

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

FACHBEREICH BIOLOGIE, CHEMIE, PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Über die biologische Aktivität von ATCUN- und Phenanthrolin- komplexen des Kupfers und Nickels

Christian Wende, M. Sc.
aus Hennigsdorf

Berlin, Januar 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.10.2012 bis 15.01.2016 im

Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie

Institut für Chemie und Biochemie

Freie Universität Berlin

Fabeckstr. 34/36

14195 Berlin

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Kulak angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Nora Kulak
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Müller

Disputation am 29. April 2016

Für Max

in Liebe für seine Geduld und Motivierung
und die bisher schönsten Jahre meines Lebens.

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Nora Kulak für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können, die vielen Ratschläge und hilfreichen Diskussionen in den vergangenen Jahren danken.

Prof. Dr. Christian Müller danke ich für die freundliche und bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kulak, insbesondere Chrischani Perera, Jan Hormann und Carsten Lüdtker möchte ich sowohl für die Anregungen und Diskussionen sowie die unterhaltsamen, lustigen und damit sehr besonderen letzten Jahre danken. Ebenso gebührt für die schöne Zeit auch Felix Brosi, Stefanie Fritz, Juliane Krüger, Darina Heinrich und Annika Meyer mein größter Dank.

Meinen Praktikantinnen und Praktikanten Tobias Reichelt, Julia Streng, Ulrike Mühlow, Alexander Oehrl und Julian Heinrich danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern der Serviceabteilungen danke ich für die schnelle und gewissenhafte Bearbeitung meiner Aufträge.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion und für die Liebe in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

1. Synopsis	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Conclusion	3
2. Einleitung	5
2.1. Krebs in Deutschland	5
2.2. Grundlagen	6
2.2.1. DNA.....	6
2.2.2. DNA-Spaltung	8
2.2.3. Zytostatika.....	15
2.3. Zielsetzung	18
3. Ergebnisse und Diskussion	19
3.1. ATCUN-Komplexe	19
3.1.1. Stand der Forschung	19
3.1.2. Peptidsynthese.....	25
3.1.3. Fluorophor-ATCUN-Peptide	32
3.1.3.1. BODIPY-Fluorophore	36
3.1.3.2. Ausbeutebestimmung der Peptide	47
3.1.3.3. Spaltung von Plasmid-DNA	54
3.1.3.4. Mechanismus der DNA-Spaltung	59
3.1.3.5. Fluoreszenzuntersuchungen	64
3.1.4. Ferrocen-ATCUN-Peptide	73
3.1.4.1. Synthese und Ausbeutebestimmung der Peptide	74
3.1.4.2. Spaltung von Plasmid-DNA	78
3.1.5. Phenanthrolin-ATCUN-Peptide	84
3.1.5.1. Synthese und Ausbeutebestimmung des Peptids.....	84
3.1.5.2. Spaltung von Plasmid-DNA	88
3.1.5.3. Spaltung von linearer DNA.....	98
3.1.5.4. Peroxidation von Lipiden	102
3.1.5.5. Spaltung von Proteinen.....	109

3.2. Phenanthrolinkomplexe	118
3.2.1. Stand der Forschung	118
3.2.2. Liganden- und Komplexsynthese.....	121
3.2.2.1. Synthese der 2,9-disubstituierten Phenanthrolinderivate	121
3.2.2.2. Synthese der Kupfer(II)-Komplexe	124
3.2.3. Biologische Evaluation	137
3.2.3.1. Spaltung von Plasmid-DNA	137
3.2.3.2. DNA-Wechselwirkungen	145
3.2.4. Phenanthrolinhydrazone	161
3.2.4.1. Ligandensynthese	162
3.2.4.2. Komplexsynthese	166
3.2.4.3. Spaltung von Plasmid-DNA	167
 4. Experimenteller Teil.....	 173
4.1. Allgemeine Anmerkungen.....	173
4.2. Methoden und Materialien.....	174
4.2.1. Analysemethoden	174
4.2.2. Ausgangsmaterialien.....	176
4.3. Synthesen	179
4.3.1. ATCUN-Peptide	179
4.3.1.1. <i>N</i> ² - <i>tert</i> -Butoxycarbonyl- <i>N</i> ³ -fluorenylmethoxycarbonyl-2,3-diamino-propansäure (3) ...	179
4.3.1.2. 3-(4,4-Difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propansäure (6)	180
4.3.1.3. 4-(Di(1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyl)benzoesäure (10)	181
4.3.1.4. 4-((1 <i>H</i> -Pyrrol-2-yl)(2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden)methyl)benzoesäure (11)	182
4.3.1.5. 4-(4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)benzoesäure (12) (METHODE A)	183
4.3.1.6. 4-(4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)benzoesäure (12) (METHODE B)	184
4.3.1.7. 4-((1 <i>H</i> -Pyrrol-2-yl)(2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden)methyl)- <i>N</i> -(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)ethyl)benzamid (14a).....	186
4.3.1.8. 2-(2-Aminoethyl)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isindolin-1,9'-xanthen]-3-on (22)	187
4.3.1.9. <i>N</i> -(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid (23)	188
4.3.1.10. 1-(2-Aminoethyl)-3-(3',6'-dihydroxy-2-oxo-3 <i>H</i> -spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thioharnstoff (24)	189
4.3.1.11. <i>N</i> -(2-Aminoethyl)ferrocenamid (27) (METHODE A)	190
4.3.1.12. <i>N</i> -(2-Aminoethyl)ferrocenamid (27) (METHODE B)	191
4.3.1.13. 1,1'-Bis(<i>N,N'</i> -(2-Aminoethyl))ferrocenamid (32) (METHODE A)	192
4.3.1.14. 1,1'-Bis(<i>N,N'</i> -(2-Aminoethyl))ferrocenamid (32) (METHODE B)	193
4.3.1.15. <i>N-tert</i> -Butoxycarbonylethan-1,2-diamin (34)	195

4.3.1.16.	<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl- <i>N'</i> - <i>tert</i> -butoxycarbonylethan-1,2-diamin (35)	196
4.3.1.17.	<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonylethan-1,2-diamin-Trifluoracetat (36)	197
4.3.1.18.	Natrium[(ethyldiamintetracetato)ferrat(III)]-Trihydrat (42)	198
4.3.1.19.	((<i>N</i> ² -Boc)-(<i>N</i> ³ -Fmoc)-2,3-diaminopropanoyl)- β -alanyl-histidyl(Mtt)-seryl(^t Bu)- seryl(^t Bu)-Harz (Fmoc- P-NH -Harz / Fmoc- P₂-NH -Harz)	199
4.3.1.20.	R -2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylserylserylamid (P-R)	200
4.3.1.21.	R -2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylserylseryl-2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylamid (P₂-R)	203
4.3.1.22.	1,1'-Bis(2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylserylserylamid)ferrocenamid (P-Fc-P) ...	205
4.3.1.23.	Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe der ATCUN-Peptide	207
4.3.2.	2,9-Disubstituierte Phenanthroline	208
4.3.2.1.	1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarboxaldehyd (44)	208
4.3.2.2.	1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarbonsäure (45)	209
4.3.2.3.	9-Methoxycarbonyl-1,10-phenanthrolin-2-carbonsäure (46)	210
4.3.2.4.	2,9-Bis(hydroxymethyl)-1,10-phenanthrolin (47)	211
4.3.2.5.	2,9-Bis(brommethyl)-1,10-phenanthrolin (48)	212
4.3.2.6.	2,9-Bis(tribrommethyl)-1,10-phenanthrolin (49)	213
4.3.2.7.	[(1,10-Phenanthrolin)(dinitrato)kupfer(II)] (Cu(37))	214
4.3.2.8.	[(1,10-Phenanthrolin)(dinitrato)nickel(II)] (Ni(37))	215
4.3.2.9.	[Bis(1,10-phenanthrolin)(nitrato)kupfer(II)]-nitrat (Cu(37)₂)	216
4.3.2.10.	[Bis(1,10-phenanthrolin)(nitrato)nickel(II)]-nitrat (Ni(37)₂)	217
4.3.2.11.	[Bis(2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin)(nitrato)kupfer(II)]-nitrat (Cu(43)₂)	218
4.3.2.12.	[Bis(2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin)(methanol)kupfer(II)]-perchlorat (Cu(43)₂(ClO₄)₂)	219
4.3.2.13.	[Bis(1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxaldehyd)kupfer(II)]-nitrat (Cu(44)₂)	220
4.3.2.14.	[Bis(9-carboxy-1,10-phenanthrolin-2-carboxylato)kupfer(II)] (Cu(45)₂)	221
4.3.2.15.	[Bis(9-methoxycarbonyl-1,10-phenanthrolin-2-carboxylato)kupfer(II)] (Cu(46)₂)	222
4.3.2.16.	[Bis(2,9-bis(hydroxymethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(II)]-nitrat (Cu(47)₂)	223
4.3.2.17.	[Bis(2,9-bis(brommethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(II)]-nitrat (Cu(48)₂)	224
4.3.2.18.	[Bis(2,9-bis(tribrommethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(II)]-nitrat (Cu(49)₂)	225
4.3.3.	Phenanthrolinhydrazone	226
4.3.3.1.	<i>N'</i> , <i>N'''</i> -(1,10-Phenanthrolin-2,9-diyl)bis(methanylyliden)di(R hydrazid) (53-55)	226
4.3.3.2.	1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (56)	228
4.3.3.3.	<i>N'</i> -(6-Oxo-1,10-phenanthrolin-5(6 <i>H</i>)-yliden)benzohydrazid (57)	229
4.3.3.4.	5-Hydroxy-2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin-1-iumbromid (58)	230
4.3.3.5.	[Bis(1,10-phenanthrolin-5,6-dion)kupfer(II)]-nitrat (Cu(56)₂)	232
4.3.3.6.	[Bis(<i>N'</i> -(6-oxo-1,10-phenanthrolin-5(6 <i>H</i>)-yliden)benzohydrazid)kupfer(II)]-nitrat (Cu(57)₂)	233

4.4. Gelelektrophoresen	234
4.4.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	234
4.4.2. SDS-PAGE	236
4.5. Spektroskopie	237
4.5.1. UV/Vis-Spektroskopie	237
4.5.2. Fluoreszenzspektroskopie	239
4.5.3. CD-Spektroskopie	240
Strukturenverzeichnis	241
Literaturverzeichnis	247
Kristallographischer Anhang	259

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang.....	6
Abbildung 2.2: Schematischer 3D-Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang.....	7
Abbildung 2.3: Schematische 3D-Darstellung von DNA-Molekül-Wechselwirkungen.....	8
Abbildung 2.4: Struktur des Cu ^{II} -Komplexes von 1,10-Phenanthrolin.....	12
Abbildung 2.5: Struktur des Fe ^{II} -Komplexes von Bleomycin A ₂	13
Abbildung 2.6: Strukturen des Mechlorethamins und der Stammverbindung S-Lost.....	15
Abbildung 2.7: Strukturen verschiedener, potentieller Chemotherapeutika.....	17
Abbildung 3.1: Quartärstruktur des globulären Rinderserumalbumins.....	19
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Hybrid-Proteins Gly-Gly-His-Hin(139-190).....	22
Abbildung 3.3: Strukturen verschiedener ATCUN-Peptide.....	23
Abbildung 3.4: Wichtige Strukturen für die Peptidsynthese.....	27
Abbildung 3.5: Übersicht der wichtigsten Peptide.....	31
Abbildung 3.6: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms für den Prozess der Absorption.....	32
Abbildung 3.7: Stokes-Shift (Rotverschiebung) im Fluoreszenzspektrum.....	34
Abbildung 3.8: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms für den Prozess der Fluoreszenz.....	35
Abbildung 3.9: Vereinfachte Darstellung des Auger-Effektes.....	36
Abbildung 3.10: Grundgerüst der BODIPY-Fluorophore und Struktur des methylierten BODIPY-FLs.....	36
Abbildung 3.11: Darstellung von elektrischem und Übergangsdipolmoment in BODIPY.....	37
Abbildung 3.12: Nummerierung des BODIPY-Motivs nach dem Vorbild der Stammverbindung Indacen.....	37
Abbildung 3.13: Struktur des Peptids 7 nach massenspektrometrischer Analyse.....	38
Abbildung 3.14: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von 12 im Kristall.....	40
Abbildung 3.15: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen zwischen 12 in der Elementarzelle.....	41
Abbildung 3.16: Zweiteilige Struktur von Aryl-BODIPYs.....	42
Abbildung 3.17: Schematische Orbitaldarstellung des photoinduzierten Elektronentransfers.....	43
Abbildung 3.18: Strukturen und analytische Daten der Verbindungen 16 und 17	46
Abbildung 3.19: Strukturen und analytische Daten der Peptide P-DPMe und P-BODIPY	47
Abbildung 3.20: Absorptionsspektrum von 22 in Ethanol und saurem Ethanol.....	49
Abbildung 3.21: Absorptionsspektrum von 24 in Wasser, Salzsäure und Natronlauge.....	50
Abbildung 3.22: Absorptionsspektren und Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von 10-12	51
Abbildung 3.23: Titrationskurven der Peptide P-NH₂ und P₂-NH₂ mit CuCl ₂ -Lösung.....	53
Abbildung 3.24: Struktur der Agarose.....	54
Abbildung 3.25: Schematischer Aufbau der Agarose-Gelelektrophorese.....	55
Abbildung 3.26: Molekülstruktur der Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Ribonucleotide Cytidin und Guanosin.....	55
Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der drei DNA-Formen und ihres Laufverhaltens auf einem Gel.....	56

Abbildung 3.28: Quantitative Auswertung der konzentrationsabhängigen DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-RhB , P-Dns und P-FITC bezüglich pBR322.	57
Abbildung 3.29: Mögliche sterische Orientierung der peptidgebundenen Farbstoffe.	58
Abbildung 3.30: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-Dns , P-NH₂ und GGH	58
Abbildung 3.31: DNA-Spaltaktivität von Cu(P-RhB) bezüglich pBR322 in der Anwesenheit verschiedener ROS-Fänger.....	61
Abbildung 3.32: DNA-Spaltaktivität von Cu(P-Dns) , Cu(P-FITC) und Cu(P-RhB) bezüglich pBR322 in H ₂ O und D ₂ O.	61
Abbildung 3.33: NMR-Spektren von Cu(P-Dns)	63
Abbildung 3.34: DNA-Spaltaktivität von Cu(P-RhB) und Cu(P-Dns) bezüglich pBR322 in der Anwesenheit von Neocuproin.....	64
Abbildung 3.35: Fluoreszenzspektren von P-RhB bei unterschiedlichen pH-Werten.	65
Abbildung 3.36: UV/Vis-Spektren der pH-abhängigen Cu ^{II} -Bindung durch das Peptid P-Dns	65
Abbildung 3.37: Fluoreszenzspektren der Titration von P-RhB und P-FITC mit CuCl ₂	66
Abbildung 3.38: Fluoreszenzquenching durch Elektronentransfer zwischen Cu ^{II} und Fluorophor.	67
Abbildung 3.39: Fluoreszenzquenching durch Elektronenbewegungen im Dexter-Energietransfer und Förster-Resonanzenergietransfer.	68
Abbildung 3.40: Überlappung der Donoremission und der Akzeptorabsorption.....	68
Abbildung 3.41: Fluoreszenzexperiment zur Untersuchung des Quenchmechanismus'.	70
Abbildung 3.42: Fluoreszenzswitching der Komplexe Cu(P-RhB) und Cu(P-Dns) durch alternierende Titration mit Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.	71
Abbildung 3.43: Fluoreszenzspektren der Peptide P-RhB , P-Dns , P-FITC und P-BODIPY sowie der entsprechenden Cu ^{II} -Komplexe vor und nach der Inkubation bei 37 °C für 1 h.	71
Abbildung 3.44: Struktur des Cyclen-Ferrocen-Komplexes.	74
Abbildung 3.45: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-NH₂ , P₂-NH₂ , P-Fc , P₂-Fc und P-Fc-P im Vergleich mit der Carbonsäure 25 bzw. Cu(P-NH₂) + 25 mit Ascorbinsäure.....	79
Abbildung 3.46: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-NH₂ , P₂-NH₂ , P-Fc , P₂-Fc und P-Fc-P im Vergleich mit der Carbonsäure 25 bzw. Cu(P-NH₂) + 25 in der Anwesenheit von H ₂ O ₂	80
Abbildung 3.47: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-NH₂ , P₂-NH₂ , P-Fc , P₂-Fc und P-Fc-P im Vergleich mit der Carbonsäure 25 bzw. Cu(P-NH₂) + 25 ohne Aktivierungsreagenz.....	81
Abbildung 3.48: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von P-NH₂ , P₂-NH₂ , P-Fc , P₂-Fc und P-Fc-P im Vergleich mit der Carbonsäure 25 bzw. Cu(P-NH₂) + 25 mit Ascorbinsäure nach 12 h....	82
Abbildung 3.49: Titrationskurven des Peptids P-Phen mit CuCl ₂ -Lösung.....	85
Abbildung 3.50: Absorptionsspektren des Komplexes Cu(37) in 50 mM Tris-HCl-Puffer und in Wasser.....	85
Abbildung 3.51: Titrationskurven des Peptids P-Phen mit Komplex Cu(37)	86
Abbildung 3.52: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen	88
Abbildung 3.53: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen im Vergleich mit CuCl ₂ bzw. NiCl ₂ sowie Cu(37) und Cu(37)₂ in der Anwesenheit von Aktivierungsreagenzien.....	89

Abbildung 3.54: DNA-Spaltaktivität der Mono- bzw. Bis(phenanthrolin)komplexe von Kupfer(II) und Nickel(II) in der Anwesenheit von Ascorbinsäure oder Wasserstoffperoxid.	91
Abbildung 3.55: Schematische Darstellung von DNA-Schmelzkurven.....	93
Abbildung 3.56: CT-DNA-Schmelzkurven in der An- und Abwesenheit von Cu ^{II} -Peptid-Komplexen.....	94
Abbildung 3.57: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen im Vergleich mit CuCl ₂ bzw. NiCl ₂ sowie Cu(37) und Cu(37)₂ in der Abwesenheit von Aktivierungsreagenzien.	96
Abbildung 3.58: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des MDA-TBA-Farbstoffes.	100
Abbildung 3.59: MDA-Bildung durch oxidative Spaltung von CT-DNA mit Cu(P-Phen) und Cu₂(P-Phen)	101
Abbildung 3.60: Oxidation von Linolsäure mit den Komplexen Cu(P-Phen) und Cu₂(P-Phen)	106
Abbildung 3.61: Oxidation verschiedener Fettsäuren mit Cu₂(P-Phen) und Cu(37)₂	107
Abbildung 3.62: Schematische Darstellung der Enzymhemmung und Proteinspaltung.	110
Abbildung 3.63: Ausschnitt aus der Struktur des Polyacrylamidgels.	111
Abbildung 3.64: Schematischer Aufbau der SDS-PAGE.	112
Abbildung 3.65: Proteinspaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen im Vergleich mit Cu(37) und Cu(37)₂ in der Anwesenheit von Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.....	113
Abbildung 3.66: Zeitabhängige Spaltung von BSA durch Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.	113
Abbildung 3.67: Proteinspaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen im Vergleich mit Cu(37) und Cu(37)₂ in der Anwesenheit von Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.....	114
Abbildung 3.68: Proteinspaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe von P-Phen im Vergleich mit Cu(37) und Cu(37)₂ ohne Aktivierungsreagenz nach 12 h.	115
Abbildung 3.69: Proteinspaltaktivität der Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe GGH sowie freier Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Ionen.	116
Abbildung 3.70: Nummerierung für den Liganden 37	119
Abbildung 3.71: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes Cu(37)₂ im Kristall.....	124
Abbildung 3.72: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes Cu(43)₂ im Kristall.	124
Abbildung 3.73: Olex2-Darstellung der Koordinationspolyeder der Kupfer(II)-Zentren der Komplexe Cu(37)₂ und Cu(43)₂	126
Abbildung 3.74: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes Cu(43)₂(ClO₄)₂	127
Abbildung 3.75: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen in den Kristallen der Komplexe Cu(37)₂ , Cu(43)₂ und Cu(43)₂(ClO₄)₂	128
Abbildung 3.76: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes Ni(37)₂	129
Abbildung 3.77: Olex2-Darstellung des Koordinationspolyeders des Komplexes Ni(37)₂	129
Abbildung 3.78: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur und der ASU des Komplexes Cu(46)₂	131
Abbildung 3.79: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen von Cu(46)₂ -Komplexmolekülen.....	133
Abbildung 3.80: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von Cu(47)₂ im Kristall.....	134
Abbildung 3.81: Olex2-Ball-and-Stick-Darstellung der Wechselwirkungen von Cu(47)₂	135
Abbildung 3.82: Quantitative Auswertung der konzentrationsabhängigen DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von 37 und 43 – 47 bezüglich Plasmid-DNA pBR322.	137
Abbildung 3.83: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von 37 und 43 – 47 in der Anwesenheit von Ascorbinsäure.	138

Abbildung 3.84: DNA-Spaltaktivität der Cu ^{II} -Komplexe von 37 und 43 – 47 ohne Aktivierungsreagenz.	139
Abbildung 3.85: UV/Vis-Spektren von BNPP nach der Inkubation mit den Cu ^{II} -Komplexen der Liganden 37 und 43 – 47 im Vergleich mit einer Phosphodieserese I.	141
Abbildung 3.86: Spaltung von Plasmid-DNA mit dem Komplex Cu(37)₂ bzw. dem Enzym EcoRI.	143
Abbildung 3.87: Religation der geschnittenen Plasmid-DNA von Cu(37)₂ bzw. EcoRI.	143
Abbildung 3.88: DNA-Spaltaktivität von 50 µM Cu(37)₂ in verschiedenen Puffersystemen.	144
Abbildung 3.89: CT-DNA-Schmelzkurven in der An- und Abwesenheit der Cu ^{II} -Phenanthrolinkomplexe.	145
Abbildung 3.90: Veränderungen in der Lage und Intensität von UV/Vis-Absorptionsbanden.	147
Abbildung 3.91: UV/Vis-Spektren von Cu(37)₂ und Cu(43)₂ bei steigender CT-DNA-Konzentration zur Bestimmung der Bindungskonstanten <i>K_{int.}</i>	151
Abbildung 3.92: Fluoreszenzspektren von Ethidiumbromid mit CT-DNA bei steigender Konzentration von Cu(37)₂ und Cu(43)₂ zur Bestimmung der Bindungskonstanten <i>K_{app.}</i>	152
Abbildung 3.93: UV/Vis-Spektren der Komplexe Cu(37)₂ und Cu(43)₂ – Cu(47)₂	154
Abbildung 3.94: Schematisches CD-Spektrum.	155
Abbildung 3.95: Schematische Darstellung der CD-Spektren der häufigsten DNA-Formen A, B und Z.	156
Abbildung 3.96: Molekülstrukturen der drei DNA-Formen A, B und Z im Kristall.	157
Abbildung 3.97: CD-Spektren von CT-DNA in der An- und Abwesenheit der Komplexe Cu(37)₂ und Cu(43)₂ – Cu(47)₂	158
Abbildung 3.98: Struktur von Bis(picolyl)amin.	161
Abbildung 3.99: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von 58 im Kristall.	164
Abbildung 3.100: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen zwischen 58 im Kristall.	165
Abbildung 3.101: Konzentrationsabhängige DNA-Spaltaktivität von Cu(57)₂ bezüglich pBR322 in der An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure.	167
Abbildung 3.102: UV/Vis-Spektren von BNPP nach der Inkubation mit dem Komplex Cu(57)₂	168
Abbildung 3.103: DNA-Spaltaktivität von Cu(57)₂ im Vergleich mit den Komplexen Cu(56)₂ und Cu(37)₂	170
Abbildung 3.104: DNA-Spaltaktivität von Cu(57)₂ im Vergleich mit Cu(56)₂ und Cu(56)₂ + 50	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über Neuerkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland (Auszug).....	5
Tabelle 3.1: Vergleich der N-terminalen Sequenz einiger Albumine.....	20
Tabelle 3.2: Reaktionskonstanten 2. Ordnung für den Einzelstrangbruch von Plasmid-DNA.....	23
Tabelle 3.3: Kristallographische Daten für 12	40
Tabelle 3.4: Bindungslängen und -winkel in 12	40
Tabelle 3.5: Fluoreszenzeigenschaften einiger BODIPY-Derivate in Ethanol.....	44
Tabelle 3.6: Extinktionskoeffizienten der Verbindungen 22 – 24	49
Tabelle 3.7: Extinktionskoeffizienten der Verbindungen 10 – 12 in H ₂ O/MeCN (1:1) und Ausbeuten der zugehörigen Peptide.....	52
Tabelle 3.8: Zeitabhängige Spaltaktivität von Cu(P-RhB)	57
Tabelle 3.9: Literaturbekannte ROS-Fänger und die im Experiment verwendeten Konzentrationen.....	59
Tabelle 3.10: Fluoreszenz der 1 : 1 Cu ^{II} -ATCUN-Komplexe nach 5 min und einer Inkubation von 24 h.....	66
Tabelle 3.11: Extinktionskoeffizienten von 27 und 32 in H ₂ O und Ausbeuten der zugehörigen Peptide.....	78
Tabelle 3.12: Assoziationskonstanten für einige Cu ^{II} - und Ni ^{II} -Komplexe bei 25 °C.....	86
Tabelle 3.13: CT-DNA-Schmelzpunkte in der An- und Abwesenheit von Cu ^{II} -Peptid-Komplexen.....	94
Tabelle 3.14: MDA-Konzentration bei der Oxidation von Linol- und Arachidonsäure.....	108
Tabelle 3.15: Kristallographische Daten für die Komplexe Cu(37)₂ , Cu(43)₂ und Cu(43)₂(ClO₄)₂	125
Tabelle 3.16: Ausgewählte Bindungslängen und -winkel von Cu(37)₂ , Cu(43)₂ und Cu(43)₂(ClO₄)₂	125
Tabelle 3.17: Kristallographische Daten für Ni(37)₂	129
Tabelle 3.18: Ausgewählte Bindungslängen und -winkel im Komplex Ni(37)₂	129
Tabelle 3.19: Kristallographische Daten sowie ausgewählte Bindungslängen und -winkel für Cu(46)₂	132
Tabelle 3.20: Kristallographische Daten für den Komplex Cu(47)₂	135
Tabelle 3.21: Vergleich der Struktur und Spaltaktivität der Kupfer(II)-Komplexe von 37 und 43 – 47	139
Tabelle 3.22: Assoziationskonstanten für Cu ^{II} -Phenanthrolin- und Cu ^{II} -Tris-Komplexe bei 25 °C.....	144
Tabelle 3.23: CT-DNA-Schmelzpunkte in der An- und Abwesenheit Cu ^{II} -Phenanthrolinkomplexe.....	146
Tabelle 3.24: Einteilung der DNA-Bindung mittels der Bindungskonstante.....	150
Tabelle 3.25: Zusammenfassung der DNA-Bindungskonstanten für Cu(37)₂ und Cu(43)₂ bis Cu(47)₂	152
Tabelle 3.26: Kristallographische Daten für 58	164

Schemataverzeichnis

Schema 2.1: Übersicht über die Mechanismen der photochemischen DNA-Spaltung.....	9
Schema 2.2: Mechanismus der hydrolytischen DNA-Spaltung in 3'-Position.....	10
Schema 2.3: Mögliche Arten der Aktivierung der Phosphodiester zur Hydrolyse durch Lewis-saure Metallionen (M).....	10
Schema 2.4: Schematische Darstellung der oxidativen DNA-Spaltung durch Wasserstoffabstraktion und Basenmodifikation.....	11
Schema 2.5: Vermuteter Reaktionsweg für die DNA-Spaltung durch $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$	12
Schema 2.6: Vermuteter Reaktionsweg für die DNA-Spaltung durch $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})]$	13
Schema 2.7: Einige Reaktionen zur Bildung von Hydroxylradikalen.....	14
Schema 2.8: Quervernetzung von DNA-Strängen durch Reaktion der nucleophilen N(7)-Atome zweier Guanine mit dem Aziridiniumion des Mechlorethamin.....	15
Schema 2.9: Quervernetzung von DNA-Strängen durch Cisplatin an den N(7)-Atomen zweier benachbarter Guanine.....	16
Schema 3.1: Strukturen des N-Terminus' im BSA und des resultierenden Metallkomplexes.....	20
Schema 3.2: Komplexierung von Cu^{II} -Ionen durch Glycylglycylhistidin(N-methylamid).....	21
Schema 3.3: Strukturen des Pentapeptids und des resultierenden Metallkomplexes unter Verlust der Fluoreszenz des gekuppelten Dansyls.....	24
Schema 3.4: Native chemische Ligation.....	25
Schema 3.5: Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese.....	26
Schema 3.6: Schema für die Synthese der Peptide.....	28
Schema 3.7: Aktivierung des C-Terminus' von Serin und anschließende Kopplung an das Harz.....	28
Schema 3.8: Fmoc-Entschützung von Serin mit der Base Piperidin.....	28
Schema 3.9: Einführung der Fmoc-Schutzgruppe für N^2 -Boc-2,3-Diaminopropionsäure (1).....	29
Schema 3.10: Abspaltung der funktionalisierten Peptide von der Festphase.....	30
Schema 3.11: Synthese des BODIPY-Derivates 6	38
Schema 3.12: Synthese des BODIPY-Derivates 12 in einer Eintopf-Synthese und einer mehrstufigen Reaktion.....	39
Schema 3.13: Synthese des Maleimids 14/14a und die geplante Kopplung ans Cystein-Peptid 15	44
Schema 3.14: Synthesewege für die Darstellung des Peptids P-BODIPY	45
Schema 3.15: Ethylendiamin-Funktionalisierung der Farbstoffe.....	48
Schema 3.16: Gleichgewicht zwischen den beiden Rhodamin-Amidformen.....	49
Schema 3.17: Synthese des Dipyrrromethens 11	51
Schema 3.18: Ausschnitt aus den Prozessen zur Erzeugung und zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen.....	60
Schema 3.19: Mechanismus der Erzeugung von ROS durch Cu^{II} -Ionen und Ascorbinsäure.....	62

Schema 3.20: Bildung von metallgebundenen ROS durch Cu-ATCUN-Komplexe.....	62
Schema 3.21: Ligandoxidation durch Komplexierung von Cu ^{II} -Ionen.....	73
Schema 3.22: Festphasen-Peptidsynthese der Ferrocen-Peptide P-Fc , P₂-Fc und P-Fc-P	74
Schema 3.23: Synthese von Ferrocen-Ethylendiamin 27	75
Schema 3.24: Boc-Schützung von Ethylendiamin.....	76
Schema 3.25: Synthese von Ferrocen 32 mit Boc-Ethylendiamin 34	76
Schema 3.26: Aktivierung der Ferrocendicarbonsäure 30 mit HATU.....	77
Schema 3.27: Synthese von Ferrocen 32 mit Fmoc-Ethylendiamin 36	77
Schema 3.28: Kopplung von Fmoc-Ethylendiamin 36	77
Schema 3.29: Generierung und Reaktion von Hydroxylradikalen bei der Oxidation von Ferrocen im sauren Milieu.....	81
Schema 3.30: Syntheseroute für die Phenanthrolinecarbonsäure 40 und das Peptid P-NH₂	84
Schema 3.31: Synthese des Kupfer(II)-Phenanthrolinekomplexes Cu(37)	85
Schema 3.32: Übersicht der synthetisierten Komplexe des Peptids P-Phen	87
Schema 3.33: Synthese des Kupfer(II)-Bis(phenanthroline)komplexes Cu(37)₂	90
Schema 3.34: Synthese der Nickel(II)-Phenanthrolinekomplexe Ni(37) und Ni(37)₂	91
Schema 3.35: Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd.....	98
Schema 3.36: Bildung von MDA durch Oxidation von DNA.....	99
Schema 3.37: Selbstkondensation von Malondialdehyd.....	100
Schema 3.38: Bildung von MDA durch Oxidation von Arachidonsäure.....	103
Schema 3.39: Mechanismus der Lipidperoxidation.....	104
Schema 3.40: Bildung von MDA bei der Lipidperoxidation.....	105
Schema 3.41: Synthese des Eisen(III)-EDTA-Komplexes 42	106
Schema 3.42: Redoxreaktion des Komplexes Cu(37)₂ während der DNA-Spaltung.....	118
Schema 3.43: Sterische Situation während der Reoxidation von Cu(43)₂	120
Schema 3.44: Übersicht der synthetisierten 2,9-disubstituierten Phenanthroline 44 – 49	121
Schema 3.45: Oxidation von Neocuproin (43) zum Dicarboxaldehyd 44	121
Schema 3.46: Oxidation von 44 zur Carbonsäure 45 mittels Salpetersäure.....	122
Schema 3.47: Veresterung der Carbonsäure 45 zum Monomethylester 46	122
Schema 3.48: Reduktion von 44 zum Alkohol 47 mit anschließender Substitution zum Bromid 48	123
Schema 3.49: Bromierung von Neocuproin (43).....	123
Schema 3.50: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen mit Neocuproin (43).....	124
Schema 3.51: Komplexierung von Kupfer(II)-perchlorat mit Neocuproin (43).....	127
Schema 3.52: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen mit dem Dialdehyd 44	130
Schema 3.53: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen durch die Carbonsäure 45 und den Ester 46	131
Schema 3.54: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen durch den Dialkohol 47	134
Schema 3.55: Komplexierung von Kupfer durch Brommethylphenanthroline 48	136
Schema 3.56: Umsetzung von Kupfer(II)-Ionen mit Tribrommethylphenanthroline 49	136
Schema 3.57: Hydrolyse von BNPP zu p-Nitrophenol.....	140

Schema 3.58: Mechanismus der DNA-Ligation.	142
Schema 3.59: Kondensation eines Aldehyds mit einem Hydrazid zum Hydrazon.	161
Schema 3.60: Säureinduzierte Hydrazonspaltung.	162
Schema 3.61: Synthese der Phenanthrolinhydrazone 53 – 55	162
Schema 3.62: Synthese des Hydrazons 57 ausgehend von Phenanthrolin (37).	163
Schema 3.63: Synthese des Kupfer(II)-Komplexes Cu(57)₂	166
Schema 3.64: Synthese des Kupfer(II)-Komplexes Cu(56)₂	166
Schema 3.65: Redoxgleichgewichte für <i>ortho</i> -Chinone am Beispiel des Liganden 57	168
Schema 3.66: Postulierter Mechanismus zur Bildung von Radikalen durch einen Kupfer(II)-Hydroxysalenkomplex in der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff.	169

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
app	<i>apparent</i> (offensichtlich)
Arg	Arginin
Asc	Ascorbinsäure
Asp	Asparaginsäure
ASU	<i>asymmetric unit</i> (asymmetrische Einheit)
ATCUN	<i>amino terminal Cu^{II} and Ni^{II} binding</i> (aminoterminal Cu ^{II} - und Ni ^{II} -bindend)
ATP	Adenosintriphosphat
β Ala	β -Alanin
BLM	Bleomycin
BNPP	Bis(<i>p</i> -nitrophenyl)phosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BODIPY	Bor-Dipyrrromethen (4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen)
Bu	Butyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CAT	<i>catalase</i> (Katalase)
cat.	<i>catalytic</i> (katalytisch)
CD	Circulardichroismus
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> (Korrelationsspektroskopie)
Cp	Cyclopentadienyl
CSA	<i>chicken serum albumin</i> (Hühnerserumalbumin)
CT-DNA	<i>calf thymus DNA</i> (Kalbsthymus-DNA)
Cys	Cystein
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan

calc	<i>calculated</i> (berechnet)
Dansyl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> (verzerrungsfreie Verstärkung durch Polarisationstransfer)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMPa	Dipyrrromethan
DMPe	Dipyrrromethen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
Dns	Dansyl
DSA	<i>canine (dog) serum albumin</i> (Hundeserumalbumin)
EcoRI	erste Nuclease (I) aus dem Stamm R von <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i> (Elektronenspinresonanz)
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i> (Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie)
Et	Ethyl
EtBr	Ethidiumbromid
eq	<i>equivalent</i> (Äquivalent)
Fc	Ferrocen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Energieresonanztransfer
G	Glycin
Glu	Glutaminsäure

Gly	Glycin
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H	Histidin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i> (heteronukleare Mehrfachbindungskorrelation)
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i> (heteronukleare Mehrfachquantenkohärenz)
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> (höchstes besetztes Molekülorbital)
HSA	<i>human serum albumin</i> (Humanserumalbumin)
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
Ile	Isoleucin
int	intrinsisch
IR	infrarot
Leu	Leucin
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital)
Lys	Lysin
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MDA	Malondialdehyd
Me	Methyl
MMPP	Magnesiummonoperoxophthalat
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPO	Myeloperoxidase
Mtt	4-Methyltrityl
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
neo	Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin)

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NOX	NADPH-Oxidase
P-3A	strukturelle Zwischenstufe der Biosynthese von Bleomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PeT	<i>photoinduced electron transfer</i> (photoinduzierter Elektronentransfer)
phen	1,10-Phenanthrolin
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RhB	Rhodamin B
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RP-HPLC	<i>reverse phase high-performance liquid chromatography</i> (Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie)
RSA	<i>rat serum albumin</i> (Rattenserumalbumin)
RT	Raumtemperatur
salen	Bis(salicyliden)ethylendiamin
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Ser	Serin
SOD	Superoxiddismutase
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasen-Peptidsynthese)
T4-Phage	Bakteriophage des Typs 4
Ts	Tosyl
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBA	<i>thiobarbituric acid</i> (Thiobarbitursäure)
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> (thiobarbitursäurereaktive Substanzen)
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran

Thr	Threonin
TIPS	Triisopropylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Trt	Triaryl
Tyr	Tyrosin
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i> (ultraviolett/sichtbar)
Val	Valin
vs.	<i>versus</i> (im Vergleich zu)
XO	Xanthinoxidase

1. Synopsis

1.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kupfer(II)- und Nickel(II)-bindende ATCUN-Peptidmotiv R-Dap- β Ala-His-Ser-Ser-CONH₂ über Festphasen-Peptidsynthese dargestellt und mit verschiedenen funktionellen Gruppen (R) derivatisiert. Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Rhodamin B, Dansyl oder BODIPY konnte nicht nur gezeigt werden, dass die entsprechenden Metallkomplexe effektive oxidative DNA-Spalter darstellen, sondern vielmehr, dass sie auch als redoxensitive Sonde fungieren können. In den Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die durch Energieübertragung ausgelöste Fluoreszenzlöschung bei der Reduktion des Kupfer(II)-Zentrums während der DNA-Spaltung teilweise wieder aufgehoben werden kann.

Die Kopplung von Ferrocen an das Peptid als funktionelle, redoxaktive Gruppe sollte hingegen die Synthese einer selbstaktivierenden Nuclease ermöglichen. Die Gelelektrophorese-Experimente zeigten jedoch, dass nur die Kombination zweier direkt benachbarten Kupfer(II)-Zentren in einem Di(ATCUN)-Peptid einen positiven Einfluss auf die DNA-Spaltung hat und zur Aktivierung der Komplexe in der Abwesenheit eines Reduktions- bzw. Oxidationsmittels führt. Die Ferrocen-Einheit sorgte dagegen durch die Bildung von Hydroxyferrocen als Konkurrenzreaktion sogar zu einer Verminderung der DNA-Spaltaktivität. Die Einführung weiterer Metallzentren konnte aber auch durch die Funktionalisierung des ATCUN-Peptids mit dem Liganden 1,10-Phenanthrolin erreicht werden, dessen Kupfer(II)-Komplex bereits einen der effektivsten bekannten Spalter darstellt.

Die synthetisierten Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe wurden zudem nicht nur hinsichtlich ihrer Nucleaseaktivität untersucht, sondern auch ihr Potential als künstliche Proteasen und Reagenzien zur Peroxidation von Lipiden zu wirken evaluiert, wodurch dieses System ein breites biologisches Anwendungsspektrum ermöglicht. Besonders die Ergebnisse der DNA-Spaltung verdeutlichten allerdings, dass, auch wenn die Kombination aus einer Kupfer(II)-Phenanthrolin- und einer Kupfer(II)-ATCUN-Einheit in einer äußerst effektiven

Nuclease resultiert, die ausschließliche Verbesserung der Affinität der Komplexe zur DNA nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Aktivität ist.

Auf der Grundlage der Kombination von zwei Strukturmotiven wurde auch ein Kupfer(II)-Phenanthrolinhydrazonkomplex synthetisiert, der die Eigenschaften von Hydrazonen mit der Nucleaseaktivität von Kupfer(II)-Phenanthrolinen vereinen sollte. Die DNA-Spaltversuche konnten zwar aufgrund der starken strukturellen und elektronischen Veränderung des Phenanthrolingerüsts bei der Synthese des Hydrazons nicht die Erwartungen erfüllen, jedoch könnte hier ein Ansatzpunkt für zukünftige Experimente gelegt worden sein, der auch die Untersuchung weiterer Anwendungsmöglichkeiten der vielseitigen Funktionen von Hydrazonen zum Beispiel als Antioxidantien oder Antibiotika einschließt.

In einem weiteren Projekt auf Basis des 1,10-Phenanthrolins wurde untersucht, inwiefern die Veränderung der Substituenten in den Positionen 2 und 9 des Liganden eine generelle Auswirkung auf die DNA-Spaltung hat. Dabei wurde überprüft, inwieweit die bereits literaturbekannten Eigenschaften des 2,9-Dimethylderivats (Neocuproin), das bedingt durch die sterische Hinderung der Substituenten im Kupfer(II)-Komplex keine Nucleaseaktivität aufweist, auch auf andere Substituenten übertragbar ist. Dazu wurden verschiedene weitere Derivate synthetisiert und mittels CHN-Analyse, ESI-Massenspektrometrie und zum Teil auch über eine Strukturbestimmung mittels Röntgenbeugung charakterisiert. Die untersuchten Komplexe erreichten zwar in keinem Fall die Effizienz des Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexes, aber es konnte deutlich gezeigt werden, dass die DNA-Spaltung von der Art der Substituenten und damit von der Komplexstruktur und -stabilität abhängig ist.

Allgemein konnten während dieser Arbeit diverse Metallkomplexe dargestellt und bezüglich zahlreicher biologischer Funktionen untersucht werden. Dabei konnten sowohl Möglichkeiten als auch Grenzen für die Neu- und Weiterentwicklung von Komplexen der verwendeten Substanzklassen aufgezeigt werden.

1.2. Conclusion

The copper(II) and nickel(II) binding ATCUN peptide motif R-Dap- β Ala-His-Ser-Ser-CONH₂ was synthesized *via* solid-phase peptide synthesis and derivatized with different functional groups (R). By coupling fluorescent dyes such as rhodamine B, dansyl or BODIPY we could show that the corresponding metal complexes exhibit not only effective DNA cleavage activity but also that they can act as redox-sensitive probes. We found that the fluorescence quenching caused by energy transfer can be partially reversed by reduction of the copper(II) center during the DNA cleavage process.

Coupling ferrocene to the peptide as a functional, redox-active group, however, should gain access to a self-activating nuclease. However, gel electrophoresis experiments showed that only the combination of two adjacent copper(II) centers in Di(ATCUN) peptides has a positive influence on DNA cleavage and results in activation of the complexes in the absence of a reducing or oxidizing agent. On the contrary, the ferrocene group led to an inhibition of the DNA cleavage activity by formation of hydroxyl ferrocene as a side reaction.

The implementation of additional metal centers could also be achieved by functionalization of the ATCUN peptide with the ligand 1,10-phenanthroline, the copper(II) complex of which is one of the most effective known DNA cleavers. The synthesized copper(II) and nickel(II) complexes were examined not only in terms of their nuclease activity but also their potential as artificial proteases and reagents for lipid peroxidation was investigated, whereby this system is given a wide range of biological applications. Although the combined copper(II) phenanthroline and copper(II) ATCUN unit results in a highly effective DNA cleavage, especially the outcomes of the DNA cleavage experiments made clear that only improving the affinity of the complexes to DNA does not lead to increased activity.

Based on the combination of two structural motifs a copper(II) phenanthroline hydrazone complex was synthesized, which should merge the properties of hydrazones with the nuclease activity of copper(II) phenanthrolines. Although the DNA cleavage experiments did not meet the expectations due to the big structural and electronic changes of the phenanthroline scaffold we set a starting point for future investigations of this ligand class.

These should also include the study of other possible applications of the versatile features of hydrazones, for example as an antioxidant or antibiotic.

Furthermore, in another project based on copper(II) phenanthroline we studied the general impact of substituents in positions 2 and 9 on the DNA cleavage activity. As it is known from the corresponding 2,9-dimethyl derivative (neocuproine) that the steric hindrance of the substituents in the copper(II) complex leads to the loss of the nuclease activity we examined to what extent the lack of the activity is transferable to other substituents. Therefore, further derivatives were synthesized and characterized by CHN analysis, ESI mass spectrometry and X-ray diffraction. Albeit the studied complexes have not achieved the efficiency of the copper(II) phenanthroline complex we could clearly show that the DNA cleavage depends on the nature of the substituents and thus on the complex structure and stability.

In conclusion, within the scope of this work various metal complexes were synthesized and investigated with regard to many biological applications. Thereby both opportunities and limitations for the development and advancement of complexes of the class of substances used herein were presented.

2. Einleitung

2.1. Krebs in Deutschland

In Deutschland wurden allein 2010 rund 470.000 Krebsneuerkrankungen und etwa 220.000 Krebssterbefälle verzeichnet.^[1] Damit ist Krebs (bösartige Gewebeneubildungen) nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Tabelle 2.1).^[2]

TABELLE 2.1: Übersicht über Neuerkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland (Auszug).^[1,2]

<i>Krankheit</i>	<i>Neuerkrankungen</i>			<i>Sterbefälle</i>		
	Männer	Frauen	Gesamt	Männer	Frauen	Gesamt
Krebs (Gesamt)	252 390	224 910	477 300	117 855	100 403	218 258
<i>Lunge</i>	35 040	17 030	52 070	29 381	13 627	43 008
<i>Darm</i>	33 800	28 630	62 430	13 489	12 510	25 999
<i>Prostata</i>	65 830	-	65 830	12 676	-	12 676
Kreislaufsystem	-	-	-	153 309	201 184	354 493

Die Zahlen offenbaren, dass die Entwicklung und Anwendung moderner Therapiemethoden unverzichtbar ist. Neben Radiotherapie und der photodynamischen Therapie stellt der Einsatz von Zytostatika einen großen Anteil dieser Methoden dar. Zytostatika hemmen dabei auf chemischem Wege durch Manipulation (Vernetzung, Alkylierung, Interkalation) oder Zerstörung (Spaltung) der DNA das Zellwachstum bzw. die Zellteilung, was schließlich zum Zelltod führen kann.^[3,4]

2.2. Grundlagen

2.2.1. DNA

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein langkettiges Biomolekül. Die in ihr enthaltenen Gene (Erbinformationen) codieren alle Informationen zur Herstellung von Ribonucleinsäuren (RNA), die wiederum die Informationen für die Synthese von Proteinen enthalten. Die DNA ist damit der Grundbaustein aller lebenden Organismen.

Der Aufbau der DNA ist im Verhältnis zur Vielzahl unterschiedlicher Lebensformen vergleichsweise einfach. Sie besteht aus zwei Polynucleotidketten, die gegenläufig eine doppelhelicale Struktur ausbilden. Das Rückgrat wird aus Desoxyriboseeinheiten gebildet, die über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Im Inneren dieser Doppelhelix befinden sich die Nucleobasen, die kovalent an die Zuckereinheiten gebunden sind. Zwischen den komplementären Purin- und Pyrimidinbasen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. (Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2A).^[5,6]

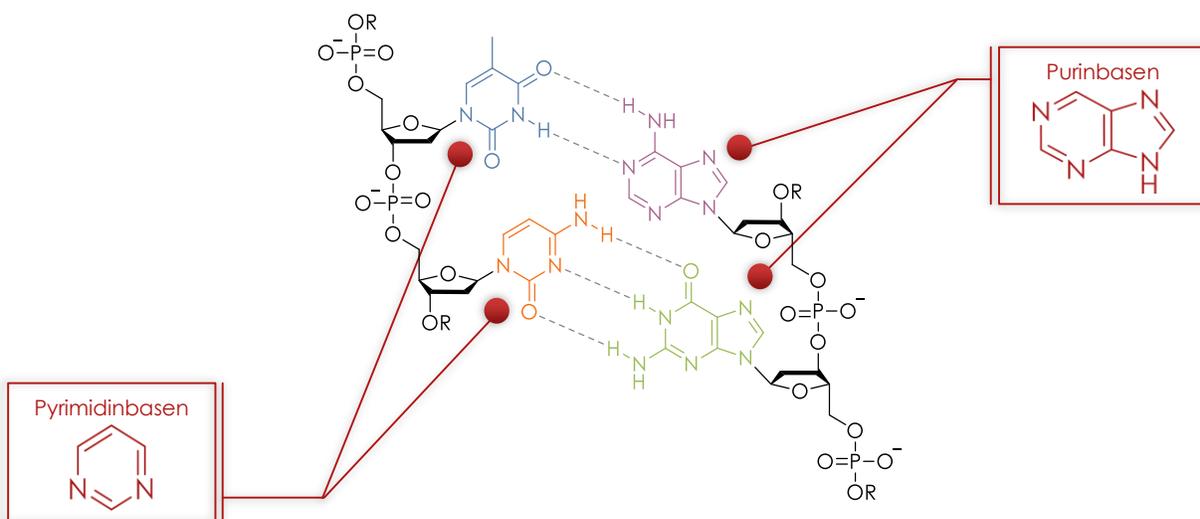


ABBILDUNG 2.1: Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang.^[5,6]
(Phosphatdesoxyribose-Rückgrat, --- Wasserstoffbrücken, Thymin, Adenin, Cytosin, Guanin)

Während die Wasserstoffbrückenbindungen nur einen kleinen Teil zur Stabilität der DNA beitragen, sind es vor allem Stapelwechselwirkungen zwischen übereinanderliegenden Basen, die die DNA thermodynamisch stabilisieren (Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2B).^[7]

Das negativ geladene Phosphatrückgrat sorgt zusätzlich für einen Schutz der DNA gegenüber nucleophilen Angriffen und verleiht ihr unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit von einigen Tausend bis hin zu Millionen Jahren (bezogen auf die spontane Esterhydrolyse).^[8,9]

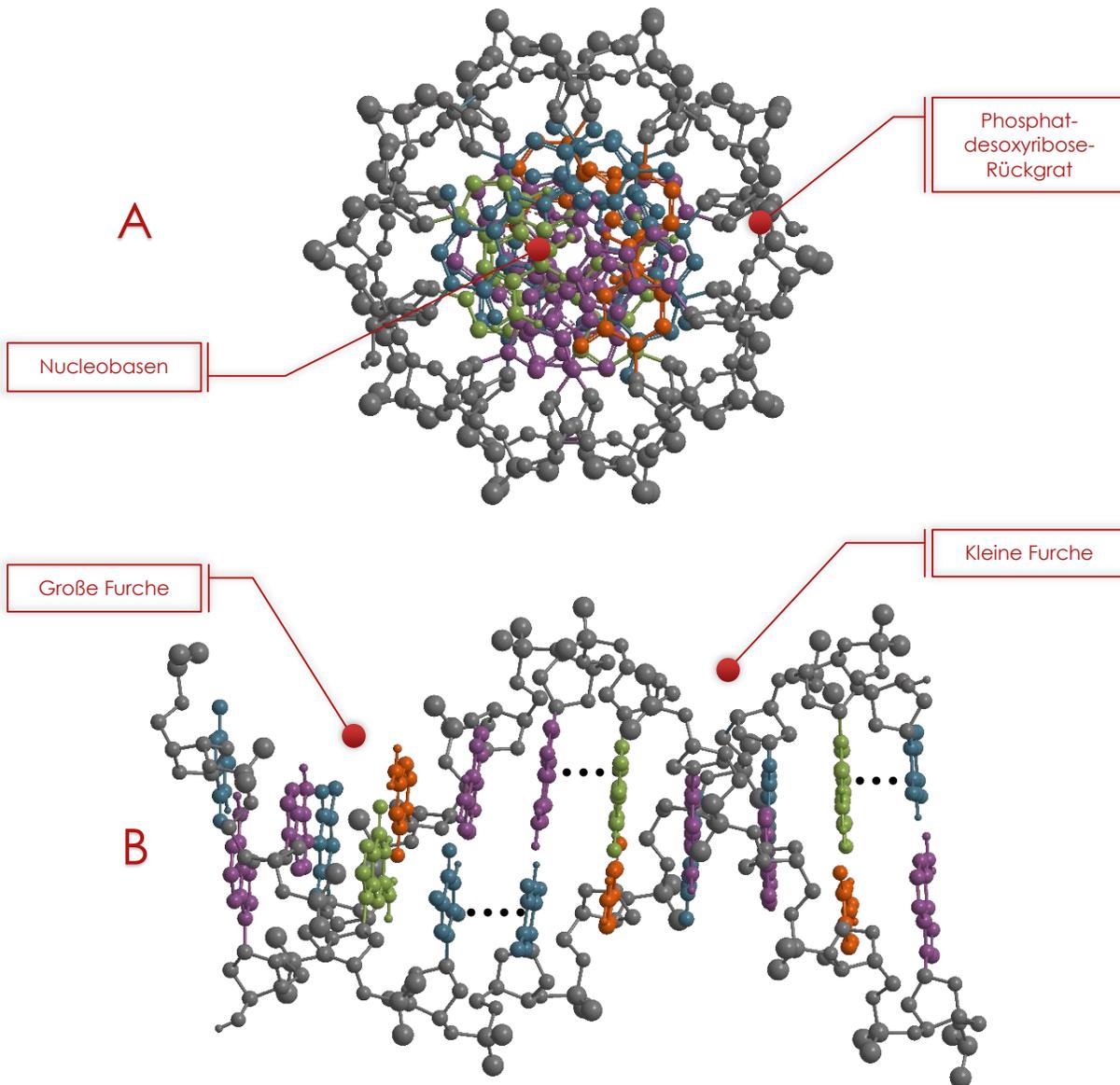


ABBILDUNG 2.2: Schematischer 3D-Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang.^[5-7]
 A: Draufsicht mit dem äußeren Rückgrat und den innenliegenden Basen.
 B: Seitenansicht mit Stapelwechselwirkungen (•••) und den Furchen.
 (Phosphatdesoxyribose-Rückgrat, Thymin, Adenin, Cytosin, Guanin)

In Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2B lässt sich erkennen, dass die Geometrie der Basenpaare, d.h. der Winkel zwischen den glycosidischen Bindungen unter denen die

Zuckereinheiten mit den Basen verbunden sind (120° und 240°), zur Bildung einer kleinen und einer großen Furche führt.^[5,10] An diesen Stellen liegen die Nucleobasen an der Oberfläche und stellen ideale Bindungsstellen und Angriffspunkte für körpereigene Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) oder körperfremde Moleküle (z.B. Interkalatoren wie Doxorubicin oder DNA-bindende Farbstoffe wie DAPI) dar (Abbildung 2.3).^[11-13]

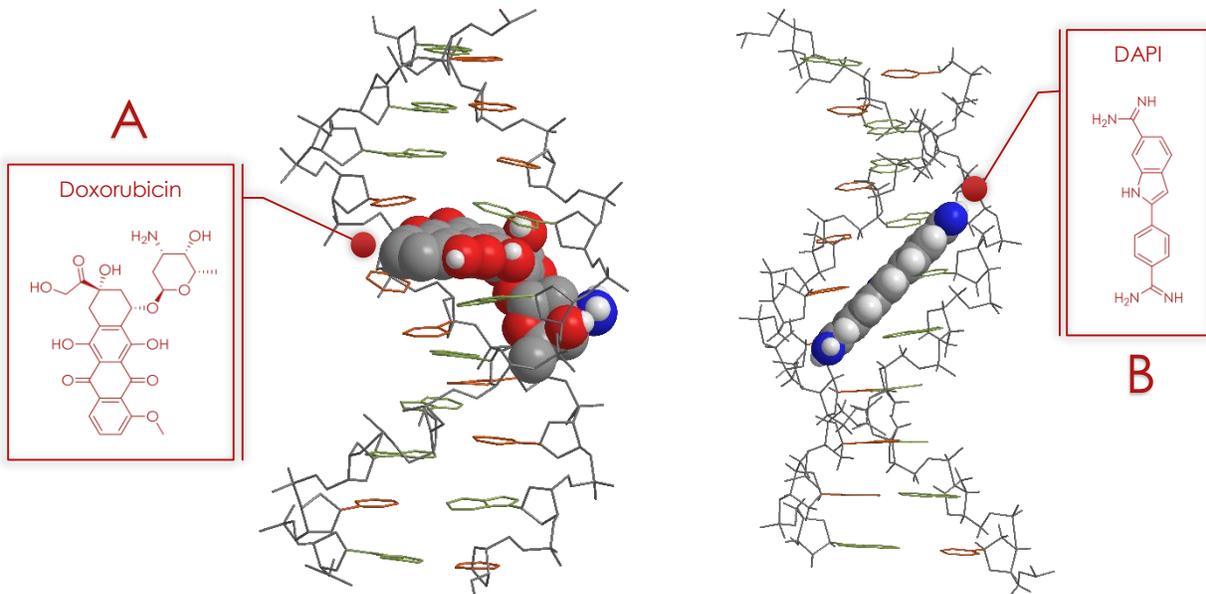


ABBILDUNG 2.3: Schematische 3D-Darstellung von DNA-Molekül-Wechselwirkungen.^[12,13]

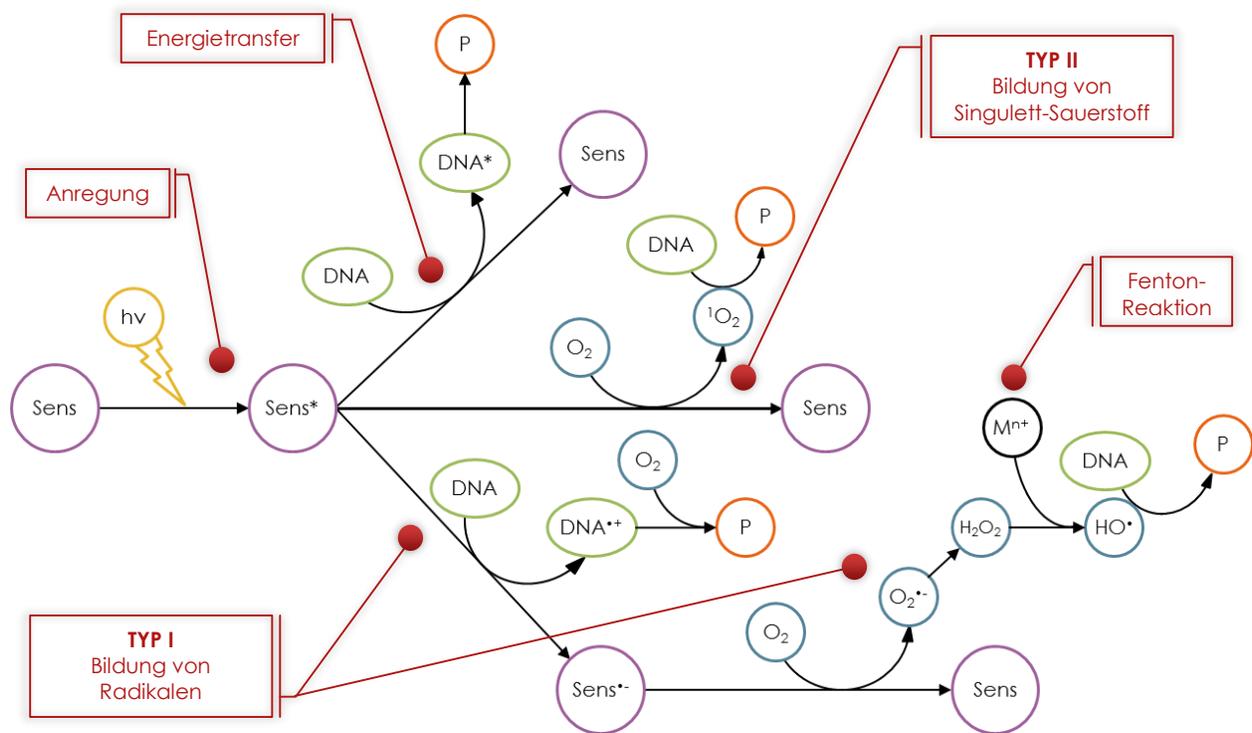
A: Interkalation von Doxorubicin zwischen die DNA-Basen.
B: Anlagerung von DAPI an die kleine Furche der DNA.
 (Phosphatdesoxyribose-Rückgrat, **Pyrimidinbasen**, **Purinbasen**)

2.2.2. DNA-Spaltung

Die Spaltung von DNA ist für viele natürliche Prozesse in lebenden Organismen von essentieller Bedeutung: Beispielsweise lösen Topoisomerasen^[14] Superspiralisierungen in der DNA während der Replikation und Transkription auf und Restriktionsenzyme^[15] bauen beim programmierten Zelltod (Apoptose) die DNA ab. Auch bei der Anwendung von Antitumor-Medikamenten stellt die gezielte DNA-Spaltung einen Therapieansatz dar. Allgemein existieren dabei drei verschiedene Arten der Spaltung: die photochemische, hydrolytische und oxidative Spaltung.

Die photochemische Spaltung von DNA ist sehr komplex und vielfältig. Je nach Art des Photosensibilisators (durch sichtbares oder UV-Licht aktivierbare Substanz) umfassen die Mechanismen, die zum Bruch der DNA-Stränge führen (Schema 2.1):^[16–18]

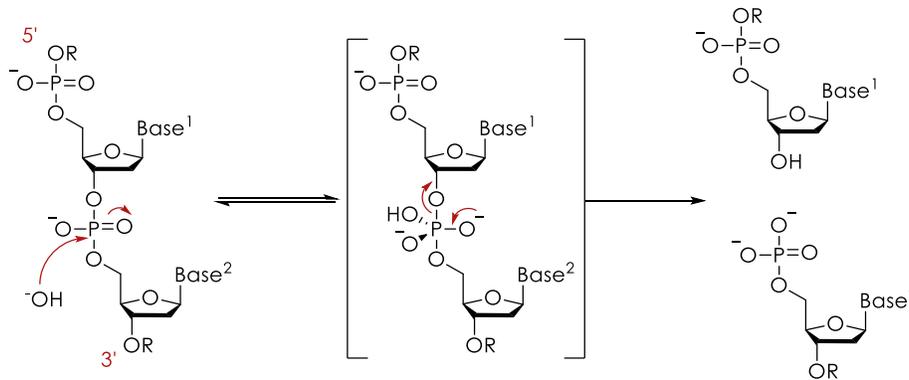
- die Erzeugung von Radikalen durch Elektronen-Transferprozesse zwischen den Basen und dem Sensibilisator oder durch Wasserstoffabstraktion an den Nucleobasen oder den Zuckereinheiten (Typ I)
- den Angriff der DNA durch Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion) (vgl. oxidative Spaltung von DNA)
- die Bildung von Singulett-Sauerstoff und Oxidation der DNA (Typ II)
- die Bildung von Addukten mit den Nucleobasen
- den direkten Energietransfer



SCHEMA 2.1: Übersicht über die Mechanismen der photochemischen DNA-Spaltung.^[16–18]
 (Photosensibilisator (* angeregt, •- Radikalanion), Licht, DNA (* angeregt, •+ Radikalkation),
 Sauerstoff/Sauerstoffspezies, Produkt (geschädigte DNA), Metallion)

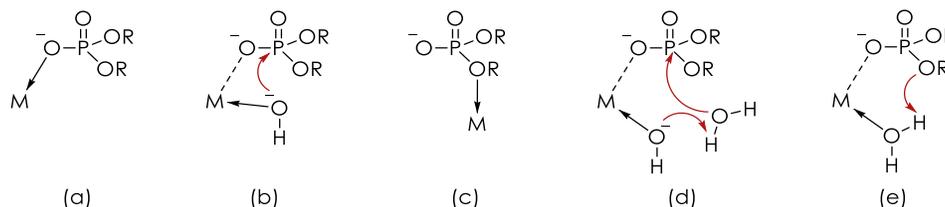
Im Gegensatz dazu werden bei der hydrolytischen Spaltung die Phosphodiesterbindungen des DNA-Rückgrats hydrolysiert. Die Hydrolyse ist reversibel und beginnt mit einem nucleophilen Angriff auf die Phosphatbindung, wodurch ein

fünfgliedriges Intermediat gebildet wird. Anschließend erfolgt die Spaltung der Esterbindung in 3'- oder 5'-Position (Schema 2.2).^[19,20]



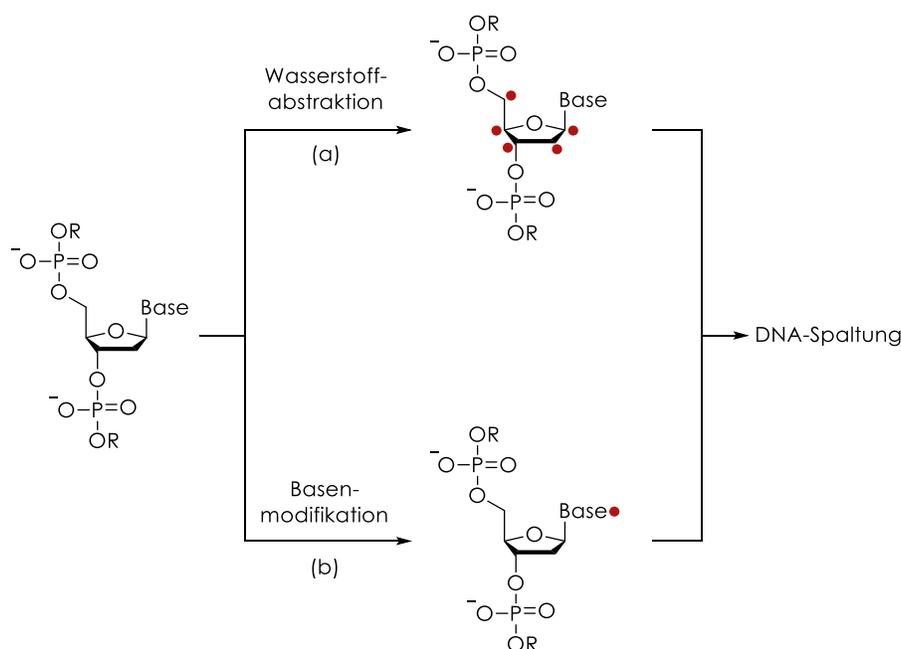
SCHEMA 2.2: Mechanismus der hydrolytischen DNA-Spaltung in 3'-Position.^[19]

Unter physiologischen Bedingungen ist die DNA gegenüber der spontanen Hydrolyse nahezu inert. Enzyme wie Nucleasen, Phosphatasen und Topoisomerasen sind jedoch in der Lage diese Reaktion zu katalysieren, wodurch die Rate der Esterspaltung um das bis zu $10^{17} - 10^{21}$ -fache gesteigert werden kann.^[21-23] Viele dieser Enzyme nutzen dabei die Lewis-Acidität von redoxinerten Metallionen, um über Koordination die Phosphatgruppe (a) oder Wassermoleküle bzw. Hydroxidionen (b) zu aktivieren, die Abgangsgruppengüte des sich abspaltenden Alkohols zu verbessern (c) oder eine „indirekte Säure/Base-Katalyse“ zu initiieren (d/e) (Schema 2.3).^[19-21] Daher werden auch für die Entwicklung künstlicher Hydrolasen als Enzymmimetika oftmals Komplexe redoxinierter Metallionen wie Zn^{II} [24], Co^{III} [25-27] oder dreiwertige Lanthanoidionen^[28,29] verwendet.^[30,31]



SCHEMA 2.3: Mögliche Arten der Aktivierung der Phosphodiester zur Hydrolyse durch Lewis-saure Metallionen (M).^[19-21]

Die oxidative DNA-Spaltung wiederum ist irreversibel und beruht auf Wechselwirkungen zwischen reaktiven Intermediaten und dem Zuckergerüst oder den Nucleobasen der DNA. Reaktive Intermediate wie ROS (reaktive Sauerstoffspezies) oder metallgebundene Sauerstoffspezies (z.B. M-OOH, M-OH) werden dabei von redoxaktiven Metallkomplexen gebildet (z.B. Cu^{II} oder Fe^{II}), wenn sie bei der Oxidation des Metallzentrums Elektronen beispielsweise auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die eigentliche Spaltung der DNA kann dann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Eine Möglichkeit ist die Radikalbildung durch Wasserstoffabstraktion an den Riboseeinheiten^[32]; eine andere die Modifikation der Basen^[33], was in der Folge zu instabilen Stellen in der DNA führt (Schema 2.4).



SCHEMA 2.4: Schematische Darstellung der oxidativen DNA-Spaltung durch Wasserstoffabstraktion (a) und Basenmodifikation (b).^[32,33]
(• modifizierte, labile Stelle in der DNA)

Viele Erkenntnisse über die oxidative Spaltung und deren Mechanismus stammen von Untersuchungen zu Bleomycin^[34–36], einem in Bakterien vorkommenden Glycopeptid, und dem [Cu^{II}(phen)₂]²⁺-Komplex^[37–40], einem der ersten und effektivsten DNA-Spaltern. Im Fall des Cu^{II}-Komplexes des 1,10-Phenanthrolins (Abbildung 2.4) führen nach Reduktion des Metallzentrums und Reaktion mit molekularem Sauerstoff metallgebundene ROS (Cu^{II}-•OH / Cu^{III}-OH oder Cu^I-OOH) zur Abstraktion eines

Wasserstoffatoms in C1'-Position. Durch anschließende Oxidation dieser Position und Umlagerung wird der 5'-Phosphatrest abgespalten. Im letzten Schritt wird das gebildete Carbokation von einem Wassermolekül angegriffen und substituiert unter Ketonbildung die Nucleobase. Gleichzeitig wird der 3'-Phosphatrest abgespalten und es bleibt ein Furanon zurück (Schema 2.5).^[32,39,41-43]

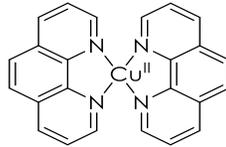
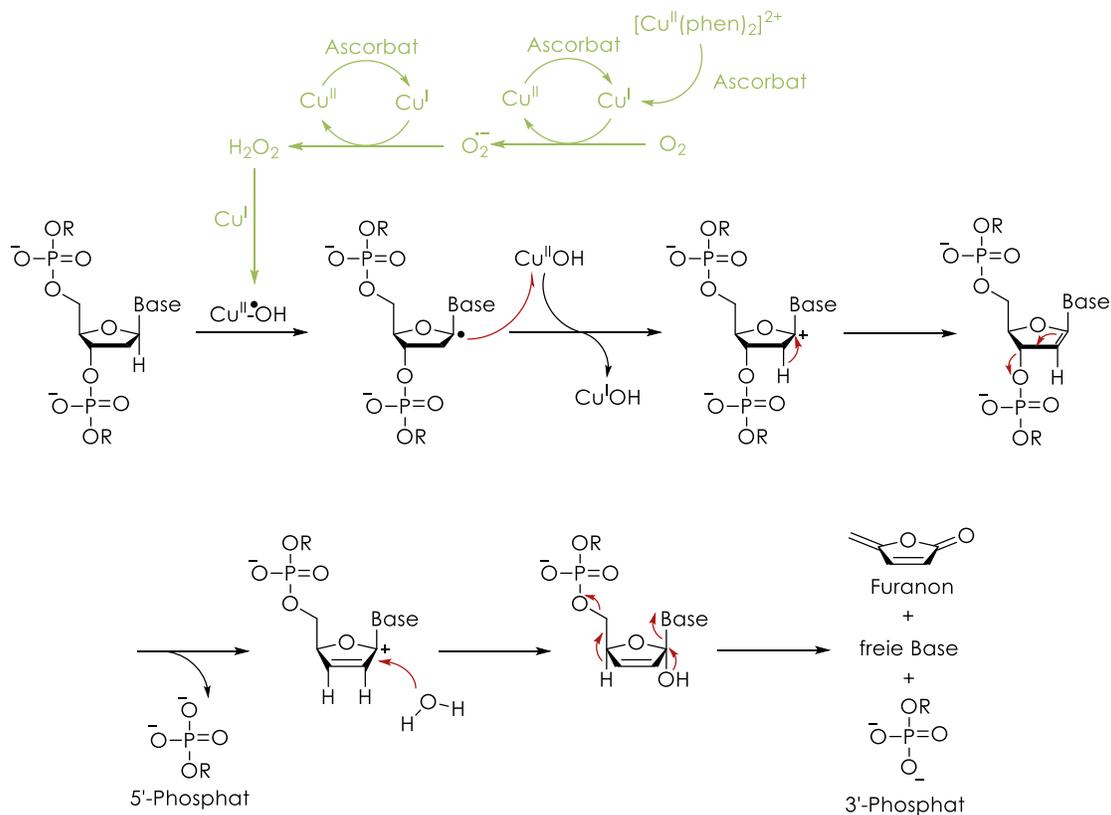


ABBILDUNG 2.4: Struktur des Cu^{II}-Komplexes von 1,10-Phenanthrolin.



