

Guanidinium-modifizierte Phthalocyanine als Fluoreszenzsonden mit hoher G-Quadruplex-Affinität und als Transkriptionsregulatoren**

Jawad Alzeer, Balayeshwanth R. Vummidi, Phillip J. C. Roth und Nathan W. Luedtke*

G-Quadruplexstrukturen gehören zu den interessantesten und bestcharakterisierten DNA-Faltungsmotiven.^[1] DNA-Sequenzen, die in vitro stabile G-Quadruplexmotive bilden können, wurden mit einer Vielzahl an In-vivo-Funktionen in Verbindung gebracht, unter anderem mit der Regulation der Telomerenstabilität,^[2] der Regulation von Promotoren^[3] sowie der viralen Integration und Rekombination.^[4] Viele Gruppen haben kleine Moleküle als Liganden für die G-Quadruplexstruktur entwickelt, die durch Unterbinden der Telomeren- und/oder Promotorenaktivität das Wachstum von Krebs blockieren sollen.^[5] Nur ein paar Gruppen haben G-Quadruplex-Liganden mit nützlichen Fluoreszenzeigenschaften beschrieben.^[6] Trotz des bemerkenswerten Fortschritts in diesem Bereich blieben G-Quadruplex-Liganden mit einer wirklich hohen Affinität ($K_d \leq 2 \text{ nm}$) und Spezifität (>5000fach niedrigere Affinität zu doppelsträngiger DNA) rar.^[5,6] Eine derart starke und selektive Bindung an G-Quadruplexe könnte jedoch notwendig sein, damit die entsprechenden Liganden erfolgreich mit zellulären Proteinen, die G-reiche DNA und RNA mit K_d -Werten im mittleren pm-Bereich binden, konkurrieren können.^[7]

Wir sind an G-Quadruplex-Liganden interessiert, die neben einer hohen Affinität noch eine duale Funktion zeigen: Sie sollten sowohl „Einschalt“-Photolumineszenz bei der Bindung an die Ziel-DNA zeigen als auch die Genexpression regulieren können.^[3,6] Diese voneinander unabhängigen Funktionen könnten genutzt werden, um mögliche Zusammenhänge zwischen G-Quadruplexstrukturen und ihren Funktionen in vivo zu untersuchen. Unsere Herangehensweise ist der Entwurf, die Synthese und die Evaluierung einer neuen Familie von Porphyrazinderivaten, bei der die DNA-Spezifität, die Aufnahme in Zellen und die photophysikalischen Eigenschaften des Phthalocyaningerüsts durch gleichzeitige Variation von Metallzentrum und Guanidiniumgruppen reguliert werden können.

Strukturselektive G-Quadruplex-Liganden zeigen oft eine ausgeprägte strukturelle und elektronische Komple-

mentarität zu den gestapelten G-Tetraden der G-Quadruplex-DNAs.^[5] So ist die G-Quadruplex-Spezifität von pyridinium- und ammoniumhaltigen Porphyrazinderivaten deutlich höher als die des breit untersuchten, allerdings unselektiven Liganden 5,10,15,20-Tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl)porphin (TMPyP4).^[8,9] Sie binden mit mäßiger Affinität an G-Quadruplex-DNA (K_d -Werte im Bereich 100–200 nm), doch wurde nichts bezüglich ihrer Aufnahme in Zellen, ihrer Lumineszenz oder der Regulation der Transkription durch sie berichtet.^[8]

