbildung 32 bei anderen ppm-Werten in Resonanz, doch konnten alle Signale für das 2-Hydroxyphenanthridin (52) durch Vergleich mit den $^{13}\text{C-NMR-Spektren}$ von 2-Methoxyphenanthridin und Phenanthridin zugeordnet werden.

4.2.2.2.4 Darstellung von 1,2,3,4,4a,6,10b-Octahydrophenanthridin

Ein zum Teil gesättigtes Ringsystem ist in Lycorin (**9**) als auch in vielen anderen Amaryllidaceenalkaloiden als Grundgerüst enthalten. Um mit Lycorin Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung durchführen zu können, wurde versucht 1,2,3,4,4a,6,10b-Octahydrophenanthridin (**53**) zu synthetisieren, das anschließend durch Oxidation mit Mangandioxid in 1,2,3,4,4a,10b-Hexahydrophenanthridin (**54**) umgewandelt werden kann.



1,2,3,4,4a,6,10b-Octahydrophenanthridin (**53**)



1,2,3,4,4a,10b-Hexahydrophenanthridin (**54**)

In der Literatur ist die Darstellung dieser Verbindungen mittels EPC-(Enantiomerically Pure Compound)-Synthese [Nachtsheim et al., 1989], Bischler-Napieralski-Cyclisierung [Rahman et al., 1976] sowie durch photochemische Cyclisierung [Ninomiya et al., 1970] beschrieben.

Als neue Synthesevariante wurde die Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) in flüssigem Ammoniak versucht. Mittels DC-Kontrolle (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 2:1) wurde die Reaktion verfolgt, und bei einem R_f -Wert von 0,3 konnte ein neu gebildeter Fleck detektiert werden. Nach fünf Stunden waren neben dem neu entstandenen Fleck noch weitere schwächere Flecke zu beobachten, so dass die Reaktion abgebrochen und der Reaktionsansatz aufgearbeitet wurde. Die Isolierung des Fleckes ($R_f = 0,3$) durch Säulenchromatographie und anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass nicht die gewünschte Verbindung **53**, sondern das Benzazetin 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (**55**) entstanden war (Abb. 34).

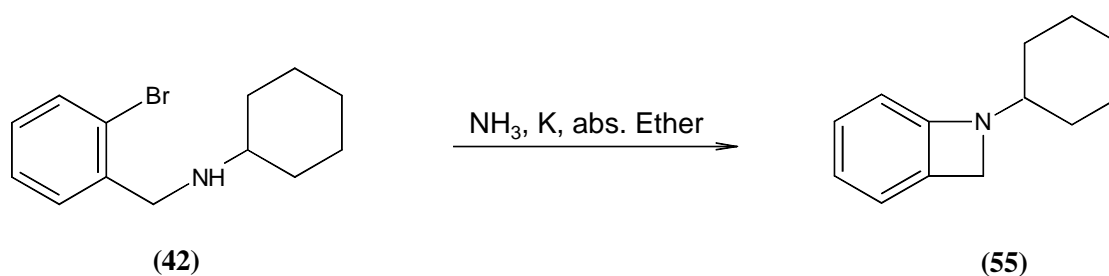


Abb. 34: Bildung von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (**55**)

Die Ursache, warum nicht die gewünschte Zielverbindung **53** entstanden ist sondern ein Bicyclus, kann bei Betrachtung des Reaktionsmechanismus für N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) in Abbildung 35 abgeleitet werden. Das gebildete Kaliumamid greift sowohl am halogenierten Benzolring unter Ausbildung eines Arins, als auch am Stickstoffatom von **42** an. Der elektronische Zustand des intermediär gebildeten Arins **56** kann aber nicht wie beim Arin **48** (Abb. 26) durch mesomere Grenzstrukturen, aufgrund der Ausbildung eines fünfbindigen Kohlenstoffs, wiedergegeben werden. Eine Cyclisierung wie in Abbildung 26 gezeigt kann somit nicht stattfinden. Stattdessen verläuft die Cyclisierung über eine intramolekulare Addition des Stickstoffs an die Arinbindung [Krohn et al., 1978]. Eine solche Cyclisierung wurde zwar von Kessar et al. beschrieben, aber ein entsprechendes Cyclisierungsprodukt nur unter Verwendung von Schutzgas isoliert. Die Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) verläuft somit über **56** durch intramolekulare Addition des Stickstoffs an die Arinbindung (Abb. 35).

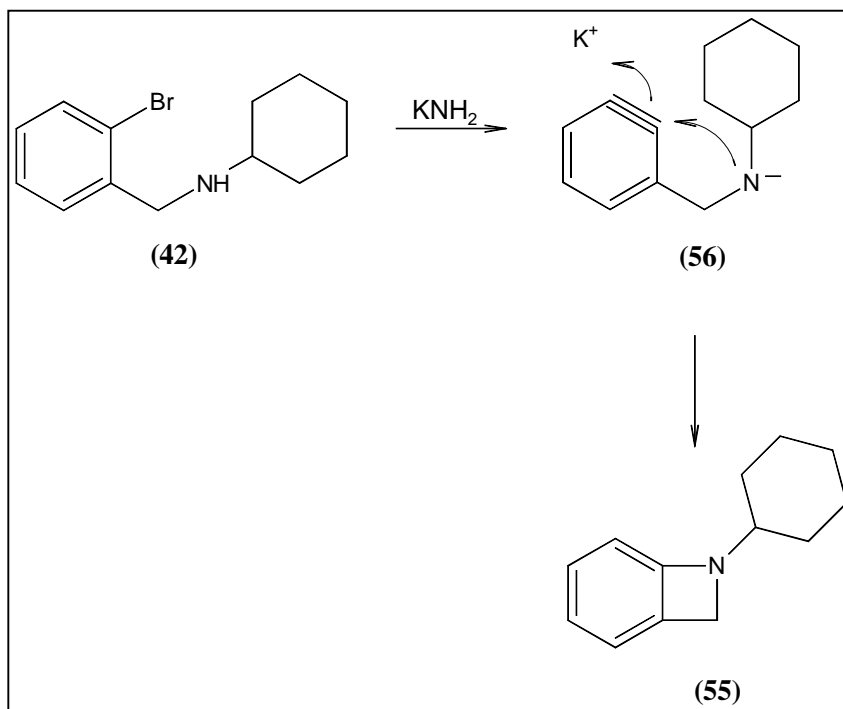


Abb. 35: Mechanismus der Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) [Krohn et al., 1978]

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigen diese Überlegungen. Das in Abbildung 36 gezeigte ¹H-NMR-Spektrum von **55** kann mithilfe von Inkrementberechnungen zugeordnet werden. Ein Vergleich mit dem ¹H-NMR-Spektrum der Ausgangsverbindung **42** zeigte keine großen Unterschiede. So sind z. B. die vier aromatischen Protonen gegenüber dem sekundären Amin nur leicht verschoben, obwohl nach Inkrementberechnungen eine größere Verschiebung zu höherem Feld zu erwarten gewesen wäre. Einzig die Verschiebung des Protons am C-9 zu tieferem Feld ($\delta = 3,15\text{-}3,07$ ppm) um 0,6 ppm und die Verschiebung des Signals für die CH₂-Gruppe in Position 8 um 0,6 ppm zu höherem Feld ($\delta = 4,29$ ppm) geben Aufschluss darüber, dass **55** entstanden ist.

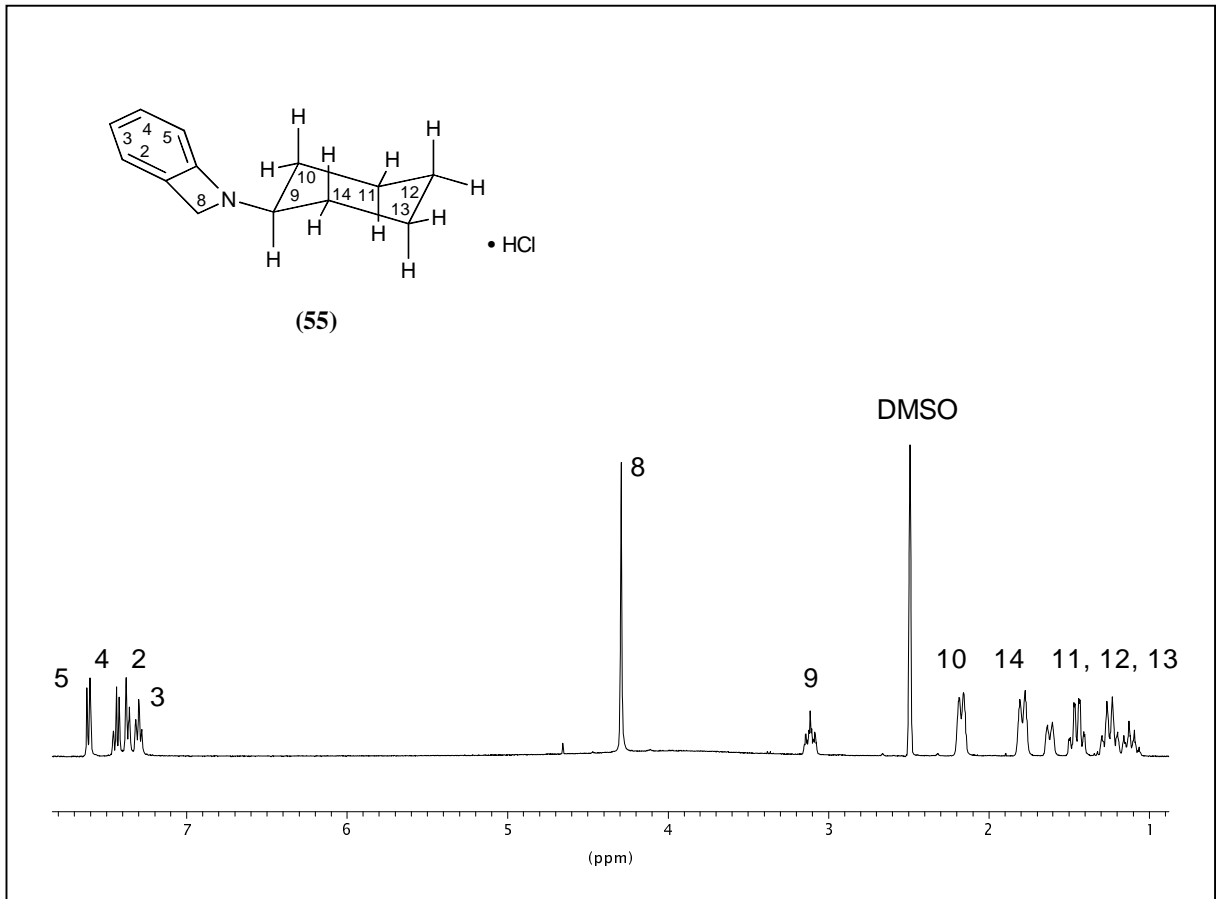


Abb. 36: ^1H -NMR-Spektrum von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien in d_6 -DMSO, Bereich von 7,8-1,0 ppm

Erst im ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 37) ist die Zuordnung der Signale für die Verbindung **55** eindeutig. Denn statt des Signals für C-7 von Verbindung **42** bei 122,3 ppm (trägt einen Brom-Substituenten) tritt das Signal bei 133,5 ppm in Resonanz und entspricht dem C-6 des Heterocycluses **55**. Alle anderen Signale im Spektrum wurden mithilfe von Inkrementabschätzungen zugeordnet.

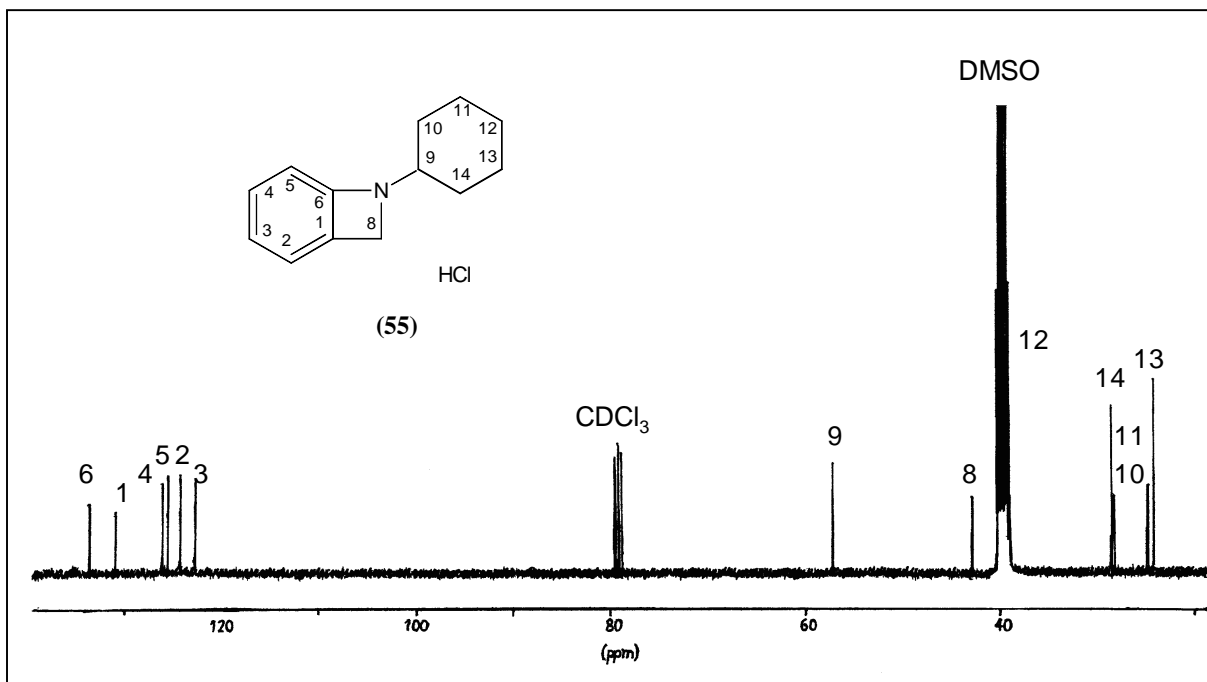


Abb. 37: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien in d_6 -DMSO, Bereich von 140,0-20,0 ppm

4.2.2.2.5 Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin

Die Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin wurde ebenfalls analog der Reaktionsführung von **55** versucht (Abb. 38). Der Unterschied zu den bisherigen eingesetzten sekundären Aminen ist die Position des Brom-Substituenten, der beim Amin **43** in ortho-Position zum Stickstoff im Phenylring desamins sitzt, während bei den übrigen Aminen der Brom-Substituent in ortho-Position zur CH_2 -Gruppe des Benzylringes sich befindet.

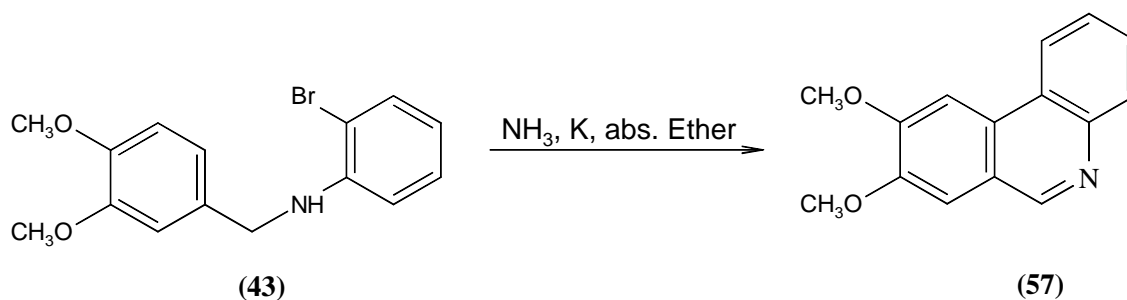


Abb. 38: Versuch der Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**)

Die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**) führte nicht zum gewünschten Cyclisierungsprodukt **57**. Auch nach acht Stunden konnte nur der Eduktfleck bei der DC-Kontrolle beobachtet werden, und nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde die Ausgangsverbindung quantitativ zurückgewonnen.

Dass die Cyclisierung von **43** nicht stattgefunden hat, liegt vermutlich daran, dass sich das Bromatom am Phenylring B befindet und die Bildung eines Carbanions in einer für die Cyclisierung günstigen Position nicht möglich ist (Abb. 39). Das sich bildende Intermediat **58** besitzt eine energetisch ungünstige Struktur, eine Cyclisierung nach dem bekannten Mechanismus (Abb. 26) findet nicht statt. Eine Cyclisierung eines solchenamins ist auf diesem Weg nicht möglich, deshalb wurde die photochemische Cyclisierung durchgeführt (Kapitel 4.2.3.3).

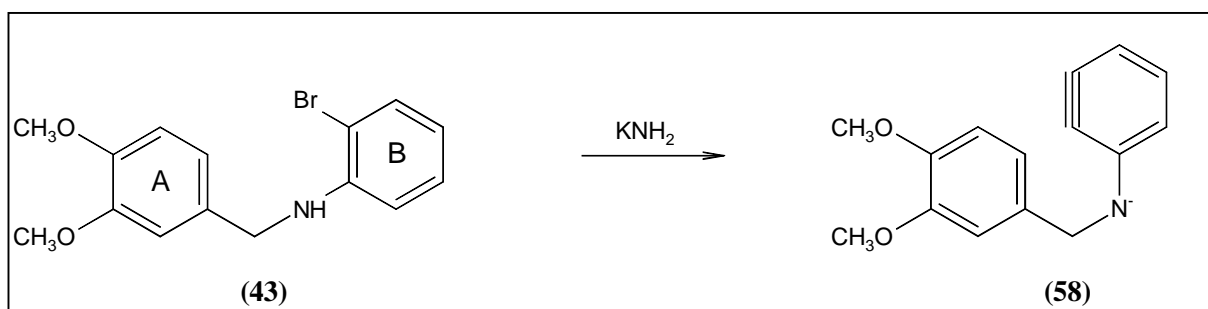


Abb. 39: Die Ausbildung eines Intermediates **58** durch Angriff von Kaliumamid an **43** ist aus energetischer Sicht unwahrscheinlich

4.2.2.3 Zusammenfassende Diskussion zur Cyclisierung in flüssigem Ammoniak

Mit der Cyclisierung in flüssigem Ammoniak gelang die Synthese von Benzo[c]phenanthridin (**47**), 2-Methoxyphenanthridin (**51**) und 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) in guten Ausbeuten. Bei dem Versuch, N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**41**) zu cyclisieren, konnte nur 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (**55**) isoliert werden. Die Cyclisierung von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**) gelang auf diesem Weg nicht. Im Vergleich

zur radikalischen Cyclisierung ist diese Cyclisierungsmethode durch gute Ausbeuten und leichte Reinigung der Reaktionsprodukte die bessere Synthesevariante.

4.2.3 Photochemische Cyclisierung

In einer Reihe von Veröffentlichungen wurden Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate durch photochemische Cyclisierung synthetisiert [Iida et al., 1974; Ninomiya et al., 1974a; Ninomiya 1974b; Ninomiya et al., 1977; Prabhakar et al., 1978; Takao et al., 1981; Thompson et al., 1988; Arai et al., 1998; Campos et al., 1998]. Ein Nachteil dieser Cyclisierungsmethode ist die oft sehr geringe Ausbeute. Da die Verbindungen 1,2,3,4,4a,6,10b-Octahydrophenanthridin (**53**) und 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) mittels radikalischer Cyclisierung und Cyclisierung in flüssigem Ammoniak nicht synthetisiert werden konnten, wurde die photochemische Cyclisierung durchgeführt.

4.2.3.1 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**)

Durch Bestrahlung einer Lösung von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**) in absolutem Dichlormethan gelang die Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) (Abb. 40).

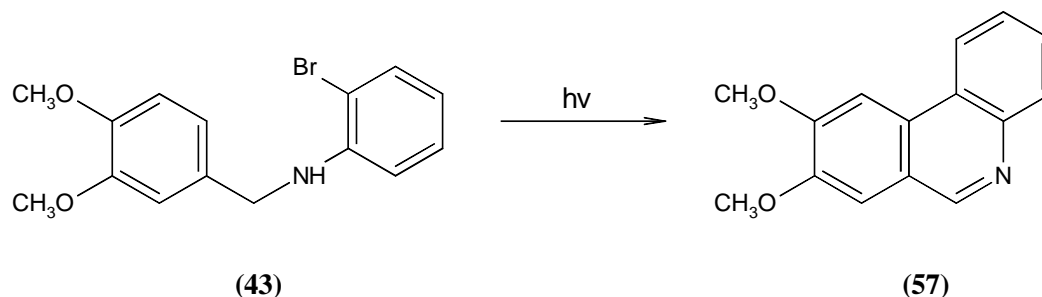


Abb. 40: Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**)

Die photochemische Cyclisierung von **43** verläuft wahrscheinlich über den π -Komplex **59** (Abb. 41). Das Amin erfährt ein "intersystem crossing" (ISC) und geht in den angeregten Triplett-Zustand des π -Komplexes **59** über. Aus diesem π -Komplex bildet sich das Radikal **60**, das über 8,9-Dimethoxy-5,6-dihydrophenanthridin (**61**) zum 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) abreagiert [Grimshaw et al., 1982; Park et al., 1994].

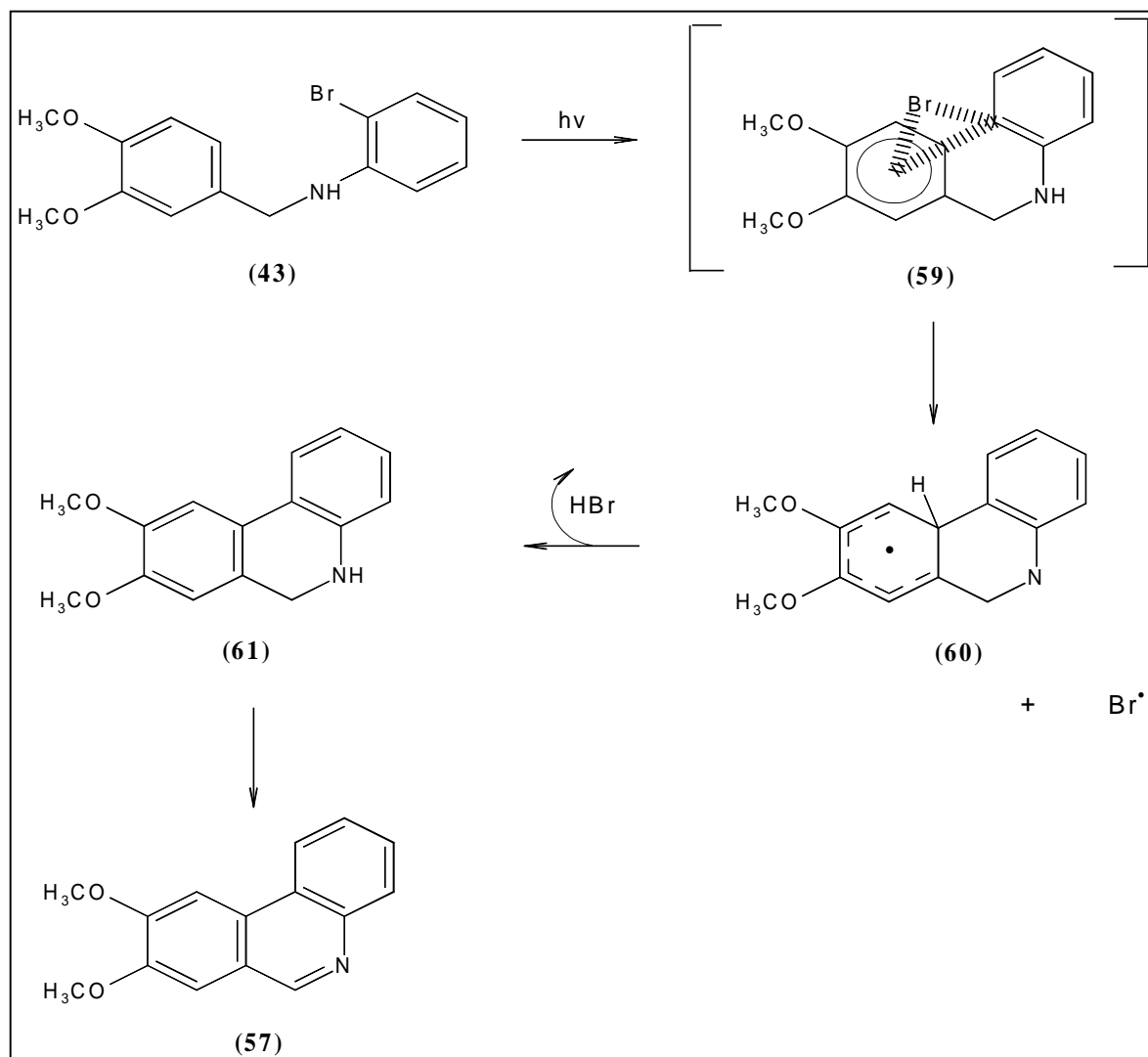


Abb. 41: Modifizierte Darstellung des Mechanismus der photochemischen Cyclisierung von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**) [Park et al., 1994]

Nach drei Stunden wurde die Bestrahlung abgebrochen, da auf dem Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 1:2) eine Reihe von Flecken zu beobachten waren, die einen nicht einheitlichen Reaktionsverlauf vermuten lassen. Die

Reaktionslösung wurde dreimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Anschließend wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2)) aufgetrennt und der intensivste Fleck (DC, $R_f = 0,6$) isoliert. Die spektroskopischen Untersuchungen (Abb. 42 und 43) bestätigten die Struktur von **57**.

Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (Abb. 42) ist das Signal bei 9,72 ppm charakteristisch für das Proton am C-6. Die beiden Protonen am C-7 und C-10 treten als Singulets bei 6,83 und 6,87 ppm in Resonanz. Die Protonen am C-1 und C-4 treten bei 7,32 ppm als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 8,0 Hz in Resonanz, während die Protonen am C-2 und C-3 dem Pseudotriplett bei 7,29 ppm zuzuordnen sind. Die Signale mit 3,83 und 3,80 ppm liegen im typischen Bereich für Methoxy-Gruppen.