SCHEMA 2.5: Vermuteter Reaktionsweg für die DNA-Spaltung durch [Cu^{II}(phen)₂]²⁺.^[32,39,41-43]
 [Cu^I und Cu^{II} beschreiben phenanthrolinegebundene Kupferionen,
 vermutete und vereinfachte Redoxchemie des Metallkomplexes]

Im Vergleich dazu ist der Eisenkomplex des Bleomycins (Abbildung 2.5) in seiner aktivierten Form $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}(\text{BLM})]$ in der Lage nach erfolgter Homolyse, Heterolyse oder direkter Reaktion des Eisenzentrums mit dem C4'-Wasserstoffatom an der DNA ein Radikal zu bilden. Das Radikal reagiert anschließend mit molekularem Sauerstoff zu einem Peroxid. Nach Sauerstoffinsertion und Umlagerung wird die DNA unter Bildung eines 3'-Phosphorglycolats, eines Aldehyds und eines 5'-Phosphats gespalten (Schema 2.6).^[34,36,44]

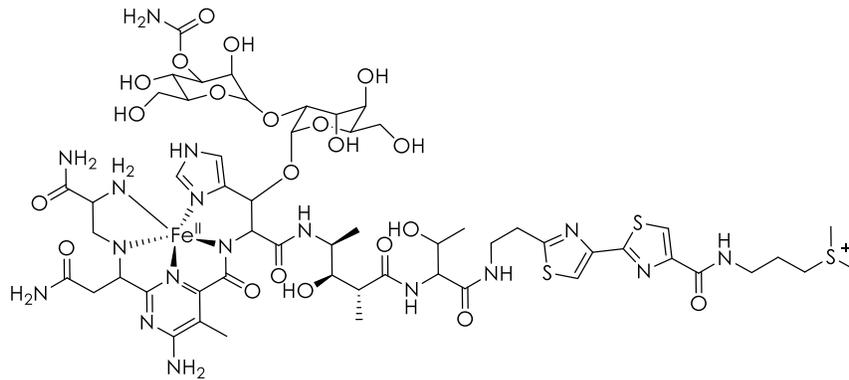
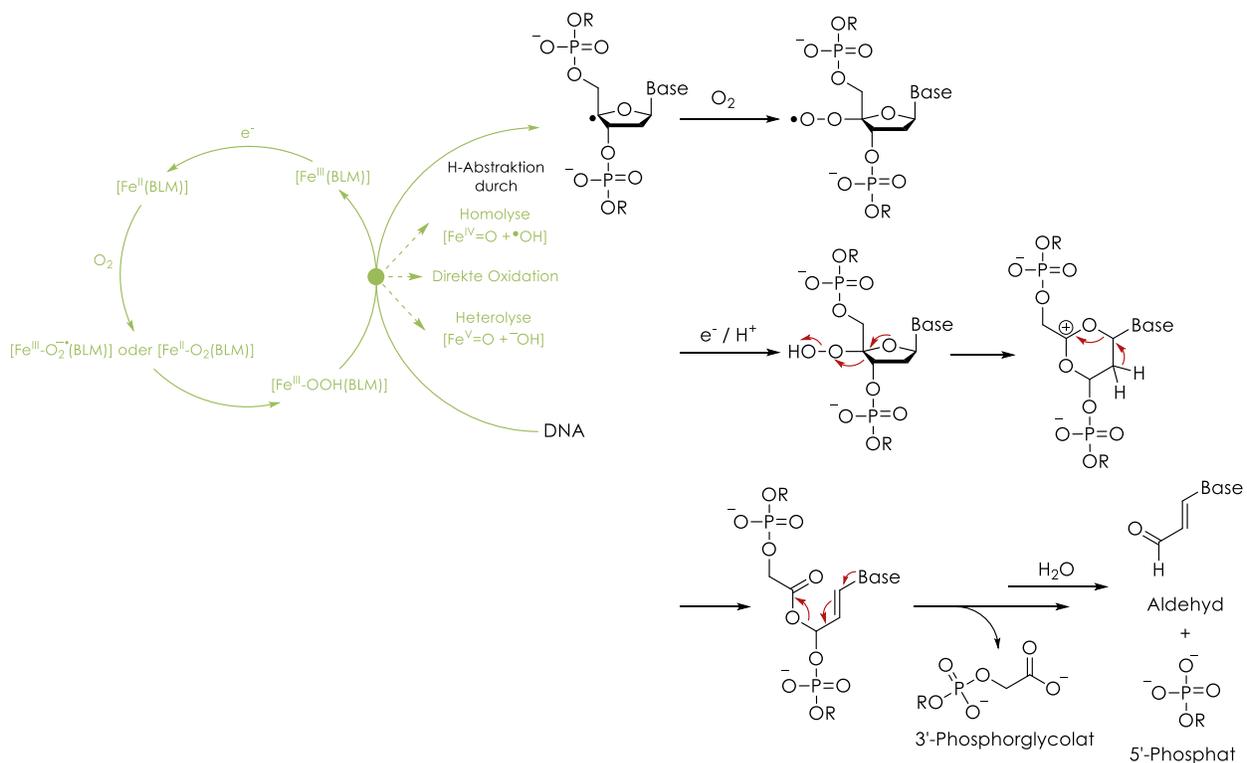


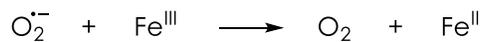
ABBILDUNG 2.5: Struktur des Fe^{II} -Komplexes von Bleomycin A_2 .^[36]



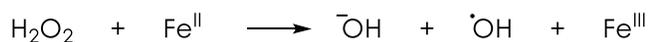
SCHEMA 2.6: Vermuteter Reaktionsweg für die DNA-Spaltung durch $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})]$.^[36,44]
(vermutete und vereinfachte Redoxchemie des Metallkomplexes)

Die hier im Schema 2.5 und Schema 2.6 abgebildeten Reaktionswege zur Spaltung von DNA stellen lediglich zwei explizite Beispiele dar. Abhängig vom eingesetzten Metallkomplex und den Reaktionsbedingungen variieren sowohl die Angriffstellen an der DNA als auch die daraus resultierenden Produkte. Entscheidend für alle oxidativ spaltenden Komplexe ist jedoch die Aktivierung des Metallzentrums durch Reduktions- oder Oxidationsmittel und die durch die ablaufenden Redoxreaktionen generierten ROS. Die Mechanismen zur Bildung von Hydroxylradikalen sind dabei aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens bei der DNA-Spaltung wohl am besten erforscht. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnte *HENRY J. H. FENTON* zeigen, dass Eisen(II)-Ionen und Wasserstoffperoxid der Oxidation organischer Substanzen dienen können.^[45] Weitere Untersuchungen u.a. durch *FRITZ HABER* und *JOSEPH WEISS* in den 1930er Jahren konnten schließlich die Beteiligung von Radikalen nachweisen (Haber-Weiss-Reaktion).^[46] Da auf diesem Wege freie Radikale mit Substanzen erzeugt werden können, die *in vivo* verfügbar sind, geht man heutzutage davon aus, dass die Fenton-Reaktion (a) bzw. Fenton-ähnliche Reaktionen (b/c) mit Übergangsmetallen wie Cu^{II}, Ni^{II} oder Co^{II} die Hauptquellen für ROS in Zellen darstellen (Schema 2.7).^[32,33,47–49]

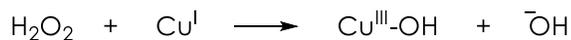
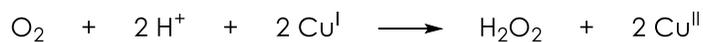
(a) Haber-Weiss-Reaktion



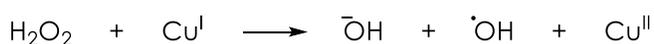
Fenton-Reaktion



(b) Fenton-ähnliche Reaktion



(c) Fenton-ähnliche Reaktion mit Ascorbinsäure



SCHEMA 2.7: Einige Reaktionen zur Bildung von Hydroxylradikalen.^[32,33,45–49]

2.2.3. Zytostatika

Das erste zugelassene Zytostatikum Mechlorethamin (1942), eine Stickstoff-Lost-Verbindung, die sich vom Senfgas ableitet, wurde bereits während des Zweiten Weltkrieges entdeckt (Abbildung 2.6). Hier konnte erstmals eine wachstumshemmende Wirkung auf Zellkulturen nachgewiesen werden.^[50,51]

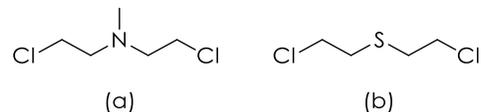
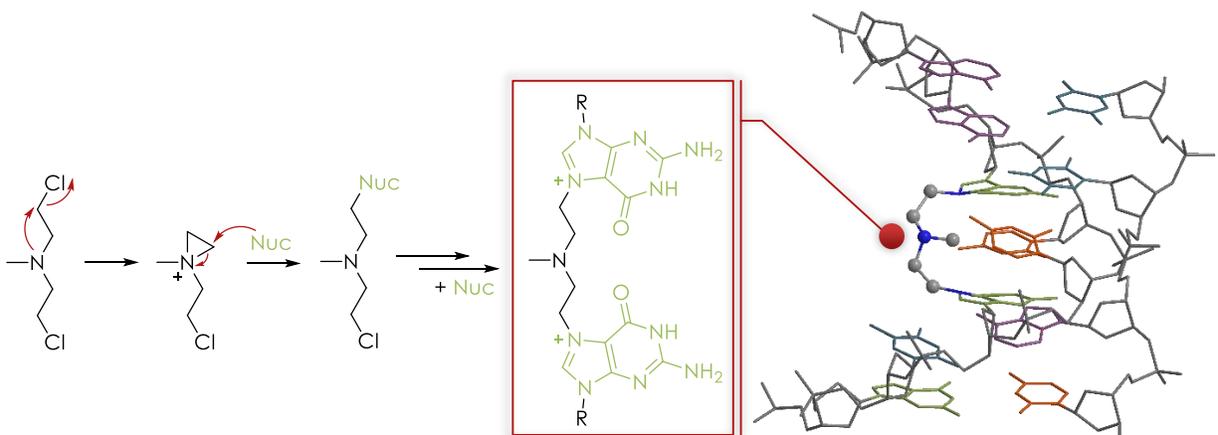


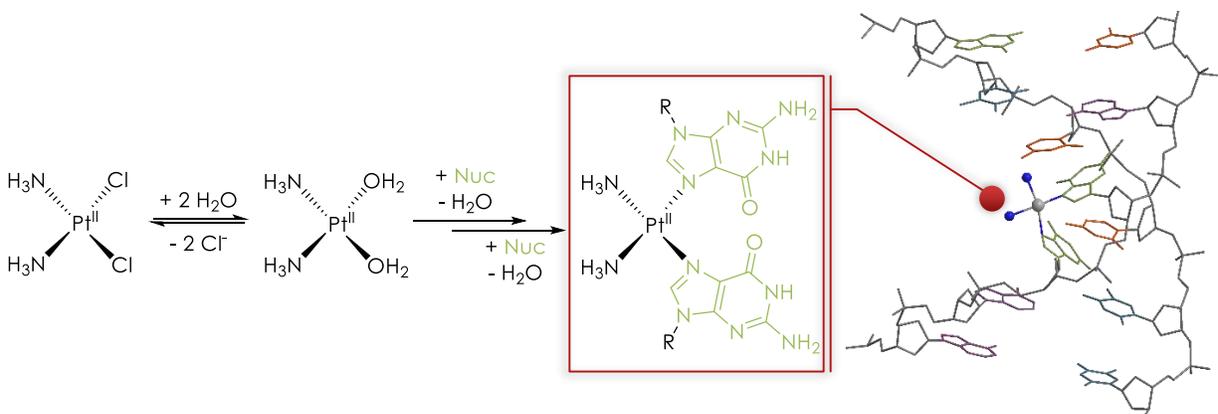
ABBILDUNG 2.6: Strukturen des Mechlorethamins (a) und der Stammverbindung S-Lost (b).

Zusammen mit der Entdeckung der biologischen Aktivität von Bleomycin 1966 durch *HAMA O UMEZAWA*^[34,35] und der durch Zufall entdeckten zytostatischen Wirkung von Cisplatin durch *BARNETT ROSENBERG* Mitte der 1960er Jahre^[52,53] erlebte die Krebsforschung und Krebstherapie eine Revolution. Die fortwährende Erforschung dieser Substanzen konnte zeigen, dass die Wirkung von Bleomycin auf der oxidativen Spaltung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies beruht (vgl. Abschnitt 2.2.2). Alkylantien wie Mechlorethamin dagegen vernetzen die DNA durch hochgradige Methylierung der Nucleobasen. Die resultierende Quartärisierung der Stickstoffatome der Basen führt letztlich zum Strangbruch (Schema 2.8).^[54,55]



SCHEMA 2.8: Quervernetzung von DNA-Strängen durch Reaktion der nucleophilen N(7)-Atome zweier **Guanine (Nuc)** mit dem Aziridiniumion des Mechlorethamin.^[54,55]
 (Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphatdesoxyribose-Rückgrat, Thymin, Adenin, Cytosin, Guanin)

Ebenso wie Alkylantien verursacht Cisplatin Intra- und Interstrangverknüpfungen in der DNA-Basenabfolge, löst Punktmutationen aus und hemmt die DNA-Reparatur.^[56] Aufgrund seiner Elektrophilie koordiniert das Platinzentrum bevorzugt am N(7)-Atom von Guanin- und Adeninresten (Schema 2.9).^[57–59] Die Vernetzung zweier benachbarter Guanine führt dabei, bedingt durch die quadratisch-planare Koordinationsumgebung des Pt^{II}-Atoms, zur Verdrehung der Basen zueinander und zur Biegung der Helixachse um etwa 40° in Richtung der großen Furche, wodurch die gegenüberliegende kleine Furche exponiert wird. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen bleiben dabei jedoch erhalten.^[57,58,60]

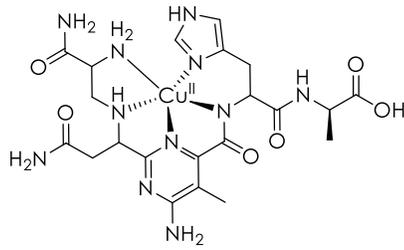


SCHEMA 2.9: Quervernetzung von DNA-Strängen durch Cisplatin an den N(7)-Atomen zweier benachbarter Guanine (Nuc).^[57,58,60]
 (Stickstoff, Platin(II), Phosphatdesoxyribose-Rückgrat, Thymin, Adenin, Cytosin, Guanin)

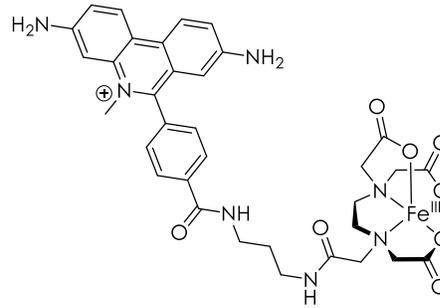
Durch die Orientierung an der Struktur und Wirkweise von Verbindungen wie Bleomycin (a/b)^[61,62] oder Cisplatin (c-e)^[63–68] gelang es seither, zahlreiche neue potenzielle Zytostatika bzw. Chemotherapeutika zu synthetisieren, die durch Variation der Liganden oder des Metallzentrums verbesserte Wirksamkeit, geringere Nebenwirkungen und/oder weniger Resistenzen aufweisen (Abbildung 2.7A). Daneben wurden aber auch zahlreiche neue Substanzen und Substanzklassen entdeckt. Nicht selten dienen für die Entwicklung dieser verbesserten Chemotherapeutika in der Natur bereits vorhandene Struktur motive als Vorbild (Abbildung 2.7B). Zu den bekanntesten Beispielen gehören wohl die auf der Klasse der Anthracycline beruhenden Verbindungen Daunorubicin (f) und Doxorubicin (g), die als DNA-Interkalatoren das Binden von Polymerasen und Topoisomerasen hemmen und damit die Transkription der DNA zur RNA-Synthese und die Replikation zur Zellteilung stören (vgl. Abbildung 2.3A).^[12,69]

A

Strukturelle und funktionelle Analoga zu [Fe(II)(BLM)]

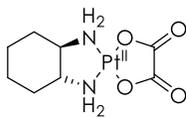


(a)
[Cu(II)(P-3A)]

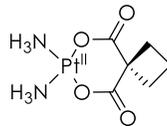


(b)
[Fe(III)(Methidiumpropyl-EDTA)]

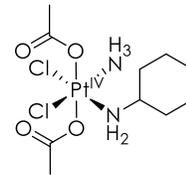
Strukturelle und funktionelle Analoga zu Cisplatin



(c)
Oxaliplatin



(d)
Carboplatin

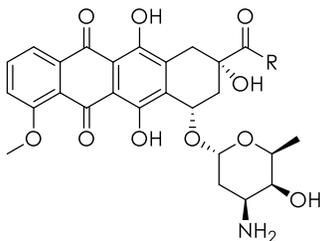


(e)
Satraplatin

B

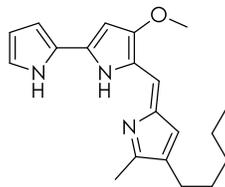
Natürliche Vorbilder

Anthracycline



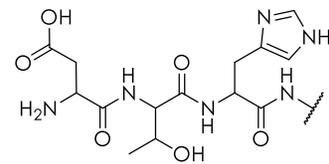
(f / g)
R = CH₃ Daunorubicin
R = CH₂OH Doxorubicin

Tripyrrole



(h)
Prodigiosin

Peptide/Proteine



(i)
N-Terminus von BSA

ABBILDUNG 2.7: Strukturen verschiedener, potentieller Chemotherapeutika.

A: Einige Analoga von Bleomycin^[61,62] und Cisplatin.^[63-68]
B: Einige Verbindungen mit natürlichen Vorbildern.^[12,69-75]

Des Weiteren stehen auch Koordinationsverbindungen im Fokus aktueller Forschung: So weisen beispielsweise die Kupfer(II)-Komplexe der Prodigiosine (h) (ein in Bakterien vorkommendes rotes Tripyrrol zum Membrantransport von Chloridionen)^[70-72], sowie die metallbindenden ATCUN-Peptide (i), die dem natürlichen N-Terminus einiger Albumine nachempfunden sind^[73-75], eine gute Antitumor-Wirkung auf.

2.3. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte das ATCUN-Pentapeptid mit der Sequenz Dap- β Ala-His-Ser-Ser-CONH₂ mittels Festphasen-Peptidsynthese dargestellt und mit Fluoreszenzfarbstoffen und redoxaktiven Metallzentren (Ferrocen, [Cu(phen)₂]²⁺) funktionalisiert werden. Die entsprechenden Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe sollten anschließend über Gelelektrophorese-Experimente und spektroskopische Methoden hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften untersucht werden (Nuclease- und Proteaseaktivität, DNA-Wechselwirkungen, Lipidperoxidation). Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Nucleaseaktivität gelegt werden und wie sie sowohl durch die Wahl des Metallzentrums (Cu^{II} oder Ni^{II}) als auch durch die Erweiterung des ATCUN-Peptids um eine weitere Metallbindungsstelle im Peptid selbst (Di(ATCUN)-Sequenz: Dap- β Ala-His-Ser-Ser-Dap- β Ala-His-CONH₂) oder durch eine funktionelle Gruppe verändert werden kann. Für die Fluorophor-ATCUN-Peptide sind dabei zusätzlich die Auswirkungen der Redoxreaktionen während der DNA-Spaltung auf die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Farbstoffe von großem Interesse und inwiefern diese für spektroskopische Zwecke ausgenutzt werden können. Dabei sollten auch genauere Informationen über den Mechanismus der DNA-Spaltung und den Mechanismus der Fluoreszenzlöschung gewonnen werden.

Darüber hinaus sollte auch auf Grundlage des bereits für die Peptide verwendeten Phenanthrolinliganden einerseits die Möglichkeit untersucht werden, wie sich die Eigenschaften des Kupfer(II)-Komplexes dieses Liganden in Kombination mit Hydrazonen, einer weitverbreiteten und häufig in der bioanorganischen Chemie verwendeten Strukturklasse mit zahlreichen biologischen Anwendungen, in den Positionen 2 und 9 bzw. 5 verändern, erweitern und eventuell verbessern lassen. Auf der anderen Seite sollte im Zuge dieser Untersuchung die generelle Beeinflussung der DNA-Spaltung durch Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexe untersucht werden, wenn sich verschiedenartige Substituenten in den Positionen 2 und 9 befinden. Ausgehend von Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin), das aufgrund der sterischen Hinderung der Methylsubstituenten selbst keine Nucleaseaktivität aufweist, sollten sechs weitere Derivate synthetisiert, charakterisiert und hinsichtlich ihrer DNA-Wechselwirkung und -Spaltaktivität untersucht werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. ATCUN-Komplexe

3.1.1. Stand der Forschung

Die Grundlage für das ATCUN-Peptidmotiv (*amino terminal copper(II)- and nickel(II) binding motif*) findet sich in einigen natürlichen Proteinen:^[74]

- dem Blutplasmaprotein Albumin^[76,77]
- dem Gastrin-freisetzenden Protein Neuromedin C^[78]
- dem während der Spermatogenese wichtigen humanen Protamin P2a^[79]
- und den antibakteriellen und wundheilungsfördernden Histatinen^[80]

Historisch betrachtet sind besonders Albumine für die Entwicklung künstlicher ATCUN-Peptide von großer Bedeutung. Albumine und Albumin-Homologe sind eine weitverbreitete globuläre Proteingruppe und können in allen Wirbeltieren gefunden werden, wo sie unterschiedliche Funktionen erfüllen (Abbildung 3.1).^[74,75,81,82] Im menschlichen Körper sorgen sie beispielsweise neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks durch Binden von Wasser auch für die Erhöhung der Wasserlöslichkeit kleiner Moleküle (z.B. Fettsäuren, Hormone und Cholesterin) sowie für die Immobilisierung und den Transport von Ionen, insbesondere von Kupfer(II)- und Nickel(II)-Ionen im Blutplasma.^[82]

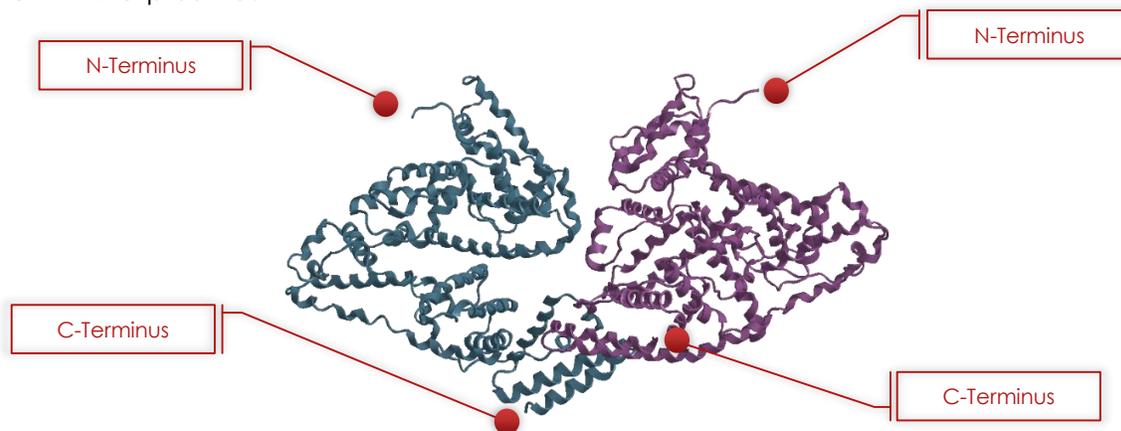
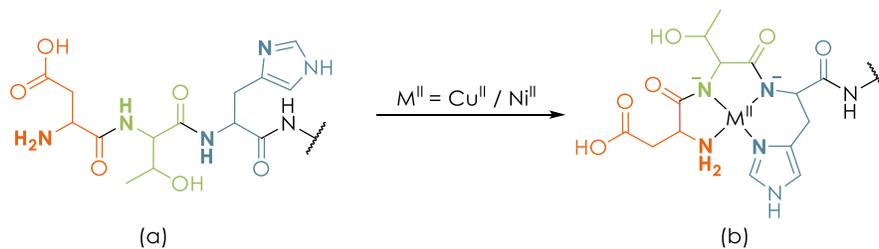


ABBILDUNG 3.1: Quartärstruktur des globulären Rinderserumalbumins.^[81]
(Untereinheit 1 und Untereinheit 2)¹

¹ Die Molekülstruktur des Albumins im Kristall wurde der Quelle [81] entnommen: A. Bujacz; *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 1278-1289.

Zur Bindung dieser Ionen ist der N-Terminus des Proteins von essentieller Bedeutung. Die Struktur dieser Bindungsstelle wurde erstmals 1967 von THEODORE PETERS und FRANK A. BLUMENSTOCK untersucht.^[73] Sie konnten zeigen, dass in Rinderserumalbumin (BSA) die Komplexierung von Cu^{II}- und Ni^{II}-Ionen über die terminale α -Aminogruppe von Asparaginsäure, die zwei Amid-Stickstoffe von Threonin und Histidin und über das Stickstoffatom in Position 3 des Imidazolringes von Histidin erfolgt (Schema 3.1).



SCHEMA 3.1: Strukturen des N-Terminus^a im BSA (a) und des resultierenden Metallkomplexes (b).^[73]
(Asparaginsäure, Threonin, Histidin, koordinierende Stickstoffatome)

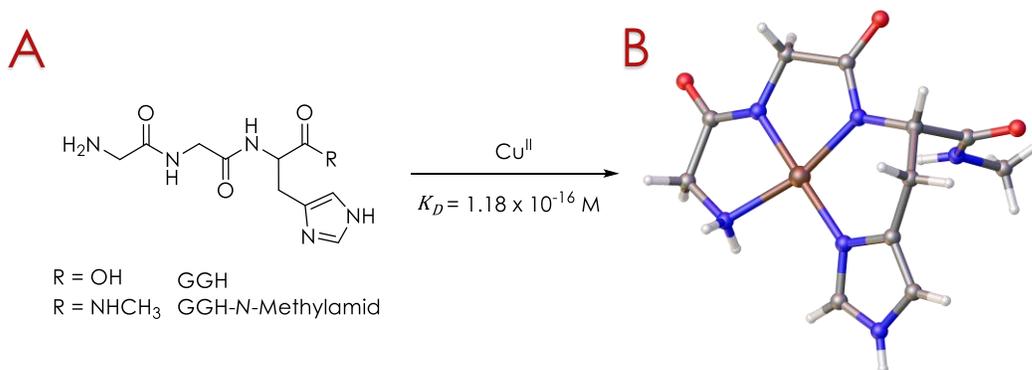
Die Untersuchung weiterer Albumine u.a. durch BIBUDHENDRA SARKAR und JOAN W. DIXON zeigte, dass einige Säugetierspezies Albumin-Homologe besitzen, bei denen sich in Position 3 kein Histidin befindet. Da dieses jedoch zwingend zur Komplexierung notwendig ist, geht man davon aus, dass Albumine nicht generell den Transport zweiwertiger Ionen in Lebewesen übernehmen (Tabelle 3.1).^[76,77,83,84]

TABELLE 3.1: Vergleich der N-terminalen Sequenz einiger Albumine.

Albumin (Lebewesen)	Sequenz am N-Terminus (ATCUN-Motiv)								
BSA (Rind) ^[76]	Asp	Thr	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	
RSA (Ratte) ^[77]	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	
HSA (Mensch) ^[77]	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	
DSA (Hund) ^[83]	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	
CSA (Huhn) ^[84]	Asp	Ala	Glu	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala

Die kontinuierliche Erforschung von Albuminen und insbesondere des ATCUN-Motivs seit nunmehr über 50 Jahren sorgte nicht nur dafür, dass die hohe Kupferaffinität vieler Albumine noch heutzutage in der Behandlung von Morbus Wilson, einer durch Genmutation hervorgerufenen Kupferstoffwechselkrankheit der Leber, Anwendung findet^[85], sondern ließ auch unser Verständnis des Motivs als kleine Metallbindungsstelle hin zu effektiven biologisch aktiven Molekülen wachsen.

Das einfachste und erste synthetische Peptid, das das ATCUN-Motiv imitiert, ist das Tripeptid Glycylglycylhistidin (GGH) (Schema 3.2A). Nachdem bereits in den 1970er Jahren die Bindungseigenschaften für Kupfer(II)-Ionen^[86] (Dissoziationskonstante $K_D = 1.18 \times 10^{-16} \text{ M}$) und die Molekülstruktur des $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGH-N-Methylamid})]$ -Komplexes^[87] durch die Arbeitsgruppe um *BIBUDHENDRA SARKAR* aufgeklärt wurden (Schema 3.2B), stellten *LINUS PAULING et al.* 1983 fest, dass $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGH})]$ in Anwesenheit von Ascorbat eine antiproliferative Wirkung gegenüber Ehrlich-Aszites-Tumorzellen *in vitro* aufweist.^[88] Detaillierte Untersuchungen zur Wirkungsweise zeigten, dass der Komplex die DNA unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich oxidativ durch Generierung von Hydroxylradikalen mittels Wasserstoffabstraktion am C4'-Atom spaltet.^[75]



SCHEMA 3.2: Komplexierung von Cu^{II} -Ionen durch Glycylglycylhistidin(*N*-methylamid).^[86]

A: Strukturen der Liganden.

B: Molekülstruktur des $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGH-N-methylamid})]$ -Komplexes.^{2,[87,89]}
(Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Kupfer, Wasserstoff (weiß))

In den vergangenen 20 Jahren wurde der $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGH})]$ - / $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{GGH})]$ -Komplex häufig verändert, um seine Eigenschaften, seine Spaltaktivität und sein Anwendungsspektrum (z.B. zur Proteinspaltung) zu erweitern. Vielfach wurden dabei Hybrid-Proteine dargestellt, die die DNA-Affinität und die DNA-Spaltspezifität erhöhen.

² Die Molekülstruktur des Cu^{II} -Komplexes im Kristall wurde der Quelle [87] entnommen: B. Sarkar *et al.*; *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1309-1316. Die Grafik wurde mittels des Programms Olex2 von OlexSys Ltd. erstellt.^[89]

Beispielsweise verknüpfte die Arbeitsgruppe um *PETER B. DERVAN* GGH mit dem N-Terminus der DNA-Bindungsregion des Proteins Hin-Rekombinase (Abbildung 3.2). Experimente mit Ni^{II} - und Cu^{II} -Ionen zeigten eine sequenzspezifische Spaltung der DNA.^[90-92] Ähnliche Ergebnisse konnten *YUKIO SUGIURA et al.* bei der Kombination von GGH mit dem Zinkfinger-Protein Sp1 erzielen.^[93]

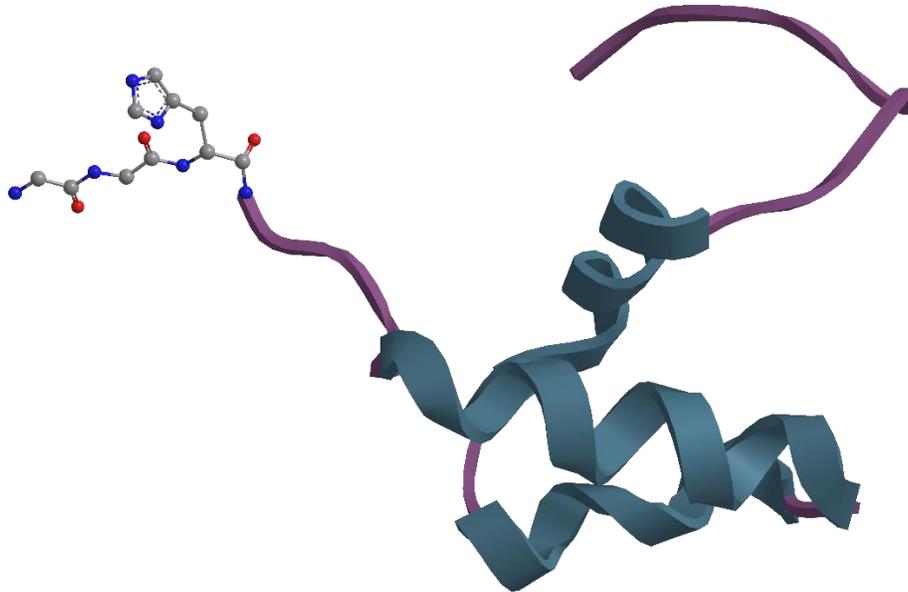


ABBILDUNG 3.2: Schematische Darstellung des Hybrid-Proteins Gly-Gly-His-Hin(139-190).^{3,[90-92,94]}
(Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff)

Generell kann die Spalteffizienz von $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{GGH})]$ / $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{GGH})]$ auch durch Abwandlung der Aminosäuresequenz verändert werden, da die biologische Aktivität durch die chemischen Eigenschaften der Seitenketten der Aminosäuren beeinflusst wird (Abbildung 3.3).^[95] Während der Imidazolring in Position 3 für die spezifische Bindung von Kupfer(II)-Ionen essentiell ist und eine Veränderung des C-Terminus' bzw. die Veränderung der Histidin-Position im Motiv zu beträchtlichen Änderungen in der Bindung von Cu^{II} -Ionen und der Interaktion mit DNA führen kann (a/d), können die Aminosäuren in Position 1 und 2 beliebig durch andere Aminosäuren ersetzt werden.^[96-98] Der Einbau von Lysin in den Peptiden Gly-Lys-His-CONH₂ (b) und Lys-Gly-His-Lys-CONH₂ (c) erhöht z.B. die Affinität bezüglich des DNA-Rückgrats aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen und damit auch die Spaltaktivität (Tabelle 3.2).^[95,99]

³ Die Molekülstruktur der Hin-Rekombinase wurde der Quelle [94] entnommen: R. E. Dickerson *et al.*; *Science* **1994**, 263, 348-355.

Der Kupfer(II)-Komplex des Peptids Arg-Gly-His-Leu (d) hingegen führt zu einer unspezifischen Bindung an die DNA und damit zu einer geringeren Spaltaktivität im Vergleich zu $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Arg-Gly-His})$.^[98]

TABELLE 3.2: Reaktionskonstanten 2. Ordnung für den Einzelstrangbruch von Plasmid-DNA.^[99]

<i>ATCUN-Peptid</i>	<i>k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) für Cu^{II}-Komplexe</i>	<i>k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) für Ni^{II}-Komplexe</i>
<i>Gly-Gly-His</i>	36 ± 2	13 ± 1
<i>Gly-Lys-His</i>	46 ± 3	19 ± 1
<i>Lys-Gly-His-Lys</i>	109 ± 4	34 ± 4

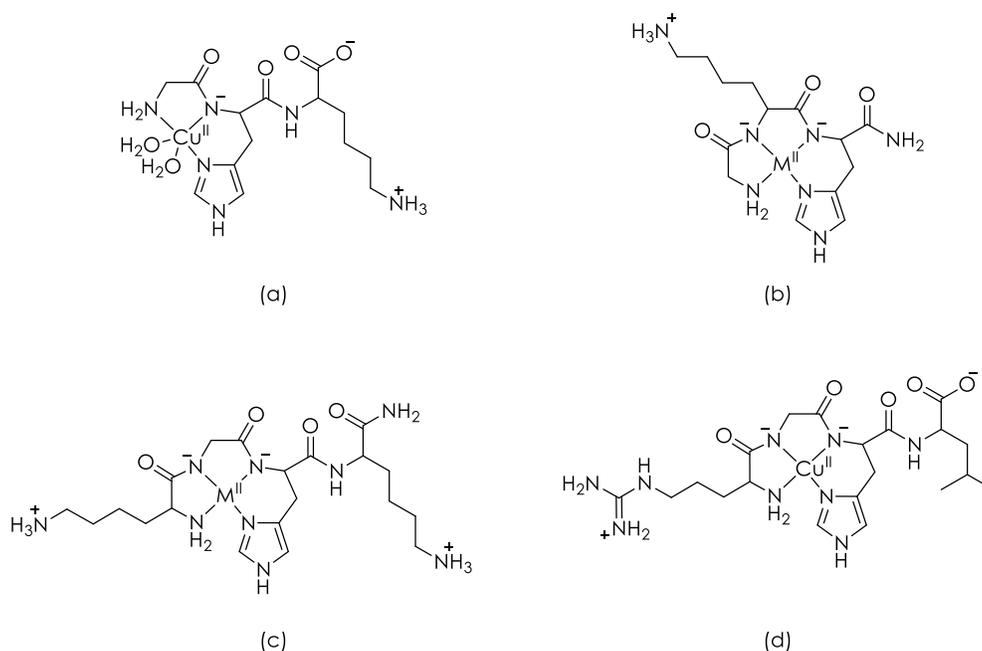


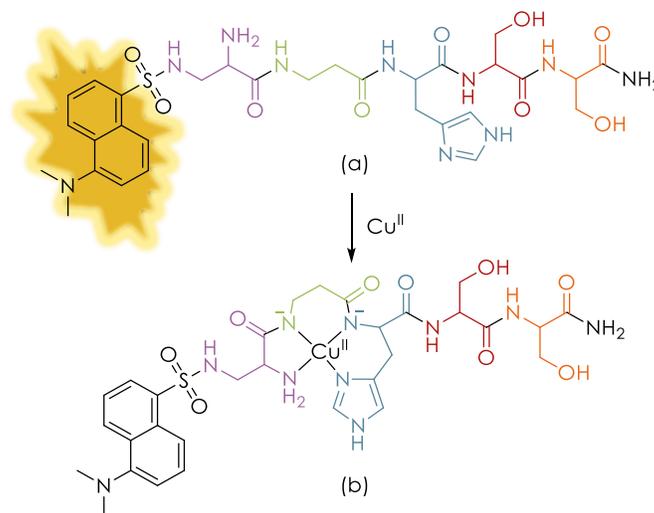
ABBILDUNG 3.3: Strukturen verschiedener ATCUN-Peptide.^[96-99]

($\text{M}^{\text{II}} = \text{Cu}^{\text{II}}$ oder Ni^{II})

(a) Gly-His-Lys, (b) Gly-Lys-His, (c) Lys-Gly-His-Lys, (d) Arg-Gly-His-Leu.

Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren auch gezeigt werden, dass sich gänzlich neu designte Aminosäuresequenzen als hochselektive Chemosensoren für Kupfer(II)-Ionen eignen.^[100,101] Dabei ist das von der Arbeitsgruppe um *BARBARA IMPERIALI* synthetisierte Pentapeptid Dap- β Ala-His-Ser-Ser-CONH₂ für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung:^[100] Die Sequenz des Peptids wurde dahingehend entwickelt, dass die

Bindungsspezifität für Ni^{II} - und Cu^{II} -Ionen im Vergleich zu GGH erhöht wird. Der Austausch eines Glycins durch die N-terminale 2,3-Diaminopropionsäure (Dap) ermöglicht es zudem, funktionale Moleküle wie Fluoreszenzfarbstoffe oder zusätzliche Liganden zur Komplexierung von Metallen einzubauen, während weiterhin eine freie Aminogruppe für das ATCUN-Motiv zur Verfügung steht. *IMPERIALI et al.* zeigten hier bereits, dass die Fluoreszenz eines gekoppelten Dansyls durch die Komplexierung von Cu^{II} -Ionen gequencht werden kann (Schema 3.3). Auf Grundlage dieser Arbeit wurden zahlreiche weitere Peptide mit unterschiedlichen Funktionalisierungen (Fluoreszenzfarbstoffe, Liganden, Metallkomplexe) dargestellt und untersucht, inwiefern die Funktionalisierungen zur Untersuchung der Prozesse bei der DNA-Spaltung ausgenutzt werden können bzw. wie sich die Effizienz der DNA-Spaltung verändern lässt.^[102]

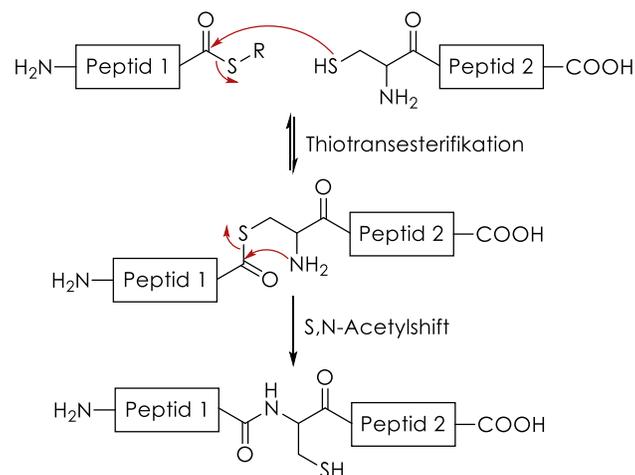


SCHEMA 3.3: Strukturen des Pentapeptids (a) und des resultierenden Metallkomplexes unter Verlust der Fluoreszenz des gekoppelten Dansyls (b).^[100]
 (Dansyl, 2,3-Diaminopropionsäure, β -Alanin, Histidin, Serin, Serin, Fluoreszenz)

3.1.2. Peptidsynthese

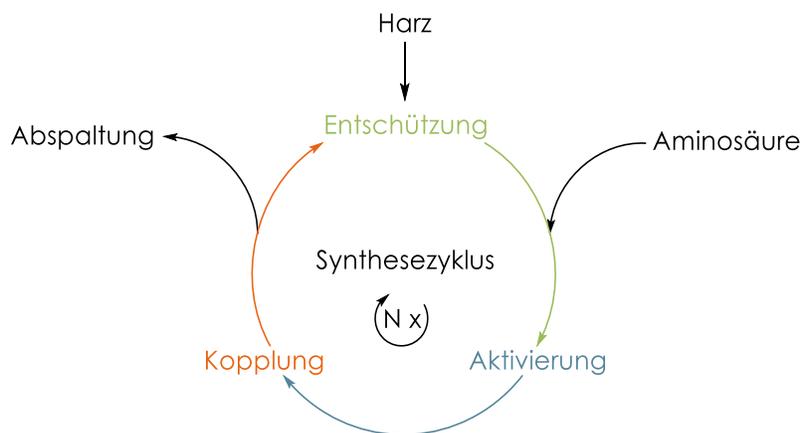
THEORETISCHER HINTERGRUND:**Festphasen-Peptidsynthese**

Die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS, *solid phase peptide synthesis*) wurde 1963 von *ROBERT. B. MERRIFIELD* entwickelt.^[103] Mithilfe dieser Methode wurde die Synthese von Peptiden und Proteinen im Labor im Vergleich zur Flüssigphasen-Synthese stark vereinfacht. Neben der einfachen Durchführbarkeit und Aufreinigung der Peptide bietet die Festphasen-Synthese auch den Vorteil, dass unnatürliche Aminosäuren gekoppelt, Rückgratmodifikationen vorgenommen und *D*-Peptide, die gänzlich aus *D*-Aminosäuren bestehen (im Gegensatz zu den *L*-Aminosäuren in natürlichen Proteinen), synthetisiert werden können. Die Nutzung einer Festphase ist jedoch nicht für die Synthese im großen Maßstab geeignet und die Länge der Peptide ist auf etwa 50-70 Aminosäuren begrenzt. Größere Peptide können nur z.B. durch chemische Ligation eines Thioesters (C-terminal) mit einem Cystein (N-terminal) zweier kleinerer Peptide erhalten werden (Schema 3.4).^[104]



SCHEMA 3.4: Native chemische Ligation.^[104]

Bei der Festphasen-Synthese besteht die feste Phase (Harz) oft aus verzweigtem Polystyrol, wodurch sie selbst in den verwendeten Lösungsmitteln unlöslich wird. Bei der Synthese wird zunächst eine an der Aminogruppe geschützte Aminosäure kovalent über die Carboxylfunktion an das Harz gebunden. Anschließend wird nach Entfernen überschüssiger Reagenzien und Waschlösungen die Schutzgruppe am N-Terminus entfernt und es kann die nächste Aminosäure gekoppelt werden. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz synthetisiert ist. Abschließend werden durch das Behandeln der Festphase mit einer Abspaltlösung das Peptid sowie alle verbliebenden Schutzgruppen entfernt (Schema 3.5).^[105]

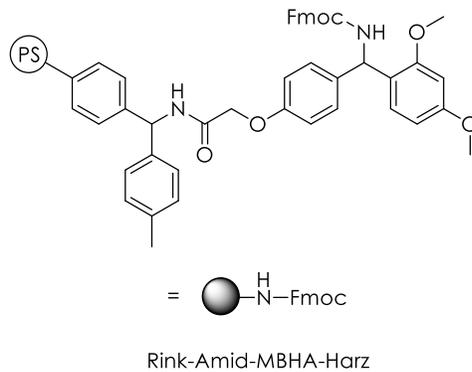


SCHEMA 3.5: Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese.^[105]

Standardmäßig wird für eine orthogonale Schutzgruppenchemie bei der Synthese nach Fmoc- oder Boc-Strategie verfahren. Werden die N-terminalen Aminogruppen mittels der basenlabilen Fmoc-Gruppe geschützt, kann diese einfach durch Piperidin entfernt werden. Boc-Gruppen hingegen sind säurelabil und können entsprechend mit Trifluoressigsäure oder HCl/Methanol abgespalten werden. Die Abspaltung von der Festphase geschieht dann entsprechend im jeweils anderen Medium.

Die Synthese aller Peptide in dieser Arbeit mit der von BARBARA IMPERIALI *et al.* entwickelten Sequenz R-Dap- β Ala-His-Ser-Ser-CONH₂ (R = H oder funktionales Molekül)^[100] erfolgte manuell an einem MBHA-Harz mittels Standard-Fmoc-Strategie. Als Schutzgruppen für die Aminosäureseitenketten dienten säurelabile *tert*-Butyl- (*t*Bu für Hydroxylfunktionen), 4-Methyltrityl- (Mtt, für sekundäre Amine) und *tert*-Butyloxycarbonylgruppen (Boc, für primäre Amine) (Abbildung 3.4).^[105]

A



B

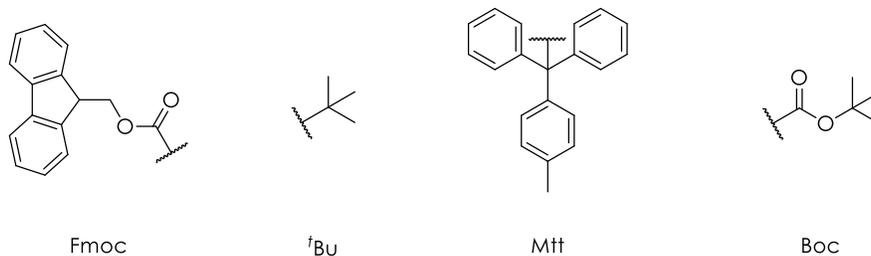


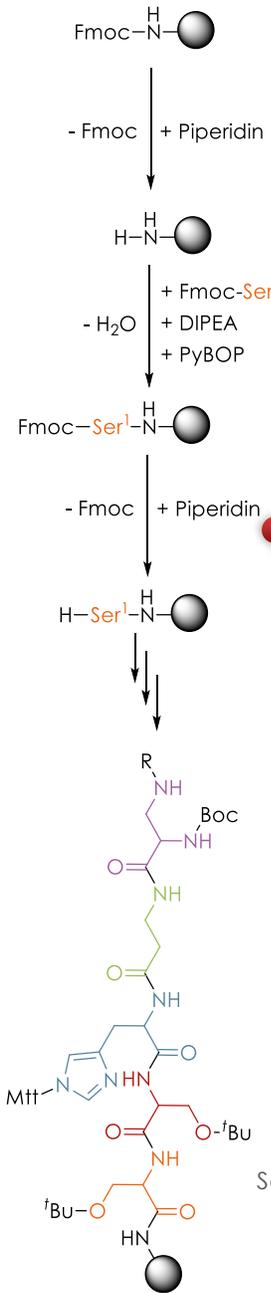
ABBILDUNG 3.4: Wichtige Strukturen für die Peptidsynthese.

A: Struktur des verwendeten Harzes.

B: Übersicht über die verwendeten Schutzgruppen.

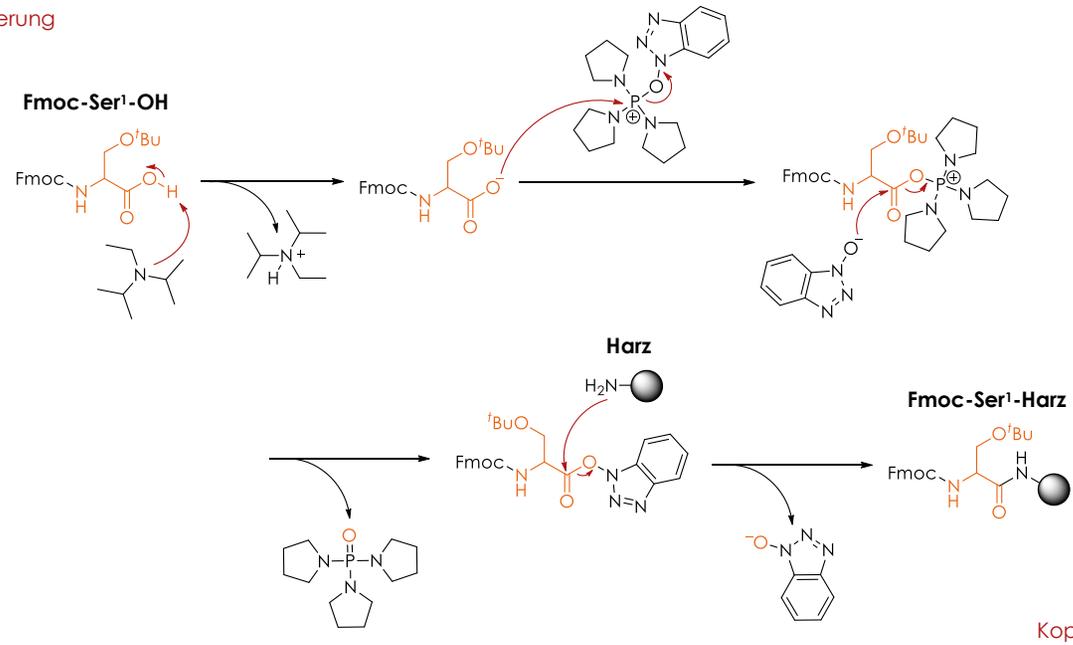
(PS = Polystyrol)

Die Schritte der durchgeführten Peptidsynthesen sind in Schema 3.6 zusammengefasst. Die Reaktionsmechanismen der einzelnen Teilschritte sind am Beispiel der ersten Aminosäure (Serin) in Schema 3.7 und Schema 3.8 gezeigt.



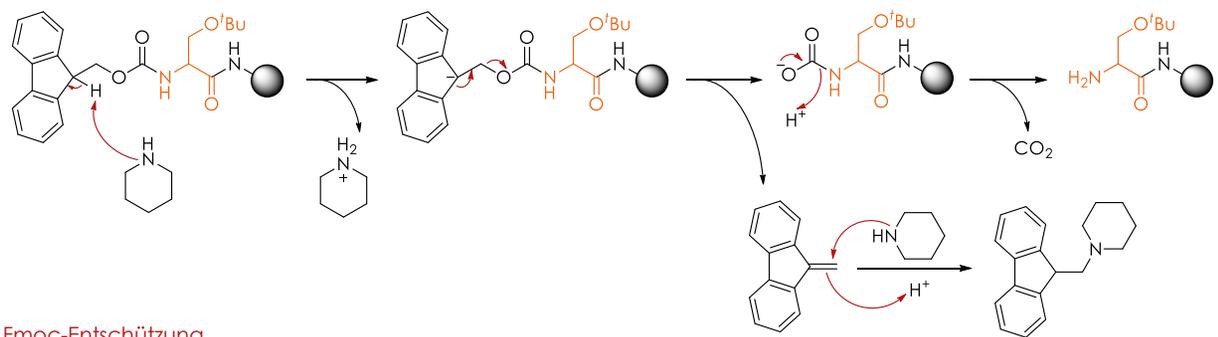
SCHEMA 3.6: Schema für die Synthese der Peptide.^[100]

Aktivierung



SCHEMA 3.7: Aktivierung des C-Terminus¹ von Serin und anschließende Kopplung an das Harz.^[105]

Fmoc-Entschützung

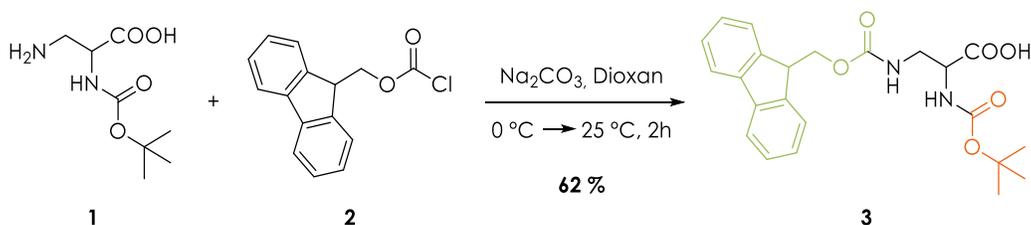


SCHEMA 3.8: Fmoc-Entschützung von Serin mit der Base Piperidin.^[105]

Im ersten Reaktionsschritt wird die Fmoc-geschützte Aminosäure am C-Terminus durch die tertiäre Base DIPEA deprotoniert. Die sterische Abschirmung des Stickstoffatoms in DIPEA ermöglicht es, dass ausschließlich ein Proton vom freien Elektronenpaar angegriffen werden kann. Die deprotonierte Aminosäure greift daraufhin das Phosphoratom des PyBOPs an und die Benzotriazoleinheit wird abgespalten. Diese wiederum greift den Carbonylsauerstoff des Serins an und es wird die aktivierte Aminosäure (Aktivester) erhalten. Triebkraft dieser Reaktion ist die Bildung der P=O-Doppelbindung im Phosphorsäuretriamid. Durch Angriff einer Aminogruppe (vom Harz oder der vorherigen Aminosäure) an der Carboxylfunktion des Aktivesters entsteht schließlich die neue Peptidbindung (Schema 3.7).^[105]

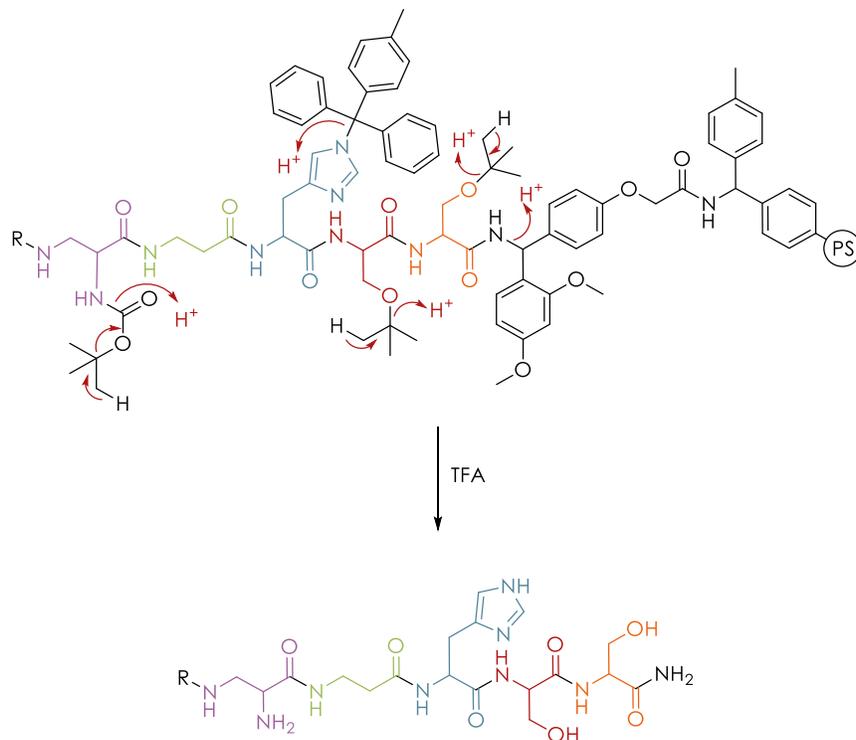
Für die Fmoc-Entschützung der neu gekoppelten Aminosäure wird die sekundäre Base Piperidin verwendet, die das acide Proton an der Fmoc-Gruppe abstrahiert. Nach Umlagerung durch die Deprotonierung spaltet sich zuerst die Fluorenyleinheit ab, die mit einem weiteren Piperidin abreagiert, und anschließend erhält man unter CO₂-Freisetzung die freie Aminogruppe am N-Terminus (Schema 3.8).^[105]

Für die Kopplung der letzten Aminosäure, *N*²-Boc-2,3-Diaminopropionsäure (**1**), wurde diese zunächst in β -Position mit Fmoc-Cl (**2**) geschützt (Schema 3.9).^[106]



SCHEMA 3.9: Einführung der Fmoc-Schutzgruppe für *N*²-Boc-2,3-Diaminopropionsäure (**1**).^[106]

Nach Fmoc-Entschützung der Aminosäure **3** an der Festphase wurden in einem letzten Kopplungsschritt verschiedene Moleküle an die freie Aminogruppe gekoppelt. Die anschließende Abspaltung der funktionalisierten Peptide von der Festphase sowie die gleichzeitige Entfernung aller Seitenketten-Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure (TFA), wodurch die freien Peptide erhalten werden, ist allgemein im Schema 3.10 gezeigt. Aufgrund der Harzstruktur wurden alle Peptide am C-Terminus als Amid erhalten.



SCHEMA 3.10: Abspaltung der funktionalisierten Peptide von der Festphase.
(2,3-Diaminopropionsäure, β -Alanin, Histidin, Serin, Serin)

Die Aufreinigung der freien Peptide erfolgte mittels RP-HPLC und die anschließende Analyse mithilfe von ESI-Massenspektrometrie. Die entsprechenden Cu^{II} - und Ni^{II} -Komplexe wurden jeweils *in situ* mit CuCl_2 - bzw. NiCl_2 -Lösung in einem Peptid : Metall(II)-Verhältnis von 1 : 0.8 bzw. 1 : 1.6, wenn zwei Ionen gebunden werden können, erzeugt und ebenfalls über ESI-MS charakterisiert.

Eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Peptide ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Dabei bezeichnen **P** bzw. **P₂** die Aminosäuresequenzen Dap- β Ala-His-Ser-Ser- CONH_2 bzw. Dap- β Ala-His-Ser-Ser-Dap- β Ala-His- CONH_2 sowie **NH₂**, **RhB**, **Dns**, **FITC**, **BODIPY**, **DPMa**, **DPMe**, **Fc** und **Phen** die jeweilige Funktionalisierung des N-Terminus¹. Die einzelnen Gruppen der Peptide werden in den nachfolgenden Abschnitten genauer besprochen.

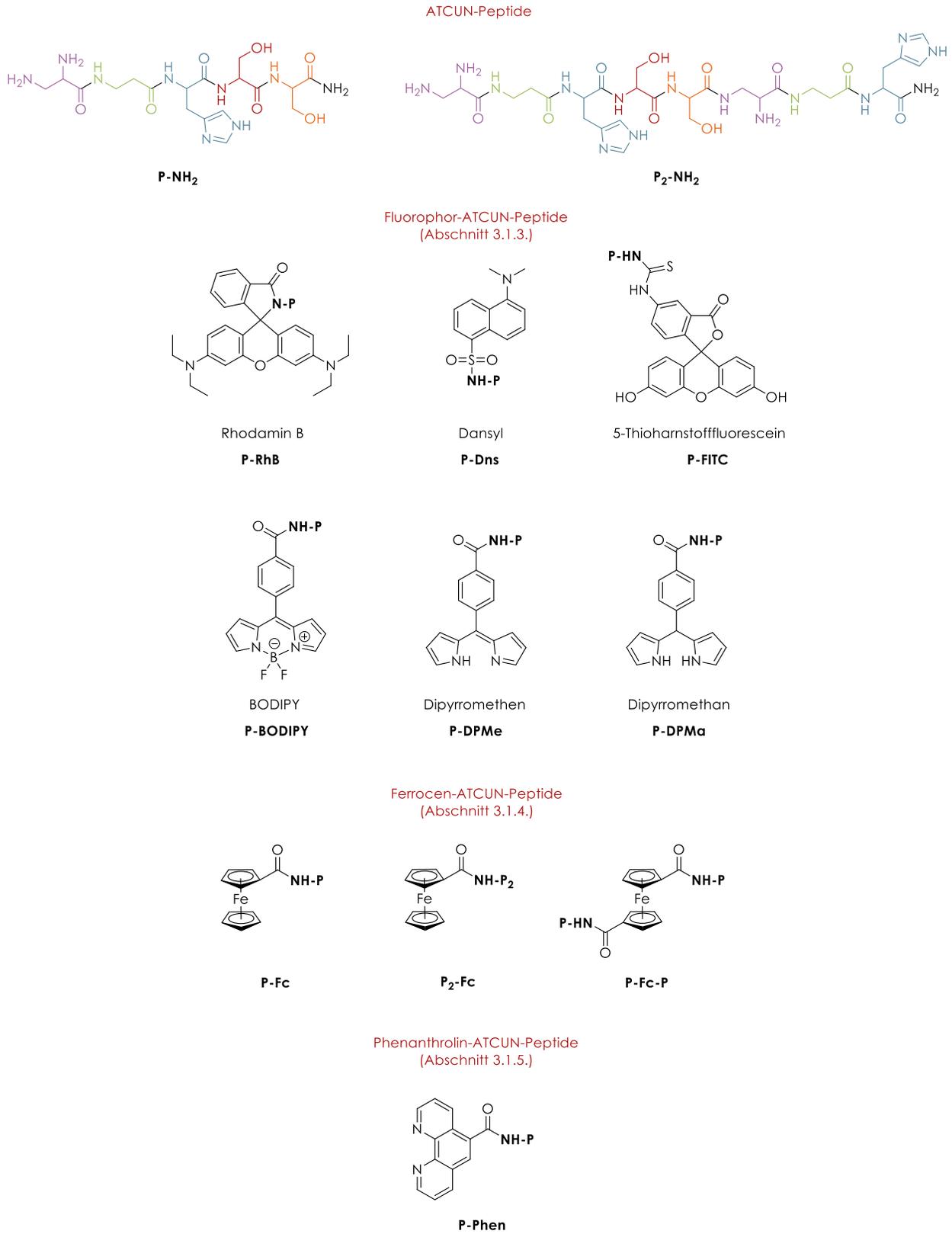


ABBILDUNG 3.5: Übersicht der relevanten Peptide.
(2,3-Diaminopropionsäure, β -Alanin, Histidin, Serin, Serin)

3.1.3. Fluorophor-ATCUN-Peptide

Wie zuvor erwähnt, zeigte die Arbeitsgruppe um *BARBARA IMPERIALI*, dass die Fluoreszenz eines am Peptid gebundenen Farbstoffes durch die Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen gequencht werden kann.^[100] Ausgehend von diesem Ansatz wurden bereits in Experimenten während meiner Masterarbeit die Fluorophore Rhodamin B, Dansylchlorid und Fluoresceinisothiocyanat an das Peptid **P-NH₂** gekoppelt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und DNA-Spaltaktivität untersucht.^[107] Diese ersten Untersuchungen wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit verifiziert und deutlich erweitert.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Absorptions- und Emissionsspektroskopie

Mithilfe der Spektroskopie lassen sich sowohl die Eigenschaften von Absorbern (Absorptionsspektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie) als auch von Strahlungsquellen (Emissionsspektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie) untersuchen. Die UV/Vis-Spektroskopie nutzt dabei elektromagnetische Wellen des sichtbaren und ultravioletten Lichts. Dies führt zur Anregung von Valenzelektronen der bestrahlten Moleküle (Abbildung 3.6).^[108,109]

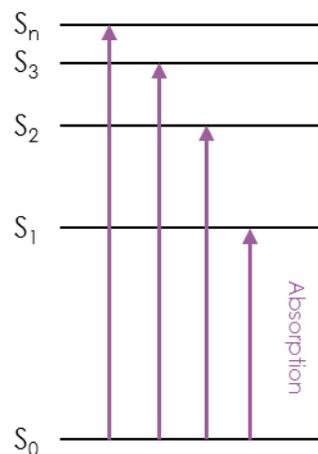


ABBILDUNG 3.6: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms für den Prozess der Absorption.^[108,109]
(– Energieniveaus, → Absorption)

Um ein Elektron von einem niedrigeren in ein höheres Energieniveau anzuheben, muss die Energie des eingestrahlteten Photons genau der Energiedifferenz zwischen den beiden Energieniveaus entsprechen. Klassisch betrachtet ist es also notwendig, dass das Molekül zumindest temporär einen Dipol besitzt, der mit einer Frequenz ν schwingt, um mit einem Photon dieser Frequenz wechselwirken zu können. Dieses temporäre Dipolmoment zwischen den beiden Energiezuständen wird Übergangsdipolmoment μ genannt. Es ist durch einen Vektor definiert, der die Richtung der Elektronenverschiebung anzeigt, und einer Länge, die proportional zur Intensität des Überganges ist.^[110,111] Der Betrag des Übergangsdipolmoments ist dabei ein Maß für die Ladungsumverteilung während des Übergangs, d.h. das Molekül kann umso besser Strahlung absorbieren, je ausgeprägter der Dipolcharakter der Ladungsumverteilung ist.^[110]

Anwendung findet die UV/Vis-Spektroskopie beispielsweise bei der Bestimmung von Konzentrationen einer Lösung. Mithilfe des *LAMBERT-BEERS*chen Gesetzes, das die Abschwächung der Intensität einer Strahlung beim Durchgang durch ein Medium beschreibt, kann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten ε über den Zusammenhang

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d \quad \text{(F1-1)}$$

mit E = Extinktion, I_0 = Intensität des einfallenden Lichts,
 I = Intensität des transmittierten Lichts und d = Schichtdicke

die Konzentration c der absorbierenden Substanz berechnet werden.^[112]

Die Untersuchung einer Strahlungsquelle mittels ihrer Emission kann hingegen durch die Fluoreszenzspektroskopie realisiert werden. Dabei nutzt man häufig den Vorteil aus, dass der Prozess der Fluoreszenz bei vielen organischen Verbindungen mit konjugiertem Doppelbindungssystem leicht durch ultraviolette Strahlung oder sichtbares Licht angeregt werden kann.

Das eigentliche Phänomen der Fluoreszenz ist bereits seit dem 17. Jahrhundert bekannt. Jedoch erst mit der Entdeckung der Rotverschiebung wurde dieses verständlich. 1852 erkannte *GEORGE STOKES*, dass das von fluoreszierenden Stoffen emittierte Licht stets eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht hat (Abbildung 3.7).^[113] Der Abstand zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum ist dabei sowohl vom fluoreszierenden Stoff als auch von der Umgebung (z.B. Lösungsmittelpolarität, pH-Wert, Temperatur) abhängig.

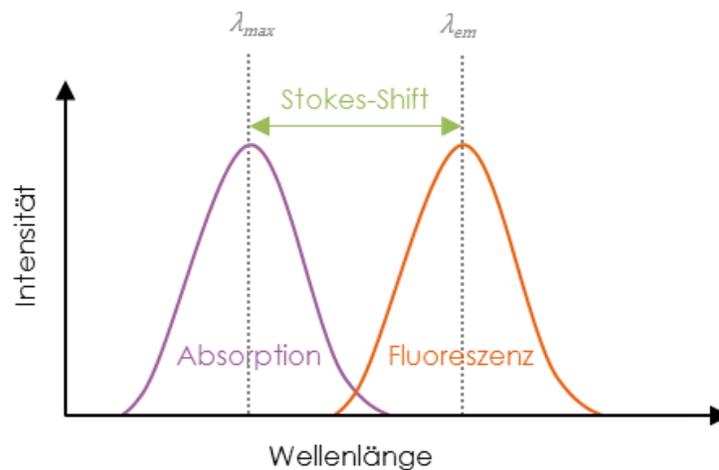


ABBILDUNG 3.7: Stokes-Shift (Rotverschiebung) im Fluoreszenzspektrum.^[113]
(λ_{max} = Absorptionsmaximum, λ_{em} = Emissionsmaximum)

Mithilfe des Jablonski-Diagramms in Abbildung 3.8 können die Vorgänge der Fluoreszenz veranschaulicht werden.^[108,109]

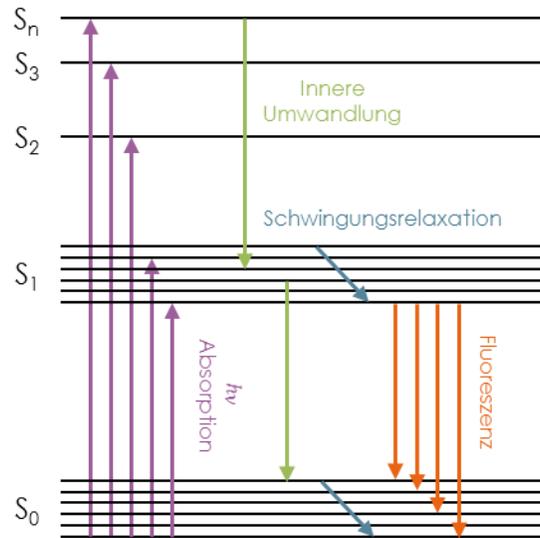
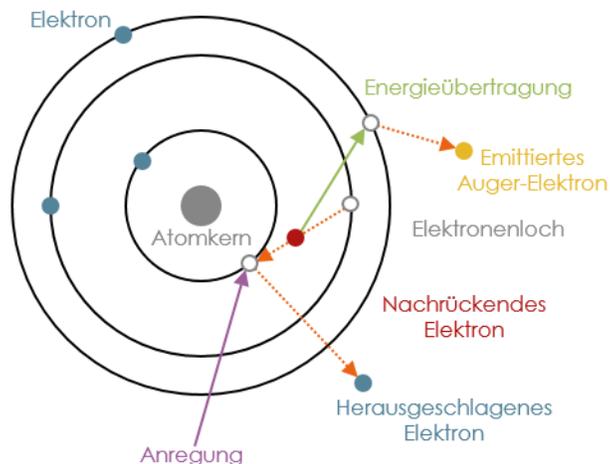


ABBILDUNG 3.8: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms für den Prozess der Fluoreszenz.^[108,109]
 (← Schwingungsniveaus, → Absorption, → Fluoreszenz,
 → strahlungslose Deaktivierung, → Schwingungsrelaxation)

Wird wie bei der UV/Vis-Spektroskopie von einem Elektron im Singulett-Grundzustand S_0 elektromagnetische Strahlung absorbiert, geht das Elektron in einen angeregten Singulett-Zustand (S_n) über. Nach der Anregung fällt das Elektron strahlungsfrei durch Schwingungsrelaxation zurück auf ein S_1 -Niveau. Fluoreszenz lässt sich dann beobachten, wenn das Elektron spontan nach einer sehr kurzen Lebensdauer des angeregten Zustandes unter Aussenden eines Photons wieder auf ein Niveau des Grundzustandes zurückkehrt. Die Energie des emittierten Photons ist dabei von der Energiedifferenz zwischen dem oberen und dem unteren Energieniveau abhängig. Das Verhältnis aus der Anzahl der emittierten zu der Anzahl der absorbierten Photonen wird als Fluoreszenzquantenausbeute (Φ) bezeichnet. Meist liegt die Ausbeute unterhalb von 1 aufgrund des konkurrierenden Auger-Effektes, bei dem in der Elektronenhülle eines angeregten Atoms ein unbesetzter Elektronenzustand durch ein Elektron der äußeren Schalen besetzt wird.