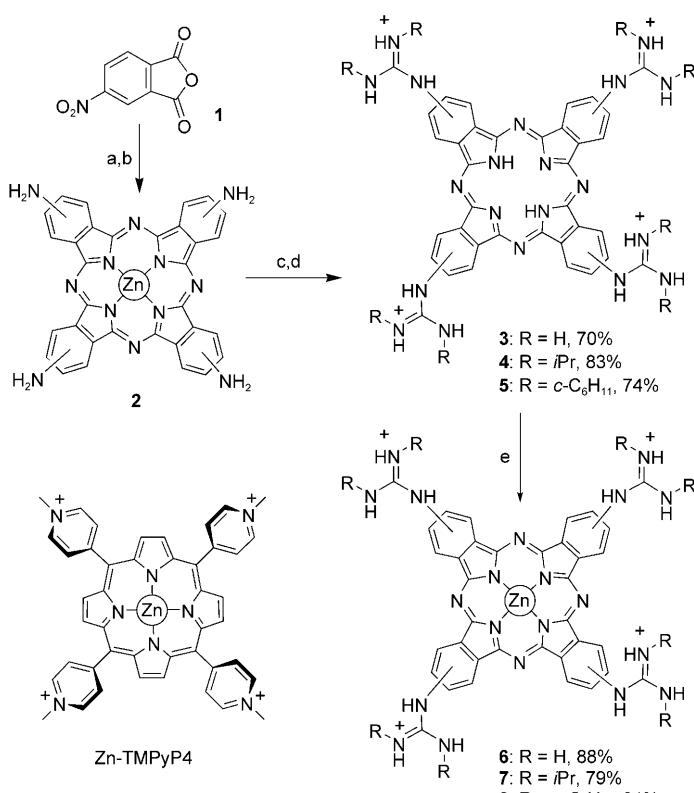
Unser primäres Interesse gilt kationischen Phthalocyaninen mit Guanidiniumgruppen, da guanidiniumhaltige Moleküle besser in Zellen aufgenommen werden und eine höhere RNA/DNA-Affinität aufweisen als die analogen ammoniumhaltigen Verbindungen.^[10] Daher synthetisierten wir eine kleine Familie von Guanidinophthalocyaninen (GPcs), indem wir ein Tetraaminozinkphthalocyanin **2** bei 120 °C in einer ionischen Flüssigkeit (Pyridin/Pyridinhydrochlorid) mit verschiedenen Carbodiimiden behandelten (Schema 1).^[11] Unter diesen Bedingungen wurde das Zink sowohl aus dem Edukt als auch den Produkten entfernt, wodurch die metallfreien GPcs **3–5** erhalten wurden (Schema 1). Diese Reaktion eröffnet einen neuen Zugang zu metallfreien Phthalocyaninen.^[11] Wir waren jedoch an den zinkhaltigen GPcs interessiert, da über lumineszierende zinkhaltige Phthalocyanine mit guter Aufnahme in Zellen berichtet worden war.^[12] Die metallfreien GPcs **3–5** wurden deshalb zusammen mit Zinkchlorid erhitzt, was die entsprechenden Guanidiniozink-phthalocyanine **6–8** lieferte (Schema 1). Diese Produkte wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, hochauflösender Massenspektrometrie und analytischer HPLC charakterisiert.^[13] Die Verbindungen **6–8** wurden als reine Regioisomere isoliert, was in Einklang mit einem früheren Bericht ist, nach dem die Cyclotetramerisierung von **1** an einem Zinktemplat regioselektiv verläuft.^[14,15] Unerwarteterweise waren nur das Tetrakis(diisopropylguanidino)zinkphthalocyanin „Zn-DIGP“ (**7**) und sein metallfreies Analogon **4** gut wasierlöslich. Daher wurden nur diese beiden Verbindungen weiter untersucht.

Um die G-Quadruplex-Affinität von Zn-DIGP (**7**) zu testen, nutzten wir zwei direkte und komplementäre fluoreszenzbasierte Methoden mit einer DNA, die von der repetitiven menschlichen Telomersequenz („Htelo“) oder vom onkogenen c-Myc-Promotor („c-Myc“) abgeleitet war.^[16] Um die Spezifität der Interaktionen zu ergründen, untersuchten wir auch eine nichtgefaltete Variante von Htelo („Htelo-Mut“) sowie die C-reichen Komplementärsequenzen von c-Myc („c-Myc-C“) und Htelo („Htelo-C“), die i-Motive bilden können.^[17]

[*] Dr. J. Alzeer, B. R. Vummidi, P. J. C. Roth, Prof. Dr. N. W. Luedtke
Institut für Organische Chemie, Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 446-356-891
E-Mail: luedtke@oci.uzh.ch

[**] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds (Förder-Nr. 116868), die Dr. Helmut Legerlotz-Stiftung und die Universität Zürich unterstützt. Wir danken dem Zentrum für Mikroskopie der Universität Zürich, dem Institut für Molekulare Krebsforschung sowie Giulio Fiaschetti und Prof. Alexandre Arcaro vom Kinderspital Zürich für die technische Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903685> zu finden.