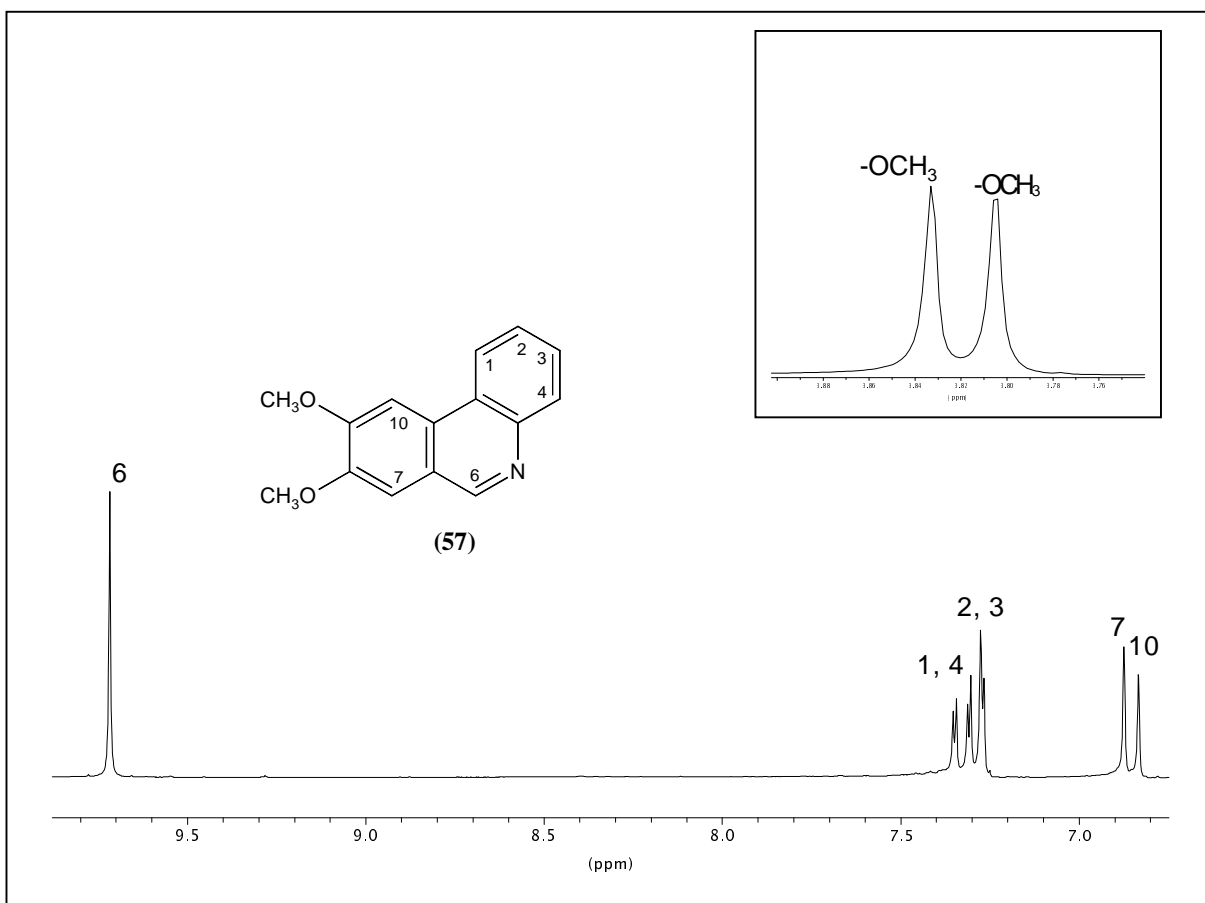


Abb. 42: $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von 8,9-Dimethoxyphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,9-6,6 ppm

Die Signale im $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 43) sind mithilfe von Inkrementberechnungen und durch Vergleich mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) zugeordnet worden. Charakteristisch sind das Signal bei 154,5 ppm für das Kohlenstoffatom in Position 6 und die Signale bei 149,6 ppm und 146,8 ppm, die den Kohlenstoffatomen mit Methoxy-Gruppe als Substituent in Position 8 und 9 zuzuordnen sind. Alle anderen Signale sind, wie in Abbildung 56 gezeigt, vorhanden und entsprechend zugeordnet.

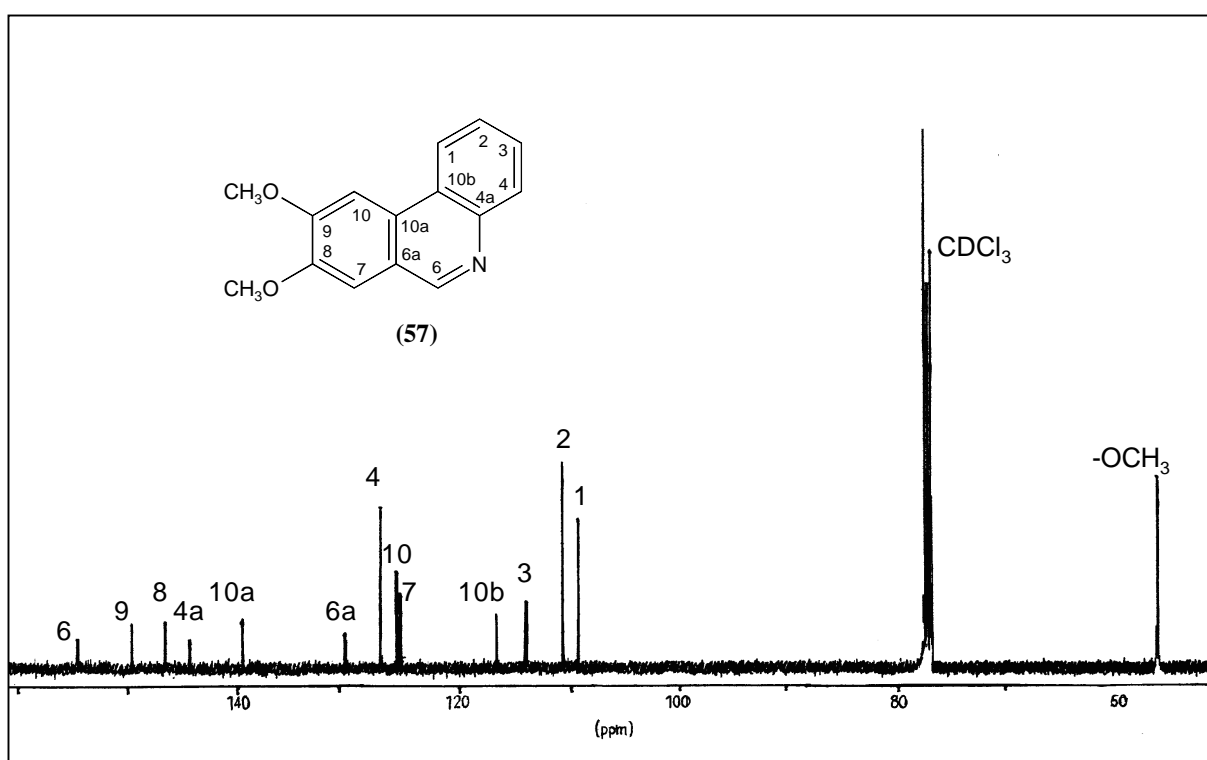


Abb. 43: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 8,9-Dimethoxyphenanthridin in CDCl_3 ,
Bereich von 160,0-45,0 ppm

4.2.3.2 Zusammenfassende Diskussion zur photochemischen Cyclisierung

Mit der photochemischen Cyclisierung gelang die Synthese von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) mit einer Ausbeute von 13 %. Bei der photochemischen Cyclisierung von N-(2-

Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) entstand ein Produktgemisch, das trotz zahlreicher Versuche nicht aufgetrennt werden konnte.

4.2.4 N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**)

Da Phenanthridin (**31**) die Grundstruktur von Lycobetain darstellt, lag es nahe, die Molekülstruktur von Phenanthridin für biologische Untersuchungen zu verändern, da diese Substanz käuflich zu erwerben ist. Phenanthridin selbst zeigte weder im Sulforhodamin-B-Assay noch im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay oder Hoechst-H33258-Verdrängungsassay deutliche Effekte (siehe Anhang), sodass man davon ausgehen kann, dass eine strukturelle Veränderung der Verbindung die biologische Wirksamkeit modifiziert.

Als erster Syntheseschritt erfolgte die Quaternisierung des Stickstoffatoms im Phenanthridin (**31**). In der Literatur wird Methyljodid als Methylierungsmittel verwendet [Karrer et al., 1950; Ostovic et al., 1985], doch kann das Iodidsalz für biologische Untersuchungen nicht eingesetzt werden, da es im Vergleich zu anderen Salzen schwerer löslich ist und sich an der Luft zersetzt [Bunting et al., 1988]. Deshalb wurde Phenanthridin mit Methansulfonsäuremethylester methyliert [Olugbade et al., 1996; Mackay et al., 1998] (Abb. 44).

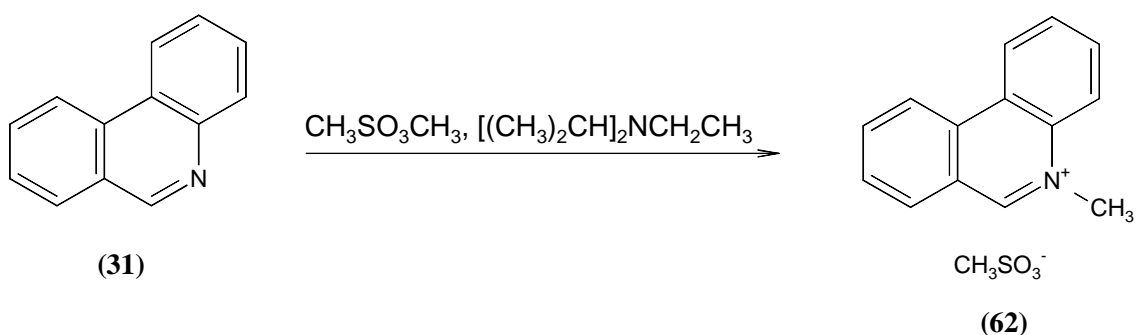


Abb. 44: Darstellung von N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**)

Dazu wurde Phenanthridin in Methansulfonsäuremethylester gelöst und unter Schutzgas 30 Minuten bei 175 °C gerührt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde der harzige Rückstand aus wenig absolutem Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute an **62** betrug 37 %. In den Abbildungen 45 und 46 sind das $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von N-Methylphenanthridiniummethansulfonat dargestellt.

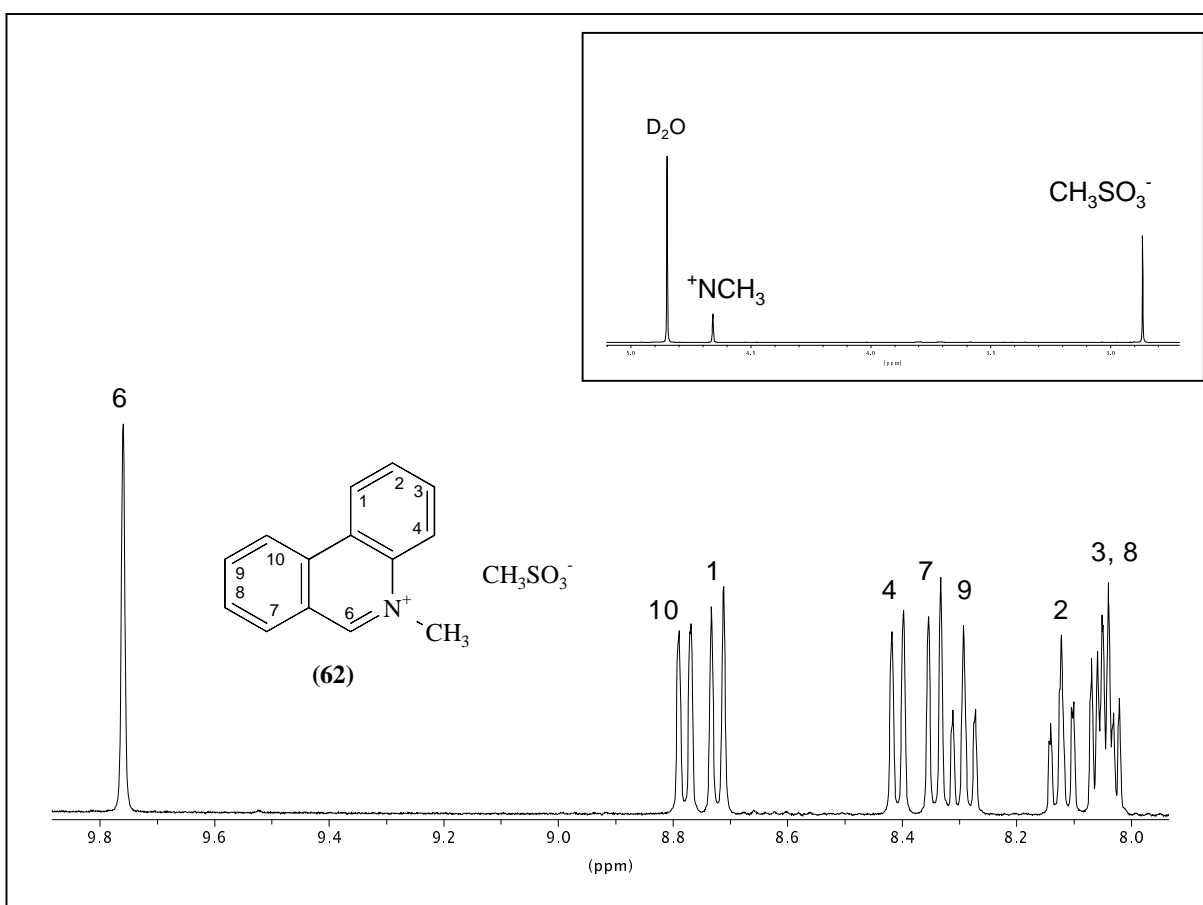


Abb. 45: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von N-Methylphenanthridiniummethansulfonat in D_2O , Bereich von 9,6-7,8 ppm

Die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 45) von **62** im aromatischen Bereich auftretenden Protonensignale zeigen das gleiche Aufspaltungsmuster wie Phenanthridin (siehe Anhang) und sind entsprechend zugeordnet. Durch das quaternäre Stickstoffatom sind leichte Verschiebungen der ppm-Werte zu beobachten.

Die Signale im $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 46) wurden mithilfe von Inkrementberechnungen zugeordnet. Der Vergleich mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) bestätigte die Zuordnung.

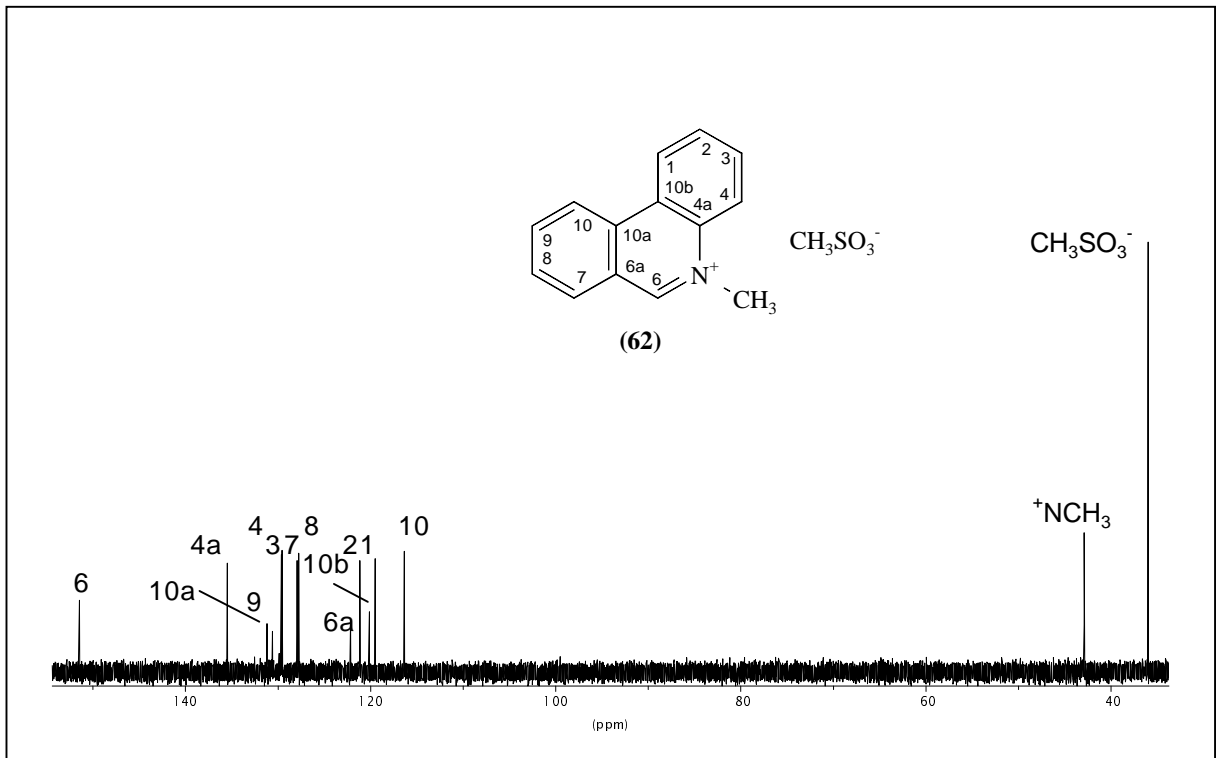


Abb. 46: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat in D_2O , Bereich von 155,0-35,0 ppm

4.2.5 2-Bromphenanthridin (63)

Phenanthridin (**31**) wird durch N-Bromsuccinimid selektiv in Position 2 bromiert (Abb. 47) [Gilman et al., 1955].

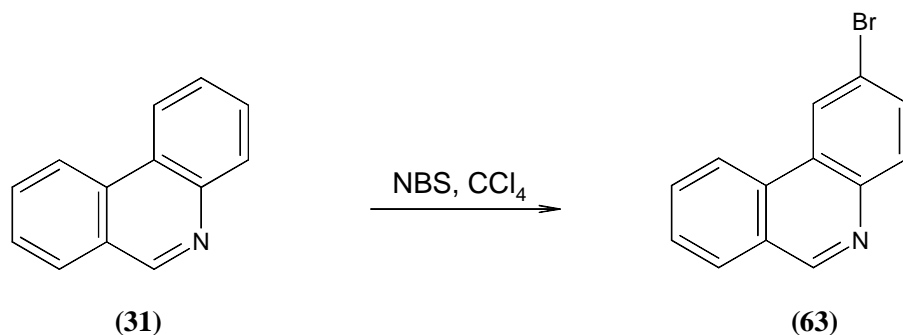


Abb. 47: Darstellung von 2-Bromphenanthridin (**63**)

Phenanthridin und N-Bromsuccinimid wurden in Tetrachlorkohlenstoff gelöst und die Lösung unter Rückfluss erhitzt. Die Kontrolle der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 2:1) zeigte, dass der Reaktionsverlauf nicht einheitlich war [Chandler, 1969]. Nach mehreren Tagen wurde die Reaktion abgebrochen, obwohl auf dem Dünnschichtchromatogramm der Eduktfleck immer noch zu sehen war. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass 2-Bromphenanthridin (**63**) vorlag.

Im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 48) sind die Protonensignale mithilfe des ¹H-NMR-Spektrums von Phenanthridin und mit NMR-Daten von Brombenzol zugeordnet worden. Im Vergleich zum Phenanthridin tritt das Proton am C-1 als Singulett (8,64 ppm) und das Proton am C-3 als Dublett (7,78 ppm) in Resonanz. Alle anderen Protonen zeigen das gleiche typische Aufspaltungsmuster wie die Protonen des Phenanthridins, sind aber zum Teil zu höherem Feld verschoben.

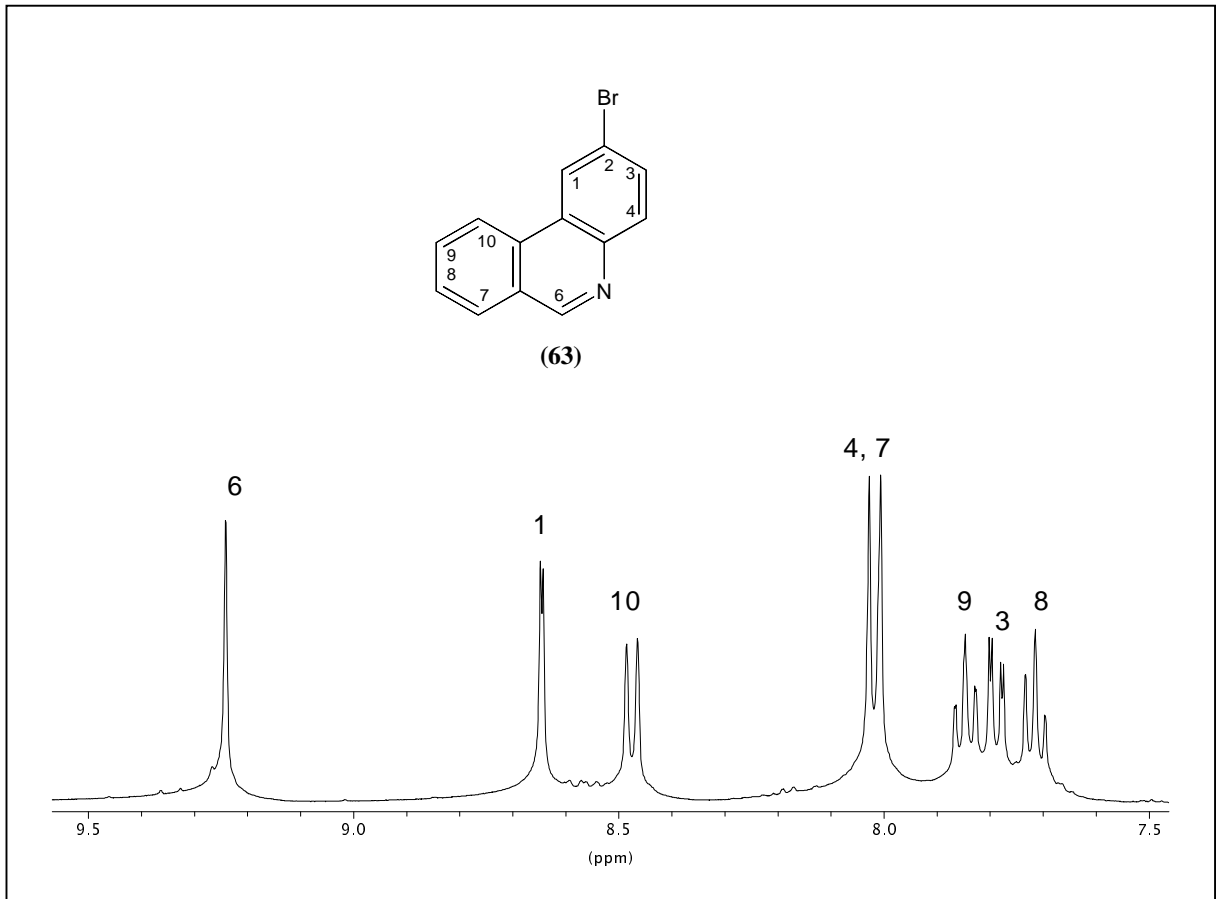


Abb. 48: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-Bromphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,4-7,6 ppm

Sämtliche für die Verbindung **63** zu erwartenden Signale im $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 49) waren vorhanden und wurden mithilfe von Inkrementberechnungen und Vergleich mit dem $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Phenanthridin (siehe Anhang) zugeordnet.

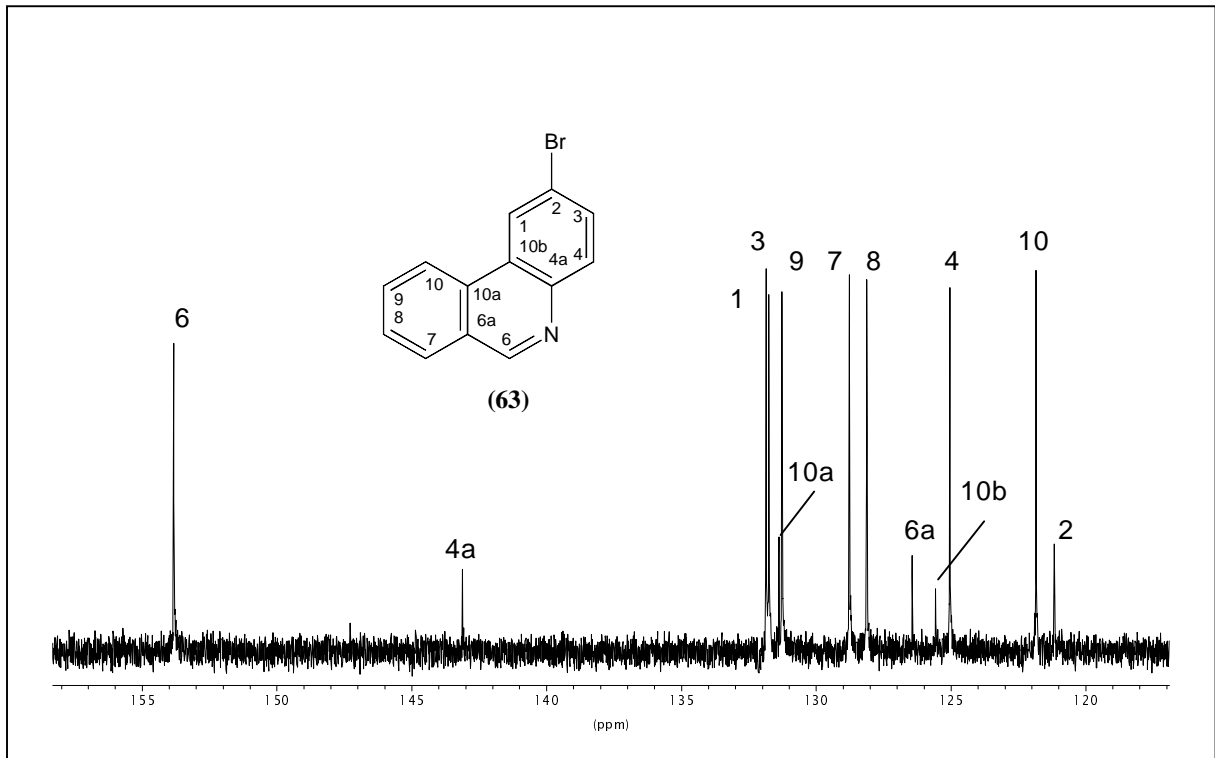


Abb. 49: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 2-Bromphenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 158,0-117,0 ppm

4.3 *in vitro* Untersuchungen

Lycorin und Lycobetain sowie die synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate wurden auf ihre wachstumshemmende Wirkung (Sulforhodamin-B-Assay) und auf ihre Fähigkeit, mit der DNA zu interagieren (Ethidiumbromidverdrängungsassay und (Hoechstkompetitionsassay), untersucht.