Die freiwerdende Energie wird dabei strahlungsfrei auf ein anderes Elektron des Atoms übertragen, das anschließend als Auger-Elektron das Atom verlässt (Abbildung 3.9).^[114,115]

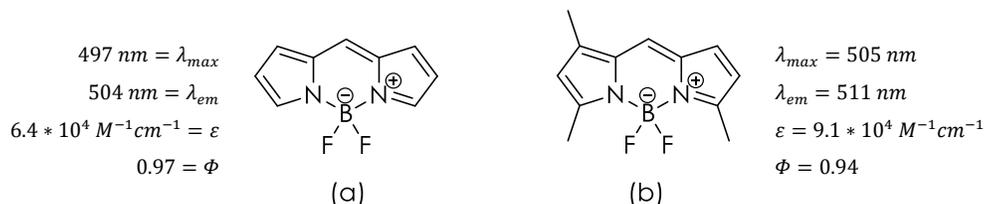


ABILDUNG 3.9: Vereinfachte Darstellung des Auger-Effektes.^[114,115]
(- Elektronenschalen, → äußere Anregung, → Energieübertragung)

Im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie bietet die Fluoreszenzspektroskopie den Vorteil, dass absolute Intensitäten gemessen werden, wodurch eine geringere Nachweisgrenze für Moleküle erreicht wird.

3.1.3.1. BODIPY-Fluorophore

Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die Fluoreszenz von Farbstoffen mit dem BODIPY-Grundgerüst durch Kupfer(II)-Ionen gequencht wird (Abbildung 3.10).^[116] Daher sollte die Reihe an Fluorophor-ATCUN-Peptiden um diesen Farbstoff erweitert werden.



ABILDUNG 3.10: Grundgerüst der BODIPY-Fluorophore (a)^[117] und Struktur des methylierten BODIPYs (b).^[118]

Das wissenschaftliche Interesse an BODIPY-Derivaten hat sich seit der zufälligen Entdeckung dieser Struktur und seiner fluoreszierenden Eigenschaften durch ALFRED TREIBS und FRANZ-HEINRICH KREUZER 1968 zunehmend verstärkt.^[119] Die hohe thermische und photochemische Stabilität, die chemische Robustheit und, dass die Absorptions- und Emissionsspektren vieler BODIPY-Derivate einen kleinen Stokes-Shift, einen relativ hohen Extinktionskoeffizienten und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen (Abbildung 3.10)^[118,120,121], machen diese Verbindungen zu attraktiven Markern für biomolekulare Anwendungen.^[122] Die Absorptions- und Emissionsspektren sind dabei aufgrund der Orthogonalität des elektrischen und des Übergangsdipolmoments relativ unabhängig von Umgebungsfaktoren wie dem Lösungsmittel, da die Polarität des Lösungsmittels beim Prozess der Anregung keinen Einfluss auf die Veränderung der Orbitale im Grundzustand hat (Abbildung 3.11).^[111,120,121]

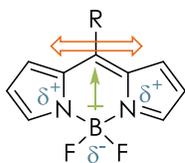


ABBILDUNG 3.11: Darstellung von elektrischem und Übergangsdipolmoment in BODIPY.^[111] (Partiellladungen)

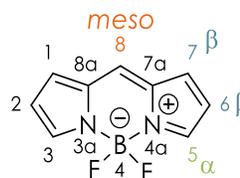
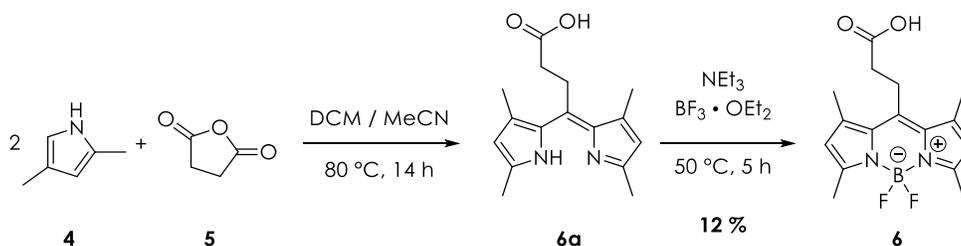


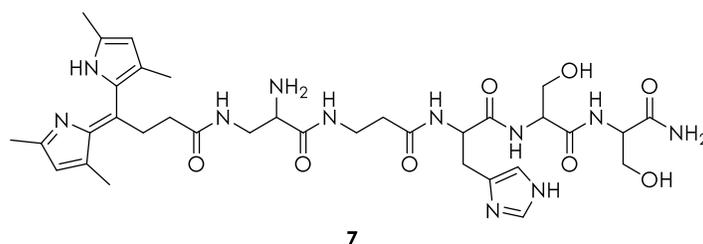
ABBILDUNG 3.12: Nummerierung des BODIPY-Motivs nach dem Vorbild der Stammverbindung Indacen.^[120]

Aufgrund der Anfälligkeit für elektrophile Angriffe und der Instabilität des Dipyrrromethens als Vorstufe oberhalb von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte das unsubstituierte BODIPY erst 2009 unabhängig von drei Arbeitsgruppen dargestellt werden.^[117,123,124] Die einfache Derivatisierung des BODIPY-Motivs während der Synthese ermöglichte aber bereits zuvor die Darstellung zahlloser Verbindungen. Ein wesentlicher Nachteil dieser Verbindungen ist jedoch ihre hohe Basenlabilität, infolge der es zur Abspaltung der BF_2 -Gruppe kommt. Obwohl dies den Einsatz in Anwendungen wie der Festphasen-Peptidsynthese erheblich erschwert^[118], sollte für die Kopplung des Farbstoffes an Peptide ein Derivat dargestellt werden, das in meso-Position über eine Carboxylgruppe verfügt (Abbildung 3.12). In einem ersten Ansatz wurde daher nach einer Vorschrift von XIAOJUN PENG *et al.* das BODIPY-Derivat **6** in einer Eintopf-Reaktion (Schema 3.11) synthetisiert.^[125]

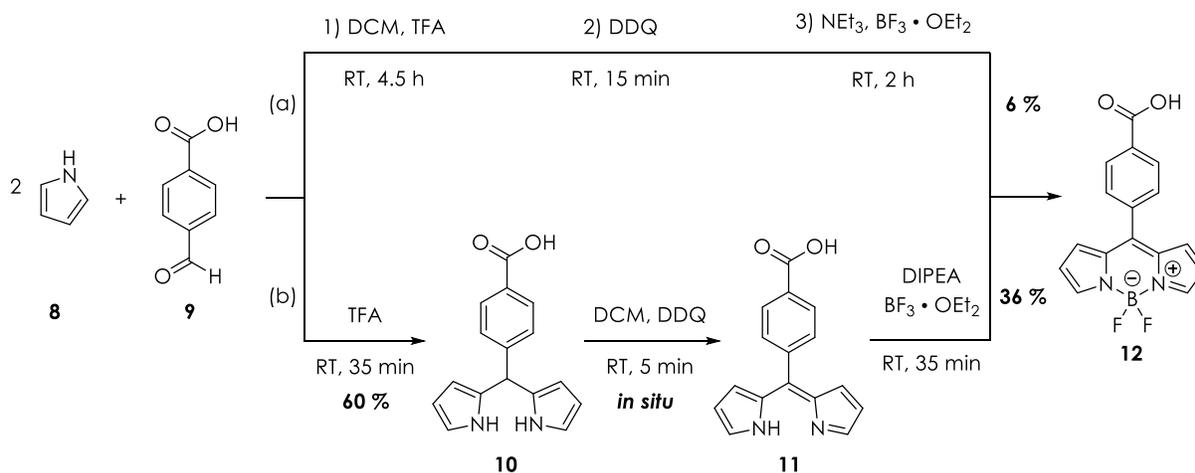
SCHEMA 3.11: Synthese des BODIPY-Derivates **6**.^[125]

In zwei aufeinanderfolgenden elektrophilen aromatischen Substitutionen (S_EAr) durch Bernsteinsäureanhydrid (**5**) am Pyrrol **4** wird zunächst *in situ* das Dipyrromethen **6a** als Zwischenprodukt gebildet. Durch Zugabe von Triethylamin und Bortrifluorid-Diethyletherat, das durch **6a** koordiniert wird, konnte das Produkt **6** erhalten werden. Obwohl die Ausbeute mit 12 % noch deutlich unter der Literaturausbeute von 21 % liegt, konnte sie durch die Verwendung von 2,4-dimethylsubstituiertem Pyrrol im Vergleich zum unsubstituierten Pyrrol um etwa zehn Prozentpunkte erhöht werden, da Nebenreaktionen in α - und β -Position von **6a** unterdrückt werden können.^[125,126]

Die Kopplung des Farbstoffes **6** an das Peptid **P-NH₂** sowie die nachfolgende Abspaltung von der Festphase in Analogie zu den in Abschnitt 3.1.2 gezeigten Reaktionen führte aufgrund der Instabilität der B-N-Bindungen im BODIPY zur Bildung des Dipyrromethen-Peptids **7** (Abbildung 3.13).^[107,118] Obwohl das Peptid **7** ohne BF₂-Gruppe keine Fluoreszenzeigenschaften besitzt, könnte die Dipyrromethen-Gruppe in zukünftigen Untersuchungen zur DNA-Spaltung durch ATCUN-Peptide als zusätzliche Koordinationsstelle für Metallionen von Interesse sein.

ABBILDUNG 3.13: Struktur des Peptids **7** nach massenspektrometrischer Analyse.^[107]

Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Synthese des BODIPYs **6** wurde für weitere Kopplungsversuche ein anderes BODIPY-Derivat synthetisiert. Das Derivat **12** kann dabei entweder ebenfalls in einer Eintopf-Reaktion nach XIAOJUN PENG *et al.*^[127] (a) oder in einer mehrstufigen Reaktion in Anlehnung an eine Vorschrift für Porphyrine von JONATHAN S. LINDSEY *et al.*^[128] (b) erhalten werden (Schema 3.12).



SCHEMA 3.12: Synthese des BODIPY-Derivates **12** in einer Eintopf-Synthese (a)^[127] und einer mehrstufigen Reaktion (b).^[128]

Obwohl der Reaktionsweg (b) synthetisch wesentlich aufwendiger ist, liefert er deutlich bessere Ausbeuten aufgrund der Isolierung und Aufreinigung des Zwischenprodukts **10**, wodurch bei der Oxidation mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) Nebenreaktionen mit Pyrrol (**8**) oder dem Aldehyd **9** verhindert werden. Für die Darstellung des BODIPYs **12** wurde diesmal auf Pyrrol (**8**) zurückgegriffen, da dieses im Reaktionsweg (b) nicht nur eines der Edukte ist, sondern gleichzeitig auch als Lösungsmittel dient. Somit kann kosteneffektiver gearbeitet werden als bei der Verwendung von 2,4-Dimethylpyrrol (**4**). Der Einsatz von 4-Carboxybenzaldehyd (**9**) wurde dadurch bedingt, dass die säurekatalysierte Aldehydkondensation zum Aufbau von BODIPY-Farbstoffen mit aliphatischen Aldehyden bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde.

Einkristalle zur Strukturbestimmung von **12** durch Röntgenbeugung wurden durch Eindampfen einer methanolischen Lösung erhalten (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 sowie Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 und Anhang).^[129–132]

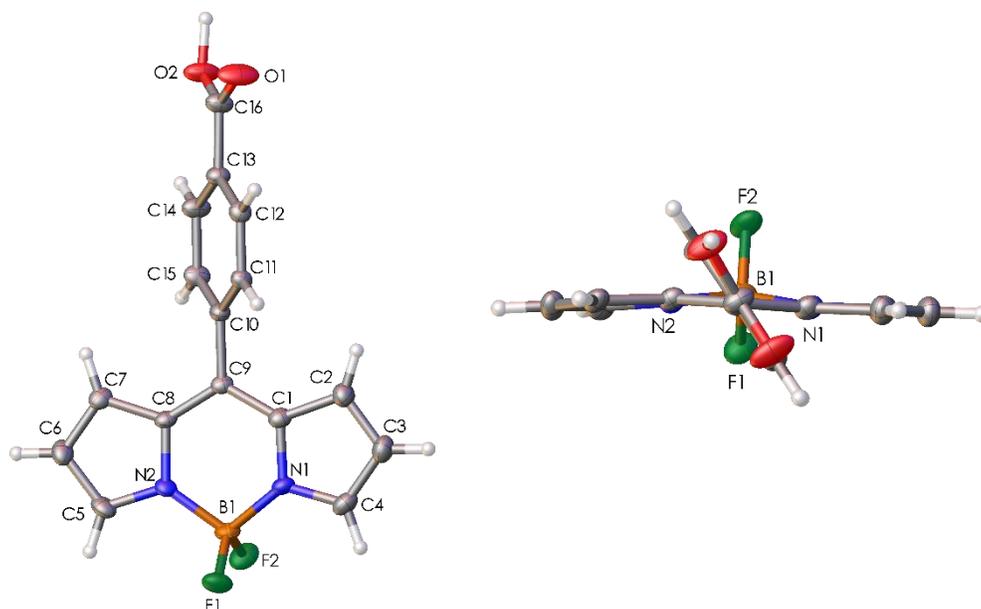


ABBILDUNG 3.14: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von **12** im Kristall.^{4,[89,129–131]}
(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit)

TABELLE 3.3: Kristallographische Daten für **12**.

Parameter	BODIPY 12
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₁ BF ₂ N ₂ O ₂
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
a [Å]	7.6130(10)
b [Å]	7.8821(9)
c [Å]	15.2447(18)
α [°]	93.608(6)
β [°]	95.655(6)
γ [°]	104.900(6)
V [Å ³]	876.01(19)
Z	2
ρ _{calc} [g cm ⁻³]	1.1831
μ (MoKα) [mm ⁻¹]	0.092
F ₍₀₀₀₎	320
Crystal size [mm ³]	0,40 x 0,26 x 0,04
2θ range	5.37 – 52.852
Index range	-9 ≤ h ≤ 9, -9 ≤ k ≤ 9, -19 ≤ l ≤ 19
Collected/unique reflections	8941 / 3583
Data / restraints / parameters	3583 / 0 / 212
Goodness-of-fit on F ²	1.031
R indices [I ≥ 2σ(I)]	R ₁ = 0.0467, wR ₂ = 0.1125
R indices [all data]	R ₁ = 0.0732, wR ₂ = 0.1192
Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	0.20 / -0.33

TABELLE 3.4: Bindungslängen und -winkel in **12**.

Bindungslänge [Å]		Bindungswinkel [°]	
B1-F1	1.375(2)	F1-B1-F2	109.09(15)
B1-F2	1.392(2)	F1-B1-N1	111.26(15)
B1-N1	1.553(2)	F1-B1-N2	111.43(16)
B1-N2	1.548(3)	F2-B1-N1	109.43(16)
N1-C1	1.390(2)	F2-B1-N2	109.99(14)
N1-C4	1.343(2)	N1-B1-N2	105.59(14)
N2-C5	1.343(2)	B1-N1-C1	125.26(15)
N2-C8	1.390(2)	B1-N1-C4	126.44(15)
C1-C2	1.420(2)	B1-N2-C5	127.08(15)
C2-C3	1.373(3)	B1-N2-C8	125.45(14)
C3-C4	1.380(3)	N1-C1-C2	107.11(16)
C1-C9	1.394(2)	C3-C4-N1	110.40(17)
C7-C8	1.414(2)	C1-N1-C4	107.81(15)
C6-C7	1.358(3)	N2-C8-C7	107.65(15)
C5-C6	1.398(2)	C6-C5-N2	109.98(16)
C8-C9	1.397(2)	C5-N2-C8	107.40(15)
C9-C10	1.477(2)	C1-C9-C8	119.93(16)
C13-C16	1.482(2)	C1-C9-C10	120.23(15)
Torsionswinkel [°]			
C1-C9-C10-C11		-51.2(2)	
C1-N1-B1-F1		-132.71(17)	
C1-N1-B1-F2		106.67(19)	
C12-C13-C16-O1		-2.7(3)	

⁴ Die Lösungsmittelmoleküle (2 MeOH) wurden zugunsten der Qualität der Struktur mittels Lösungsmittelmaske entfernt.^[132]

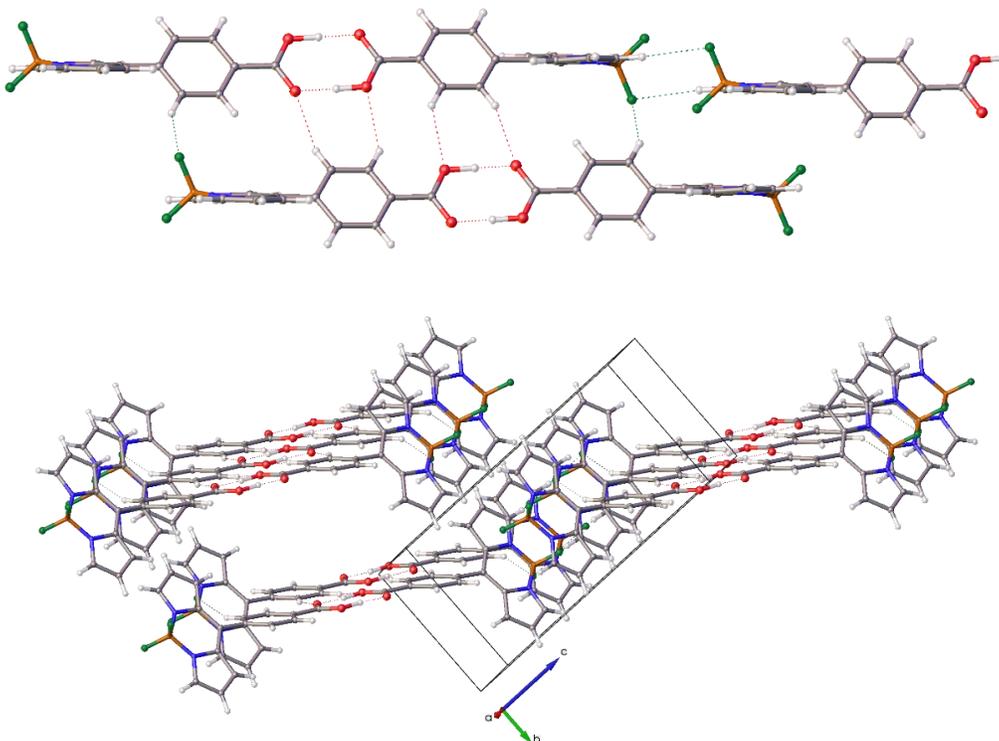


ABBILDUNG 3.15: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen zwischen **12** in der Elementarzelle.^[89,129–131]
(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit)

Die Molekülstruktur von **12** zeigt, dass das BODIPY-Gerüst nur nahezu planar ist. Das Boratom kippt um etwa 7.6° aus der Dipyrrromethen-Ebene heraus und ist dabei von den Fluor- und Stickstoffatomen tetraedrisch umgeben. Dadurch steht die Ebene, die von der BF_2 -Gruppe aufgespannt wird, in etwa senkrecht zur Dipyrrromethen-Ebene ($\chi \sim 90.4^\circ$). Die Werte für die B-F-, B-N-, C-N- und C-C-Bindungslängen sind in guter Übereinstimmung mit Literaturergebnissen zu BODIPY-Strukturen und zeigen sowohl die Delokalisierung der π -Elektronen über das Gerüst als auch die Delokalisierung der positiven Ladung über beide B-N-Bindungen (Abbildung 3.14 und Tabelle 3.4).^[125,127] Im Kristallgitter bilden die Carboxylgruppen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus, sodass sich je zwei Moleküle in einer Kopf-zu-Kopf-Ausrichtung anordnen, wodurch die Phenylringe parallele Ebenen entlang der Winkelhalbierenden der b- und c-Achse bilden. Die Fluoratome wiederum wechselwirken mit dem nächsten Molekül durch Ausbildung von C-H...F-Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Dipyrrromethengerüst (Abbildung 3.15). Der Torsionswinkel zwischen der BODIPY-Ebene und dem in *meso*-Position enthaltenen Phenylring beträgt etwa -51° . Die Drehung des Phenylringes

aus der Ebene spricht in Zusammenhang mit in den Positionen 1 und 7 fehlenden Methylsubstituenten (vgl. BODIPY **6**) für eine freie Rotation des Ringes in Lösung. Dies führt bei BODIPY-Farbstoffen häufig zu einer Abschwächung der Fluoreszenzintensität und -quantenausbeute aufgrund photoinduzierter Elektronenübertragungen (*photoinduced electron transfer*, PeT).^[125,127]

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Photoinduzierter Elektronentransfer (PeT)

Allgemein kann ein BODIPY mit Arylfunktionalisierung in *meso*-Position als Verbindung aus einer stark fluoreszierenden Gruppe (BODIPY-Gerüst) und einem dazu nicht-planaren, nicht-fluoreszierenden Substituenten (Phenylring) angesehen werden (Abbildung 3.16).

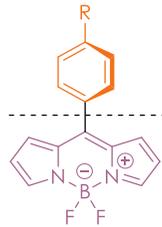


ABBILDUNG 3.16: Zweiteilige Struktur von Aryl-BODIPYs.
(fluoreszierendes BODIPY-Gerüst, nicht-fluoreszierender Substituent)

Im Gegensatz zum normalen Prozess der Fluoreszenz (a) kann der *meso*-Substituent – besonders bei freier Rotation um die Bindung zum BODIPY – abhängig vom Oxidationspotential als Elektronendonator oder -akzeptor fungieren. Überträgt der Substituent aus seinem HOMO im angeregten Zustand der fluoreszierenden Gruppe ein Elektron, dient diese als Akzeptor (b) (reduktiver PeT). Als Folge vermindert sich die Fluoreszenz. Ebenso findet eine Fluoreszenzverminderung statt, wenn beim oxidativen PeT der angeregte Fluorophor ein Elektron in das LUMO des Substituenten überträgt (c). Die Art des Elektronentransfers hängt

dabei vor allem von den Substituenten am Phenylring ab. Stark elektronenziehende Gruppen verringern beispielsweise die Energie des LUMOs des Aromaten, sodass er Elektronen aus dem höher liegenden LUMO des BODIPY-Fluorophors aufnehmen und der Prozess des oxidativen Transfers ablaufen kann (Abbildung 3.17).^[120,126,133]

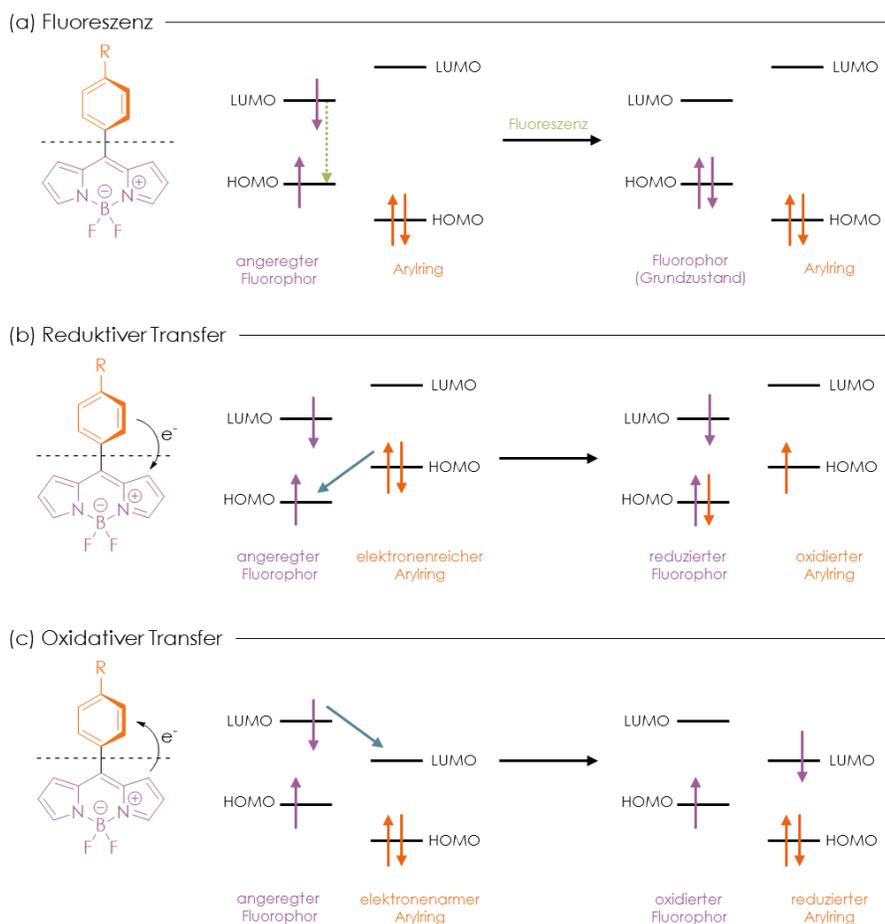


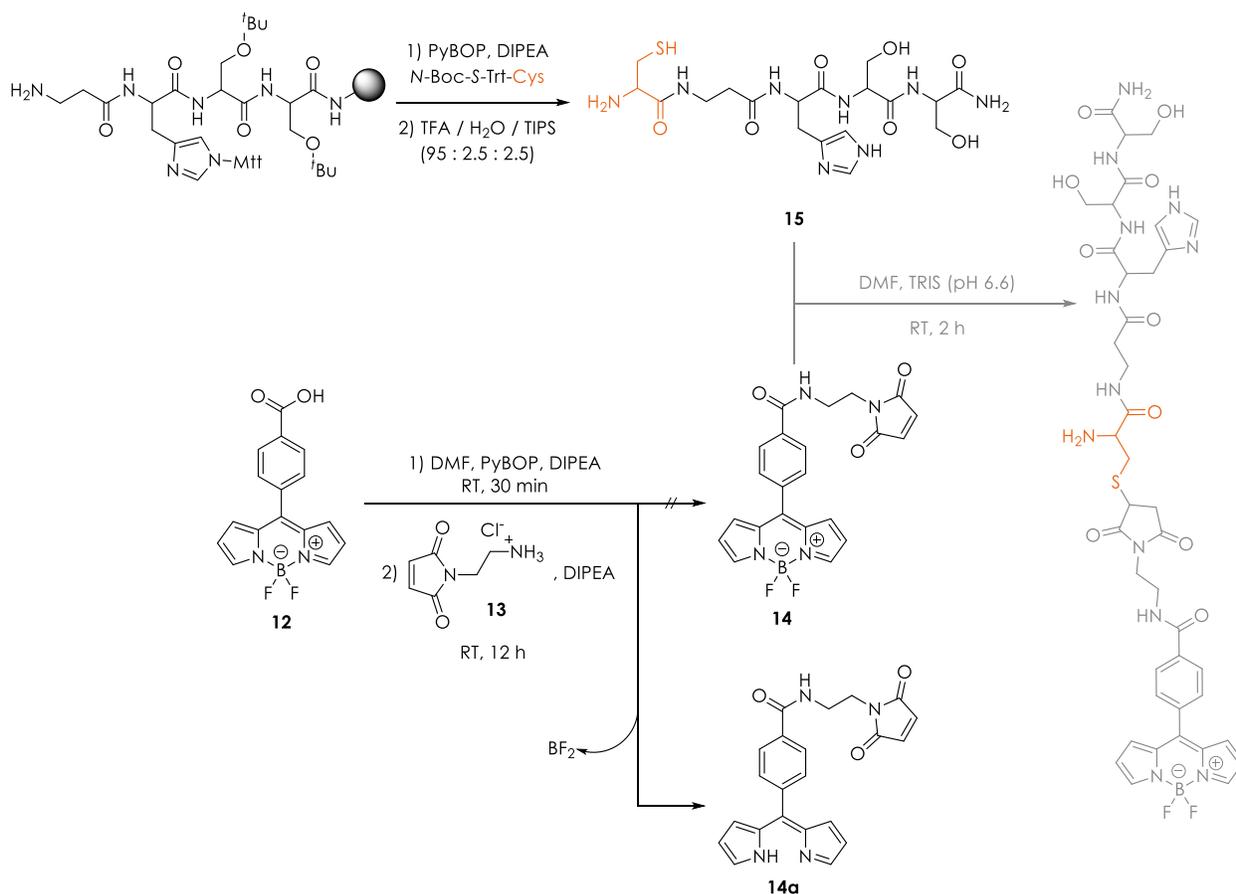
ABBILDUNG 3.17: Schematische Orbitaldarstellung des photoinduzierten Elektronentransfers.^[120,126]

Auch wenn es im BODIPY **12** durch den Phenylring zu einer Verringerung der Quantenausbeute kommt, so reicht die Fluoreszenzintensität für die nachfolgenden Untersuchungen aus (Tabelle 3.5).^[125,127] Das PeT-Fluoreszenzquenching ist also an dieser Stelle nicht von wesentlicher Bedeutung, hat jedoch eine große Bedeutung bei der Untersuchung des Mechanismus⁴ der Fluoreszenzlöschung (vgl. Abschnitt 3.1.3.5).

TABELLE 3.5: Fluoreszenzeigenschaften einiger BODIPY-Derivate in Ethanol.^[125,127]

BODIPY	Substituenten		ϵ [$10^4 M^{-1} cm^{-1}$]	Φ
	meso	1,7		
- ^[125]	-CH ₂ CH ₂ COOH	-H	5.6	0.66
5 ^[125]	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	8.3	0.79
12 ^[127]	-C ₆ H ₄ COOH	-H	6.4	0.031
- ^[127]	-C ₆ H ₄ COOH	-CH ₃	12.0	0.59

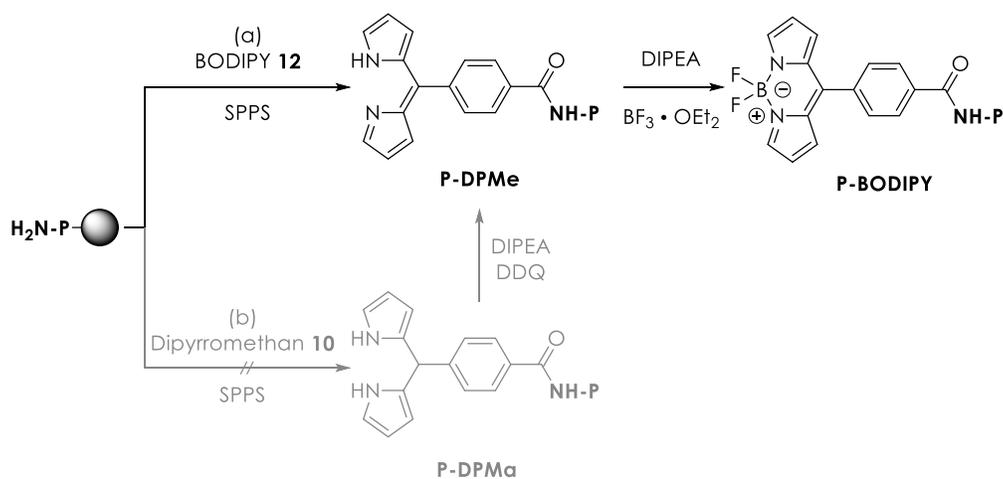
Um bei der Kopplung des BODIPYs **12** die Bedingungen der Festphasen-Peptidsynthese zu umgehen, wurde das Peptid **P-NH₂** zunächst dahingehend modifiziert, dass die letzte Aminosäure (Dap) durch ein Cystein ersetzt wurde. Der Farbstoff sollte anschließend über ein Maleimid in der Flüssigphase an die Thiolgruppe gekoppelt werden (Schema 3.13).



SCHEMA 3.13: Synthese des Maleimids **14/14a**^[134] und die geplante Kopplung an das **cystein**haltige-Peptid **15**.

Die Synthese des Maleimids **14** orientierte sich an einer Vorschrift von *RAINER HAAG et al.*^[134] Hierbei reagieren die Carbonsäure **12** und das Aminoethylmaleimid **13** in ähnlicher Weise wie Aminosäuren bei der Peptidsynthese.^[134] Nach Analyse des Reaktionsproduktes konnte festgestellt werden, dass auch die verhältnismäßig geringen Mengen der Base DIPEA, die für die Kopplung notwendig sind, ausreichen um die BF₂-Gruppe aus **12** abzuspalten. Es konnte daher lediglich das Dipyrrromethen-Maleimid **14a** erhalten werden konnte.

Da eine Kopplung der BODIPY-Farbstoffe **6** und **12** unter Erhalt der BF₂-Gruppe mit den gewählten Bedingungen nicht durchgeführt werden konnte, sollte erneut der Farbstoff **12** nach der Standard-Peptidsynthese an das Peptid **P-NH₂** gekoppelt werden (Schema 3.14). Die BF₂-Gruppe sollte dann nachträglich wieder in das Dipyrrromethen-Gerüst eingefügt werden (a). Da zu diesem Zeitpunkt nicht klar war, ob diese Methode funktioniert, sollte in einem zweiten Ansatz das Dipyrrromethan **10** ebenfalls an das Peptid gekoppelt werden. Ausgehend von **10** wäre die Darstellung des entsprechenden BODIPYs synthetisch möglich (vgl. Synthese von **12**, Schema 3.12) unter der Voraussetzung, dass das Peptid während der Oxidation mit DDQ stabil ist (b).



SCHEMA 3.14: Synthesewege für die Darstellung des Peptids **P-BODIPY**.

Die Aufreinigung des Syntheseansatzes nach der Kopplung von **10** mittels RP-HPLC und die Analyse über ESI-Massenspektrometrie zeigten, dass ein nachträgliches Einführen der BF₂-Gruppe nicht möglich ist: Im Peptid **P-DPMa** kommt es zur Abspaltung eines Pyrrolringes aufgrund der generellen Instabilität von Dipyrrromethanen gegenüber Licht, Luft und Säure.^[126]

Massenspektrometrisch lassen sich dabei die zwei Hauptprodukte **16** und **17** unterscheiden (Abbildung 3.18). Bei der Verbindung **16** dürfte es sich um ein Derivat handeln, bei dem das zentrale Kohlenstoffatom einen Pyrrolring trägt und das zweite Pyrrol durch ein Wasserstoffatom substituiert wurde. Für das Derivat **17** hingegen ist eine kationische Struktur denkbar (Trifluoracetat-Salz). Dass es sich bei den Verbindungen **16** und **17** nicht um die gleiche Spezies handelt und hier lediglich ein Masseneffekt vorliegt, zeigt sich vor allem daran, dass beide Verbindungen sich mittels HPLC trennen lassen und in den einzelnen Fraktionen nicht beide Spezies massenspektrometrisch nebeneinander nachzuweisen sind. Ebenso zeigen beide Fraktionen eine deutlich unterschiedliche Farbe (Abbildung 3.18).

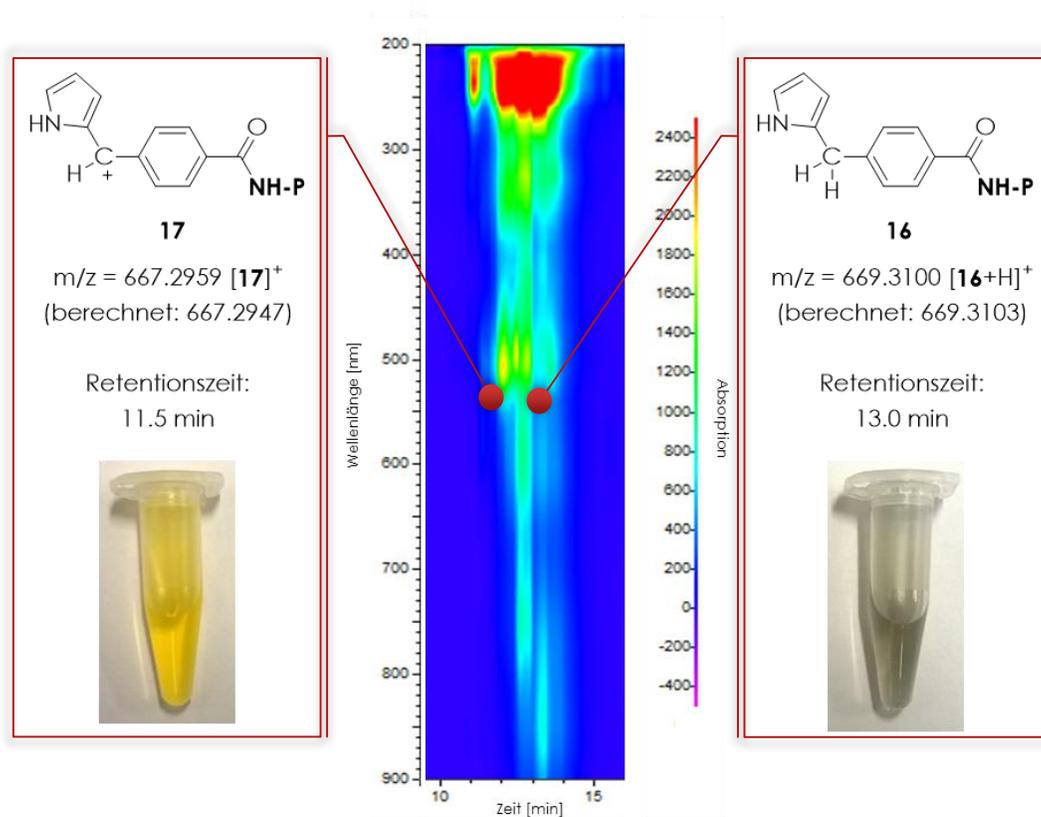


ABBILDUNG 3.18: Strukturen und analytische Daten der Verbindungen **16** und **17**.

Die Analyse der Kopplung von **12** mit dem Peptid **P-NH₂** zeigte hingegen einerseits, dass sich wie erwartet das Peptid **P-DMPe** gebildet hat, aber andererseits auch, dass das Peptid **P-BODIPY** enthalten war. Beide Peptide konnten mithilfe der HPLC getrennt und

isoliert werden, sodass eine erneute Einführung der BF₂-Gruppe nicht notwendig war (Abbildung 3.19). Ob sich dieses Ergebnis ausschließlich mit dem BODIPY **12** ergibt und auch reproduzieren lässt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. Dieser Ansatz sollte jedoch zukünftig weiter untersucht werden, da eine mögliche Festphasen-Kopplung ausgewählter BODIPY-Derivate eine enorme Vereinfachung der Fluoreszenzmarkierung darstellen könnte.

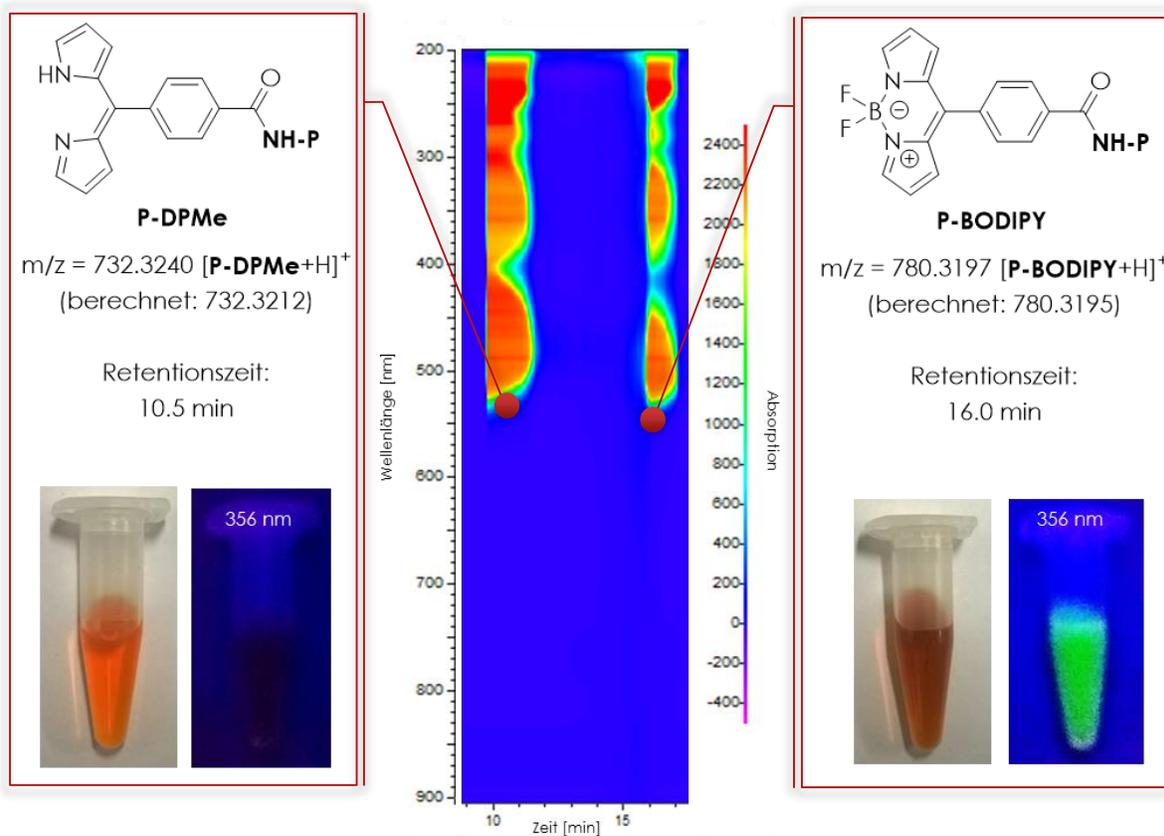
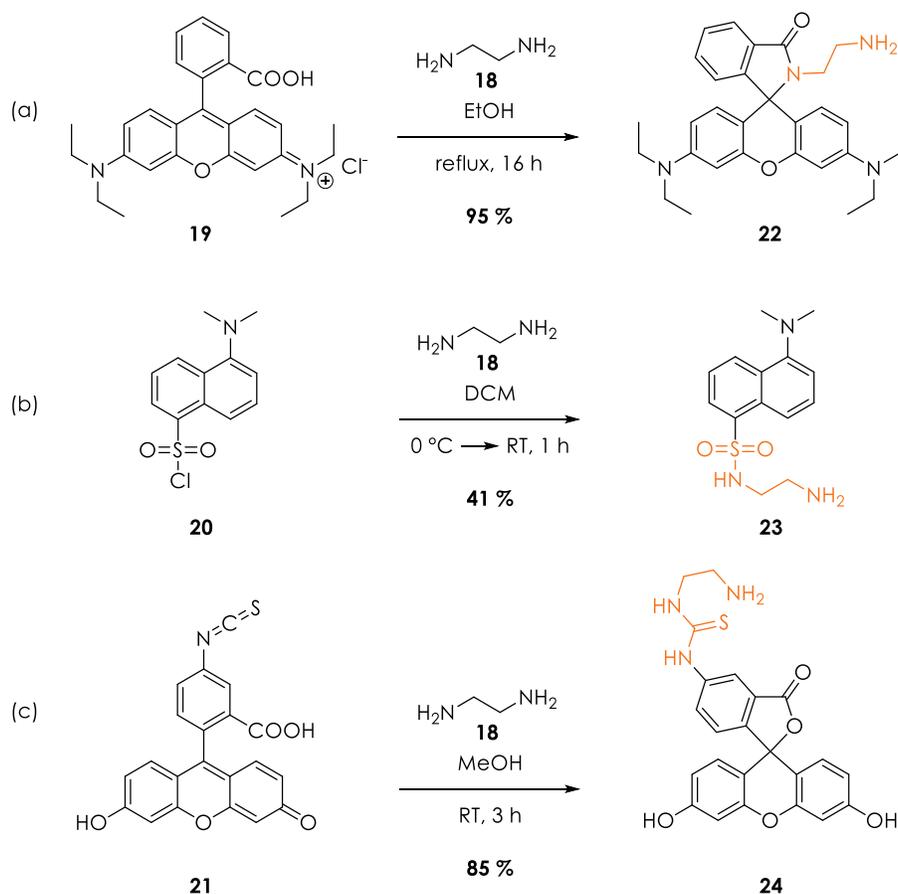


ABBILDUNG 3.19: Strukturen und analytische Daten der Peptide **P-DPMe** und **P-BODIPY**.

3.1.3.2. Ausbeutebestimmung der Peptide

Die Ausbeutebestimmung von Peptiden und Proteinen nach der Synthese und Aufreinigung über Wägung stellt oftmals keinen zuverlässigen Weg dar, da die Ausbeute durch Wasser und Salze verfälscht werden könnte. Die Bestimmung erfolgt daher meist über die Absorption von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei 280 nm. Den größten Anteil an dieser Absorption haben dabei die Aminosäuren Tryptophan und

Tyrosin.^[135] Das verwendete Peptid **P-NH₂** verfügt jedoch nicht über diese Aminosäuren und hat ebenfalls kein ausreichendes Molekulargewicht (mindestens 3000 g mol⁻¹) für die Bestimmung mittels des Bradford-Assays, bei dem die Verschiebung des Absorptionsmaximums des roten Farbstoffes Coomassie-Brillant Blau G-250 von 470 nm zu 595 nm durch Blaufärbung des Farbstoffes bei Bindung an kationische und unpolare Aminosäureseitenketten ausgenutzt wird.^[136,137] Daher sollten die Absorptionen der gekoppelten Farbstoffe zur Ausbeutebestimmung genutzt werden. Unter der Annahme, dass die Extinktionskoeffizienten der freien und der gekoppelten Fluorophore unterschiedlich sind, wurden zunächst Vergleichsverbindungen mit Ethylendiamin synthetisiert, um ein zum Peptid möglichst ähnliches Bindungsmotiv zu erhalten (Schema 3.15).^[138-140] Diese Variante der Ausbeutebestimmung konnte für verschiedene Peptide bereits erfolgreich angewendet werden.^[102,107]



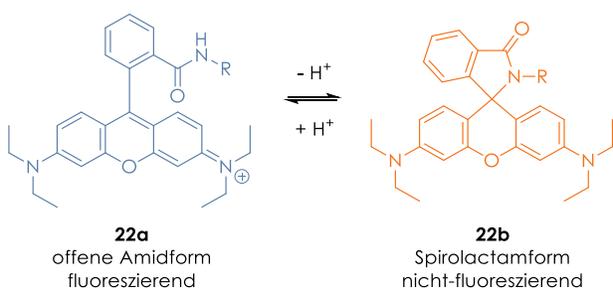
SCHEMA 3.15: Ethylendiamin-Funktionalisierung der Farbstoffe.
 (a) Rhodamin B (für **P-RhB**)^[138], (b) Dansylchlorid (für **P-Dns**)^[139], (c) Fluoresceinisothiocyanat (für **P-FITC**)^[140].
 (zu den Peptiden analoges Bindungsmotiv des Farbstoffes)

Die Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **22** – **24** wurden mithilfe der Messung von Konzentrationsreihen über UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Nach dem *LAMBERT-BEERS*chen Gesetz (**F1-1**) kann durch die Auftragung der Absorption über die Konzentration aus der Steigung der Geraden der Extinktionskoeffizient direkt abgelesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.^[102]

TABELLE 3.6: Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **22** – **24**.^[102]

Verbindung	Lösungsmittel	λ_{max} [nm]	ϵ [$M^{-1} cm^{-1}$]
Rhodamin 22	Ethanol + 0.1 M HCl	556	4 434
Dansyl 23	Ethanol	336	2 582
Fluorescein 24	0.1 M HCl	439	34 094
	0.1 M NaOH	495	37 493

Der verhältnismäßig kleine Extinktionskoeffizient des Rhodamins **22** lässt sich durch das Carbonsäure-Lacton-Gleichgewicht erklären, in dem sich Rhodamine und Fluoresceine in Lösung befinden. Die Bildung des Amids aus der Carbonsäure mit Ethylendiamin führt zu einer starken Verschiebung dieses Gleichgewichts. Rhodamin zeigt dabei nur in der offenen Amidform eine starke Absorption und Fluoreszenz, die besonders bei niedrigen pH-Werten vorliegt (Schema 3.16 und Abbildung 3.20).^[102,107,141] Aus diesem Grund wurde die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in Ethanol mit 0.1 M HCl vorgenommen.



SCHEMA 3.16: Gleichgewicht zwischen den beiden Rhodamin-Amidformen.^[141] (offene Form **22a** und Spirolactam-Form **22b**)

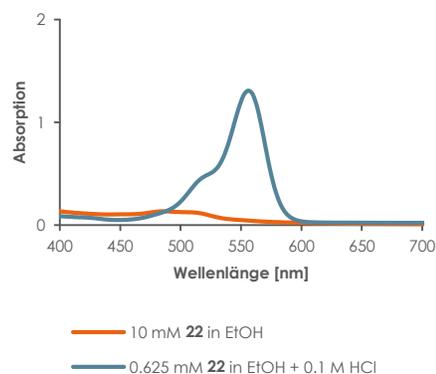


ABBILDUNG 3.20: Absorptionsspektrum von **22** in Ethanol und saurem Ethanol.^[102,107]

Das Fluorescein **24** unterliegt einem ähnlichen Gleichgewicht. Da die Funktionalisierung jedoch an der Isothiocyanatgruppe erfolgte und nicht an der Carbonsäure, ist die Absorptionsminderung wesentlich schwächer ausgeprägt. Unterschiedliche pH-Werte verändern hier vorwiegend die Wellenlänge des Absorptionsmaximums. Um eine definierte Absorption zu erhalten, wurde der Extinktionskoeffizient von **24** unter leicht sauren und leicht basischen Bedingungen bestimmt (Abbildung 3.21).^[102,107]

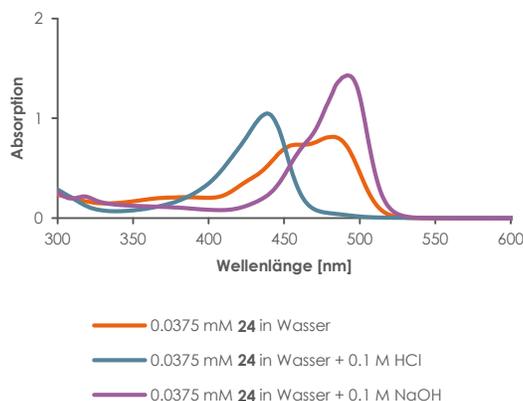
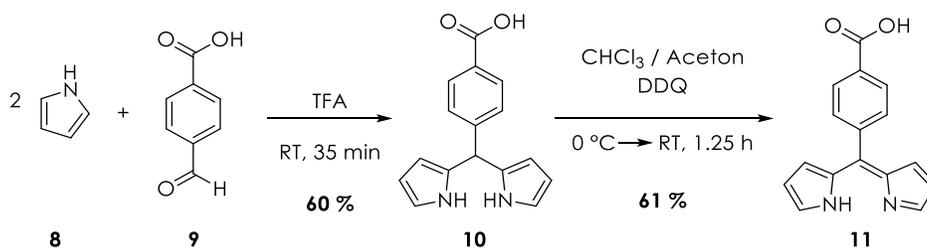


ABBILDUNG 3.21: Absorptionsspektrum von **24** in Wasser, Salzsäure und Natronlauge.^[102,107]

Die Bestimmung der Ausbeute der Peptide **P-RhB**, **P-Dns** und **P-FITC** erfolgte mithilfe der Extinktionskoeffizienten in Tabelle 3.6 unter identischen Bedingungen. Die erhaltenen Ausbeuten wurden mit den Werten verglichen, die über die Wägung der Peptide erhalten wurden. Im Falle des Rhodamins konnte dabei keine Korrelation zwischen dem Farbstoff **22** und dem Peptid **P-RhB** festgestellt werden. Das Amid-Lactam-Gleichgewicht scheint demnach im funktionalisierten Farbstoff anders eingestellt zu sein als im Peptid. Der Vergleich der Ausbeuten für die anderen Peptide (**P-Dns**, **P-FITC**) zeigte jedoch, dass beide Methoden sehr ähnliche Werte liefern, weshalb für das Peptid **P-RhB** die Ausbeute über Wägung herangezogen wurde.^[102] Da eine Bestimmung der Ausbeute über Wägung im vorliegenden Fall möglich ist, wurde für die Peptide **P-DPMe** und **P-BODIPY** aufgrund des hohen synthetischen Anspruchs und der Empfindlichkeit des Farbstoffes auf eine Funktionalisierung mit Ethylendiamin verzichtet. Zusätzlich zur Bestimmung über Wägung wurden zudem die Extinktionskoeffizienten des Dipyrromethens **11** und des BODIPYs **12** bestimmt, um zu testen, ob mit diesen Werten ein Vergleich der Ausbeuten möglich ist.

Das Dipyrromethen **11** wurde dazu nach den Vorschriften der Arbeitsgruppen um *JONATHAN S. LINDSEY*^[128] und *ALAIN VIGROUX*^[142] synthetisiert, da es bei der Synthese des BODIPYs **12** nur *in situ* erzeugt und nicht isoliert wurde (Schema 3.17).



SCHEMA 3.17: Synthese des Dipyrromethens **11**.^[128,142]

Die Absorptionsspektren sowie die Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **11** und **12** sind in Abbildung 3.22 und Tabelle 3.7 dargestellt (zum Vergleich wurde auch die Vorstufe **10** gemessen). Tabelle 3.7 enthält zudem den Vergleich der ermittelten Ausbeuten.

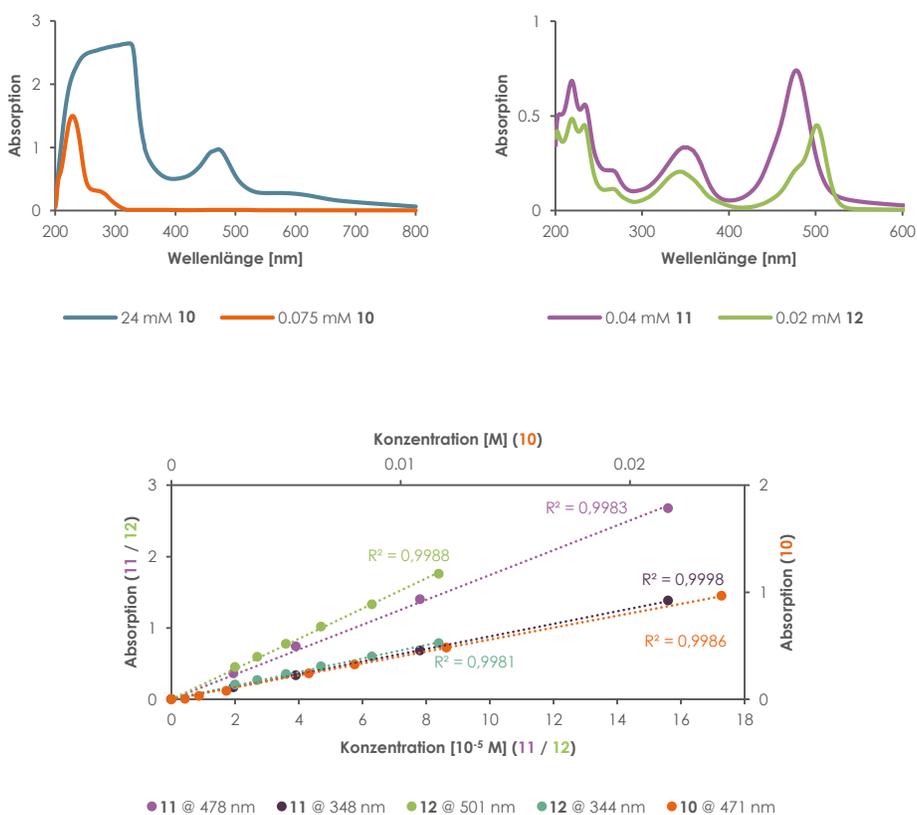


ABBILDUNG 3.22: Absorptionsspektren und Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von **10-12**.

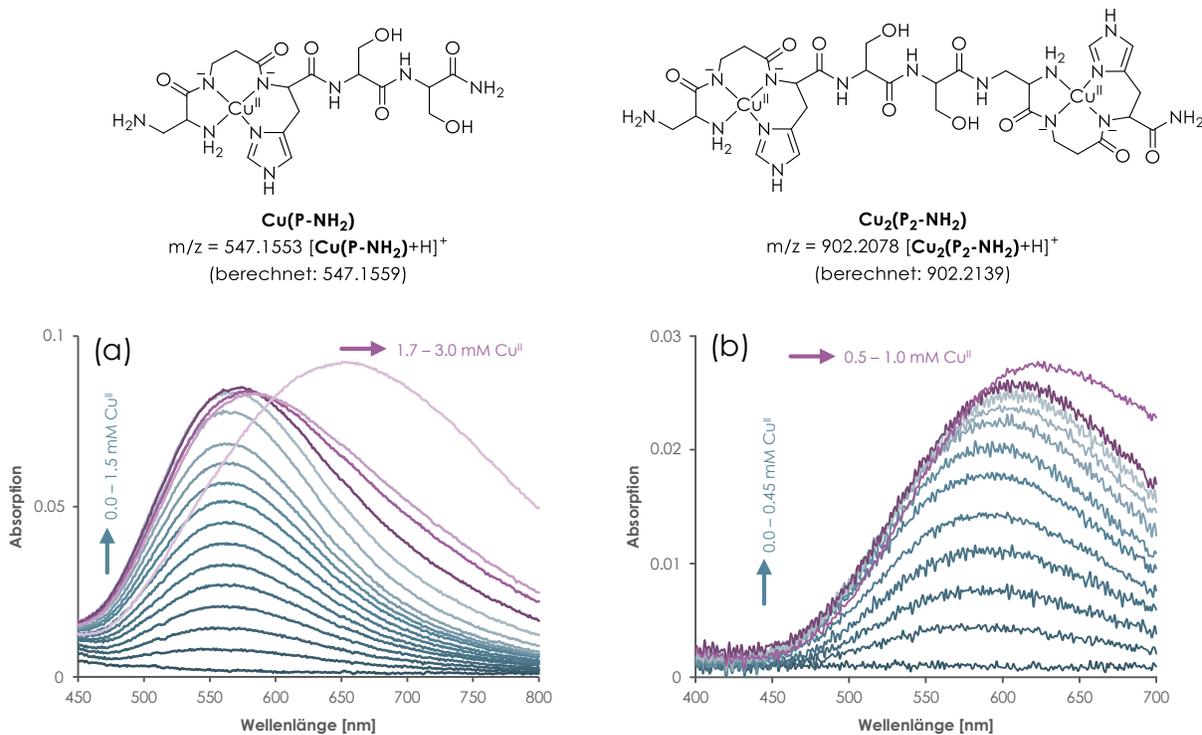
TABELLE 3.7: Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **10** – **12** in H₂O/MeCN (1:1) und Ausbeuten der zugehörigen Peptide.

Verbindung	λ_{max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Peptid	Ausbeute [mg]		Differenz [mg] $\Delta m = m_1 - m_2$
				m_1 UV/Vis	m_2 Wägung	
DPMa 10	471	40	-	-	-	-
DPMe 11	478	17 408	P-DPMe	18.67	19.48	-0.81
	348	8821		(22.2 %)	(23.1 %)	(4.1 %)
BODIPY 12	501	21 214	P-BODIPY	7.70	7.99	-0.29
	344	9540		(8.4 %)	(8.7 %)	(3.7 %)

Die gezeigten Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten lassen erkennen, dass das Dipyrrromethan **10** nur in hohen Konzentrationen eine Absorption oberhalb von 300 nm zeigt. Die Oxidation von **10** zum aromatischen Dipyrrromethen **11** erzeugt einen deutlichen Anstieg der Absorption. Die starke Absorptionsbande bei 478 nm kann dabei dem $S_0 \rightarrow S_1$ ($\pi - \pi^*$)-Übergang zugeordnet werden. Die Bande bei 348 nm entspricht dem $S_0 \rightarrow S_2$ ($\pi - \pi^*$)-Übergang. Die Koordination von BF₂ führt im Farbstoff **12** nochmals zu einer Erhöhung der Absorptionen, wobei das $S_0 \rightarrow S_1$ ($\pi - \pi^*$)-Absorptionsmaximum noch weiter rotverschoben wird (501 nm).^[111,143] Der Vergleich der ermittelten Ausbeuten zeigt einerseits, dass die Kopplung von **11** und **12** an das Peptid die Absorptionsmaxima nicht verschiebt und dass die Bestimmung der Ausbeute über Wägung in sehr gutem Einklang mit der UV/Vis-bestimmten Ausbeute steht. Die geringe Ausbeute des BODIPY-Peptids ist dabei auf die Instabilität des Farbstoffes zurückzuführen.

Ähnliches konnte im Rahmen von Vorarbeiten bereits bei der Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat beobachtet werden (**P-FITC**).^[107] Die Stabilität einer Thioharnstoffbindung in Peptiden während der Abspaltung mit TFA wird in der Literatur unterschiedlich betrachtet.^[144,145] Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass eine Kopplung von FITC an der Festphase möglich ist. Die Ausbeute fällt dabei mit etwa 1-3 % äußerst gering aus. Die Kopplung in der Flüssigphase ist in diesem Falle aufgrund der hohen Kosten des Farbstoffes und der Kopplungsreagenzien zu bevorzugen.^[102,107]

Die Ausbeutebestimmung von ATCUN-Peptiden kann prinzipiell auch durch die Messung der Absorption des $d-d$ -Übergangs des Kupfer(II)-Komplexes bei etwa 550 nm (bzw. 560 nm in Tris-HCl, pH 7.4) erfolgen.^[146] Die starken Absorptionen der gebundenen Farbstoffe in diesem Wellenlängenbereich erschweren jedoch die Nutzung dieser Methode, weshalb sie ausschließlich für die Peptide **P-NH₂** und **P₂-NH₂** genutzt wurde (Abbildung 3.23). Titriert man in kleinen Äquivalenzschritten CuCl₂-Lösung zu einem Aliquot des Peptids, steigt die Absorption des entstehenden Cu^{II}-Komplexes solange an, bis das Peptid vollständig mit Kupferionen gesättigt ist. Dabei muss beachtet werden, dass ein Molekül des Peptids **P₂-NH₂** zwei Äquivalente Cu^{II}-Ionen binden kann. Dies wurde zuvor über ESI-Massenspektrometrie geprüft.



ABILDUNG 3.23: Titrationskurven der Peptide **P-NH₂** (a) und **P₂-NH₂** (b) mit CuCl₂-Lösung. (10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4, Absorption der Cu^{II}-ATCUN-Komplexe, Absorption eines Cu^{II}-Tris-Komplexes)

Rechnet man die erhaltenen Cu^{II}-Konzentration aus der Titration der Aliquoten für den gesamten Syntheseansatz um, ergeben sich für die Ausbeuten 14.6 mg (26 % für **P-NH₂**) und 8.8 mg (10 % für **P₂-NH₂**). Dabei wurden für die Konzentrationen der Cu^{II}-Ionen diejenigen zugrunde gelegt, bei denen anhand des Absorptionsmaximums noch definitiv auszuschließen war, dass sich bereits ein Kupfer(II)-Tris-Komplex ($\lambda_{max} = 650$ nm) gebildet hat.^[147]

3.1.3.3. Spaltung von Plasmid-DNA

Zur Untersuchung der DNA-Spaltung wird im Regelfall die Methode der Gelelektrophorese genutzt.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Agarose-Gelelektrophorese^[148]

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, die zur Auftrennung von Molekülgemischen genutzt werden kann. Gele zur Trennung von DNA- bzw. RNA-Proben nach ihrer Größe bestehen dabei aus dem Polysaccharid Agarose, dessen Monomereinheit aus glycosidisch miteinander verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose gebildet wird (Abbildung 3.24).

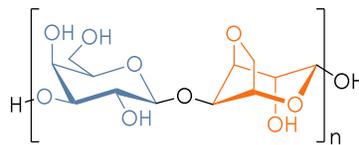


ABBILDUNG 3.24: Struktur der Agarose.
(D-Galactose, 3,6-Anhydro-L-Galactose)

Agarose ist ein starker Gelbildner, der nach Erhitzen in Wasser beim Abkühlen ein Polymernetz durch Quervernetzung der kettenförmigen Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Die Größe der Poren des Netzes kann dabei durch die Konzentration der Agarose beeinflusst werden (die Poren sind umso kleiner, je höher die Agarosekonzentration ist). Die Poren des Gels wirken dabei für die Proben ähnlich einem Sieb. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes werden die negativ geladenen Nucleinsäurestränge durch den induzierten Ionenstrom horizontal in Richtung der Anode durch das Gel gezogen. Nach der Reptationstheorie, die die Retention von nicht-sphärischen Molekülen durch Reibung an der Gelmatrix beschreibt, bewegen

sich kleinere Moleküle dabei schneller durch das Gel als große (Abbildung 3.25).^[149]

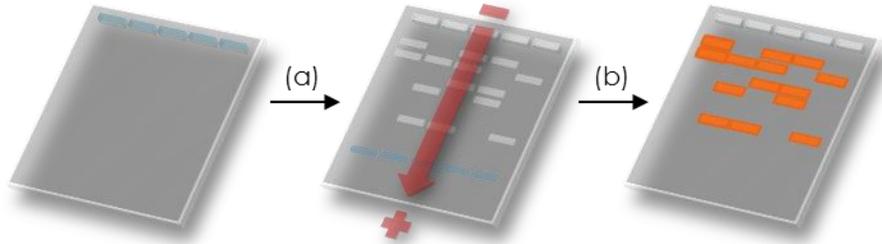


ABBILDUNG 3.25: Schematischer Aufbau der Agarose-Gelelektrophorese. (Die DNA-/RNA-Proben werden mit Saccharose + Bromphenolblau (Ladepuffer) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proben ihrer Größe nach aufgetrennt (a). Die Anregung von Ethidiumbromid (EtBr) macht die DNA-Banden durch Fluoreszenz sichtbar (b).)

Zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente (Banden) wird das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt. Dieses interkaliert zwischen die Nucleobasen (Abbildung 3.26), wodurch das Absorptionsspektrum des Farbstoffes verändert wird.^[150,151] Die Emission von Ethidiumbromid wird dadurch stark erhöht und kann dann nach Anregung mit ultraviolettem Licht zur Auswertung der Gele genutzt werden ($\lambda_{max} = 518 \text{ nm} / \lambda_{em} = 605 \text{ nm}$). Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur DNA-/RNA-Konzentration.^[152,153]

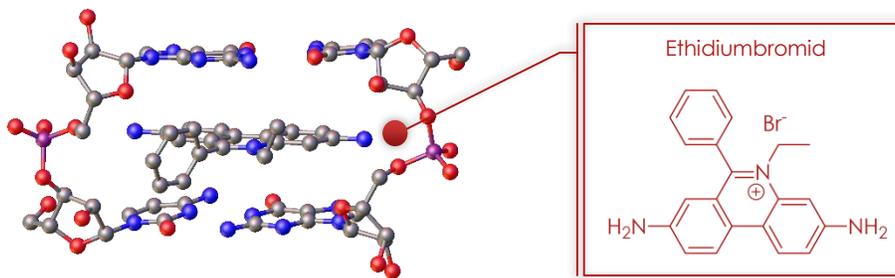


ABBILDUNG 3.26: Molekülstruktur der Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Ribonucleotide Cytidin und Guanosin.^{5,[89,150,151]} (Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor)

⁵ Die Molekülstruktur des EtBr-Addukts wurde der Quelle [151] entnommen: H. M. Sobell et al.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1984**, *1*, 1179-1194. Die Grafik wurde mittels des Programms Olex2 von OlexSys Ltd. erstellt.^[89]

Zur Untersuchung der Nucleaseeigenschaften von Molekülen wird häufig Plasmid-DNA als Modell für eine doppelhelicale DNA verwendet. Aufgrund der intramolekularen Spannung durch die Verdrillung dieser DNA ist diese verhältnismäßig einfach zu spalten und liefert gut auswertbare Gele. Im Allgemeinen können dabei drei unterschiedliche Banden im Gel unterschieden werden. Die drei Banden werden von den häufigsten Formen der Plasmid-DNA erzeugt, wenn diese durch Nucleasen gespalten wird:

- Form I = superspiralisierte DNA (*supercoiled*)
- Form II = offenkettige DNA (*nicked, open circular*)
- Form III = lineare DNA (*linear*)

Aufgrund der kompakten, knäueligen Form der *supercoiled* DNA wandert diese am schnellsten durch die Poren des Gels, gefolgt von der linearen und der offenkettigen Form (Abbildung 3.27).

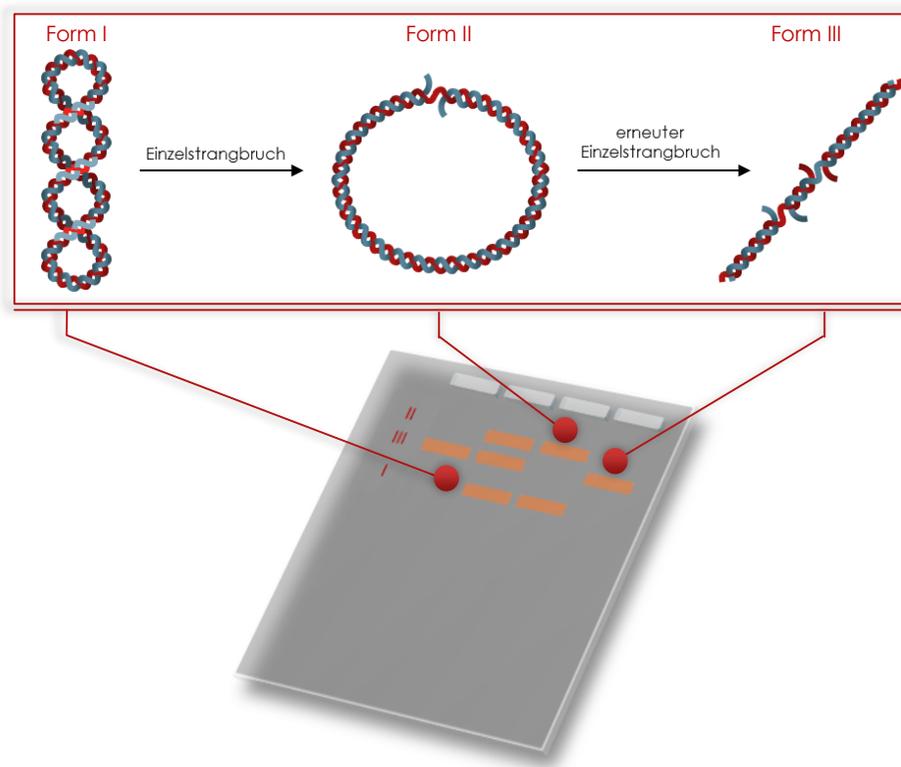


ABBILDUNG 3.27: Schematische Darstellung der drei DNA-Formen und ihres Laufverhaltens auf einem Agarose-Gel.