Um die Stöchiometrie der Zn-DIGP/Oligonukleotid-Bindung zu bestimmen, wurden Absorptionsspektren einer 1 μM Zn-DIGP-Lösung als Funktion der DNA-Konzentration gemessen (Abbildung 1 A und Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).^[13] Diese Experimente wurden bei Zn-DIGP-Konzentrationen durchgeführt, die deutlich höher als die K_d -Werte für die Zn-DIGP/G-Quadruplex-Bindung waren, und ergaben Stöchiometrien von 2:1 für Zn-DIGP/c-Myc, 1:1 für Zn-DIGP/Htelo und 4:1 für Zn-DIGP/Htelo-Mut.^[13]

Zn-DIGP zeigte bei der Bindung an Nucleinsäuren tatsächlich das erwünschte Einschalten der Fluoreszenz: Bei Sättigung mit DNA oder RNA wurde ein mindestens 200facher Anstieg der Photolumineszenz von Zn-DIGP beobachtet (Abbildung 1 B, C und Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).^[13] Die Quantenausbeute der resultierenden Komplexe in Wasser betrug beim Vergleich mit Cy5 und Cresylviolett als Fluoreszenzstandards^[18] 0.06 ± 0.02 . Diese mäßigen Quantenausbeuten werden aber durch die hohen molaren Absorptionskoeffizienten der Zn-DIGP-Komplexe kompensiert ($\varepsilon = 30000\text{--}130000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, Abbildung 1 A).

Fluoreszenzdaten, die mit einer 10 nm Lösung von Zn-DIGP gesammelt (Abbildung 1 B) und auf der Grundlage eines unabhängigen 2:1-Bindungsmodells analysiert wurden,^[9a] lieferten eine scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d für das Zn-DIGP/c-Myc-System von $\leq 2 \text{ nm}$ für jede Bindungsstelle. Eine Einschränkung bei der Interpretation dieser Daten muss jedoch genannt werden: Die für die direkte Detektion verwendete Probenkonzentration (10 nm) war deutlich höher als die K_d -Werte, sodass Selbstassoziation von Zn-DIGP zu einer Unterschätzung der DNA-Bindungsaffinität für alle genannten Bindungsinteraktionen geführt haben kann. Ein 1:1-Bindungsmodell lieferte für Htelo einen K_d -Wert von $(6 \pm 4) \text{ nM}$, während das mutierte Konstrukt Htelo-Mut mit einem K_d -Wert von $(60 \pm 10) \text{ nM}$ band (Abbildung 1 B). G-Quadruplexe, die von c-kit (Stammzellfaktor-Rezeptor)-, VEGF (Gefäßendothel-Wachstumsfaktor)- und Insulinpromotoren stammen, banden mit K_d -Werten von ungefähr 10^{-8} M ebenso an Zn-DIGP, während die C-reichen Sequenzen c-Myc-C und Htelo-C Zn-DIGP mit einer ca. 1000fach geringeren Affinität banden (Abbildungen 1 B, C).^[16]

Um die G-Quadruplex-Spezifität von Zn-DIGP relativ zu der heterogener, von Zellen stammender Nucleinsäuren zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzintensitäten von 10 nm Zn-DIGP-Lösungen mittels Titration einer tRNA-Mischung oder von Kalbsleber(CT)-DNA gemessen.^[19] Ein Vergleich dieser Bindungsisothermen in einem logarithmischen Maßstab (Abbildung 1 C) enthielt eine hochselektive G-Quadruplex-Bindung. Diese