4.3.1 Wachstumshemmende Wirkung von Lycorin und Lycobetain

Im Sulforhodamin-B-Assay (SRB) wurde die wachstumshemmende Wirkung von Lycorin (**9**) und Lycobetain (**10**) an den drei humanen Tumorzelllinien LXFL529L (großzelliges

Lungenkarzinom), GXF251L (Magenkarzinom) und CXF94L (Colonkarzinom) untersucht. Dabei handelt es sich um einen Viabilitätstest, der auf der Färbung und Quantifizierung zellulärer Proteine beruht [Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990].

Die in Zellkulturflaschen mit sterilem RPMI-1640-Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt ist, als Monolayer wachsenden Zellen wurden mit und ohne Testsubstanz 72 Stunden inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die überlebenden Zellen mit Trichloressigsäure fixiert und die abgestorbenen Zellen zusammen mit der Testsubstanz mittels Pufferlösung entfernt. Das Protein von den überlebenden, fixierten Zellen wurde mit Sulforhodamin B angefärbt und photometrisch vermessen, wobei die Farbintensität der Menge an Protein und damit der Zahl an überlebenden Zellen direkt proportional ist. Die ermittelten IC₅₀-Werte (Inhibitory Concentration: Substanzkonzentration, bei der im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle noch 50 % der Zellen überleben) wurden durch mehrmaliges Wiederholen des Tests gesichert (Tab. 3).

Tab. 3: Wachstumshemmende Wirkung von Lycorin und Lycobetain an drei humanen Tumorzelllinien; IC₅₀-Wert [μ M]

	SRB, IC ₅₀ [μ M]*		
	LXFL529L	GXF251L	CXF94L
Lycorin (9)	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3
Lycobetain (10)	1,5 ± 0,3	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2

*Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen ermittelt

Lycorin zeigte bei allen drei humanen Tumorzelllinien wachstumshemmende Wirkung im mikromolaren Bereich. Die größte Wachstumshemmung konnte bei der Zelllinie LXFL529L beobachtet werden. Auch Lycobetain zeigte eine signifikante Hemmung der Zellproliferation an den drei humanen Tumorzelllinien im mikromolaren Bereich. Die größte Wachstumshemmung konnte bei der Zelllinie LXFL529L, vergleichbar mit den Daten von Lycorin, beobachtet werden.

4.3.2 Interaktion von Lycorin und Lycobetain mit Kalbsthymus-DNA

Die mögliche Interaktion von Lycorin und Lycobetain mit Doppelstrang-DNA wurde mithilfe der Ethidiumbromid-Verdrängungs- bzw. Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassays untersucht. Ethidiumbromid und Hoechstfarbstoff H33258 sind Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der DNA interagieren. Während Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA intercaliert, ist Hoechstfarbstoff H33258 ein Ligand, der an die kleine Furche der DNA mit erhöhter Affinität für A-T-reiche Regionen bindet [Morgan et al., 1979; Wang et al., 1994].

Die Affinität von intercalierenden Substanzen zur DNA kann durch die Verdrängung von Ethidiumbromid bzw. Hoechstfarbstoff H33258 bestimmt werden. Dazu setzt man die gemessene Abnahme der Fluoreszenz der beiden Farbstofflösungen als Funktion der Substanzkonzentration mit der Anfangsfluoreszenz in Verhältnis. Der ermittelte ED₅₀-Wert (Effective Dose: Substanzkonzentration, bei der die Fluoreszenz der Farbstofflösung um 50 % reduziert ist) ist dabei umgekehrt proportional zu den Bindungskonstanten zwischen Substanz und DNA.

Die jeweiligen Messungen wurden an isolierter Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Mit einem Fluoreszenzspektrometer wurde die Fluoreszenzintensität des intercalierten Ethidiumbromids bei 546 nm (Anregung) und 595 nm (Emission) bzw. beim Liganden Hoechstfarbstoff H33258 bei 360 nm (Anregung) und 450 nm (Emission) bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden auf 100 % gesetzt. Dann wurde die zu untersuchende Substanz in definierten Mengen schrittweise zum Ethidiumbromid-Puffer bzw. Hoechstfarbstoff-Puffer zugegeben und die Fluoreszenz der jeweiligen Pufferlösung nach einigen Minuten erneut gemessen. Eventuelle Eigenfluoreszenz der Substanz wurde durch Vermessen der gleichen Lösung ohne DNA bestimmt und gegebenenfalls vom ermittelten Fluoreszenzwert abgezogen. Der so erhaltene Wert wurde mit der Fluoreszenzintensität ohne Substanzzugabe (= 100 %) in Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Als Positivkontrolle diente im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay Actinomycin D und im Kompetitionsassay mit Hoechstfarbstoff H33258 Netropsin.

Wie Abbildung 50 zeigt, erfolgt durch Lycorin keine Interaktion mit der DNA, während Lycobetain mit der DNA interagiert. Im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay liegt der

ED₅₀-Wert von Lycobetain bei 13 μM ; der Wert des bekannten Intercalators Actinomycin D bei 2,2 μM . Es lässt sich daraus schließen, dass Lycobetain mit Ethidiumbromid um die Bindungsstellen der DNA konkurriert. Bei Lycorin dagegen ist über einen großen Konzentrationsbereich keine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten.

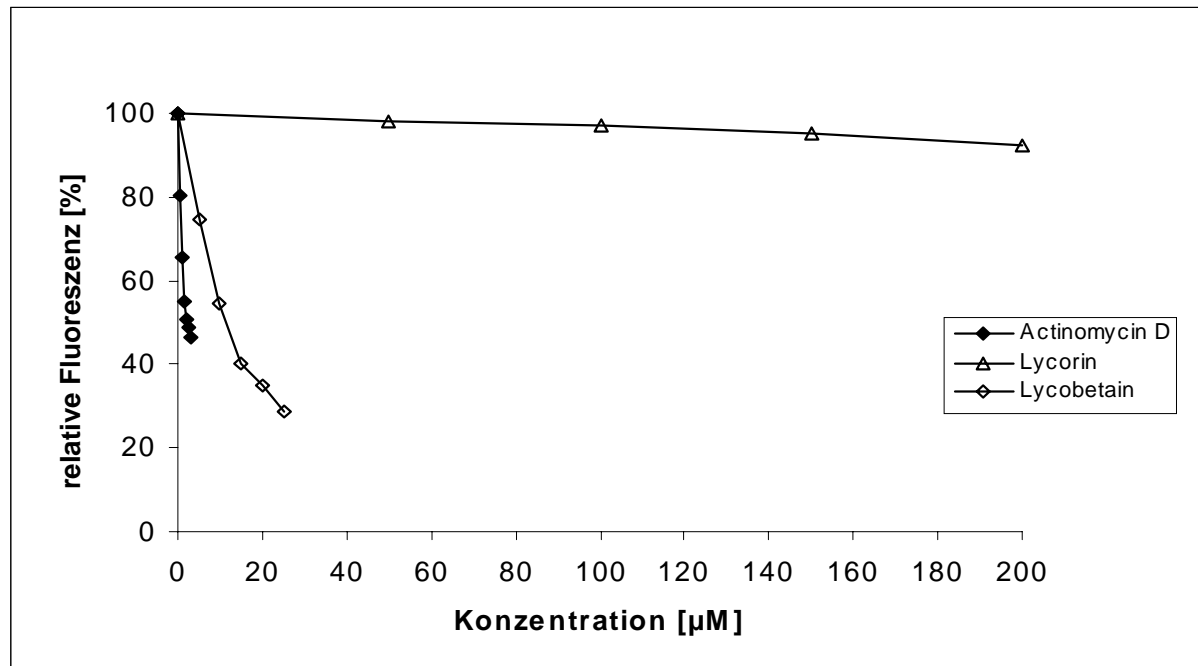


Abb. 50: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Lycorin, Lycobetain und der Positivkontrolle Actinomycin D

Ähnliche Ergebnisse wurden im Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassay mit Lycorin und Lycobetain ermittelt (Abb. 51). Auch im Kompetitionsassay mit H33258 zeigte Lycobetain mit einem ED₅₀-Wert von 0,5 μM im Vergleich zum bekannten Liganden Netropsin von 0,3 μM Interaktion mit der DNA, während Lycorin im gewählten Konzentrationsbereich keine Veränderung der Fluoreszenzintensität bewirkte.

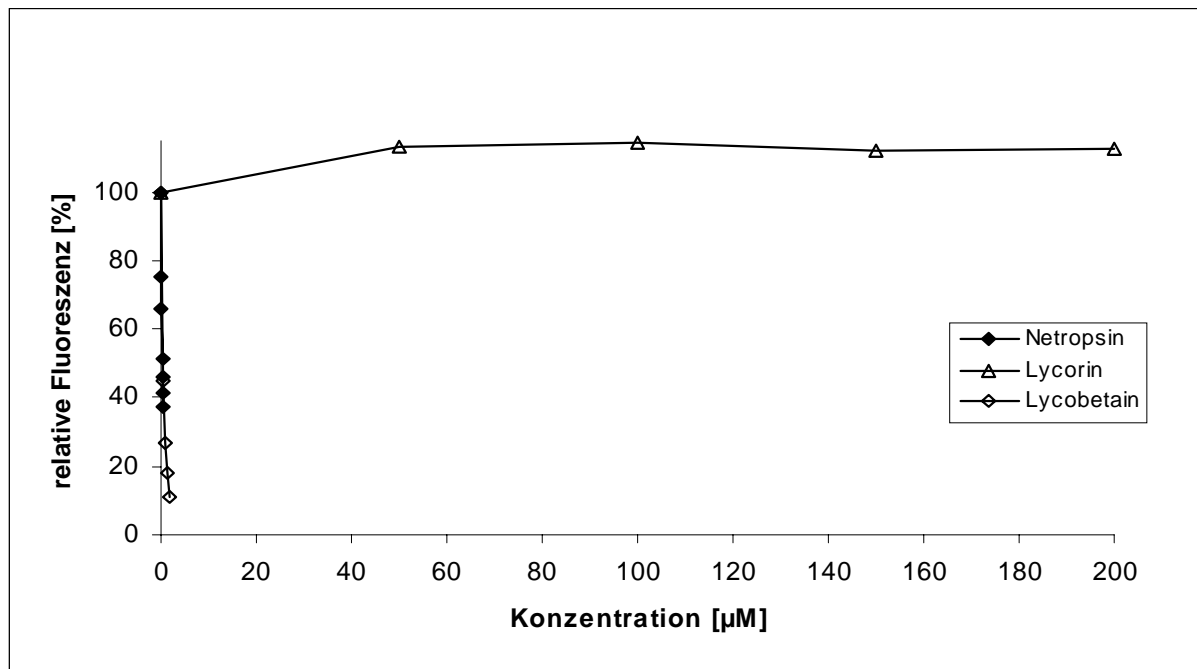


Abb. 51: Hoechstfarbstoff-Kompetitionsassay von Lycorin, Lycobetain und der Positivkontrolle Netropsin

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion zu den *in vitro* Untersuchungen von Lycorin und Lycobetain

Bei den biologischen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass beide Substanzen potente Wachstumsinhibitoren an verschiedenen humanen Tumorzelllinien sind. Die IC_{50} -Werte von beiden Substanzen liegen alle im mikromolaren Bereich (Tab. 4).

Bei der Interaktion mit Kalbsthymus-DNA wurden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Alkaloiden beobachtet. So zeigt Lycorin weder im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay (Abb. 50) noch im Kompetitionsassay mit Hoechstfarbstoff H33258 (Abb. 51) über einen großen Konzentrationsbereich einen Effekt, während Lycobetain dagegen mit einem ED_{50} -Wert von 13 µM im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay (Abb. 50) sowie mit einem ED_{50} -Wert von 0,5 µM im Kompetitionsassay mit H33258 (Abb. 51) mit der DNA interagiert.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Substanzen in den Intercalationstests kann in der Struktur der Verbindungen liegen. In Abbildung 52 sind die berechneten Molekülstrukturen (Tripos, Sybyl, Molecular Modeling Software, Version 6.4) der beiden Substanzen dargestellt. Während Lycobetain aufgrund seines konjugierten aromatischen Ringsystems eine planare Struktur besitzt, hat Lycorin durch sein zum Teil hydriertes Ringsystem keine planare Form. Die planare Struktur einer Substanz scheint aber notwendig für die Intercalation in die DNA (siehe Kapitel 2.3) zu sein.

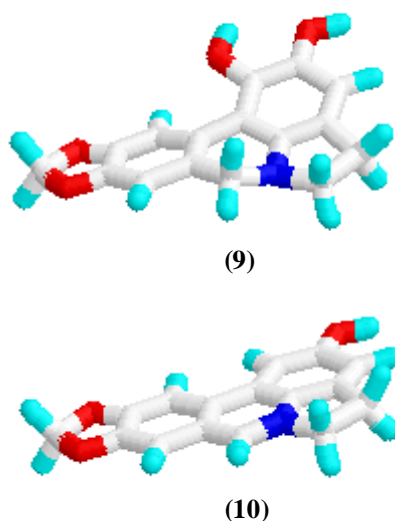


Abb. 52: Berechnete Molekülstruktur von Lycorin (9) und Lycobetain (10)

4.3.4 Wachstumshemmende Wirkung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate

Die in dieser Arbeit synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate wurden an den drei humanen Tumorzelllinien LXFL529L, GXF251L und CXF94L auf ihre wachstumshemmende Wirkung im Sulforhodamin-B-Assay getestet (Tab. 4).

Tab. 4: Wachstumshemmende Wirkung von Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten an drei humanen Tumorzelllinien; IC₅₀-Wert [μ M]

	SRB, IC ₅₀ [μ M] ¹⁾		
	LXFL529L	GXF251L	CXF94L
Phenanthridin (31)	81 \pm 1	171	151
N-Methyl-phenanthridinium-methansulfonat (62)	26 \pm 3	22 \pm 4	37 \pm 2
2-Methoxyphenanthridin (51)	87 \pm 3	174	121
2-Hydroxyphenanthridin (52)	34 \pm 2	42 \pm 3	37 \pm 3
2-Bromphenanthridin (63)	*nicht bestimmt	*nicht bestimmt	*nicht bestimmt
2,3-Methylenedioxyphenanthridin (45)	53 \pm 3	109	111
8,9-Dimethoxyphenanthridin (57)	139	173	46 \pm 2
Benzo[c]phenanthridin (47)	37 \pm 3	134	43 \pm 4
1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]-phenanthridin (44)	42 \pm 4	88 \pm 3	17 \pm 2

¹⁾Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen ermittelt

*nicht bestimmt: IC₅₀-Wert nicht ermittelbar, da Substanz sehr früh ausfällt (50 μ M)

Während Lycorin und Lycobetain potente Wachstumsinhibitoren sind (Tab. 3), zeigten die synthetisierten Substanzen keinen so starken Effekt. Einzig N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**) und 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) bewirkten bei allen drei Tumorzelllinien eine cytotoxische Wirkung mit IC₅₀-Werten unter 50 μ M und können als schwache Wachstumsinhibitoren bezeichnet werden. Bei allen anderen Substanzen dagegen treten zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien signifikante Unterschiede auf. So zeigten Phenanthridin (**31**), 2-Methoxyphenanthridin (**51**) und 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) bei LXFL529L die größte Wirkung, während bei GXF251L und CXF94L keine Cytotoxizität zu beobachten ist. Aufgrund der IC₅₀-Werte von \sim 80 μ M bei **31** und **51** besitzen diese Substanzen aber keine starke Wachstumshemmung. **45** mit einem IC₅₀-Wert von 53 μ M zeigte dagegen eine schwache Wachstumshemmung. 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) wies dagegen die größte Hemmung bei den CXF94L mit einem IC₅₀-Wert von 46 μ M, während bei

den beiden anderen Zelllinien keine cytotoxische Wirkung zu beobachten war. Auch hier war die Wachstumshemmung im Vergleich zu Lycorin und Lycobetain deutlich schwächer. Benzo[c]phenanthridin (**47**) und 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) hemmten dagegen das Wachstum von LXFL529L und CXF94L in einem Bereich von $\sim 40 \mu\text{M}$, wobei **44** mit einem IC_{50} -Wert von $17 \mu\text{M}$ bei CXF94L deutlich stärker hemmte. Gegenüber GXF251L besitzt **44** einen IC_{50} -Wert von $88 \mu\text{M}$, während **47** keinen Effekt aufweist. Generell kann man sagen, dass keine der Substanzen eine so starke wachstumshemmende Wirkung besitzt wie Lycorin und Lycobetain.

4.3.5 Interaktion der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate mit Kalbsthymus-DNA

Analog zu den Verbindungen Lycorin und Lycobetain wurden die Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und im Hoechstfarbstoff-H33258-Verdrängungsassay getestet. Die Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays bzw. des Kompetitionsassays mit dem Hoechstfarbstoff H33258 sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

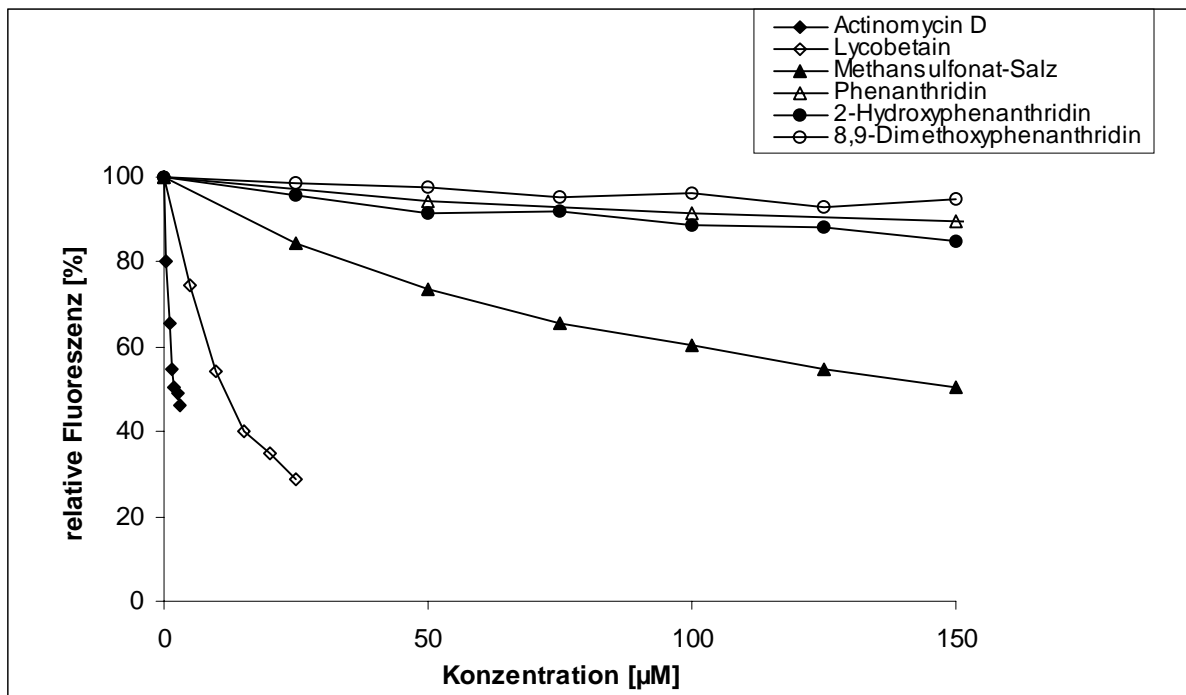


Abb. 53: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay von Actinomycin D (Positivkontrolle), Lycobetain (Referenzverbindung), N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (Methansulfonat-Salz), Phenanthridin, 2-Hydroxyphenanthridin und 8,9-Dimethoxyphenanthridin

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der synthetisierten Verbindungen im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay gezeigt. Während Actinomycin D als Positivkontrolle im Assay einen ED_{50} -Wert von 2 μM und Lycobetain als Referenzverbindung einen ED_{50} -Wert von 13 μM besitzen, zeigten alle synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate außer N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (Methansulfonat-Salz) über einen großen Konzentrationsbereich keine Interaktion mit der DNA. Bei N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**) war dagegen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Hier lag der ED_{50} -Wert bei $\sim 150 \mu\text{M}$.

Für die Substanzen 2-Methoxyphenanthridin (**51**), 2-Bromphenanthridin (**63**), 2,3-Methylen-dioxyphenanthridin (**45**), Benzo[c]phenanthridin (**47**) und 1,2,3,4-Tetrahydro-benzo[c]-phenanthridin (**44**) konnten im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay keine ED_{50} -Werte ermittelt werden, da diese Verbindungen ab einer Konzentration von 25 μM ausfielen und eine Bestimmung deshalb nicht möglich war.

Im Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassay (Abb. 54) zeigten die synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate ein anderes Verhalten als im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay. Während für 2-Bromphenanthridin (**63**) und 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) auch in diesem Assay keine ED_{50} -Werte bestimmt werden konnten, weil die Verbindungen ab 25 μM ausfielen, wiesen nur 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) und 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) in einem Konzentrationsbereich bis zu 200 μM keinen Effekt auf. Für Phenanthridin (**31**), das in der Abbildung wegen des kleinen Konzentrationsbereichs (bis 25 μM) nicht abgebildet wurde, konnte ein ED_{50} -Wert von $\sim 160 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

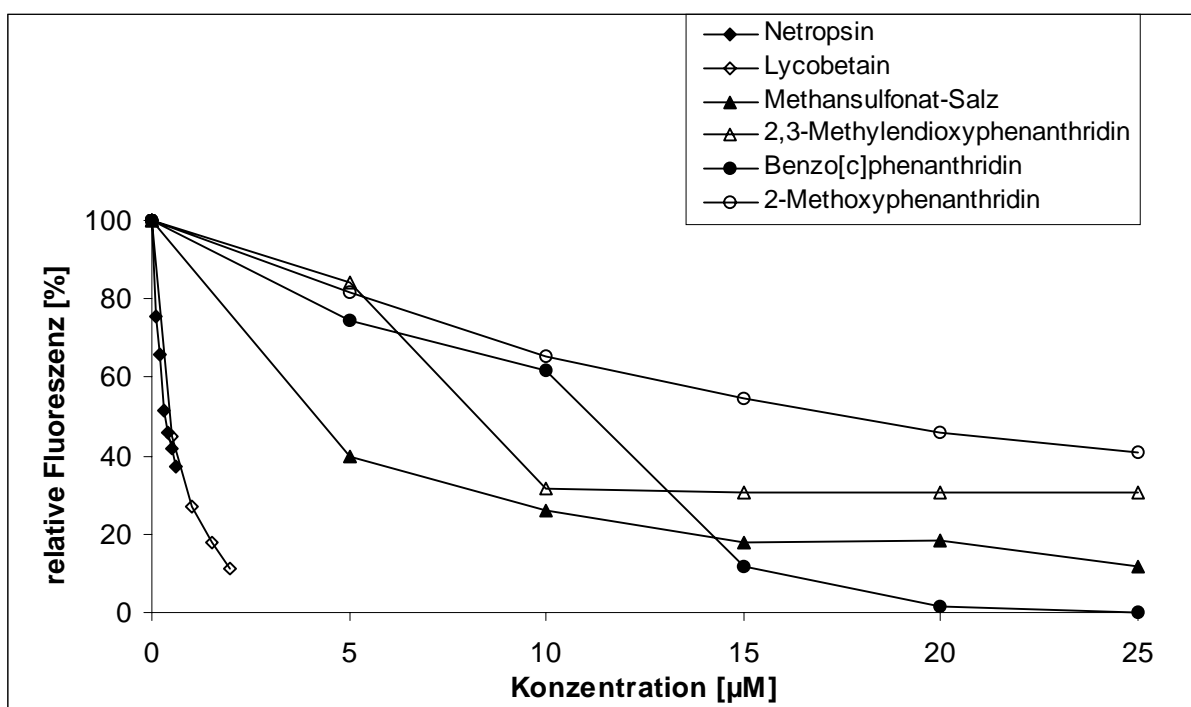


Abb. 54: Hoechstfarbstoff-Kompetitionsassay von Netropsin (Positivkontrolle), Lycobetain (Referenz-verbindung), N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (Methansulfonat-Salz), 2,3-Methylenedioxyphenanthridin, Benzo[c]phenanthridin und 2-Methoxyphenanthridin

Wie in Abbildung 54 gezeigt, hat die Positivkontrolle Netropsin einen ED_{50} -Wert von 0,3 μM und die Referenzverbindung Lycobetain einen ED_{50} -Wert von 0,5 μM . Für N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**) wurde ein ED_{50} -Wert von 4 μM , für 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) von 9 μM , für Benzo[c]phenanthridin (**47**) von 13 μM und für 2-Methoxyphenanthridin (**51**) von 16 μM ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass diese vier

synthetisierten Substanzen mit Netropsin um die DNA-Bindungsstellen konkurrieren und als Liganden der kleinen Furche betrachtet werden können.

4.3.6 Zusammenfassende Diskussion zu den *in vitro* Untersuchungen der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate

Wie die Ergebnisse des Sulforhodamin-B-Assays zeigten, sind die synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate schwächere Wachstumshemmer als Lycorin und Lycobetain. N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**), 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) und N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (**37**) zeigten eine Wachstumshemmung in einem Bereich zwischen 20 und 50 μM bei allen drei Tumorzelllinien. Benzo[c]phenanthridin (**47**) bewirkte eine Wachstumshemmung von $\sim 40 \mu\text{M}$ nur an den Zelllinien LXFL529L und CXF94L, während 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) nur an der Zelllinie LXFL529L eine Wachstumshemmung von $\sim 40 \mu\text{M}$ aufwies und an CXF94L mit 17 μM deutlich stärker hemmte. Phenanthridin (**31**), 2-Methoxyphenanthridin (**51**) und 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) zeigten nur bei LXFL529L mit IC_{50} -Werten von $\sim 80 \mu\text{M}$ (**31** und **51**) und $\sim 50 \mu\text{M}$ (**45**) Wachstumshemmung. 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) besaß nur bei CXF94L einen IC_{50} -Wert von $\sim 50 \mu\text{M}$ sowie N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**) nur bei GXF251L ($\text{IC}_{50} = 67 \mu\text{M}$).