Die generelle Spaltaktivität der Kupfer(II)-Komplexe der Fluorophor-ATCUN-Peptide gegenüber Plasmid-DNA pBR322 wurde bereits in früheren Experimenten eingehend untersucht.^[102,107] Es konnte gezeigt werden, dass entsprechend der Ergebnisse von YAN JIN und JAMES A. COWAN die Peptidkomplexe nur in Anwesenheit von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel in der Lage sind die DNA zu spalten.^[75] Der Spaltungsgrad erhöht sich dabei mit steigender Konzentration der Komplexe, wobei eine effektive Spaltung erst ab 20-25 μM beobachtet werden kann (Abbildung 3.28). Sie kann jedoch auch durch längere Inkubationszeiten gesteigert werden (Tabelle 3.8).^[102,107]

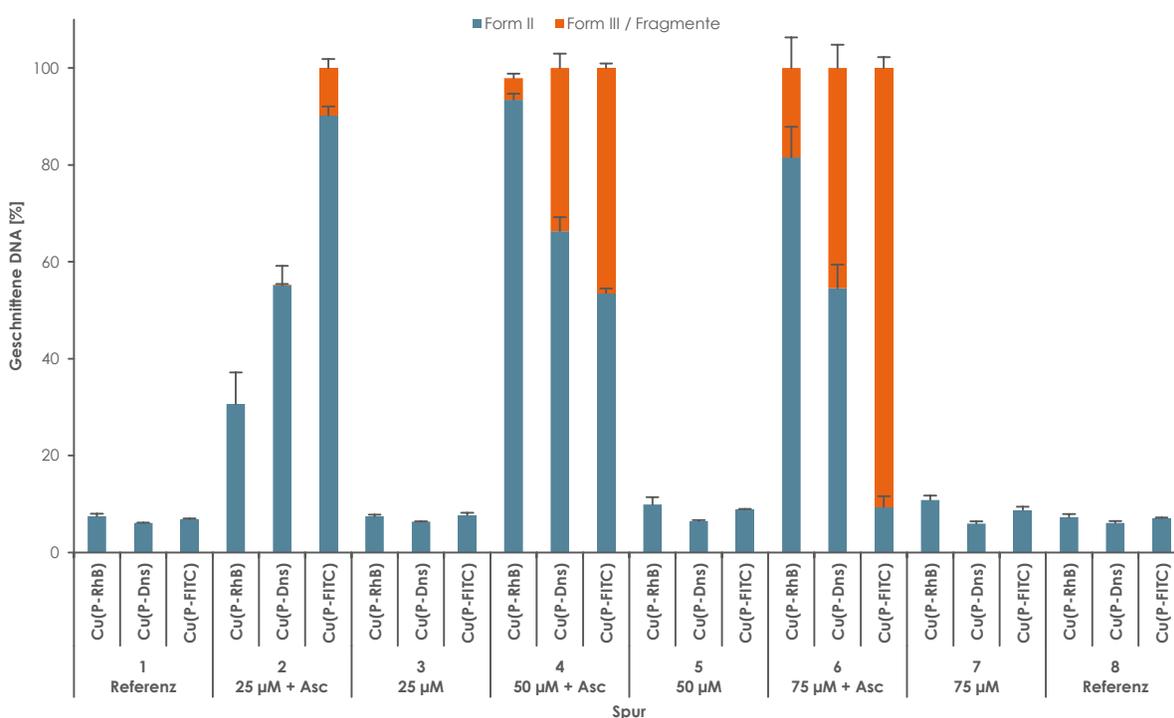


ABBILDUNG 3.28: Quantitative Auswertung der konzentrationsabhängigen DNA-Spaltaktivität der Cu^{II} -Komplexe von **P-RhB**, **P-Dns** und **P-FITC** bezüglich pBR322.^[102,107]
 (0.025 μg μL^{-1} DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der An- und Abwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

TABELLE 3.8: Zeitabhängige Spaltaktivität von **Cu(P-RhB)**.^[102,107]
 (0.05 mM Komplex und 0.025 μg μL^{-1} pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C)

Zeit (h)	Form II [%]	Form III / Fragmente [%]
1	92 ± 3	8 ± 4
2	59 ± 7	41 ± 7
4	10 ± 5	90 ± 5

Vergleicht man die Komplexe untereinander, steigt die Effizienz der DNA-Spaltung in der Reihenfolge **Cu(P-RhB) < Cu(P-Dns) < Cu(P-FITC)**. Es kann vermutet werden, dass dies in Zusammenhang mit den Fluoreszenzfarbstoffen und ihrer Bindungen an das Peptid steht. Aufgrund der unterschiedlichen Länge und Beschaffenheit der Linker (**P-RhB**: Amid, **P-Dns**: Sulfonamid, **P-FITC**: Thioharnstoff) kommt es zu einer mehr (**P-RhB**) oder weniger (**P-FITC**) starken Annäherung des Farbstoffes an das Kupferzentrum, was wiederum eine unterschiedliche Orientierung der Farbstoffe und damit eine Änderung in der Interaktion mit DNA nach sich zieht (Abbildung 3.29). Die Vermutung findet sich unter Einbeziehung der Ergebnisse für **Cu(GGH)** und **Cu(P-NH₂)** in Abbildung 3.30 sowie der Literaturergebnisse für **Cu(GGH)** (100 % Form II, 25 μM, 30 min)^[75] bestätigt, da beide Komplexe in der Lage sind DNA noch effektiver zu schneiden.^[102]

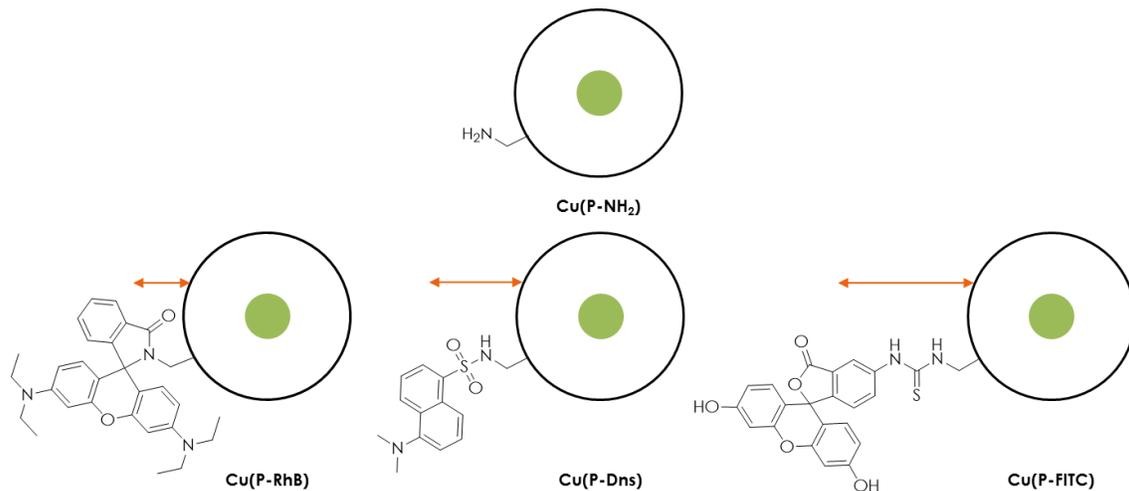


ABBILDUNG 3.29: Mögliche sterische Orientierung der peptidgebundenen Farbstoffe. (← Peptid P-NH₂, • Cu^{II}-Zentrum, → verhältnismäßiger Abstand zum Farbstoffgrundkörper)

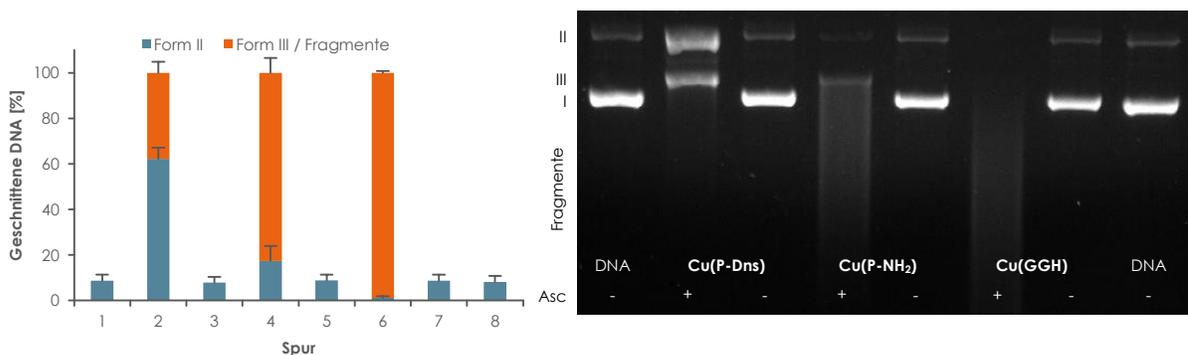


ABBILDUNG 3.30: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **P-Dns**, **P-NH₂** und **GGH**.^[102] (50 μM Komplex und 0.025 μg μL⁻¹ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der An- und Abwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure (Asc) bei 37 °C für 1 h)

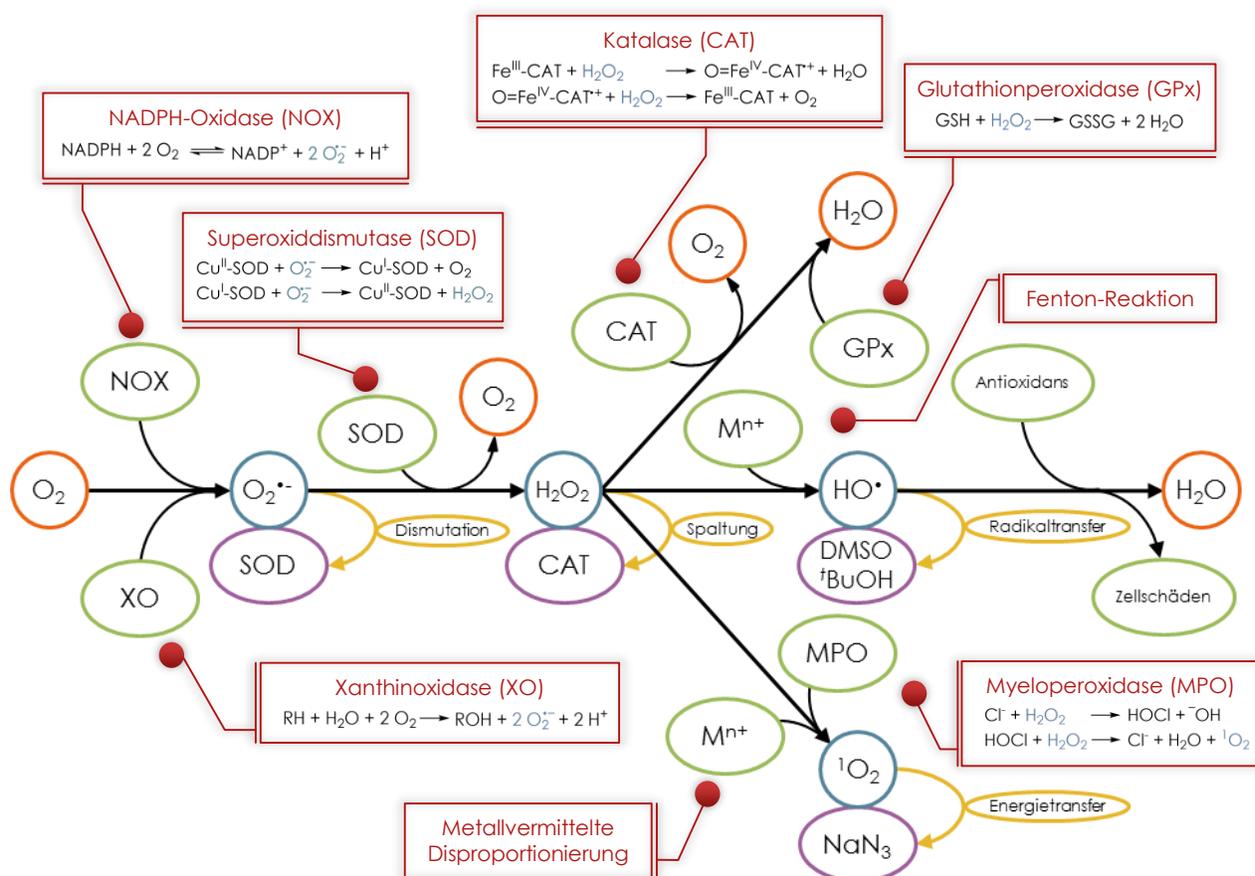
3.1.3.4. Mechanismus der DNA-Spaltung

Die Abhängigkeit der DNA-Spaltung von einem Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure legt nahe, dass die Spaltung des Plasmids auf oxidativem Wege geschieht, da für die hydrolytische Spaltung keine Oxidations- oder Reduktionsmittel notwendig sind.^[19,20] Zur genaueren Untersuchung des Reaktionsmechanismus' und zur Identifikation der an der Spaltung beteiligten ROS wurden die Komplexe **Cu(P-NH₂)**, **Cu(P-RhB)**, **Cu(P-Dns)** und **Cu(P-FITC)** mit Plasmid-DNA und verschiedenen, beispielhaften Fängern für Sauerstoffspezies inkubiert (Tabelle 3.9).

TABELLE 3.9: Literaturbekannte ROS-Fänger und die im Experiment verwendeten Konzentrationen.

<i>ROS-Fänger</i>	<i>ROS</i>	<i>Konzentration</i>
<i>tert-Butanol (tBuOH)</i> ^[154]	Hydroxylradikale	200 mM
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i> ^[155]	Hydroxylradikale	200 mM
<i>Natriumazid (NaN₃)</i> ^[156]	Singulett-sauerstoff	10 mM
<i>Katalase (CAT)</i> ^[49]	Wasserstoffperoxid	2.5 mg mL ⁻¹
<i>Superoxiddismutase (SOD)</i> ^[156]	Superoxid	313 units mL ⁻¹

Die Palette möglicher ROS-Fänger ist dabei sehr vielfältig. Neben einfachen Alkoholen oder Dimethylsulfoxid zum Abfangen von Hydroxylradikalen lassen sich auch mehrwertige Alkohole wie Glycerin oder Mannitol einsetzen.^[157,158] In der Literatur finden sich als Quencher für Singulett-sauerstoff auch Histidin^[159], DABCO und Diphenylfuran, wobei jedoch die Selektivität letzterer umstritten ist.^[160] Natriumazid dagegen ist selektiv für Singulett-sauerstoff, kostengünstig und einfach handhabbar. Die Verwendung von Enzymen wie Katalase, Glutathionperoxidase oder Superoxiddismutase stellt bei diesen Experimenten einen besonderen Vorteil dar, da sie äußerst effektiv sind und ebenfalls im menschlichen Organismus bei oxidativem Stress eine identische Rolle für den Abbau von ROS übernehmen. Das Schema 3.18 zeigt einen Ausschnitt aus der Bildung und dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Systemen durch metallvermittelte oder enzymatische Reaktionen. Gleichzeitig gibt es einen Überblick über die bei den Quenchemperimenten ablaufenden Reaktionen.^[161–170]



SCHEMA 3.18: Ausschnitt aus den Prozessen zur Erzeugung und zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen.^[161-170]
 (Reaktive Sauerstoffspezies (• Radikal, •- Radikalanion), Erzeugung/Abbau von ROS (Enzyme, Antioxidantien, Metallionen), ROS-Fänger, Quenchreaktion, Edukt-/Produktspezies)

Die Ergebnisse der Quenchemperimente sind exemplarisch anhand des **Cu(P-RhB)**-Komplexes in Abbildung 3.31 gezeigt, da für alle getesteten Komplexe einschließlich **Cu(GGH)** identische Ergebnisse erzielt wurden. Der Mechanismus der Spaltung ist demnach für alle Komplexe der gleiche. Die Abbildung zeigt, dass die DNA-Spaltung durch *tert*-Butanol, Dimethylsulfoxid und Katalase deutlich inhibiert wird (Spuren 3, 4, 6). Damit ist davon auszugehen, dass sowohl Hydroxylradikale als auch Wasserstoffperoxid an der Spaltung beteiligt sind.^[102] Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe um JAMES A. COWAN.^[75] Die eher geringe Inhibierung der Spaltung durch *t*BuOH im Vergleich zu DMSO ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das entstehende *tert*-Butanolradikal schlechter stabilisiert wird und Folgereaktion zur weiteren Schädigung der DNA führen, wohingegen das DMSO-Radikal bzw. das gebildete Methylradikal keine zusätzliche Schädigung der DNA herbeiführen.^[169]

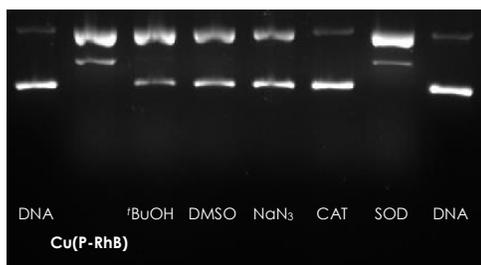
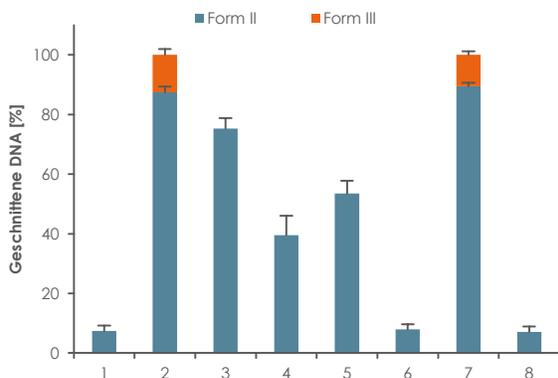


ABBILDUNG 3.31: DNA-Spaltaktivität von **Cu(P-RhB)** bezüglich pBR322 in der Anwesenheit verschiedener ROS-Fänger.^[102]

(50 μM Komplex und 0.025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Plasmid-DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h)

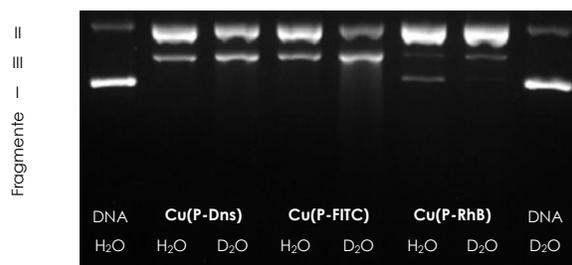
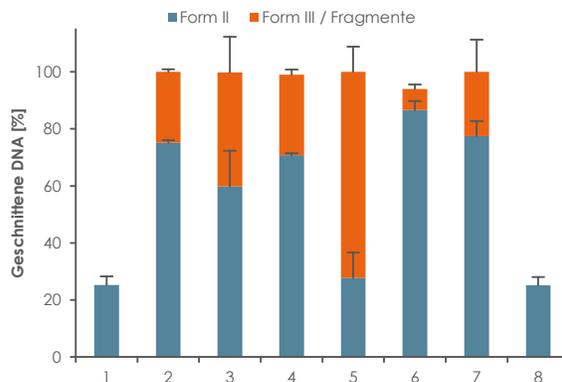
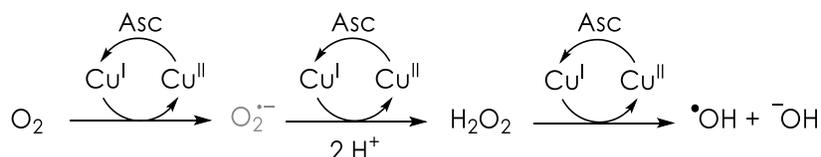


ABBILDUNG 3.32: DNA-Spaltaktivität von **Cu(P-Dns)**, **Cu(P-FITC)** und **Cu(P-RhB)** bezüglich pBR322 in H_2O und D_2O .^[102]

(50 μM Komplex und 0.025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Plasmid-DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der Anwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

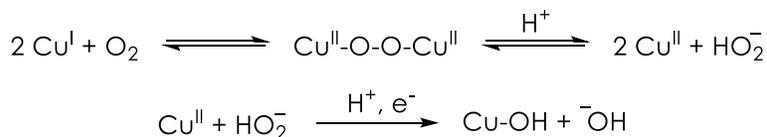
Darüber hinaus wird die Spaltung jedoch auch bei Anwesenheit von Natriumazid stark reduziert (Spur 5). Um zu überprüfen, ob dies tatsächlich auf eine Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an der DNA-Spaltung zurückzuführen ist und kein Effekt des Azids selbst ist, wurden als Kontrollexperiment die Komplexe **Cu(P-RhB)**, **Cu(P-Dns)** und **Cu(P-FITC)** wie zuvor mit DNA inkubiert. Das verwendete Wasser wurde jedoch gegen deuteriertes Wasser ersetzt. Singulett-Sauerstoff hat in H_2O eine Lebensdauer von 2 – 7 μs . In D_2O wird die Lebensdauer etwa um den Faktor 10 erhöht.^[171] Daher sollten $^1\text{O}_2$ -abhängige Reaktionen in D_2O effektiver verlaufen. Abbildung 3.32 zeigt das Ergebnis dieses Versuches und es wird deutlich, dass die DNA-Spaltung durch die Kupferkomplexe in D_2O etwa um das Zwei- bis Dreifache verstärkt wird. Singulett-Sauerstoff stellt demnach ebenfalls eine reaktive Sauerstoffspezies bei der DNA-Spaltung durch Cu^{II} -ATCUN-Komplexe dar.^[102] Die Mechanismen zu dessen Bildung sind dabei jedoch nicht klar. Vermutet werden kann entweder ein direkter Energietransfer auf Triplett-Sauerstoff bzw. die thermische oder kupfervermittelte Zersetzung/Disproportionierung des Wasserstoffperoxids.^[172]

Unter Vernachlässigung des Singulett-Sauerstoffs erfolgt die Spaltung von Plasmid-DNA also durch die Bildung von OH-Radikalen und H₂O₂ bei der Oxidation von Cu^I-Ionen mit molekularem Sauerstoff, wobei die Cu^I-Ionen durch die Reduktion von Cu^{II} mit Ascorbinsäure gebildet werden (Schema 3.19).^[74,102,173]



SCHEMA 3.19: Mechanismus der Erzeugung von ROS durch Cu^{II}-Ionen und Ascorbinsäure.^[74,102,173]
 (Superoxid konnte nicht mittels Quenchversuchen nachgewiesen werden,
 Cu^I und Cu^{II} beschreiben komplexgebundene Kupferionen)

Die Gegenwart von metallgebundenen Sauerstoffspezies, die nicht durch die Quenchversuche erfasst werden können, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich beispielsweise Untersuchungen an Cu-ATCUN-Komplexen, die anhand von Versuchen mit dem Radikalfänger Rhodamin B sowohl Cu-Peroxo- als auch Cu-Hydroxylspezies als Intermediate bei der Erzeugung von ROS nahelegen (Schema 3.20).^[75]



SCHEMA 3.20: Bildung von metallgebundenen ROS durch Cu-ATCUN-Komplexe.^[75]
 (Cu^I und Cu^{II} beschreiben komplexgebundene Kupferionen)

Neuere Analysen zeigten sogar mittels Cyclovoltammetrie und der Korrelation der Elektrodenpotentiale mit den Reaktionskonstanten für die Geschwindigkeit der DNA-Spaltung, dass ein Cu^{III}/Cu^{II}-Redoxzyklus beteiligt ist. Die Potentiale offenbaren dabei, dass Cu-ATCUN-Komplexe durch Ascorbinsäure nicht direkt reduziert werden können. Inwiefern jedoch eine DNA-Spaltung unter reduzierenden Bedingungen, d.h. nur in Anwesenheit von Ascorbinsäure, durch Oxidation von Cu^{II} zu Cu^{III} verlaufen soll, ist bisher ungeklärt.^[99,174]

Zur Untersuchung des Redoxzyklus' für die hier vorliegenden Cu^{II} -Komplexe wurde exemplarisch der Komplex **Cu(P-Dns)** unter inerten Bedingungen in Tris-HCl-Puffer (auf D_2O -Basis) NMR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 3.33A). Das Spektrum zeigt die für eine paramagnetische Cu^{II} -Verbindung erwarteten verbreiterten Signale. Nach Zugabe von Ascorbinsäure weist das NMR-Spektrum hingegen scharfe, diamagnetische Signale auf (Abbildung 3.33B). Dies geht mit dem Verlust der für Cu^{II} -ATCUN-Komplexe typischen roten Färbung einher. Unter anaeroben Bedingungen können diese Beobachtungen nur durch die Reduktion des Cu^{II} -Zentrums erklärt werden.^[102]

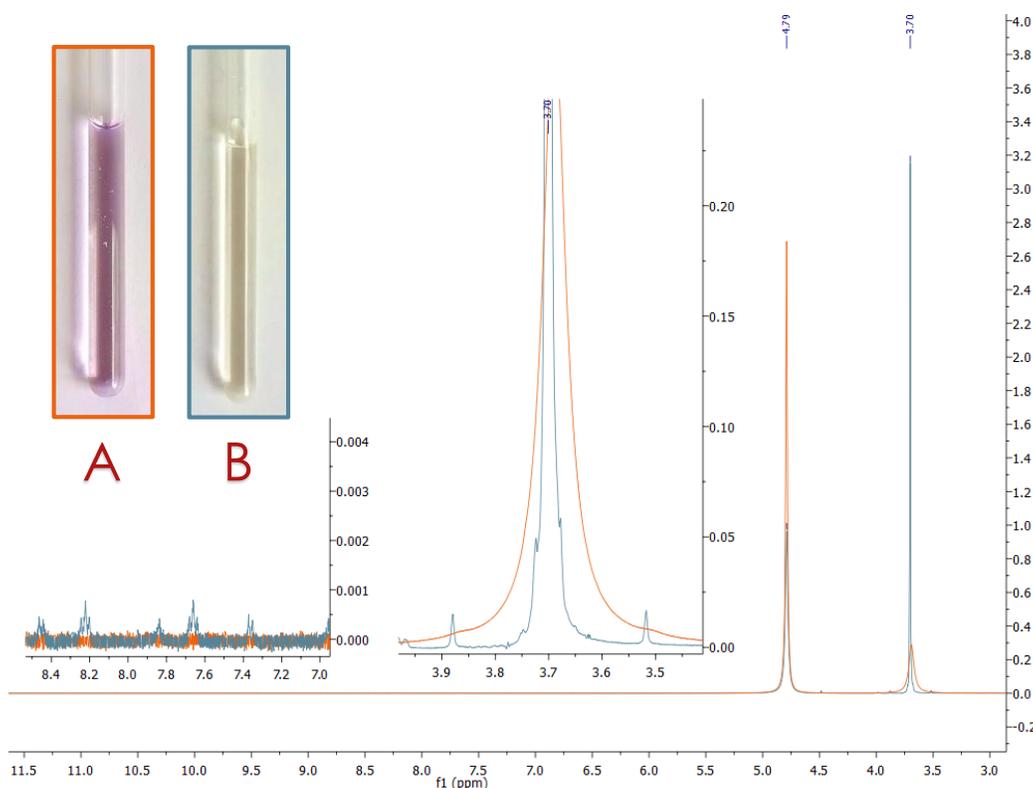


ABBILDUNG 3.33: NMR-Spektren von **Cu(P-Dns)**.^[102]
A: 1 mM Peptid + 0,8 mM CuCl_2 in 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 in D_2O
B: Probe A + 5 mM Ascorbinsäure

Diese Beobachtungen werden zusätzlich durch Gelelektrophorese-Experimente unterstützt. In der Anwesenheit von Neocuproin (neo, 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin), ein für Cu^{I} -Ionen spezifischer Chelator^[175], wird die DNA-Spaltung mit Ascorbinsäure durch die Komplexe **Cu(P-RhB)** (a) und **Cu(P-Dns)** (b) stark inhibiert (Abbildung 3.34).^[102]

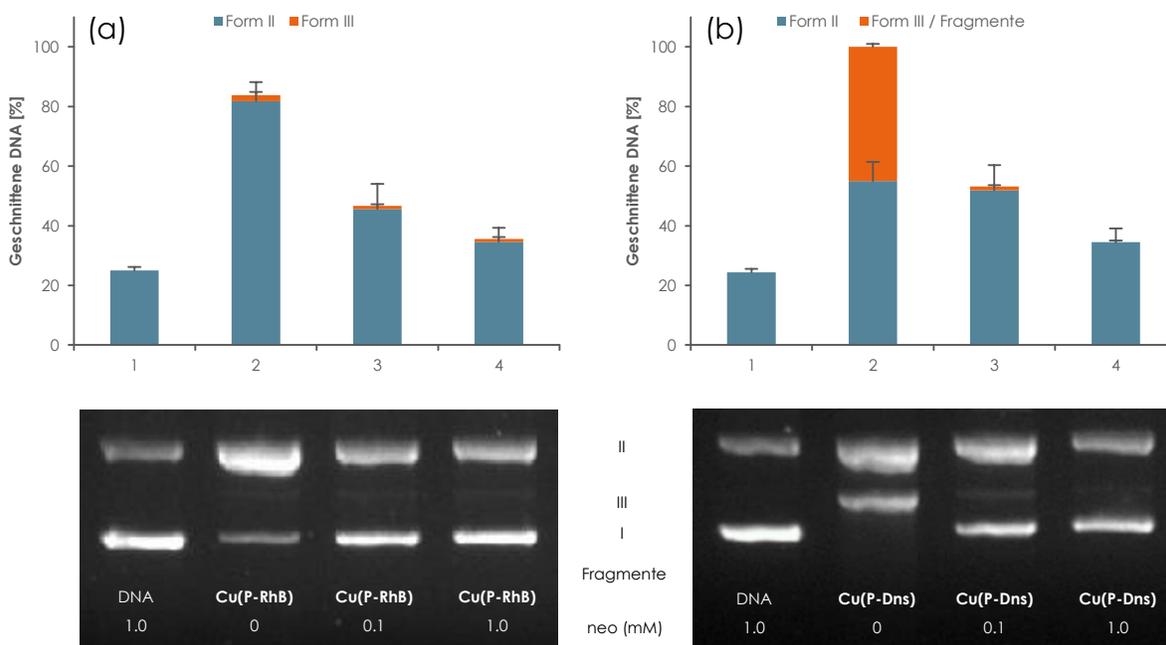


ABBILDUNG 3.34: DNA-Spaltaktivität von **Cu(P-RhB)** (a) und **Cu(P-Dns)** (b) bezüglich pBR322 in der Anwesenheit von Neocuproin.^[102]
(50 μM Komplex und $0.025 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der Anwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

Zusammengefasst zeigen das NMR-Experiment und die Gelelektrophorese-Experimente die Beteiligung und die wichtige Rolle von Cu^{II}-Ionen bei der DNA-Spaltung unter den hier gewählten Bedingungen.

3.1.3.5. Fluoreszenzuntersuchungen

Mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.3.4 und dem Wissen, dass die Fluoreszenz verschiedener Farbstoffe durch paramagnetische Cu^{II}-Ionen gequencht werden kann^[176–179], sollte in Fluoreszenzexperimenten gezeigt werden, wie sich die Komplexierung von Kupfer(II) durch ATCUN-Peptide auf die Farbstoffe Dansyl, Rhodamin B, Fluorescein und BODIPY auswirkt und inwiefern die Redoxprozesse während der DNA-Spaltung einen Einfluss auf dieses Phänomen haben. Für Rhodamin B muss dabei beachtet werden, dass die Fluoreszenz bei physiologischem pH-Wert (pH 7.4) auch in der Abwesenheit von Kupfer(II)-Ionen vollständig gequencht wird. Eine Nutzung der Fluoreszenz ist erst unterhalb eines pH-Werts von 6 möglich (Abbildung 3.35 und vgl. Abschnitt 3.1.3.2). Aus diesem Grund wurde die generelle Stabilität der Kupfer(II)-Komplexe bei verschiedenen pH-Werten mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abbildung 3.36).

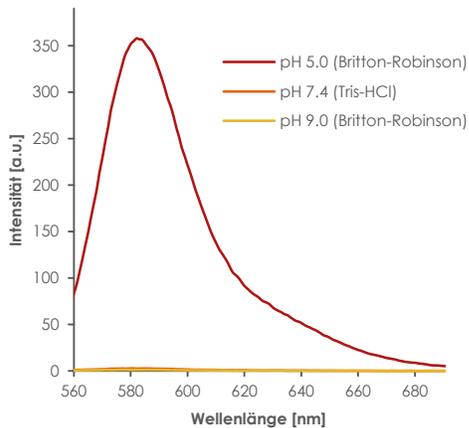


ABBILDUNG 3.35: Fluoreszenzspektrale von **P-RhB** bei unterschiedlichen pH-Werten. [102,107] (50 μ M Peptid, λ_{max} = 582 nm)

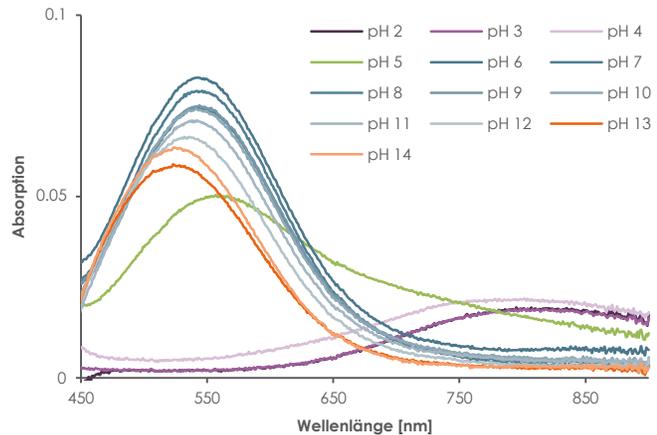


ABBILDUNG 3.36: UV/Vis-Spektren der pH-abhängigen Cu^{II} -Bindung durch das Peptid **P-Dns**. [102] (2,0 mM Peptid, pH 2-14 mit HCl/KOH)

Die Absorptionsspektren vom 1 : 1-Komplex von **Cu(P-Dns)** zeigen im Bereich von pH 2 - 4 ausschließlich eine breite Bande bei 800 nm, die typisch für Cu^{II} -Ionen in Wasser ist. [180] Bei steigendem pH-Wert nimmt die Intensität der Bande für den $d-d$ -Übergang des Cu^{II} -Peptid-Komplexes bei 525-550 nm zu, während die Bande für Cu^{II} -Ionen abnimmt. [181] Die Abbildung zeigt deutlich, dass ATCUN-Komplexe über einen weiten pH-Bereich stabil sind, Cu^{II} -Ionen jedoch unterhalb eines pH-Wertes von 6 nicht durch die typische ATCUN-Koordinationsumgebung gebunden werden, da es zu keiner Deprotonierung der Amid-Stickstoffatome kommt. Dass die Peptide bei pH 5 trotzdem eine - wenn auch veränderte - Koordination von Cu^{II} -Ionen zeigen und dass Rhodamin B ab diesem pH-Wert intensiv fluoresziert, macht die Anwendung des Fluoreszenzkonzeptes auch bei nicht-physiologischen pH-Werten denkbar. Alle nachfolgenden Untersuchungen des Peptids **P-RhB** wurden daher bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt. Da der Tris-HCl-Puffer nur im Bereich von pH 7.2 - 9.0 eine gute Pufferkapazität besitzt, wurde stattdessen der Britton-Robinson-Puffer verwendet, der über einen wesentlich weiteren pH-Bereich puffert (pH 2.0 - 12.0).⁶, [182]

Die Arbeitsgruppe um *BARBARA IMPERIALI* zeigte bereits, dass Cu^{II} -Ionen die Fluoreszenz von Dansyl, wenn es an das Peptid **P-NH₂** gekoppelt wird, fast vollständig quenchen.

⁶ Britton-Robinson-Puffer: 0.04 M CH_3COOH + 0.04 M H_3PO_4 + 0.04 M H_3BO_3 + 0.2 M NaOH [182]

Die Komplexierung von Ni^{II}-Ionen bzw. die Anwesenheit zweiwertiger Metallionen wie Mn^{II}, Fe^{II}, Co^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Mg^{II} oder Ca^{II} hat dagegen nur einen äußerst geringen Einfluss.^[100]

Die Abbildung 3.37 zeigt exemplarisch an den Peptiden **P-RhB** (a) und **P-FITC** (b) die Titration mit CuCl₂-Lösung. Mit steigender Cu^{II}-Konzentration, d.h. mit steigender Komplexbildung, nimmt die Fluoreszenzintensität der Peptide ab. Für keinen der Farbstoffe konnte dabei bei einem Ligand : Metall-Verhältnis von 1 : 1 ein komplettes Fluoreszenzquenching beobachtet werden. Längere Inkubationszeiten zeigten jedoch, dass dies hauptsächlich ein Effekt der *in situ*-Messung ist, wobei das Peptid **P-FITC** generell den geringsten Quencheffekt aufweist (Tabelle 3.10).^[102,107]

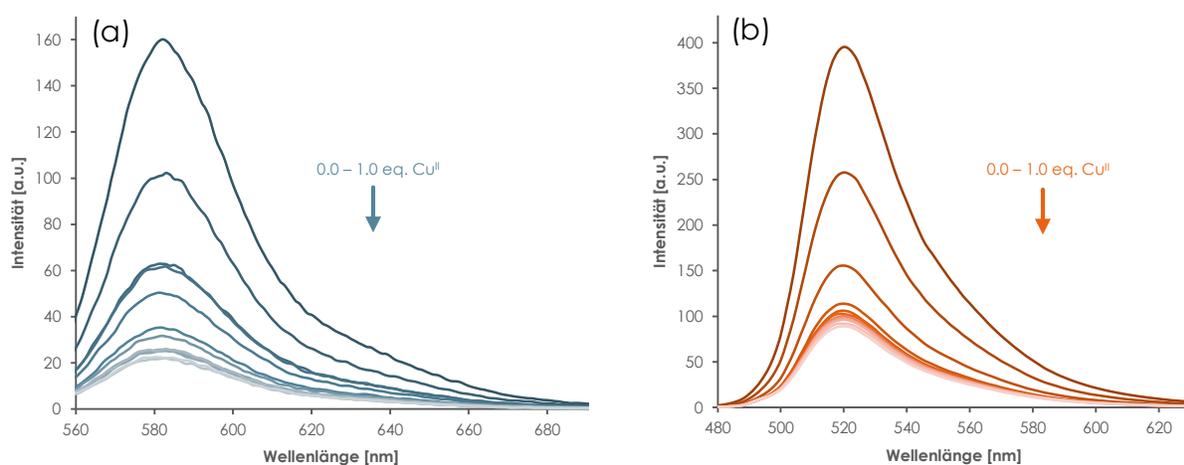


ABBILDUNG 3.37: Fluoreszenzspektren der Titration von **P-RhB** (a) und **P-FITC** (b) mit CuCl₂.^[102,107]
(50 µM Peptid in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit einer Inkubationszeit von 5 min nach jeder Cu^{II}-Zugabe)

TABELLE 3.10: Fluoreszenz der Cu^{II}-ATCUN-Komplexe (1 : 1) nach 5 min und einer Inkubation von 24 h.

Peptid	Puffer (10 mM, pH)	λ_{max} [nm]	λ_{em} [nm]	Restfluoreszenz [%] Ligand : Metall = 1 : 1	
				5 min (<i>in situ</i>)	24 h
P-RhB	Britton-Robinson (5.0)	552	582	14	6
P-Dns	Tris-HCl (7.4)	333	556	30	6
P-FITC	Tris-HCl (7.4)	495	520	23	12
P-BODIPY	Tris-HCl (7.4)	501	527	39	9

Für das Quenchen der Fluoreszenz durch Übergangsmetallionen wie Kupfer(II) sind in der Literatur im Allgemeinen zwei verschiedene Prozesse bekannt, wie dieses hervorgerufen werden kann: Elektronen- und Energietransfer.^[183–186]

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Fluoreszenzquenching

Die strahlungslose Deaktivierung eines Fluorophors kann durch Übergangsmetalle sowohl durch einen Elektronentransfer als auch durch einen Energietransfer initiiert werden. Beim Elektronentransfer wird vom Metallzentrum ein Elektron auf den angeregten Fluorophor übertragen, wobei das Metallion selbst oxidiert wird (Abbildung 3.38). Damit ein Elektron übertragen werden kann, müssen sich das Metall und der Fluorophor in großer räumlicher Nähe befinden.^[184]

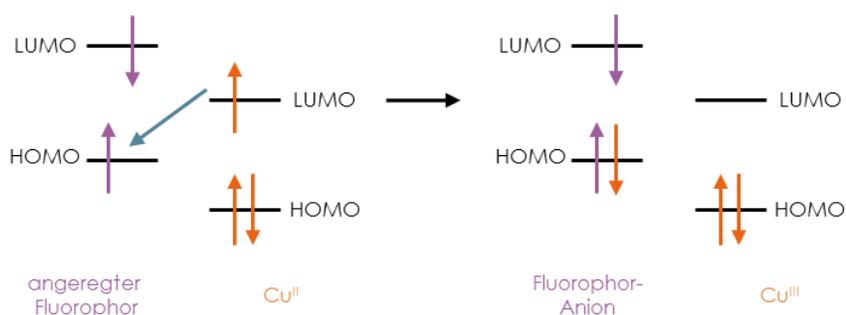


ABBILDUNG 3.38: Fluoreszenzquenching durch Elektronentransfer zwischen Cu^{II} und Fluorophor.^[183,184]

Die Deaktivierung des Fluorophors kann auch durch die Übertragung von Energie geschehen. Hierbei können wiederum zwei Prozesse unterschieden werden (Abbildung 3.39). Einerseits verfügen Metallionen wie Cu^{II} über d-Orbitale, die sich für einen Dexter-Energietransfer eignen, sofern es zu einer Überlappung der Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor kommt (a).^[187] Auf der anderen Seite kann die Energie durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) übertragen werden (b).^[188]

Hierbei regt der angeregte Fluorophor durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Übergangsdipolmomente ein anderes Molekül an, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt (Abbildung 3.40).

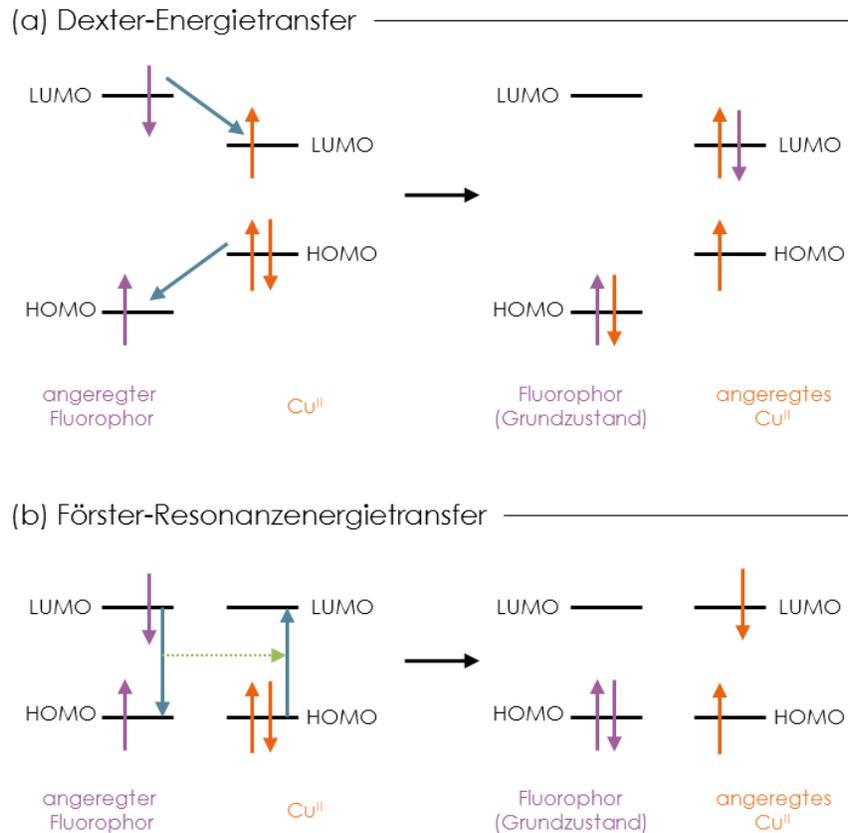


ABBILDUNG 3.39: Fluoreszenzquenching durch Elektronenbewegungen im (a) Dexter-Energietransfer und (b) Förster-Resonanzenergietransfer.^[184,187,188]

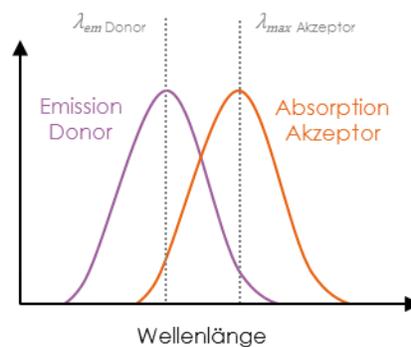


ABBILDUNG 3.40: Überlappung der Donoremission und der Akzeptorabsorption.^[188]

Die Effizienz beider Prozesse hängt stark vom Donor-Akzeptor-Abstand R ab. Aus der Berechnung der Energietransferraten ergibt sich, dass die Effizienz für den Förster-Transfer mit einer Rate von $\frac{1}{R^6}$, die für den Dexter-Prozess exponentiell mit e^{-R} fällt. Daraus folgt, dass im Gegensatz zum FRET-Prozess, bei dem Donor und Akzeptor durchaus bis zu 10 nm entfernt sein können, beim Dexter-Prozess der Abstand im Regelfall nicht mehr als 1 nm betragen darf, da hier Elektronen ausgetauscht werden.^[185–188]

Welche Art des Quenchings vorliegt, kann mithilfe von Fluoreszenzmessungen bei niedrigen Temperaturen untersucht werden. Da ein Elektronentransfer (Abbildung 3.38) eine Ladungstrennung bewirkt (Fluorophor-Anion + Kupfer(III)-Kation), kommt es in Lösung zu einer Neuordnung der umgebenden Lösungsmittelmoleküle. Ist das Lösungsmittel gefroren, verhindert die Immobilisierung diese Neuordnung, sodass der Quenchprozess unterbunden und die Fluoreszenz wiederhergestellt wird. Ein Energietransfer hingegen benötigt keine Neuordnung des Lösungsmittels, d.h. der Aggregatzustand hat keinen Einfluss auf das Fluoreszenzquenching (Abbildung 3.39).^[184]

Abbildung 3.41 zeigt die Fluoreszenzspektren der Peptide **P-RhB**, **P-Dns**, **P-FITC** und **P-BODIPY** (a) und der entsprechenden Cu^{II}-Komplexe (b). Da es für die Messung der Fluoreszenz bei -196 °C (flüssiger Stickstoff) notwendig ist, dass das Anregungslicht nicht vom gefrorenen Lösungsmittel absorbiert bzw. reflektiert wird, wurden die Untersuchungen in dem glasbildenden Lösungsmittel Ethanol unter Zusatz von Tris-HCl-Puffer durchgeführt. Wie bereits in Tabelle 3.10 gezeigt, wird die Fluoreszenz aller Farbstoffe durch die Koordination von Kupfer(II)-Ionen gequencht (b). Die Immobilisierung des Lösungsmittels durch Gefrieren bei -196 °C führt für die Komplexe **Cu(P-RhB)**, **Cu(P-Dns)** und **Cu(P-FITC)** zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität (c). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass der Quenchmechanismus über den Prozess des Elektronentransfers verläuft. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität des **Cu(P-BODIPY)**-Komplexes ist vermutlich nicht auf einen anderen Mechanismus zurückzuführen, sondern vielmehr darauf, dass bei tiefen Temperaturen ebenfalls die Rotation des BODIPY-Grundkörpers um die Bindung zum Phenylring gehemmt wird,

wodurch der photoinduzierte Elektronentransfer im BODIPY-Farbstoff selbst unterdrückt wird (vgl. Abbildung 3.17, Abschnitt 3.1.3.1).

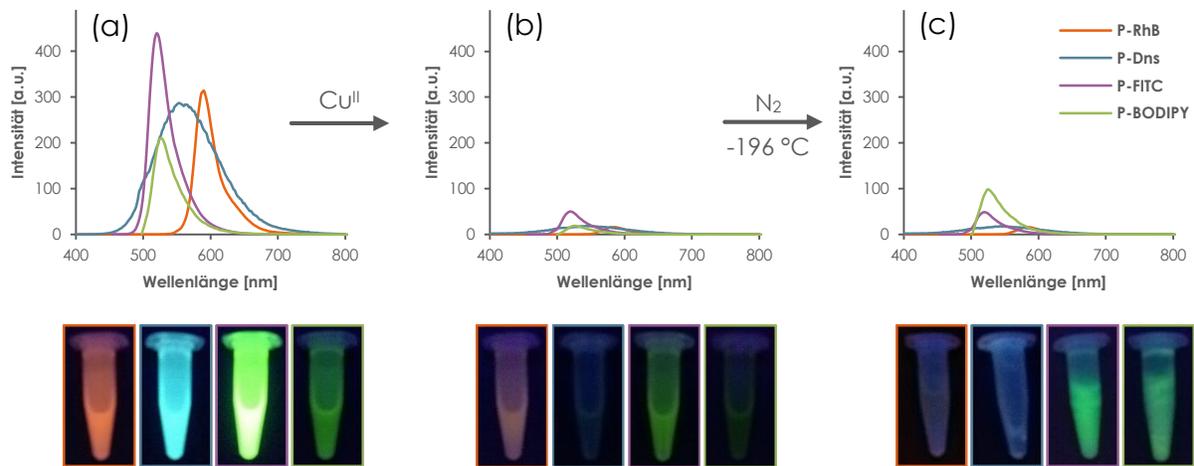


ABBILDUNG 3.41: Fluoreszenzexperiment zur Untersuchung des Quenchmechanismus⁷.

Das durchgeführte Experiment zeigt also, dass die Fluoreszenz durch Energietransfer vom angeregten Fluorophor auf das Kupfer-Zentrum gequencht wird, wobei hier nicht unterschieden werden kann, ob es sich dabei um einen Dexter- oder einen Förster-Prozess handelt. Da jedoch beide Prozesse vom Abstand des Donors zum Akzeptor abhängig sind, können die Ergebnisse aus Tabelle 3.10 mit den Überlegungen zur Sterik der Komplexe durch die unterschiedlichen Verlinkungen der Farbstoffe (vgl. Abbildung 3.29) und die Ergebnisse aus der DNA-Spaltung in Abschnitt 3.1.3.3 korreliert werden: Je länger der Linker zwischen dem Cu^{II}-ATCUN-Zentrum und dem Farbstoff ist, desto geringer ist die Effizienz des Fluoreszenzquenchings, aber desto höher ist die DNA-Spaltaktivität.

Legt man dem beschriebenen Quenchprozess die Abhängigkeit von paramagnetischen Cu^{II}-Ionen (d⁹-Ion) zugrunde, kann vermutet werden, dass ein Fluoreszenzswitching durch Reduktion und Oxidation des Kupfer-Zentrums möglich ist, da diamagnetische Cu^I-Ionen (d¹⁰-Ion) keinen Effekt auf die Fluoreszenz haben sollten.^[179,183,184] Zur Überprüfung der Schaltbarkeit der Fluoreszenz wurden die Komplexe **Cu(P-RhB)** und **Cu(P-Dns)** alternierend mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel und Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel titriert (Abbildung 3.42).^{7,[102]}

⁷ Das Peptid **P-FITC** konnte hierbei aufgrund der Instabilität der Thioharnstoffbindung gegenüber H₂O₂ nicht untersucht werden.

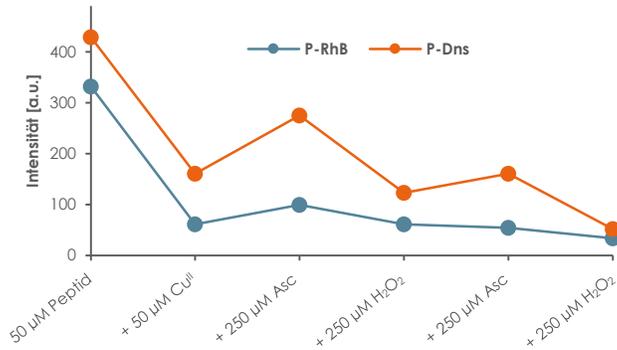


ABBILDUNG 3.42: Fluoreszenzswitching der Komplexe **Cu(P-RhB)** und **Cu(P-Dns)** durch alternierende Titration mit Ascorbinsäure (Asc) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂).^[102]
 (50 µM Peptid in 10 mM Britton-Robinson- (pH 5.0, für **P-RhB**) oder 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4, für **P-Dns**), jeweils 1 h Inkubation bei 37 °C)

Für beide Komplexe konnte eine gewisse Schaltbarkeit der Fluoreszenz durch die Redoxreaktion des Kupfer-Zentrums gefunden werden. Während jedoch das Switching für **Cu(P-Dns)** sehr ausgeprägt ist und nur einen kleinen Intensitätsverlust im zweiten Reaktionszyklus aufweist, wird die Fluoreszenz des Rhodamin-Komplexes **Cu(P-RhB)** nur sehr gering wiederhergestellt und die Intensität nimmt im Verlauf der Reaktionen stark ab.^[102] Überträgt man diesen Versuch auf die Bedingungen, bei denen die Spaltung der Plasmid-DNA abläuft, zeichnet sich ein ähnliches Bild ab (Abbildung 3.43).^[102,107]

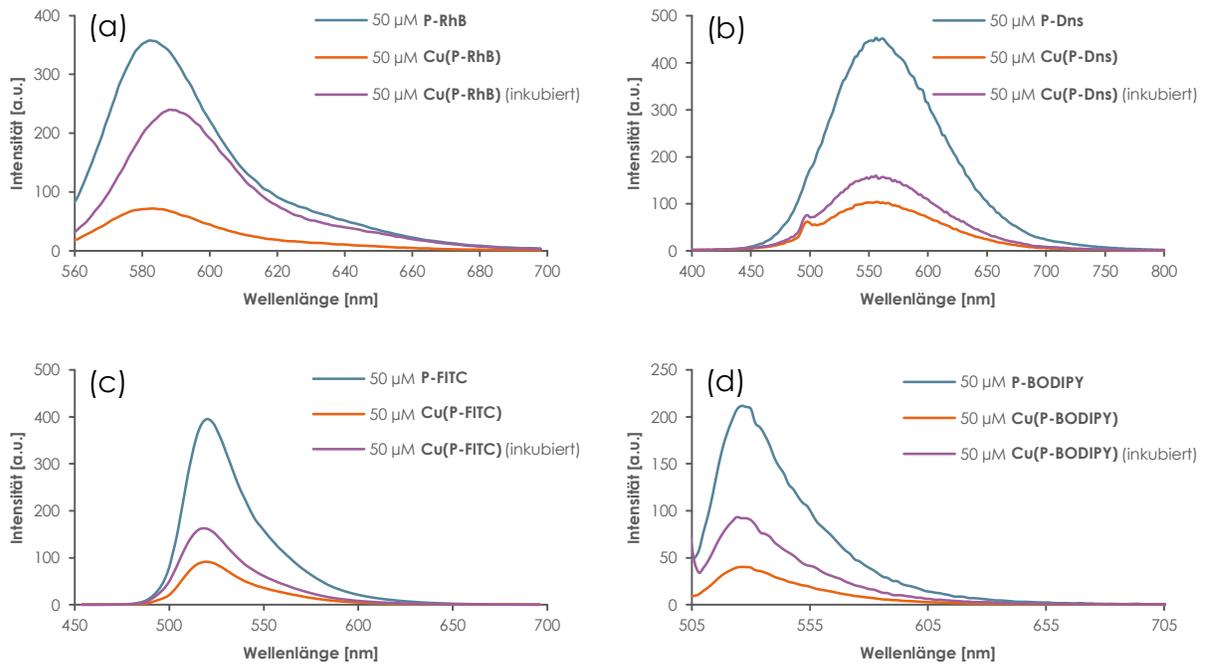
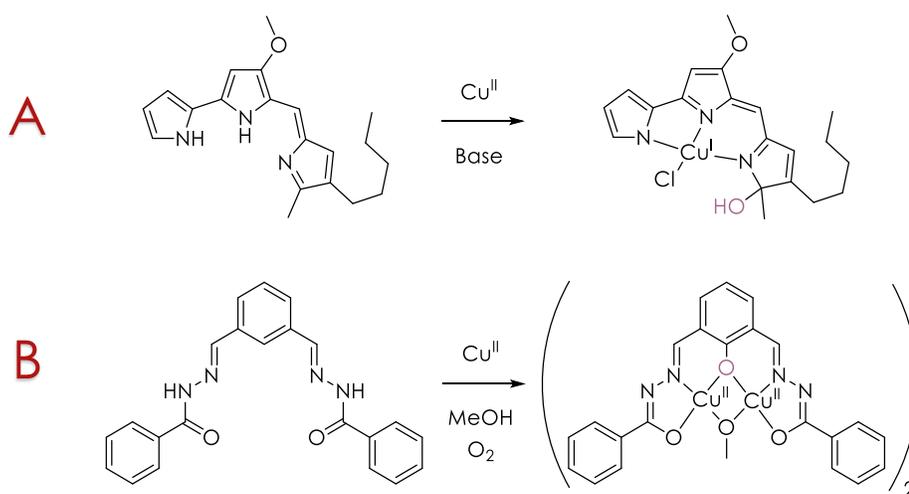


ABBILDUNG 3.43: Fluoreszenzspektren der Peptide **P-RhB** (a), **P-Dns** (b), **P-FITC** (c) und **P-BODIPY** (d) sowie der entsprechenden Cu^{II}-Komplexe vor und nach der Inkubation.^[102,107]
 (50 µM Peptid bzw. Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4, inkubiert bei 37 °C, 1 h mit 0.025 µg µL⁻¹ Plasmid-DNA)

Werden die Cu^{II}-Peptid-Komplexe unter Gelelektrophoresebedingungen inkubiert (10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.4, 0.2 µg Plasmid pBR322, 1 h, 37 °C), wird die Fluoreszenz der Farbstoffe zu einem gewissen Grad wiederhergestellt, da im Laufe der DNA-Spaltung mehr und mehr Cu^I-Ionen bzw. „Cu-oxo“-Spezies wie Cu-OOH oder Cu-OH gebildet werden, die die Fluoreszenz nicht quenchen. Die unvollständige Wiederherstellung der Fluoreszenz kann mehrere Ursachen haben. Einerseits ist es möglich, dass die Farbstoffe durch die gebildeten ROS angegriffen werden. Aus der Literatur ist dies zum Beispiel für Rhodamin B bekannt, das häufig zur quantitativen Bestimmung von Hydroxylradikalen eingesetzt wird, da das Reaktionsprodukt nicht-fluoreszierend ist.^[156,189] Zum anderen kommt es zu einer Reaktion zwischen den Farbstoffen und der Ascorbinsäure.^[190] Die Inkubation der Komplexe **Cu(P-RhB)**, **Cu(P-Dns)** und **Cu(P-FITC)** zeigte bereits in früheren Ergebnissen, dass ein Überschuss an Ascorbinsäure, wie er bei der Gelelektrophorese verwendet wird, besonders bei Inkubationszeiten von über 1 h einen Intensitätsverlust der Fluoreszenz nach sich zieht.^[102,107] Trotz der Abschwächung der Fluoreszenz kann anhand des Anteils der wiederhergestellten Fluoreszenz festgehalten werden, dass der Quenchprozess durch Cu^{II}-Ionen im Vergleich zur Schädigung der Farbstoffe für die Fluoreszenzintensität von größerer Bedeutung ist. Damit stellen die hier synthetisierten Fluorophor-ATCUN-Peptide nicht nur effiziente DNA-Spalter dar, sondern können auch als redoxsensitive Sonde für Kupfer(II)-Ionen dienen.

3.1.4. Ferrocen-ATCUN-Peptide

Die freie Aminogruppe der 2,3-Diaminopropionsäure in der verwendeten ATCUN-Peptidsequenz ermöglicht nicht nur die Kopplung von Fluorophoren, sondern auch die Verknüpfung mit Metallkomplexen während der Festphasen-Peptidsynthese. Die Kopplung redoxaktiver Komplexe sollte dabei einen Ansatz zur Synthese von Nucleasen darstellen, die in der Lage sind, DNA ohne Zusatz eines externen Stimulus wie Oxidations- oder Reduktionsmittel zu spalten, da der Zusatz von Aktivierungsreagenzien bzw. die photoinduzierte Aktivierung die *in vivo*-Anwendung limitieren können. Das Interesse an der Entwicklung „selbstaktivierender Nucleasen“ wuchs daher in den letzten Jahren stark an. In der Literatur sind mittlerweile verschiedene Ansätze zur Synthese derartiger Komplexe bekannt: So kann die Selbstaktivierung beispielsweise durch die Verknüpfung von DNA-Interkalatoren mit Metallzentren^[191–193], der Ausnutzung synergistischer Effekte mehrerer Metallzentren^[194–196] oder durch die Oxidation des Liganden bei der Komplexbildung erzeugt werden.^[70,71,197–199] Die Oxidation des Liganden ist ein bisher selten beschriebener Reaktionsweg, wobei die bekanntesten Beispiele die auf Pyrrol basierenden Systeme der Tambjamine^[198] und Prodigiosine^[70,71,197] sind (Schema 3.21A). Die Kombination von Ligandoxidation und Synergismus wurde zudem in einer Kooperation der Arbeitsgruppen um NORA KULAK und EZEQUIEL M. VÁZQUEZ-LÓPEZ an Bis(benzoylhydrazon) untersucht (Schema 3.21B).^[199]



SCHEMA 3.21: Ligandoxidation durch Komplexbildung von Cu^{II}-Ionen.

A: Prodigiosin^[70,71,197]

B: Bis(benzoylhydrazon)^[199]
(oxidierte Stelle)

Für die ATCUN-Peptide sollte der Ansatz der synergetischen Effekte genutzt werden, da die Einführung eines redoxaktiven Metallkomplexes wie Ferrocen durch Kopplung von Ferrocencarbonsäure einfach durchführbar ist und die Arbeitsgruppe um XIAO-QI YU bereits effiziente Nucleasen durch die Kombination von Cyclen mit Ferrocen darstellen konnte (Abbildung 3.44).^[196]

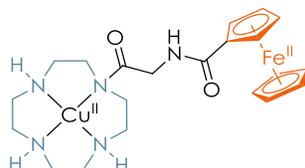
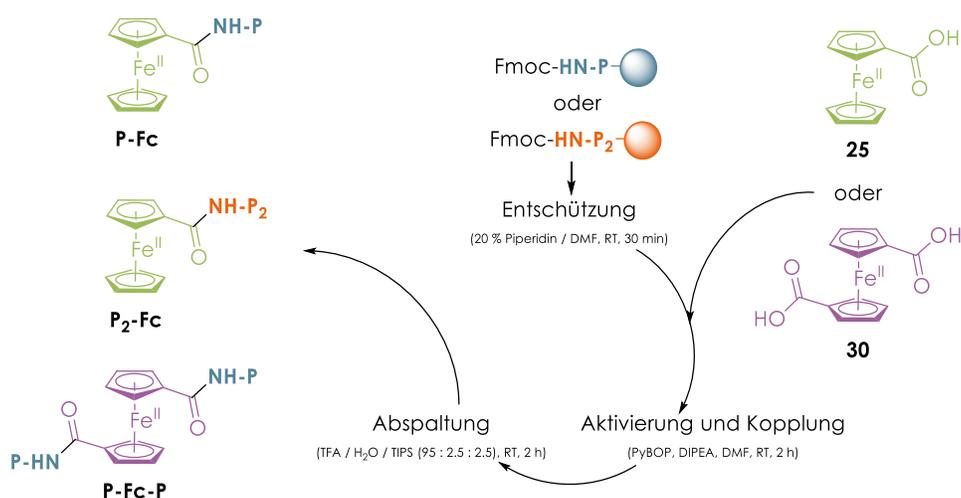


ABBILDUNG 3.44: Struktur des heteronuklearen Cyclen-Ferrocen-Komplexes.^[196]

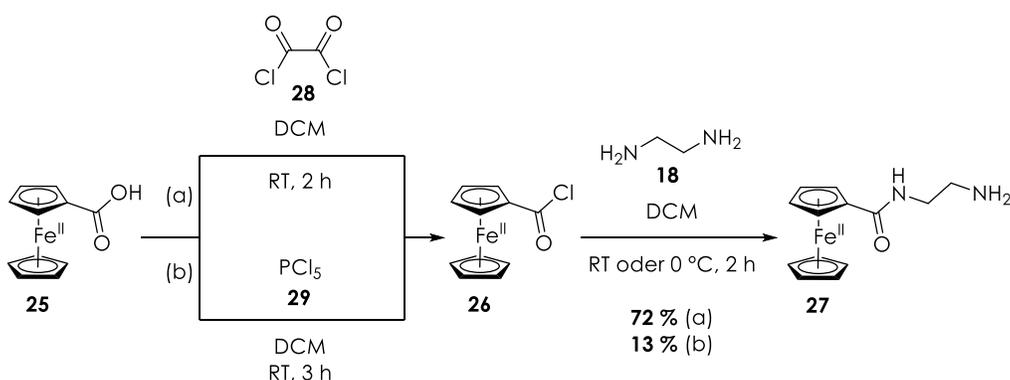
3.1.4.1. Synthese und Ausbeutebestimmung der Peptide

Für die Untersuchung des Einflusses redoxaktiver Metallzentren auf die DNA-Spaltung der Cu^{II}-ATCUN-Komplexe wurden verschiedene Ferrocen-Peptide nach der Standard-Fmoc-Strategie an der Festphase synthetisiert (Schema 3.22).^[105] Dabei sollte nicht nur der generelle Einfluss von Ferrocen auf den einfachsten ATCUN-Komplex **Cu(P-NH₂)** untersucht werden, sondern vielmehr inwiefern die Position des Ferrocens sowie die Anzahl der Metallzentren Veränderungen in der Spaltaktivität hervorrufen.



SCHEMA 3.22: Festphasen-Peptidsynthese der Ferrocen-Peptide **P-Fc**, **P₂-Fc** und **P-Fc-P**.^[105]
(Peptid **P-NH₂**, Peptid **P₂-NH₂**, Ferrocencarbonsäure **25**, Ferrocencarbonsäure **30**)

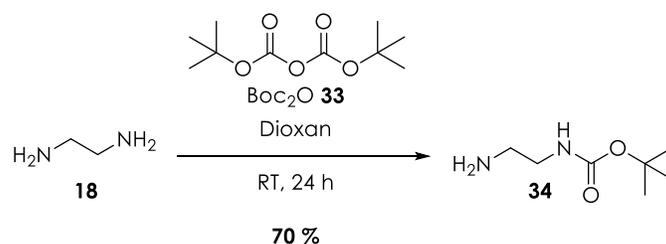
Die Ausbeutebestimmung der drei Peptide **P-Fc**, **P₂-Fc** und **P-Fc-P** nach Charakterisierung über ESI-Massenspektrometrie erfolgte analog zur Bestimmung für die Fluorophor-ATCUN-Peptide, indem Vergleichsverbindungen mit Ethylendiamin (**18**) synthetisiert wurden (vgl. Abschnitt 3.1.3.2). Die Vergleichsverbindung für die Peptide mit dem N-terminalen Ferrocen (**P-Fc** und **P₂-Fc**) kann über das Säurechlorid **26** der Carbonsäure **25** erhalten werden, wobei die Erzeugung des Säurechlorids durch Oxalylchlorid (**28**) nach Vorschriften der Arbeitsgruppen um *BERND SPEISER*^[200] und *FENG YAN*^[201] (a) mit deutlich besseren Ausbeuten für das Endprodukt **27** verbunden ist als bei der Verwendung von Phosphorpentachlorid (**29**) nach *YU FANG et al.*^[202,203] (b) (Schema 3.23).



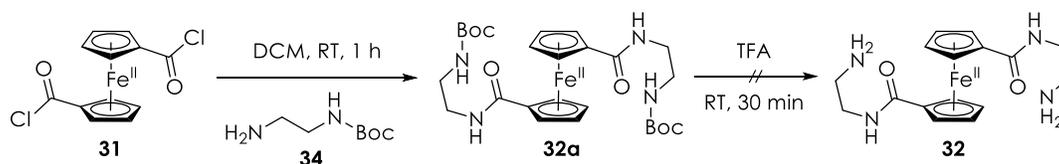
SCHEMA 3.23: Synthese von Ferrocenylethylenediamin **27**.^[200–203]

Durch langsames Hinzutropfen des Säurechlorids **26** zu einer Lösung aus Ethylendiamin (**18**) in DCM konnte die Mehrfachfunktionalisierung vermindert werden, sodass zuvor keine Schutzgruppe eingeführt werden musste.

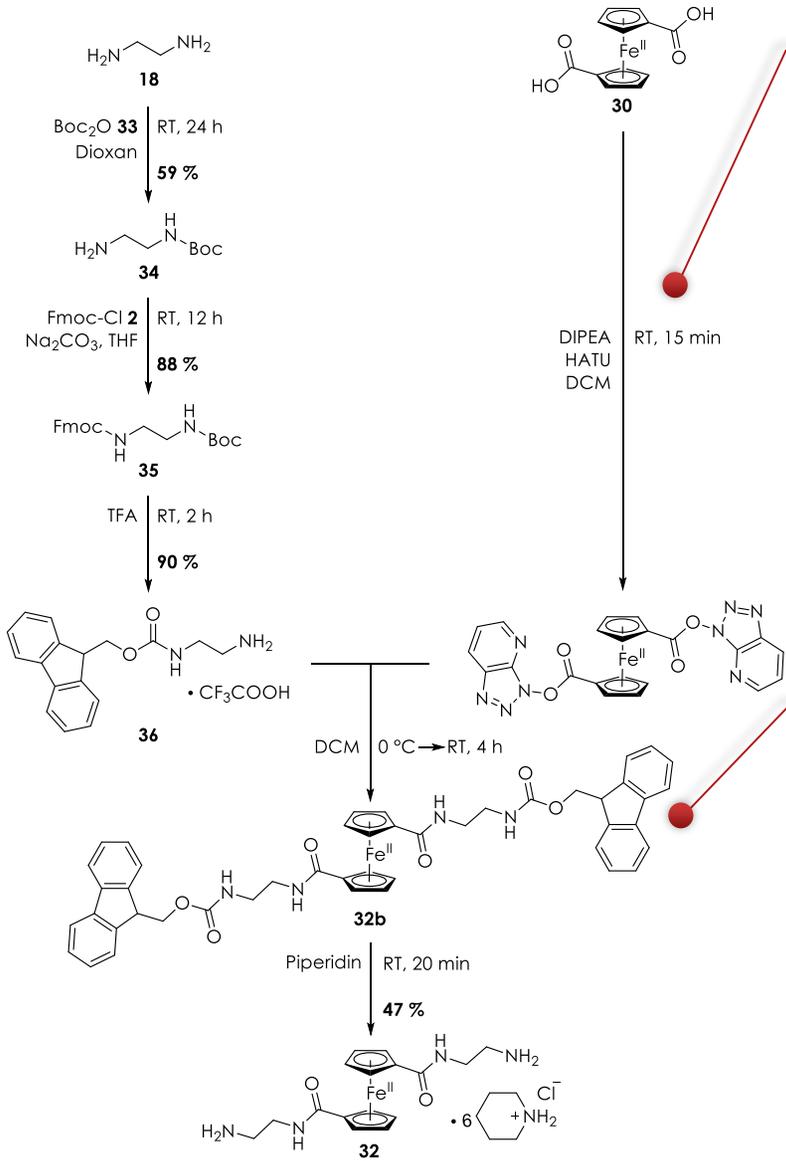
Bei der analogen Synthese für die Umsetzung der Ferrocendicarbonsäure **30** zum Bis(ferrocenoylchlorid) **31** bzw. zum Bis(ethylendiamin)ferrocen **32** konnte das Produkt NMR-spektroskopisch und ESI-massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. In diesem Falle sollten durch die Einführung einer Boc-Schutzgruppe an einer der Aminogruppen des Ethylendiamins (**18**) mögliche Mehrfachfunktionalisierungen als Nebenreaktion ausgeschlossen werden. Die Boc-Schützung erfolgte dabei nach einer Synthese von *A. PAUL KRAPCHO* und *CHRISTOPHER S. KUELL* mit Boc-Anhydrid (Boc_2O) **33** (Schema 3.24).^[204]

SCHEMA 3.24: Boc-Schützung von Ethylendiamin.^[204]

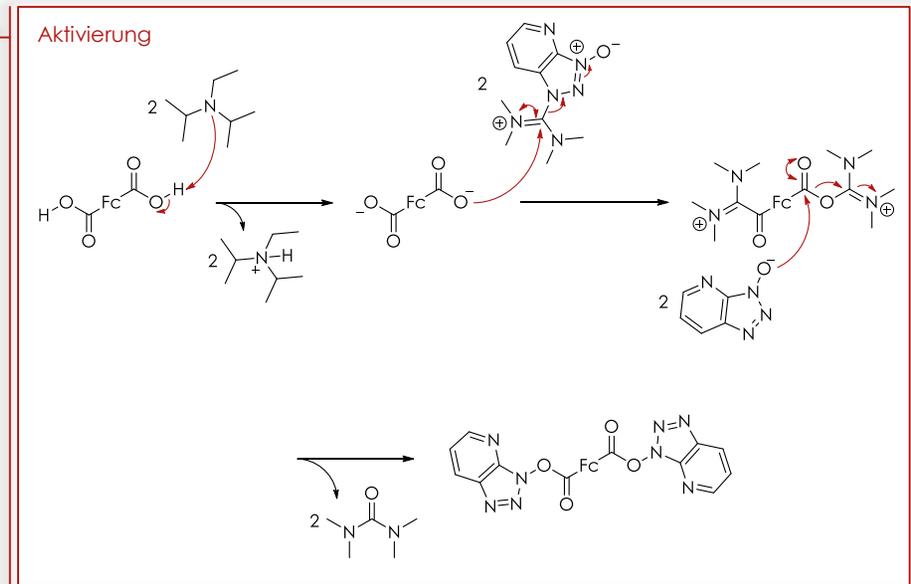
Die Analyse des Reaktionsgemisches nach der Umsetzung des Säurechlorids **31** mit Boc-Ethylendiamin **34** und der Entschützung mit TFA, wodurch die freien Aminogruppen an den Ethylendiamin-Resten erhalten werden sollten, zeigte keinen Hinweis auf die Bildung des Produkts **32** (Schema 3.25).^[201]

SCHEMA 3.25: Synthese von Ferrocen **32** mit Boc-Ethylendiamin **34**.^[201]

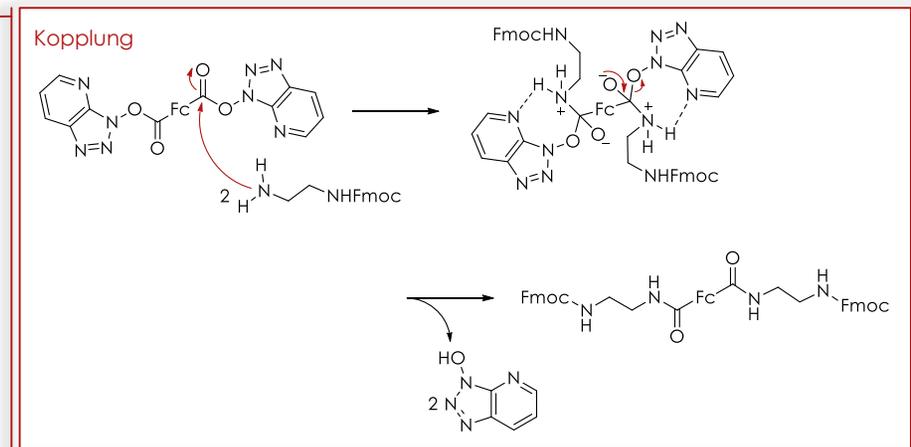
Da die zwei beschriebenen Synthesewege für die Vergleichsverbindung **32** nicht erfolgreich waren, wurde in einem weiteren Ansatz nach der einzigen literaturbekannten Syntheseroute von Nils Metzler-Nolte *et al.* verfahren, die synthetisch wesentlich aufwendiger ist als die bisher gezeigten vereinfachten Reaktionen.^[205] Hierbei wurde ausgehend von Ethylendiamin (**18**) dieses zunächst Boc-geschützt^[204], um in einem weiteren Schritt die zweite Aminogruppe mit Fmoc-Cl (**2**) zu schützen.^[206] Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mit TFA konnte das Fmoc-Ethylendiamin **36** unter Schutzgas mit dem Aktivierungsreagenz HATU (**37**) an die Ferrocendicarbonsäure **30** gekoppelt werden.^[205,207] Nach anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin und Aufreinigung mittels RP-HPLC konnte das Produkt **32** als Piperidiniumchloridsalz erhalten werden (Schema 3.26 – Schema 3.28).