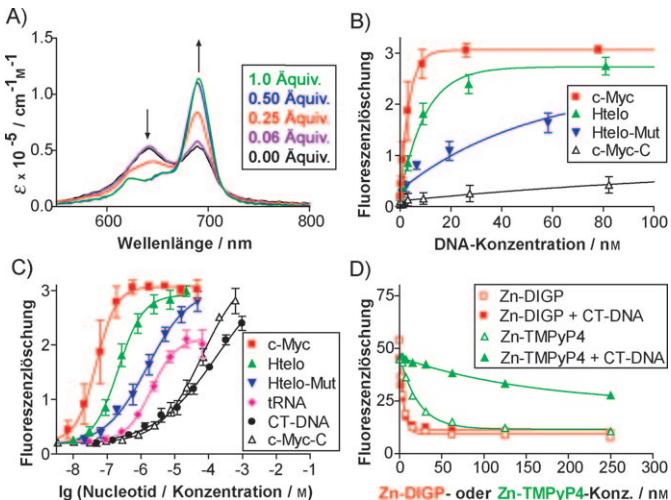


Abbildung 1. A) Absorptionsspektren einer 1 μM Lösung von Zn-DIGP als Funktion der Konzentration (0–1 Äquiv.) einer bereits gefalteten 22 bp langen Quadruplex-DNA des c-Myc-Promotors.^[16] B, C) Fluoreszenzlösung einer 10 nm Lösung von Zn-DIGP ($\lambda_{\text{Anr.}} = 620$, $\lambda_{\text{Emm.}} = 705 \text{ nm}$) bei Zugabe einer Nucleinsäure.^[13] D) Fluoreszenzlösung einer 10 nm Lösung einer endständig mit 5'-Fluorescein markierten c-Myc-DNA ($\lambda_{\text{Anr.}} = 495$, $\lambda_{\text{Emm.}} = 520 \text{ nm}$) bei der Titration von Zn-DIGP oder Zn-TMPyP4 in An- oder Abwesenheit von 220 μM CT-DNA (Nucleotidkonzentration). Alle Proben wurden in einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM KCl und 0.5 mM EDTA („TKE“-Puffer) vorbereitet und analysiert. Die Fehlerbalken in (B) und (C) deuten die Standardabweichung an.

Auftragung ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen oligomeren und polymeren Nucleinsäuren verschiedener Länge und gibt sowohl die Zahl der Bindungsstellen als auch die relativen Affinitäten wieder. Unter der Annahme, dass Größe und Frequenz von Bindungsstellen in Nucleotiden ungefähr gleich sind,^[19] deuten diese Daten darauf hin, dass Zn-DIGP mit mindestens 100- respektive 5000fach höherer Affinität an den c-Myc-Quadruplex als an tRNA bzw. CT-DNA bindet (Abbildung 1 C).

Die beeindruckende G-Quadruplex-Affinität und -Spezifität von Zn-DIGP wurde durch Messung der Fluoreszenzlösung einer 5'-Fluorescein-markierten c-Myc-DNA durch Titration von Zn-DIGP in An- oder Abwesenheit eines 1000fachen Nucleotidüberschusses von CT-DNA bestätigt (Abbildung 1 D). Als Kontrolle wurde auch das bekannte kationische Porphyrin Zn-TMPyP4 (Schema 1) untersucht. In Einklang mit dessen unspezifischer Bindung an Nucleinsäuren^[20] trat hier in Gegenwart des Kompetitors CT-DNA eine Abnahme der scheinbaren Bindungsaaffinität auf ein Zehntel auf. Bei Zn-DIGP wurde dagegen auch in Anwesenheit des 1000fachen Überschusses an CT-DNA noch immer eine hohe scheinbare Affinität ($K_d \leq 2 \text{ nm}$) gemessen (Abbildung 1 D).

Eine empfindliche Detektion der Aufnahme von Zn-DIGP in Zellen kann mit Standardabbildungssystemen, die mit Cy5 kompatibel sind, erreicht werden, wie sowohl Breitfeld- als auch konfokale Fluoreszenzmikroskopieexperimente zeigten. Dank seiner profluoreszierenden Eigenschaften kann Zn-DIGP einfach einer Zellprobe zugegeben, inkubiert und abgebildet werden; kein Waschen der Zellen war nötig, auch wenn das Medium mit 10% FCS (fötales Kälberserum) angereichert war. Aufnahme von Zn-DIGP wurde in allen von uns bisher untersuchten lebenden und fixierten Zellen beobachtet, einschließlich HeLa, MCF7, B16F10, SH-SY5Y, *E. coli*-BL-21 und SK-Mel-28.^[13] Unter allen Bedingungen und in allen getesteten Zelllinien wurde in Übereinstimmung mit Färbungsexperimenten mit Hoechst 33342 (Abbildung 2 A-C und Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen) wenig bis gar keine nichtspezifische Anfärbung der Duplex-DNA beobachtet.^[13]