Bei den zwei Tests zur Interaktion mit der DNA (Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassay) konnte unterschiedliches Verhalten der synthetisierten Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate beobachtet werden. So wurde im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay nur für N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**) ein ED_{50} -Wert von $\sim 150 \mu\text{M}$ ermittelt, während für Phenanthridin (**31**), 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) und 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) kein Effekt über einen großen Konzentrationsbereich (bis 200 μM) auftrat. Bei den anderen Substanzen war eine Bestimmung von ED_{50} -Werten wegen der schlechten Löslichkeit nicht möglich. Im Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassay wurden für einige Substanzen ED_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich (bis 20 μM) ermittelt. Hier besaß N-Methylphenanthridinium-

methansulfonat (**62**) mit 4 μM die größte DNA-Interaktion. 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) mit einem ED_{50} -Wert von 9 μM , Benzo[*c*]phenanthridin (**47**) von 13 μM , 2-Methoxyphenanthridin (**51**) von 16 μM und N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (**37**) von 16 μM konkurrieren ebenfalls mit Hoechstfarbstoff H33258 um die Bindungsstellen der DNA. 2-Hydroxyphenanthridin (**52**) und 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) zeigten wie im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay keinen Effekt. Bei den übrigen Substanzen konnte ein ED_{50} -Wert aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Die relativ gute biologische Wirksamkeit von N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (**62**) im Gegensatz zu Phenanthridin (**31**) könnte auf den Methyl-Substituenten am Stickstoff und die veränderte Löslichkeit der Verbindung zurückzuführen sein. Beim Vergleich der Strukturen von **10** und **62** ist zu erkennen, dass die Methyl-Gruppe von **62** und der Pyrrol-Ring von **10** ähnliche Positionen einnehmen und bei der Interaktion mit der DNA eine Rolle spielen könnten (Abb. 55).

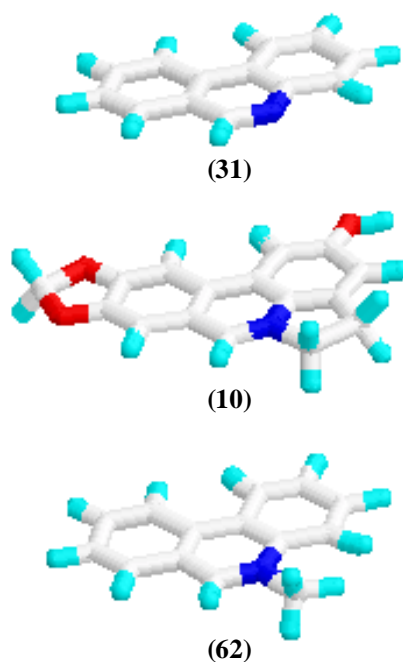


Abb. 55: Berechnete Molekülstrukturen von Phenanthridin (**31**), Lycobetain (**10**) und N-Methylphenanthridiniummethansulfonat (**62**)

Die gute biologische Wirkung von Lycobetain ist nicht nur auf den Pyrrol-Ring, sondern auch auf die Methylenedioxy- und Hydroxy-Gruppe zurückzuführen, wie ein Vergleich mit **31** zeigt.

Benzo[c]phenanthridin (**47**) und 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) besitzen unterschiedliche wachstumshemmende Wirkung. So zeigte **44** an allen drei Tumorzelllinien Wachstumshemmung, während **47** nur bei LXFL529L und CXF94L cytotoxisch wirkte. In den DNA-Interaktions-Untersuchungen konnten für beide Substanzen im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay keine ED₅₀-Werte ermittelt werden, da die Substanzen schlecht löslich (bis 25 µM) waren. Hingegen im Hoechstfarbstoff-H33258-Kompetitionsassay besaß **47** einen ED₅₀-Wert von 13 µM, was auf eine Interaktion mit der DNA schließen lässt. Bei **44** konnte auch im Kompetitionsassay mit H33258 kein ED₅₀-Wert bestimmt werden, da auch in diesem Fall die Substanz ab einer Konzentration von 25 µM nicht mehr gelöst werden konnte.

Dass **47** mit der DNA interagiert, dürfte auf das konjugierte aromatische System im Molekül zurückzuführen sein, aus dem eine planare Struktur resultiert (Abb. 56). **44** war bei den Versuchsbedingungen schwer löslich und eine Interaktion mit der DNA konnte nicht ermittelt werden. Im SRB-Test zeigte **44** dagegen eine bessere Wachstumshemmung als **45** und im Vergleich mit der guten wachstumshemmenden Wirkung von Lycorin könnte auch bei **44** ein anderer Wirkmechanismus die Ursache sein, da sowohl **9** als auch **44** aufgrund eines aliphatischen Ringes keine planare Struktur besitzen (Abb. 56).

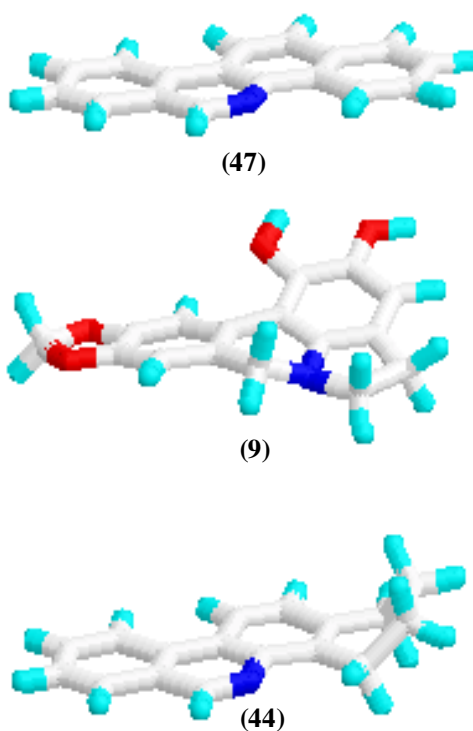


Abb. 56: Berechnete Molekülstrukturen von Benzo[c]phenanthridin (**47**), Lycorin (**9**) und 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**)

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde reines Lycorin aus Pflanzenmaterial gewonnen. Durch Oxidation von Lycorin wurde Lycobetain dargestellt und als Acetat und Chlorid isoliert. Des Weiteren wurden verschiedene Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate synthetisiert und auf ihre cytotoxische Wirkung untersucht. Dies geschah mit dem Hintergrund, dass Lycorin und Lycobetain, die eine Phenanthridin-Grundstruktur besitzen, Wachstumsinhibitoren sind und Lycobetain als Topoisomerase-Inhibitor identifiziert wurde [Niederberger, 1998]. Mit den Daten aus den biologischen Untersuchungen sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden.

Für die Synthesen des PhenanthridinGrundgerüsts wurde die radikalische Cyclisierung, die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak und die photochemische Cyclisierung ausgewählt, da bei diesen Reaktionen die Vorstufen aus leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien gut darstellbar und durch Variation der Substituenten sehr vielfältig sind.

Ausgehend von den Verbindungen N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin (**38**) und N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (**41**) konnten mit der radikalischen Cyclisierung die Substanzen 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (**44**) und 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**) dargestellt werden. Da die Aufarbeitung der Reaktionsansätze, insbesondere die Eliminierung der Organozinnverbindungen, sich als schwierig erwies, und auch nur befriedigende Ausbeuten erhalten wurden, wurde die Cyclisierung einiger Substanzen in flüssigem Ammoniak durchgeführt.

Bei dieser Synthesevariante wurden ausgehend von N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (**37**) und N-(2-Brombenzyl)-4-methoxyanilin (**39**) die Verbindungen Benzo[c]phenanthridin (**47**) und 2-Methoxyphenanthridin (**51**) in Ausbeuten um die 60 % gewonnen. Die Ausbeute von 2-Hydroxyphenanthridin (**52**), dargestellt aus N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin (**40**), lag bei etwa 30 %, was auf die Hydroxy-Gruppe als Substituent und auf die längere Reaktionszeit zurückzuführen ist. Die Cyclisierung von N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (**42**) in flüssigem Ammoniak verläuft aufgrund des aliphatischen Ringes über eine intramolekulare

Addition des Stickstoffs an die Arinbindung und der Bicyclus 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (**55**) wurde isoliert (Abb. 35).

Die Darstellung von 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**) gelang durch photochemische Cyclisierung von N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (**43**). Die Ausbeute von 13 % ist niedriger als die Ausbeuten bei der radikalischen Cyclisierung.

Bei vergleichender Betrachtung der drei durchgeführten Cyclisierungsreaktionen scheint die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak die bessere Variante zu sein, da die Substanzen in guten Ausbeuten gewonnen werden konnten. Durch Substituenten wie z. B. Hydroxy-Gruppen verringerte sich die Ausbeute jedoch deutlich. Die radikalische Cyclisierung mit Tributylzinnhydrid hat den großen Nachteil, dass Organzinnverbindungen eine hohe Toxizität besitzen und als Verunreinigungen schwer aus dem Reaktionsansatz entfernt werden können und dadurch die Ausbeuten im allgemeinen nicht sehr hoch ausfallen. Bei der photochemischen Cyclisierung sind die Ausbeuten generell niedrig, da viele Nebenreaktionen ablaufen können, die die Ausbeute an der gewünschten Verbindung stark reduzieren. Welche der drei Cyclisierungsreaktionen bei der Synthese von Verbindungen eingesetzt werden kann, hängt immer von der eingesetzten Ausgangsverbindung und der gewünschten Zielverbindung ab.

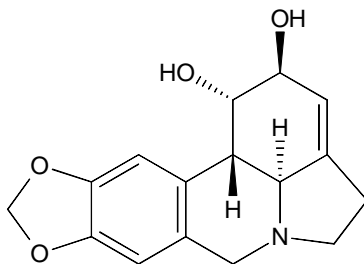
Die biologische Wirkung der synthetisierten Substanzen wurde mittels Sulforhodamin-B-Assay, Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und dem Kompetitionsassay mit Hoechstfarbstoff H33258 untersucht. Die wachstumshemmende Wirkung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate war im Vergleich zu Lycorin ($\sim 2 \mu\text{M}$) und Lycobetain ($\sim 3 \mu\text{M}$) deutlich niedriger und lag bei allen Substanzen über $10 \mu\text{M}$. Auch bei den Ergebnissen zur DNA-Interaktion zeigte sich, dass keine der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay einen ED_{50} -Wert kleiner als $20 \mu\text{M}$ (Lycobetain: $\text{ED}_{50} = 13 \mu\text{M}$) bzw. im Kompetitionsassay mit H33258 einen ED_{50} -Wert kleiner als $1 \mu\text{M}$ (Lycobetain: $\text{ED}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) besaßen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten reichen nicht aus, um eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufstellen zu können. Dazu müssen weitere Substanzen synthetisiert und eine Reihe von zusätzlichen biologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Lycorin und Lycobetain

6.1.1 Isolierung von Lycorin (9) aus Pflanzenmaterial



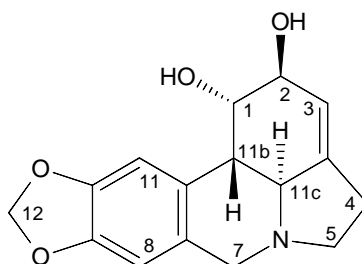
(9)

1 kg getrocknetes Pflanzenmaterial (*Sternbergia lutea*) wird in 1%iger Schwefelsäure aufgeschwemmt und über Nacht gerührt. Anschließend wird die Lösung durch ein Tuch gepresst und das Filtrat mit konz. NaOH-Lösung auf pH 10 eingestellt. Die alkalische Lösung lässt man drei Tage im Dunkeln stehen, wobei das Lycorin ausfällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und aus Ethanol umkristallisiert. Die Mutterlauge wird im Vakuum eingeeengt und zur erneuten Ausfällung im Dunkeln aufbewahrt [Evidente et al., 1983b; Evidente et al., 1984a]. Die Ausbeute an **9** beträgt 2,2 g. Der Schmelzpunkt von 259 °C und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Evidente et al., 1983a; Likhitwitayawuid et al., 1993].

Elementaranalyse: C₁₆H₁₇NO₄ (MG 287,32)

Ber.:	C 66,9 %	H 5,8 %	N 4,9 %
Gef.:	C 66,1 %	H 5,6 %	N 4,7 %

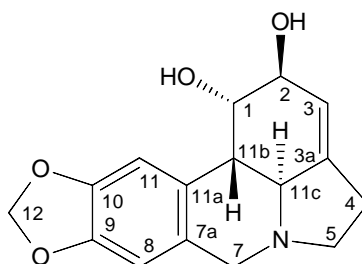
$^1\text{H-NMR-Daten}$: $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
6,80	s, 1 H	C-11H
6,67	s, 1 H	C-8H
5,94	s, 1H	C-12H ₂
5,93	s, 1 H	C-12H ₂
5,35	s ¹⁾ , 1 H	C-3H
4,86	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 5,8$	C-1, -OH
4,76	s ¹⁾ , 1 H	C-2, -OH
4,26	s ¹⁾ , 1 H	C-1H
4,00	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 12,4$	C-7H _{β}
3,96	s ¹⁾ , 1 H	C-2H
3,31	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 12,4$	C-7H _{α}
3,18	t, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 12,4$	C-5H _{β}
2,59	d, 1H; $^3J_{\text{H,H}} = 10,5$	C-11cH
2,52 – 2,36	m, 3 H	C-4H _{α,β} , C-11bH
2,19	q, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 12,4$	C-5H _{α}

¹⁾ verbreitert

^{13}C -NMR-Daten: d_6 -DMSO, 400 MHz



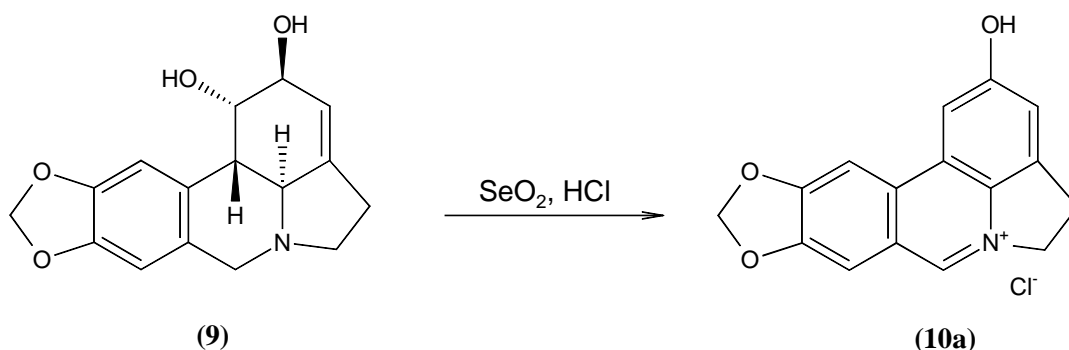
δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
145,8	s	C-9
145,4	s	C-10
141,9	s	C-3a
129,9	s	C-7a
129,8	s	C-11a
118,7	d; $^1J_{\text{C,H}} = 157$	C-3
107,2	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-8
105,2	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-11
100,7	t; $^1J_{\text{C,H}} = 174$	C-12
71,9	d; $^1J_{\text{C,H}} = 145$	C-1
70,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 151$	C-2
61,0	d; $^1J_{\text{C,H}} = 127$	C-11c
56,9	t; $^1J_{\text{C,H}} = 132$	C-7
53,5	t; $^1J_{\text{C,H}} = 128$	C-5
40,4	d; n.b. ¹⁾	C-11b
28,3	t; $^1J_{\text{C,H}} = 133$	C-4

¹⁾ nicht bestimmt (liegt unterm LM-Signal)

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
287	M ⁺	36
268	[M ⁺ - H ₃ O]	27
250	[M ⁺ - Cl]	30
226	[250 - C ₂ H ₄]	100
163	[226 - CH ₂ O ₃]	32
105	[163 - C ₃ H ₇ N ⁺]	38

6.1.2 Lycobetainchlorid (10a)

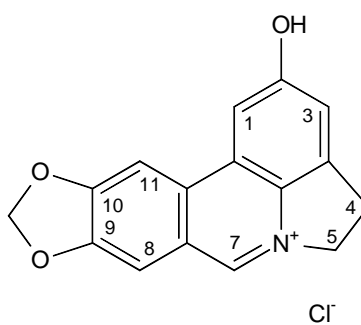


Lycorin (500 mg, 1,74 mmol) und Selendioxid (340 mg, 3,06 mmol) werden in 30 ml Ethanol vorgelegt und zwei Stunden zum Sieden erhitzt (DC-Kontrolle: Kieselgel, Chloroform/Methanol 4:1, R_f = 0,1). Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wird das überschüssige Selendioxid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in destilliertem H₂O aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure das Lycobetainchlorid gefällt. Der Niederschlag wird filtriert und im Vakuum getrocknet [Fales et al., 1955; Ghosal et al., 1986]. Die Ausbeute beträgt 244 mg (46 %). Die Charakterisierung von **10** erfolgte durch Bestimmung des Schmelzpunktes (273 °C), durch Elementaranalyse und mittels ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie.

Elementaranalyse: C₁₆H₁₂NO₃Cl (MG 301,72)

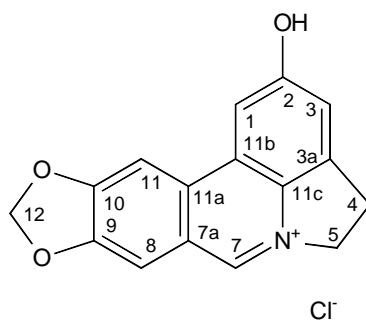
Ber.: C 63,6 % H 4,0 % N 4,6 %
 Gef.: C 59,5 % H 4,4 % N 4,1 %

¹H-NMR-Daten: d₆-DMSO, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
11,00	s, 1 H	C-2, -OH
9,56	s, 1 H	C-7H
8,29	s, 1 H	C-11H
7,89	s, 1 H	C-8H
7,81	s, 1 H	C-3H
7,45	s, 1 H	C-1H
6,43	s, 2 H	-O-CH ₂ -O-
5,19	t, 2 H; ³ J _{H,H} = 6,7	C-5H ₂
3,67	t, 2 H; ³ J _{H,H} = 6,7	C-4H ₂

^{13}C -NMR-Daten: d_6 -DMSO, 400 MHz



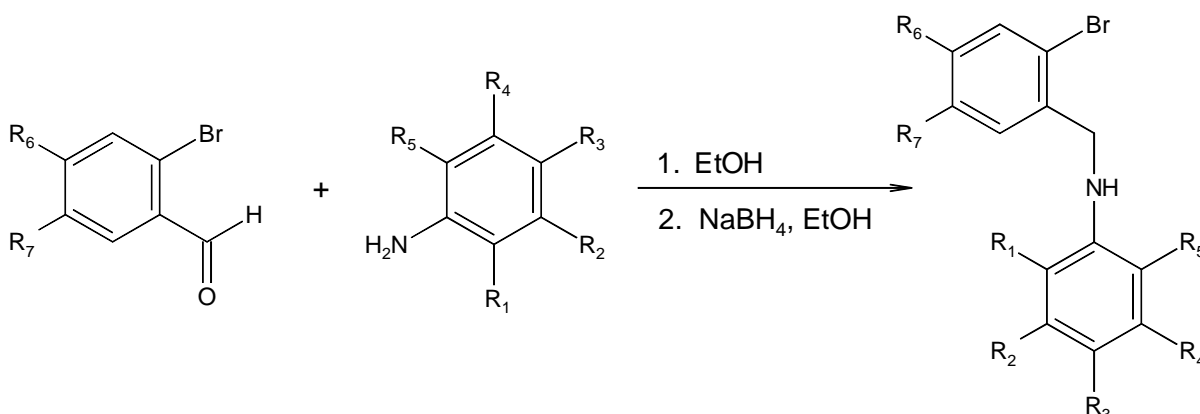
δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
161,1	s	C-2
155,5	s	C-9
150,1	s	C-10
141,5	d; $^1J_{\text{C,H}} = 182$	C-7
138,8	s	C-3a
131,3	s	C-11c
130,8	s	C-11b
125,0	s	C-7a
122,6	s	C-11a
117,0	d; $^1J_{\text{C,H}} = 162$	C-3
107,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 175$	C-8
104,1	d; $^1J_{\text{C,H}} = 168$	C-11
103,9	d; $^1J_{\text{C,H}} = 165$	C-1
101,7	t; $^1J_{\text{C,H}} = 170$	C-12
55,9	t; $^1J_{\text{C,H}} = 152$	C-5
27,5	t; $^1J_{\text{C,H}} = 138$	C-4

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
301	M ⁺	9
265	[M ⁺ - Cl]	75
237	[265 - C ₂ H ₄]	100
195	[237 - C ₂ H ₂ O]	12

6.2 Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate

6.2.1 Ausgangsmaterial: Aromatische sekundäre Amine

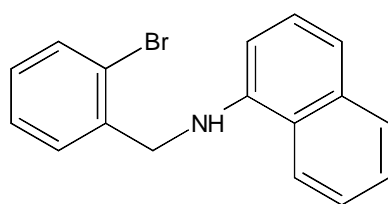


SYN 1 [Organikum, 1984]: Der entsprechende Aldehyd (1 g, 5,41 mmol) wird in 5 ml Ethanol gelöst und das jeweilige Amin (5,41 mmol) portionsweise zugegeben. Nach der Zugabe wird die Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und für 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft und getrocknet. Die gebildete Schiff'sche Base wird direkt weiter umgesetzt und mit einem sechsfachen Überschuss an Natriumborhydrid in 30 ml Ethanol eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird das überschüssige Natriumborhydrid in H₂O gelöst und die wässrige Lösung dreimal mit Ether ausgeschüttelt.

Die vereinigte Etherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Die synthetisierten Amine werden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum identifiziert.

6.2.1.1 N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin (37)



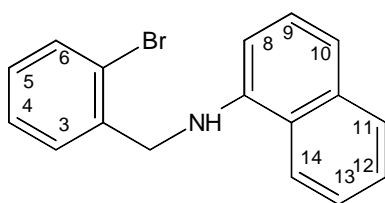
(37)

$$R_1 + R_2 = -(\text{CH})_4-$$

$$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 = \text{H}$$

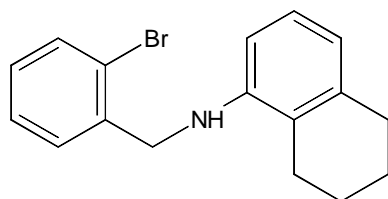
SYN 1, 1g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 774 mg (5,41 mmol) 1-Naphthylamin; die Ausbeute beträgt 1,4 g (84 %)

$^1\text{H-NMR}$ -Daten: CDCl_3 , 200 MHz

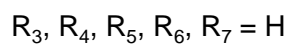
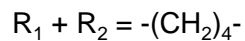


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,82 - 7,79	m, 2 H	C-11H, C-14H
7,53	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$	C-10H
7,48 - 7,39	m, 3 H	C-6H, C-12H, C-13H
7,31 - 7,19	m, 3 H	C-3H, C-4H, C-5H
7,06	pt, 1 H	C-9H
6,46	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,1$	C-8H
4,84		-NH
4,49	s	-CH ₂

6.2.1.2 N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin (38)

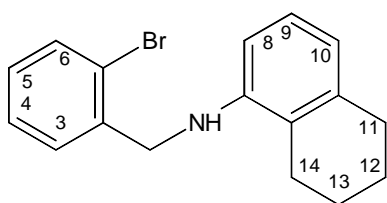


(38)



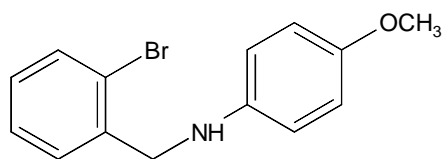
SYN 1, 1 g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 795 mg (5,41 mmol) 5,6,7,8-Tetrahydro-1-naphthylamin ; die Ausbeute beträgt 1,6 g (92 %)

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 200 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,86	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,1$	C-6H
7,66	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,6$	C-3H
7,53	pt, 1 H	C-4H
7,43	pt, 1 H	C-5H
7,28	pt, 1 H	C-9H
6,81	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,4$	C-8H
6,65	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,9$	C-10H
4,72	s, 2 H	-CH ₂
4,42		-NH
3,04	t, 2 H; $^3J_{H,H} = 6,3$	C-11H ₂
2,76	t, 2 H; $^3J_{H,H} = 6,6$	C-14H ₂
2,21 - 2,03	m, 4 H	C-12H ₂ , C-13H ₂

6.2.1.3 N-(2-Brombenzyl)-4-methoxyanilin (39)

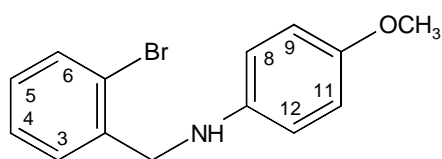


(39)

R₃ = -OCH₃R₁, R₂, R₄, R₅, R₆, R₇ = H

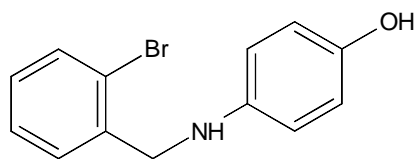
SYN 1, 1g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 665 mg (5,41 mmol) p-Anisidin; die Ausbeute beträgt 1,3 g (86 %)

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 200 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,56	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,1$	C-6H
7,41	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,6$	C-3H
7,26	pt, 1 H	C-4H
7,12	pt, 1 H	C-5H
6,78	2 H, AA'BB'-System	C-8H, C-9H
6,59	2 H, AA'BB'-System	C-11H, C-12H
4,36	s, 2 H	-CH ₂
3,99		-NH
3,74	s, 3 H	-OCH ₃

6.2.1.4 N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin (40)

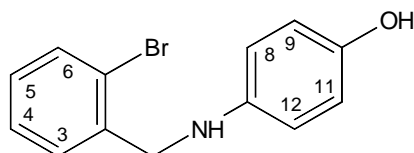


(40)

 $R_3 = -OH$ $R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7 = H$

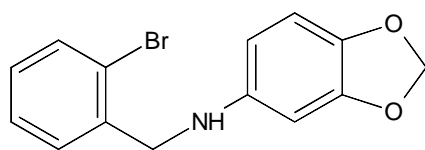
SYN 1, 1g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 590 mg (5,41 mmol) 4-Hydroxyanilin; die Ausbeute beträgt 798 mg (53 %)

1H -NMR-Daten: $CDCl_3$, 200 MHz

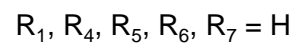
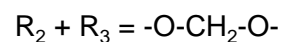


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,53	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,2$	C-6H
7,47	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,8$	C-3H
7,19	pt, 1 H	C-4H
7,09	pt, 1 H	C-5H
6,46	2 H, AA'BB'-System	C-8H, C-9H
6,29	2 H, AA'BB'-System	C-11H, C-12H
4,41	s, 2 H	-CH ₂
4,35		-NH

6.2.1.5 N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin (41)

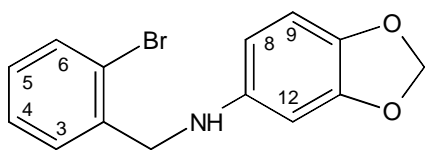


(41)