SCHEMA 3.27: Synthese von Ferrocen **32** mit Fmoc-Ethylen-diamin **36**.^[205,207]



SCHEMA 3.26: Aktivierung der Ferrocendicarbonsäure **30** mit HATU.



SCHEMA 3.28: Kopplung von Fmoc-Ethylen-diamin **36**.

Mithilfe der Extinktionskoeffizienten der Ferrocene **27** und **32** konnten schließlich die Ausbeuten der Peptide bestimmt werden (Tabelle 3.11).

TABELLE 3.11: Extinktionskoeffizienten von **27** und **32** in H₂O und Ausbeuten der zugehörigen Peptide.

Verbindung	λ_{max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Peptid	Ausbeute	
				%	mg
Ferrocen 27	445	156	P-Fc	51	41.83
			P₂-Fc	15	16.95
Ferrocen 32	437	101	P-Fc-P	6	8.99

Die geringe Ausbeute des Peptids **P₂-Fc** lässt sich wie auch im Falle des Peptids **P₂-NH₂** auf die im Vergleich zum Peptid **P-Fc** lange Aminosäuresequenz zurückführen. Bei der Festphasen-Peptidsynthese sind die Ausbeuten eines einzelnen Kopplungsschrittes im Regelfall zwar recht hoch, jedoch verringert sich die Gesamtausbeute durch die nicht 100 %ige Umsetzung in jedem einzelnen Schritt. Die Ausbeute des Peptids **P-Fc-P** erscheint zwar ebenso gering, betrachtet man aber, dass bei der Verknüpfung von zwei Peptidfragmenten an der Festphase durch die Carbonsäure **30** eine Dreiteilchenreaktion abläuft, bei der nicht - wie üblich während der Peptidsynthese - mit hohen Überschüssen gearbeitet werden kann, sondern lediglich in einem Peptid : Carbonsäure-Verhältnis von 2 : 1, ist eine Ausbeute von 6 % durchaus als gut zu bewerten.

3.1.4.2. Spaltung von Plasmid-DNA

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden die Peptide mit CuCl₂-Lösung *in situ* zu den entsprechenden Kupfer(II)-Komplexen umgesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexbildung wurde mittels ESI-Massenspektrometrie verifiziert. Damit in den Inkubationslösungen zur DNA-Spaltung keine freien Cu^{II}-Ionen vorhanden sind, wurden die Komplexe in einem Peptid : Kupfer(II)-Verhältnis von 1 : 0.8 (für **P-Fc**) bzw. 1 : 1.6 (für **P₂-Fc** und **P-Fc-P**) erzeugt. Um die Spalteffizienz der Ferrocen-Komplexe grundlegend mit der der Fluorophor-Peptide vergleichen zu können, wurden die DNA-Spaltung zuerst in der Anwesenheit von Ascorbinsäure untersucht (Abbildung 3.45).

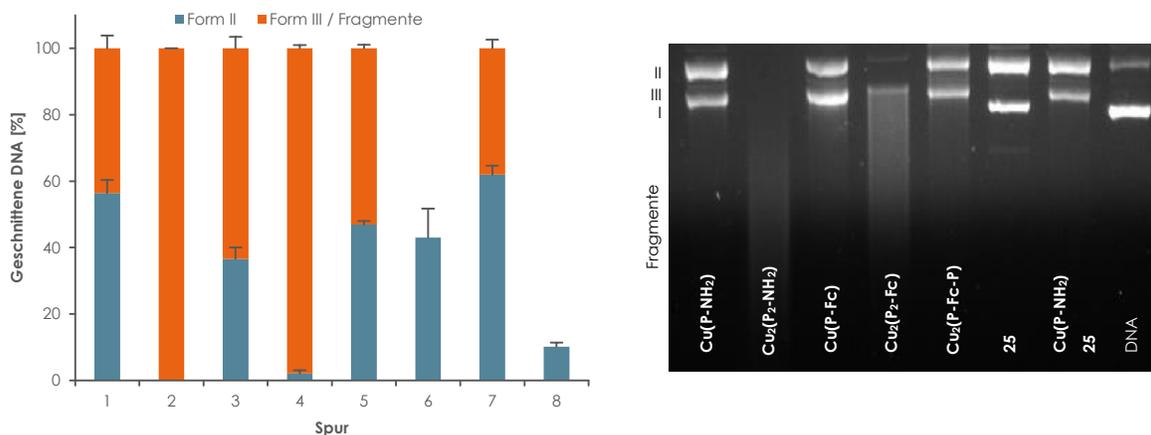


ABBILDUNG 3.45: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II} -Komplexe von **P-NH₂**, **P₂-NH₂**, **P-Fc**, **P₂-Fc** und **P-Fc-P** im Vergleich mit der Carbonsäure **25** bzw. **Cu(P-NH₂) + 25** mit Ascorbinsäure. (50 μM Komplex und 0.025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

Der Vergleich des ATCUN-Komplexes **Cu(P-NH₂)** und des Di(ATCUN)-Komplexes **Cu₂(P₂-NH₂)** zeigt, dass die DNA-Spaltung durch die Einführung eines zweiten Kupfer(II)-Zentrums deutlich gesteigert werden kann (Spuren 1 und 2). Verbleiben beim **Cu(P-NH₂)**-Komplex noch etwa 56 % der DNA in Form II, so spaltet der Di(ATCUN)-Komplex die DNA bei gleicher Konzentration vollständig in Fragmente. Vergleicht man jedoch beide Komplexe mit den entsprechenden Ferrocen-Komplexen **Cu(P-Fc)** und **Cu₂(P₂-Fc)** in den Spuren 3 und 4 können kaum Änderungen in der DNA-Spaltung verzeichnet werden. Auch eine übereinstimmende Tendenz kann nicht aus den Ergebnissen abgeleitet werden, da der Kupfer-Komplex des Peptids **P-Fc** etwas besser spaltet als der des Peptids **P-NH₂**, der Komplex **Cu₂(P₂-Fc)** spaltet die DNA allerdings etwas schlechter als der Komplex ohne Ferrocen (**Cu₂(P₂-NH₂)**). Auffällig ist jedoch, dass der **Cu₂(P-Fc-P)**-Komplex, bei dem das Ferrocen als Linker zwischen den ATCUN-Einheiten dient, nicht die Effizienz der anderen Komplexe mit drei Metallzentren aufweist, sondern ebenso spaltet wie der Komplex **Cu(P-Fc)** mit zwei Zentren (Spuren 3 und 5). Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den Spuren 6 (Carbonsäure **25**) und 7 (**Cu(P-NH₂)** in Anwesenheit von **25**), die zeigen, dass die geringe Spaltaktivität des Ferrocens selbst keine Auswirkung auf die Spaltaktivität der Peptide hat (vgl. Spuren 1 und 7), kann man schließen, dass die Ferrocen-Einheit bei der oxidativen Spaltung von Plasmid-DNA in der Anwesenheit von Ascorbinsäure als Aktivierungsreagenz keinen Einfluss auf die Spalteffizienz hat. Vielmehr erhöht sich die Spaltaktivität der ATCUN-Komplexe nur dann, wenn zwei Cu^{II} -Zentren direkt miteinander verknüpft werden. Da jedoch ein positiver Einfluss des Ferrocens

denkbar wäre, wenn anstatt des Reduktionsmittels Wasserstoffperoxid benutzt werden würde, da dieses eventuell in der Lage ist, das Eisen(II)-Zentrum durch Oxidation zu Eisen(III) zu aktivieren, wodurch ein Elektron zur Reduktion der Kupfer(II)-Ionen übertragen werden könnte, wurde dies in einem weiteren Experiment untersucht (Abbildung 3.46).

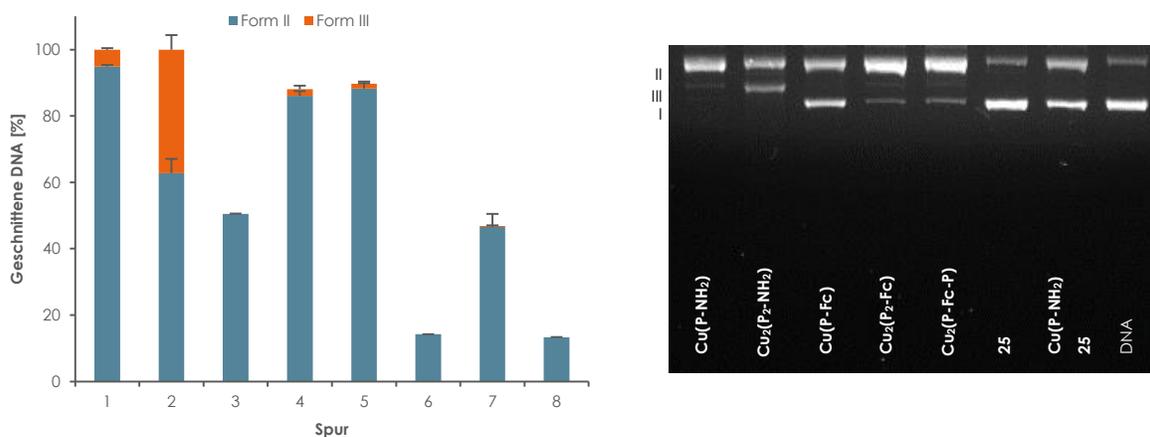
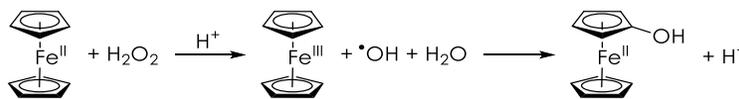


ABBILDUNG 3.46: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **P-NH₂**, **P₂-NH₂**, **P-Fc**, **P₂-Fc** und **P-Fc-P** im Vergleich mit der Carbonsäure **25** bzw. **Cu(P-NH₂) + 25** in der Anwesenheit von H₂O₂. (50 μM Komplex und 0.025 μg μL⁻¹ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.5 mM Wasserstoffperoxid bei 37 °C für 1 h)

Der Vergleich der DNA-Spaltung in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Abbildung 3.46) mit der Spaltung in Anwesenheit von Ascorbinsäure (Abbildung 3.45) zeigt grundlegend, dass die Spaltung wesentlich ineffizienter ist, wenn die Komplexe durch ein Oxidationsmittel aktiviert werden. Darüber hinaus fällt auf, dass der Grad der Spaltung durch die Kupfer(II)-Komplexe der Ferrocen-Peptide **P-Fc** (Spur 3) bzw. **P₂-Fc** (Spur 4) deutlich geringer ist und nicht mehr mit den ATCUN-Komplexen **Cu(P-NH₂)** (Spur 1) bzw. **Cu₂(P₂-NH₂)** (Spur 2) vergleichbar ist. Eine Erklärung hierfür kann aus den Spuren 6 und 7 entnommen werden. Einerseits wird die Spaltung des **Cu(P-NH₂)**-Komplexes durch die Anwesenheit der Carbonsäure **25** gequencht (Spur 7) und andererseits zeigt die Carbonsäure **25** selbst keine DNA-Spaltung (Spur 6). Daraus wird ersichtlich, dass das Wasserstoffperoxid zwar mit der Ferrocen-Einheit reagieren kann, diese jedoch nicht in der Lage ist, durch Elektronenübertragung die Cu^{II}-Zentren zu aktivieren bzw. selbst reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, die eine Spaltung der DNA hervorrufen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Oxidation von Ferrocen mit H₂O₂ zum Ferrocenium-Kation zur Bildung von Hydroxylradikalen führen kann, diese jedoch mit dem Ferrocen unter Hydroxylierung der Cyclopentadienylringe (Cp-Ringe) abreagieren (Schema 3.29).^[208]

Das peptidgekoppelte Ferrocen könnte demnach unter den hier gewählten Bedingungen als Quencher für die durch die ATCUN-Komplexe gebildeten OH-Radikale fungieren. Einzige Ausnahme hiervon könnte der Komplex **Cu₂(P-Fc-P)** (Spur 5) sein, der eine identische Spalteffizienz wie der Komplex **Cu₂(P₂-Fc)** (Spur 4) aufweist, während er bei der Aktivierung durch Ascorbinsäure eine schlechtere Spaltung zeigt, die eher mit den Komplexen **Cu(P-NH₂)** und **Cu(P-Fc)** vergleichbar ist. Die zweifache Substituierung des Ferrocens mit den sterisch anspruchsvollen Peptid-Komplexen könnte eine Reaktion von Hydroxylradikalen an den Cp-Ringen verhindern.



SCHEMA 3.29: Generierung und Reaktion von Hydroxylradikalen bei der Oxidation von Ferrocen im sauren Milieu.^[208]

Obwohl in den bisherigen Experimenten kein positiver Einfluss des Ferrocens gefunden werden konnte, wurde die DNA-Spaltung auch in Abwesenheit eines Oxidations- bzw. Reduktionsmittels untersucht, um die Möglichkeit einer selbstaktivierenden Nuclease zu untersuchen. Hierzu wurden die Komplexe in unterschiedlichen Konzentrationen eine Stunde mit dem Plasmid pBR322 bei 37 °C inkubiert (Abbildung 3.47).

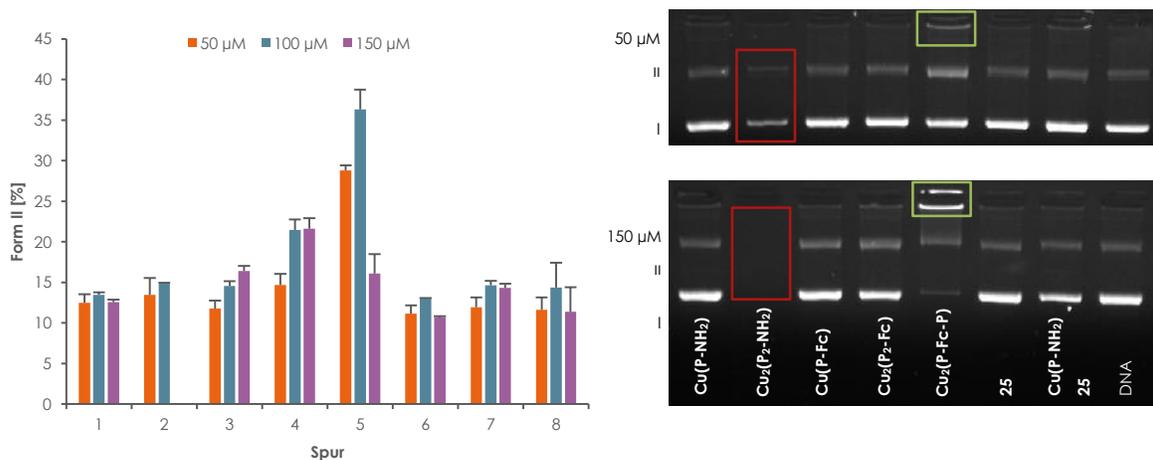


ABBILDUNG 3.47: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **P-NH₂**, **P₂-NH₂**, **P-Fc**, **P₂-Fc** und **P-Fc-P** im Vergleich mit der Carbonsäure **25** bzw. **Cu(P-NH₂) + 25** ohne Aktivierungsreagenz. (50, 100, 150 µM Komplex und 0,025 µg µL⁻¹ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h) (DNA-Komplex-Addukt, reduzierte DNA-Menge)

Ohne Aktivierung der Komplexe mittels eines äußeren Stimulus zeigen bei einer Inkubationszeit von einer Stunde nur die Komplexe **Cu₂(P₂-Fc)** und **Cu₂(P-Fc-P)** eine gewisse Spaltaktivität, wobei für den **Cu₂(P₂-Fc)**-Komplex für eine Spaltung von lediglich 7 % in die Form II bereits eine Konzentration von 100 µM benötigt wird, die durch eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 150 µM nicht gesteigert werden kann (Spur 4). Der **Cu₂(P-Fc-P)**-Komplex spaltet die DNA zwar zu einem etwas höheren Grad in die Form II (17 % bei 50 µM bzw. 22 % bei 100 µM, Spur 5), jedoch bildet sich bei zunehmender Konzentration vermehrt ein DNA-Komplex-Addukt, das aufgrund seiner Größe nur minimal innerhalb des Gels wandert (Abbildung 3.47, grünes Feld). Dadurch kann keine genaue Auswertung der DNA-Spaltung durchgeführt werden. Ein ähnliches Problem der Auswertung ergibt sich für die Spaltung durch den Komplex **Cu₂(P₂-NH₂)**. Bei steigender Komplexkonzentration nimmt die Menge an DNA im Gel ab (Abbildung 3.47, rotes Feld). Aufgrund der Art der Berechnung der quantitativen Auswertung der DNA-Spaltung kann dies zwar im Diagramm nicht erkannt werden, dafür jedoch eindeutig in den Bildern der Gele. Hierbei findet sich auch kein Addukt in der Nähe der Geltaschen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass dieses bereits während der Inkubation der Proben oder der Durchführung des Experiments ausfällt und nicht mit auf das Gel aufgetragen wird.

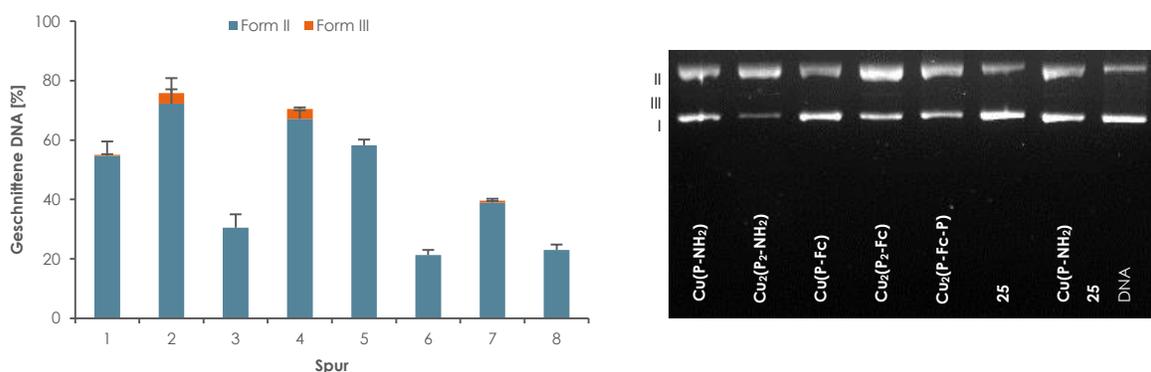


ABBILDUNG 3.48: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von P-NH₂, P₂-NH₂, P-Fc, P₂-Fc und P-Fc-P im Vergleich mit der Carbonsäure **25** bzw. **Cu(P-NH₂) + 25** mit Ascorbinsäure nach 12 h. (50 µM Komplex und 0.025 µg µL⁻¹ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 12 h)

Verlängert man jedoch die Inkubationszeit von einer Stunde auf 12 Stunden, sind nicht nur alle Komplexe in der Lage mehr oder weniger effektiv die DNA zu spalten, sondern es werden durch die Spaltung auch die DNA-Komplex-Addukte aufgelöst (Abbildung 3.48). Die effektivsten Spalter sind die Komplexe **Cu₂(P₂-NH₂)** und **Cu₂(P₂-Fc)**, also diejenigen,

bei denen zwei Kupfer(II)-Zentren direkt miteinander verknüpft sind (Spuren 2 und 4). Wie bereits bei der Spaltung in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zeigt sich allerdings unter Einbeziehung der Spuren 6 und 7 auch hier der Trend, dass das Vorhandensein eines Ferrocens die DNA-Spaltung quencht (vgl. Spuren 1 und 3 bzw. 2 und 4). Überraschend dabei ist, dass sogar der Komplex des Peptids **P-NH₂**, der lediglich über ein Metallzentrum verfügt, ohne Reduktionsmittel die DNA bis zu 30 % in die Form II überführen kann, wodurch vermutet werden kann, dass das Cu^{II}-Ion im Peptid bei langen Reaktionszeiten auch anderweitig aktiviert werden kann.

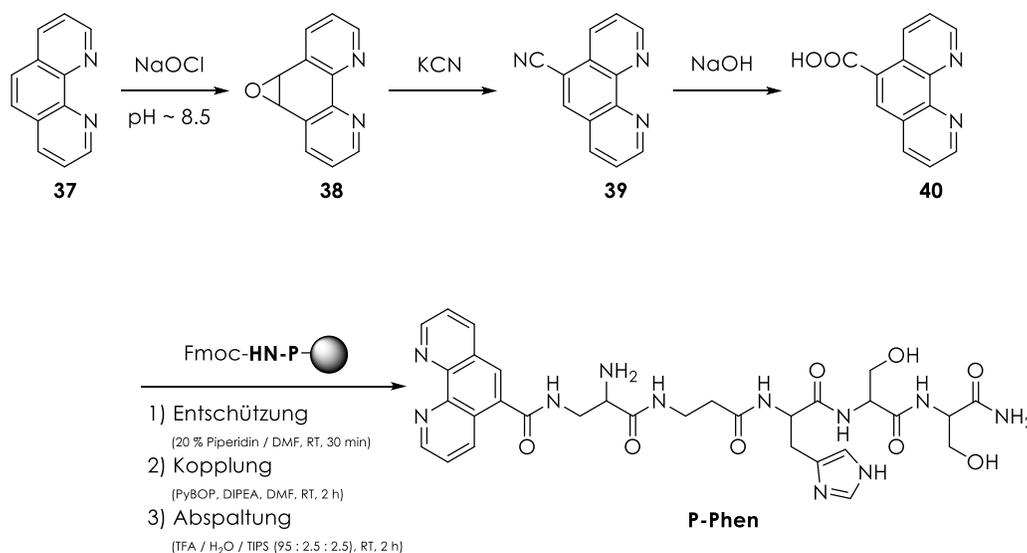
Zusammengefasst ist es möglich, die DNA-Spaltung durch Cu^{II}-ATCUN-Komplexe durch das Zusammenspiel mehrerer benachbarter Kupfer(II)-Zentren erheblich zu steigern. Auf diese Weise ist auch die Synthese einer selbstaktivierenden Nuclease möglich. Die Einführung eines Ferrocens zur Aktivierung des Komplexes zeigte hingegen keinen positiven Einfluss auf die DNA-Spaltung. Vielmehr führt die Bildung von Hydroxylferrocenen als Konkurrenzreaktion zur DNA-Schädigung durch die Hydroxylradikale zu einer teilweisen Inhibierung des Spaltprozesses (vgl. Abschnitt 3.1.3.4).

3.1.5. Phenanthrolin-ATCUN-Peptide

Die Ergebnisse der Ferrocen-Peptide aus Abschnitt 3.1.4 zeigten, dass durch die Kombination zweier Cu^{II} -Zentren innerhalb eines Peptids die DNA-Spaltaktivität stark gesteigert werden kann. Durch die Einführung des Kupfer(II)-bindenden Liganden Phenanthrolin am N-Terminus des Peptids **P-NH₂** sollte daher nicht nur die Anwesenheit eines zusätzlichen Metallzentrums ausgenutzt werden, sondern auch die Eigenschaften des Kupfer(II)-Komplexes des Phenanthrolins selbst, dessen DNA-Spaltaktivität von *DAVID S. SIGMAN et al.* in den 1970er Jahren entdeckt wurde und der noch heute einer der effektivsten bekannten Spalter ist.^[37,38,40]

3.1.5.1. Synthese und Ausbeutebestimmung des Peptids

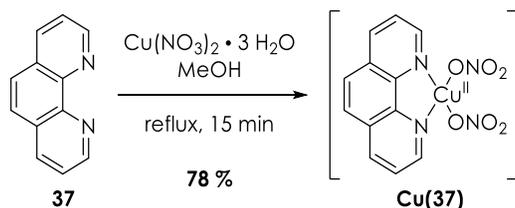
Zur Kopplung eines Phenanthrolins an das Peptid **P-NH₂** an der Festphase wurde die Phenanthrolincarbonsäure **40** verwendet, die nach Epoxidierung von Phenanthrolin (**37**) mit Natriumhypochlorit und Umsetzung zum Cyanid **39** mit KCN durch Hydrolyse in Natriumhydroxid zugänglich ist (Schema 3.30).^[209] Die Darstellung der Verbindung **40** wurde an dieser Stelle nicht selbst durchgeführt, da sie im Rahmen der Doktorarbeit von *CARSTEN LÜDTKE* bereits synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt wurde.^[210]



SCHEMA 3.30: Syntheseroute für die Phenanthrolincarbonsäure **40** und das Peptid **P-NH₂**.^[209,210]

Die Ausbeute des Peptids **P-Phen** wurde über mehrere Titrations bestimmt, um deren Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Dazu wurde die Ausbeute über die Titrationsabsorptionsspektren des Cu^{II} -ATCUN- sowie des $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})(\mathbf{P}\text{-Phen})]^{2+}$ -Komplexes durch Titration des Peptids **P-Phen** mit $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})(\text{NO}_3)_2]$ (**Cu(37)**) gemessen. Die Titrationskurven sind in Abbildung 3.49 und Abbildung 3.51 dargestellt, wobei zur Auswertung die Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ (Cu^{II} -ATCUN-Komplex) bzw. $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$ ($[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})(\mathbf{P}\text{-Phen})]^{2+}$ -Komplex) genutzt wurden.

Der für die Bestimmung verwendete Komplex **Cu(37)** konnte dabei einfach durch die Umsetzung von Phenanthrolin (**37**) mit Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat in Methanol erhalten werden (Schema 3.31).^[211]



SCHEMA 3.31: Synthese des Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexes **Cu(37)**.^[211]

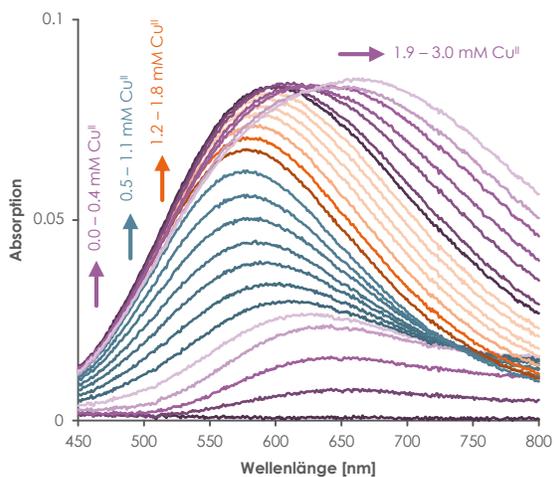


ABBILDUNG 3.49: Titrationskurven des Peptids **P-Phen** mit CuCl_2 -Lösung. (50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4, Absorption des ATCUN-Komplexes, Absorption eines Cu^{II} -Tris-Komplexes, Absorption des Phen-Komplexes)

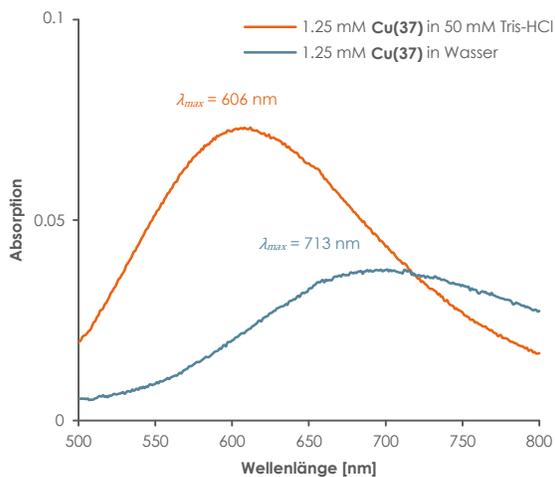


ABBILDUNG 3.50: Absorptionsspektren des Komplexes **Cu(37)** in 50 mM Tris-HCl-Puffer und in Wasser. (1.25 mM Komplex, 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bzw. H_2O)

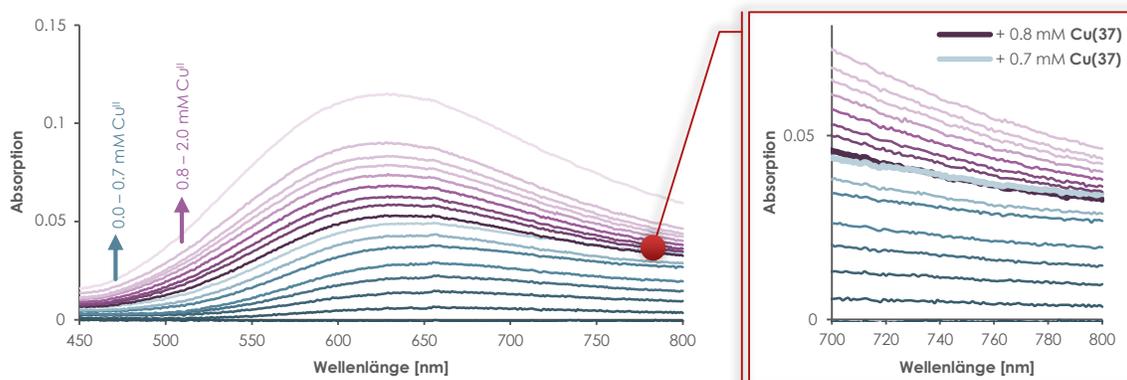


ABBILDUNG 3.51: Titrationskurven des Peptids **P-Phen** mit Komplex **Cu(37)**.
 (50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4, Absorption des Cu^{II} -Phen₂-Komplexes, Absorption des Cu^{II} -Phen-Tris-Komplexes)

Obwohl neben der Bildung des Cu^{II} -ATCUN-Komplexes auch die Bildung entsprechender Tris- und Phenanthrolinkomplexe bei der Titration ablaufen könnten, deren Absorptionsmaxima alle im Bereich von 500 – 750 nm liegen, kann eine Konkurrenzreaktion im Bereich eines 1 : 1-Verhältnisses von Metall zu Peptid ausgeschlossen werden. Die Assoziationskonstanten für die Komplexe in Tabelle 3.12 zeigen, dass das ATCUN-Motiv die bei weitem höchste Affinität zu Kupfer(II)-Ionen hat.

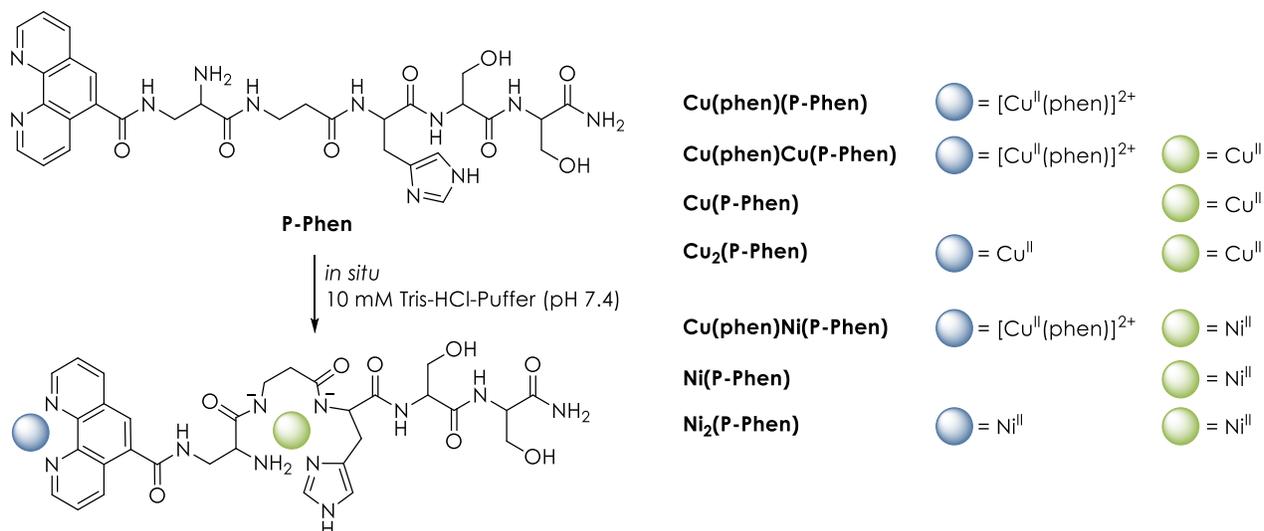
TABELLE 3.12: Assoziationskonstanten K_A (bzw. $\log K_A$) für einige Cu^{II} - und Ni^{II} -Komplexe bei 25 °C. (Die Werte der Ni^{II} -Komplexe sind für die Synthese der entsprechenden **P-Phen**-Komplexe in Schema 3.32 von Bedeutung.)

Komplex	Assoziationskonstante K_A [M^{-1}]	$\log K_A$
Cu^{II} -ATCUN ^[86]	8.45×10^{15}	15.9
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})]^{2+}$ ^[212]	1.26×10^9	9.1
Cu^{II} -Tris ^[147]	$1.95 \times 10^5 - 1.95 \times 10^6$	5.29 – 6.29
Ni^{II} -ATCUN ^[213]	$\sim 10^{16}$	~ 16
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{phen})]^{2+}$ ^[214]	3.98×10^8	8.6

Die Bande bei 620 - 650 nm bei Kupfer(II)-Konzentrationen von 0.1 – 0.4 mM spricht prinzipiell für die Bildung eines Cu^{II} -Tris-Komplexes, ist jedoch auf den großen Überschuss an Tris in Bezug auf das Peptid (50 mM zu ~ 1 mM) zurückzuführen und in diesem Falle nicht auf eine größere Affinität. Ab einer Kupfer(II)-Konzentration von 1.2 mM verschiebt sich das Absorptionsmaximum allmählich zu 610 nm. Im Vergleich mit Abbildung 3.50 zeigt dies die Bildung eines Kupfer(II)-Komplexes des Phenanthrolins mit Tris als zweiten

Liganden. Erhöht man die Metallkonzentration weiter, bildet sich erneut der Cu^{II}-Tris-Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 650 nm (1.9 – 3.0 mM Cu^{II}). Zusammen mit dem Ergebnis der Titration des Peptids mit dem Komplex **Cu(37)** (Abbildung 3.51), bei der man besonders im Bereich von 750 – 800 nm durch die Überlagerung der Kurven von 0.7 mM und 0.8 mM Komplex **Cu(37)** die Bildung des [Cu^{II}(phen)(**P-Phen**)]²⁺- und des Cu^{II}-Tris-Komplexes unterscheiden kann, ergibt sich für das Peptid **P-Phen** eine Ausbeute von 59 % (48.4 mg).

Mit der bekannten Ausbeute des Peptids wurden anschließend die in Schema 3.32 gezeigten Komplexe synthetisiert. Da sowohl ATCUN-Peptide als auch Phenanthroline in der Lage sind mit hohen bis sehr hohen Bildungskonstanten (vgl. Tabelle 3.12) Ni^{II}-Ionen zu binden, wurden zusätzlich zu den Kupfer(II)-Komplexen auch entsprechende Nickel(II)-Komplexe für weitere Untersuchungen dargestellt. Aufgrund der deutlich höheren Assoziationskonstanten des ATCUN-Motivs zu den Metallionen wurde für die Komplexe **Cu(phen)Cu(P-Phen)** und **Cu(phen)Ni(P-Phen)** zunächst in 10 mM Tris-HCl-Puffer eine 1 mM Lösung des Peptids **P-Phen** mit einer Cu^{II}- bzw. Ni^{II}-chlorid-Lösung (0.8 mM) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erst anschließend wurde eine 0.8 mM Lösung des Komplexes **Cu(37)** hinzugegeben. Die anderen Komplexe wurden jeweils durch Zugabe einer 0.8 mM (**Cu/Ni(P-Phen)**) bzw. 1.6 mM (**Cu₂/Ni₂(P-Phen)**) Metallsalz-Lösung zu einer 1 mM Peptidlösung erzeugt. Die Charakterisierung der Komplexe erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie, wobei die Metallbindungstelle aufgrund der Deprotonierung des ATCUN-Motivs unterschieden werden kann.



SCHEMA 3.32: Übersicht der synthetisierten Komplexe des Peptids **P-Phen**.

3.1.5.2. Spaltung von Plasmid-DNA

Die Spaltaktivität der Cu^{II} - und Ni^{II} -ATCUN-Komplexe gegenüber der Plasmid-DNA pBR322 wurde in ersten Experimenten wieder in der Anwesenheit von Aktivierungsreagenzien untersucht. Für die Cu^{II} -Komplexe wurde wie zuvor das Reduktionsmittel Ascorbinsäure verwendet. Die Komplexe, die Nickel(II)-Ionen enthalten, wurden hingegen mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel aktiviert, da aus der Literatur bekannt ist, dass Ni^{II} -ATCUN-Komplexe über das Redoxpaar $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ DNA spalten.^[90-93,215,216] Die Spaltung verläuft dabei vorwiegend durch metallgebundene Hydroxylradikale aus der Nickel-induzierten heterolytischen Spaltung des Peroxids, wobei es zur Abstraktion des C4'-Wasserstoffatoms der Desoxyribose begünstigt durch die Bindung des Komplexes in der kleinen Furche der DNA kommt.^[216,217] Die Reaktionsbedingungen haben jedoch einen großen Einfluss auf die DNA-Spaltung. Die Verwendung eines Überschusses des Oxidationsmittels Kaliumperoxomonosulfat (KHSO_5) bei gleichzeitig hoher Ionenstärke der Inkubationslösung (z.B. Zugabe von 100 mM NaCl) verhindert z.B. das Binden des Komplexes in der kleinen Furche und führt so zur fast selektiven Oxidation von Guanin durch nickelgebundene Sulfatradikale ($\text{Ni}^{\text{III}}\text{-SO}_4\bullet$).^[216,218] Die Wahl der Bedingungen ermöglicht es im Fall von Ni^{II} -ATCUN-Komplexen demnach die Art der Spaltung selektiv zu wählen.

Für die Agarose-Gelelektrophoresen der DNA-Spaltung der **P-Phen**-Komplexe mussten unterschiedliche Konzentrationen verwendet werden (5 μM für Cu^{II} / 50 μM für Ni^{II}). Während die Spaltaktivität der Cu^{II} -Komplexe bei 50 μM für eine quantitative Auswertung deutlich zu hoch ist (a), weisen die Ni^{II} -Komplexe bei 5 μM nur eine sehr geringe Aktivität auf (b) (Abbildung 3.52).

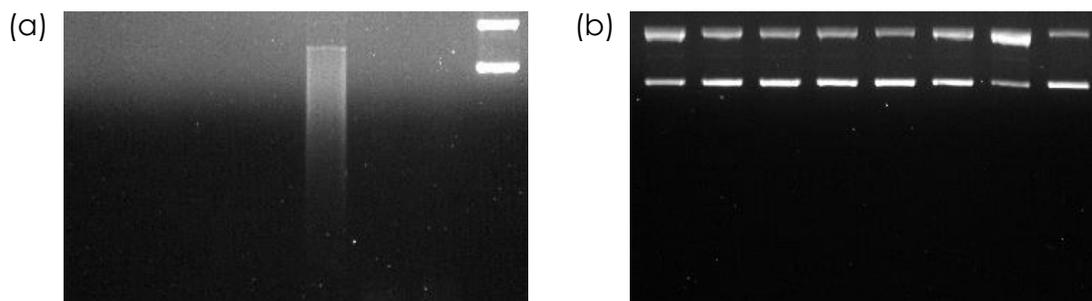


ABBILDUNG 3.52: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II} - und Ni^{II} -Komplexe von **P-Phen**.

((a) 50 μM Cu^{II} -Komplexe mit 0.25 mM Ascorbinsäure und (b) 5 μM Ni^{II} -Komplexe mit 0.5 mM Wasserstoffperoxid bezüglich 0.025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h)

Abbildung 3.53 zeigt entsprechend die Ergebnisse der DNA-Spaltung für die Komplexe **Cu(phen)(P-Phen)**, **Cu(phen)Cu(P-Phen)**, **Cu(P-Phen)**, **Cu₂(P-Phen)** bei einer Konzentration von 5 μM ((a), blaue Säulen) bzw. **Ni(phen)(P-Phen)**, **Ni(P-Phen)** und **Ni₂(P-Phen)** bei 50 μM ((b), orange Säulen). Als Vergleich wurden jeweils auch Kupfer(II)- und Nickel(II)-chlorid sowie die Komplexe $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{NO}_3)_2]$ (**Cu(37)**) (vgl. Schema 3.31) und $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$ (**Cu(37)₂**) (Schema 3.33) unter identischen Bedingungen inkubiert.

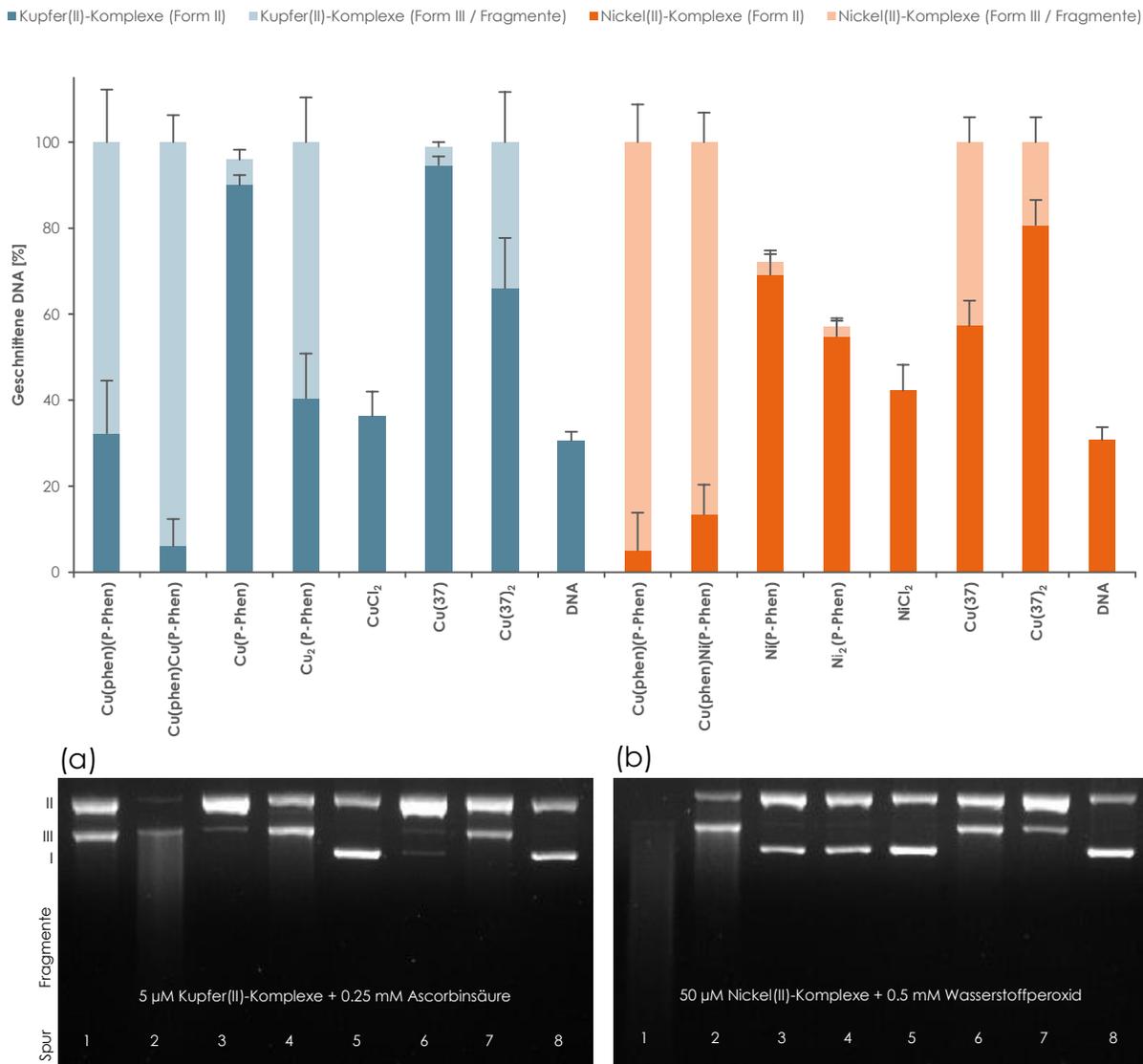
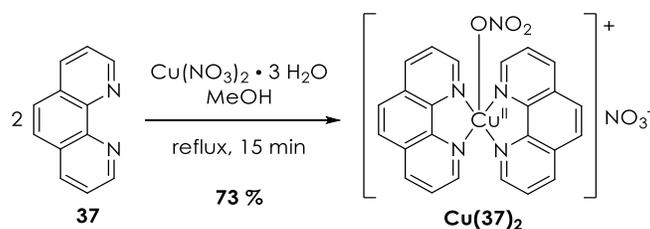


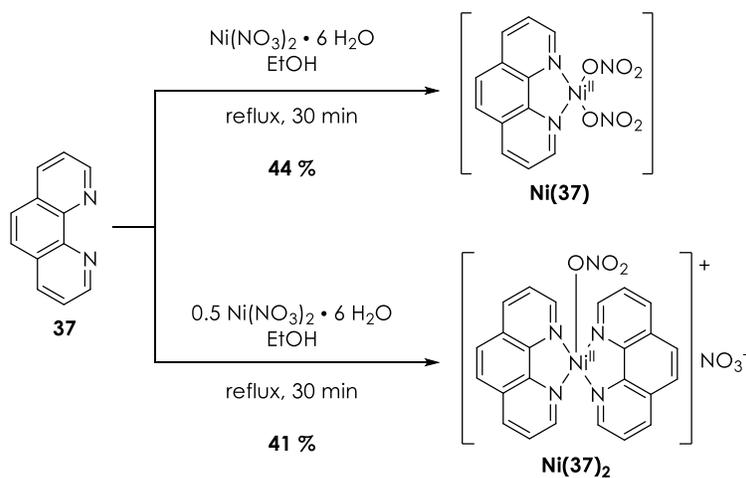
ABBILDUNG 3.53: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}- und Ni^{II}-Komplexe von **P-Phen** im Vergleich mit CuCl₂ bzw. NiCl₂ sowie **Cu(37)** und **Cu(37)₂** in der Anwesenheit von Aktivierungsreagenzien. ((a) 5 μM Cu^{II}-Komplexe mit 0,25 mM Ascorbinsäure und (b) 50 μM Ni^{II}-Komplexe mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid bezüglich 0,025 μg μL^{-1} pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bei 37 °C für 1 h)



SCHEMA 3.33: Synthese des Kupfer(II)-Bis(phenanthrolin)komplexes **Cu(37)₂**.^[211]

Im Allgemeinen weisen die **P-Phen**-Komplexe, die eine $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ -Einheit wie im Komplex **Cu(37)₂** (vgl. Schema 3.33) enthalten, die höchste Spaltaktivität auf (jeweils Spuren 1 und 2). Der Vergleich des **Cu(phen)(P-Phen)**-Komplexes mit **Cu(37)₂** zeigt jedoch sowohl bei Aktivierung mittels eines Reduktions- als auch eines Oxidationsmittels eine deutliche Steigerung der Aktivität (jeweils Spuren 1 und 7). Es kann vermutet werden, dass das gekoppelte Peptid zu einer stärkeren Annäherung und damit zu einer verstärkten Wechselwirkung der Komplexe mit der DNA führt. Des Weiteren kann angenommen werden, dass neben dem Einfluss mehrerer Metallzentren auch eine Kombination aus DNA-Interkalation (durch $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$)^[42,219] und Furchenbindung (durch Cu^{II} -ATCUN)^[75] zu einer Erhöhung der Spalteffizienz führt, da das Binden eines weiteren Cu^{II} -Ions durch das ATCUN-Motiv im Komplex **Cu(phen)Cu(P-Phen)** die Spalteffizienz sogar um weitere 26 Prozentpunkte bezüglich der Form III und den DNA-Fragmenten steigert (Spur 1 und 2 in (a)). Dass äquivalente Beobachtungen im Fall der entsprechenden Ni^{II} -Komplexe nicht gemacht werden können, hat seine Ursache möglicherweise in der unterschiedlichen Interaktion der Metallzentren mit den verschiedenen Aktivierungsreagenzien zur Generierung der ROS. So führt die Komplexierung der Kupfer(II)-Ionen durch zwei Phenanthroline in **Cu(37)₂** beispielsweise bei Verwendung von H_2O_2 zu einer schlechteren DNA-Spaltung im Vergleich zum **Cu(37)**-Komplex (Spuren 6 und 7 in (b)) und nicht, wie aufgrund einer erhöhten DNA-Wechselwirkung durch zwei Liganden erwartet und bei der Aktivierung durch Ascorbinsäure zu sehen (Spuren 6 und 7 in (a)), zu einer Verstärkung der Spaltaktivität.^[42] Auch zeigt nicht nur der Vergleich der Ni^{II} -ATCUN-Komplexe **Ni(P-Phen)** und **Ni₂(P-Phen)** mit den übrigen Komplexen eine schlechtere DNA-Spalt-effizienz (b) im **VERHÄLTNIS (UNTERSCHIEDLICHE KONZENTRATIONEN)** zu den Cu^{II} -Komplexen (a), sondern die grundsätzliche Anwesenheit sowie die Anzahl von Nickel(II)-Zentren führt zu einer Verschlechterung der Spaltung (Spuren 1 und 2 bzw. 3 und 4 in (b)).

Die generell schlechtere Spaltaktivität kann hier jedoch nicht von Peptid-Komplexen abhängig gemacht werden, sondern tritt allgemein bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid auf, wie der Vergleich der Nickel(II)- und Kupfer(II)-Komplexe in Abbildung 3.54 zeigt (vgl. Schema 3.31, Schema 3.33 und Schema 3.34). Darüber hinaus ist auch aus der Literatur bekannt, dass bei Aktivierung durch KHSO_5 oder Magensiummonoperoxophthalat (MMPP) Ni^{II} -Komplexe eine gesteigerte Spaltaktivität aufweisen. Dabei steigt die Spalteffizienz mit zunehmender Acidität der Produkte der Peroxidspaltung (H_2SO_4 aus $\text{KHSO}_5 > \text{C}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{H})_2$ aus MMPP $\gg \text{H}_2\text{O}$ aus H_2O_2).^[216]



SCHEMA 3.34: Synthese der Nickel(II)-Phenanthrolinkomplexe **Ni(37)** und **Ni(37)₂**.

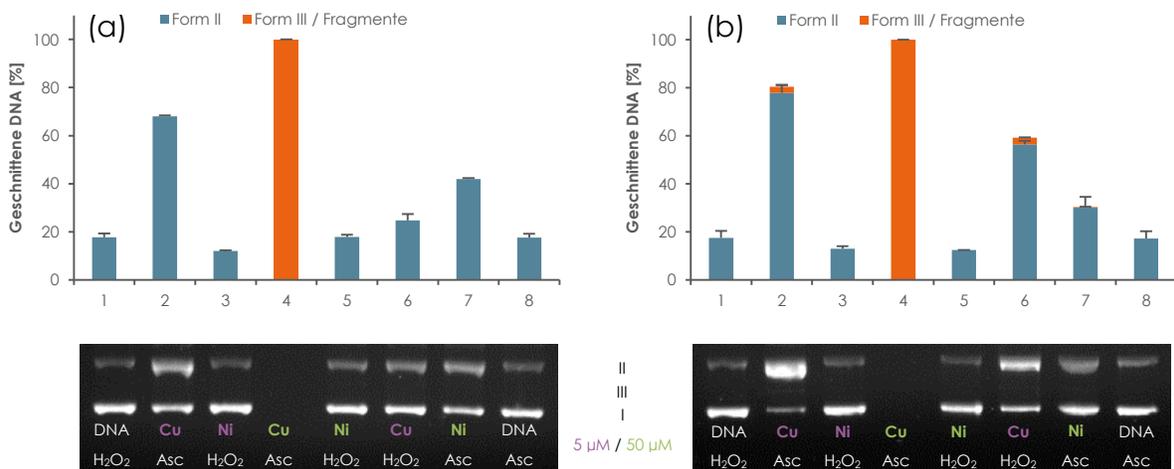


ABBILDUNG 3.54: DNA-Spaltaktivität der Mono- (a) bzw. Bis(phenanthroline)komplexe (b) von Kupfer(II) und Nickel(II) in der Anwesenheit von Ascorbinsäure oder Wasserstoffperoxid. (5 μM oder 50 μM Komplex und 0.025 $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der Anwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure oder 0.5 mM Wasserstoffperoxid bei 37 °C für 1 h)

Neben der bereits beschriebenen schlechteren Spaltaktivität der Komplexe **Cu(37)** und **Cu(37)₂** bei Aktivierung durch Wasserstoffperoxid (jeweils Spuren 2 und 6) zeigt die Abbildung 3.54 auch, dass die entsprechenden Nickel(II)-Komplexe selbst bei einer Konzentration von 50 μM keine bzw. nur eine minimale Spaltung der DNA zeigen (jeweils Spuren 5 und 7). Auffällig ist dagegen, dass sowohl der **Ni(37)**- als auch der **Ni(37)₂**-Komplex durch Ascorbinsäure aktiviert werden kann und die DNA zu 24 % bzw. 13 % in die Form II überführt. Inwiefern dies unter reduzierenden Bedingungen möglich sein kann, ist nicht klar, legt aber die Vermutung nahe, dass auch ein $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{I}}$ -Redoxpaar existieren könnte. Im Vergleich mit der Abbildung 3.53 muss beachtet werden, dass die Spaltaktivität der Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexe deutlich geringer ausfällt, was auf eine Instabilität der Komplexe in Lösung hinweist, sodass regelmäßig neue Lösungen angesetzt wurden. Da die Komplexe **Ni(37)** und **Ni(37)₂** zusammengefasst in biologischer Hinsicht wesentlich inaktiver sind, wurden als Vergleich zu den **P-Phen**-Komplexen in allen nachfolgenden Versuchen nur die Cu^{II} -Komplexe des Phenanthrolins herangezogen.

Um ein besseres Verständnis der Ergebnisse aus Abbildung 3.53 (a) zu erhalten, wurde die Wechselwirkung der Komplexe mit doppelsträngiger CT-DNA durch Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur untersucht.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

DNA-Schmelzkurven^[220]

Für die Stabilität der DNA-Doppelhelix unter physiologischen Bedingungen sind sowohl die Wasserstoffbrücken als auch die Stapelwechselwirkungen zwischen den Nucleobasen von großer Bedeutung (vgl. Abschnitt 2.2.1). Diese Struktur kann jedoch unter extremen Bedingungen wie starken Temperaturerhöhungen oder stark alkalischem pH-Wert aufgebrochen werden, sodass der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge zerfällt. Die thermische Denaturierung der DNA kann dabei mithilfe der UV-Spektroskopie bei $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ untersucht werden, da aufgrund des Energiegewinns bei der Ausbildung der Stapelwechselwirkungen

der DNA-Doppelstrang zwischen 12 und 40 % weniger UV-Licht absorbiert als die Einzelstränge. Die Auftragung der Absorptionsänderung über die Temperatur wird Schmelzkurve genannt. Durch Normierung der Kurve kann bei einer Absorption von 0.5 der Schmelzpunkt T_m der DNA direkt abgelesen werden. Der Schmelzpunkt beschreibt dabei die Temperatur, bei der 50 % der Basenpaare aufgebrochen sind (Abbildung 3.55).

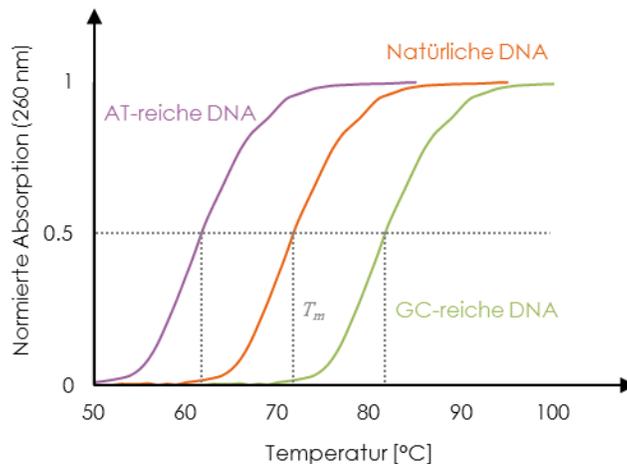


ABBILDUNG 3.55: Schematische Darstellung von DNA-Schmelzkurven.
(AT-reiche DNA, GC-reiche DNA, natürliche DNA mit statistischer Basenzusammensetzung)

Der sigmoide Kurvenverlauf zeigt, dass es sich beim Schmelzen der DNA um einen kooperativen Vorgang handelt, der durch die Basenstapelung hervorgerufen wird. Die Auftrennung des DNA-Doppelstranges beginnt an weniger stabilen Stellen der DNA, was in der Folge zur Destabilisierung der benachbarten Basenpaare führt. Beim Überschreiten der Schmelztemperatur T_m kommt es schließlich zum raschen Zusammenbruch der Struktur und zur vollständigen Trennung der DNA-Stränge. Der Schmelzpunkt ist dabei charakteristisch für bestimmte DNA-Sequenzen. Durch die unterschiedliche Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare Guanin-Cytosin (GC) und Adenin-Thymin (AT) und der unterschiedlichen Energie der Stapelwechselwirkungen (GC/CG = $-61.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ bzw. AT/TA = $-16.0 \text{ kJ mol}^{-1}$)^[221] zeigt

GC-reiche DNA einen höheren Schmelzpunkt als AT-reiche (Abbildung 3.55). Der Schmelzpunkt der DNA erhöht sich jedoch nicht nur durch einen steigenden GC-Gehalt, sondern auch durch die Wechselwirkung der Nucleobasen mit einem DNA-Interkalator. Je stärker dieser zwischen die Basen interkaliert, desto höher wird die Schmelztemperatur. Die Bindung von Molekülen in den DNA-Furchen hat hingegen keine Auswirkung auf die Schmelztemperatur.

Zur Bestimmung der Veränderung des Schmelzpunktes von CT-DNA wurde die Absorption bei 260 nm in der An- und Abwesenheit der Kupfer(II)-Peptid-Komplexe im Temperaturbereich von 50 – 95 °C gemessen (Abbildung 3.56 und Tabelle 3.13).

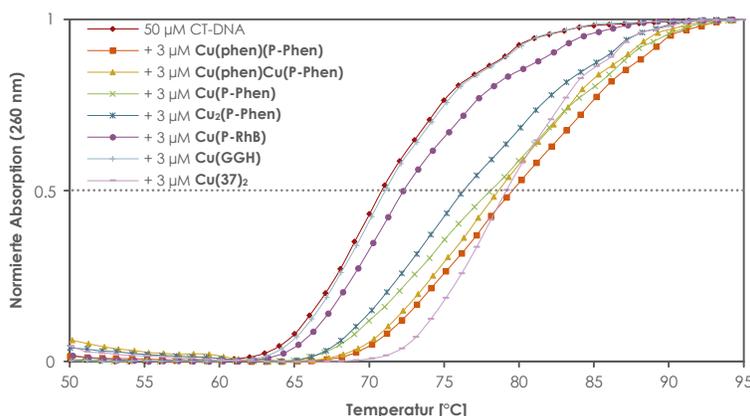


ABBILDUNG 3.56: CT-DNA-Schmelzkurven in der An- und Abwesenheit von Cu^{II}-Peptid-Komplexen. (50 µM CT-DNA, 3 µM Cu^{II}-Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 50 - 95 °C (1 °C min⁻¹))

TABELLE 3.13: CT-DNA-Schmelzpunkte in der An- und Abwesenheit von Cu^{II}-Peptid-Komplexen. (50 µM CT-DNA, 3 µM Cu^{II}-Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 50 - 95 °C (1 °C min⁻¹))

Komplex	T_m [°C]	ΔT [°C]	Komplex	T_m [°C]	ΔT [°C]
CT-DNA	71.0	-	Cu₂(P-Phen)	76.3	5.3
Cu(phen)(P-Phen)	79.6	8.6	Cu(P-RhB)	72.2	1.2
Cu(phen)Cu(P-Phen)	78.6	7.6	Cu(GGH)	71.1	0.1
Cu(P-Phen)	78.2	7.2	Cu(37)₂	79.2	8.2

Aus Tabelle 3.13 kann man allgemein entnehmen, dass die Schmelztemperatur der CT-DNA zwischen 5 und 9 °C erhöht wird, wenn der untersuchte Komplex Phenanthrolin enthält, da dieses zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert.^[42] Bindet der Komplex jedoch in den Furchen der DNA wie **Cu(GGH)** und **Cu(P-RhB)** bleibt die Temperatur unverändert bzw. erhöht sich lediglich um etwa 1 °C durch die Interkalation des Rhodamins im Peptid **P-RhB**. Die Erhöhung des Schmelzpunktes und damit die Stärke der Interkalation fällt in der Reihenfolge

- **Cu(phen)(P-Phen) > Cu(phen)Cu(P-Phen) > Cu(P-Phen) > Cu₂(P-Phen).**

Vergleichend dazu fällt die DNA-Spaltaktivität (Abbildung 3.53 (a)) in der Reihenfolge

- **Cu(phen)Cu(P-Phen) > Cu(phen)(P-Phen) > Cu₂(P-Phen) > Cu(P-Phen).**

Wie schon festgestellt wurde, führen synergistische Effekte zwischen zwei Kupfer(II)-Zentren prinzipiell zur Verbesserung der DNA-Spaltung (**Cu(phen)Cu(P-Phen)** spaltet besser als **Cu(phen)(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** besser als **Cu(P-Phen)**). Hinzu kommt jedoch auch die Steigerung der Spaltaktivität durch die Interkalation der [Cu(phen)₂]²⁺-Gruppe (**Cu(phen)Cu(P-Phen)** und **Cu(phen)(P-Phen)** spalten besser als **Cu₂(P-Phen)** und **Cu(P-Phen)**). Darüber hinaus bestätigt die unterschiedliche Reihenfolge der Spaltaktivität im Vergleich zu der der Interkalationsstärke die bereits bei den Ergebnissen der Gelelektrophorese getroffene Vermutung, dass die Koordination eines weiteren Cu^{II}-Ions durch das ATCUN-Motiv einen Anstieg der Spaltung nach sich zieht. Zugleich kommt es jedoch auch zu einer Verringerung der Interaktion des Phenanthrolins mit der DNA entweder aufgrund sterischer Ansprüche oder durch Veränderungen in der Kombination der DNA-Wechselwirkungen Interkalation und Furchenbindung. Ebenfalls findet sich beim Vergleich der Schmelztemperaturen in Anwesenheit der beiden Komplexe **Cu(37)₂** (79.2 °C) und **Cu(phen)(P-Phen)** (79.6 °C), die sich lediglich durch das zusätzliche Peptid unterscheiden, die Vermutung bestätigt, dass dieses zu einer leicht verbesserten Annäherung des Komplexes an die DNA führt und so zu einer besseren DNA-Spaltung. Des Weiteren kann anhand der Komplexe **Cu(phen)(P-Phen)** und **Cu(phen)Cu(P-Phen)** im Vergleich mit den Komplexen **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** gezeigt werden, dass eine [Cu(phen)₂]²⁺-Einheit einen deutlich stärkeren Einfluss auf die DNA-Spaltung und den DNA-Schmelzpunkt hat als der Ligand alleine (**Cu(P-Phen)**) bzw. eine [Cu(phen)]²⁺-Gruppe (**Cu₂(P-Phen)**). Da das positiv geladene Kupfer(II)-Zentrum im Phenanthrolin des **Cu₂(P-Phen)**-Komplexes keine „Abschirmung“ durch ein zweites

Phenanthrolin erfährt und somit der hydrophobe Charakter des Komplexes im Gegensatz zu **Cu(phen)Cu(P-Phen)** stark gesenkt wird, vermindert sich auch die Interkalation in die DNA deutlich. Obwohl der Komplex **Cu(P-Phen)** wesentlich stärker zwischen die DNA-Basen interkaliert als **Cu₂(P-Phen)**, da er durch den freien Liganden am N-Terminus deutlich hydrophober ist, spaltet er DNA weniger effektiv, da hier der Einfluss eines zweiten Cu^{II}-Ions überwiegt. Zudem spielt bei der oxidativen DNA-Spaltung das Redoxpotential der Komplexe, das bei der Komplexierung des Metallzentrums durch die Art und Anzahl der Liganden stark beeinflusst wird, eine essentielle Rolle. Je leichter dabei die Reduktion und Reoxidation des Metallzentrums ist, desto effektiver kann die Generierung von ROS und damit die Schädigung der DNA ablaufen.^[99,146] Zusammengefasst zeigt dies nachdrücklich, dass die bloße Verbesserung der Affinität eines Komplexes zur DNA nicht gleichbedeutend mit einer verbesserten DNA-Spaltung sein muss.

Zur Untersuchung eines möglichen Potentials der **P-Phen**-Komplexe als selbstaktivierende Nucleasen wurden die Komplexe unter den Bedingungen wie zuvor (vgl. Abbildung 3.53) inkubiert, jedoch ohne den Zusatz von Aktivierungsreagenzien (Abbildung 3.57).

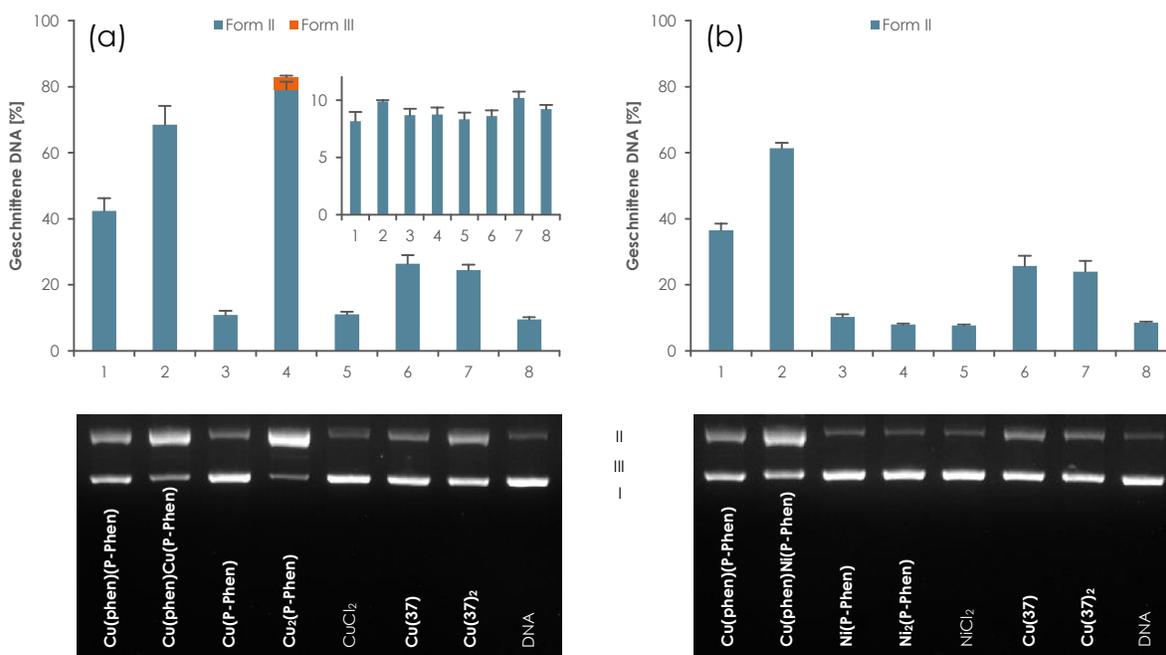


ABBILDUNG 3.57: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}- und Ni^{II}-Komplexe von **P-Phen** im Vergleich mit CuCl₂ bzw. NiCl₂ sowie **Cu(37)** und **Cu(37)₂** in der Abwesenheit von Aktivierungsreagenzien. (a) 50 μM Cu^{II}-Komplexe (Einfügung: 5 μM Cu^{II}-Komplexe) und (b) 50 μM Ni^{II}-Komplexe bezüglich 0.025 μg μL⁻¹ pBR322 in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h)

Die Inkubation von Plasmid-DNA mit den Kupfer(II)-**P-Phen**-Komplexen bei der ursprünglichen Konzentration von 5 μM zeigt keine Spaltung der DNA (Einfügung in Abbildung 3.57 (a)). Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 50 μM identisch zu den Nickel(II)-Komplexen kann jedoch eine deutliche DNA-Spaltung durch die Komplexe **Cu(phen)(P-Phen)**, **Cu(phen)Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** beobachtet werden (Spuren 1, 2 und 4 in (a)). Der Grad der Spaltung durch den Komplex **Cu₂(P-Phen)** ist dabei mit der Spaltung durch die Komplexe **Cu(P₂-NH₂)** und **Cu(P₂-Fc)** vergleichbar, jedoch wird bei diesen für ein ähnliches Ergebnis eine Inkubationszeit von 12 h benötigt (vgl. Abbildung 3.48, Spuren 2 und 4). Beim Vergleich der Ni^{II}-Komplexe untereinander bzw. mit **Cu(phen)(P-Phen)** (b) kann eine Spaltung nur bei den beiden Komplexen **Cu(phen)(P-Phen)** und **Cu(phen)Ni(P-Phen)** beobachtet werden, d.h. bei denjenigen, die eine [Cu(phen)₂]²⁺-Einheit enthalten (Spuren 1 und 2 in (b)). Auffällig ist die Spaltung von etwa 9 % durch die Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexe **Cu(37)** und **Cu(37)₂** (jeweils Spuren 6 und 7). Obwohl in der Literatur entgegen des allgemeinen Standpunktes auch vereinzelt Hinweise auf eine hydrolytische Spaltung durch Kupferkomplexe des Phenanthrolins gefunden werden können^[222,223], konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen einer [Cu(phen)]²⁺-Gruppe mit Tris Ursache der oxidativen Spaltung ohne Aktivierungsreagenz ist. Die ausführlichen Untersuchungen und Experimente hierzu sind im Abschnitt 3.2.3.1 dargestellt. Geht man nun davon aus, dass ein gewisser Grad der Spaltung auf Cu^I-Tris-Komplexe zurückzuführen ist, zeigt der Vergleich der Spuren 1 und 2 mit 7 in (a), dass auch bei Abwesenheit von Ascorbinsäure die DNA-Spaltung positiv durch das Peptid sowie durch die Anwesenheit eines zweiten Kupfer(II)-Zentrums beeinflusst wird (**Cu(phen)(P-Phen)** spaltet besser als **Cu(37)₂**, aber schlechter als **Cu(phen)Cu(P-Phen)**). Wie bereits bei den Ferrocen-Peptiden in Abschnitt 3.1.4.2 festgestellt, hat die direkte Verknüpfung von zwei Cu^I-ATCUN-Zentren dabei den größten Einfluss (Spur 4 in (a)). Wird im Gegensatz dazu jedoch ausschließlich Nickel(II) durch das ATCUN-Motiv gebunden, bleibt eine Spaltung aufgrund des unterschiedlichen Redoxverhaltens (Cu^{II}/Cu^I vs. Ni^{II}/Ni^{III}) aus (jeweils Spur 4). Die Kombination von Ni^{II}- und Cu^{II}-Ionen im Komplex **Cu(phen)Ni(P-Phen)** wirkt sich dagegen durch die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Metallionen durchaus positiv aus (Spuren 2 und 7 in (b)).