Das metallfreie Guanidinophthalocyanin DIGP (**4**) zeigte eine ähnliche G-Quadruplex-Affinität, eine niedrigere Spezifität (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen)^[13] und eine deutlich intensivere Kernfärbung (Abbildungen 2D-F) als Zn-DIGP (**7**). Die zellulären Verteilungsmuster sowohl von DIGP (**4**) als auch von Zn-DIGP (**7**) erwiesen sich als abhängig vom Zelltyp, von der Anwendungsmethode und von den Inkubationsbedingungen. In lebenden Zellen wurden diese Substanzen mehrheitlich in Vesikeln und in perinukleären Organellen angereichert,^[13] während in fixierten und sterbenden Zellen eine intensive Färbung der Zellkerne und der Nucleoli beobachtet wurde (Abbildungen 2D-F). Ähnliche Trends wurden für guanidinhaltige Transporterkonstrukte beschrieben.^[20]

Ältere Studien besagten, dass die Aktivität des c-Myc-Promotors um den Faktor zwei oder mehr unterdrückt wurde,^[21] wenn TMPyP4 in einer Dosis der Größenordnung des EC₅₀ für Zytotoxizität zu Zellkulturen gegeben wurde (100 μM).^[22] Aufgrund der höheren G-Quadruplex-Affinität und -Spezifität von Zn-DIGP verwendeten wir in analogen

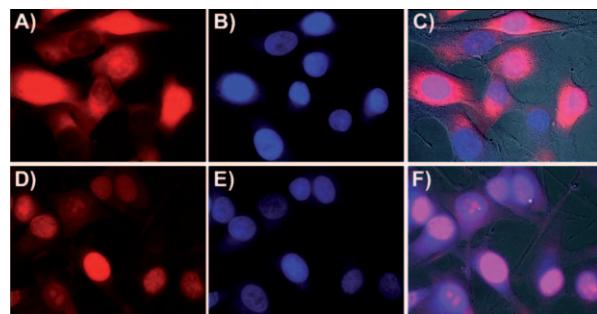


Abbildung 2. Fixierte SK-Mel-28, angefärbt mit 3 μM Zn-DIGP (7) oder DIGP (4) und 8 μM Hoechst 33342. A) Zn-DIGP-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Anr}} = 620$, $\lambda_{\text{Emm}} = 700 \text{ nm}$). Ähnliche Färbungsmuster wurden auch bei Zellen ohne Hoechst 33342 gefunden (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen).^[13] B) Hoechst-33342-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Anr}} = 360$, $\lambda_{\text{Emm}} = 470 \text{ nm}$). C) Überlagerung von (A) und (B) mit Absorption im Bereich von weißem Licht. D) DIGP-Fluoreszenz. E) Hoechst-33342-Fluoreszenz. F) Überlagerung von (D) und (E) mit Absorption im Bereich von weißem Licht. Eine Aufnahme in lebenden Zellen konnte ebenfalls beobachtet werden (Abbildungen S5 und S6 in den Hintergrundinformationen).^[13] Farbleichgewicht, Helligkeit und Kontrast wurden für jedes Bild einzeln optimiert.

Experimenten eine viel kleinere Dosis (1 μM), und wir nutzten die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR), um die Aktivität des c-Myc-Promotors in Neuroblastoma-Zelllinien (SH-SY5Y) abzuschätzen; diese sind bekannt dafür, c-Myc übermäßig zu exprimieren.^[23] Ungeachtet dessen, dass bei dieser Dosis keine zytotoxischen Bedingungen vorlagen ($\text{EC}_{50} > 80 \mu\text{M}$),^[13] konnte eine zeitabhängige bis zu dreifache Abnahme der c-Myc-Expression beobachtet werden (Abbildung 3).

Damit ist Zn-DIGP der erste G-Quadruplex-Ligand mit hoher Affinität, der sowohl ein Einschalten von Lumineszenz bei der Bindung an DNA bewirkt als auch die Fähigkeit aufweist, RNA-Expression zu unterdrücken. Mit einem $K_d \leq 2 \text{ nm}$ ist die Interaktion zwischen Zn-DIGP und c-Myc-G-Quadruplex-DNA die stärkste bis dato beschriebene Bindungsinteraktion einer G-Quadruplexstruktur mit einem kleinen Molekül.^[5] Die Fluoreszeineigenschaften von Zn-DIGP vereinfachen direkte Bindungsanalysen in vitro und das Anfärben in vivo. Die Verteilung von Zn-DIGP in Zellen war deutlich anders als diejenige von Duplex-DNA-Sonden, und bei relativ geringer Dosis (1 μM) bewirkte Zn-DIGP