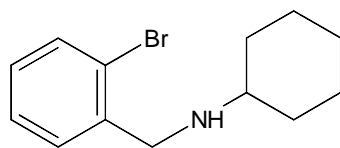
SYN 1, 1 g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 741 mg (5,41 mmol) 3,4-Methylenedioxyanilin; die Ausbeute beträgt 1,5 g (93 %)

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 200 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
8,99	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,9$	C-6H
8,82	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,4$	C-3H
8,69	pt, 1 H	C-4H
8,56	pt, 1 H	C-5H
8,07	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,4$	C-9H
7,68	s, 1 H	C-12H
7,47	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,4$	C-8H
7,27	s, 2 H	-O-CH ₂ -O-
5,76	s, 2 H	-CH ₂
5,29		-NH

6.2.1.6 N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin (42)

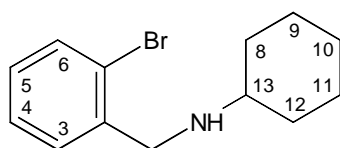


(42)

 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = H_2$
 $R_6, R_7 = H$

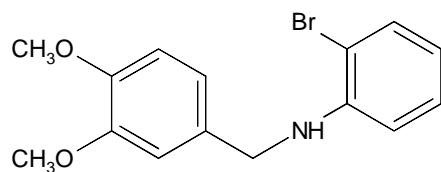
SYN 1, 1 g (5,41 mmol) o-Brombenzaldehyd, 536 mg (5,41 mmol) Cyclohexylamin, **42** ist eine klare Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 129 °C bei 4,8 kPa; die Ausbeute beträgt 1,2 g (81 %)

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 200 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,51	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,9$	C-6H
7,38	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,5$	C-3H
7,25	pt, 1 H	C-4H
7,08	pt, 1 H	C-5H
4,86	s, 2 H	-CH ₂
4,61		-NH
2,51 - 2,42	m, 1 H	C-13H
1,97 - 1,58	m, 4 H	C-8H ₂ , C-12H ₂
1,32 - 1,08	m, 6 H	C-9H ₂ , C-10H ₂ , C-11H ₂

6.2.1.7 N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (43)

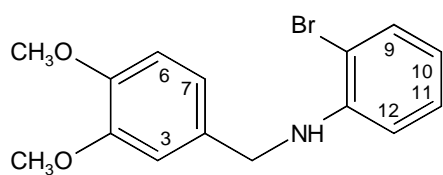


(43)

R₅ = BrR₆, R₇ = -OCH₃R₁, R₂, R₃, R₄ = H

SYN 1, 1 g (6,02 mmol) 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 1 g (6,02 mmol) o-Bromanilin; die Ausbeute beträgt 1,1 g (63 %)

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 200 MHz



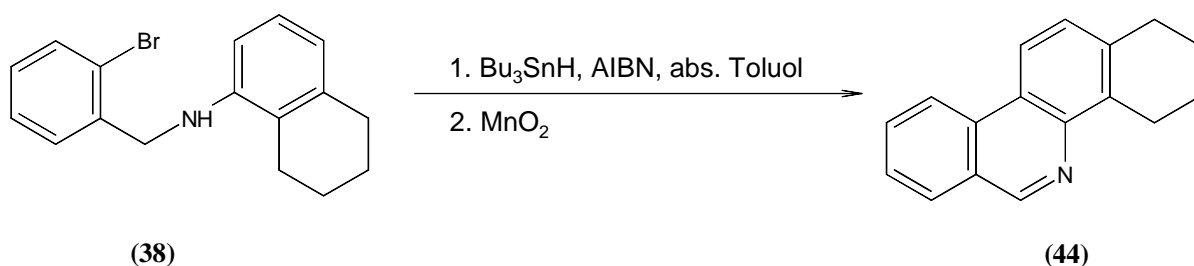
δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,78	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 7,9	C-9H
7,49	pt, 1 H	C-10H
7,28	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,4	C-12H
7,27	s, 1 H	C-3H
7,18	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 7,4	C-6H
6,98	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 7,9	C-7H
6,96	pt, 1 H	C-11H
5,08		-NH
4,67	s, 2 H	-CH ₂
4,22	s, 6 H	-OCH ₃

6.2.2 Allgemeine Synthesevorschrift für die radikalische Cyclisierung

SYN 2 [Rosa et al., 1997a,b,c]: Es werden das entsprechende Amin und Tributylzinnhydrid in 30 ml absolutem Toluol vorgelegt und die Reaktionslösung zum Sieden erhitzt. Zur Lösung wird Azobisisobutyronitril, gelöst in 15 ml absolutem Toluol, langsam zugetropft. Das Anspringen der Reaktion ist am Farbumschlag von farblos nach gelb zu beobachten. Nach zwei Stunden wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Mangandioxid versetzt und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung durch Celite filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in n-Pentan aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure dreimal gewaschen, um Organozinnverbindungen zu entfernen. Die organische Lösung wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, eingeeengt und der Rückstand aufgereinigt.

Im Folgenden werden die eingesetzten Mengen der Ausgangsverbindungen (aromatische sekundäre Amine), des Tributylzinnhydrids und des Azobisisobutyronitrils sowie die Vorgehensweise zur weiteren Aufarbeitung und die Analysendaten angegeben.

6.2.2.1 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin (44)

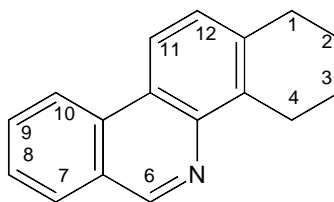


SYN 2, 500 mg (1,58 mmol) N-(2-Brombenzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthylamin, 920 mg (3,16 mmol) Tributylzinn, 155 mg (0,95 mmol) Azobisisobutyronitril, DC-Kontrolle (Kieselgel, Dichlormethan/n-Hexan (1:1), $R_f = 0,5$). Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan/n-Hexan (1:1)) und anschließender Sublimation gereinigt. **44** ist ein hellgelbes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 98 °C. Die Ausbeute beträgt 66 mg (18 %).

Elementaranalyse: C₁₇H₁₅N (MG 233,31)

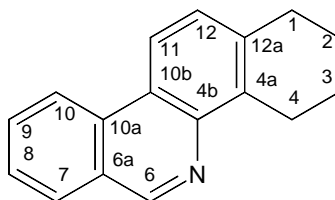
Ber.: C 87,5 % H 6,5 % N 6,0 %
 Gef.: C 84,8 % H 7,1 % N 5,4 %

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,31	s, 1 H	C-6H
8,56	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,2	C-10H
8,33	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,5	C-11H
8,04	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 7,6	C-7H
7,82	pt, 1 H	C-9H
7,64	pt, 1 H	C-8H
7,40	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,2	C-12H
3,43	t, 2 H; ³ J _{H,H} = 6,2	C-1H ₂
2,98	t, 2 H; ³ J _{H,H} = 6,2	C-4H ₂
2,02 - 1,89	m, 4 H	C-2H ₂ , C-3H ₂

¹³C-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz

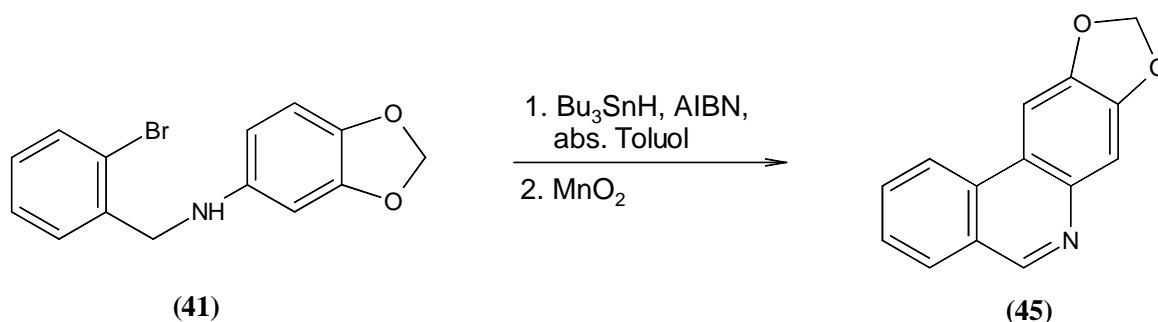


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
151,8	d; $^1J_{C,H} = 175$	C-6
142,6	s	C-4b
137,9	s	C-6a
135,5	s	C-10a
133,0	s	C-10b
130,8	s	C-12a
128,9	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-9
128,7	d; $^1J_{C,H} = 169$	C-8
126,8	d; $^1J_{C,H} = 170$	C-10
125,8	d; $^1J_{C,H} = 170$	C-7
121,8	s	C-4a
121,7	d; $^1J_{C,H} = 166$	C-12
119,1	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-11
30,2	t; $^1J_{C,H} = 127$	C-1
25,4	t; $^1J_{C,H} = 127$	C-4
23,1	t; $^1J_{C,H} = 129$	C-2
22,9	t; $^1J_{C,H} = 129$	C-3

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
233	M ⁺	100
218	[M ⁺ - CH ₃]	47
179	[M ⁺ - C ₄ H ₆]	53
151	[179 - C ₂ H ₄]	9
76	[C ₆ H ₄ ⁺]	8

6.2.2.2 2,3-Methylenedioxyphenanthridin (**45**)

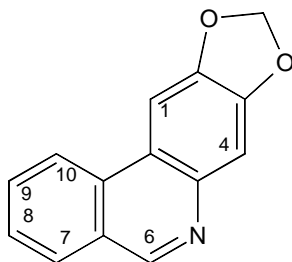


SYN 2, 500 mg (1,63 mmol) N-(2-Brombenzyl)-3,4-methylenedioxyanilin, 950 mg (3,26 mmol) Tributylzinn, 160 mg (0,98 mmol) Azobisisobutyronitril, DC-Kontrolle (Kieselgel, Dichlormethan/n-Hexan (1:1), R_f = 0,3). Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan als Fließmittel gereinigt. 2,3-Methylenedioxyphenanthridin bildet hellbeige Kristalle mit einen Schmelzpunkt von 176 °C. Die Ausbeute an **45** beträgt 76 mg (21 %).

Elementaranalyse: C₁₄H₉NO₂ (MG 223,23)

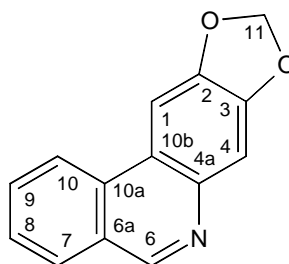
Ber.: C 75,3 % H 4,1 % N 6,3 %
 Gef.: C 73,0 % H 4,7 % N 5,6 %

$^1\text{H-NMR}$ -Daten: CDCl_3 , 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,13	s, 1 H	C-6H
8,36	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$	C-10H
7,98	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$	C-7H
7,84	s, 1 H	C-1H
7,78	pt, 1 H	C-9H
7,62	pt, 1 H	C-8H
7,53	s, 1 H	C-4H
6,13	s, 2 H	-O-CH ₂ -O-

¹³C-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



(45)

δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
151,0	d; $^1J_{C,H} = 181$	C-6
149,3	s	C-3
148,2	s	C-2
141,5	s	C-4a
132,6	s	C-10a
130,7	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-10
128,7	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-9
126,6	d; $^1J_{C,H} = 163$	C-8
125,6	s	C-6a
121,6	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-7
120,1	s	C-10b
107,6	d; $^1J_{C,H} = 167$	C-1
101,9	t; $^1J_{C,H} = 174$	C-11
99,4	d; $^1J_{C,H} = 162$	C-4

Massenspektrum: (70eV)

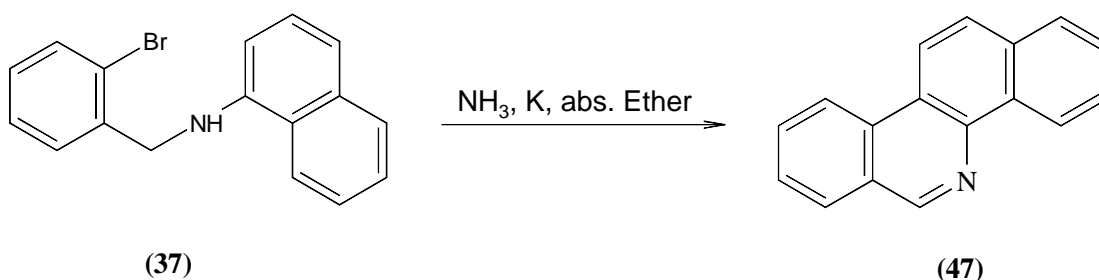
Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
223	M^+	100
179	$[M^+ - C_2H_3O_2]$	95
83	$[C_4H_3O_2^+]$	63
76	$[C_6H_4^+]$	13

6.2.3 Allgemeine Synthesevorschrift für die Cyclisierung in flüssigem Ammoniak

SYN 3 [Kessar et al., 1973a; Kessar et al., 1988]: In einem 500-ml-Dreihalskolben mit Kondensationskühler und Einleitungsrohr werden 300 ml Ammoniak aus einer Gasbombe einkondensiert. Vorsichtig wird Kalium in kleinen Stücken im Ammoniak gelöst, was am Umschlagen der Farbe von farblos nach blau zu beobachten ist. Nach vollständigem Lösen des Kaliums wird eine katalytische Menge Eisen(III)nitrat zugegeben, und es bildet sich Kaliumamid (KNH_2), welches am grauen Farbton der Lösung zu erkennen ist. Zu dieser Reaktionslösung gibt man 150 ml absoluten Ether und das entsprechende sekundäre Amin, und lässt die Reaktionslösung bis zu fünf Stunden rühren. Nach dem Ende der Reaktionszeit (DC-Kontrolle) gibt man einen Überschuss an Ammoniumchlorid zu und erwärmt die Lösung auf Raumtemperatur, wobei der Ammoniak verdampft. Anschließend wird der Rückstand in 200 ml H_2O aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird zweimal mit H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingengt und der Rückstand aufgereinigt.

Im Folgenden werden die eingesetzten Mengen der Ausgangsverbindungen (sekundäre Amine) und des Kaliums sowie die Vorgehensweise zur weiteren Aufarbeitung und die Analysendaten angegeben.

6.2.3.1 Benzo[c]phenanthridin (47)

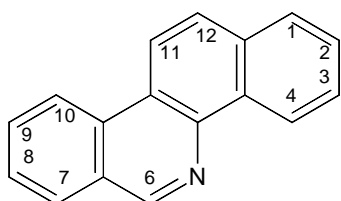


SYN 3, 500 mg (1,60 mmol) N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin, 626 mg (16,0 mmol) Kalium, DC-Kontrolle (Kieselgel, Dichlormethan/n-Hexan (2:1), $R_f = 0,4$), Reaktionszeit: 3 h. Der Rückstand wird durch Sublimation gereinigt und die Ausbeute an **47** beträgt 231 mg (63 %). Benzo[c]phenanthridin ist ein gelbes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 132 °C.

Elementaranalyse: $C_{17}H_{11}N$ (MG 229,28)

Ber.: C 89,1 % H 4,8 % N 6,1 %
 Gef.: C 89,0 % H 4,7 % N 6,2 %

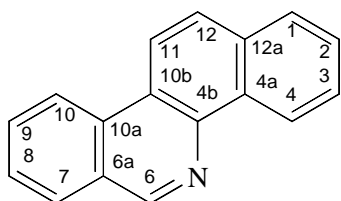
1H -NMR-Daten: $CDCl_3$, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,49	s, 1 H	C-6H
9,41	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,3$	C-4H
8,69	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,0$	C-10H
8,56	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 9,2$	C-11H
8,16	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,8$	C-7H
8,05	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,9$	C-1H

7,99	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 7,8$	C-12H
7,90	pt, 1 H	C-9H
7,80 - 7,68	m, 3 H	C-2H, C-3H, C-8H

^{13}C -NMR-Daten: CDCl_3 , 400 MHz

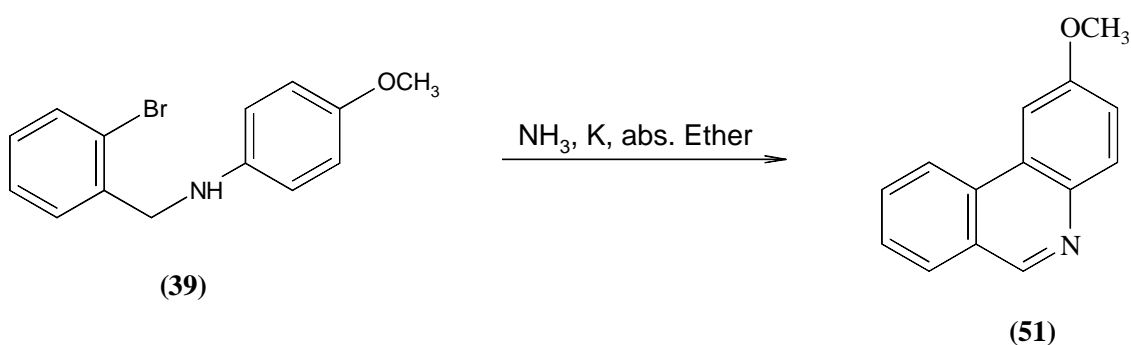


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
151,8	d; $^1J_{C,H} = 178$	C-6
141,3	s	C-4b
133,2	s	C-10a
132,8	s	C-6a
131,9	s	C-10b
130,8	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-9
128,6	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-8
127,8	s	C-4a
127,6	d; $^1J_{C,H} = 162$	C-10
127,3	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-11
127,1	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-7
127,0	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-4
126,8	d; $^1J_{C,H} = 153$	C-2
124,7	d; $^1J_{C,H} = 163$	C-3
122,1	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-12
121,0	s	C-12a
119,8	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-1

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
229	M ⁺	100
179	[M ⁺ - C ₄ H ₄]	22
151	[C ₁₂ H ₇ ⁺]	3
76	[C ₆ H ₄ ⁺]	3

6.2.3.2 2-Methoxyphenanthridin (51)

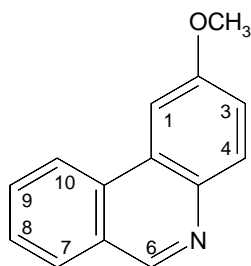


SYN 3, 500 mg (1,71 mmol) N-(2-Brombenzyl)-4-methoxyanilin, 670 mg (17,1 mmol) Kalium, DC-Kontrolle (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2), R_f = 0,4), Reaktionszeit: 3 h. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert und die Ausbeute beträgt 200 mg (56 %). 2-Methoxyphenanthridin hat einen Schmelzpunkt von 82 °C und liegt als farblose Kristalle vor.

Elementaranalyse: C₁₄H₁₁NO (MG 209,25)

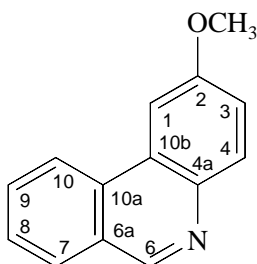
Ber.: C 80,4 % H 5,3 % N 6,7 %
 Gef.: C 79,9 % H 5,4 % N 6,8 %

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,12	s, 1 H	C-6H
8,47	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,3	C-10H
8,08	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 9,0	C-4H
7,97	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,0	C-7H
7,85	d, 1 H; ⁴ J _{H,H} = 2,7	C-1H
7,78	pt, 1 H	C-9H
7,67	pt, 1 H	C-8H
7,34	dd, 1 H; ³ J _{H,H} = 9,0, ⁴ J _{H,H} = 2,8	C-3H
3,98	s, 3 H	-OCH ₃

¹³C-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz

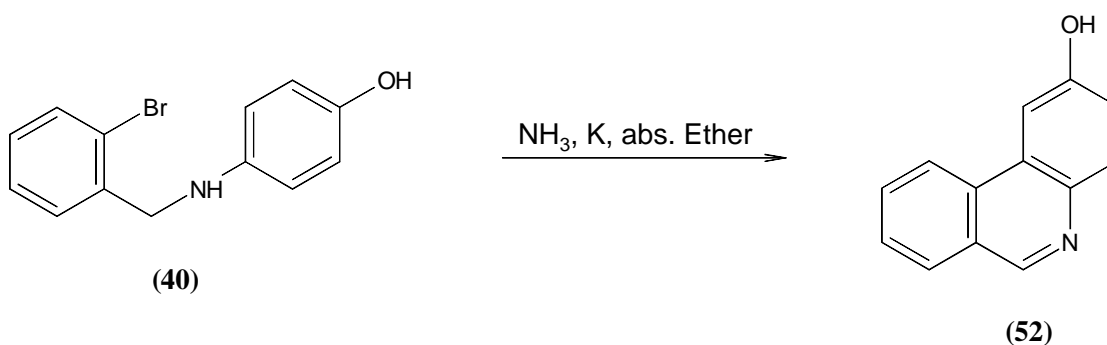


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
158,4	s	C-2
151,0	d; $^1J_{C,H} = 178$	C-6
139,8	s	C-4a
132,0	s	C-10a
131,5	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-4
130,4	d; $^1J_{C,H} = 162$	C-9
128,6	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-7
127,4	d; $^1J_{C,H} = 162$	C-8
126,5	s	C-6a
125,1	s	C-10b
121,8	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-10
118,4	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-3
103,0	d; $^1J_{C,H} = 160$	C-1
55,6	q; $^1J_{C,H} = 144$	-OCH ₃

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
209	M ⁺	100
195	[M ⁺ - CH ₃]	16
166	[M ⁺ - C ₂ H ₃ O]	93
138	[166 - C ₂ H ₄]	4
76	[C ₆ H ₄ ⁺]	3

6.2.3.3 2-Hydroxyphenanthridin (52)

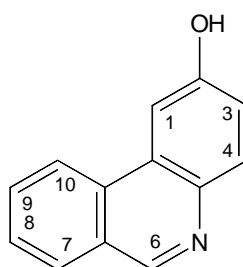


SYN 3, 300 mg (1,08 mmol) N-(2-Brombenzyl)-4-hydroxyanilin, 422 mg (10,8 mmol) Kalium, DC-Kontrolle (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2), $R_f = 0,6$), Reaktionszeit: Nach 5 h Reaktion abgebrochen. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2)) gereinigt. Die Ausbeute an **52** beträgt 57 mg (27 %). 2-Hydroxyphenanthridin bildet farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 153 °C.

Elementaranalyse: C₁₃H₉NO (MG 195,22)

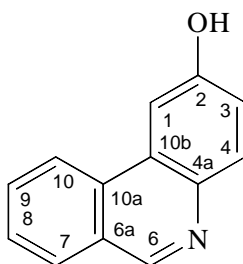
Ber.: C 79,9 % H 4,7 % N 7,2 %
 Gef.: C 75,3 % H 5,5 % N 8,6 %

¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
8,64		-OH
8,38	s, 1 H	C-6H
7,77	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,8	C-10H
7,35	d, 2 H; ³ J _{H,H} = 8,8	C-4H, C-7H
7,06	s, 1 H	C-1H
6,77	pt, 1 H	C-9H
6,57	pt, 1 H	C-8H
6,47	d, 1 H; ³ J _{H,H} = 8,6	C-3H

^{13}C -NMR-Daten: CDCl_3 , 400 MHz

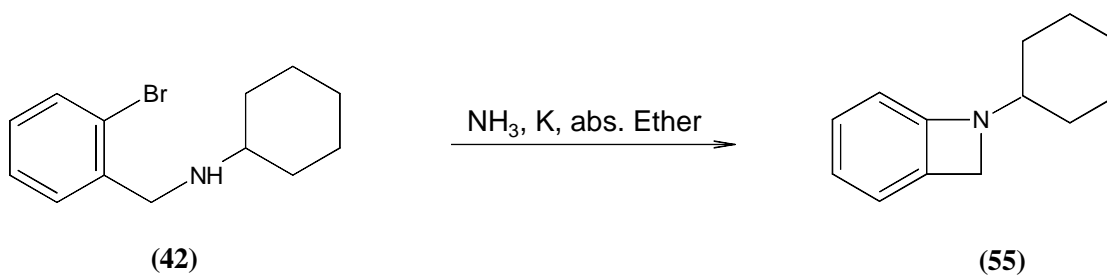


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
157,2	d; $^1J_{\text{C,H}} = 183$	C-6
155,9	s	C-2
149,6	s	C-4a
143,4	s	C-10a
138,6	d; $^1J_{\text{C,H}} = 164$	C-4
136,3	d; $^1J_{\text{C,H}} = 158$	C-9
130,6	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-7
128,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 163$	C-8
128,2	s	C-6a
122,0	s	C-10b
116,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 164$	C-10
115,9	d; $^1J_{\text{C,H}} = 164$	C-3
115,8	d; $^1J_{\text{C,H}} = 162$	C-1

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
197	MH ₂ ⁺	8
178	[M ⁺ - OH ₃ ⁺]	1
109	[C ₆ H ₇ NO ⁺]	100
76	[C ₆ H ₄ ⁺]	44

6.2.3.4 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien (55)

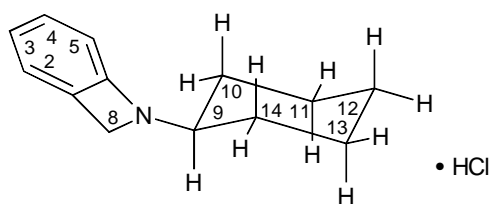


SYN 3, 500 mg (1,87 mmol) N-(2-Brombenzyl)-cyclohexylamin, 731 mg (18,7 mmol) Kalium, DC-Kontrolle (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (2:1), R_f = 0,3), Reaktionszeit: Nach 5 h Reaktion abgebrochen. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (2:1)) gereinigt und die Ausbeute beträgt 129 mg (31 %). 7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien liegt als farbloses Öl vor und wird mit verdünnter Salzsäure als Hydrochlorid kristallisiert (Schmelzpunkt: 217 °C).