Im Ganzen kann gesagt werden, dass die Kupfer(II)-Komplexe des Peptids **P-Phen** ein großes Potential als Nuclease und selbstaktivierende Nuclease aufweisen und dabei sogar den Komplex **Cu(37)₂** an Effizienz übertreffen.

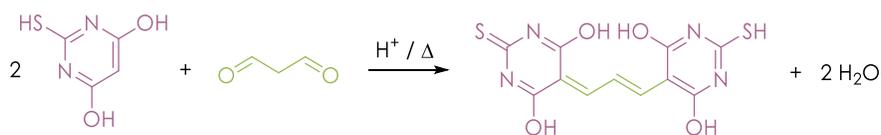
3.1.5.3. Spaltung von linearer DNA

Die Spaltung von natürlicher linearer DNA (z.B. CT-DNA oder Lachsspermien-DNA) ist im Vergleich zur Spaltung von Plasmid-DNA aufgrund der fehlenden intramolekularen Spannung, die bei bakteriellen Plasmiden durch die Superspiralisierung hervorgerufen wird, weitaus schwieriger und stellt damit einen guten Indikator für die Effektivität künstlicher Nucleasen dar. Neben der Untersuchung der Spaltprodukte linearer DNA mittels Gelelektrophorese bietet der Thiobarbitursäure-Assay (TBA-Assay) eine einfache und schnelle Methode der Analyse.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Thiobarbitursäure-Assay

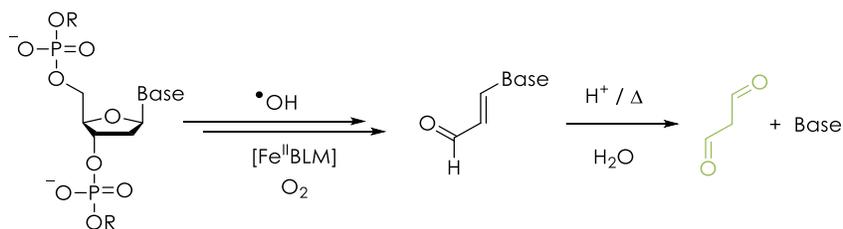
Die Anfänge des Thiobarbitursäure-Assays (TBA-Assay) liegen bereits in den späten 1940er Jahren.^[224] Ursprünglich entwickelt zur Untersuchung und Quantifizierung der Lipidperoxidation in chemischer sowie biologischer Hinsicht, entwickelte sich der Assay über die Jahre zu einem vielseitigen Standardtest zur Bestimmung oxidativen Stresses. Grundlage des Assays ist die säurekatalysierte Bildung eines roten Farbstoffes bei etwa 100 °C durch Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd (MDA), einem Endprodukt des oxidativen Abbaus von Lipiden (Schema 3.35).^[225–227]



SCHEMA 3.35: Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd.

MDA wird jedoch nicht nur bei der Peroxidation von Lipiden gebildet, sondern kann auch als sekundäres Endprodukt bei der Oxidation von Aminosäuren, Kohlenhydraten und DNA

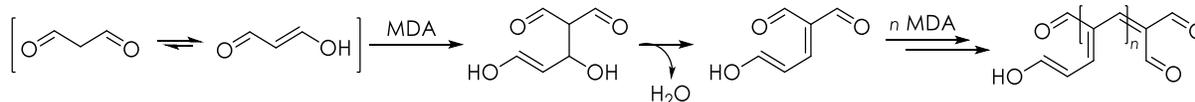
entstehen.^[228–231] Erste Ergebnisse zur Bildung von MDA aus der Oxidation von DNA stammen aus den frühen 1980er Jahren von JOHN M. C. GUTTERIDGE.^[229,231] Untersuchungen zur DNA-Spaltung durch den Eisen(II)-Komplex des Bleomycins zeigten, dass die als Endprodukt gebildete Basenaldehyd beim TBA-Assay säurekatalytisch bzw. thermisch zur freien Base und MDA hydrolysiert werden (Schema 3.36, vgl. Schema 2.6).^[232]



SCHEMA 3.36: Bildung von MDA durch Oxidation von DNA.^[226,229,231,232]

Bei der Verwendung des TBA-Assays müssen mehrere Fakten beachtet werden. Der gebildete TBA-MDA-Farbstoff kann zwar in **VERGLEICHENDER WEISE** zur quantitativen Auswertung der DNA-Spaltung genutzt werden, da seine Absorption bei $\lambda_{max} = 532$ nm proportional zur gebildeten MDA-Menge ist, jedoch ist eine absolute Aussage über die DNA-Spaltung nicht möglich.^[233] Einerseits kann nicht zwischen freiem MDA und anderweitigen Hydrolyseprodukten unterschieden werden, da TBA mit vielen Aldehyden (thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS)) rote Farbstoffe bildet, und andererseits wird beim Assay nicht der gesamte DNA-Spaltvorgang abgebildet. Vielmehr wird nur der Teil angesprochen, bei dem TBARS gebildet werden, sodass keine vollständige Aussage über die Spaltung getroffen werden kann, wenn der Spaltmechanismus beispielsweise vorwiegend über die Bildung von Furanonen oder anderen nicht-thiobarbitursäurereaktive Spezies verläuft (vgl. Schema 2.5).^[232]

Zur Untersuchung der DNA-Spaltung mittels einiger Cu^{II}-P-Phen-Peptide über die Menge an gebildetem Malondialdehyd wurde zunächst eine MDA-Standardkurve erstellt, über die der Extinktionskoeffizient des MDA-TBA-Farbstoffes bestimmt werden kann. Da reines MDA äußerst instabil ist und zur Selbstkondensation neigt (Schema 3.37), wurde für die Standardkurve Malonaldehydbis(dimethylacetal) mit verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Die Konzentration des gebildeten Malondialdehyds wurde anschließend bei 245 nm ($\epsilon = 13\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) bestimmt.^[234] Durch Umsetzung mehrerer MDA-Lösungen bekannter Konzentration (0.25 – 5.00 μM) mit TBA in 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) bei 99 °C für 30 min und anschließender Messung der Absorption bei 532 nm konnte schließlich der Extinktionskoeffizient des roten MDA-TBA-Produkts errechnet werden (Abbildung 3.58).^[226,227,235]



SCHEMA 3.37: Selbstkondensation von Malondialdehyd.^[226,227,235]

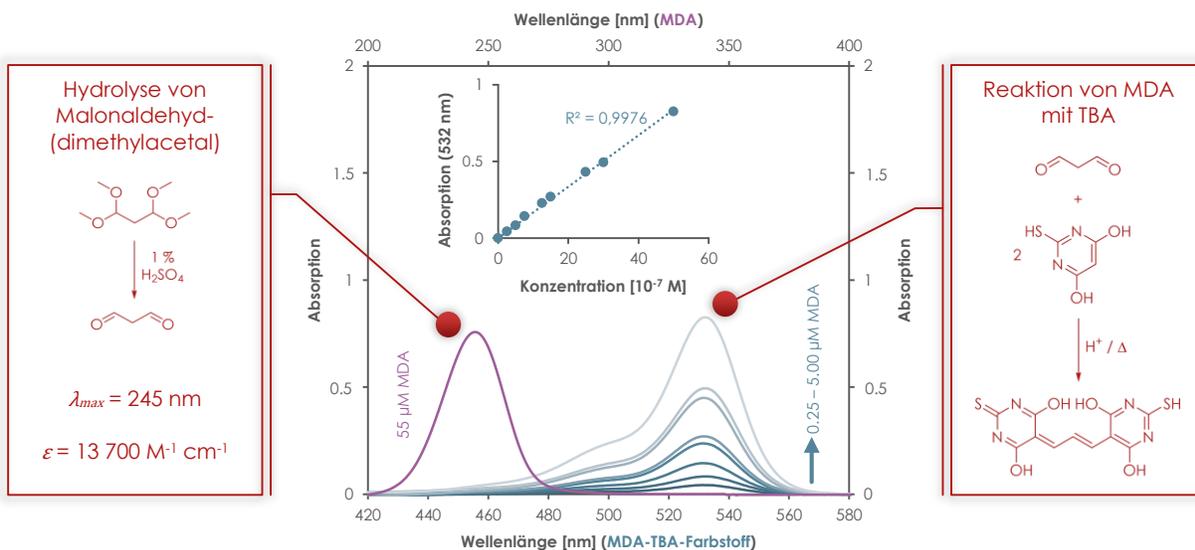


ABBILDUNG 3.58: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des MDA-TBA-Farbstoffes.^[227]

Abbildung 3.58 liefert einen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 167\,566\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Dieser Wert steht im Einklang mit dem Literaturdurchschnittswert von $\varepsilon = 153\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.^[227]

Die Spaltung von CT-DNA erfolgte in der An- und Abwesenheit der Komplexe **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** mit Ascorbinsäure als Aktivierungsreagenz. Zum Vergleich wurde auch die Spaltung durch die Komplexe **Cu(P-RhB)** und **Cu(37)₂** sowie durch CuCl₂ untersucht. Dazu wurden die Proben zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend äquivalent zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten mit 10 % TCA und TBA für 30 min bei 99 °C erhitzt. Die Abbildung 3.59 zeigt die Auswertung der Absorptionsmessungen sowohl in der Form der MDA-Konzentration in den Proben als auch in der durch die Komplexe gebildeten absoluten Menge an MDA bezogen auf die Stoffmenge der CT-DNA.

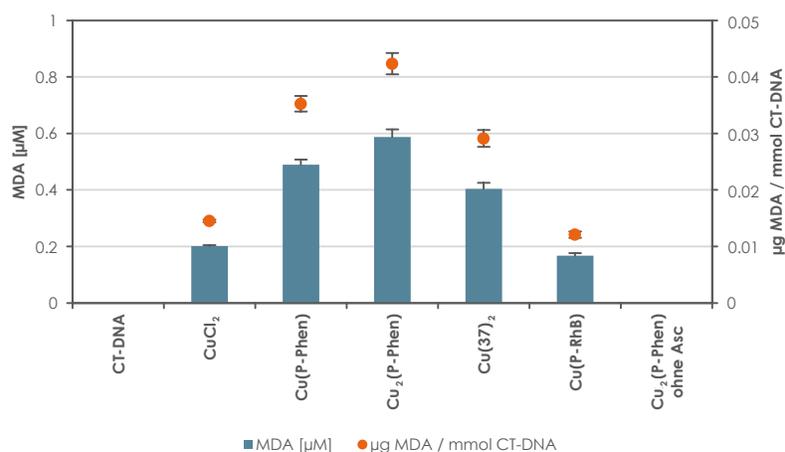


ABBILDUNG 3.59: MDA-Bildung durch oxidative Spaltung von CT-DNA mit **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)**. (100 µM Komplex und 1 mM CT-DNA in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.5 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 2 h)

Wie bereits bei der Spaltung von Plasmid-DNA stellen auch bei der Spaltung von linearer CT-DNA die zwei Kupfer(II)-Komplexe des Peptids **P-Phen** die effektivsten Spalter dar (vgl. Abschnitt 3.1.5.2) und übertreffen dabei den Phenanthrolinkomplex **Cu(37)₂** um 21 bzw. 46 Prozentpunkte bezüglich der MDA-Konzentration in den Proben. Für die höhere Aktivität können hier die gleichen Gründe wie zuvor angeführt werden: Die Interaktion mehrerer Metallzentren sowie die Kombination von Interkalation und Furchenbindung wirken sich positiv auf die DNA-Spaltung aus. Das Ergebnis dieses Tests zusammen mit Untersuchungen aus der Literatur zeigen, dass sich die Spaltung linearer DNA durch Cu^{II}-Peptid- und Cu^{II}-Phenanthrolinkomplexe prinzipiell mittels des TBA-Assays untersuchen lässt.^[75,236] Die die äußerst geringen Mengen gebildeten MDAs von maximal

0.04 $\mu\text{g mmol}^{-1}$ CT-DNA für **Cu₂(P-Phen)** zeugen jedoch davon, dass der Reaktionsweg für die Spaltung nicht vorwiegend über die Bildung von Basenaldehyden, die sich zu MDA zersetzen, abläuft. *YAN JIN* und *JAMES COWAN* konnten so unter anderem durch Nutzung des TBA-Assays feststellen, dass die Spaltung durch Cu^{II}-ATCUN-Komplexe bevorzugt über die Freisetzung der Nucleobasen durch C4'-Wasserstoffabstraktion (bzw. zu einem geringen Teil über die C1'-Wasserstoffabstraktion) verläuft.^[75] Dies findet sich dadurch bestätigt, dass die Spaltung durch den Komplex **Cu(P-RhB)** identisch mit der durch Kupfer(II)-chlorid ist. Die höhere Aktivität der **P-Phen**-Komplexe bezüglich der Bildung von Basenaldehyden ist demnach hauptsächlich auf eine veränderte DNA-Komplex-Wechselwirkung und damit einem veränderten Spaltmechanismus durch die Phenanthrolingruppe im Peptid zurückzuführen. Es zeigt sich auch, dass nur in der Anwesenheit von Ascorbinsäure eine DNA-Spaltung zu beobachten ist. Ursache hierfür kann sowohl eine unzureichende Selbstaktivierung der Nucleasen für eine Spaltung linearer DNA sein als auch, dass die Spaltung ohne Ascorbinsäure keinerlei Basenaldehyde und damit kein MDA produziert und ausschließlich Spaltprodukte entstehen, die nicht durch den TBA-Assay erfasst werden.

3.1.5.4. Peroxidation von Lipiden

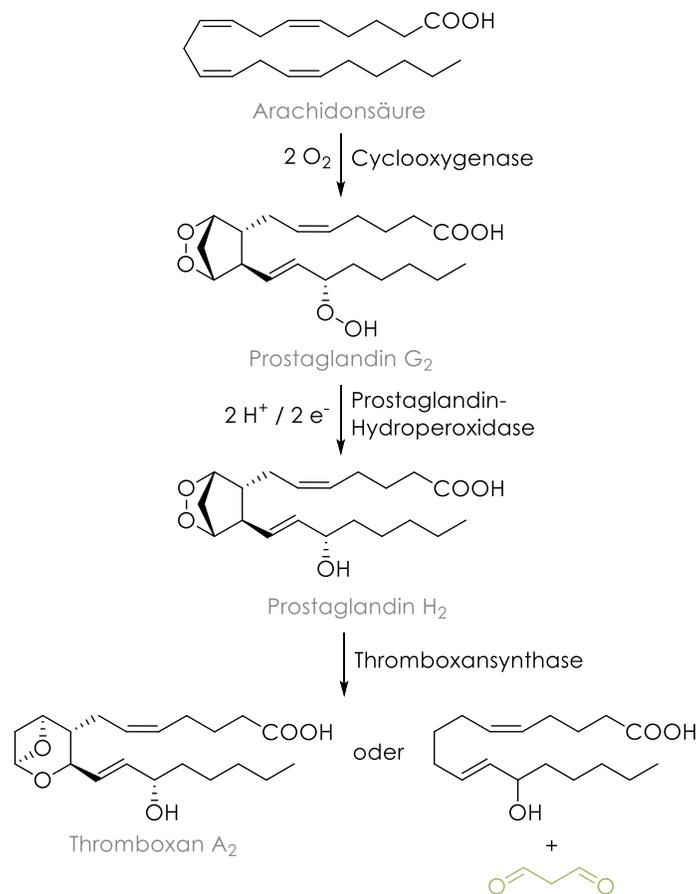
Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen trägt nicht nur durch Schädigung der DNA zum oxidativen Stress der Zellen bei, sondern ebenso durch ihre Reaktion mit Lipiden. Die Degeneration von Lipiden durch Peroxidation sollte daher für ATCUN-Peptide modellhaft anhand von Fettsäuren untersucht werden.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Lipidperoxidation

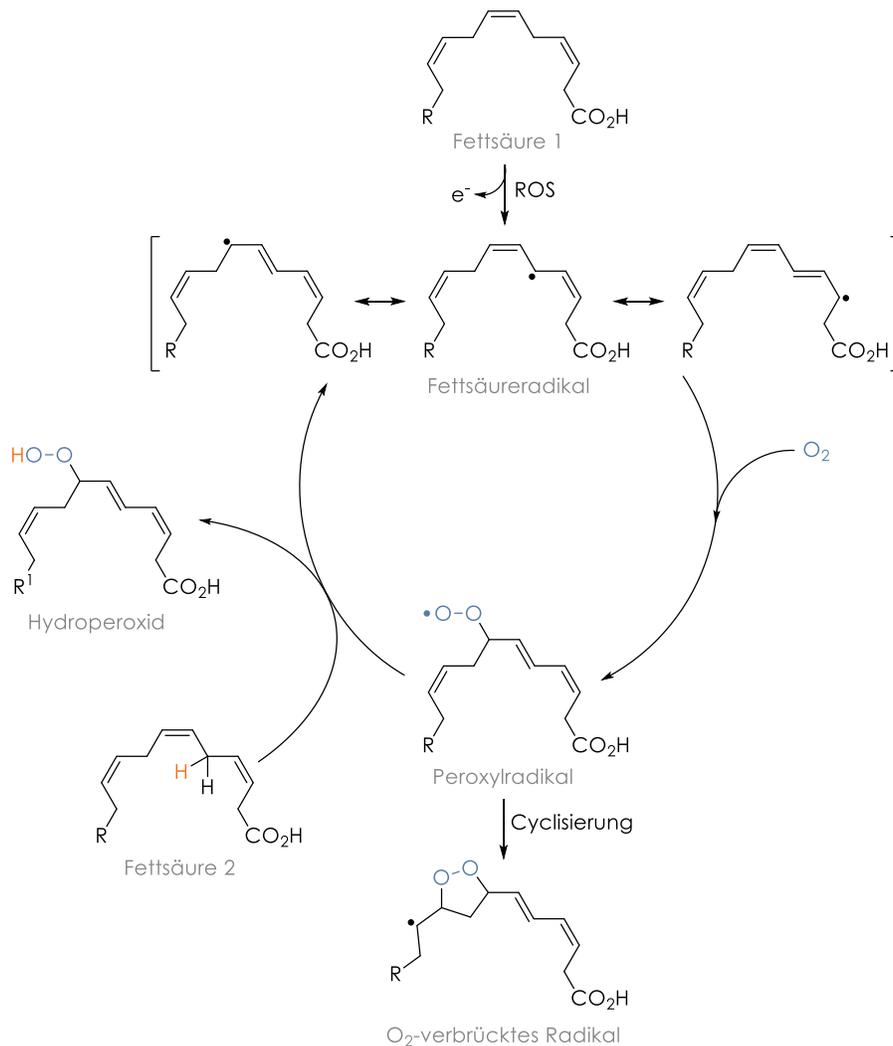
Die oxidative Schädigung von Lipiden in biologischen Systemen steht seit vielen Jahren im Fokus des wissenschaftlichen Interesses, da die Lipidperoxidation bzw. die Produkte der Peroxidation häufig mit Prozessen des Alterns und einigen Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit und Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden.^[163,226,237–240] Die Schädigung der Lipide tritt dabei zumeist

durch Elektronenübertragungen (Radikalbildung) an reaktiven Methylengruppen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf und wird vorwiegend durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen, die sowohl auf natürlichem Wege durch Enzyme (z.B. Myeloperoxidase oder Lipoxygenasen) als auch durch Reaktion von Übergangsmetallen mit Sauerstoff gebildet werden können (vgl. Schema 3.18). Ein typisches Endprodukt der Lipidperoxidation ist Malondialdehyd. Dieses wird *in vivo* einerseits enzymkontrolliert beim Metabolismus von Arachidonsäure zur Biosynthese von Prostaglandinen (Gewebshormone) und Thromboxan (Aktivierung der Thrombozytenaggregation) gebildet (Schema 3.38).^[241]



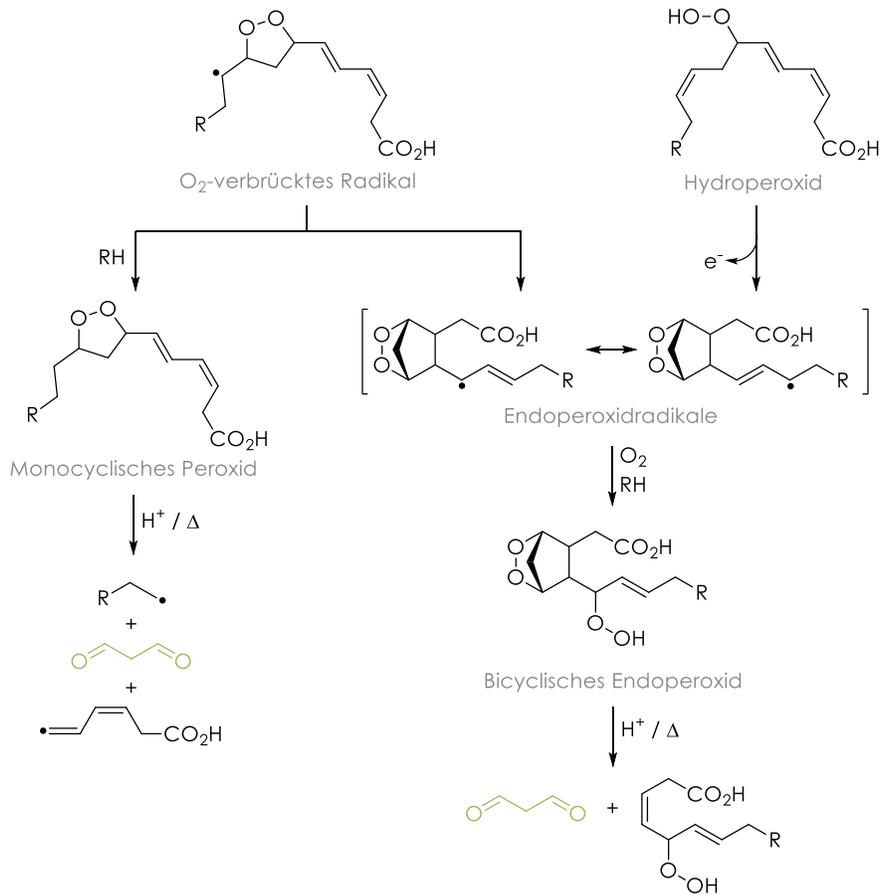
SCHEMA 3.38: Bildung von MDA durch Oxidation von Arachidonsäure.^[241]

Andererseits kann MDA als sekundäres Endprodukt bei der nicht-enzymatischen Metabolisierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen. Die Addition von Sauerstoff an ein durch ROS generiertes Fettsäureradikal setzt eine Kettenreaktion in Gang, bei der das Peroxylradikal über Wasserstoffabstraktion intramolekular mit benachbarten Methingruppen oder aber mit weiteren Fettsäuremolekülen reagiert (Schema 3.39).^[226,242,243] Ein Kettenabbruch erfolgt erst dann, wenn zwei Radikale miteinander reagieren und ein stabiles Produkt bilden, die Fettsäuren aufgebraucht sind oder sämtliche Radikale durch Antioxidantien (z.B. Vitamin E) abgefangen werden.^[239,240]



SCHEMA 3.39: Mechanismus der Lipidperoxidation.^[226,242,243]
(R = Alkylreste der Fettsäuren)

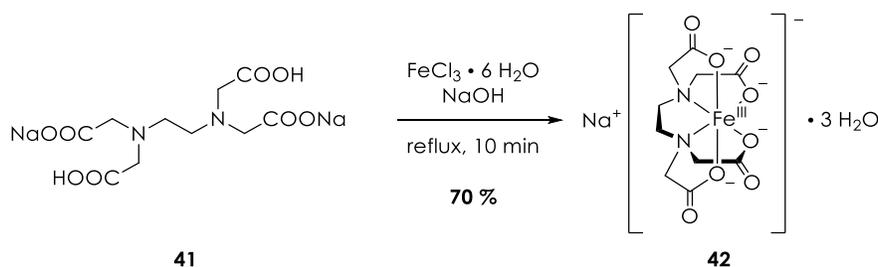
Malondialdehyd entsteht schließlich durch verschiedene Reaktionen ausgehend von den reaktiven O₂-verbrückten Radikalen oder den Hydroperoxiden (Schema 3.40).^[226,242,243]



SCHEMA 3.40: Bildung von MDA bei der Lipidperoxidation.^[226,242,243]
(RH = Wasserstoffdonor)

Die Bildung von MDA ermöglicht, wie bereits bei der Spaltung von CT-DNA, die Analyse der Peroxidation mithilfe des Thiobarbitursäure-Assays, wobei auch hier bedacht werden muss, dass MDA nur das Produkt spezifischer Abbauewege von Lipiden/Fettsäuren ist und nur eines von vielen aldehydischen Produkten.^[244,245]

Durch Nutzung des TBA-Assays wurden einige Cu^{II}-ATCUN-Komplexe hinsichtlich ihres Potentials untersucht, eine Oxidation von Fettsäuren durch reaktive Sauerstoffspezies herbeizuführen. Dabei sollte die Effektivität der Peptid-Komplexe im Vergleich mit dem Komplex **Cu(37)**₂ sowie dem Eisen(III)-EDTA-Komplex **42**, aber auch die Abhängigkeit der Oxidation vom Grad der Sättigung der Fettsäuren untersucht werden. In einem ersten Versuch wurde daher zunächst die zweifach ungesättigte Linolsäure mit den Komplexen **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** in der An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert (Abbildung 3.60). Der Eisen(III)-EDTA-Komplex **42**, der als Modell für den Eisen-Bleomycin-Komplex dienen sollte, wurde zuvor in Anlehnung an eine Vorschrift von *Du T. Loots et al.* dargestellt (Schema 3.41).^[246]



SCHEMA 3.41: Synthese des Eisen(III)-EDTA-Komplexes **42**.^[246]

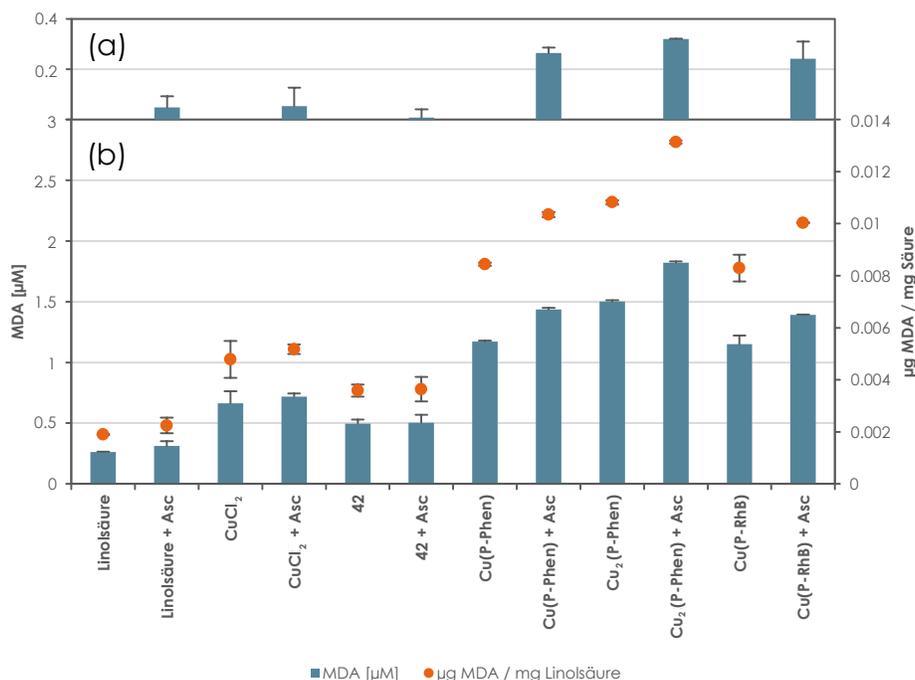


ABBILDUNG 3.60: Oxidation von Linolsäure mit den Komplexen **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)**.

(100 μM Komplex und 100 mg mL⁻¹ Linolsäure in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.5 mM Ascorbinsäure (Asc) bei 37 °C für 2 h)
 ((a) Daten aus (b) abzüglich der jeweiligen Autooxidation von Linolsäure + Komplex ohne Ascorbinsäure)

Wie bereits bei vorherigen Untersuchungen stellt auch bei der Oxidation von Linolsäure **Cu₂(P-Phen)** den effektivsten Komplex dar. Mit etwa 0.013 µg MDA pro mg Linolsäure übertrifft der Komplex in Anwesenheit von Ascorbinsäure die freien Kupfer(II)-Ionen um etwa 60 % und den Fe^{III}-Komplex **42** sogar um rund 73 %. Auch die Freisetzung von MDA durch den Komplex des Rhodaminpeptids (**Cu(P-RhB)**) wird noch um ca. 24 % übertroffen. Der Phenanthrolinligand hat demnach auch bei der Fettsäureperoxidation einen positiven Einfluss auf die biologische Aktivität von ATCUN-Komplexen.

Die geringe Steigerung der Fettsäureoxidation in Anwesenheit von Ascorbinsäure im Vergleich zur MDA-Bildung ohne Ascorbinsäure lässt sich vermutlich auf die generell hohe Anfälligkeit von mehrfach ungesättigten Fettsäuren gegenüber Oxidation durch Sauerstoff erklären. Die Anwesenheit redoxaktiver Metallkomplexe spielt dabei jedoch eine wesentliche Rolle. So ist die Autooxidation von Linolsäure in Anwesenheit von ATCUN-Komplexen deutlich stärker ausgeprägt (**Cu(P-Phen)**, **Cu₂(P-Phen)** und **Cu(P-RhB)** im Vergleich mit CuCl₂ und Komplex **42**). Des Weiteren zeigt sich wie bei der DNA-Spaltung auch eine höhere Oxidation in Abhängigkeit der Anzahl der Metallzentren (**Cu₂(P-Phen)** generiert mehr MDA als **Cu(P-Phen)**). Dass die Autooxidation von Fettsäuren einen beträchtlichen Anteil an der Bildung von Malondialdehyd haben kann, lässt sich auch in Abbildung 3.61 erkennen. Hier wurde **Cu₂(P-Phen)** als effektivster Komplex mit unterschiedlich gesättigten Fettsäuren inkubiert.

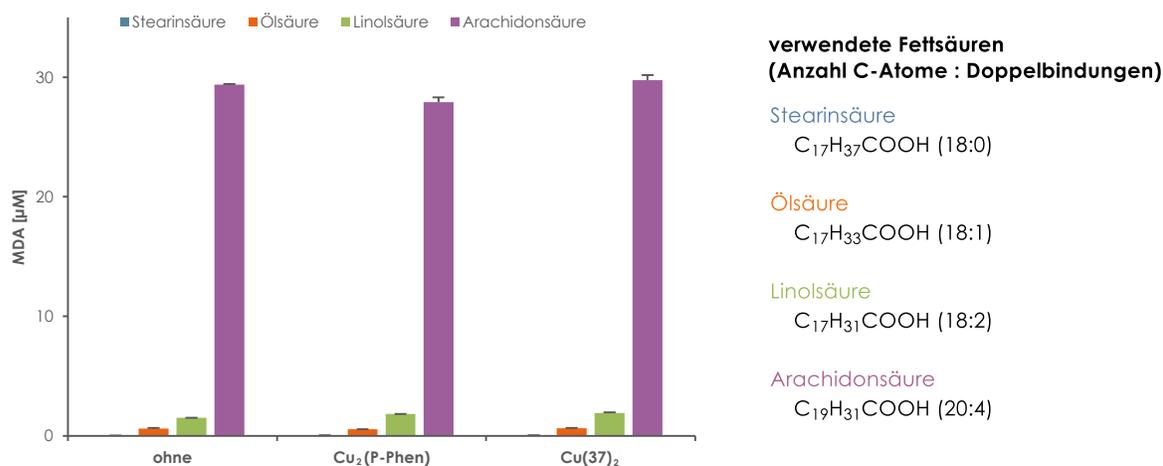


ABBILDUNG 3.61: Oxidation verschiedener Fettsäuren mit **Cu₂(P-Phen)** und **Cu(37)₂**. (100 µM Komplex und 100 mg mL⁻¹ Fettsäure (bzw. 20 µM Komplex und 20 mg mL⁻¹ Arachidonsäure) in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.5 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 2 h)

Anhand der MDA-Konzentration in Abbildung 3.61 zeigt sich deutlich, dass der Grad der Sättigung der Fettsäure einen großen Einfluss auf die Bildung von MDA hat. Je gesättigter die Fettsäure ist, desto weniger MDA wird durch Peroxidation freigesetzt. Betrachtet man die Ergebnisse für die vollständig gesättigte Stearinsäure und die einfach ungesättigte Ölsäure, die in der Anwesenheit der Komplexe **Cu₂(P-Phen)** und **Cu(37)₂** keine gesteigerte Bildung des TBA-MDA-Farbstoffes zeigen, muss jedoch gesagt werden, dass zwei Doppelbindungen (Linolsäure) das Minimum darstellen, damit es überhaupt zur Peroxidation kommt. In Bezug auf die Autooxidation ungesättigter Fettsäuren verdeutlicht die Arachidonsäure, dass mit Erhöhung der Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren auch die Anfälligkeit gegenüber Oxidation durch Sauerstoff steigt. Die vierfach ungesättigte Säure ist gegenüber Sauerstoff und Wärme so stark empfindlich, dass der Zusatz der Kupfer(II)-Komplexe kaum Einfluss auf die Degeneration der Säure hat (violette Balken, vgl. 100 mg mL⁻¹ Linolsäure zu 20 mg mL⁻¹ Arachidonsäure).

Vergleicht man die MDA-Konzentrationen beim Abbau der Linolsäure und der Arachidonsäure durch die Komplexe **Cu₂(P-Phen)** und **Cu(37)₂** fällt auf, dass entgegen den Ergebnissen der DNA-Spaltung der Phenanthrolinkomplex **Cu(37)₂**, wenn auch nur gering unter den gewählten Bedingungen, die Fettsäuren effektiver oxidiert als der Peptid-Komplex (Tabelle 3.14).

TABELLE 3.14: MDA-Konzentration bei der Oxidation von Linol- und Arachidonsäure. (100 µM Komplex und 100 mg mL⁻¹ Linolsäure bzw. 20 µM Komplex und 20 mg mL⁻¹ Arachidonsäure in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 mit 0.5 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 2 h)

<i>Fettsäure</i>	<i>MDA-Konzentration [µM (µg MDA / mg Säure)]</i>	
	Cu₂(P-Phen)	Cu(37)₂
<i>Linolsäure</i>	1.82 (0.013)	1.92 (0.014)
<i>Arachidonsäure</i>	27.92 (1.006)	29.74 (1.072)

Die geringere Effizienz des Peptid-Komplexes ist auch aus der Literatur bekannt.^[247] Obwohl bisher nicht vollständig geklärt werden konnte, worauf genau die Eigenschaft der Inhibierung der Peroxidation durch ATCUN-Peptide beruht, geht man davon aus, dass die Oxidation der Fettsäuren vor allem durch Kupfer(II)-Ionen hervorgerufen wird, die durch eine Zersetzung des Cu^{II}-Peptid-Komplexes mit der Zeit freigesetzt werden.

Diese Theorie wird vor allem dadurch gestützt, dass gezeigt werden konnte, dass die Inhibierung der Peroxidation deutlich stärker ist, wenn ein Cu^{II} : Peptid-Verhältnis von 1 : 2 im Gegensatz zu einem Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt wird. Die höhere Peptidkonzentration führt dazu, dass freiwerdende Kupfer(II)-Ionen schnell erneut gebunden werden.^[247] Legt man diese Theorie zugrunde und bedenkt, dass die Cu^{II} -Peptid-Komplexe im Rahmen dieser Arbeit in einem Cu^{II} : Peptid-Verhältnis von 0.8 : 1 synthetisiert wurden, d.h. nur mit einem geringen Überschuss der Peptide, damit freie Kupfer(II)-Ionen zu Beginn eines jeden Experimentes ausgeschlossen werden können, erklärt sich der im Vergleich zur Literatur geringe inhibitorische Effekt des **$\text{Cu}_2(\text{P-Phen})$** -Komplexes auf die Fettsäureoxidation. Dennoch kann gesagt werden, dass die verwendete Peptidsequenz durch Koordination von Kupfer(II)-Ionen in der Lage ist, oxidativen Stress durch Oxidation von Fettsäuren auszulösen und die Effizienz dabei durch Phenanthrolin deutlich gesteigert werden kann.

3.1.5.5. Spaltung von Proteinen

Neben den Eigenschaften der ATCUN- bzw. Phenanthrolinkomplexe als Nuclease zu fungieren und Lipide peroxidieren zu können, ist auch seit langem bekannt, dass sie in der Lage sind Proteine zu spalten (Proteaseaktivität)^[248–250] bzw. die Verlinkung von Proteinen zu initiieren (Cross-Linkingaktivität).^[251–253] Besonders die Entwicklung künstlicher Proteasen wurde in den letzten Jahren zu einem zentralen Thema der bioanorganischen Forschung, da heutzutage davon ausgegangen wird, dass einige Krankheiten durch fehlgefaltete Proteine ausgelöst werden. Man nimmt beispielsweise an, dass Oligomere des fehlgefalteten Amylins (Insel-Amyloid-Polypeptid, IAPP) mit der Apoptose der insulinbildenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse in Verbindung stehen, einem Charakteristikum von Diabetes mellitus Typ 2.^[254–257] Auch Oligomere anderer Peptide und Proteine wie Amyloid β 42 und α -Synuclein stehen im Verdacht die primären toxischen Spezies einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen, zu denen unter anderem die Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit gehören, zu sein.^[258–260] Da derartige Proteine zumeist nicht wie Enzyme (a) über ein aktives (b) oder allosterisches (c) Zentrum verfügen, womit eine Hemmung durch entsprechende Inhibitoren ausgeschlossen ist^[261], liegt hier der Fokus vor allem auf der Synthese

künstlicher Proteasen, die zur selektiven Spaltung (d) der Oligomere genutzt werden können (Abbildung 3.62).^[262,263]

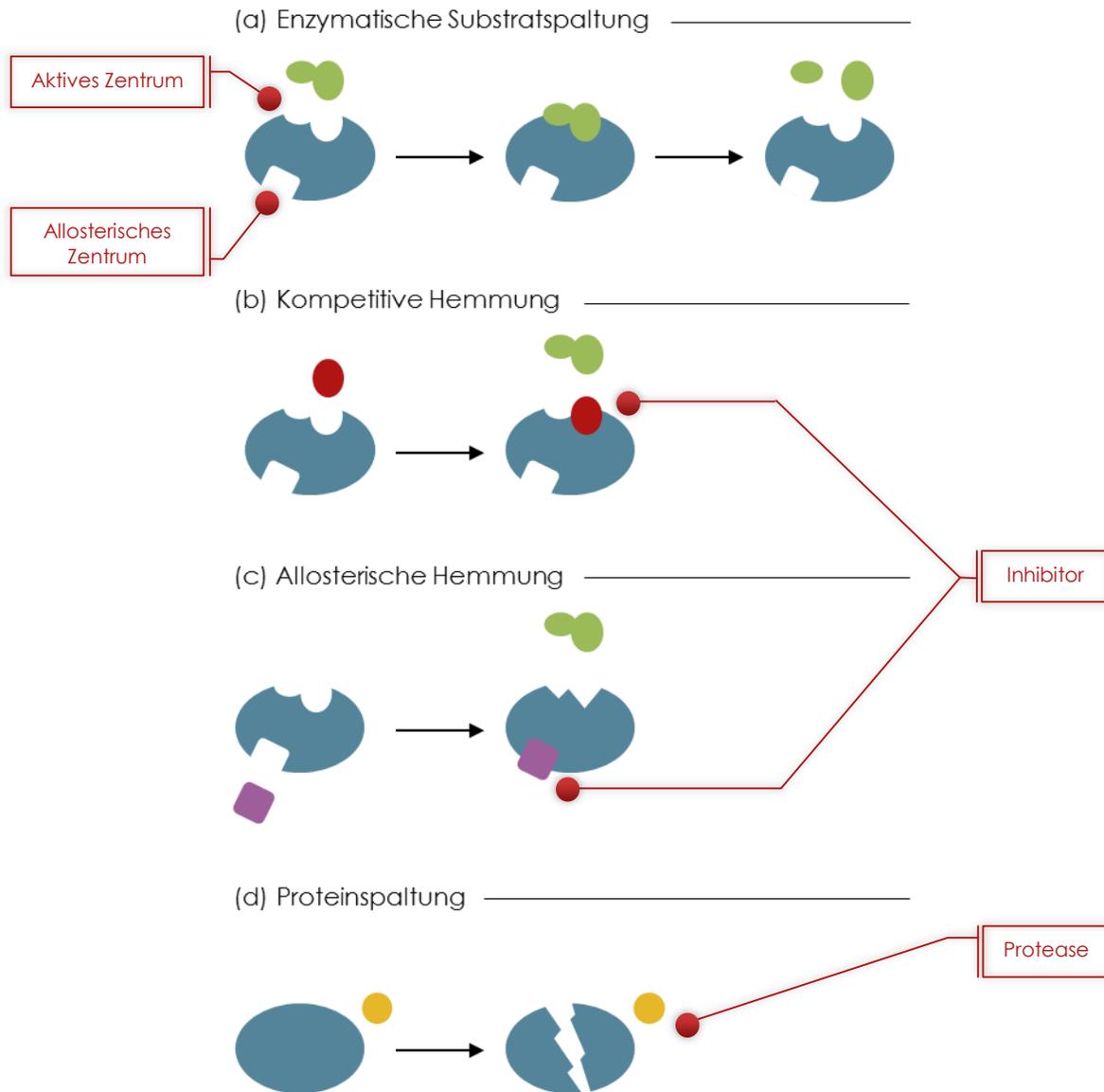


ABBILDUNG 3.62: Schematische Darstellung der Enzymhemmung und Proteinspaltung.^[261]
 (Enzym, Substrat/Produkt, kompetitiver Inhibitor, allosterischer Inhibitor, Protease)

Zur Untersuchung der Proteaseaktivität der **P-Phen**-Komplexe wurde das Protein BSA als Modell verwendet. Die Analyse der Spaltung von Proteinen erfolgte mithilfe der Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

THEORETISCHER HINTERGRUND:**SDS-PAGE^[264]**

Wie auch bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese um eine analytische Methode zur Größentrennung von Probengemischen in einem elektrischen Feld; im Regelfall für Nucleinsäuren und Proteine mit einem Gewicht von etwa 1 – 500 kDa.^[265] Die Gele werden dabei durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid, welches zur Vernetzung der Acrylamid-Fäden dient, erzeugt. Beim Erstarren des Gels bilden sich durch diese Quervernetzung Maschen aus, durch die die Proben während der Elektrophorese wandern (Abbildung 3.63).

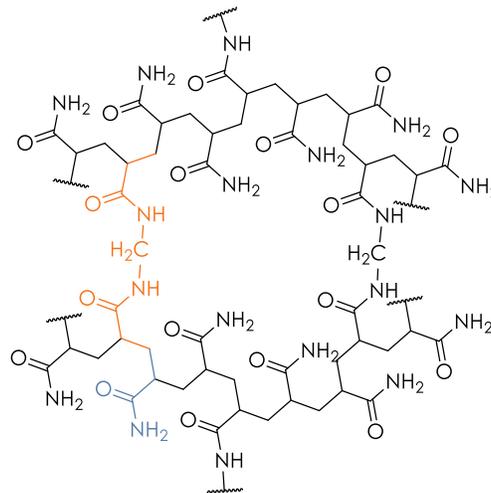


ABBILDUNG 3.63: Ausschnitt aus der Struktur des Polyacrylamidgels.
(Acrylamid, *N,N'*-Methylenbisacrylamid)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach *ULRICH K. LAEMMLI* wandern die Proteine zur Aufkonzentrierung zuerst durch ein großmaschiges Gel mit neutralem pH-Wert (Sammelgel) und anschließend durch ein basisches Trenngel (Abbildung 3.64).^[266]

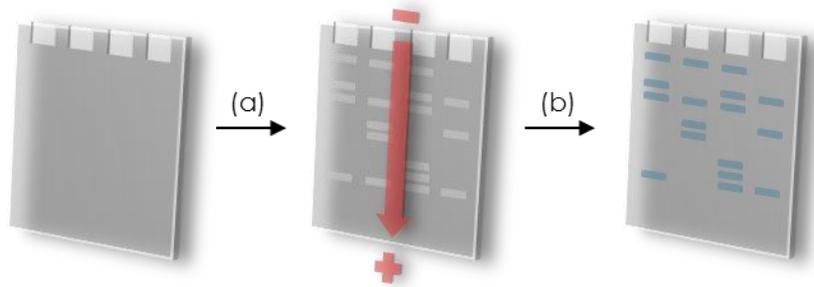


ABBILDUNG 3.64: Schematischer Aufbau der SDS-PAGE.

(Die Proteinproben werden in die Taschen des Gels geladen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt (a). Die Anfärbung der Proteinfragmente z.B. mit Coomassie-Brillant Blau oder die Anregung der Tryptophanfluoreszenz macht die Proteinbanden sichtbar (b).)

Durch eine Proteindenaturierung bei 85 °C und der Reduktion der Disulfidbrücken mittels β -Mercaptoethanol, kommt es zur Linearisierung der Proteine durch Zerstörung der dreidimensionalen Struktur. Diese ermöglicht eine Auftrennung nach der Kettenlänge, wobei längere Proteine langsamer durch das Gel migrieren als kurze. Das Versetzen der Proben mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat sorgt während der Elektrophorese durch Überdecken der Proteineigenladung für eine konstante Ladungsverteilung und führt zur Wanderung der Proteine durch das Gel vom Minus- zum Pluspol. Die Detektion der Banden nach der Gelelektrophorese erfolgt für gewöhnlich mit Farbstoffen wie Coomassie-Brillant-Blau oder über die empfindlichere Silberfärbung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch färbungsfreie Gele der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet, bei denen die Detektion der Proteine auf der Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan beruht.^[267]

Um bei der Spaltung von BSA den Redoxzyklus der Metallkomplexe möglichst zu intensivieren, wurde die Inkubation in der Anwesenheit von Ascorbinsäure **UND** Wasserstoffperoxid durchgeführt. Die Abbildung 3.65 zeigt das Proteingel nach einer Inkubationszeit der Proben von drei Stunden bei 37 °C.^[268]

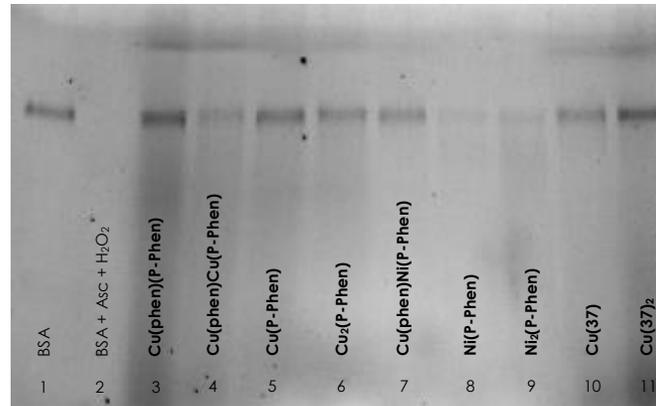


ABBILDUNG 3.65: Proteinspaltaktivität der Cu^{II} - und Ni^{II} -Komplexe von **P-Phen** im Vergleich mit **Cu(37)** und **Cu(37)₂** in der Anwesenheit von Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.
(200 μM Komplexe mit 5 mM Ascorbinsäure (Asc) und 10 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bezüglich 0.66 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ BSA in 60 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 3 h)

Obwohl in erster Näherung für alle getesteten Komplexe eine Proteinspaltaktivität gefunden werden kann, wobei die Ni^{II} -Komplexe **Ni(P-Phen)** und **Ni₂(P-Phen)** scheinbar die höchste Aktivität aufweisen (Spuren 8 und 9), ist das Fehlen der BSA-Bande in Spur 2, in der ausschließlich BSA mit Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid inkubiert wurde, äußerst auffällig. Vergleicht man dazu eine zeitabhängige Inkubation von BSA mit den Aktivierungsreagenzien sieht man deutlich, dass bereits nach fünf Minuten die Spaltung von BSA begonnen hat (a) und schon 30 Minuten ausreichend sind, um das Protein vollständig zu spalten (b) (Abbildung 3.66).

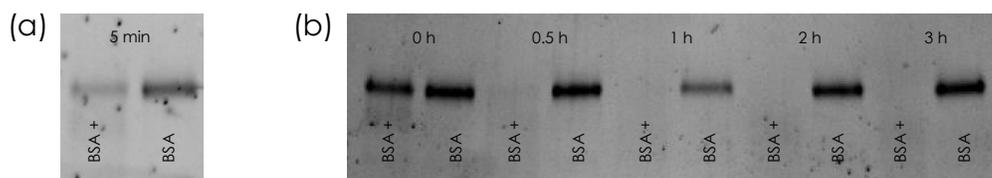


ABBILDUNG 3.66: Zeitabhängige Spaltung von BSA durch Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid.
(0.66 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ BSA in der Ab- und Anwesenheit (BSA+) von 5 mM Ascorbinsäure (Asc) und 10 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in 60 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 0 - 3 h)

Bezieht man das Ergebnis aus Abbildung 3.66 in die Auswertung für die BSA-Spaltung in Abbildung 3.65 ein, können die Spaltergebnisse damit erklärt werden, dass einerseits bei Anwesenheit der **P-Phen**-Komplexe die Aktivierungsreagenzien bevorzugt mit diesen reagieren und die Komplexe wiederum mit dem Protein interagieren und es spalten. Damit wären die Ni^{II} -Komplexe weiterhin die effektivsten Proteasen.

Andererseits wäre auch denkbar, dass die Komplexe die durch Ascorbinsäure und H_2O_2 hervorgerufene BSA-Spaltung inhibieren. Dies würde bedeuten: je schwächer die BSA-Bande im Gel ist, desto schlechter inhibiert der Komplex die Spaltung. Entgegen der ursprünglichen Aussage müsste hier demnach gesagt werden, dass die Komplexe **Ni(P-Phen)** und **Ni₂(P-Phen)** die schlechtesten Spalter/Inhibitoren sind. Die letztere Vermutung wird insofern unterstützt, dass es in der Anwesenheit von Ascorbinsäure (a) **ODER** Wasserstoffperoxid (b) zu keinerlei Proteinspaltung durch die Nickel(II)-Komplexe kommt (Abbildung 3.67, Spuren 8 und 9).

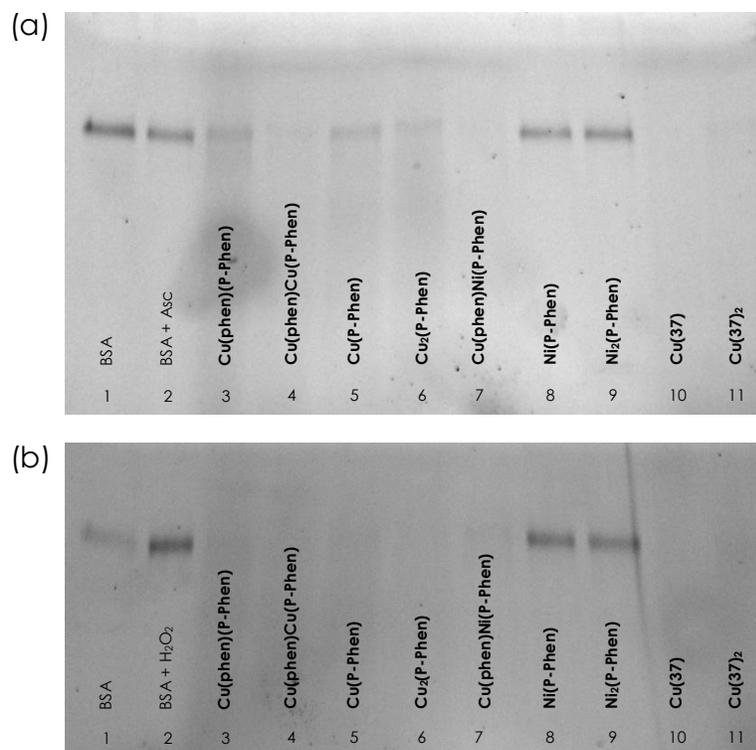


ABBILDUNG 3.67: Proteinspaltaktivität der Cu^{II}- und Ni^{II}-Komplexe von **P-Phen** im Vergleich mit **Cu(37)** und **Cu(37)₂** in der Anwesenheit von (a) Ascorbinsäure und (b) Wasserstoffperoxid. (200 μM Komplexe mit (a) 5 mM Ascorbinsäure (Asc) oder (b) 10 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bezüglich 0.66 μg μL⁻¹ BSA in 60 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 3 h)

Neben der Inaktivität der Komplexe **Ni(P-Phen)** und **Ni₂(P-Phen)** zeigt Abbildung 3.67 auch, dass das BSA ausschließlich durch die Kombination beider Aktivierungsreagenzien, nicht aber von Ascorbinsäure bzw. Wasserstoffperoxid allein gespalten wird (jeweils Spuren 1 und 2 im Vergleich). Allgemein kann gesagt werden, dass die Spaltaktivität der Komplexe höher ist, wenn sie durch H_2O_2 aktiviert werden.

Hierbei scheinen alle Komplexe eine ähnliche Effizienz zu besitzen (b). Bei der Aktivierung durch Ascorbinsäure hingegen zeigen sich Unterschiede in der Spaltaktivität (a). Während die beiden Phenanthrolinkomplexe **Cu(37)** und **Cu(37)₂** die aktivsten Proteasen darstellen (Spuren 10 und 11) und lediglich die Komplexe **Cu(phen)Cu(P-Phen)** und **Cu(phen)Ni(P-Phen)** eine ähnliche Effizienz erreichen (Spuren 4 und 7), spalten die Komplexe **Cu(phen)(P-Phen)**, **Cu(P-Phen)** und **Cu₂(P-Phen)** BSA zu einem wesentlich geringeren Grad (Spuren 3, 5, 6). Im Gegensatz zur DNA-Spaltung ist demnach für die Proteinspaltung die bloße Verknüpfung mehrerer Metallzentren nicht ausreichend, um eine Verbesserung der Spaltaktivität zu erzielen. Vielmehr bedingt die Kombination aus Anzahl der Metallzentren mit der Koordinationsumgebung und damit mit der Polarität der Komplexe eine bessere oder schlechtere Wechselwirkung mit dem Protein (**Cu(phen)Cu(P-Phen)** und **Cu(phen)Ni(P-Phen)** spalten besser als der Komplex **Cu(phen)(P-Phen)** mit nur einem Metallzentrum, aber auch besser als **Cu₂(P-Phen)**). Inwiefern der Aktivierungsmechanismus und damit der Spaltmechanismus eine Rolle bei der Effizienz der Komplexe spielen, kann an dieser Stelle nicht bestimmt werden. Da eine Proteinspaltung jedoch ohne Aktivierungsreagenz nicht abläuft, kann zumindest davon ausgegangen werden, dass die Spaltung höchstwahrscheinlich oxidativ verläuft und die Reoxidation der Metallzentren im Fall der Proteinspaltung effektiver ist als die Reduktion durch Ascorbinsäure (Abbildung 3.68).^[248,269,270]

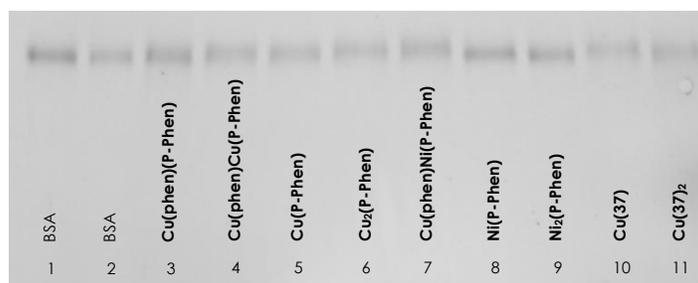


ABBILDUNG 3.68: Proteinspaltaktivität der Cu^{II}- und Ni^{II}-Komplexe von **P-Phen** im Vergleich mit **Cu(37)** und **Cu(37)₂** ohne Aktivierungsreagenz nach 12 h.

(200 µM Komplexe bezüglich 0.66 µg µL⁻¹ BSA in 60 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 12 h)

Zudem zeigt das Schmierens der Banden bezüglich des Mechanismus⁴, dass die Spaltung nicht selektiv verläuft. Bei der Spaltung an einer spezifischen Stelle des Proteins, wie es von der Proteinhydrolyse durch natürliche Proteasen bekannt ist^[271], müssten sich diskrete Banden auf dem Gel widerfinden lassen (Abbildung 3.67).

Dass neben den bereits getroffenen Aussagen über die Abhängigkeit der Spaltaktivität auch die Peptidsequenz bzw. die Größe des Komplexes (vgl. Abbildung 3.67, Spuren 10 und 11) und die Art des Metallzentrums wichtige Rollen spielen, lässt sich beim Vergleich der Spaltung von BSA durch den **Cu(GGH)**- und **Ni(GGH)**-Komplex bzw. freie Kupfer(II)- und Nickel(II)-Ionen erkennen (Abbildung 3.69). Hierbei zeigt sich, dass Nickel(II)-Ionen und der Nickel(II)-Komplex nur eine minimale Spaltaktivität gegenüber BSA besitzen (Spuren 6 und 11 bzw. 4 und 9). Der im Vergleich zu den Kupfer(II)-**P-Phen**-Komplexen sehr kleine **Cu(GGH)**-Komplex sowie Kupfer(II)-Ionen zeigen dagegen eine sehr hohe Effizienz in der Anwesenheit von Ascorbinsäure (Spuren 8 und 10). Die Aktivierung mittels Wasserstoffperoxid, die im Falle der **P-Phen**-Komplexe deutlich bessere Ergebnisse erzielte, führt für den **Cu(GGH)**-Komplex jedoch zu einer Verschlechterung der Proteinspaltung (Spuren 3 und 8 im Vergleich).

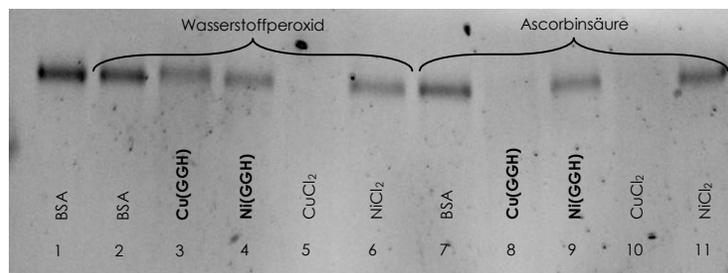


ABBILDUNG 3.69: Proteinspaltaktivität der Cu^{II} - und Ni^{II} -Komplexe **GGH** sowie freier Cu^{II} - und Ni^{II} -Ionen. (200 μM Komplexe/Ionen mit 5 mM Ascorbinsäure oder 10 mM Wasserstoffperoxid bezüglich 0,66 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ BSA in 60 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bei 37 °C für 3 h)

Vergleicht man die Reduktionspotentiale (versus Normal-Wasserstoffelektrode) der Systeme Ascorbylradikal/Ascorbat ($E^0 = -66 \text{ mV}^{[268]}$) und $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}\cdot$ ($E^0 = 380 \text{ mV}^{[268]}$) mit den Potentialen von **Cu(GGH)** ($E^0 = 1038 \text{ mV}^{[268]}$) bzw. **Cu(37)₂** ($E^0 \approx 320 \text{ mV}^{[272]}$) lässt sich feststellen, dass das Potential des ATCUN-Komplexes weit außerhalb des thermodynamisch optimalen Wirkungsbereichs von -66 bis 380 mV liegt. Legt man den **P-Phen**-Komplexen als Vereinfachung das Potential des Komplexes **Cu(37)₂** zugrunde, findet sich für die Eielektronenreduktionen hingegen eine wesentlich bessere Übereinstimmung. Aus der Literatur ist bekannt, dass Komplexe mit einem Reduktionspotential innerhalb dieses Bereichs wesentlich effektivere Redoxzyklen aufweisen und daher in biologischer Hinsicht durch die erhöhte Radikalgenerierung deutlich aktiver sind.^[268] Die Aktivität von ATCUN-Komplexen in der Anwesenheit von

Ascorbinsäure trotz des hohen Potentials, das diese aufweisen, ist noch immer Gegenstand aktueller Forschungen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Aktivität der Komplexe um ein Vielfaches gesteigert werden kann, wenn sowohl Ascorbinsäure als auch Wasserstoffperoxid für die Redoxreaktionen des Kupfer(II)-Zentrums verwendet werden.^[268] Dass im Fall von Kupfer-ATCUN-Komplexen für die oxidative Protein- und auch DNA-Spaltung alle Oxidationsstufen des Kupfers von +1 bis +3 eine wichtige Rolle spielen, kann damit nicht ausgeschlossen werden.

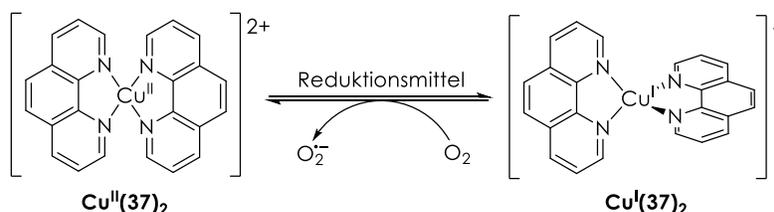
Grundlegend muss bei dieser Betrachtung jedoch beachtet werden, dass die angegebenen Redoxpotentiale für zwei spezifische Komplexe sind und sich durch die veränderte Aminosäuresequenz des Peptids **P-NH₂** im Vergleich zu GGH bzw. der Kopplung von Phenanthrolin an dieses Peptid stark verändern können.^[273]

Auch wenn die Komplexe des **P-Phen**-Peptids im Einzelfall nicht die Proteaseaktivität der einfacheren Komplexe **Cu(GGH)**, **Cu(37)** und **Cu(37)₂** erreichen, bieten sie neben dem Einsatz als künstliche Nuclease und als Peroxidationsreagenz auch Potential als künstliche Protease. Damit stellen die **P-Phen**-Komplexe ein System mit breitem biologischen Anwendungsspektrum dar.

3.2. Phenanthrolinkomplexe

3.2.1. Stand der Forschung

Wie bereits eingehend erwähnt, wurde 1,10-Phenanthrolin (**37**) als zusätzlicher Ligand im Peptid **P-Phen** aus dem Grund verwendet, weil der Komplex **Cu(37)₂** die erste künstliche Kupfer(II)-Nuclease war und bis heute eine der effektivsten Nucleasen darstellt (vgl. Abschnitt 3.1.5).^[37,38,40,43] Die DNA-Spaltaktivität wurde dabei von der Arbeitsgruppe um *DAVID S. SIGMAN* eher zufällig bei der Untersuchung des entsprechenden Kupfer(I)-Komplexes auf seine inhibitorische Wirkung auf die Polymerase I des Bakteriums *Escherichia coli* entdeckt.^[37] Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Inhibierung der Polymerase nicht wie vorausgesagt durch Blockierung der Polymerasebindungsstelle in der kleinen Furche der DNA durch den Liganden **37** erfolgte, sondern durch die Spaltung der DNA durch den Komplex.^[37,274] *DAVID S. SIGMAN et al.* fanden bei genaueren Untersuchungen heraus, dass die DNA-Spaltung auf der Bildung des Cu^I-Komplexes [Cu(phen)₂]⁺ beruht, der in der Anwesenheit von Reduktionsmitteln aus **Cu(37)₂** erzeugt wird.^[37,275] Der Cu^I-Komplex wiederum reagiert mit Sauerstoff, wodurch sowohl der Cu^{II}-Komplex zurückgebildet wird als auch ein Superoxidanion (Schema 3.42). Dieses kann ebenfalls mit Kupfer(I) unter Bildung von Wasserstoffperoxid reagieren. In der Literatur wird heute angenommen, dass die DNA-Spaltung schließlich durch Bildung von metallgebundenen „Cu-oxo“-Spezies (z.B. Cu^{III}-OH oder Cu^I-OOH) aus der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Kupfer(I) stattfindet (vgl. Schema 2.5).^[42] Aufgrund der Möglichkeit der Kupfer-Phenanthrolinkomplexe zwischen die Basen der DNA zu interkalieren^[42,219], gelangen die reaktiven Sauerstoffspezies, obwohl sie selbst nicht diffusionsfähig sind wie beispielsweise Hydroxylradikale, in räumliche Nähe zur DNA und initiieren dort vorwiegend die Abstraktion des Wasserstoffs am C1'-Atom.^[32,39,41–43,274]



SCHEMA 3.42: Redoxreaktion des Komplexes **Cu(37)₂** während der DNA-Spaltung.^[37,42,275]

Da sich die Koordinationsumgebung des Kupfer(II)-Ions während der Reduktion strukturell ändert (Cu^{II} bevorzugt eine planare Koordination, Cu^{I} hingegen eine tetraedrische), ermöglicht die tetraedrische Struktur von **$\text{Cu}^{\text{I}}(\mathbf{37})_2$** , dass der Komplex mit der DNA durch Interkalation eines Liganden und gleichzeitiger Bindung in der kleinen Furche mit dem zweiten Liganden wechselwirkt.^[42,219] Aufgrund dieser Bindungsmodalität haben Substitutionen am Phenanthrolingerüst mitunter starke Auswirkungen auf die DNA-Bindung und damit auf die Spaltaktivität und -effizienz. Während eine Substitution mit kleinen Atomen wie Fluor in den Positionen 5 und 6 zur Steigerung der Bioverfügbarkeit und Löslichkeit des Komplexes **$\text{Cu}(\mathbf{37})_2$** beispielsweise kaum Auswirkung auf die DNA-Bindung hat, rufen Veränderungen in den Positionen 3, 4, 7 und 8 eine starke Abschwächung der DNA-Spaltaktivität aufgrund der geringeren Bindungsaffinität zur kleinen Furche hervor (Abbildung 3.70).^[276,277]

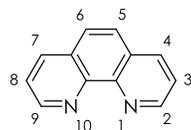
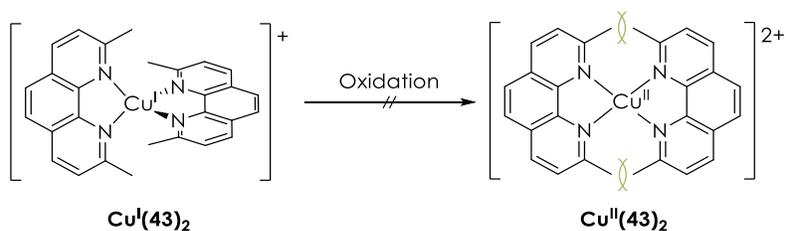


ABBILDUNG 3.70: Nummerierung für den Liganden **37**.

Die größte Auswirkung zeigt jedoch die Substitution in den Positionen 2 und 9. Aus der Literatur ist z.B. bekannt, dass der Cu^{I} -Komplex des 2,9-Dimethylderivats des Phenanthrolins (**43**, Neocuproin) zwar an die DNA binden kann, jedoch keinerlei DNA-Spaltung zeigt.^[278–280] Grund für die fehlende Aktivität ist dabei die Sterik der Komplexe. Bei der Reoxidation des Cu^{I} -Zentrums im tetraedrischen **$\text{Cu}^{\text{I}}(\mathbf{43})_2$** -Komplex zum Cu^{II} -Komplex blockieren die Methylgruppen die Ausbildung einer planaren Koordinationsumgebung (Schema 3.43). Dies führt insgesamt zu einer hohen Stabilisierung der Oxidationsstufe +I und einer hohen Affinität zu Cu^{I} -Ionen, wodurch es möglich ist, mittels Neocuproin die DNA-Spaltung anderer Kupferkomplexe zu inhibieren (vgl. Abschnitt 3.1.3.4).^[37,175,278–280]



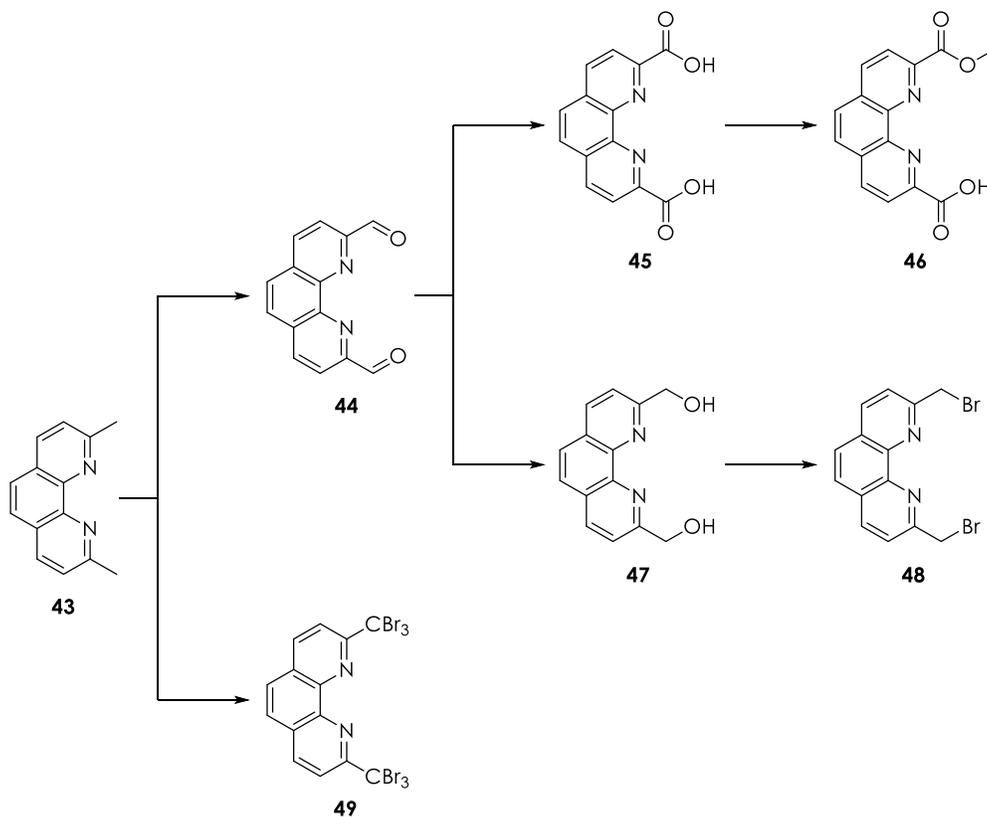
SCHEMA 3.43: Sterische Situation während der Reoxidation von $\text{Cu}^{\text{I}}(\mathbf{43})_2$.^[37,175,278–280]

Um zu überprüfen, inwiefern diese Eigenschaft des Neocuproins (**43**) allgemeingültig ist und auch auf andere 2,9-disubstituierte Phenanthroline zutrifft, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Derivate und deren Kupfer(II)-Komplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer DNA-Bindung und ihrer DNA-Spaltaktivität untersucht.