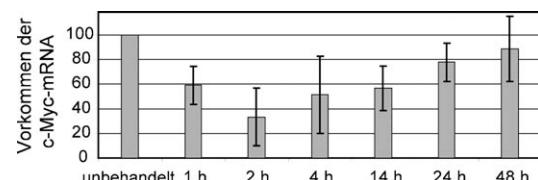


Abbildung 3. Relatives Vorkommen der c-Myc-mRNA, extrahiert aus SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen, die 1–48 h mit 1 μM Zn-DIGP behandelt wurden. qRT-PCR wurde verwendet, um die mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen β-Actin, SDHA und GAPDH zu quantifizieren. Zwei oder mehr unabhängige Versuche an je drei Proben wurden verwendet, um die dargestellten Durchschnittswerte und Standardabweichungen zu bestimmen. Unter den Housekeeping-Genen wurden keine oder nur kleinste Veränderungen beobachtet.^[13]

rasch eine dreifache Unterdrückung der c-Myc-mRNA. Der exakte Mechanismus, der für diese Unterdrückung verantwortlich ist, wird noch untersucht, aber unsere Resultate stimmen mit einer Quadruplex-vermittelten Promotordesaktivierung überein.^[3,21] Eine direkte Fluoreszenzvisualisierung des vermuteten Zn-DIGP/c-Myc-Promotorkomplexes in Zellen ist nicht möglich, da c-Myc ein Gen mit einer einzigen oder nur wenigen Kopien ist. Die künftige Anwendung von Zn-DIGP oder anderen difunktionellen G-Quadruplex-Liganden zur Untersuchung von Tandem-repetitiven Genen mit G-Quadruplex-haltigen Promotoren ist ein hochgradig attraktiver Ansatz, um die Zusammenhänge zwischen G-Quadruplexstrukturen und Transkriptionsregulierung weiter zu untersuchen.

Eingegangen am 6. Juli 2009
Online veröffentlicht am 30. Oktober 2009

Stichwörter: DNA · Fluoreszenzsonden · G-Quadruplexe · Polymerasenkettenreaktion · RNA