Elementaranalyse: C₁₃H₁₈NCl (MG 223,75)

Ber.: C 69,8 % H 8,1 % N 6,3 %
 Gef.: C 56,8 % H 8,3 % N 9,9 %

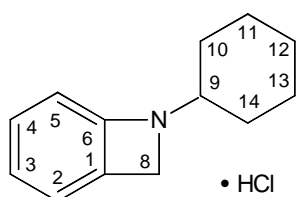
$^1\text{H-NMR}$ -Daten: d_6 -DMSO, 400 MHz



(55)

δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
7,61	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$	C-5H
7,44	pt, 1 H	C-4H
7,34	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$	C-2H
7,30	pt, 1 H	C-3H
4,29	s, 2 H	C-8H ₂
3,15 - 3,07	m, 1 H	C-9H
2,18 - 1,77	m, 2 H	C-10H ₂
1,63 - 1,40	m, 2 H	C-14H ₂
1,29 - 1,06	m, 6 H	C-11H ₂ , C-12H ₂ , C-13H ₂

^{13}C -NMR-Daten: d_6 -DMSO, 400 MHz

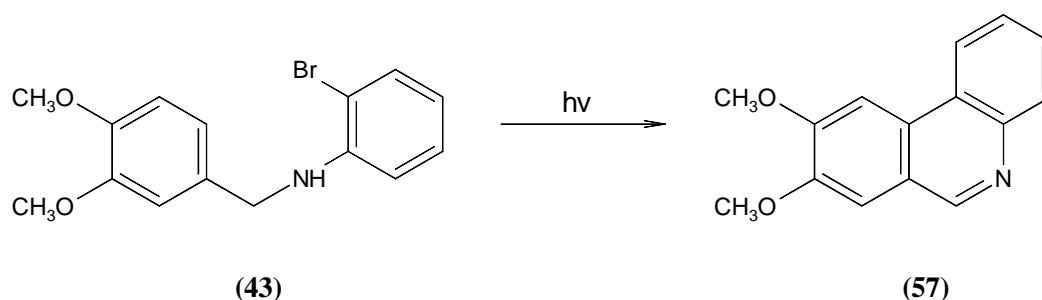


δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
133,5	s	C-6
130,8	s	C-1
126,1	d; $^1J_{\text{C,H}} = 164$	C-4
125,2	d; $^1J_{\text{C,H}} = 165$	C-5
124,3	d; $^1J_{\text{C,H}} = 164$	C-2
122,8	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-3
57,2	d; $^1J_{\text{C,H}} = 142$	C-9
42,9	t; $^1J_{\text{C,H}} = 144$	C-8
28,7	t; $^1J_{\text{C,H}} = 128$	C-14
28,6	t; $^1J_{\text{C,H}} = 127$	C-10
24,9	t; $^1J_{\text{C,H}} = 128$	C-11, C-13
24,2	t; $^1J_{\text{C,H}} = 125$	C-12

Massenspektrum: (70eV)

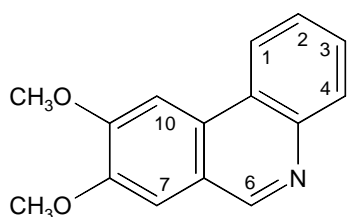
Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
209	$[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$	2
179	$[\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_8]$	29
121	$[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}^+]$	59
106	$[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}^+]$	100
36	$[\text{HCl}^+]$	28

6.2.4 8,9-Dimethoxyphenanthridin (**57**)



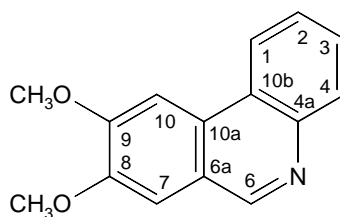
In einer Bestrahlungsapparatur, bestehend aus einem Reaktionsgefäß mit einer Tauchlampe (TQ 150) und einem Kühlrohr aus Quarzglas, wird in 300 ml absolutem Dichlormethan N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin (500 mg, 1,55 mmol) gelöst und die Reaktionslösung bestrahlt (DC-Kontrolle: Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2), $R_f = 0,6$). Nach drei Stunden wird die Bestrahlung abgebrochen und die Reaktionslösung dreimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (1:2)) aufgetrennt. Die Ausbeute an **57** beträgt 48 mg (13 %).

$^1\text{H-NMR}$ -Daten: CDCl_3 , 400 MHz



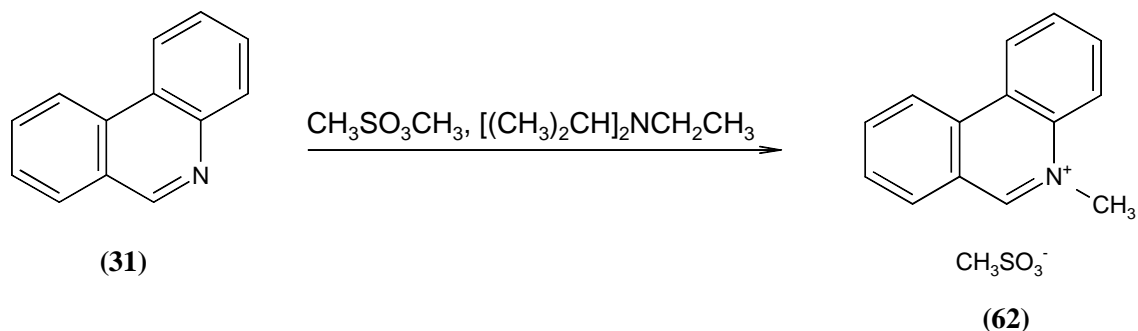
δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,72	s, 1 H	C-6H
7,32	d, 2 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$	C-1H, C-4H
7,29	pt, 2 H	C-2H, C-3H
6,87	s	C-7H
6,83	s	C-10H
3,83	s, 3 H	-OCH ₃
3,80	s, 3 H	-OCH ₃

¹³C-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



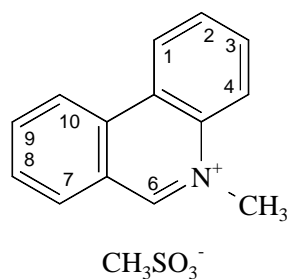
δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
154,5	d; $^1J_{C,H} = 173$	C-6
149,6	s	C-9
146,8	s	C-8
144,2	s	C-4a
139,6	s	C-10a
130,1	s	C-6a
126,9	d; $^1J_{C,H} = 163$	C-4
125,6	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-10
125,2	d; $^1J_{C,H} = 158$	C-7
116,2	s	C-10b
113,7	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-3
110,4	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-2
108,8	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-1
56,2	q; $^1J_{C,H} = 145$	-OCH ₃
55,1	q; $^1J_{C,H} = 145$	-OCH ₃

6.2.5 N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat (62)

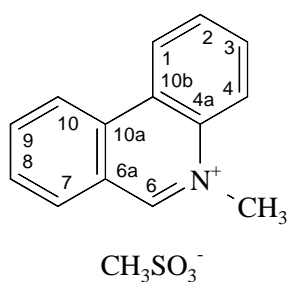


Phenanthridin (200 mg, 1,12 mmol) und Methansulfonsäuremethylester (123 mg, 1,12 mmol) werden unter Zusatz von 0,8 ml Diisopropylethylamin 30 Minuten unter Schutzgas bei 175 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 6 ml absolutem Ether verdünnt und gerührt. Die Etherphase wird abpipettiert und der harzige Rückstand aus wenig absolutem Ethanol umkristallisiert [Olugbade et al., 1996; Mackay et al., 1998]. Die Ausbeute beträgt 125 mg (37 %). **62** liegt als weißes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 228 °C vor.

¹H-NMR-Daten: D₂O, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,56	s, 1 H	C-6H
8,58	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$	C-10H
8,52	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,7$	C-1H
8,21	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$	C-4H
8,14	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$	C-7H
8,09	pt, 1 H	C-9H
7,92	pt, 1 H	C-2H
7,87 - 7,82	m, 2 H	C-3H, C-8H
4,46	s, 3 H	N ⁺ -CH ₃
2,67	s, 3 H	CH ₃ -SO ₃ ⁻

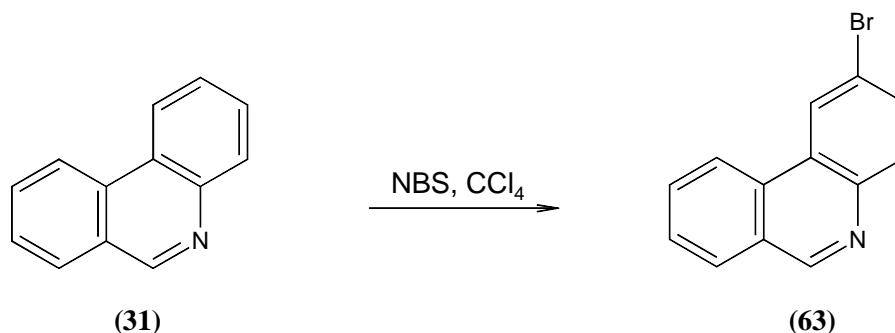
^{13}C -NMR-Daten: D_2O , 400 MHz

δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
151,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 187$	C-6
135,5	s	C-4a
131,2	s	C-10a
130,6	d; $^1J_{\text{C,H}} = 168$	C-9
129,6	d; $^1J_{\text{C,H}} = 170$	C-4
129,5	d; $^1J_{\text{C,H}} = 168$	C-3
127,9	d; $^1J_{\text{C,H}} = 168$	C-7
127,7	d; $^1J_{\text{C,H}} = 168$	C-8
122,2	s	C-6a
121,1	s	C-2
120,1	d; $^1J_{\text{C,H}} = 157$	C-10b
119,5	d; $^1J_{\text{C,H}} = 167$	C-1
116,3	d; $^1J_{\text{C,H}} = 167$	C-10
42,9	q; $^1J_{\text{C,H}} = 145$	$\text{N}^+\text{-CH}_3$
35,9	q; $^1J_{\text{C,H}} = 136$	$\text{CH}_3\text{-SO}_3^-$

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
194	M^+	3
179	$[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$	80
151	$[179 - \text{C}_2\text{H}_4]$	8
76	$[\text{C}_6\text{H}_4^+]$	8
32	S^+	100

6.2.6 2-Bromphenanthridin (63)

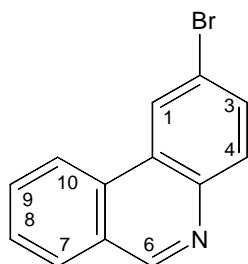


Phenanthridin (800 mg, 4,47 mmol) und N-Bromsuccinimid (796 mg, 4,47 mmol) werden in 10 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und die Reaktionslösung ca. zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit 3 ml Toluol versetzt, erwärmt und heiß filtriert. Das Filtrat wird zum Auskristallisieren im Vakuum auf ca. $\frac{1}{4}$ des Volumens eingengt [Gilman et al., 1955]. Der Niederschlag wird abgesaugt und säulenchromatographisch (Kieselgel, Petrolether/Diethylether (2:1)) gereinigt. **63** ist ein farbloses Pulver mit einem Schmelzpunkt von 152 °C. Die Ausbeute beträgt 493 mg (43 %).

Elementaranalyse: C₁₃H₈NBr (MG 258,12)

Ber.: C 60,5 % H 3,1 % N 5,4 %
 Gef.: C 60,4 % H 2,9 % N 5,6 %

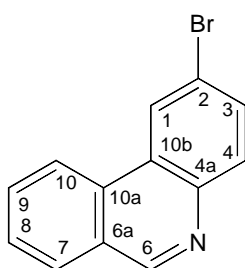
¹H-NMR-Daten: CDCl₃, 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,24	s, 1 H	C-6H
8,64	s, 1 H	C-1H
8,47	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$	C-10H
8,01	d, 2 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,6$	C-4H, C-7H

7,84	pt, 1 H	C-9H
7,78	d, 1 H; $^3J_{H,H} = 8,7$	C-3H
7,71	pt, 1 H	C-8H

^{13}C -NMR-Daten: CDCl_3 , 400 MHz



δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
153,8	d; $^1J_{C,H} = 179$	C-6
143,1	s	C-4a
131,9	d; $^1J_{C,H} = 166$	C-1
131,8	d; $^1J_{C,H} = 163$	C-3
131,4	s	C-10a
131,3	d; $^1J_{C,H} = 161$	C-9
128,8	d; $^1J_{C,H} = 167$	C-7
128,1	d; $^1J_{C,H} = 162$	C-8
126,4	s	C-6a
125,6	s	C-10b
125,0	d; $^1J_{C,H} = 163$	C-4
121,9	d; $^1J_{C,H} = 159$	C-10
121,2	s	C-2

Massenspektrum: (70eV)

Massenzahl m/z	Fragment	Intensität [%]
258	M ⁺	20
178	[M ⁺ - Br]	100
150	[178 - C ₂ H ₄]	11
76	[C ₆ H ₄ ⁺]	9

6.3 Methoden der Zellkultivierung

6.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien werden in sterilem RPMI-1640-Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt ist, in entsprechenden Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wird regelmäßig zwei- bis dreimal pro Woche erneuert, um die Zellen stets mit neuen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu versorgen.

6.3.2 Passagieren von Zellen

Sind die Monolayerzellen konfluent gewachsen, werden sie steril passagiert. Dazu wird das verbrauchte Medium abgeschüttet und der Zellrasen mit 20 ml PBS gewaschen, bevor man 5 ml gebrauchsfertige Trypsinlösung 20 Sekunden auf die Monolayer einwirken lässt, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Wenn sich die Zellen von der Oberfläche der Flasche abgelöst haben, wird das restliche Trypsin mit 20 ml RPMI-Medium mit FKS

inaktiviert und die Zellen auf ca. 25 % ihres ursprünglichen Volumens verdünnt und anschließend wieder mit frischem Medium aufgefüllt.

Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass Monolayer mit hoher Passagenzahl ihre physiologischen Eigenschaften stark verändern können. Deshalb werden für eine Zelllinie nicht mehr als 15 Passagen durchgeführt. Danach werden die Zellen verworfen und neue Zellen kultiviert.

Reagenzien:

PBS:
(phosphate buffered saline) 5 g NaCl
 720 mg Na₂HPO₄
 125 mg KCl
 125 mg KH₂PO₄
 mit aq. bidest. H₂O auf 500 ml auffüllen, pH 7,4

Trypsinlösung: 50,12 g Trypsin (Rinderpankreas, 2,4 IU/mg)
 25 mg EDTA
 mit PBS auf 100 ml auffüllen, über Nacht im Eisbad rühren und dann steril
 filtrieren

6.3.3 Auszählen von Zellen

Nach abtrypsinieren der Zellen werden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung gevortext und die Lösung in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Das Auszählen der Zellen ist unterm Lichtmikroskop möglich, da abgestorbene Zellen blau gefärbt sind (durch Membranschäden kann der Farbstoff in die Zelle eindringen und an Proteine binden), während lebende Zellen farblos erscheinen (der Farbstoff kann hier nicht in die Zelle eindringen). Es werden zur Bestimmung der Zellzahl nur die farblosen Zellen gezählt.

6.3.4 Einfrieren von Zellen

Um Zellen mit niedriger Passagenzahl zur Verfügung zu haben bzw. bei eventueller Kontamination der kultivierten Zellen auf neue Zellen zurückgreifen zu können, empfiehlt es sich, einen Vorrat an Zellen in ausreichender Menge in Kryoröhrchen einzufrieren und bei -180 °C in flüssigem Stickstoff aufzubewahren. Dazu werden die Zellen abtrypsinisiert und auf eine Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Als Gefrierschutz gibt man 10 % Vol. DMSO zu und friert die Zellen zunächst bei -80 °C im Biofreezer ein, um sie anschließend zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff zu überführen.

6.3.5 Auftauen von Zellen

In einem Falcon werden 10 ml RPMI-Medium mit 20 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin vorgelegt und die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wird ins Falcon überführt und fünf Minuten bei 800 Umdrehungen zentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in frischem Medium mit 20 % FKS aufgenommen und zur Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

6.3.6 Untersuchung auf Mykoplasmenkontamination

Alle in Kultur befindlichen Zellen werden regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Diese bakterienähnlichen Kleinstlebewesen leben in enger Vergesellschaftung mit Tier- und Pflanzenzellen [Alberts et al., 1995].

Es werden 5000 adhärent wachsende Zellen auf einen Objektträger ausgestreut, und man lässt sie 24 Stunden auf der Oberfläche anwachsen. Anschließend wird zur Fixierung der Zellen der Objektträger in eiskaltes Methanol getaucht und mindestens 15 Minuten inkubiert.

Zur Detektion der Mykoplasmen wird ein Gemisch aus DAPI/Propidiumiodid und Antifade auf den Objektträger pipettiert und die Färbung der Zellen und Mykoplasmen unterm

Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Die DNA der Zellen ist blau und Cytoplasmaproteine rot gefärbt, während Mykoplasmen, die zum größten Teil aus DNA bestehen, als kleine Punkte im Cytoplasma und im Interzellularraum auszumachen sind.

Sind die Zellen kontaminiert, werden sie eine Woche lang mit Mykoplasmen-Entfernungs-Reagenz (MRA) behandelt und mindestens zweimal passagiert, bevor man wieder mit ihnen arbeiten kann.

Reagenzien:

DAPI/Propidiumiodid/Antifade-Lösung:

Je 1 µl der Farbstofflösungen auf 1 ml Antifade-Puffer

Farbstofflösungen: 1 mg DAPI auf 1 ml aq. bidest. H₂O
1 mg Propidiumiodid auf 1 ml aq. bidest. H₂O

Antifade-Puffer:

100 mg p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid in 10 ml PBS lösen, mit 0,5 M Carbonat-Dicarbonat-Puffer den pH-Wert auf 8,0 einstellen, auf 100 ml mit Glyzerin auffüllen und bei -20°C lagern

6.4 Methoden der *in vitro* Untersuchungen

6.4.1 Sulforhodamin-B-Assay

Zur Bestimmung der Cytotoxizität der synthetisierten Substanzen wird der photometrische Sulforhodamin-B-Assay durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Färbung und Quantifizierung von zellulären Proteinen durch den Farbstoff Sulforhodamin B, indem Zellen einer unbehandelten Kontrolle mit Zellen verglichen werden, die mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Substanzen über 72 Stunden inkubiert wurden [Rubinstein et al., 1990; Shekan et al., 1990].

In eine 24-Loch-Mikrotiterplatte werden 4000 Zellen/well (LXFL529L) bzw. 5000 Zellen/well (GXF251L, CXF94L) in serumhaltigem Medium ausgestreut, und man lässt sie 24 Stunden anwachsen. Danach wird das Medium abgesaugt und durch frisches Medium mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen ersetzt. Zur Inkubation werden pro Verbindung (gelöst in DMSO) 4 wells parallel angesetzt, wobei die DMSO-Konzentration zwischen 0,1 % und 1 % eingestellt wird. Die Kontrollansätze werden ebenfalls unter Zusatz der entsprechenden DMSO-Konzentration mitgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wird der Versuch abgestoppt. Dazu wird in jedes well 1/10 Volumenanteil 50%ige Trichloressigsäure (TCA) pipettiert und zur Fixierung der Zellen die Mikrotiterplatte 1 Stunde bei 4 °C gehalten. Danach wird das TCA-haltige Medium abgeschüttet und die Platte vier- bis fünfmal mit fließend kaltem Leitungswasser gespült, um TCA-Reste zu entfernen. Das Trocknen der Mikrotiterplatte erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 50 °C für ein bis zwei Stunden im Trockenschrank.

Nach dem Trocknen werden die fixierten Zellen mit 250 µl/well Sulforhodamin-B-Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt. Die SRB-Lösung wird dann abgeschüttet und die Platte vier- bis fünfmal mit 1%iger Essigsäure gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Platte wird erneut getrocknet (s. oben) und der an zelluläre Proteine gebundene Farbstoff durch Zugabe von 1ml/well 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5) solubilisiert. Die Farbstofflösung wird anschließend in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 570 nm im Photometer gegen einen Blindwert gemessen. Die Färbung der Lösung ist direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen im well.

Reagenzien:

Trichloressigsäure-Lösung: 50 % (m/v) in bidest. H₂O

Essigsäure-Lösung: 1 % (v/v) Essigsäure in H₂O

Sulforhodamin B-Lösung: 0,45 (m/v) Sulforhodamin B in 1%iger Essigsäure

10 mM Tris-Base:

1,21 g Tris-(Hydroxyethyl)-aminomethan in bidest. H₂O lösen und mit HCl den pH-Wert auf 10,5 einstellen, mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

6.4.2 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Dieser Test gibt Aufschluss über die Fähigkeit von Substanzen, zwischen die Basenpaare der DNA zu intercalieren [Morgan et al., 1979]. Ethidiumbromid, was erwiesenermaßen in die Doppelstrang-DNA intercaliert und dabei stark fluoresziert, dient als Referenzsubstanz [Glazer et al., 1992].

Die Reaktion findet in einem ethidiumbromidhaltigen Puffer unter Zusatz von Kalbsthymus-DNA und der zu testenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen statt.

Das Fluoreszenzspektrometer wird auf die Wellenlängen 546 nm (Extinktion) und 595 nm (Emission) eingestellt und mit 2 ml des Ethidiumbromidpuffers ohne Zusatz von DNA in einer Fluoreszenzküvette geblankt. Dann misst man die Fluoreszenzintensität von 2 ml eines Gemisches aus 6 ml Ethidiumbromidpuffer und 26,3 µl Kalbsthymus-DNA und setzt diese maximale Fluoreszenz als 100 %. Danach pipettiert man zu den 2 ml Lösung in der Messküvette in 10-µl-Schritten die entsprechende Substanz (gelöst in DMSO), verrührt nach jeder Zugabe gut mit einem Rührspatel und misst die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Substanzkonzentration (vergrößertes Volumen wird eingerechnet). Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanz wird durch Zugabe der entsprechenden Konzentrationsschritte zu 2 ml Ethidiumbromidpuffer bestimmt (Korrekturwert) und von den zuvor gemessenen Fluoreszenzwerten subtrahiert.

Zwischen den einzelnen Messungen wird immer wieder der Nullwert überprüft und bei zu großer Abweichung erneut ein Nullabgleich durchgeführt.

Die Auftragung der gemessenen Abnahme der Fluoreszenz gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus der der ED₅₀-Wert ermittelt werden kann.

Als Positivkontrolle wird Actinomycin D (ED₅₀-Wert ca. 2 µM) mitgeführt.

Reagenzien:

Pufferlösung:

9,3 mmol NaCl, 2 mmol Na-Acetat-Puffer und 0,1 mmol EDTA in bidest. H₂O lösen und den pH-Wert auf 7,0 einstellen

Ethidiumbromidpuffer:

Ethidiumbromidstammlösung 10 mg/ml; davon 2 µM Lösung mit Pufferlösung ansetzen

Kalbsthymus-DNA:

2 mg/ml Kalbsthymus-DNA (Sigma), gelöst in folgendem Puffer: 0,1 mol/l NaCl, 0,1 mol/l Trinatriumcitrat, pH 7,5; Puffer gesättigt mit Chloroform

6.4.3 Hoechstfarbstoff-H33258-Verdrängungsassay

Der Hoechstfarbstoff-Assay gibt Aufschluss über die Fähigkeit von Substanzen, sich in der kleinen Furche der DNA anzulagern. Als Referenzsubstanz dient dabei der Hoechst-Fluoreszenz-Farbstoff H33258, der sich bekanntermaßen in der kleinen Furche der DNA mit einer speziellen Affinität zu A-T-reichen Region anlagert [Wang et al., 1994].

Die Reaktion findet in einem Hoechstfarbstoff-haltigen Puffer unter Zusatz von Kalbsthymus-DNA und der zu testenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen statt.

Das Fluoreszenzspektrometer wird auf die Wellenlängen 360 nm (Extinktion) und 450 nm (Emission) eingestellt und mit 2 ml des Hoechst-Puffers ohne Zusatz von DNA in einer Fluoreszenzküvette geblankt. Dann misst man die Fluoreszenzintensität von 2 ml eines Gemisches aus 10 ml Hoechstfarbstoff-Puffer und 13,15 µl Kalbsthymus-DNA und setzt diese maximale Fluoreszenz als 100 %. Danach pipettiert man zu den 2 ml Lösung in der Messküvette in 10-µl-Schritten die entsprechende Substanz (gelöst in DMSO), verrührt nach jeder Zugabe gut mit einem Rührspatel und misst die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Substanzkonzentration (vergrößertes Volumen wird eingerechnet). Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanz wird durch Zugabe der entsprechenden Konzentrationsschritte zu 2 ml Hoechstfarbstoff-Puffer bestimmt (Korrekturwert) und von den zuvor gemessenen Fluoreszenzwerten subtrahiert.

Zwischen den einzelnen Messungen wird immer wieder der Nullwert überprüft und bei zu großer Abweichung erneut ein Nullabgleich durchgeführt.

Die Auftragung der gemessenen Abnahme der Fluoreszenz gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus der der ED₅₀-Wert ermittelt werden kann.

Als Positivkontrolle wird Netropsin (ED₅₀-Wert ca. 380 nM) mitgeführt.

Reagenzien:Pufferlösung:

9,3 mmol NaCl, 2 mmol Na-Acetat-Puffer und 0,1 mmol EDTA in bidest. H₂O lösen und den pH-Wert auf 7,0 einstellen

Bisbenzimid H33258 (Hoechstfarbstoff):

Stammlösung 10 mg/ml; davon 2 µM Lösung mit Pufferlösung ansetzen

Kalbsthymus-DNA:

10 mg Kalbsthymus-DNA (Boehringer Mannheim) auf 3,8 ml bidest. H₂O

6.5 Geräte und Materialien

6.5.1 Synthese

Es wurden handelsübliche Chemikalien eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel waren p.a. oder frisch destilliert und gegebenenfalls nach gängigen Methoden getrocknet.

Verwendetes Wasser war bidestilliert, und als Schutzgas diente Argon.

Zur Durchführung der Synthesen und anschließender Aufarbeitung sowie für spektroskopische und analytische Untersuchungen wurden folgende Geräte benutzt.

¹H-NMR: Bruker AMX400
Bruker AC200

¹³C-NMR: Bruker AMX400
Bruker AC200

Massenspektren: Finnigan Massenspektrometer MAT 3300

Elementaranalyse: Perkin Elmer 2400 CHN-Elemental-Analyzer

Schmelzpunkt:	Büchi 510 Melting Point, die ermittelten Schmelzpunkte sind nicht korrigiert
Dünnschichtchromatographie:	DC-Kieselgel-Folien, Alugram Sil G/UV ₂₅₄ ; Macherey+Nagel DC-Aluminiumoxid-Folien, Aluminiumoxid 150 F ₂₅₄ , neutral (Typ T); Merck DC-RP-18-Folien, RP-18 F ₂₅₄ ; Merck
Säulenchromatographie:	Kieselgel Typ 60 (0,063-0,2 mm); Macherey+Nagel
UV-Spektren:	Beckmann DU-600
IR-Spektren:	Perkin Elmer Infrared Spektrophotometer 1310
HPLC-System:	Pumpe: Jasco PU 980 Gradientenmischer: Jasco LG-980-02 Entgaser: Jasco DG-980-50 Säule: LichroCART, 125-4, RP-18, mit Vorsäule; Merck UV-Detektor: GAT LCD-500 Integrator: Shimadzu C-R3A

6.5.2 Zellkultivierung

Die adhärent wachsenden Tumorzelllinien LXFL529L (humanes großzelliges Lungenkarzinom), GXF251L (humanes Magenkarzinom) und CXF94L (humanes Colonkarzinom) wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. H. Fiebig von der Universität Freiburg überlassen.