3.2.2. Liganden- und Komplexsynthese

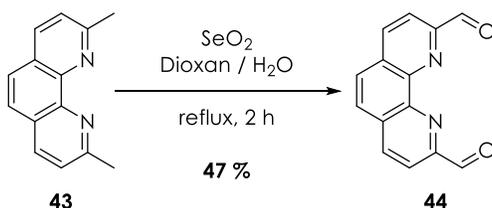
3.2.2.1. Synthese der 2,9-disubstituierten Phenanthrolinderivate

Ausgehend von Neocuproin (**43**) wurden insgesamt sechs 2,9-difunktionalisierte Phenanthrolinderivate synthetisiert. Das Schema 3.44 gibt einen Überblick der Syntheserouten.^[281,282]



SCHEMA 3.44: Übersicht der synthetisierten 2,9-disubstituierten Phenanthroline **44** – **49**.^[281,282]

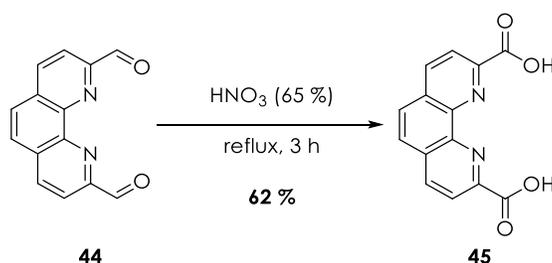
Mit Ausnahme der Liganden **46** und **48** wurden alle Verbindungen nach einer Vorschrift von JAMES A. REISS dargestellt.^[281] Zunächst wurde das Dicarboxaldehyd **44** durch selektive Oxidation von **43** mittels Selendioxid synthetisiert (Schema 3.45).



SCHEMA 3.45: Oxidation von Neocuproin (**43**) zum Dicarboxaldehyd **44**.^[281]

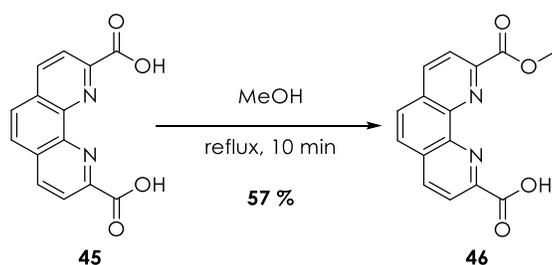
Die im Vergleich zur Literaturausbeute von 70 % hier recht geringe Ausbeute von 47 % ist vor allem darauf zurückzuführen, dass das Produkt **44** entgegen der Literatur häufig umkristallisiert werden musste.^[281] Da die Oxidation der Methylgruppen mit SeO_2 nur bis zu einem gewissen Grad selektiv verläuft, entstehen als Nebenprodukte auch höhere Oxidationsprodukte des Phenanthrolins wie die 2-Mono- und 2,9-Dicarbonsäure. Des Weiteren ist häufiges Umkristallisieren zur Entfernung überschüssigen Selen, das während der Reaktion gebildet wird, notwendig.^[283]

Die gezielte Oxidation zur 2,9-Dicarbonsäure **45** erfolgte hingegen durch Umsetzung von **44** mit 65 %iger Salpetersäure (Schema 3.46).



SCHEMA 3.46: Oxidation von **44** zur Carbonsäure **45** mittels Salpetersäure.^[281]

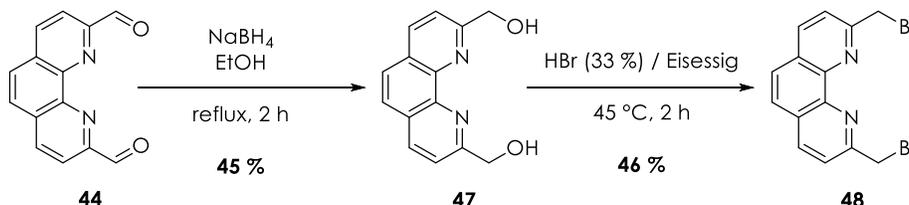
Nach der Umkristallisation von **45** aus Methanol konnte überraschenderweise der Monomethylester **46** erhalten werden, sodass nachfolgende Aufreinigungsschritte für die Säure **45** vorwiegend durch Umkristallisation aus Acetonitril vorgenommen werden mussten (Schema 3.47).



SCHEMA 3.47: Veresterung der Carbonsäure **45** zum Monomethylester **46**.

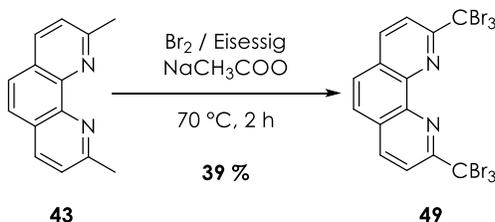
Die Veresterung der Carbonsäure **45** findet vermutlich aufgrund der Kombination vorhandener Spuren von Selen bzw. Selendioxid aus der Oxidation von **43** zum

Carboxaldehyd **44** und Spuren von Salpetersäure aus der nachfolgenden Oxidation statt. Eine gezielte Reaktion unter ähnlichen Bedingungen ist auch aus der Literatur bekannt. GUANGYI WANG und DONALD E. BERGSTROM beschreiben beispielsweise die Umsetzung von Neocuproin (**43**) in Methanol unter Zugabe von Selendioxid und Schwefelsäure zum Mono- bzw. Diester.^[284] Hierdurch zeigt sich, dass das bloße Umkristallisieren von **44** zur Entfernung sämtlicher Selen-/Selendioxidspuren nicht ausreichend ist. Inwiefern dies durch eine Koordination des Selens durch den Liganden **44** bedingt ist, kann nicht gesagt werden, da bisher keine Koordinationsverbindungen von Selen und Phenanthrolin beschrieben wurden. Dass es jedoch durchaus möglich ist, zeigt die Existenz von Phenanthrolinverbindungen des Tellurs, dem größeren Homologen des Selens.^[285–287] Ausgehend vom Dialdehyd **44** wurde durch Reduktion der Aldehydgruppen mittels Natriumborhydrid auch der Alkohol **47** dargestellt, der wiederum mit Bromwasserstoffsäure in einer nucleophilen Substitution (S_N2 -Reaktion) zum entsprechenden 2,9-Bis(brommethyl)-1,10-phenanthrolin (**48**) umgesetzt werden kann (Schema 3.48).^[281,282]



SCHEMA 3.48: Reduktion von **44** zum Alkohol **47** mit anschließender Substitution zum Bromid **48**.^[281,282]

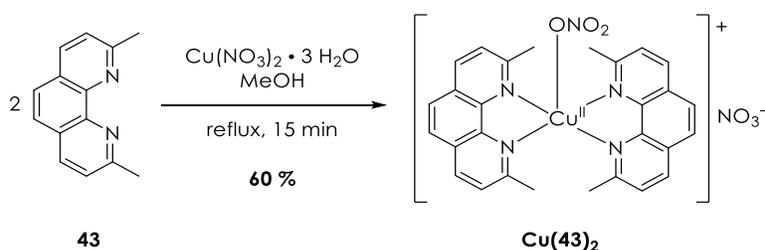
Neben dem Bromid **48** kann aus Neocuproin (**43**) in einer direkten Bromierung auch das 2,9-Bis(tribrommethyl)-Derivat **49** dargestellt werden (Schema 3.49).^[281]



SCHEMA 3.49: Bromierung von Neocuproin (**43**).^[281]

3.2.2.2. Synthese der Kupfer(II)-Komplexe

Für die Untersuchung der biologischen Aktivität von 2,9-disubstituierten Phenanthrolinen sollten von den Liganden **43** - **49** Kupfer(II)-Komplexe mit einem Ligand : Cu^{II}-Verhältnis von 2 : 1 synthetisiert und charakterisiert werden. Die Synthese des Komplexes des Neocuproins (**43**) erfolgte durch Umsetzung des Liganden mit Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat in Methanol (Schema 3.50). Analog dazu wurde als Vergleichsverbindung der Komplex des Phenanthrolins (**37**) dargestellt (vgl. Schema 3.33). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Komplexe in Methanol fallen beide Verbindungen während der Synthese aus und konnten so in hoher Reinheit erhalten werden.^[211]



SCHEMA 3.50: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen mit Neocuproin (**43**).^[211]

Mittels Diffusion von Ether in methanolische Lösungen der Komplexe **Cu(37)**₂ und **Cu(43)**₂ (bzw. **Cu(43)**₂(ClO₄)₂, vgl. Schema 3.51) konnten jeweils Kristalle zur Strukturbestimmung durch Röntgenbeugung erhalten werden (Abbildung 3.71 und Abbildung 3.72, Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16 und Anhang).^[89,129–131]

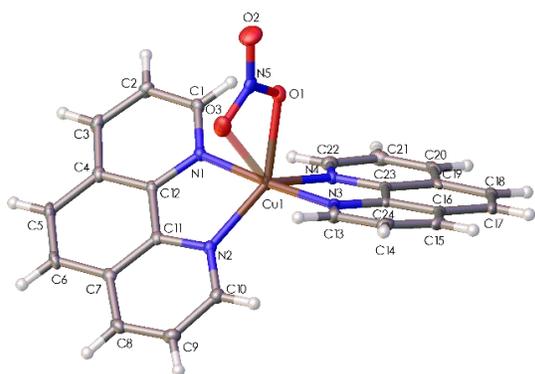


ABBILDUNG 3.71: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes **Cu(37)**₂ im Kristall.^[89,129–131]

(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, Lösungsmittel und ein Nitrat-Anion wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

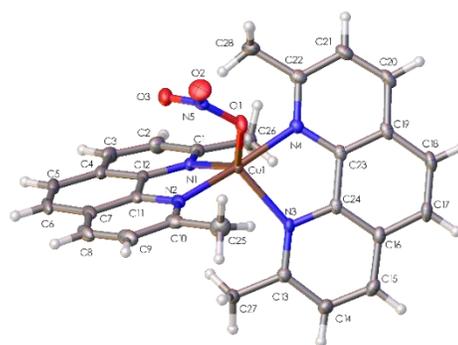


ABBILDUNG 3.72: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes **Cu(43)**₂ im Kristall.^[89,129–131]

(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, ein Nitrat-Anion wurde zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

⁸ Die Lösungsmittelmoleküle (3 MeOH) wurden zugunsten der Qualität der Struktur mittels Lösungsmittelmaske entfernt.^[132]

TABELLE 3.15: Kristallographische Daten für die Komplexe **Cu(37)**₂, **Cu(43)**₂ und **Cu(43)**₂(ClO₄)₂.

Parameter	Cu(37) ₂	Cu(43) ₂	Cu(43) ₂ (ClO ₄) ₂
Empirical formula	C ₂₄ H ₁₆ CuN ₆ O ₆ • CH ₃ OH	C ₂₈ H ₂₄ CuN ₆ O ₆	C ₂₈ H ₂₄ Cl ₂ CuN ₄ O ₈ (CH ₃ OH)
Crystal system	triclinic	triclinic	monoclinic
Space group	P-1	P-1	P2 ₁ /c
a [Å]	7.4126(5)	8.0718(4)	13.8534(7)
b [Å]	10.9712(8)	12.9150(6)	12.6895(5)
c [Å]	15.4847(12)	16.2136(8)	16.9638(8)
α [°]	99.045(4)	100.958(2)	90
β [°]	103.776(3)	99.769(2)	100.608(2)
γ [°]	102.335(3)	106.621(2)	90
V [Å ³]	1165.75(15)	1544.32(13)	2931.1(2)
Z	2	2	4
ρ _{calc} [g cm ⁻³]	1.652	1.299	1.611
μ (MoKα) [mm ⁻¹]	0.999	0.755	0.990
F ₍₀₀₀₎	594	622	1463
Crystal size [mm ³]	0.25 x 0.05 x 0.03	0.29 x 0.23 x 0.11	0.60 x 0.23 x 0.18
2θ range	5.256 – 52.86	4.8 – 53.03	4.38 – 53.02
Index range	-9 ≤ h ≤ 9, -13 ≤ k ≤ 13, -19 ≤ l ≤ 19	-10 ≤ h ≤ 10, -16 ≤ k ≤ 16, -20 ≤ l ≤ 20	-17 ≤ h ≤ 17, -15 ≤ k ≤ 15, -21 ≤ l ≤ 21
Collected / unique reflections	48827 / 4801	34386 / 6400	49773 / 6070
Data / restraints / parameters	4801 / 0 / 354	6400 / 0 / 374	6070 / 3 / 413
Goodness-of-fit on F ²	1.051	1.081	1.067
R indices [I ≥ 2σ(I)]	R ₁ = 0.0271, wR ₂ = 0.0627	R ₁ = 0.0313, wR ₂ = 0.0783	R ₁ = 0.0432, wR ₂ = 0.1145
R indices [all data]	R ₁ = 0.0344, wR ₂ = 0.0660	R ₁ = 0.0364, wR ₂ = 0.0810	R ₁ = 0.0620, wR ₂ = 0.12141
Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	0.32 / -0.41	0.41 / -0.39	1.32 / -0.64

TABELLE 3.16: Ausgewählte Bindungslängen und -winkel von **Cu(37)**₂, **Cu(43)**₂ und **Cu(43)**₂(ClO₄)₂.

Bindungslänge [Å]	Cu(37) ₂	Cu(43) ₂	Cu(43) ₂ (ClO ₄) ₂
Cu1-N1	1.9801(15)	2.1050(15)	1.996(2)
Cu1-N2	2.0435(15)	2.0035(15)	2.082(2)
Cu1-N3	1.9873(15)	2.1395(14)	1.984(2)
Cu1-N4	2.0883(15)	2.0030(15)	2.141(2)
Cu1-O1	2.1550(13)	2.0486(13)	2.115(2)
Cu1-O3	2.7637(15)	3.0099(14)	-
C-C-Bindungen	1.358(3) – 1.437(3)	1.353(3) – 1.436(3)	1.345(5) – 1.437(4)
C1-C26 / C10-C25 / C19-C27 / C22-C28	-	1.490(2) – 1.493(3)	1.487(4) – 1.501(4)
Bindungswinkel [°]			
N1-Cu1-N3	175.58(6)	107.01(5)	166.91(10)
N1-Cu1-N2	82.21(6)	81.95(6)	81.90(10)
N1-Cu1-N4	99.60(6)	104.60(6)	108.56(10)
N1-Cu1-O1	86.81(6)	132.44(5)	82.52(9)
N2-Cu1-N3	100.22(6)	103.35(6)	101.57(1)
N2-Cu1-N4	131.82(6)	171.03(6)	116.20(9)
N2-Cu1-O1	134.51(5)	88.39(6)	127.22(9)
N3-Cu1-N4	81.57(6)	80.81(6)	81.43(10)
N3-Cu1-O1	88.87(6)	120.53(5)	85.42(9)
N4-Cu1-O1	93.48(5)	82.67(5)	116.58(9)
O1-Cu1-O3	50.61(4)	46.67(4)	-

Cu(37)₂ und **Cu(43)**₂ kristallisieren in der triklinen Raumgruppe P-1, wobei sich jeweils zwei asymmetrische Einheiten (ASU) in der primitiven Einheitszelle befinden.

Obwohl Kupfer(II)-Ionen eine quadratisch-planare Koordinationsumgebung bevorzugen, wird das Metallzentrum in beiden Komplexen verzerrt trigonal-bipyramidal von den Liganden koordiniert. Die äquatoriale Ebene wird dabei durch je ein Stickstoffatom beider Phenanthrolinliganden sowie durch ein Sauerstoffatom des Nitrats gebildet. Die übrigen Stickstoffatome der Phenanthroline besetzen entsprechend die axialen Positionen, wobei die Bipyramide aufgrund des Jahn-Teller-Effektes zur Verringerung der Entartung entlang dieser Achse leicht gestaucht wird (Abbildung 3.73).^[288,289] Im Unterschied zum Komplex **Cu(43)₂** lässt die Bindungslänge Cu1-O3 und der Bindungswinkel O1-Cu1-O3 im Komplex **Cu(37)₂** zusätzlich eine schwache Wechselwirkung eines zweiten Sauerstoffatoms mit dem Metall vermuten (Abbildung 3.71 und Tabelle 3.16).^[290,291]

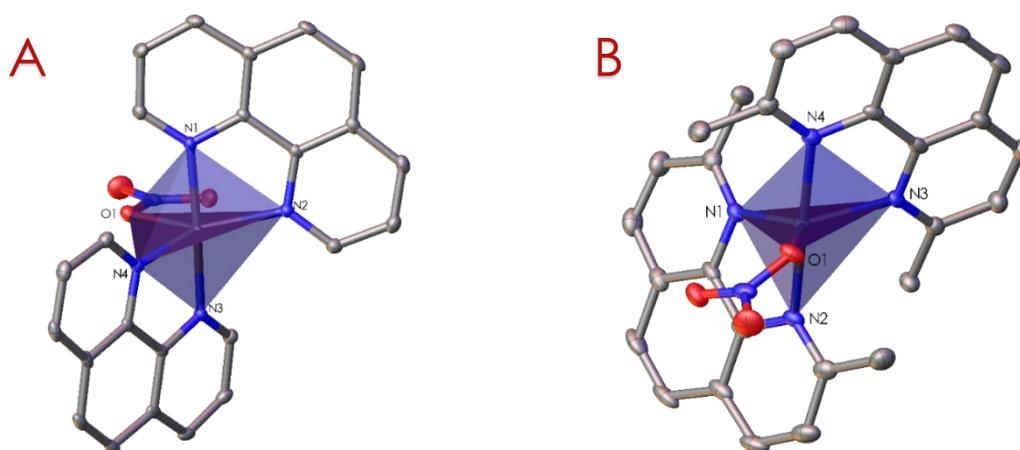
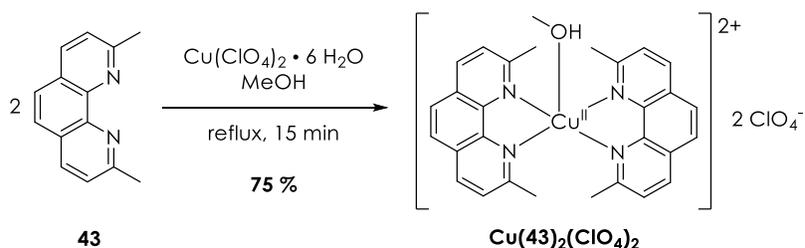


ABBILDUNG 3.73: Olex2-Darstellung der Koordinationspolyeder der Kupfer(II)-Zentren der Komplexe **Cu(37)₂** (A) und **Cu(43)₂** (B).^[89,129–131]

(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, Lösungsmittel, Nitrat-Anionen der äußeren Koordinationssphären und Wasserstoffe wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

Die bipyramidale Koordination ergibt sich hierbei aus der sterischen Hinderung der Substituten in den Positionen 2 und 9, wobei bereits die im Vergleich zu den Methylgruppen des Komplexes **Cu(43)₂** kleinen Wasserstoffatome in **Cu(37)₂** eine quadratisch-planare Koordination verhindern. Die Torsionswinkel zwischen den Ebenen, die jeweils durch die aromatischen Liganden aufgespannt werden, betragen daher etwa 47.8° für **Cu(37)₂** bzw. 70.5° für **Cu(43)₂**. Aus der Literatur sind zwar auch Kupfer(II)-Komplexe des Phenanthrolins und Neocuproins bekannt, die im Festkörper eine annähernd quadratisch-pyramidale Koordination einnehmen^[290,292], jedoch entsprechen

die hier gefundenen Längen und Winkel für die Cu-N-, Cu-O-, C-N- und C-C-Bindungen den üblichen Beobachtungen für fünffach koordinierte Kupfer(II)-Ionen in vergleichbaren Komplexen.^[291,293–296] Die grundlegende Koordinationsumgebung des Komplexes **Cu(43)₂** konnte auch dadurch nicht verändert werden, dass bei der Synthese anstatt des stark koordinierenden Nitrat-Anions das schwach koordinierende Perchlorat verwendet wurde, da die fünfte Koordinationsstelle am Kupfer(II)-Zentrum in diesem Fall durch ein Lösungsmittelmolekül besetzt wird (Schema 3.51 und Abbildung 3.74 und Anhang).



SCHEMA 3.51: Komplexierung von Kupfer(II)-perchlorat mit Neocuproin (**43**).

Bedingt durch die Koordination eines Methanols in einer der äquatorialen Positionen des Metallzentrums kommt es im Komplex **Cu(43)₂(ClO₄)₂** im Vergleich mit **Cu(43)₂** zu einer stärkeren Verzerrung der axialen Achse, wohingegen die Bindungswinkel in der äquatorialen Ebene sich mehr den idealen Winkeln von 120° annähern (Tabelle 3.16).

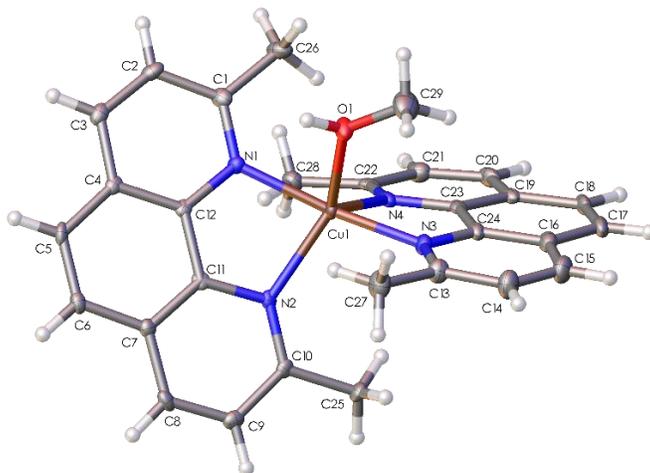


ABBILDUNG 3.74: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes **Cu(43)₂(ClO₄)₂**.^[89,129–131]
 (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, die Perchlorat-Anionen wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

Innerhalb des Kristalls ordnen sich bei allen Komplexen die Moleküle so an, dass es zur Ausbildung von $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen den Phenanthrolinliganden kommt (Abbildung 3.75).

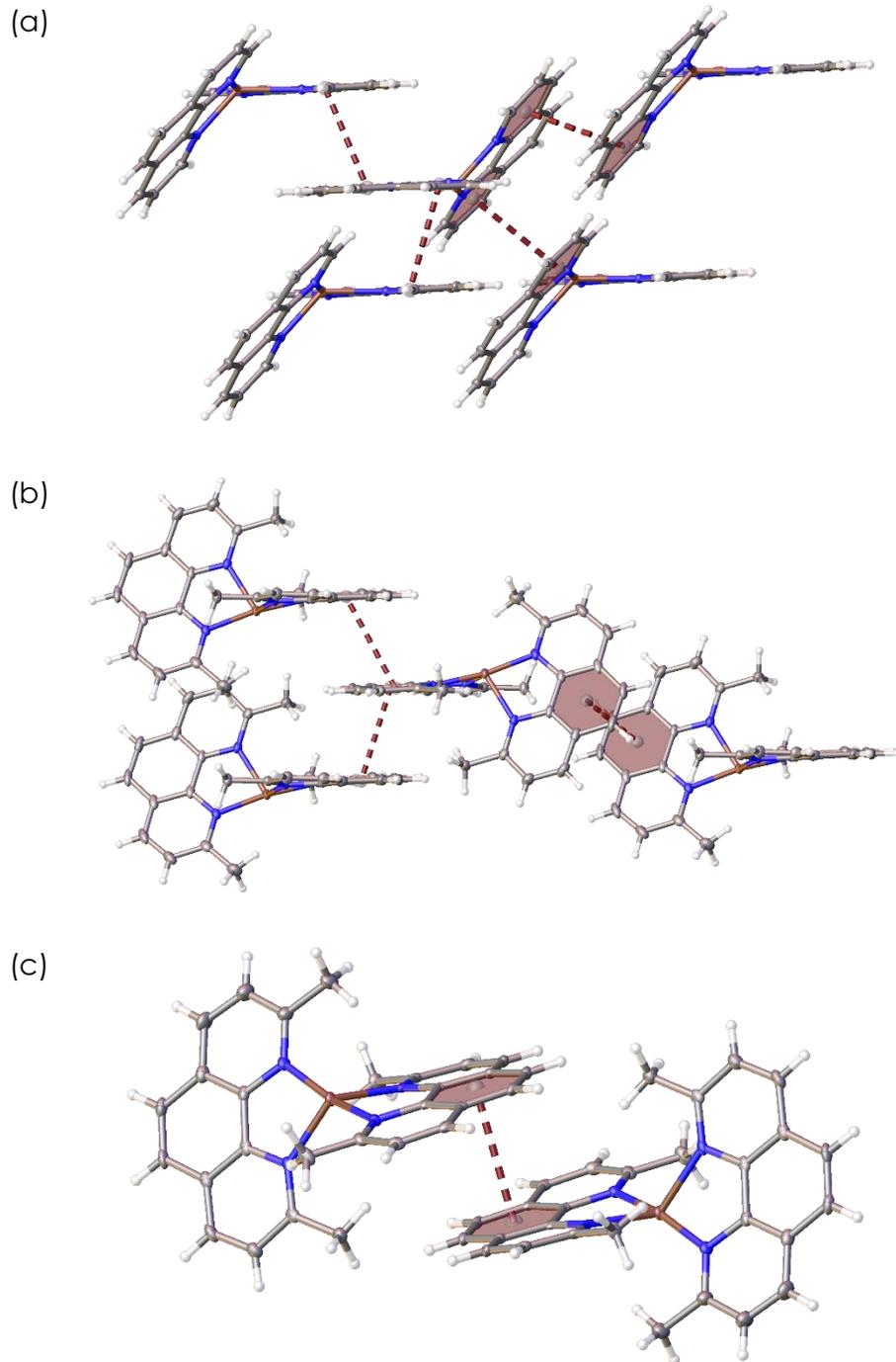


ABBILDUNG 3.75: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen in den Kristallen der Komplexe (a) **Cu(37)₂**, (b) **Cu(43)₂** und (c) **Cu(43)₂(ClO₄)₂**.^[89,129–131]

(--- $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen)

(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, Lösungsmittel und Anionen wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

Im Vergleich zu den Kupfer(II)-Komplexen wird im Komplex **Ni(37)₂** das Nickel(II)-Zentrum durch die Phenanthroline oktaedrisch koordiniert, wobei die freien Koordinationsstellen durch ein Nitrat und ein Lösungsmittelmolekül besetzt werden (vgl. Schema 3.34 zur Synthese des Komplexes) (Abbildung 3.76, Abbildung 3.77 und Anhang).

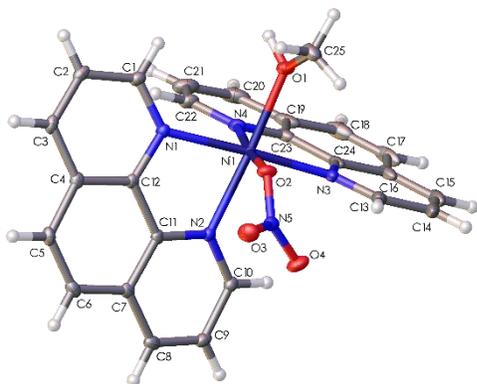


ABBILDUNG 3.76: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur des Komplexes **Ni(37)₂**.^[89,129–131] (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, ein Nitrat-Anion wurde zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

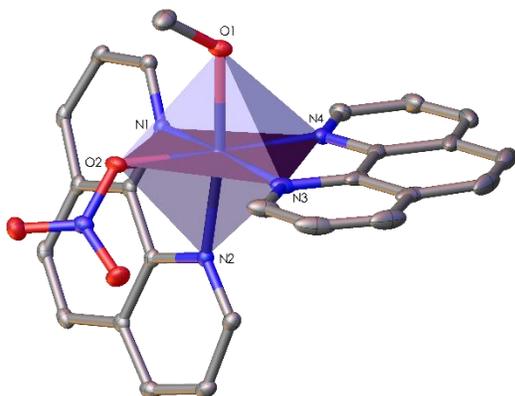


ABBILDUNG 3.77: Olex2-Darstellung des Koordinationspolyeders des Komplexes **Ni(37)₂**.^[89,129–131] (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, ein Nitrat-Anion und die Wasserstoffatome wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

TABELLE 3.17: Kristallographische Daten für **Ni(37)₂**.

Parameter	Ni(37)₂
Empirical formula	C ₂₄ H ₁₄ N ₄ NiO ₆ (CH ₃ OH)
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
<i>a</i> [Å]	7.9633(6)
<i>b</i> [Å]	8.5990(6)
<i>c</i> [Å]	17.4581(12)
α [°]	98.204(3)
β [°]	99.075(3)
γ [°]	98.360(3)
<i>V</i> [Å ³]	1151.05(14)
<i>Z</i>	2
ρ_{calc} [g cm ⁻³]	1.660
μ [MoK α] [mm ⁻¹]	0.906
<i>F</i> ₀₀₀	592
Crystal size [mm ³]	0.25 x 0.20 x 0.16
2 θ range	4.796 – 52.864
Index range	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 9, -10 ≤ <i>k</i> ≤ 10, -21 ≤ <i>l</i> ≤ 21
Collected / unique reflections	36399 / 4735
Data / restraints / parameters	4735 / 3 / 356
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.058
<i>R</i> indices [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0248, <i>wR</i> ₂ = 0.603
<i>R</i> indices [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.0270, <i>wR</i> ₂ = 0.0615
Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	0.37 / -0.43

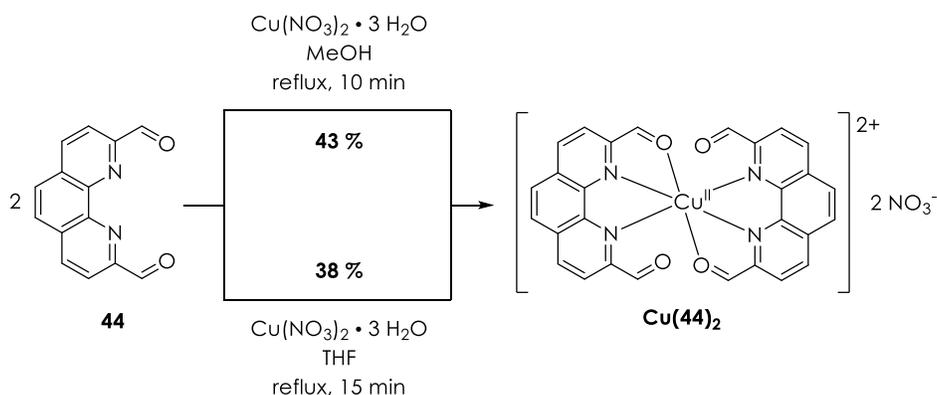
TABELLE 3.18: Ausgewählte Bindungslängen und -winkel im Komplex **Ni(37)₂**.

Bindungslänge [Å]	Ni(37)₂
Ni1-N1 / Ni1-O2	2.1009(12) / 2.1023(11)
Ni1-N2 / Ni1-N4	2.0689(12) / 2.0718(13)
Ni1-N3 / Ni1-O1	2.0811(13) / 2.0899(11)
Bindungswinkel [°]	
N1-Ni1-O1	95.41(5)
N1-Ni1-O2	85.59(4)
N1-Ni1-N2	79.66(5)
N1-Ni1-N3	174.93(5)
N1-Ni1-N4	95.66(5)
N2-Ni1-O1	172.93(5)
N2-Ni1-O2	88.73(4)
N2-Ni1-N3	97.47(5)
N2-Ni1-N4	96.41(5)
N3-Ni1-O1	87.81(5)
N3-Ni1-O2	98.57(5)
N3-Ni1-N4	80.45(5)
N4-Ni1-O1	89.09(5)
N4-Ni1-O2	174.85(4)
O1-Ni1-O2	85.82(4)

Im Gegensatz zu den Kupfer(II)-Komplexen zeigt die Tabelle 3.18, dass die oktaedrische Koordinationsumgebung des Nickel(II)-Zentrums nur leicht verzerrt ist. Da es sich bei Nickel(II) um ein d^8 -Ion handelt und das Oktaeder in keiner der drei vierzähligen Achsen eine Streckung bzw. Stauchung erfährt, ist die Verzerrung keine Ursache des Jahn-Teller-Effektes, sondern vielmehr des Phenanthrolingerüsts, d.h. der starren Stickstoff-Stickstoff-Abstände innerhalb eines Liganden von jeweils etwa 2.7 \AA .^[288,289] Dies zeigt sich auch daran, dass die größte Abweichung vom idealen Oktaederwinkel von 90° bei den Winkeln zwischen N1-Ni1-N2 (ca. 79.7°) und N3-Ni1-N4 (ca. 80.5°) auftreten.

Während die Synthese der Komplexe **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂** recht einfach durchführbar und mit guten Ausbeuten verbunden war, mussten für die Komplexe der Liganden **44 - 47** verschiedene Methoden getestet werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur die erfolgreichen Synthesen vorgestellt sein sollen.

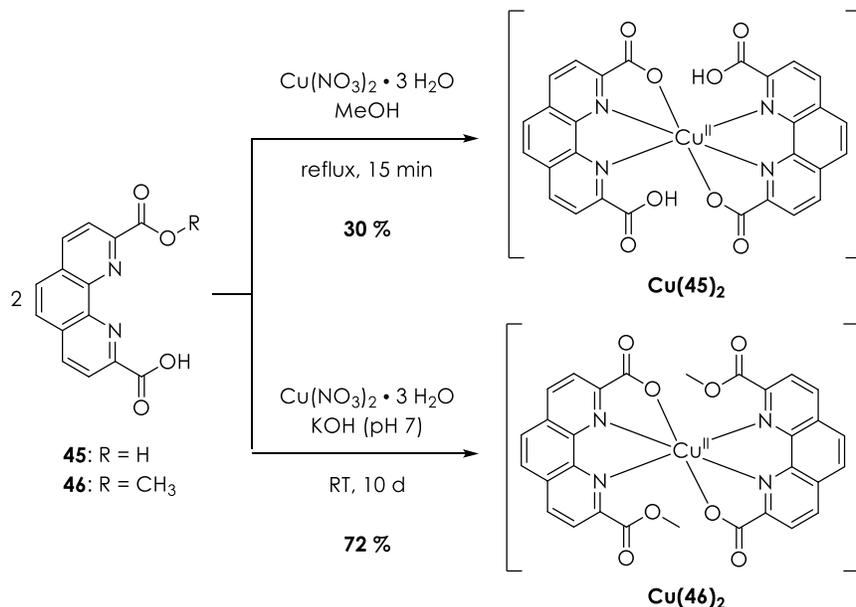
Kupfer(II)-Komplexe des Dialdehyds **44** konnten durch Umsetzung des Liganden in Methanol bzw. Tetrahydrofuran (THF) mit anschließendem langsamem Verdampfen der Lösungsmittel erhalten werden (Schema 3.52).



SCHEMA 3.52: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen mit dem Dialdehyd **44**.

Die Analyse des Komplexes **Cu(44)₂** mittels IR-Spektroskopie deutet darauf hin, dass das Kupfer(II)-Ion sowohl durch die Stickstoffatome der Phenanthroline-Liganden als auch durch die Carbonylgruppen koordiniert wird, da sich die Streckschwingung der C=O-Bindung des freien Liganden bei 1701 cm^{-1} durch die Komplexierung zu einer niedrigeren Wellenzahl von 1607 cm^{-1} verschiebt. Die zusätzliche Koordination eines Nitrats kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Komplexbildung von Cu^{II} -Ionen durch die Carbonsäure **45** bzw. den Monomethylester **46** wird das Metallzentrum ebenso zusätzlich durch zwei Sauerstoffatome der Liganden koordiniert (Schema 3.53).



SCHEMA 3.53: Komplexbildung von Kupfer(II)-Ionen durch die Carbonsäure **45** und den Ester **46**.

Die sechsfache Koordination des Kupfer(II)-Ions konnte sowohl über ESI-MS als auch durch CHN-Analysen bestätigt werden. Zusätzlich konnte vom Komplex **Cu(46)₂** eine Molekülstruktur im Kristall erhalten werden (Abbildung 3.78, Tabelle 3.19 und Anhang).

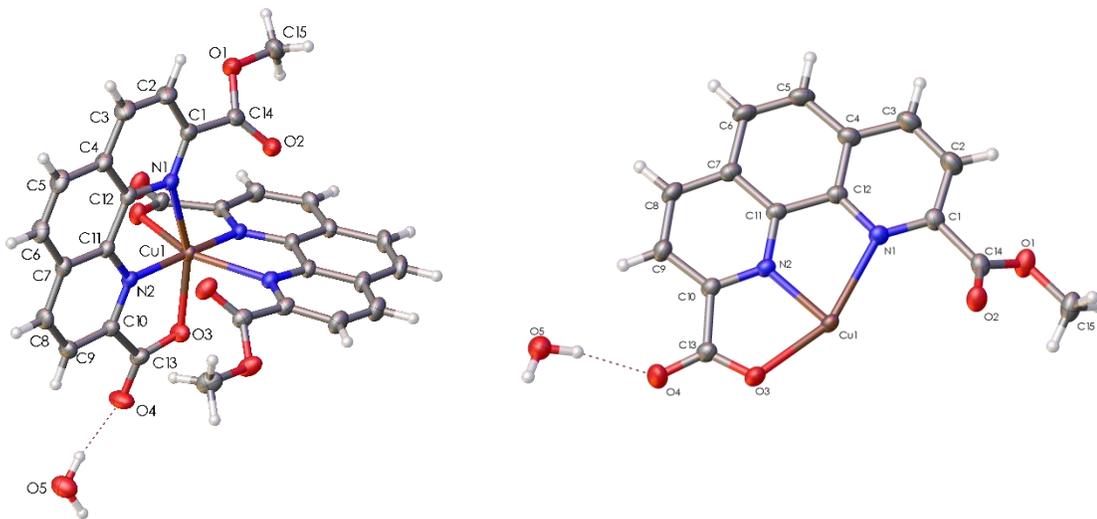


ABBILDUNG 3.78: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur und der ASU des Komplexes **Cu(46)₂**.^[89,129–131]
 (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit)

TABELLE 3.19: Kristallographische Daten sowie ausgewählte Bindungslängen und -winkel für **Cu(46)**₂.

Parameter	Cu(46) ₂	Bindungslänge [Å]	Cu(46) ₂
Empirical formula	C ₃₀ H ₁₈ CuN ₄ O ₈ • 2 H ₂ O	N1(N1')-Cu1	2.3481(12)
Crystal system	monoclinic	N2(N2')-Cu1	1.9377(12)
Space group	I2/a	O3(O3')-Cu1	2.1329(12)
a [Å]	15.495(3)	C1-C14	1.500(2)
b [Å]	9.4183(19)	C10-C1	1.519(2)
c [Å]	19.159(6)	C13-O3	1.2590(18)
α [°]	90	C13-O4	1.240(2)
β [°]	92.117(4)	C14-O1	1.3300(19)
γ [°]	90	C14-O2	1.2023(19)
V [Å ³]	2794.2(11)	C15-O1	1.452(2)
Z	4	O4·····HO5 / O4·····HC2	1.915(2) / 2.438(2)
ρ _{calc} [g cm ⁻³]	1.574	Bindungswinkel [°]	
μ (MoKα) [mm ⁻¹]	0.851	N1-Cu1-N1'	97.68(6)
F ₍₀₀₀₎	1356	N1(N1')-Cu1-N2(N2')	76.70(5)
Crystal size [mm ³]	0.27 x 0.20 x 0.12	N1(N1')-Cu1-N2'(N2)	110.02(5)
2θ range	4.254 – 61.15	N1(N1')-Cu1-O3(O3')	155.23(4)
Index range	-20 ≤ h ≤ 22, -13 ≤ k ≤ 13, -24 ≤ l ≤ 27	N1(N1')-Cu1-O3'(O3)	87.18(5)
Collected / unique reflections	24875 / 4211	N2-Cu1-N2'	170.22(7)
Data / restraints / parameters	4211 / 0 / 208	N2(N2')-Cu1-O3(O3')	78.82(5)
Goodness-of-fit on F ²	1.076	N2(N2')-Cu1-O3'(O3)	94.74(5)
R indices [I ≥ 2σ(I)]	R ₁ = 0.0334, wR ₂ = 0.0855	O3-Cu1-O3'	98.54(7)
R indices [all data]	R ₁ = 0.0408, wR ₂ = 0.0911	O1-C14-O2	124.87(15)
Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	0.47 / -0.22	O3-C13-O4	126.32(14)

Bedingt durch die Koordination der deprotonierten Carboxylgruppen wird das Kupfer(II)-Ion von den Phenanthrolinliganden asymmetrisch gebunden, sodass die N1-Cu1-Bindung mit ca. 2.35 Å wesentlich länger ist als die N2-Cu1-Bindung mit etwa 1.94 Å. Dies hat ebenfalls zur Folge, dass die Winkel im Oktaeder deutlich vom idealen Winkel von 90° abweichen. Die Deprotonierung und Koordination führen außerdem zu einer Veränderung der C-O-Bindungslängen. Während die Sauerstoffatome der Estergruppe die typische Bindungslänge für C=O-Doppelbindungen von etwa 1.20 Å bzw. eine längere C-O-Einfachbindung mit ca. 1.33 Å aufweisen, gleichen sich die Bindungslängen der koordinierenden Carbonsäure mit 1.24 Å bzw. 1.26 Å einander an (Tabelle 3.19).

Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Kristallwasser und dem Sauerstoffatom O4 bzw. dem C2-Wasserstoffatom bilden die Komplexmoleküle innerhalb des Kristalls ein dreidimensionales Netzwerk aus. Dabei werden jeweils zwei Komplexmoleküle durch Ausbildung von vier Wasserstoffbrückenbindungen von zwei Wassermolekülen vernetzt. Die Bildung einer weiteren, schwächeren Wasserstoffbrücke ausgehend vom O5-Atom im Wassermolekül führt zur Verbrückung eines zusätzlichen Komplexmoleküls über das C2-Wasserstoffatom (Abbildung 3.79A). Darüber hinaus

kommt es zu $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen den Phenanthrolinringen C4-C5-C6-C7-C11-C12 und C7-C8-C9-C10-N2-C11 mit einem Centroid-Centroid-Abstand von etwa 3.94 Å und einer Verschiebung von etwa 1.13 Å (Abbildung 3.79B).

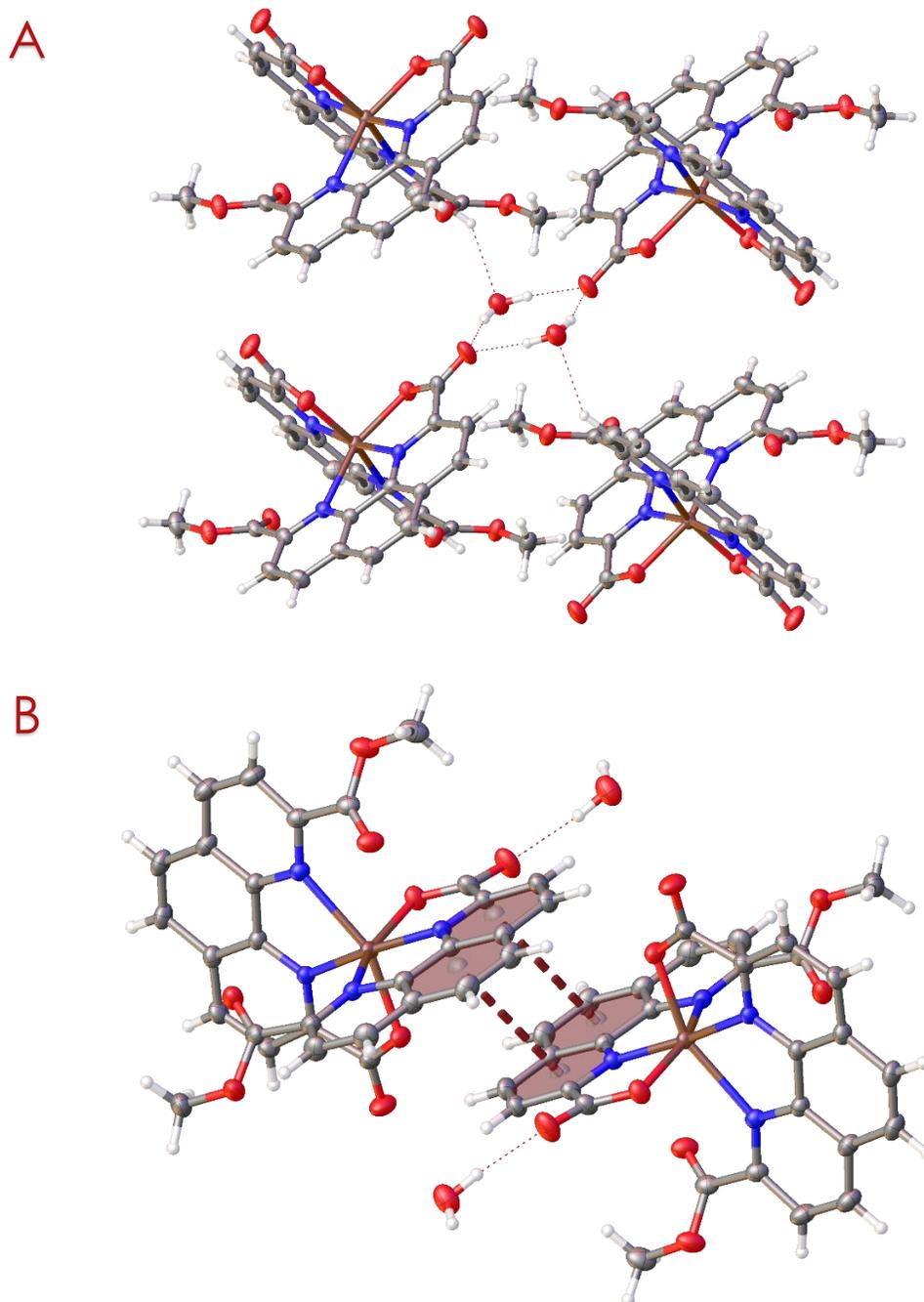


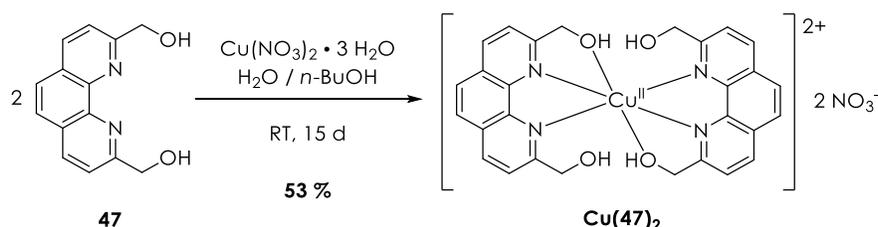
ABBILDUNG 3.79: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen von **Cu(46)₂**-Komplexmolekülen.^[89,129–131]

A: Wasserstoffbrückenbindungen (---) zwischen den Komplexmolekülen.

B: $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen (- - -) zwischen den Phenanthrolinliganden.

(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit)

Die oktaedrische Koordination des Metallzentrums findet sich auch bei der Komplexierung mit dem Alkohol **47** wieder (Schema 3.54). Aus der CHN-Analyse und der Strukturbestimmung mittels Röntgenbeugung zeigt sich jedoch, dass im Gegensatz zum Komplex **Cu(46)₂** keine Deprotonierung der Hydroxygruppen stattfindet (Abbildung 3.80).



SCHEMA 3.54: Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen durch den Dialkohol **47**.

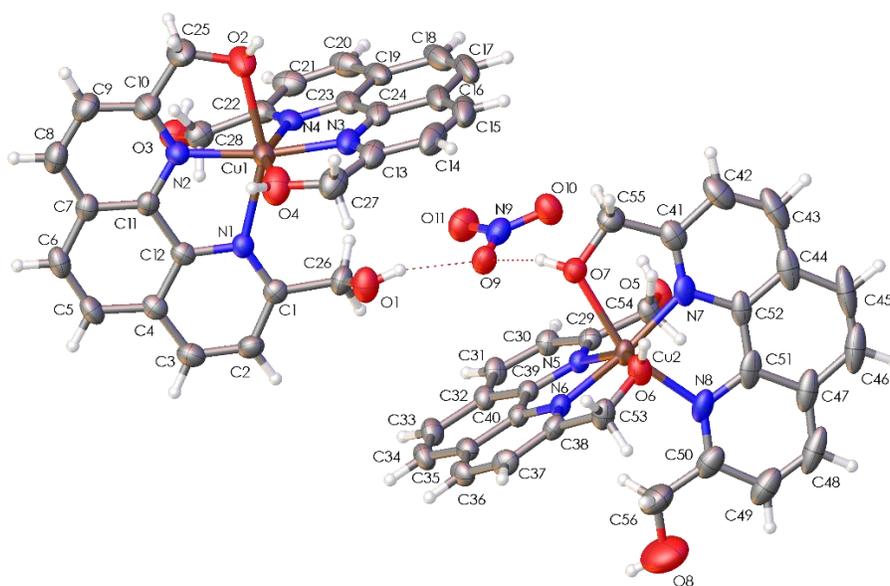


ABBILDUNG 3.80: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von **Cu(47)₂** im Kristall.^{9,[89,129–131]}
 (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit,
 Nitrat-Anionen wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt)

Der Komplex **Cu(47)₂** kristallisiert in der Raumgruppe P-1, wobei die asymmetrische Einheit aus zwei Komplexmolekülen besteht. Bedingt durch die geringe Güte des Einkristalls ist die Auflösung der Molekülstruktur sehr schlecht (Tabelle 3.20), weshalb an dieser Stelle auf eine genaue Analyse von Bindungslängen und -winkeln verzichtet wird.

⁹ Die Lösungsmittelmoleküle (6 H₂O) wurden zugunsten der Qualität der Struktur mittels Lösungsmittelmaske entfernt.^[132]

TABELLE 3.20: Kristallographische Daten für den Komplex **Cu(47)**₂.

Parameter	Cu(47) ₂	Parameter	Cu(47) ₂
Empirical formula	C ₂₈ H ₂₄ CuN ₆ O ₁₀	ρ_{calc} [g cm ⁻³]	1.485
Empirical formula (w/o mask)	C ₂₈ H ₂₄ CuN ₆ O ₁₀ • 3 H ₂ O	μ (MoK α) [mm ⁻¹]	0.798
Crystal system	triclinic	$F_{(000)}$	1372
Space group	P-1	Crystal size [mm ³]	0.75 x 0.36 x 0.30
a [Å]	13.471(4)	2θ range	2.726 – 55.2
b [Å]	14.919(4)	Index range	-17 ≤ h ≤ 17, -15 ≤ k ≤ 19, -20 ≤ l ≤ 20
c [Å]	16.145(5)	Collected / unique reflections	22133 / 12970
α [°]	99.387(5)	Data / restraints / parameters	12970 / 12 / 827
β [°]	109.027(6)	Goodness-of-fit on F^2	1.053
γ [°]	95.413(6)	R indices [$I \geq 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0718, wR ₂ = 0.2096
V [Å ³]	2988.5(15)	R indices [all data]	R ₁ = 0.1016, wR ₂ = 0.2318
Z	4	Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	1.79 / -0.76

Unverkennbar ist jedoch, dass das Kupfer(II)-Ion durch die Bindung der Sauerstoffatome wie bereits im Komplex **Cu(46)**₂ asymmetrisch koordiniert wird und dass die beiden Komplexmoleküle der ASU über Wasserstoffbrücken mit einem Nitrat-Gegenion verbrückt werden (Abbildung 3.80). Neben diesen Wasserstoffbrücken und einigen $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen ergibt sich im Kristall ein großes Netzwerk, das erkennbar wird, wenn das Kristallwasser nicht mittels einer Lösungsmittelmaske zur Verbesserung der Strukturqualität entfernt wird (Abbildung 3.81).

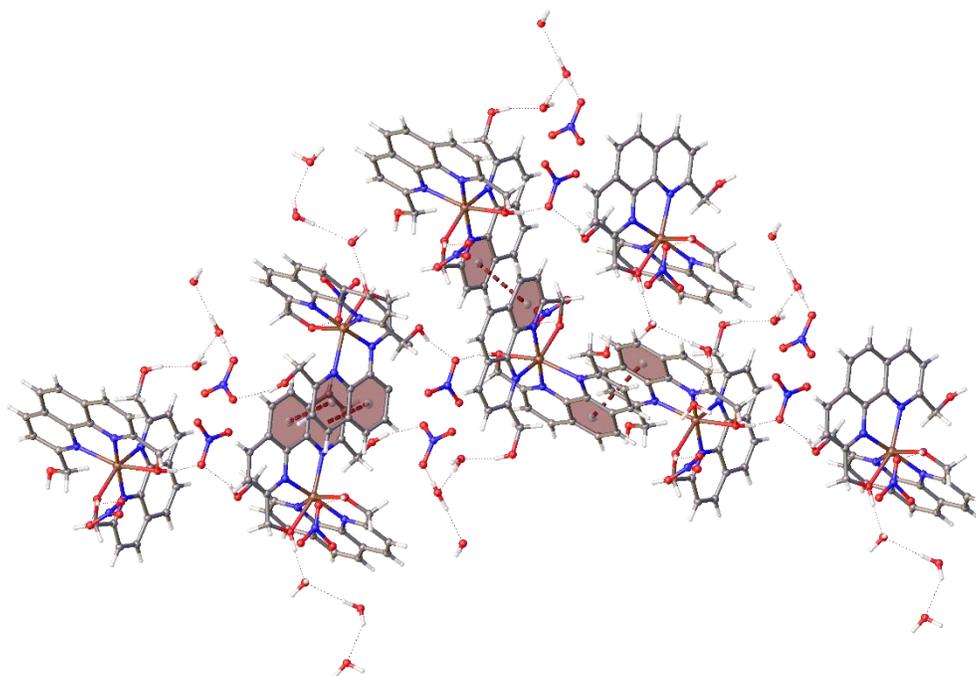
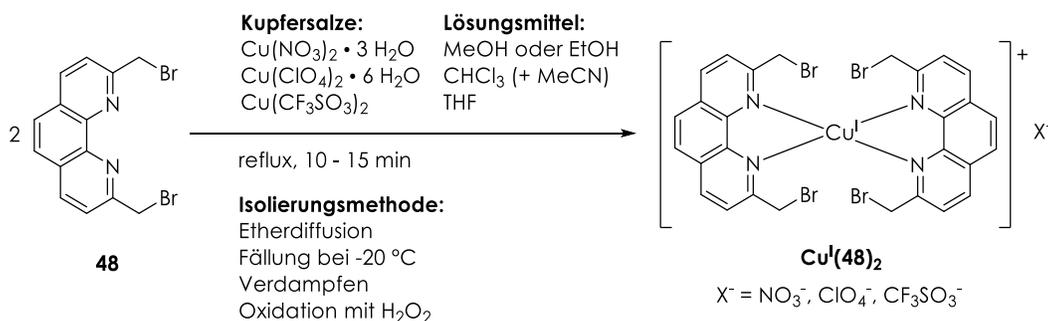


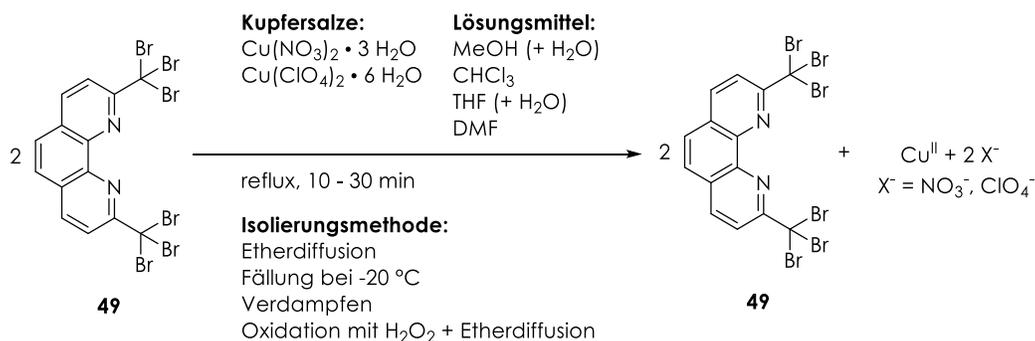
ABBILDUNG 3.81: Olex2-Ball-and-Stick-Darstellung der Wechselwirkungen von **Cu(47)**₂.^[89,129–131]
 (--- Wasserstoffbrückenbindungen, - - - $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen)
 (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, zugunsten der Übersichtlichkeit wurde die Ball-and-Stick-Darstellung gewählt)

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Komplexierungen konnten für die bromierten Liganden **48** und **49** keine entsprechenden Kupfer(II)-Komplexe isoliert werden. Die Umsetzung des Brommethylderivats **48** mit verschiedenen Kupfer(II)-Salzen führt zwar in Lösung zur Bildung eines Kupfer(II)-Komplexes, was sich optisch leicht an der typischen grün-blauen Färbung von Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexen erkennen lässt, als Produkt wurde jedoch in allen Versuchen ausschließlich der gelb-braune Kupfer(I)-Komplex isoliert (Schema 3.55).



SCHEMA 3.55: Komplexierung von Kupfer durch Brommethylphenanthrolin **48**.

Im Fall des Tribrommethylphenanthrolins **49** konnte weder der Cu^{II} - noch der Cu^{I} -Komplex dargestellt werden. Verschiedene Komplexierungsversuche zeigten, dass der sterische Anspruch der sechs Bromatome eines Liganden so groß ist, dass das Metallion von den Stickstoffatomen nicht gebunden werden kann. Da so selbst die Komplexierung durch nur einen Liganden ausgeschlossen ist, wurde stattdessen in den Versuchen jeweils nur der Ligand **49** zurückgewonnen (Schema 3.56).



SCHEMA 3.56: Umsetzung von Kupfer(II)-Ionen mit Tribrommethylphenanthrolin **49**.

3.2.3. Biologische Evaluation

Die erfolgreich synthetisierten und charakterisierten Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexe **Cu(44)₂** bis **Cu(47)₂** sollten schließlich vergleichend mit den Komplexen **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂** mithilfe verschiedener Methoden auf ihre Wechselwirkungen mit DNA sowie ihr Potential als künstliche Nucleasen untersucht werden.

3.2.3.1. Spaltung von Plasmid-DNA

Die Untersuchung der Nucleaseaktivität der 2,9-funktionalisierten Phenanthrolinkomplexe erfolgte analog zu den Versuchen der ATCUN-Peptide in Abschnitt 3.1.3.3. Dazu wurden die Komplexe zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen mit der Plasmid-DNA pBR322 für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Abbildung 3.82).

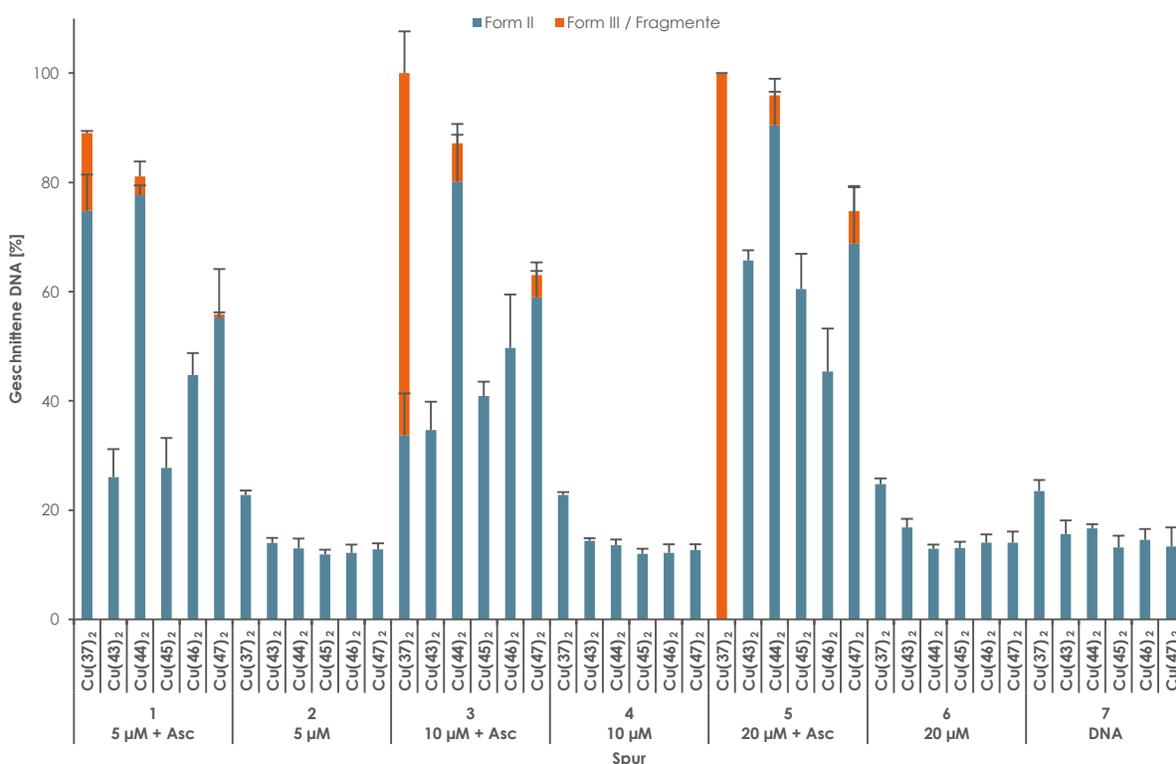


ABBILDUNG 3.82: Quantitative Auswertung der konzentrationsabhängigen DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **37** und **43** – **47** bezüglich Plasmid-DNA pBR322.^[102,107]
 (0.025 µg µL⁻¹ DNA in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der An- und Abwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

Abbildung 3.82 zeigt allgemein, dass die Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexe bei Konzentrationen zwischen 5 und 20 µM ausschließlich in der Anwesenheit des Reduktionsmittels Ascorbinsäure in der Lage sind, Plasmid-DNA zu spalten (Spuren 1, 3, 5).

Dabei ist jedoch offensichtlich, dass der Grad der Spaltung zwischen den Komplexen stark variiert. Während der unsubstituierte Komplex **Cu(37)₂**, wie erwartet, die mit Abstand höchste Aktivität aufweist, zeigt der Neocuproinkomplex **Cu(43)₂** aufgrund der bereits beschriebenen sterischen Hinderung der Methylgruppen eine deutlich schlechtere. Im Gegensatz zu Literaturergebnissen konnte aber festgestellt werden, dass zumindest eine geringe Spaltaktivität vorliegt, wobei selbst bei einer Konzentration von 20 μM lediglich etwa 49 % der DNA in die Form II überführt werden (Spur 5).^[37,279] Im Gegensatz dazu wird die DNA von **Cu(37)₂** bei gleicher Konzentration vollständig in kleinste Fragmente geschnitten. Im Vergleich mit den übrigen Komplexen lässt sich feststellen, dass sowohl der Aldehydkomplex **Cu(44)₂** als auch der Alkoholkomplex **Cu(47)₂** die DNA bereits bei 5 μM zumindest zu einem kleinen Teil in die Form III überführen (Spur 1, 3,5 % für **Cu(44)₂**, 0,6 % für **Cu(47)₂**). Eine starke Zunahme der Spaltaktivität durch Erhöhung der Konzentration wie im Fall des Komplexes **Cu(37)₂** kann dabei allerdings nicht gefunden werden (vgl. Spuren 1, 3, 5 von **Cu(37)₂** mit **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂**). Der Komplex der Carbonsäure **45** und der des Monomethylesters **46** weisen wiederum eine Nucleaseaktivität vergleichbar mit der des Neocuproinkomplexes auf (vgl. Spuren 1, 3, 5 von **Cu(43)₂** mit **Cu(45)₂** und **Cu(46)₂**). Dass dieses Ergebnis nicht Ursache der Experimentdurchführung auf verschiedenen Gelen ist, lässt sich im direkten Vergleich aller Komplexe auf einem Gel in Abbildung 3.83 erkennen. Hierbei ergibt sich für eine Komplexkonzentration von 5 μM ein identisches Spaltergebnis zur Abbildung 3.82 (Spur 1).

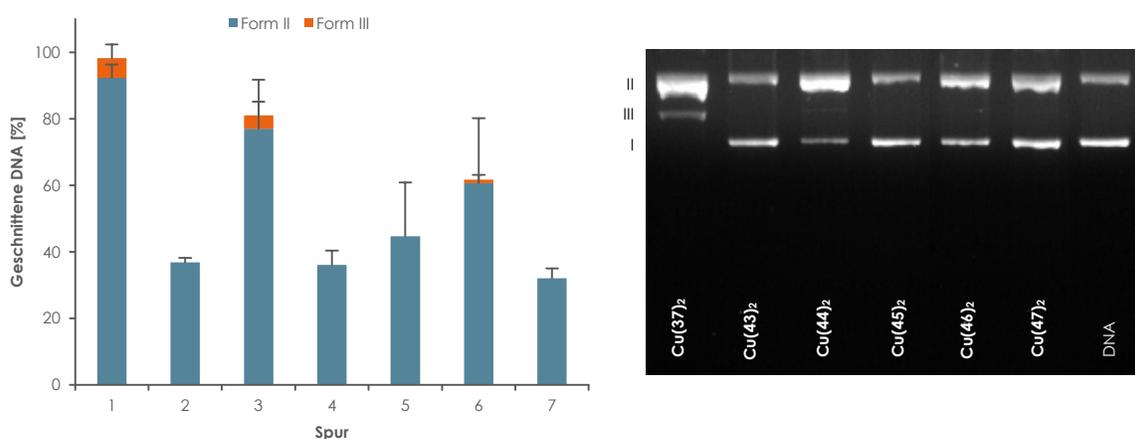


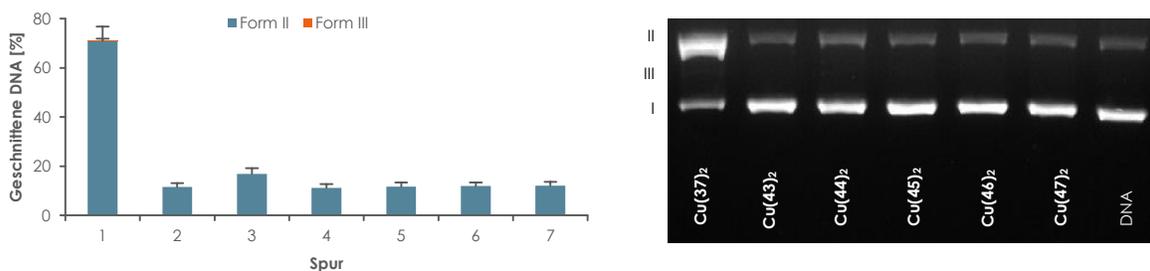
ABBILDUNG 3.83: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **37** und **43 – 47** in der Anwesenheit von Ascorbinsäure.

(5 μM Komplex und 0,025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ pBR322 in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit 0,25 mM Ascorbinsäure bei 37 °C für 1 h)

TABELLE 3.21: Vergleich der Struktur und Spaltaktivität der Kupfer(II)-Komplexe von **37** und **43 – 47**.
 (+ höher/besser, = identisch/gleich)

<i>Komplex</i>	<i>Struktur</i>	<i>Substituenten in 2,9-Position</i>	<i>Spaltaktivität im Vergleich zu Cu(43)₂</i>
Cu(37)₂	trigonal-bipyramidal	H	++
Cu(43)₂	trigonal-bipyramidal	CH ₃	
Cu(44)₂	oktaedrisch	CHO	+
Cu(45)₂	oktaedrisch	COO ⁻ / COOH	=
Cu(46)₂	oktaedrisch	COO ⁻ / COOCH ₃	=
Cu(47)₂	oktaedrisch	OH	+

Da das unterschiedliche Spaltverhalten nicht allein durch gelelektrophoretische Untersuchungen in der Abhängigkeit von Ascorbinsäure mit der Art der funktionellen Gruppen in den Positionen 2 und 9, der Komplexstruktur und -stabilität bzw. der Stärke der oktaedrischen Koordination korreliert werden kann (Tabelle 3.21), wurden weitere Untersuchungen angestellt. Zunächst sollte überprüft werden, ob die Spaltung der DNA auf einer möglichen Redoxreaktion der Cu^{II}-Zentren mit den 2,9-Substituenten beruht, d.h. ob eine Aktivierung der Komplexe in der Abwesenheit externer Reduktionsmittel möglich ist. Zusätzlich zu den Ergebnissen aus Abbildung 3.82 wurden die Komplexe daher auch bei einer Konzentration von 50 µM in der Abwesenheit von Ascorbinsäure inkubiert (Abbildung 3.84).

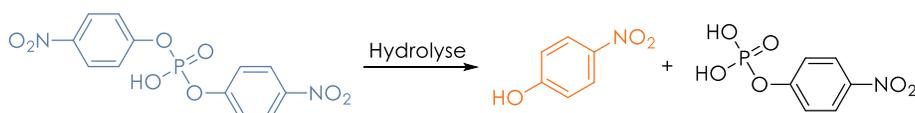

ABBILDUNG 3.84: DNA-Spaltaktivität der Cu^{II}-Komplexe von **37** und **43 – 47** ohne Aktivierungsreagenz.
 (50 µM Komplex und 0.025 µg µL⁻¹ pBR322 in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h)

Ohne Aktivierungsreagenz weist ausschließlich der Komplex **Cu(37)₂** eine deutliche Nucleaseaktivität auf (Spur 1); der Kupfer(II)-Komplex des Dialdehyds **44** immerhin noch eine minimale Aktivität (Spur 3, etwa 5 % Form II). Aufgrund der hohen Reaktivität von Aldehydgruppen ist eine Aktivierung des Komplexes durch Oxidation der Carbonylgruppen mittels Reduktion des Metallzentrums durchaus denkbar. Dem entgegen steht jedoch, dass – mit sehr wenigen Ausnahmen^[222,223] – aus der Literatur bekannt ist, dass für die DNA-Spaltung mit Cu^{II}(phen)₂-Systemen zwingend ein Oxidations- bzw. Reduktionsmittel erforderlich ist.^[37,42,275] Wie bereits im Abschnitt 3.1.5.2 angedeutet, kann die Spaltung der DNA durch den Komplex **Cu(37)₂** auf eine Interaktion mit dem Tris-HCl-Puffer zurückgeführt werden. Dies lässt sich anhand der folgenden Experimente zeigen: Ein einfacher Test zur Überprüfung der hydrolytischen Spaltung ist der BNPP-Assay.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

BNPP-Assay

Für die Untersuchung der hydrolytischen DNA-Spaltung durch natürliche Phosphodiesterasen und künstliche Nucleasen wurden bereits in den späten 1950er Jahren diverse chromogene Substrate durch Veresterung von z.B. Thymidin und Uridin synthetisiert.^[297,298] Die einfachste chromogene Modellverbindung für das Phosphatrückgrat der DNA ist jedoch Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP). Dieses bietet dabei die Vorteile, dass es leicht spaltbar ist und dass das Hydrolyseprodukt *p*-Nitrophenol UV/Vis-spektroskopisch leicht nachweisbar ist, da die Freisetzung eine Absorptionsbande bei $\lambda_{max} = 400 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12\,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erzeugt (Schema 3.57).^[299,300]



SCHEMA 3.57: Hydrolyse von BNPP zu *p*-Nitrophenol.^[299]

Die UV/Vis-Spektren in Abbildung 3.85 nach der Inkubation der Komplexe mit BNPP zeigen keine Bande für das Spaltungsprodukt *p*-Nitrophenol (vgl. violette Kurve für die Spaltung durch die Phosphodiesterase I aus dem Gift der Texas-Klapperschlange), woraus geschlossen werden kann, dass keine hydrolytische Spaltung der Phosphatbindung stattfindet.