- [1] a) J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668; b) D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7429; c) S. Neidle, G. N. Parkinson, *Biochimie* **2008**, *90*, 1184; d) A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482; e) J. B. Chaires, J. L. Mergny, *Biochimie* **2008**, *90*, 973.
- [2] a) C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8572; b) K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 847; c) N. Maizels, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 1055; d) L. Oganesian, T. M. Bryan, *Bioessays* **2007**, *29*, 155; e) D. Gomez, T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M. F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-Ya, H. Morjani, C. Trentesaux, J. F. Riou, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38721.
- [3] a) Y. Qin, L. H. Hurley, *Biochimie* **2008**, *90*, 1149; b) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406; c) S. G. Hershman, Q. Chen, J. Y. Lee, M. L. Kozak, P. Yue, L. S. Wang, F. B. Johnson, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 144; d) P. Rawal, V. B. R. Kummarasetti, J. Ravindran, N. Kumar, K. Halder, R. Sharma, M. Mukerji, S. K. Das, S. Chowdhury, *Genome Res.* **2006**, *16*, 644.
- [4] a) D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, *334*, 364; b) A. K. Shukla, K. B. Roy, *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 251; c) V. De Fonzo, E. Berzani, F. Aluffi-Pentini, V. Parisi, *Med. Hypotheses* **2001**, *57*, 103; d) P. Barros, F. Boan, M. G. Blanco, J. Gomez-Marquez, *FEBS J.* **2009**, *276*, 2983; e) P. Mani, V. K. Yadav, S. K. Das, S. Chowdhury, *PLoS One* **2009**, *4*, e4399.
- [5] Einige neuere Übersichtsartikel: a) D. Monchaud, M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627; b) T. M. Ou, Y. J. Lu, J. H. Tan, Z. S. Huang, K. Y. Wong, L. Q. Gu, *ChemMed-Chem* **2008**, *3*, 690; c) N. W. Luedtke, *Chimia* **2009**, *63*, 134; d) A. Arola, R. Vilar, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1405; e) A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J. F. Riou, J. L. Mergny, *Biochimie* **2008**, *90*, 131; f) J. H. Tan, L. Q. Gu, J. Y. Wu, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1163; g) S. Balasubramanian, S. Neidle, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 345.
- [6] a) P. Yang, A. De Cian, M. P. Teulade-Fichou, J. L. Mergny, D. Monchaud, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2188; b) D. L. Ma, C. M. Che, S. C. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1835; c) F. Koeppe, J. F. Riou, A. Laoui, P. Maillet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Hélène, J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1087; d) C. C. Chang, I. C. Kuo, I. F. Ling, C. T. Chen, H. C. Chen, P. J. Lou, J. J. Lin, T. C. Chang, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4490; e) H. Arthanari, S. Basu, T. L. Kawano, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3724.
- [7] a) S. D. Creacy, E. D. Routh, F. Iwamoto, Y. Nagamine, S. A. Akman, J. P. Vaughn, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34626; b) M. Fry, *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 4336.
- [8] a) D. P. N. Goncalves, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2006**, 4685; b) L. G. Ren, A. M. Zhang, J. Huang, P. Wang, X. C. Weng, L. X. Zhang, F. Liang, Z. Tan, X. Zhou, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 775.
- [9] a) M. W. Freyer, R. Buscaglia, K. Kaplan, D. Cashman, L. H. Hurley, E. A. Lewis, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2007; b) J. S. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067.
- [10] a) N. W. Luedtke, T. J. Baker, M. Goodman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12035; b) N. W. Luedtke, P. Carmichael, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12374.
- [11] J. Alzeer, P. J. Roth, N. W. Luedtke, *Chem. Commun.* **2009**, 1970.
- [12] D. J. Ball, S. Mayhew, S. R. Wood, J. Griffiths, D. I. Vernon, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 390.
- [13] In den Hintergrundinformationen sind die Synthese und Charakterisierung von **6–8**, Vorschriften zu allen Experimenten sowie die Ergebnisse bezüglich der Abbildung lebender Zellen, der konfokalen Mikroskopie, der Zytotoxizität, die Absorptions- und Emissionsspektren von Zn-DIGP, die Titrationsexperimente und die qRT-PCR-Daten zu finden.
- [14] F.-D. Cong, B. Ning, X.-G. Du, C.-Y. Ma, H.-F. Yu, B. Chen, *Dyes Pigm.* **2005**, *66*, 149.
- [15] Alle analytischen Daten sind sowohl mit C_4 - als auch mit D_2 -symmetrischen Regiosomeren vereinbar, weshalb die exakte Struktur nicht spezifiziert ist.
- [16] Die verwendeten Oligonucleotide sind TGA(G)₃T(G)₄-A(G)₃T(G)₄AA (c-Myc), GTTA(GGGTTA)₄GG (Htelo), GTTA(GAGTTA)₄GG (Htelo-Mut). Ähnliche Resultate wurden sowohl für das 22mer c-Myc als auch für eine längere Wildtyp-c-Myc-DNA ((G)₄A(G)₃T(G)₄A(G)₃T(G)₄AA(G)₂T(G)₄) erhalten. „tRNA“ war ein Gemisch aus reifer und prä-tRNA des Typs X-SA.
- [17] a) A. T. Phan, J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618; b) D. J. Cashman, R. Buscaglia, M. W. Freyer, J. Dettler, L. H. Hurley, E. A. Lewis, *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 93.
- [18] a) D. Magde, J. H. Brannon, T. L. Cremers, J. Olmsted, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 696; b) S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant, A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 356.
- [19] Die Zn-DIGP-Stöchiometrien für Interaktionen mit stärkerer Bindungsaffinität (zu c-Myc-C, tRNA und CT-DNA) ließen sich wegen der Selbstassoziation von Zn-DIGP bei höheren Konzentrationen nicht bestimmen.
- [20] A. Wender, W. C. Galliher, E. A. Goun, L. R. Jones, T. H. Pillow, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 452.
- [21] a) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593; b) C. L. Grand, H. Y. Han, R. M. Munoz, S. Weitman, D. D. Von Hoff, L. H. Hurley, D. J. Bearss, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 565; c) Y. Mikami-Terao, M. Akiyama, Y. Yuza, T. Yanagisawa, O. Yamada, H. Yamada, *Cancer Lett.* **2008**, *261*, 226.
- [22] E. Izbicka, D. Nishioka, V. Marcell, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, R. T. Wheelhouse, L. H. Hurley, R. S. Wu, D. D. Von Hoff, *Anti-Cancer Drug Des.* **1999**, *14*, 355.
- [23] A. M. Jalava, J. E. Heikkila, K. E. O. Akerman, *Exp. Cell Res.* **1988**, *179*, 10.