Zellkulturmaterial	Greiner, Sarstedt, Falcon
RPMI-1640-Zellkulturmedium	Life Technology
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technology
Penicillin/Strepomycin (10.000 I.E./10.00 µg)	Life Technology

Sterilbank Laminar.Air HLB 2472 BS	Heraeus
Brutschrank Cytoperm	Heraeus
Lichtmikroskop Labovert	Leitz
Neubauer-Zählkammer	
Multipipette	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipettus-Akku	Tecnorama
Biofreezer Vakuumsaugpumpe	Forma KNF-Neuberger
Varioklav-Dampfsterilisator 500 E	H+P Labortechnik
Trockenschrank	Memmert
EIA-Platereader	Bio-Rad
Fluoreszenz-Spektrometer RF-510LC	Shimadzu

7 Literaturverzeichnis

- Abou-Donia A H, Abib A-A, El Din A S, Evidente A, Gaber M, Scopa A: Two Betaine-Type Alkaloids from Egyptian *Pancreatium maritimum*; *Phytochemistry* **1992**, 31 (6), 2139-2141.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D: Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, *Garland Publishing Inc., New York* **1995**.
- Ali A A, Kating H, Frahm A W, El-Moghazi A M, Ramadan M A: Two Non-Hydroxylated Alkaloids in *Crinum augustum*; *Phytochemistry* **1981**, 20 (5), 1121-1123.
- Amico A, Stefanizzi L: Cytochemical Localization of Lycorine in Plants of *Sternbergia lutea* Ker-Gawl; *Quart. J. Crude Drug Res.* **1978**, 16 (2), 65-70.
- Amico A, Stefanizzi L, Bruno S, Bonvino V: Distribution of Lycorine in *Sternbergia lutea* Ker-Gawl; *Quart. J. Crude Drug Res.* **1980**, 18 (1), 27-31.
- Arai S, Ishikura M, Yamagishi T: Synthesis of Polycyclic Azonia-Aromatic Compounds by Photo-Induced Intramolecular Quaternization: Azonia Derivatives of Benzo[c]-phenanthrene, [5]helicene and [6]helicene; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1561-1567.
- Armand J P, Cunningham D, van Cutsem E, Misset J L, Kohne C H: Clinical Advances with Topoisomerase I Inhibitors in Gastrointestinal Malignancies; *Anti-Cancer Drugs* **1999**, 10 Suppl. 1, 5-12.
- Arrigoni O, Paciolla C, De Gara L: Inhibition of Galactonolactone Dehydrogenase Activity by Lycorine; *J. Biol. Res.-Boll. Soc. It. Biol. Sper.* **1996**, 72 (1-2), 37-43.
- Arthur H R, Hui WH, Ng Y L: Structures of New Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*; *Chem. Ind. (London)* **1958**, 1514.
- Bailly C, Dassonneville L, Colson P, Houssier C, Fukasawa K, Nishimura S, Yoshinari T: Intercalation into DNA Is Not Required for Inhibition of Topoisomerase I by Indolocarbazole Antitumor Agents; *Cancer Research* **1999**, 59 (12), 2853-2860.
- Bastida J, Fernandez J M, Viladomat F, Codina C, De La Fuente G: Alkaloids from *Narcissus tortuosus*; *Phytochemistry* **1995**, 38 (2), 549-551.

- Bastida J, Codina C, Porras C L, Paiz L: Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*; *Planta Med.* **1996**, *62*, 74-75.
- Bowman W R, Heaney H, Jordan B M: Oxidation during Reductive Cyclisations Using Bu_3SnH ; *Tetrahedron* **1991**, *47* (48), 10119-10128.
- Bridewell D J, Finlay G J, Baguley B C: Mechanism of Cytotoxicity of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide and of its 7-chloro Derivative: The Roles of Topoisomerases I and II; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *43* (4), 302-308.
- Bunting J W, Luscher M A: Kinetics of Hydride Transfer between Nitrogen Heteroaromatic Cations; *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2524-2531.
- Burgess E M, McCullagh L: N-Phenylbenzoazetine; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (7), 1580-1581.
- Campbell W E, Nair J J, Gammon D W, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Smith P J, Albrecht C F: Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from *Brunsvigia littoralis*; *Planta Med.* **1998**, *64*, 91-93.
- Campos P J, Anon E, Malo M C, Tan C-Q, Rodriguez M A: Synthesis of Substituted Benzoquinolines by the Irradiation of 3-Amino-2-alkene Imines; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6929-6938.
- Capranico G, Giaccone G, Zunino F, Garattini S, D'Incalci M: DNA Topoisomerase II Poisons and Inhibitors; *Cancer Chemother. Biol. Respose Modif.* **1997**, *17*, 114-131.
- Carrigan S W, Fox P C, Wall M E, Wani M C, Bowen J P: Comparative Molecular Field Analysis and Molecular Modeling Studies of 20-(S)-camptothecin Analogs as Inhibitors of DNA Topoisomerase I and Anticancer/Antitumor Agents; *J. Computer-Aided Molecular Design* **1997**, *11*, 71-78.
- Chandler GS: Phenanthridines VI. The Bromination of Phenanthridine; *Aust. J. Chem.* **1969**, *22*, 1105-1106.
- Chabner B A, Collins J M: Cancer Chemotherapy: Principles and Practice; *J. B. Lippincott-Raven*, Philadelphia, New York **1990**.
- Chen A Y, Liu L F: DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets; *Ann. Reviews in Pharmacol. Toxicology* **1994**, *34*, 191-218.

- Cho W-J, Park M-J, Imanishi T, Chung B-H: A Novel Synthesis of Benzo[c]phenanthridine Skeleton and Biological Evaluation of Isoquinoline Derivates; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47* (6), 900-902.
- Clark J, Sikov W, Cummings F, Browne M, Akerley W, Wanebo H, Weitberg A, Kennedy T, Cole B, Bigley J, Beitz J, Darnowski J: Phase II Study of 5-Fluoruracil Leucovorin and Azidothymidine in Patients with Metastatic Colorectal Cancer; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, *122* (9), 554-558.
- Corbett A H, Osheroff N: When Good Enzymes Go Bad: Conversion of Topoisomerase II to a Cellular Toxin by Antineoplastic Drugs; *Chemical Research in Toxicology* **1993**, *6* (5), 585-591.
- Cozzarelli N R: DNA Gyrase and the Supercoiling of DNA; *Science* **1980**, *207*, 953-960.
- Curran D P: The Design and Application of Free Radical Chain Reactions in Organic Synthesis. Part 1; *Synthesis* **1988**, 417-439.
- Davey M W, Persiau G, De Bruyn A, Van Damme J, Bauw G, Van Montagu M: Purification of the Alkaloid Lycorine and Simultaneous Analysis of Ascorbic Acid and Lycorine by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography; *Analytical Biochemistry* **1998**, *257*, 80-88.
- Diaz J F, Strobe R, Engelborghs Y, Souto A A, Andreu J M: Molecular Recognition of Taxol by Microtubules: Kinetics and Thermodynamics of Binding of Fluorescent Taxol Derivatives to an Exposed Site; *J. Biol. Chem.* **2000**, 18.
- Dickerson R E, Drew H R, Conner B N, Wing R M, Fratini A V, Kopka M L: The Anatomy of A-, B-, and Z-DNA; *Science* **1982**, *216*, 475-485.
- Evidente A, Cicala M R, Giudicianni I, Randazzo G, Riccio R: ¹H and ¹³C NMR Analysis of Lycorine and α -Dihydrolycorine; *Phytochemistry* **1983a**, *22* (2), 581-584.
- Evidente A, Iasiello I, Randazzo G: Rapid Quantitative Analysis of Lycorine by Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography; *J. of Chromatography* **1983b**, *281*, 362-366.
- Evidente A, Iasiello I, Randazzo G: An Improved Method for the Large-scale Preparation of Lycorine; *Chemistry and Industry* **1984a**, 348-349.
- Evidente A, Iasiello I, Randazzo G: Isolation of Sternbergine, a New Alkaloid from Bulbs of *Sternbergia lutea*; *J. Nat. Prod.* **1984b**, *47* (6), 1003-1008.

- Fales H M, Warnhoff E W, Wildman W C: Alkaloids of the Amaryllidaceae. VI. The Action of Oxidizing Agents on Lycorine and Caranine; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5885-5890.
- Fales H M, Wildman W C; Alkaloids of the Amaryllidaceae. IX. On the Structure of Galanthine; *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4151-4153.
- Fales H M, Wildman W C: Interconversions of Amaryllidaceae Alkaloids by Sodium and Amyl Alcohol; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4395-4404.
- Fang S D, Wang L K, Hecht S M: Inhibitors of DNA Topoisomerase I Isolated from the Roots of *Zanthoxylum nitidum*; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5025-5027.
- Fleury F, Sukhanova A, Ianoul A, Devy J, Kudelina I, Duval O, Alix A J, Jardillier J C, Nabiev I: Molecular Determinants of Site-specific Inhibition of Human DNA Topoisomerase I by Fagaronine and Ethoxidine. Relation to DNA Binding; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (5), 3501-3509.
- Fiebig H H, Henss H, Arnold H, Löhr G W: Phase II Study of HECNU in Patients with Advanced Stomach and Large Bowel Cancer; *Contrib. Oncol.* **1989**, *37*, 157-162.
- Fortune J M, Velea L, Graves D E, Utsugi T, Yamada Y, Osheroff N: DNA Topoisomerases as Targets for the Anticancer Drug TAS-103: DNA Interactions and Topoisomerase Catalytic Inhibition; *Biochemistry* **1999**, *38* (47), 15580-15586.
- Fujii N, Yamashita Y, Mizukami T, Nakano H: Correlation between the Formation of Cleavable Complex with Topoisomerase I and Growth-inhibitory Activity for Saintopin-type Antibiotics; *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51* (2), 269-276.
- Fukuda M, Inomata M, Nishio K, Fukuoka K, Kanzawa F, Arioka H, Ishida T, Fukumoto H, Kurokawa H, Oka M, Saijo N: A Topoisomerase II Inhibitor, NK 109, Induces DNA Single- and Double-strand Breaks and Apoptosis; *Jpn. J. Cancer Res.* **1996**, *87*, 1086-1091.
- Gatto B, Sanders M M, Yu C, Wu H Y, Markhey D, LaVoie E J, Liu L F: Identification of Topoisomerase I as the Cytotoxic Target of the Protoberberine Alkaloid Coralyne; *Cancer Research* **1996**, *56*, 2795-2800.
- Gellert M, Mizuchi K, O'Dea M, Nash H: DNA Gyrase: An Enzyme that Introduces Superhelical Turns into DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73* (11), 3872-3876.

- Ghamande S A, Piver M S: Role of Salvage Chemotherapy with Topotecan and Cisplatin in Patients with Paclitaxel- and Platinum-resistant Recurrent Ovarian or Primary Peritoneal Cancer: A Phase II Pilot Study; *J. Surg. Oncol.* **1999**, *72* (3), 162-166.
- Ghosal S, Shanthy A, Kumar A, Kumar Y: Palmilycorine and Lycoriside: Acyloxy and Acylglucosyloxy Alkaloids from *Crinum asiaticum*; *Phytochemistry* **1985**, *24* (11), 2703-2706.
- Ghosal S, Kumar Y, Singh S K, Kumar A: Chemical Constituents of Amaryllidaceae. Part 21. Ungeremine and Criasbetaine, Two Antitumour Alkaloids from *Crinum asiaticum*; *J. Chem. Research (S)* **1986**, 112-113.
- Ghosal S, Singh S K, Kumar Y, Unnikrishnan S, Chattopadhyay U: The Role of Ungeremine in the Growth-inhibition and Cytotoxic Effects of Lycorine: Evidence and Speculation; *Planta Med.* **1988**, *54*, 114-116.
- Giaccone G: DNA Topoisomerases and Topoisomerase Inhibitors; *Path. Biol.* **1994**, *42* (4), 346-352.
- Gilman H, Eisch J: The Bromination of Phenanthridine; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 6379-6380.
- Gimenez-Arnau E, Missailidis S, Stevens M F: Antitumour Polycyclic Acridines. Part 4. Physico-chemical Studies on the Interactions between DNA and Novel Tetracyclic Acridine Derivatives; *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, *13* (5), 431-451.
- Giovanella B C, Stehlin J S, Wall M E, Wani M C, Nicholas A W, Liu L F, Silber R, Potmesil M: DNA Topoisomerase I-targeted Chemotherapy of Human Colon Cancer in Xenografts; *Science* **1989**, *246*, 1046-1048.
- Glazer A N, Rye H S: Stable Dye-DNA Intercalation Complexes as Reagents for High-sensitivity Fluorescence Detection; *Nature* **1992**, *359*, 859-861.
- Gonzalez C, Perez D, Guitian E, Castedo L: Synthesis of Lycorines by Intramolecular Aryne Cycloadditions; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6318-6326.
- Gonzalez C, Guitian E, Castedo L: A New Intramolecular Aryne Cycloaddition Approach to Lycorines; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (3), 405-406.
- Gottlieb J A, Guarino A M, Call J B, Oliverio V T, Block J B: Preliminary Pharmacologic and Clinical Evaluation of Camptothecin Sodium (NSC-100880); *Cancer Chemother. Rep.* **1970**, *54*, 461-470.

- Grem J L: 5-Fluoropyrimidines. In: Chabner B A, Longo D L (eds.): *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*; *Lippincot-Raven*, Philadelphia, New York **1996**, 149-212.
- Grotjahn D B, Vollhardt K P C: Cobalt-Mediated [2+2+2]Cycloaddition of Alkynes to the Enamine Double Bond: A Formal Total Synthesis of γ -Lycorane; *Synthesis* **1993**, 579-605.
- Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, Capranico G: Topoisomerase Poisoning Activity of Novel Disaccharide Anthracyclines; *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (1), 77-84.
- Harris C C: Chemical and Physical Cancerogenesis: Advances and Perspectives for the 1990's; *Cancer Research (suppl.)* **1991**, *51*, 5023-5044.
- Heron J F: Topotecan: An Oncologist's View; *Oncologist* **1998**, *3* (6), 390-402.
- Hertzberg R P, Caranfa M J, Hecht S M: On the Mechanism of Topoisomerase I Inhibition by Camptothecin: Evidence for Binding to an Enzyme-DNA Complex; *Biochemistry* **1989**, *28* (11), 4629-4638.
- Hortobagyi G N, Buzdar A U, Theriault R L, Valero V, Frye D, Booser D J, Holmes F A, Giralt S, Khouri I, Andersson B, Gajewski J L, Rondon G, Smith T L, Singletary S E, Ames F C, Sneige N, Strom E A, McNeese M D, Deisseroth A B, Champlin R E: Randomized Trial of High-dose Chemotherapy and Blood Cell Autografts for High-risk Primary Breast Carcinoma; *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92* (3), 225-233.
- Hoshino O, Ishizaki M, Kamei K, Taguchi M, Nagao T, Iwaoka K, Sawaki S, Umezawa B, Iitaka Y: Potential Intermediate, (\pm)-Di-*o*-acetyl-3 α -phenylselanyl-3,3a-dihydro-B-nor-6,7a-secolycorin-5-one for Synthesis of the *Amaryllidaceae* Alkaloid Lycorine: Formal and Total Syntheses of (\pm)-Lycorine; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 571-580.
- Hsiang Y-H, Hertzberg R P, Hecht S M, Liu L F: Camptothecin Induces Protein-linked Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I; *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14873-14878.
- Hsiang Y-H, Lihou M G, Liu L F: Arrest of Replication Forks by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin; *Cancer Research* **1989**, *49*, 5077-5082.
- Ieven M, Vlietinck A J, van den Berghe D A, Totte J: Plant Antiviral Agents. III. Isolation of Alkaloids from *Clivia miniata* REGEL (Amaryllidaceae); *J. Nat. Prod.* **1982**, *45* (5), 564-573.

- Ieven M, van den Berghe D A, Vlietinck A J: Plant Antiviral Agents. IV. Influence of Lycorine on Growth Pattern of Three Animal Viruses; *Planta Med.* **1983**, *49*, 109-114.
- Iida H, Aoyagi S, Kibayashi C: Photocyclisation of Enamido-ketones. Novel Synthesis of Lycorine-type Alkaloids; *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1974**, 499.
- Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K, Hirai M: L-Galactono- γ -lactone Dehydrogenase from Sweet Potato: Purification and cDNA Sequence Analysis; *Plant Cell Physiol.* **1998**, *39* (12), 1350-1358.
- Irie H, Nishitani Y, Sugita M, Uyeo S: A Total Synthesis of Dihydrolycorine, Hydrogenation Product of the Alkaloid Lycorine; *Chemical Communications* **1970**, 1313-1315.
- Issacs R J, Davies S L, Wells N J, Harris A: Topoisomerase II α and β as Therapy Targets in Breast Cancer; *Anti-Cancer Drugs* **1995**, *6*, 195-211.
- Janin Y L, Croisy A, Riou J-F, Bisagni E: Synthesis and Evaluation of New 6-Amino-Substituted Benzo[c]phenanthridine Derivatives; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3686-3692.
- Jarvinen T A, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola J J: Predictive Value of Topoisomerase II α and Other Prognostic Factors for Epirubicin Chemotherapy in Advanced Breast Cancer; *Br. J. Cancer* **1998**, *77* (12), 2267-2273.
- Jaxel C, Capranico G, Kerrigan D, Kohn K W, Pommier Y: Effect of Local DNA Sequence on Topoisomerase I Cleavage in the Presence or Absence of Camptothecin; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20418-20423.
- Jenkins J R, Ayton P, Jones T, Davies S L, Simmons D L, Harries A L, Sheer D, Hickson I D: Isolation of cDNA Clones Encoding the β Isoenzyme of Human DNA Topoisomerase II and Location of the Gene to Chromosome 3p24; *Nucleic Acid Research* **1992**, *20*, 5587-5592.
- Kabasawa T, Kobayashi F, Ekimoto H, Suzuki M, Hanaoka M: A Novel Benzo[c]phenanthridine Derivate. NK109, Is a Highly Active Anticancer and Topoisomerase II Inhibitor; *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1996**, *37*, 427.
- Kanzawa F, Nishio K, Ishida T, Fukuda M, Kurokawa H, Fukumoto H, Nomoto Y, Fukuoka K, Bojanowski K, Saijo N: Antitumour Activities of a New Benzo[c]phenanthridine Agent, 2,3-(Methylenedioxy)-5-methyl-7-hydroxy-8-methoxybenzo[c]phenanthridiniumhydrogensulphatedihydrate (NK109), against Several Drug-resistant Human Tumour Cell Lines; *Br. J. Cancer* **1997**, *76* (5), 571-581.
- Karrer P, Szabo L, Krishna H J V, Schwyzer R: N-Methyl-o-dihydro-phenanthridin und Umwandlungsprodukte; *Helv. Chim. Acta* **1950**, *33* (44), 294-300.

- Kaufmann S H, McLaughlin S J, Kastan M B, Liu L F, Karp J E, Burke P J: Topoisomerase II Levels During Granulocytic Maturation *in vitro* and *in vivo*; *Cancer Research* **1991**, *51* (13), 3534-3543.
- Kayser K, Kayser G, Andre S, Altiner M, Gabius H: Evaluation of Histochemical Anthracyclin Binding As Potential Prognostic Parameter in Small Cell Lung Cancer; *Oncol. Rep.* **1999**, *6* (5), 1153-1157.
- Kessar S V, Gopal R, Singh M: New Routes to Condensed Polynuclear Compounds – VII: Synthesis of Phenanthridines through a Novel Cyclisation Reaction of Haloanils; *Tetrahedron* **1973a**, *29* (1), 167-175.
- Kessar S V, Pal D, Singh M: New Routes to Condensed Polynuclear Compounds – VIII: Scope of Phenanthridine Synthesis through Cyclisation of Haloanils; *Tetrahedron* **1973b**, *29* (1), 177- 184.
- Kessar S V, Parkash N, Joshi G S: Azasteroids. Part X. Synthesis of 3,4-Dihydro-8-methoxybenzo[c]phenanthridin-1(2H)-one; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973c**, 1158-1160.
- Kessar S V: A Novel Route to Condensed Polynuclear Systems; Reality and Illusion of Benzyne Intermediacy; *Accounts of Chemical Research* **1978**, *11* (8), 283-288.
- Kessar S V, Gupta Y P, Balakrishnan P, Sawal K K, Mohammad T, Dutt M: Benzyne Cyclization Route to Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. Synthesis of Chelerythrine, Decarine, and Nitidine; *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (8), 1708-1713.
- Kohn K W: Beyond DNA Cross-Linking: History and Pospects of DNA-targeted Cancer Treatment – Fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture; *Cancer Research* **1996**, *56*, 5533-5546.
- Krogh S, Mortensen U H, Westergaard O, Bonven B J: Eukaryotic Topoisomerase I-DNA Interaction Is Stabilized by Helix Curvature; *Nucleid Acid Research* **1991**, *19*, 1235-1241.
- Krohn K, Carboo D, Puttfarcken U: 1-Phenyl-1,2-dihydrobenzazete aus N-Phenylbenzylaminen über Arin-Ringschluss; *Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 608-616.
- Kukhanova M, Victorova L, Krayevsky A: Peptidyltransferase Center of Ribosomes; *FEBS* **1983**, *160* (1,2), 129-133.
- Kushner B H, Cheung N K, Kramer K, Heller G, Jhanwar S C: Neuroblastoma and Treatment-related Myelodysplasia/Leukemia: The Memorial Sloan-Kettering Experience and a Literature Review; *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16* (12), 3880-3889.

- Langer S W, Schmidt G, Sorensen M, Sehested M, Jensen P B: Inhibitors of Topoisomerase II as pH-dependent Modulators of Etoposide-mediated Cytotoxicity; *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5* (10), 2899-2907.
- Larsen A K, Grondard L, Couprie J, Desoize B, Comoe L, Jardillier J C, Riou J F: The Antileukemic Alkaloid Fagaronine Is an Inhibitor of DNA Topoisomerases I and II; *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46* (8), 1403-1412.
- Lauk U, Dürst D Fischer W: Total Synthesis of the Amaryllidaceae Alkaloids Ungeremine; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (1), 65-68.
- Lhomme C, Fumoleau P, Fargeot P, Krakowski Y, Dieras V, Chauvergne J, Vennin P, Rebattu P, Roche H, Misset J L, Lentz M A, Van Glabbeke M, Matthieu-Boue A, Mignard D, Chevallier B: Results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer/Early Clinical Studies Group Phase II Trial of First-line Irinotecan in Patients with Advanced or Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Cervix; *J. Clinical Oncol.* **1999**, *17* (10), 3136-3142.
- Likhitwitayawuid K, Angerhofer C K, Chai H, Pezzuto J M, Cordell G A: Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Bulbs of *Crinum amabile*; *J. Nat. Prod.* **1993**, *56* (8), 1331-1338.
- Lin L-Z, Hu S-F, Chai H-B, Pengsuparp T, Pezzuto J M, Cordell G A, Ruangrungsi N: Lycorine Alkaloids from *Hymenocallis littoralis*; *Phytochemistry* **1995**, *40* (4), 1295-1298.
- Luzzio M J, Besterman J M, Emerson D L, Evans M G, Lackey K, Leitner P L, McIntyre G, Morton B, Myers P L, Peel M, Sisco J M, Sternbach D D, Tong W-Q, Truesdale A, Uehling D E, Vuong A, Yates J: Synthesis and Antitumor Activity of Novel Water Soluble Derivatives of Camptothecin as Specific Inhibitors of Topoisomerase I; *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (3), 395-401.
- Lynn R M, Bjornsti M A, Caron P R, Wang J C: Peptide Sequencing and Site-directed Mutagenesis Identify Tyrosine 727 as the Active Site Tyrosine of *Saccharomyces cerevesiae* DNA Topoisomerase I; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3559-3563.
- MacCallum J, Cummings J, Dixon J M, Miller W R: Concentrations of Tamoxifen and Its Major Metabolites in Hormone Responsive and Resistant Breast Tumours; *Br. J. Cancer* **2000**, *82* (10), 1629-1635.
- Mackay S P, Comoe L, Desoize B, Duval O, Jardillier J-C, Waigh R D: The Effect of 12-alkoxy Modification on the *in vitro* Antileukaemic Activity of N-Methyl-2,3,8,9-tetramethoxybenzo[c]phenanthridinium Salts; *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, *13*, 797-813.

- Makhey D, Gatto B, Yu C, Liu A, Liu L F, LaVoie E J: Coralyne and Related Compounds as Mammalian Topoisomerase I and Topoisomerase II Poisons; *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 781-791.
- Matsui S, Koida M, Hiramatsu Y: Pharmacological Studies on *Lycoris radiata* Alkaloids. 1. Pharmacological Action of Lycorine and Lycorenine; *Chem. Abstr.* **58**, 859 (**1962**).
- Matsui S: Pharmacological Studies on *Lycoris radiata* alkaloids. 3. The Mechanism of Antipyretic Action of Lycorine; *Chem. Abstr.* **60**, 7349 (**1964**).
- Meert A P, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, Rubesova E, Vermeylen P, Paesmans M, Sculier J P: Phase II and III Studies with New Drugs for Non-small Cell Lung Cancer: A Systematic Review of the Literature with a Methodology Quality Assessment; *Anticancer Research* **1999**, *19* (5C), 4379-4390.
- Meiras D P, Guitian E, Castedo L: Intramolecular Aryne Cycloaddition. A New Approach to Amaryllidaceae Alkaloids; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (16), 2331-2332.
- Messmer W M, Tin-Wa M, Fong H H, Bevelle C, Farnsworth N R, Abraham D J, Trojanek J: Fagaronine, a New Tumor Inhibitor Isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae); *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61* (11), 1858-1859.
- Moertel C G, Schutt A J, Reitemeier R J, Hahn R G: Phase II Study of Camptothecin (NSC-100880) in Treatment of Advanced Gastrointestinal Cancer; *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *56*, 95-101.
- Mondon A, Krohn K: Synthese des Narciprimins und verwandter Verbindungen; *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 3726-3747.
- Morgan A R, Lee J S, Pulleyblank D E, Murray N L, Evans D H: Review; Ethidium Fluorescence Assays. Part 1. Physicochemical Studies; *Nucleic Acid Research* **1979**, *7* (3), 547-569.
- Muggia F M, Creaven P J, Hansen H H, Cohen M H, Selawry O S: Phase I Clinical Trial of Weekly and Daily Treatment with Camptothecin (NSC-100880); *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *56*, 515-521.
- Nachtsheim C M, Frahm A W: Die EPC-Synthese arylsubstituierter cis-4aR,10bR- und cis-4aS-10bS-Octahydrophenanthridine; *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1989**, *322*, 199-206.
- Nakanishi T, Suzuki M, Mashiba A, Ishikawa K, Yotosuka T: Synthesis of NK109, an Anticancer Benzo[c]phenanthridine Alkaloid; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4235-4239.

- Nakanishi T, Suzuki M, Saimoto A, Kabasawa T: Structural Considerations of NK109, an Antitumor Benzo[c]phenanthridine Alkaloid; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 864-867.
- Nicolaou K C, Dai W-M, Guy R K: Chemie und Biologie von Taxol, *Angew. Chemie* **1994**, *106*, 38-69.
- Niederberger E: Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten; *Dissertation* **1998**, Universität Kaiserslautern.
- Ninomiya I, Naito T, Kiguchi T: Stereoselective Syntheses of trans-1,2,3,4,4a,5,6,10b-Octahydrophenanthridines: Photocyclization of Cyclo-Hexanone N-Benzoylenamines; *Tetrahedron Lett.* **1970**, *51*, 4451-4453.
- Ninomiya I, Kiguchi T, Naito T: Migration of *ortho*-Substituents in Enamide Photocyclisation; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974a**, 81-82.
- Ninomiya I: Application of Enamide Photocyclization to the Synthesis of Natural Products; *Heterocycles* **1974b**, *2 (1)*, 105-123.
- Ninomiya I, Yamamoto O, Kiguchi T, Naito T, Ishii H: Enamide Photocyclization in the Synthesis of Benzo[c]phenanthridine Alkaloids; *Heterocycles* **1977**, *6 (9/10)*, 1730-1735.
- Olugbade T A, Waigh R D: Synthetic Benzo[c]phenanthridines with Antileukaemic Activity in Mice; *Pharmaceutical Sciences* **1996**, *2*, 259-264.
- Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum; 3. Nachdruck der 15. überarbeiteten Auflage, *VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin* **1984**.
- Ormrod D, Spencer C M: Topotecan: a Review of Its Efficacy in Small Cell Lung Cancer; *Drugs* **1999**, *58 (3)*, 533-551.
- Oserhoff N: Eukaryotic Topoisomerase II. Characterisation of Enzyme Turn Over; *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9944-9950.
- Oserhoff N: Biochemical Basis for the Interaction of Type I and Type II Topoisomerases with DNA; *Pharmacological Therapy* **1989**, *41*, 223-241.
- Ostovic D, Han Lee I-S, Roberts R M G, Kreevog M M: Hydride Transfer and Oxyanion Addition Equilibria of NAD⁺ Analogues; *J. Org. Chem.* **1985**, *50 (22)*, 4206-4211.

- Park Y-T, Lee I-H, Kim Y-H: The Photochemical Reactions of the Halogenated N-Benzylanilines. Mechanism of the Reactions; *J. Heterocyclic Chem.* **1994**, *31*, 1625-1629.
- Perez D, Bures G, Guitian E, Castedo L: Synthesis of Antitumor Lycorines by Intramolecular Diels-Alder Reaction; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1650-1654.
- Pilar M, Tato V, Castedo L, Riguera R: New Alkaloids from *Pancreatum maritimum* L.; *Heterocycles* **1988**, *27* (12), 2833-2838.
- Pommier Y, Leteurtre F, Fesen M R, Fujimori A, Bertrand R, Solary E, Kohlhagen G, Kohn K W: Cellular Determinants of Sensitivity and Resistance to DNA Topoisomerase Inhibitors; *Cancer Investigation* **1994**, *12* (5), 530-542.
- Pommier Y: Diversity of Topoisomerase I and Inhibitors; *Biochimie* **1998a**, *80* (3), 255-270.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D: Mechanism of Action of Eukaryotic DNA Topoisomerase I and Drugs Targeted to the Enzyme; *Biochimica et Biophysica Acta* **1998b**, *1400*, 83-106.
- Potmesil M, Hsiang Y-H, Liu L F, Bank B, Grossberg H, Kirschenbaum S, Forlenzar T J, Penzinger A, Kanganis D, Knowles D, Traganos F, Silber R: Resistance of Human Leukemic and Normal Lymphocytes to Drug-induced DNA Cleavage and Low Levels of DNA Topoisomerase II; *Cancer Research* **1988**, *48*, 3537-3543.
- Potmesil M: Camptothecin: From Bench Research to Hospital Wards; *Cancer Research* **1994**, *54*, 1431-1439.
- Prabhakar S, Lobo A M, Tavares M R: Boron Complexes as Control Synthons in Photocyclisations: An Improved Phenanthridine Synthesis; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 884-885.
- Rahman M F, May E L: A Simple Convenient Synthesis of trans-1,2,3,4,4a,5,6,10b-Octahydrophenanthridine; *J. Heterocyclic Chem.* **1976**, *13*, 1329-1331.
- Reed E, Dabhilkar M, Chabner B A: Plantinimum Analouges. In. Chabner B A, Longo D L (eds.): *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*; *Lippincot-Raven*, Philadelphia, New York **1996**, 357-378.
- Rosa A M, Lobo A M, Branco P S, Prabhakar S, Pereira A M D L: Synthesis of Phenanthridines by Radical C_{aryl}-C_{aryl} Coupling; *Tetrahedron* **1997a**, *53* (1), 269-284.

- Rosa A M, Lobo A M, Branco P S, Prabhakar S: The Chemistry and Reactivity of Aryl Radicals – The C-C bond Formation from o-Bromobenzylphenylethers with Tin Hydride and Azobisisobutyronitrile; *Tetrahedron* **1997b**, 53 (1), 285-298.
- Rosa A M, Lobo A M, Branco P S, Prabhakar S, Sa-da-Costa M: New Syntheses of the *Amaryllidaceae* Alkaloids Vasconine, Assoanine, Oxoassoanine, Pratosine and Ismine by Radical Cyclisation; *Tetrahedron* **1997c**, 53 (1), 299-306.
- Rossi G, Donisi A, Casari S, Re A, Cadeo G, Carosi G: The International Prognostic Index Can Be Used as a Guide to Treatment Decisions Regarding Patients with Human Immunodeficiency Virus-related Systemic non-Hodgkin Lymphoma; *Cancer* **1999**, 86 (11), 2391-2397.
- Rothenberg M L, Blanke C D: Topoisomerase I Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer; *Semin. Oncol.* **1999**, 26 (6), 632-639.
- Rubinstein L, Shoemaker R, Paul K, Simon R, Tosini S, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Boyd M: Comparison of *in vitro* Anticancer-drug-screening Data Generated with a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1113-1118.
- Sanders M M, Liu A A, Li T K, Wu H Y, Desai S D, Mao Y, Rubin E H, LaVoie E J, Makhey D, Liu L F: Selective Cytotoxicity of Topoisomerase-directed Protoberberines against Glioblastoma Cells; *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56 (9), 1157-1166.
- Sandler A, van Oosterom A T: Irinotecan in Cancers of the Lung and Cervix; *Anti-Cancer Drugs* **1999**, 10 Suppl. 1, 13-17.
- Schultz A G, Holoboski M A, Smyth M S: The First Asymmetric Total Syntheses of (+)-Lycorine and (+)-1-Deoxylycorine; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (26), 6210-6219.
- Shekan P, Storeng P, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D; Warren J, Bokesch H, Kenney S, Boyd M: New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-drug Screening; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107-1112.
- Shimamoto K, Isozaki T: The Emetic Action of Lycorine Hydrochloride; *Chem. Abstr.* 53, 1544 (**1959**).
- Siddiqui M A, Snieckus V: Concise Syntheses of the *Amaryllidaceae* Alkaloids Ungeremine and Hippadine via the Suzuki Aryl-Aryl Cross Coupling Reaction; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (11), 1523-1526.

- Stephenson G R, Palotai I M, Ross W J, Tupper D E: An Organometallic Approach for the Synthesis of Lycorine: Substituent Tolerance in the Arylation Step; *Synlett* **1991**, 586-588.
- Strumberg D, Nitiss J L, Dong J, Kohn K W, Pommier Y: Molecular Analysis of Yeast and Human Type II Topoisomerases. Enzyme-DNA and Drug Interactions; *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (40), 28246-28255.
- Suau R, Rico R, Garcia A I, Gomez A I: New Amaryllidaceae Alkaloids from *Narcissus papyraceus* KER-GAWLER; *Heterocycles* **1990**, 31 (3), 517-522.
- Sullivan D M, Latham M D, Ross W E: Proliferation-dependent Topoisomerase II Content as a Determinant of Antineoplastic Drug Action in Human, Mouse and Chinese Hamster Ovary Cells; *Cancer Research* **1987**, 47, 3973-3979.
- Suzuki K, Sekimoto J, Siddique T, Kamiya A, Uyeda M: Macrostatin, a Novel Macromolecular Inhibitor of Topoisomerases Produced by *Streptomyces Avermitilis* No. C-127; *J. Enzyme Inhib.* **1998**, 14 (1), 69-83.
- Takao N, Kamigauchi M, Sugiura M, Ninomiya I, Miyata O, Naito T: The Structure of the Alkaloid Macarpine; *Heterocycles* **1981**, 16 (2), 221-225.
- Takeda K, Kotera K, Mizukami S: A Partial Synthesis of Caranine; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2562-2567.
- Tang W, Eisenbrand G: Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine; *Springer-Verlag* **1992**, Kap. 33, 239-261.
- Thompson C M, Docter S: Lewis Acid Promoted Photocyclization of Arylimines. Studies Directed towards the Synthesis of Pentacyclic Natural Products; *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (41), 5213-5216.
- Tilak B D, Gogte V N, Jindal S L: Synthesis of Sulphur Heterocyclics: Part IX – NMR Spectra of Polycyclic Sulphur Compounds; *Indian J. Chem.* **1969**, 7, 741-743.
- Titman J J, Neuhaus D, Keeler J: Measurement of Long-range Heteronuclear Coupling Constants; *J. Magnetic Resonance* **1989**, 85, 111-131.
- Tsai-Pflugfelder M, Liu L F, Liu A A, Tewey K M, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce C M, Wang J C: Cloning and Sequencing of cDNA Encoding Human DNA Topoisomerase II and Localisation of the Gen to Chromosome Region 17q21-22: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7177-7181.

- Tsuda Y, Sano T, Taga J, Isobe K, Toda J, Irie H, Tanaka H, Takagi S, Yamaki M, Murata M: Synthesis of the Amaryllidaceae Alkaloid, Lycorine; *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1975**, 933-934.
- Van Binst G, Tourwe D, De Cock E: Benzo- and Indoloquinolizines X-Application of Carbon-13 n.m.r. to the Stereochemistry of the 4b,5,6,7,8,8a,10,11,16,16b-Decahydrodibenz[f,h]indolo[2,3-a]quinolizine Isomers; *Organic Magnetic Resonance* **1976**, 8, 618-622.
- Voet D, Voet J G: Biochemie; *VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio* **1994**.
- Vrijzen R, Vanden Berghe D A, Vietinck J, Boeye A: Lycorine: A Eukaryotic Termination Inhibitor?; *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (2), 505-507.
- Wall M E, Wani M C, Cook C E, Palmer K H, McPhail A T, Sim G A: Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloid Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3888-3890.
- Wang J C: Interaction between DNA and an Escherichia Coli Protein Omega; *J. Mol. Biol.* **1971**, 55 (3), 523-533.
- Wang J C: DNA Topoisomerases; *Annual Reviews in Biochemistry* **1985**, 54, 665-697.
- Wang L-K, Johnson R K, Hecht S M: Inhibition of Topoisomerase I Function by Nitidine and Fagaronine; *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 813-818.
- Wang H, Gupta R, Lown W: Synthesis, DNA Binding, Sequence Preference and Biological Evaluation of Minor Groove Selective N-1-Alkoxyalkyl-bis-benzimidazoles; *Anti-Cancer Drug Design* **1994**, 9, 153-180.
- Wani M C, Nicholas A W, Manikumar G, Wall M E: Plant Antitumor Agents. 25. Total Synthesis and Antileukemic Activity of Ring A Substituted Camptothecin Analogues. Structure-Activity Correlations; *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1774-1779.
- Webb C D, Latham M D, Lock R B, Sullivan D M: Attenuated Topoisomerase II Content Directly Correlates with a Low Level of Drug Resistance in a Chinese Ovary Cell Line; *Cancer Research* **1991**, 51, 6543-6549.
- Yang X L, Wang A H: Structural Studies of Atom-specific Anticancer Drugs Acting on DNA; *Pharmacol. Ther.* **1999**, 83 (3), 181-215.

8 Anhang

8.1 ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum von Phenanthridin (31)

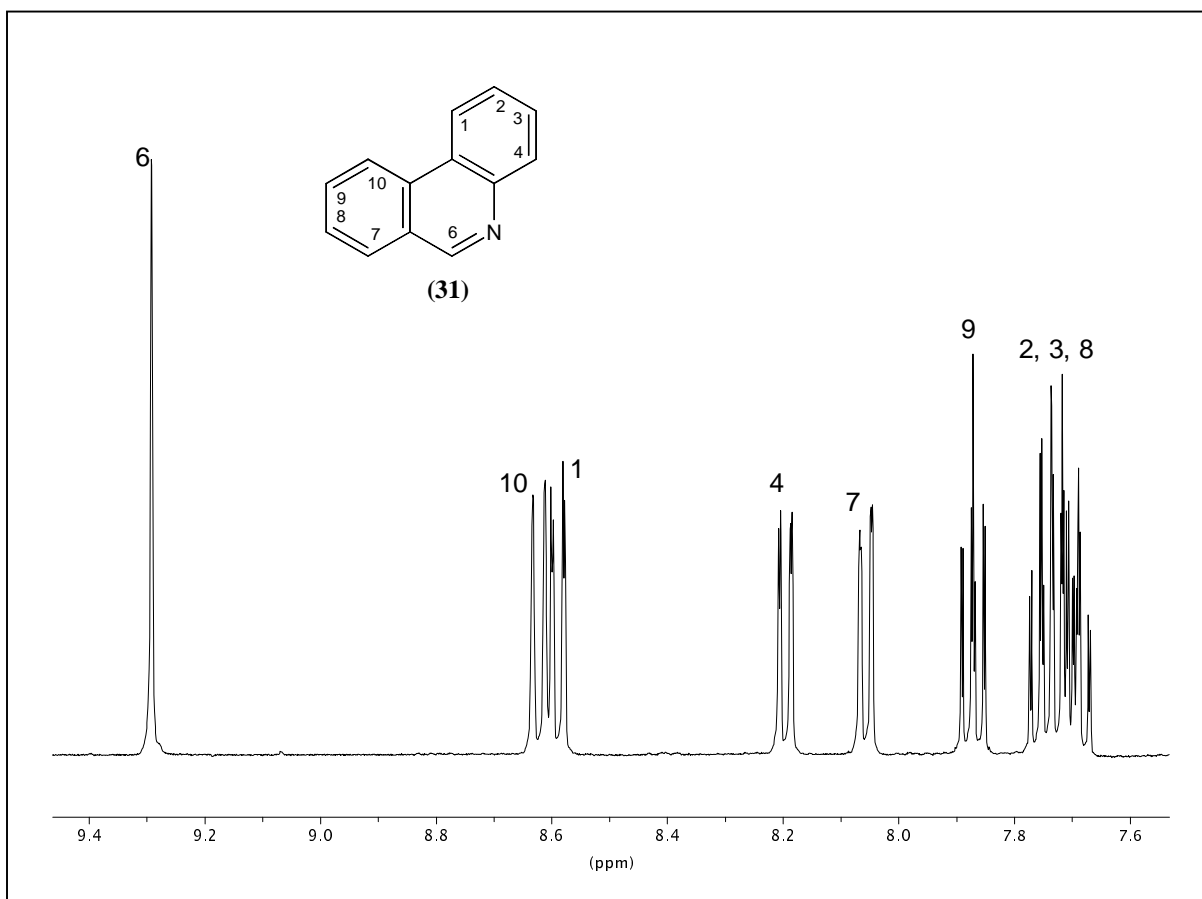


Abb. 57: ^1H -NMR-Spektrum von Phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 9,3-7,6 ppm

δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
9,29	s, 1 H	C-6H
8,62	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$	C-10H
8,59	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$	C-1H
8,20	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$	C-4H
8,06	d, 1 H; $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$	C-7H
7,87	pt, 1 H	C-9H
7,78 – 7,66	m, 3 H	C-2H, C-3H, C-8H

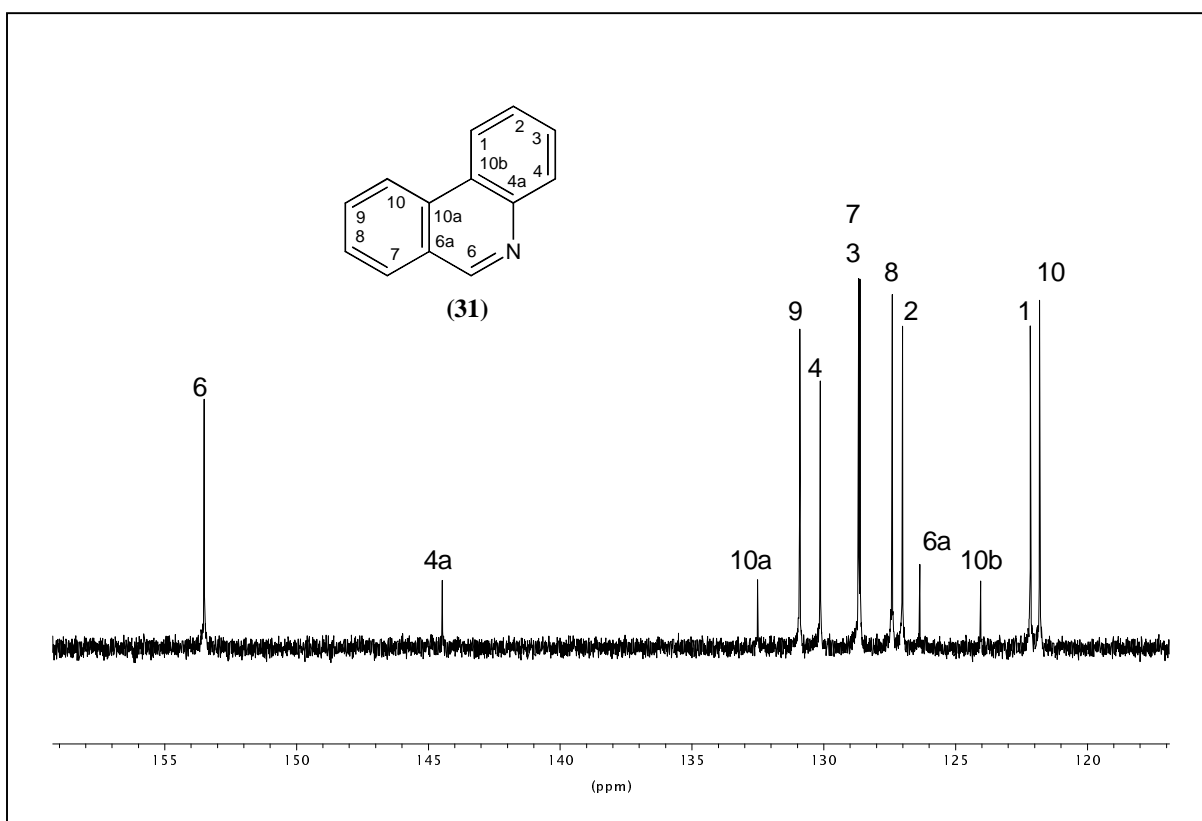


Abb. 58: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von Phenanthridin in CDCl_3 , Bereich von 159,0-117,0 ppm

δ in ppm	Signalform; Kopplung [Hz]	Zuordnung
153,5	d; $^1J_{\text{C,H}} = 173$	C-6
144,5	s	C-4a
132,5	s	C-10a
130,9	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-9
130,1	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-4
128,7	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-3
128,6	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-7
127,4	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-8
127,0	d; $^1J_{\text{C,H}} = 161$	C-2
126,3	s	C-6a
124,0	s	C-10b
122,1	d; $^1J_{\text{C,H}} = 158$	C-1
121,8	d; $^1J_{\text{C,H}} = 158$	C-10

8.2 Ergebnisse der biologischen Tests

8.2.1 Wachstumshemmende Wirkung

Tabelle 5: Wachstumshemmende Wirkung von Alkaloiden, Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten, Sulforhodamin-B-Assay, 72 Stunden Inkubation, IC₅₀-Wert [μ M]

Substanz	LXFL529L	GXF251L	CXF94L
Lycorin	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3
Lycobetainchlorid	1,5 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,7 ± 0,1
Lycobetainacetat	1,5 ± 0,3	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2
Phenanthridin	81 ± 1	171	151
N-Methyl-phenanthridinium-methansulfonat	26 ± 3	22 ± 4	37 ± 2
2-Methoxyphenanthridin	87 ± 3	174	121
2-Hydroxyphenanthridin	34 ± 2	42 ± 3	37 ± 3
2-Bromphenanthridin	*nicht bestimmt	*nicht bestimmt	*nicht bestimmt
2,3-Methylenedioxyphenanthridin	53 ± 3	109	111
8,9-Dimethoxyphenanthridin	139	173	46 ± 2
Benzo[c]phenanthridin	37 ± 3	134	43 ± 4
1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin	42 ± 4	88 ± 3	17 ± 2
N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin	50 ± 1	42 ± 2	47 ± 2
N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin	113	67 ± 1	159
7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien	144	143	>200

*nicht bestimmt: IC₅₀-Wert nicht ermittelbar, da die Substanz bei 50 μ M ausfällt

8.2.2 DNA-Interaktion

Tabelle 6: Hinweise auf DNA-Intercalation im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, Hinweise auf Bindung an die kleine Furche der DNA im Hoechstfarbstoff-H33258-Verdrängungsassay, EC₅₀-Wert [μ M]

Substanz	Ethidiumbromid-Verdrängung	Hoechstfarbstoff-H33258-Verdrängung
Lycorin	#kein Effekt	#kein Effekt
Lycobetainchlorid	12,5 \pm 1	0,5 \pm 0,1
Phenanthridin	#kein Effekt	>100
N-Methyl-phenanthridiniummethansulfonat	>100	4,0 \pm 0,2
2-Methoxyphenanthridin	*nicht nachweisbar	15,5 \pm 3
2-Hydroxyphenanthridin	#kein Effekt	#kein Effekt
2-Bromphenanthridin	*nicht nachweisbar	*nicht nachweisbar
2,3-Methylenedioxyphenanthridin	*nicht nachweisbar	8,8 \pm 1
8,9-Dimethoxyphenanthridin	#kein Effekt	#kein Effekt
Benzo[c]phenanthridin	*nicht nachweisbar	12,6 \pm 2
1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[c]phenanthridin	*nicht nachweisbar	*nicht nachweisbar
N-(2-Brombenzyl)-1-naphthylamin	*nicht nachweisbar	15,8 \pm 4
N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-2-bromanilin	*nicht nachweisbar	*nicht nachweisbar
7-Cyclohexyl-7-aza-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien	#kein Effekt	>100

#kein Effekt bis 200 μ M

*nicht nachweisbar: EC₅₀-Wert nicht ermittelbar, da die Substanzen bei 25 μ M ausfallen

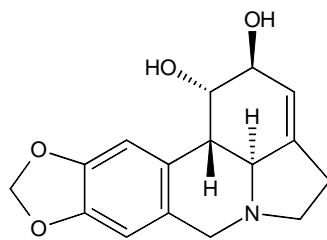
8.3 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Niederbeger E, Eisenbrand G, Fiebig H H, Roth T, **Schulte K**, Spitzmüller B, Tang W C, Marko D: Traditional Chinese Drugs Revisited: Lycobetaine, an Alkaloid from *Amaryllidaceae*, Is a Potent Inhibitor of Topoisomerase I; Neue molekulare Targets, Substanzen und Konzepte in Onkologie und Hämatologie, Symposium der APOH, AWO und AIO, Freiburg, 2-4 Juli 1998.

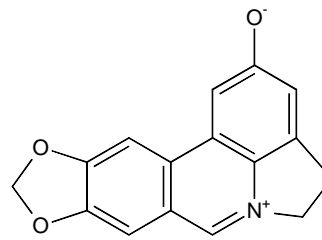
Niederbeger E, Roth T, **Schulte K**, Tang W C, Genzlinger A, Zankl H, Böge F, Fiebig H H, Eisenbrand G, Marko D: Lycobetaine, an Alkaloid from *Amaryllidaceae*, Potently Inhibits Topoisomerase I and II and Induces Growth Inhibition in Tumor Cells, *in vitro* and *in vivo*; in Vorbereitung

Synthese von Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivaten und Untersuchungen auf ihre biologische Wirkung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das biologisch aktive Alkaloid Lycorin aus Pflanzenmaterial isoliert. Durch Oxidation von Lycorin konnte das biologisch ebenfalls wirksame Lycobetain (Ungeremine) dargestellt werden. Zur Identifizierung der für die biologischen Wirkungen wesentlichen strukturellen Elemente dieser Substanzen, wurden verschiedene Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate synthetisiert und auf ihre cytotoxische Wirkung untersucht.



Lycorin



Lycobetain

Die biologische Wirkung der synthetisierten Substanzen wurde mittels Sulforhodamin-B-Assay, Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und dem Kompetitionsassay mit Hoechstfarbstoff H33258 untersucht. Die wachstumshemmende Wirkung der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate war im Vergleich zu Lycorin ($\sim 2 \mu\text{M}$) und Lycobetain ($\sim 3 \mu\text{M}$) deutlich niedriger und lag bei allen Substanzen über $10 \mu\text{M}$. Auch bei den Ergebnissen zur DNA-Interaktion zeigte sich, dass keine der Phenanthridin- und Benzo[c]phenanthridin-Derivate im Ethidiumbromid-Verdrängungsassay einen ED_{50} -Wert kleiner als $20 \mu\text{M}$ (Lycobetain: $\text{ED}_{50} = 13 \mu\text{M}$) bzw. im Kompetitionsassay mit H33258 einen ED_{50} -Wert kleiner als $1 \mu\text{M}$ (Lycobetain: $\text{ED}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) besaßen.