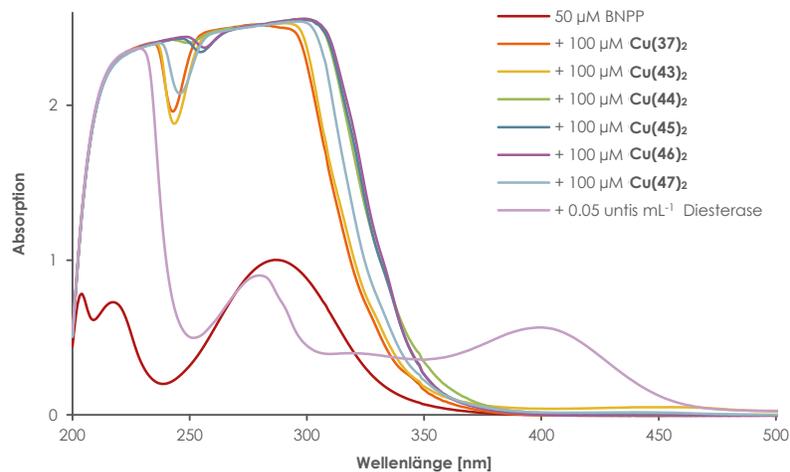


ABBILDUNG 3.85: UV/Vis-Spektren von BNPP nach der Inkubation mit den Cu^{II}-Komplexen der Liganden **37** und **43 – 47** im Vergleich mit einer Phosphodiesterase I. (100 μM Komplex bzw. 0,05 units mL⁻¹ Phosphodiesterase I mit 50 μM BNPP in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bei 37 °C für 2 h)

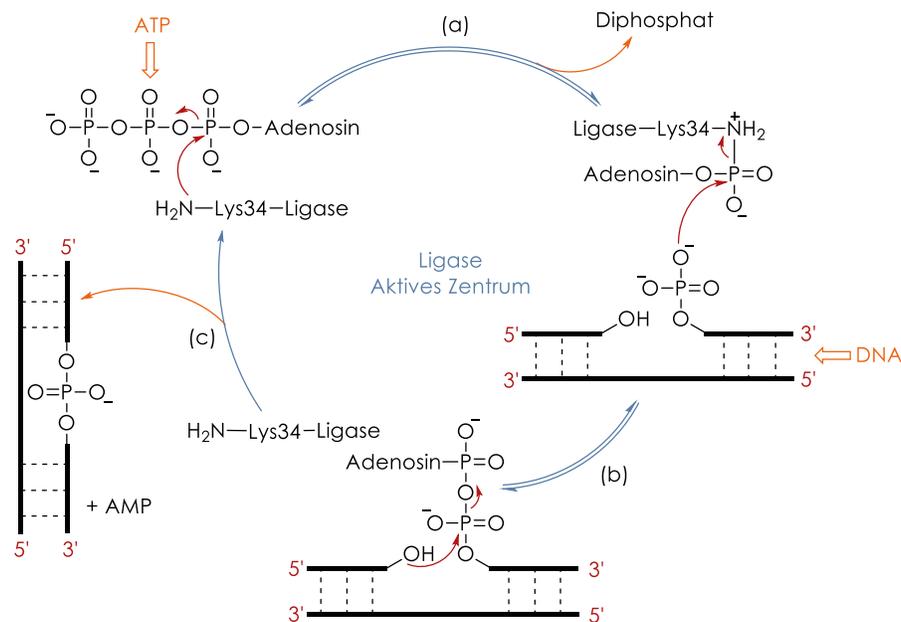
Um dennoch auszuschließen, dass die Spaltung der Plasmid-DNA dadurch begünstigt und erleichtert wird, dass das Plasmid in der *supercoiled*-Form eine starke intramolekulare Spannung aufweist, wurde ein Religationsexperiment durchgeführt.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

DNA-Religation

Die Enzymklasse der Ligasen hat in der Natur und der Genetik eine große Bedeutung, da sie in Organismen DNA-Fragmente während der diskontinuierlichen Replikation verknüpft bzw. DNA- und RNA-Strangbrüche durch Bildung neuer Phosphodiesterbindungen repariert. In der Molekularbiologie macht man sich diese Katalyse der Veresterung bei der

Rekombination von genetischem Material zunutze. Häufig wird dafür die DNA-Ligase von T4-Phagen verwendet (T4-Ligase), da sie sehr schnell und äußerst variabel bezüglich der Reaktionsbedingungen einsetzbar ist.^[301,302] Die DNA-Ligation erfolgt dabei in drei Schritten (Schema 3.58): Im ersten Schritt wird die Ligase mittels Adenosintriphosphat (ATP) als Kofaktor aktiviert (a). Das aktivierte Enzym reagiert dann mit dem 5'-Phosphat des DNA-Strangbruchs, sodass ein aktivierter Phosphatester erhalten wird (b). Durch den abschließenden Angriff der 3'-Hydroxygruppe wird die neue Phosphodiesterbindung gebildet und der Strangbruch geschlossen (c).^[303]



SCHEMA 3.58: Mechanismus der DNA-Ligation.^[303]
 (innerhalb des aktiven Zentrums, außerhalb des aktiven Zentrums)
 (ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat)

Da eine Ligation von geschnittener DNA (= Religation) nur für den Fall der Spaltung des Phosphatrückgrats (hydrolytische Spaltung), nicht aber bei der oxidativen Spaltung möglich ist, kann die Religation eindeutige Hinweise zum Spaltmechanismus liefern.

Damit für die Religation eine ausreichende Menge DNA zur Verfügung steht, wurde insgesamt ein Mikrogramm Plasmid-DNA mit dem Komplex **Cu(37)₂** für fünf Stunden inkubiert. Zum Vergleich und zur gleichzeitigen Überprüfung des Experimentes wurde zusätzlich eine DNA-Probe mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt. Dieses Enzym überführt die Plasmid-DNA durch einen hydrolytischen, sequenzspezifischen Doppelstrangsschnitt vollständig in die lineare Form III (Abbildung 3.86).

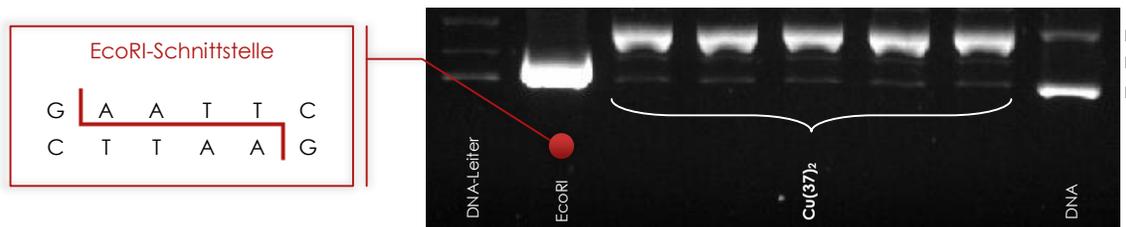


ABBILDUNG 3.86: Spaltung von Plasmid-DNA mit dem Komplex **Cu(37)₂** bzw. dem Enzym EcoRI.
(100 μM Komplex und $0.025 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ pBR322 in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37°C für 5 h)
(Spur 2: EcoRI-HF® RE-Mix®, New England Biolabs, 15 min, 37°C)

Nach der Extraktion der DNA der Formen II und III aus dem Gel wurden die Proben zur Religation mit T4-Ligase für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der gelelektrophoretischen Analyse wurde mithilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion die Ligase wieder aus den Proben entfernt.

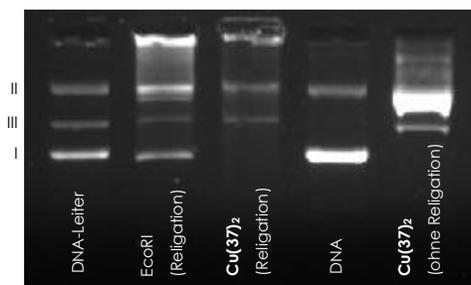
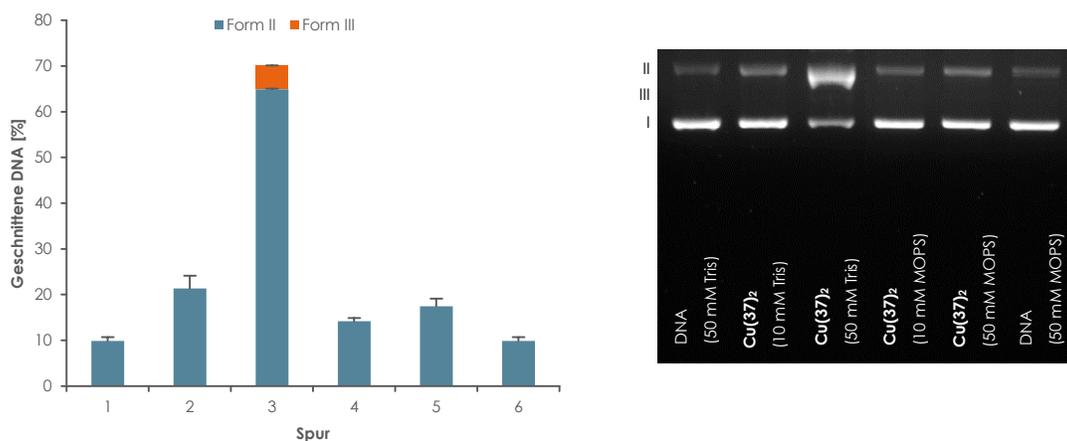


ABBILDUNG 3.87: Religation der geschnittenen Plasmid-DNA von **Cu(37)₂** bzw. EcoRI.
(Religation: Blunt/TA Ligase Master Mix, New England Biolabs, 15 min, RT)
(Spur 5: 100 μM Komplex und $0.025 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ pBR322 in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37°C für 5 h)

Das Agarose-Gel in Abbildung 3.87 zeigt, dass eine Religation der Form III-DNA, die durch das Restriktionsenzym erzeugt wurde, möglich ist (Spur 2). Das heißt, dass das Experiment unter den angegebenen Bedingungen funktioniert und dass die Ligase sowohl die Form II

als auch die Form I der DNA zurückbilden kann. Vergleicht man damit die Religation der DNA, die durch den Komplex **Cu(37)₂** geschnitten wurde, finden sich ausschließlich erneut die Banden für die zuvor isolierten Formen II und III (vgl. Spur 3 und 5). Damit kann eine hydrolytische Spaltung definitiv ausgeschlossen werden. Dass die Spaltung in Abwesenheit eines Reduktionsmittels tatsächlich vielmehr auf einer Wechselwirkung des Komplexes mit dem Tris-Puffer beruht, kann mittels eines einfachen Gelelektrophorese-Experiments nochmals verdeutlicht werden (Abbildung 3.88). Inkubiert man den Komplex **Cu(37)₂** mit Plasmid-DNA anstatt im 50 mM Tris-Puffer in nur 10 mM konzentriertem Puffer, reduziert sich der Grad der Spaltung bereits deutlich (Spuren 2 und 3). Ebenso wird die Spaltung inhibiert, wenn statt des Tris- der MOPS-Puffer verwendet wird (Spuren 4 und 5).



ABILDUNG 3.88: DNA-Spaltaktivität von 50 µM **Cu(37)₂** in verschiedenen Puffersystemen. (0.025 µg µL⁻¹ pBR322 in 50 mM / 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bzw. 50 mM / 10 mM MOPS-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 1 h)

Erklärbar wird diese Beobachtung bei der Betrachtung der Assoziationskonstanten für Cu^{II}(phen)- und Cu^{II}-Tris-Komplexe (Tabelle 3.22).

TABELLE 3.22: Assoziationskonstanten log K_A für Cu^{II}-Phenanthrolin- und Cu^{II}-Tris-Komplexe bei 25 °C. (M = Metallzentrum, L = Ligand)

Komplex	Reaktion	log K_A
$[Cu^{II}(phen)]^{2+}$ [212]	$M^{II} + L \rightleftharpoons M^{II}L$	9.10
$[Cu^{II}(phen)_2]^{2+}$ [212]	$M^{II}L + L \rightleftharpoons M^{II}L_2$	6.75
Cu^{II} -Tris ^[147]	$M^{II} + L \rightleftharpoons M^{II}L + L \rightleftharpoons M^{II}L_2$	5.34 – 6.29

Bei einem Cu^{II} : Tris-Verhältnis von 0.05 mM : 50 mM beträgt die Assoziationskonstante des Cu^{II}-Tris-Komplexes etwa 5.34 – 6.29. Damit ist sie fast ebenso groß wie die Konstante für die Reaktion von $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})]^{2+} + \text{phen} \rightleftharpoons [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$. Bei der Inkubation der Proben für die DNA-Spaltung liegt demnach ein Cu^{II}-Phenanthrolin-Tris-Komplexgemisch unterschiedlicher Zusammensetzung vor. Die DNA-Spaltung sollte daher ein Effekt der Reaktion der Kupfer(II)-Ionen mit den Hydroxygruppen von Tris sein. Dass dieses Verhalten ausschließlich für das unsubstituierte Phenanthrolin gefunden wird, kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die 2,9-Substituenten das Redoxpotential des Metallzentrums verändern, wodurch eine „Selbstaktivierung“ des Kupfer(II)-Zentrums durch Tris nicht mehr möglich wird. Aber auch die Erhöhung der Bindungsstärke der Liganden an das Metallzentrum durch die oktaedrische Koordination in den Komplexen **Cu(44)₂** bis **Cu(47)₂** kann eine wichtige Rolle spielen. Nachdem mittels der vorangegangenen Experimente ausgeschlossen werden konnte, dass das unterschiedliche Spaltverhalten der Komplexe durch Redoxreaktionen mit den Liganden verursacht wird, wurde die Wechselwirkung der Komplexe mit DNA mittels spektroskopischer Methoden genauer untersucht. Dabei wurde jeweils eine Pufferkonzentration von 10 mM gewählt, um die Störungen durch Tris zu minimieren.

3.2.3.2. DNA-Wechselwirkungen

Wie bereits in Abschnitt 3.1.5.2 gezeigt, ist die Messung von Schmelzkurven mittels UV/Vis-Spektroskopie eine sehr einfache Methode, um die Stärke der Interkalation von Molekülen zwischen die Basenpaare linearer DNA qualitativ zu bestimmen.

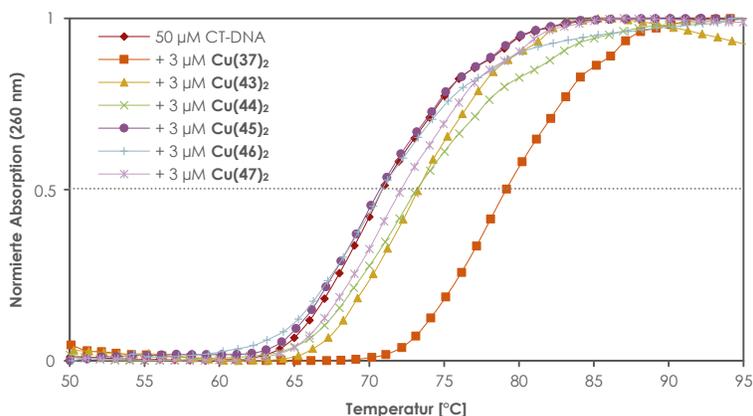


ABBILDUNG 3.89: CT-DNA-Schmelzkurven in der An- und Abwesenheit der Cu^{II}-Phenanthrolinkomplexe. (50 μM CT-DNA, 3 μM Cu^{II}-Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 50 - 95 °C (1 °C min⁻¹))

TABELLE 3.23: CT-DNA-Schmelzpunkte in der An- und Abwesenheit Cu^{II}-Phenanthrolinkomplexe. (50 µM CT-DNA, 3 µM Cu^{II}-Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 50 - 95 °C (1 °C min⁻¹))

Komplex	Substituenten	T_m [°C]	ΔT [°C]
CT-DNA	-	71.0	-
Cu(37)₂	H	79.2	8.2
Cu(43)₂	CH ₃	73.4	2.4
Cu(44)₂	CHO	73.2	2.2
Cu(45)₂	COOH / COO ⁻	70.8	-0.2
Cu(46)₂	COOCH ₃ / COO ⁻	71.0	0.0
Cu(47)₂	OH	72.2	1.2

Die Schmelzkurven in Abbildung 3.89 bzw. die Schmelzpunkte in Tabelle 3.23 zeigen, dass der Komplex **Cu(37)₂**, der die höchste DNA-Spaltaktivität aufweist, auch den größten Einfluss auf den Schmelzpunkt der CT-DNA hat (Erhöhung um 8.2 °C). Dies bedeutet, dass der Komplex am stärksten interkaliert, wodurch das Metallzentrum in große räumliche Nähe zur DNA gebracht wird und die DNA-Spaltung effektiv verlaufen kann. Die übrigen Komplexe wechselwirken hingegen wesentlich schwächer mit der DNA ($\Delta T_{max} = 2.4$ °C für **Cu(43)₂**) bzw. interkalieren gar nicht zwischen die Basen (**Cu(45)₂** und **Cu(46)₂**). Dies hängt vor allem mit der veränderten Struktur der Komplexe zusammen. Bedingt durch den sterischen Anspruch der Substituenten in den Positionen 2 und 9 (vgl. besonders **Cu(37)₂** mit **Cu(43)₂** sowie **Cu(45)₂** und **Cu(46)₂**) und der oktaedrischen Koordination des Metallzentrums (**Cu(45)₂** – **Cu(47)₂**) verändert sich die Bindung der Komplexe an die DNA und führt zu einer geringeren Fähigkeit zur Interkalation.

Die Abnahme der Bindungsstärke kann durch die Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen DNA und Komplex mittels UV/Vis-Titrationen verdeutlicht werden. Über Fluoreszenztitrationen ist es zudem recht einfach möglich, die Bindungskonstanten anhand ihrer Größe den typischen Wechselwirkungen (Interkalation oder Furchenbindung) zuzuordnen.

THEORETISCHER HINTERGRUND:**DNA-Bindungskonstanten**

Neben vielen Methoden wie NMR- und CD-Spektroskopie, Viskosimetrie oder Gelelektrophorese bieten vor allem Experimente, die auf Absorptions- oder Emissionsveränderungen beruhen, einen guten Ansatzpunkt zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen DNA und Metallkomplexen.

Bei der UV/Vis-Titration macht man sich zunutze, dass die ausgeprägten UV-Absorptionen von Metallkomplexen mit aromatischen Liganden bei der Bindung an DNA sowohl eine bathochrome (Rotverschiebung) als auch hypochrome (Absorptionsabnahme) Verschiebung erfahren (Abbildung 3.90).

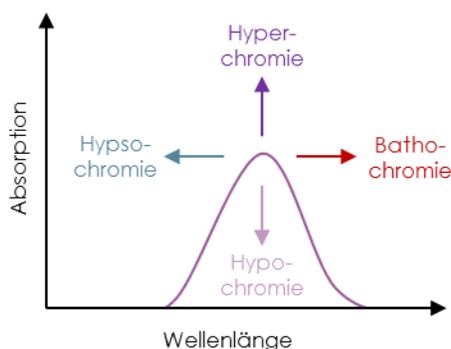


ABBILDUNG 3.90: Veränderungen in der Lage und Intensität von UV/Vis-Absorptionsbanden.^[304]

Ursache der Rotverschiebung ist dabei die elektronische Wechselwirkung des π -Systems der Nucleobasen mit den Liganden der Komplexe. Dies führt zu einer Verringerung der Energie zwischen HOMO und LUMO und damit zu einem bathochromen Effekt. Das heißt also, je ausgeprägter dieser Effekt ist, desto stärker interkaliert der Metallkomplex zwischen die DNA-Basen.^[305–307] Der hypochrome Effekt ergibt sich hingegen – umgekehrt zur Messung von DNA-Schmelzkurven – durch eine Verringerung der Lichtabsorption durch den Energiegewinn

bei der Ausbildung zusätzlicher Stapelwechselwirkungen mit den aromatischen Liganden.^[220,304] Nach der Methode von DONALD M. CROTHERS kann die Hypochromie bei der Titration unter Zuhilfenahme der Extinktionskoeffizienten unter anderem dazu verwendet werden, die intrinsische Bindungskonstante K_{int} des Metallkomplexes zu ermitteln.^[304,308] Für die Bestimmung der Konstanten werden die Konzentrationen der DNA $c(DNA)$ und des untersuchten Komplexes $c(Komplex)$ sowie die Absorptionen A für jede Einzelmessung benötigt, da sich K_{int} nach Formel **(F2-1)** aus dem LAMBERT-BEERSchen und dem Massenwirkungsgesetz ergibt:

$$\frac{c(DNA)}{\Delta\varepsilon_{af}} = \frac{1}{\Delta\varepsilon} * \frac{1}{K_{int}} + \frac{1}{\Delta\varepsilon} * c(DNA) \quad \text{(F2-1)}$$

mit $\Delta\varepsilon_{af}$ vgl. **(F2-4)** und $\Delta\varepsilon$ vgl. **(F2-5)**

Dabei muss jedoch gelten, dass die Konzentration des Komplex-DNA-Addukts, d.h. die Konzentration des gebundenen Komplexes in der Lösung, wesentlich kleiner ist als die Konzentration der freien DNA ($\frac{c(Komplex-DNA-Addukt)}{c(DNA)} \approx 0$).

Die benötigten Extinktionskoeffizienten können dann nach den Formeln **(F2-2)** bis **(F2-5)** errechnet werden.

$$\varepsilon_f = \frac{A_0}{c_0(Komplex)} \quad \text{(F2-2)}$$

Extinktionskoeffizient des Komplexes in der Abwesenheit von DNA
(extinction coefficient of the **free** complex)

$$\varepsilon_a = \frac{A_x}{c_x(Komplex)} \quad \text{(F2-3)}$$

Offensichtlicher Extinktionskoeffizient des Komplexes bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen
(**apparent** extinction coefficient)

$$\Delta\varepsilon_{af} = \varepsilon_a - \varepsilon_f \quad \text{(F2-4)}$$

Unterschied zwischen freiem und offensichtlichem Extinktionskoeffizienten

$$\Delta\varepsilon = |\varepsilon_f - \varepsilon_b| \Leftrightarrow \varepsilon_b = \frac{1}{m} + \varepsilon_f \quad \text{(F2-5)}$$

Unterschied zwischen gebundenem und freiem Extinktionskoeffizienten,
wobei ε_b = Extinktionskoeffizient des vollständig gebundenen (*fully bound*)
Komplexes und m = Anstieg der Geraden (vgl. **(F2-6)**)

Mittels der Auftragung von $\frac{c(DNA)}{\Delta\varepsilon_{af}}$ über $c(DNA)$ erhält man nach
Gleichung **(F2-1)** eine Gerade mit der Steigung m und dem
Ordinatenschnittpunkt n , wobei gilt:

$$m = \frac{1}{\Delta\varepsilon} \quad n = \frac{1}{\Delta\varepsilon} * \frac{1}{K_{int}} \quad \text{(F2-6)}$$

Über die Bestimmung von m und n durch einen linearen Fit der
Messdaten ergibt sich die Bindungskonstante schließlich zu

$$K_{int} = \frac{m}{n} \quad \text{(F2-7)}$$

Da es sich hierbei um ein stark vereinfachtes Modell zur
Bestimmung von K_{int} handelt, das für das lineare Fitting
beispielsweise Parameter wie die Anzahl der Bindungsstellen
vernachlässigt, eignet es sich vor allem für Komplexe, die eine
hohe Bindungskonstante von $> 10^4 \text{ M}^{-1}$ aufweisen.^[304,309]

Die Bestimmung der Bindungskonstante über Fluoreszenz ist
dagegen wesentlich genauer. Ein typisches Verfahren für die
Bestimmung von K_{app} (*apparent*) beruht auf der Veränderung
der Fluoreszenz von Ethidiumbromid bei der Interkalation in die
DNA (Verdrängungsassay) (vgl. Abschnitt 3.1.3.3).^[152,153] Bei der
Titration von ethidiumbromidgesättigter CT-DNA kann anhand
der Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der
Verdrängung des Interkalators durch die zu untersuchenden
Komplexe bei statischer Fluoreszenzlöschung über die lineare

Stern-Volmer-Gleichung **(F3-1)** die Bindungskonstante bestimmt werden.^[310-312]

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} * c(Komplex) \quad \text{(F3-1)}$$

mit I_0 = Intensität in der Abwesenheit des Quenchers, I = Intensität in der Anwesenheit des Quenchers und K_{SV} = Stern-Volmer-Konstante

Über die Auftragung von $\frac{I_0}{I}$ über $\frac{c(Komplex)}{c(DNA)}$ liefert der Anstieg der Geraden die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} . Mithilfe von K_{SV} und der Gleichung **(F3-1)** ergibt sich schließlich über den Zusammenhang

$$K_{EtBr} * c(EtBr) = K_{app} * c(Komplex)_{50} \quad \text{(F3-2)}$$

mit K_{EtBr} = Bindungskonstante von Ethidiumbromid ($= 10^7 \text{ M}^{-1}$)^[313] und $c(EtBr)$ = eingesetzte Konzentration von Ethidiumbromid

die Bindungskonstante, wenn $c(Komplex)_{50}$ die Konzentration des Quenchers ist, bei der genau 50 % der ursprünglichen Ethidiumbromidfluoreszenz ausgelöscht sind. Für die Gleichung **(F3-1)** gilt dann entsprechend:

$$2 = 1 + K_{SV} * c(Komplex)_{50} \Leftrightarrow \frac{1}{K_{SV}} = c(Komplex)_{50} \quad \text{(F3-3)}$$

Die Art der DNA-Bindung kann mittels K_{app} wie folgt eingeteilt werden (Tabelle 3.24):^[314-317]

TABELLE 3.24: Einteilung der DNA-Bindung mittels der Bindungskonstante.^[314-317]

$K_{app} [\text{M}^{-1}]$	Bindungsmodus
$> 10^6$	Interkalation
10^6	partielle Interkalation
10^5-10^4	Furchenbindung / elektrostatische Wechselwirkung

Entsprechend der theoretischen Einführung wurden für die Komplexe **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂** bis **Cu(47)₂** die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung mit CT-DNA sowohl über UV/Vis als auch über Fluoreszenz bestimmt. Abbildung 3.91 und Abbildung 3.92 zeigen diese Bestimmung beispielhaft am Phenanthrolinkomplex **Cu(37)₂** (a) und am Neocuproinkomplex **Cu(43)₂** (b), wobei für die UV/Vis-Messung jeweils der $\pi - \pi^*$ -Übergang zur Auswertung verwendet wurde, da sich der bathochrome und hypochrome Effekt an dieser starken Bande generell am besten nachvollziehen lassen. Die Tabelle 3.25 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse für alle Komplexe.

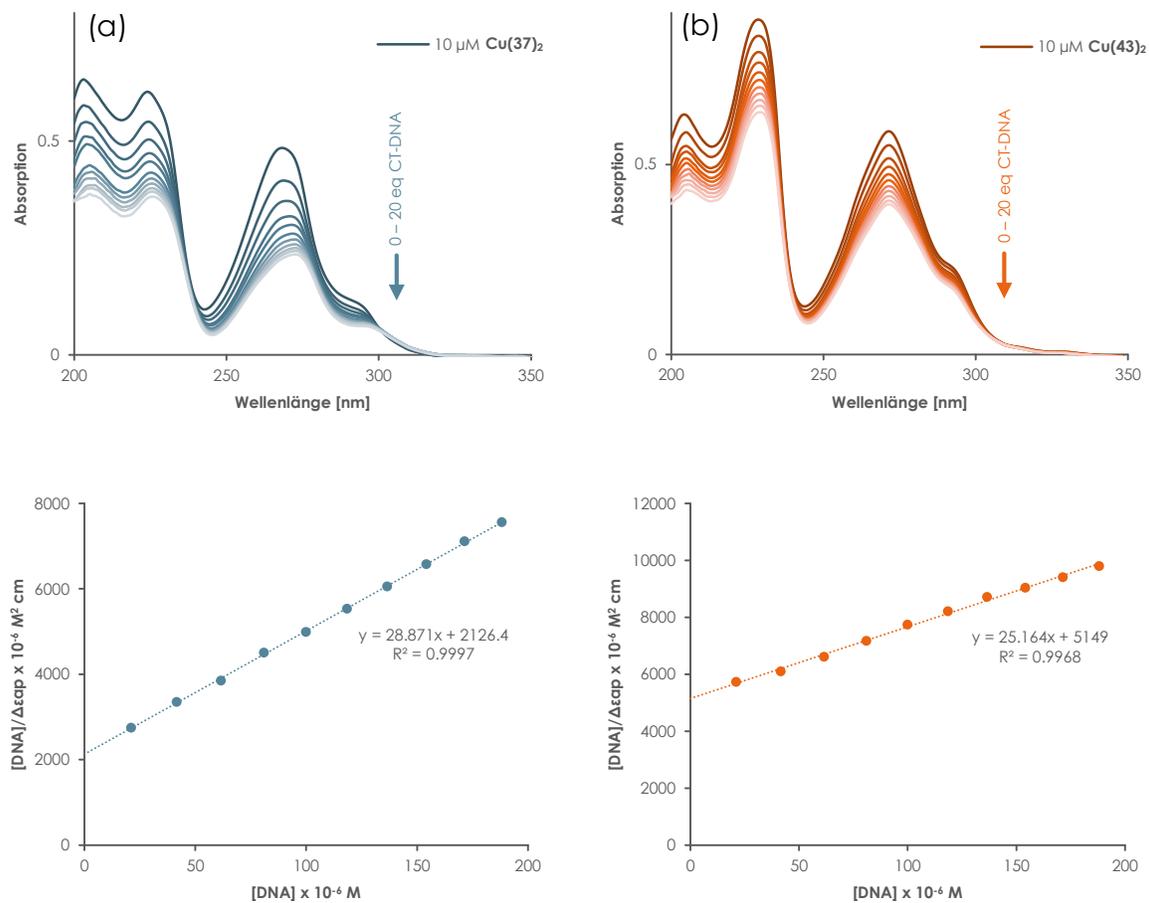


ABBILDUNG 3.91: UV/Vis-Spektren von **Cu(37)₂** (a) und **Cu(43)₂** (b) bei steigender CT-DNA-Konzentration zur Bestimmung der Bindungskonstanten K_{int} . (10 µM Komplex mit 0 – 20 eq CT-DNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4)

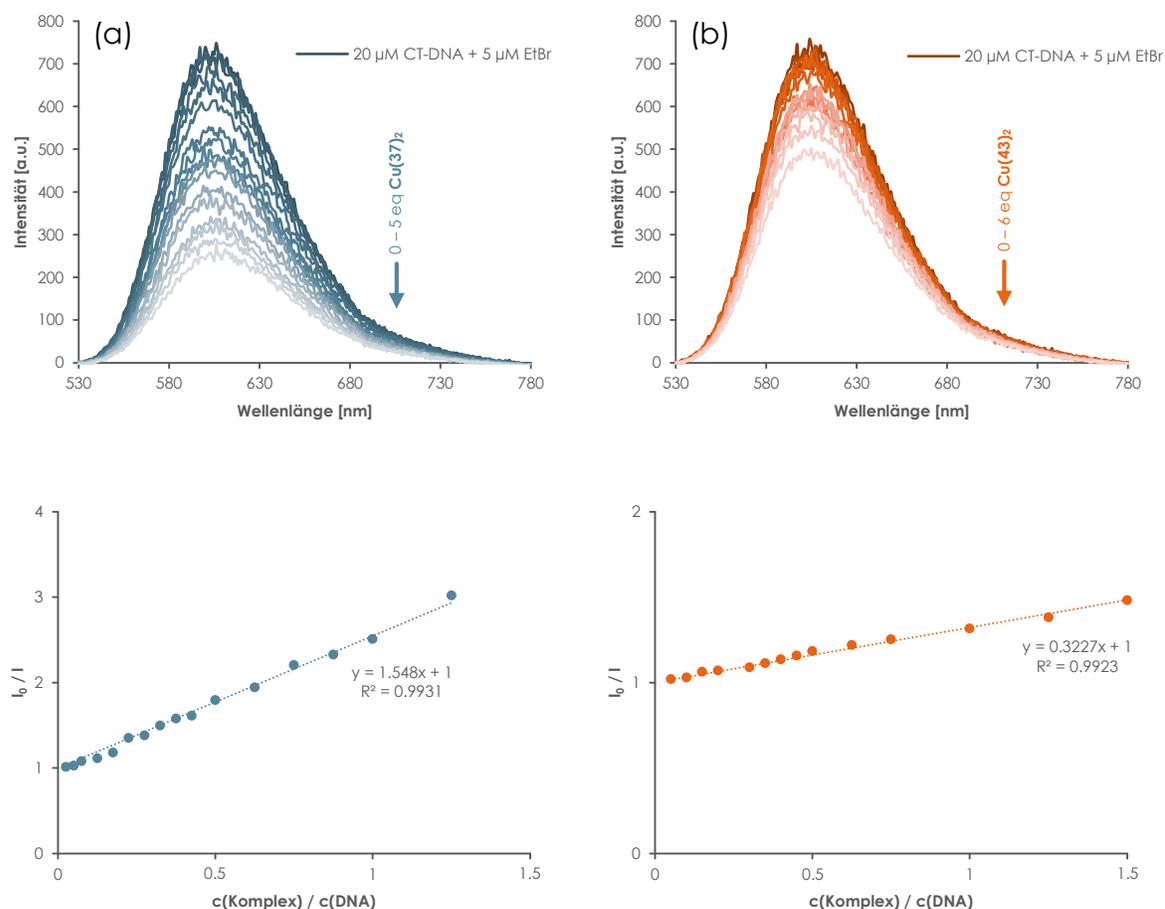


ABBILDUNG 3.92: Fluoreszenzspektren von Ethidiumbromid mit CT-DNA bei steigender Konzentration von **Cu(37)₂** (a) und **Cu(43)₂** (b) zur Bestimmung der Bindungskonstanten K_{app} . (20 μM CT-DNA mit 5 μM Ethidiumbromid und 0 – 5 bzw. 6 eq Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4)

TABELLE 3.25: Zusammenfassung der DNA-Bindungskonstanten für **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂** bis **Cu(47)₂**.

Komplex	UV/Vis	Fluoreszenz		
	K_{int} [M^{-1}]	K_{SV}	$c(\text{Komplex})_{50}$ [μM]	K_{app} [M^{-1}]
Cu(37)₂	$(1.34 \pm 0.13) \times 10^4$	1.55	12.9	$(3.87 \pm 0.15) \times 10^6$
Cu(43)₂	$(5.46 \pm 1.15) \times 10^3$	0.32	62.0	$(8.07 \pm 0.12) \times 10^5$
Cu(44)₂	$(7.89 \pm 0.26) \times 10^3$	0.33	60.7	$(8.24 \pm 0.10) \times 10^5$
Cu(45)₂	$(5.40 \pm 0.35) \times 10^2$	0.04	518.9	$(9.63 \pm 0.18) \times 10^4$
Cu(46)₂	$(9.26 \pm 0.13) \times 10^2$	0.03	762.3	$(6.55 \pm 0.19) \times 10^4$
Cu(47)₂	$(8.04 \pm 1.50) \times 10^3$	0.22	90.8	$(5.51 \pm 0.16) \times 10^5$

Obwohl sich die Bindungskonstanten aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden in ihrer Größenordnung stark unterscheiden, ergibt sich in beiden Fällen der gleiche Trend für die Stärke der Bindung der Komplexe an die CT-DNA. Die Bindungskonstanten fallen dabei in der Reihenfolge

- **$\text{Cu(37)}_2 > \text{Cu(43)}_2 \approx \text{Cu(44)}_2 \approx \text{Cu(47)}_2 > \text{Cu(45)}_2 \approx \text{Cu(46)}_2$,**

wobei für den Phenanthrolinkomplex **Cu(37)_2** gesagt werden kann, dass er zwar am stärksten zwischen die Basen der DNA interkaliert, die Größe der Bindungskonstante jedoch im Vergleich mit Literaturwerten zeigt, dass es sich nur um eine partielle Interkalation handelt.^[318–321] Starke Interkalatoren wie beispielsweise Ethidiumbromid weisen dagegen wesentlich größere Bindungskonstanten auf ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ für UV/Vis^[153] bzw. $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ für Fluoreszenz^[313]).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.5.2, wo keine Korrelation zwischen DNA-Spalteffizienz und DNA-Affinität gefunden wurde, lässt sich für die Komplexe der 2,9-disubstituierten Phenanthroline beim Vergleich der Bindungsstärke mit der Spaltaktivität bezüglich Plasmid-DNA eindeutig feststellen, dass eine höhere Affinität zur DNA auch zu einer stärkeren Spaltaktivität führt. So weisen die Komplexe **Cu(45)_2** und **Cu(46)_2** mit Bindungskonstanten in der Größenordnung von 10^2 M^{-1} bzw. 10^4 M^{-1} die bei weitem kleinsten Konstanten auf und zeigen gleichzeitig auch die geringste DNA-Spaltung. Mithilfe der Einteilung aus Tabelle 3.24 kann gesagt werden, dass die Änderung der Wechselwirkung mit DNA von partieller Interkalation zu Furchenbindung bzw. elektrostatischer Wechselwirkung mit einem Verlust der Nucleaseaktivität einhergeht. Die verringerte Interkalationsfähigkeit der Komplexe **Cu(43)_2** bis **Cu(47)_2** kann dabei allgemein sowohl auf den im Gegensatz zum Komplex **Cu(37)_2** größeren sterischen Anspruch der Liganden als auch auf die Struktur der Komplexe selbst zurückgeführt werden. Die sehr schwache Wechselwirkung der Komplexe **Cu(45)_2** und **Cu(46)_2** kann zusätzlich dadurch erklärt werden, dass es zu einer möglichen elektrostatischen Abstoßung zwischen den Carboxylatgruppen und dem Phosphatrückgrat der DNA kommt. Betrachtet man dazu noch die Fehlerwerte der UV/Vis-Bindungskonstanten, fällt auf, dass besonders die Werte für die Komplexe **Cu(43)_2** und **Cu(47)_2** verhältnismäßig große Fehler aufweisen. In den UV/Vis-Spektren der Komplexe zeigt sich, dass dies vor allem auf eine schnelle Reduktion der Kupfer(II)-Ionen zurückgeführt werden kann (Abbildung 3.93). Daraus ergibt sich aber gleichzeitig auch für die Komplexe **Cu(44)_2** bis

Cu(47)₂, dass, obwohl alle eine oktaedrische Struktur aufweisen, die Koordination durch die 2,9-Substituenten unterschiedlich stark erfolgt. Je stärker das Kupfer(II)-Ion durch die Sauerstofffunktionalisierungen gebunden wird, d.h. je stabiler der Komplex ist, desto schwieriger bzw. langsamer ist die Reduktion zu Kupfer(I) und damit die Möglichkeit der Komplexe als Nuclease zu fungieren.

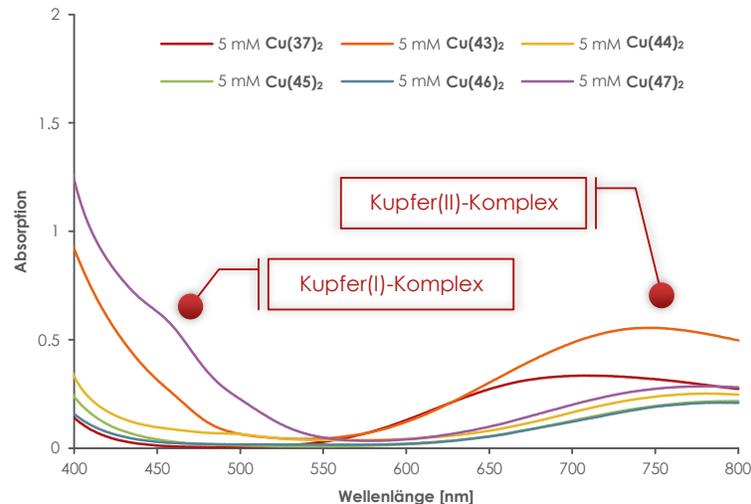


ABBILDUNG 3.93: UV/Vis-Spektren der Komplexe **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂ – Cu(47)₂**.
(5 mM Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4)

Unabhängig von der Bindungskonstante, die eine hohe Aussagekraft vor allem für stark interkalierende Komplexe besitzt, können mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) zusätzlich die Auswirkungen der Wechselwirkungen der Komplexe auf die dreidimensionale Struktur der DNA untersucht werden.

THEORETISCHER HINTERGRUND:

Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Dichroismus-Spektroskopie kann zur Charakterisierung von Molekülen genutzt werden, wobei die Eigenschaft einiger Moleküle und Materialien ausgenutzt wird, dass unterschiedlich polarisiertes Licht verschieden stark absorbiert wird (Dichroismus).

Der Circular dichroismus ist dabei eine spezielle Form dieser Eigenschaft, die es erlaubt, die Stereochemie chiraler Moleküle anhand ihres Absorptionsverhaltens gegenüber zirkular polarisiertem Licht aufzuklären, da im Gegensatz zu achiralen Verbindungen die Differenz aus der Absorption ΔA von rechtszirkular (A_R) zu linkszirkular (A_L) polarisiertem Licht ungleich null ist. Das Phänomen der Änderung des Circular dichroismus' tritt dabei nur in der Nähe der Absorptionsbanden chiraler Stoffe auf und wurde 1985 erstmals von *AIMÉ COTTON* beschrieben. Dieser sogenannte Cotton-Effekt führt in der Absorptionsregion zur Änderung der Magnitude der optischen Drehung. Am Absorptionsmaximum überquert sie schließlich den Nullwert und variiert anschließend in umgekehrter Richtung erneut mit der Wellenlänge. Daraus ergeben sich in einem CD-Spektrum sowohl positive als auch negative Banden (Abbildung 3.94).^[322,323]

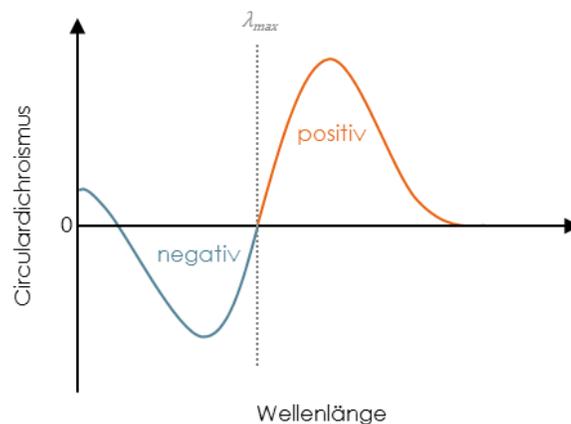


ABBILDUNG 3.94: Schematisches CD-Spektrum.^[322,323]

Die Größe des Circular dichroismus' kann über das *LAMBERT-BEERS*-Gesetz nach der Gleichung **(F4-1)** als Differenz der Extinktionskoeffizienten in [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] angegeben werden (molarer Circular dichroismus).^[322,324]

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \varepsilon * c * d \quad \text{(F4-1)}$$

mit $\Delta \varepsilon = (\varepsilon_L - \varepsilon_R)$ und A_L bzw. A_R = Absorption des links bzw. rechts polarisierten Lichts sowie den zugehörigen Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R

In vielen Fällen wird der Dichroismus jedoch in Grad der Elliptizität Θ angegeben, der aus der gemessenen Polarisationsänderung in Radiant durch Multiplikation mit $\frac{180}{\pi}$ zu

$$\Theta = 32.98 * \Delta A \quad \text{(F4-2)}$$

erhalten werden kann und seinen Ursprung in der Polarisationselliptizität und dem Winkel zwischen der größten und kleinsten Magnitude des elektrischen Feldvektors hat.^[324-326]

Da es sich auch bei der DNA um ein chirales Molekül handelt, liefert die CD-Spektroskopie typische Spektren, die sich je nach Form der DNA mehr oder weniger stark voneinander unterscheiden (Abbildung 3.95)

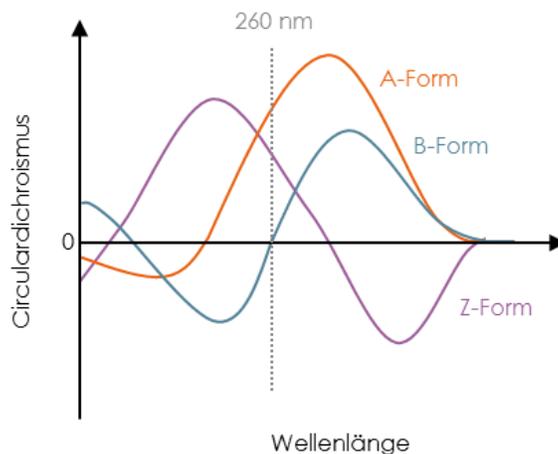


ABBILDUNG 3.95: Schematische Darstellung der CD-Spektren der häufigsten DNA-Formen A, B und Z.

Aufgrund der unterschiedlichen dreidimensionalen Strukturen der drei häufigsten DNA-Formen, die in Abbildung 3.96 gezeigt sind, unterschieden sich auch die CD-Spektren.^[327–329]

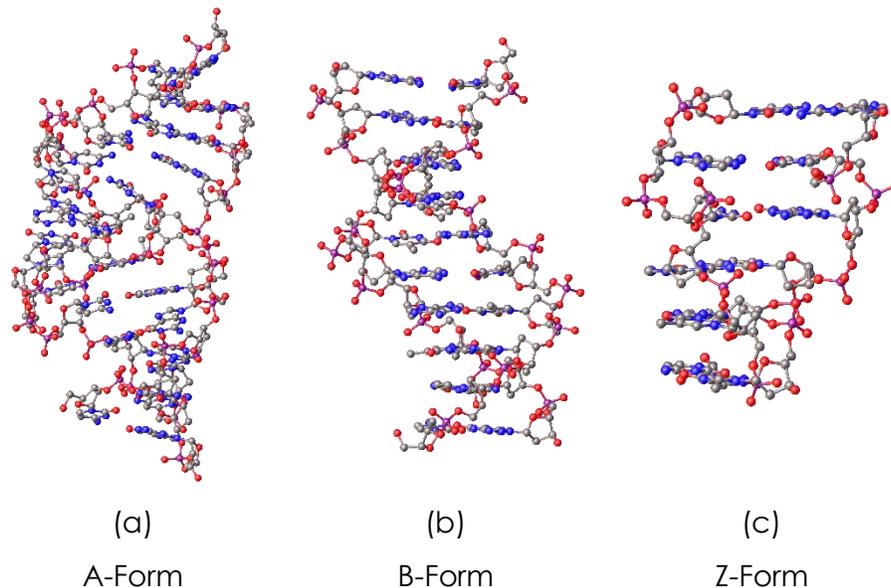


ABBILDUNG 3.96: Molekülstrukturen der drei DNA-Formen A, B und Z im Kristall.^{10,[89,327–329]}
(Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor)

Die B-DNA zeigt dabei zwei prominente Banden in der Nähe des Absorptionsmaximums von 260 nm in einem Wellenlängenbereich von 220 - 320 nm. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass die positive Bande bei etwa 275 nm durch die Basenstapelung und die negative Bande bei etwa 245 nm aufgrund der Helizität der DNA-Doppelhelix hervorgerufen wird (Abbildung 3.95, blaue Kurve).^[323,330–335] Da die Basenpaare in der B-Form orthogonal zur Helixachse stehen, ist die Chiralität dieser Form eher gering und die positive CD-Bande hat dementsprechend eine geringe Intensität. Im Vergleich dazu ist

¹⁰ Die Molekülstrukturen der drei DNA-Formen wurden den Quellen [327–329] entnommen:

A-Form: N. Gautham *et al.*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 407, 307-312.

B-Form: N. Niimura *et al.*; *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3017-3024.

Z-Form: N. Narayana *et al.*; *Biochemistry* **2006**, 45, 1200-1211.

Die Grafiken wurden mittels des Programms Olex2 von OlexSys Ltd. erstellt.^[89]

die A-DNA zwar kompakter, jedoch stehen die Basenpaare nicht senkrecht zur Achse, sodass die Intensität der positiven CD-Bande deutlich zunimmt (Abbildung 3.95, orange Kurve). Während die Spektren der A- und B-Form in ihren Grundzügen die gleichen Charakteristika aufgrund der rechtsgängigen Helixdrehrichtung aufweisen, stellt das Spektrum der Z-DNA annähernd eine Inversion dessen dar, da hier die Drehrichtung linksgängig ist. Damit wird in diesem Fall für die Basenstapelung eine negative und für die Helizität entsprechend eine positive Bande erhalten (Abbildung 3.95, violette Kurve).^[323,330,332–334]

Da mithilfe der Veränderung der positiven und negativen CD-Banden eine grobe Aussage darüber getroffen werden kann, inwiefern die dreidimensionale Struktur der DNA durch beispielsweise Metallkomplexe beeinflusst wird, wurden die CD-Spektren von CT-DNA in der An- und Abwesenheit der Komplexe **Cu(37)₂** bzw. **Cu(43)₂** bis **Cu(47)₂** aufgenommen (Abbildung 3.97).

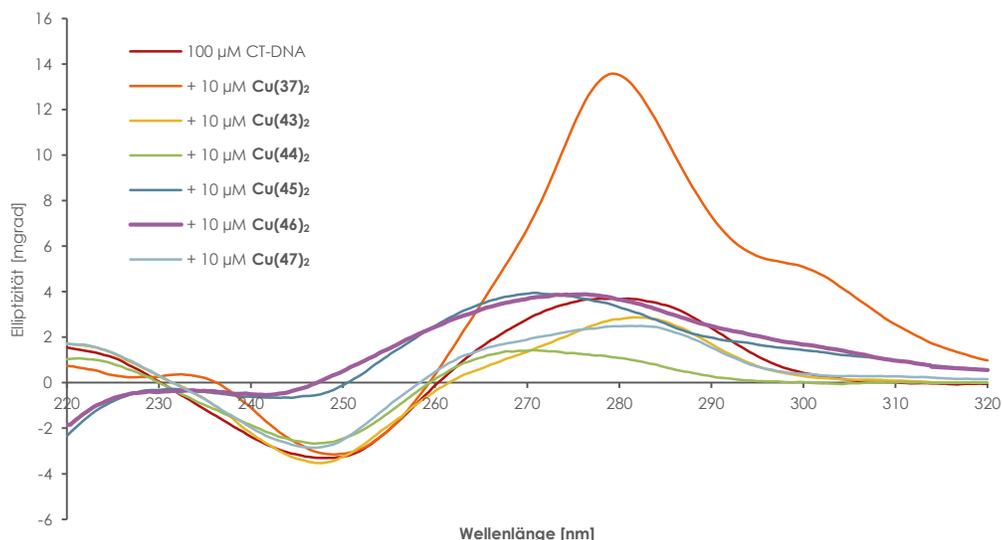


ABBILDUNG 3.97: CD-Spektren von CT-DNA in der An- und Abwesenheit der Komplexe **Cu(37)₂** und **Cu(43)₂ – Cu(47)₂**.

(100 µM CT-DNA mit 10 µM Komplex in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 nach 30 min bei Raumtemperatur)

Abbildung 3.97 zeigt deutlich, dass von den Komplexen **Cu(37)₂**, **Cu(43)₂**, **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** die negative Bande im CD-Spektrum nur leicht (Verschiebung durch **Cu(37)₂** bzw. Abnahme der Bande durch **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂**) bis gar nicht (**Cu(43)₂**) beeinflusst wird. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung der Komplexe **Cu(43)₂**, **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** mit der CT-DNA kaum Einfluss auf die Helixachse der DNA hat. Die positive Bande der Basenstapelung wird dagegen deutlicher verändert. Während jedoch der Komplex **Cu(37)₂** einen starken Anstieg der Elliptizität bewirkt, wird diese von den anderen Komplexen vermindert. Da es zu keiner Verschiebung des Maximums der positiven und einer nur kleinen Veränderung der negativen Bande kommt, ist die Änderung keine Ursache einer Transformation der B-Form in die A-Form der DNA, sondern kann vor allem auf die Interkalation des Komplexes **Cu(37)₂** zurückgeführt werden, wodurch es zu einer Stabilisierung der B-Form der DNA kommt. Umgekehrt kann aus der leichten Verminderung der positiven Bande durch die Komplexe **Cu(43)₂**, **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** bzw. der Abnahme der negativen Bande durch die Komplexe **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** geschlossen werden, dass die Basenstapelung destabilisiert wird.^[323,335–338] Wie bereits durch die Bestimmung des DNA-Schmelzpunktes und der Bindungskonstanten angenommen, lässt auch die Interpretation des CD-Spektrums eine geringe Interkalation vermuten, wobei beachtet werden muss, dass kleine Änderungen im Spektrum auch bei elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. Furchenbindung auftreten können.^[335,339–341]

Des Weiteren zeigt das Spektrum des Komplexes **Cu(37)₂** eine neue Bande bei etwa 300 nm. Zur Erklärung dieser Bande findet sich in der Literatur einerseits der Hinweis, dass DNA selbst keinerlei Absorptionen über 300 nm zeigt und die Bande daher möglicherweise durch kondensierte DNA-Moleküle erzeugt wird. Diese bilden Partikel, die das eingestrahelte Licht streuen.^[323] Aus diesem Grund sollte die Interpretation des Spektrums mit Vorsicht betrachtet werden. Andererseits kann die im Vergleich zur CT-DNA veränderte Form der positiven Bande der Komplexe **Cu(37)₂**, **Cu(43)₂**, **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** auch aus der Überlappung der $\pi - \pi^*$ -Absorption der Liganden mit der Absorption der DNA unterhalb von 300 nm resultieren (vgl. Abbildung 3.91), woraus sich ein induzierter Circular dichroismus ergibt.^[339]

Besonders auffällig in Abbildung 3.97 sind jedoch die Spektren für die Komplexe **Cu(46)₂** und **Cu(47)₂**. Obwohl die vorherigen Untersuchungen keine Wechselwirkung mit der DNA (keine Spaltaktivität, keine Veränderung des Schmelzpunktes, sehr geringe Bindungskonstanten) zeigen konnten, finden sich starke Veränderungen der DNA-Struktur

in den CD-Spektren. Hierbei kommt es neben einer minimalen Zunahme der positiven Bande vor allem zu einer Verschiebung des Maximums zu kleineren Wellenlängen und zu einer deutlichen Reduzierung der negativen Bande. Zusammen mit dem zunehmenden Abfall der Kurven zwischen 220-230 nm deuten die Ergebnisse auf eine Änderung der DNA-Struktur von der B-Form zur A-Form hin.^[323] Da die Elliptizitätszunahme der positiven Bande jedoch sehr gering ausfällt, könnten die Änderungen auch lediglich durch eine Entwindung der DNA zustande kommen. Eine eindeutige Aussage kann damit an dieser Stelle nicht getroffen werden. Zur Klärung der genauen Wechselwirkungen müssten weitere CD-Untersuchungen sowie DNA-Entwindungsassays mittels Gelelektrophorese vorgenommen werden.

Im Allgemeinen hat die Untersuchung der Kupfer(II)-Komplexe verschiedener Phenanthrolinderivate jedoch gezeigt, dass eine 2,9-Substitution der Liganden nicht generell zu einem Verlust der Nucleaseaktivität wie im Fall des Neocuproins (**43**) führt. Obwohl kein Komplex die Effizienz des Phenanthrolinkomplexes **Cu(37)₂** erreicht, konnte gezeigt werden, dass die Art der Substituenten die Struktur (trigonal-bipyramidal vs. oktaedrisch) und damit die Stabilität der Komplexe beeinflusst, sodass unterschiedliche DNA-Wechselwirkungen eingegangen werden können. Zudem ermöglichen die Substituenten in den Komplexen **Cu(44)₂** und **Cu(47)₂** eine Reduktion und zumindest die teilweise Reoxidation des Kupfer(II)-Zentrums, wodurch eine gewisse DNA-Spaltaktivität erreicht wird.

3.2.4. Phenanthrolinhydrazone

Die Entwicklung chemischer Sensoren für Metallionen bildet seit vielen Jahren ein wichtiges Thema der bioanorganischen Chemie, Biochemie, Zellbiologie und Medizin. Besonderes Interesse gilt dabei organischen Liganden, die spezifisch giftige Metallionen wie Quecksilber, Cadmium und Blei oder essentielle Ionen wie Zink, Kupfer und Cobalt binden können.^[342,343] Im Mittelpunkt stehen häufig Kupfer(II)-Ionen, da sie zwar ein Spurenelement für alle Organismen darstellen, jedoch in erhöhten Dosen zu bedrohlichen Beschwerden (Zerstörung roter Blutkörperchen, Nierenschäden) oder tödlichen Krankheiten wie Morbus Wilson führen (vgl. Abschnitt 3.1.1).^[85]

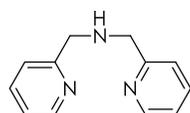
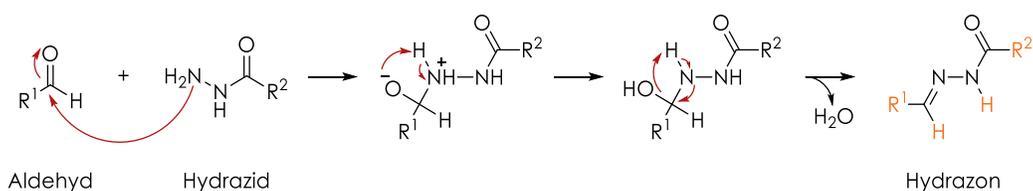


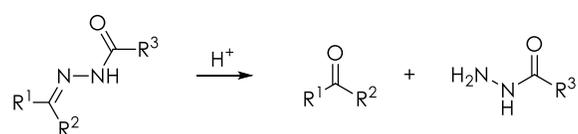
ABBILDUNG 3.98: Struktur von Bis(picolyl)amin.

Neben Verbindungen, die vielfach den Bis(picolyl)amin-Liganden in Abbildung 3.98 zur Bindung von Kupfer(II)-Ionen nutzen^[344,345], haben sich vor allem Imin-Liganden bewährt. Dabei weisen insbesondere Hydrazone bzw. Carbonylhydrazone und deren Komplexe vielseitige Anwendungsmöglichkeiten und biologische Aktivitäten auf. Aufgrund der einfachen Synthese durch Kondensation von Aldehyden oder Ketonen mit Hydrazinen bzw. Carbonylhydrazinen (Hydraziden) und der leichten Funktionalisierung an unterschiedlichen Positionen des Hydrazongrundgerüsts sind mittlerweile zahlreiche Derivate bekannt (Schema 3.59)^[346,347]. Deren Eigenschaften wurden dahingehend angepasst, dass ihr Anwendungsspektrum von Sensoren für Metallionen^[348,349] und Photoschaltern^[346] über generelle cytotoxische, antioxidative und antibakterielle^[350–357] Verbindungen bis hin zu spezifischen Substanzen gegen Mycobakterien (Krankheitserreger der Tuberkulose und Lepra)^[358] und Tumoren^[359,360] reicht.



SCHEMA 3.59: Kondensation eines Aldehyds mit einem Hydrazid zum Hydrazone.^[346,347]
(mögliche Positionen zur Derivatisierung)

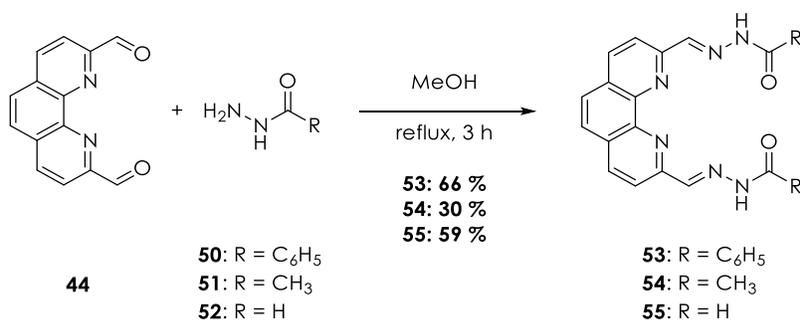
Hydrazone bieten beim Einsatz in biologischen System darüber hinaus den Vorteil, dass sie zwei Anwendungsstrategien ermöglichen. Einerseits können stabile Kupfer(II)-Hydrazonkomplexe eingesetzt werden, die an Proteine oder an die DNA binden und diese spalten.^[351] Auf der anderen Seite könnten sie in der Pharmakotherapie verwendet werden, wenn es durch geeignete Derivatisierung gelingt, die leicht saure Umgebung in Tumorgewebe (pH-Wert 5 - 6 im Gegensatz zu pH 6 - 7 in gesundem Gewebe)^[361] zur säureinduzierten Hydrazonspaltung und damit zur Freisetzung von ROS-generierenden Kupfer(II)-Ionen auszunutzen (Schema 3.60).^[362]



SCHEMA 3.60: Säureinduzierte Hydrazonspaltung.^[362]

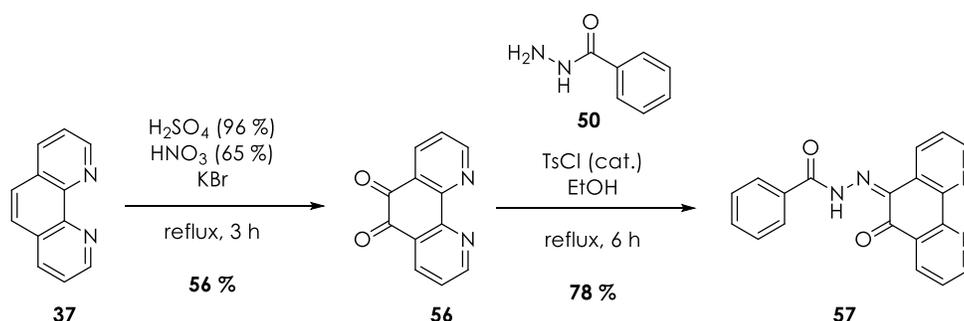
3.2.4.1. Ligandensynthese

Den Ausgangspunkt für die Synthese der Hydrazonkomplexe sollte die Kombination der Nucleaseaktivität von Kupfer(II)-Phenanthrolinkomplexen mit den Eigenschaften von Hydrazonen darstellen. In Erweiterung zu den 2,9-disubstituierten Phenanthrolinen wurde dazu bereits in früheren Untersuchungen das Phenanthroлиндialdehyd **44** mit Benzohydrazid **50** nach einer Vorschrift von MAURO CARCELLI *et al.* funktionalisiert (Schema 3.61).^[107,277,283,363,364] Obwohl bei einer Hydrazonspaltung nach Schema 3.60 der Aldehydkomplex **Cu(44)₂** zurückgewonnen werden würde, der eine deutlich verringerte DNA-Spaltaktivität als **Cu(37)₂** aufweist, sollte dies als erster Ansatz dienen.



SCHEMA 3.61: Synthese der Phenanthrolinhydrazone **53** – **55**.^[107,277,283,363,364]

Da vom Ligand **53** aus der Literatur bisher nur bekannt ist, dass er große Metallionen wie Blei, Zinn, Europium und Gadolinium in einem 1 : 1-Verhältnis binden kann^[363,364], sollte vergleichend zum Kupfer(II)-Phenylbis(benzoylhydrazon) aus Abschnitt 3.1.4^[199] auch untersucht werden, ob aufgrund der wesentlich geringeren Ionengröße von Kupfer(II) mehrere Ionen durch den Liganden **53** komplexiert werden können. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Liganden **53** in gängigen organischen Lösungsmitteln wurde der Dialdehyd **44** zusätzlich auch mit dem Acetohydrazid **51** und dem Formohydrazid **52** umgesetzt.^[283] Wenngleich die Löslichkeit der Liganden dadurch deutlich gesteigert werden konnte, war es nicht möglich Kupfer(II)-Komplexe mit einer definierten Zusammensetzung zu erhalten bzw. konnten lediglich Kupfer(I)-Komplexe der Liganden **53** und **54** isoliert werden.^[107,283] Um für die Untersuchungen zur DNA-Spaltung nicht auf *in situ* erzeugte Komplexe zurückgreifen zu müssen, wodurch stets die Gefahr besteht freie Kupfer(II)-Ionen in Lösung vorzufinden, wurde der Synthesansatz umgestellt. Um grundlegend eine definiertere und weniger variable Koordinationsumgebung für die Kupfer(II)-Ionen zu haben, wurde nach einer Vorschrift der Arbeitsgruppen um *ULRICH ABRAM* und *EZEQUIEL M. VÁQUEZ-LÓPEZ* der Ligand **57** synthetisiert. Die Vorstufe **56** konnte dabei durch Oxidation von Phenanthrolin (**37**) mit Nitriersäure in der Anwesenheit von Kaliumbromid erhalten werden (Schema 3.62).^[283,365,366]



SCHEMA 3.62: Synthese des Hydrazons **57** ausgehend von Phenanthrolin (**37**).^[283,365,366]

In der Literatur ist bisher nicht vollständig geklärt, wie die Oxidation von Phenanthrolin (**37**) zum Dion **56** abläuft, da das Dion zwar auch während der Nitrierung mit H_2SO_4 / HNO_3 gebildet wird, jedoch ausschließlich in der Anwesenheit von Kaliumbromid als Hauptprodukt isoliert werden kann.^[367,368] Die Klärung des Mechanismus' wird vorwiegend dadurch erschwert, dass in der Reaktion eine Reihe an Zwischenprodukten gebildet

werden kann (z.B. Brom, Nitrosylschwefelsäure, Nitrosyl- und Nitroniumsalze, Kaliumbromat).^[369,370] Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Ausführung von entsprechenden Versuchsdetails zwar verzichtet, es konnte aber anhand von Neocuproin (**43**) festgestellt werden, dass die Oxidation zum zweifachen Keton wesentlich von der Größe des Syntheseansatzes, der Zugabe der Säuren **NACHEINANDER** und der Reaktionsdauer abhängt. Dabei ist es interessant, dass beispielsweise bei der Halbierung der Reaktionszeit auf 1.5 Stunden nach der Aufarbeitung als Hauptprodukt lediglich das 5-Monohydroxyderivat **58** isoliert werden konnte. Die Bildung dieses Derivats konnte über NMR-Spektroskopie, CHN-Analyse und ESI-Massenspektrometrie sowie über eine Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden (Abbildung 3.99, Tabelle 3.26 und Anhang).

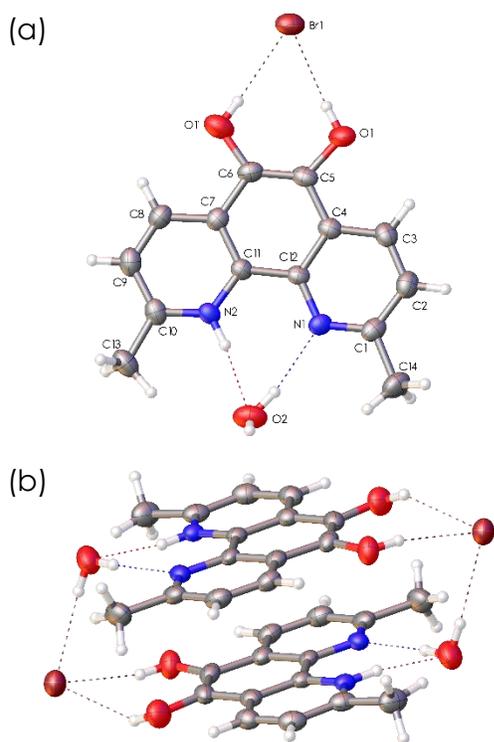


ABBILDUNG 3.99: Olex2-Darstellung der Molekülstruktur von **58** im Kristall.^[89,129–131] (Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShellXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit, Darstellung beider Strukturteile)

TABELLE 3.26: Kristallographische Daten für **58**.

Parameter	58
Empirical formula (1 Part)	C ₁₄ H ₁₂ BrN ₂ O ₁ • H ₂ O
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /n
<i>a</i> [Å]	6.9057(6)
<i>b</i> [Å]	10.7778(9)
<i>c</i> [Å]	18.6867(17)
α [°]	90
β [°]	100.403(4)
γ [°]	90
<i>V</i> [Å ³]	1368.0(2)
<i>Z</i>	4
ρ_{calc} [g cm ⁻³]	1.5757
μ (MoK α) [mm ⁻¹]	3.005
<i>F</i> ₍₀₀₀₎	656
Crystal size [mm ³]	0.70 x 0.15 x 0.12
2 θ range	4.382–61.21
Index range	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 8, -11 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -26 ≤ <i>l</i> ≤ 26
Collected / unique reflections	15870 / 4067
Data / restraints / parameters	4067 / 0 / 190
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.092
<i>R</i> indices [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0667, <i>wR</i> ₂ = 0.1558
<i>R</i> indices [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.0930, <i>wR</i> ₂ = 0.1635
Largest diff. peak / hole [e Å ⁻³]	1.34 / -0.95
Bindungslänge [Å]	
C5-C6	1.357(7)
C5-O1	1.369(7)
N2·····HO2 / O4·····HN2	2.003(7) / 1.905(7)

Die Molekülstruktur des Liganden **58** im Kristall in Abbildung 3.99 zeigt, dass dieser als Hydrobromidsalz erhalten wurden, wobei eines der Stickstoffatome protoniert vorliegt. Das Bromid-Gegenion wechselwirkt dabei jedoch nicht mit diesem, sondern bildet eine

Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxygruppe in Position 5 aus (a). Darüber hinaus zeigt sich, dass dieser Hydroxylsubstituent fehlgeordnet ist, sodass die Sauerstoffatome in den Positionen 5 (Atom O1) und 6 (Atom O1') jeweils eine Besetzungszahl von 0.5 aufweisen. Dass es sich hierbei tatsächlich um eine Hydroxygruppe und nicht um eine Ketogruppe handelt, lässt sich an den beiden Bindungslängen C5-C6 (1.36 Å) und C5-O1 (1.37 Å) in Tabelle 3.26 erkennen, die auf entsprechende Doppel- bzw. Einfachbindungen hinweisen. Innerhalb des Kristalls lagern sich je zwei Moleküle des Neocuproins **58** durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Kristallwasser und den Stickstoffatomen sowie dem Bromid antiparallel übereinander (b). Dabei kommt es zu einer dimeren Anordnung der Liganden, die wiederum durch $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen untereinander wechselwirken und sich dadurch als nebeneinanderliegende Ketten durch den Kristall ziehen (Abbildung 3.100).

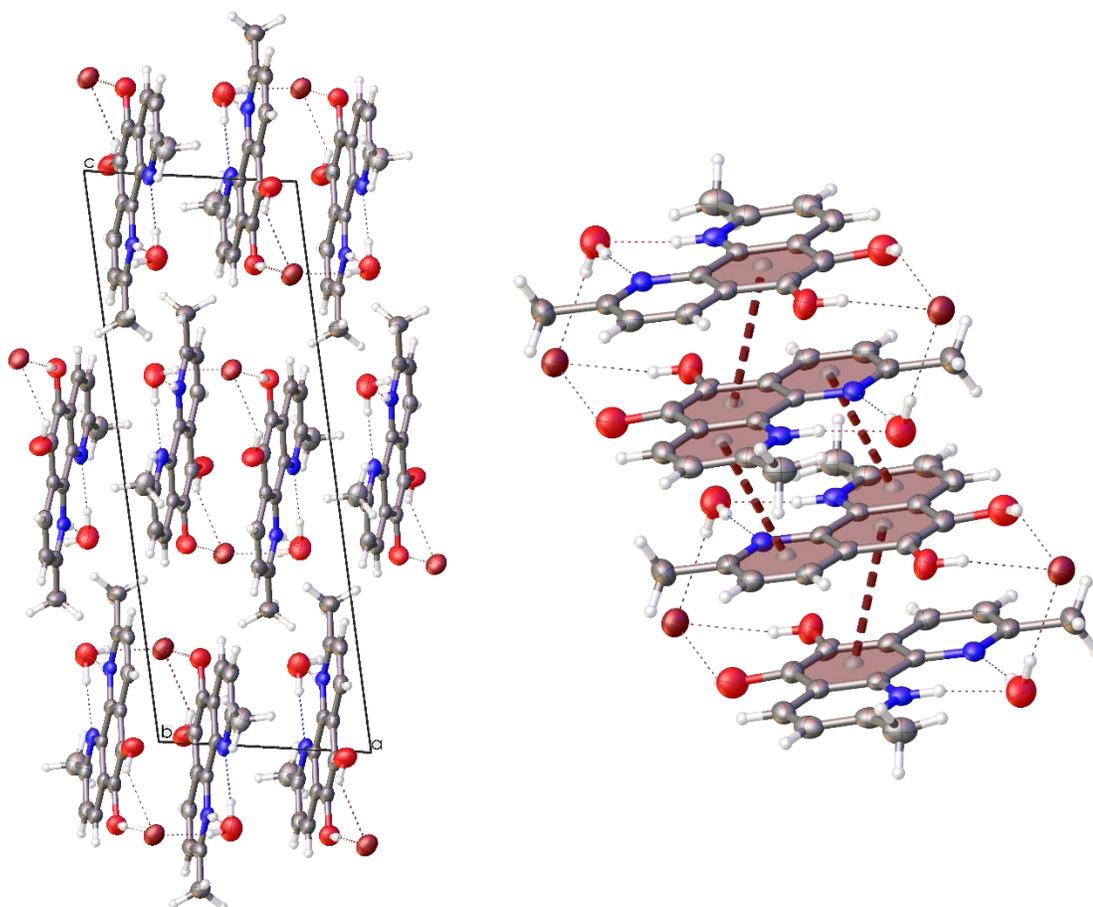
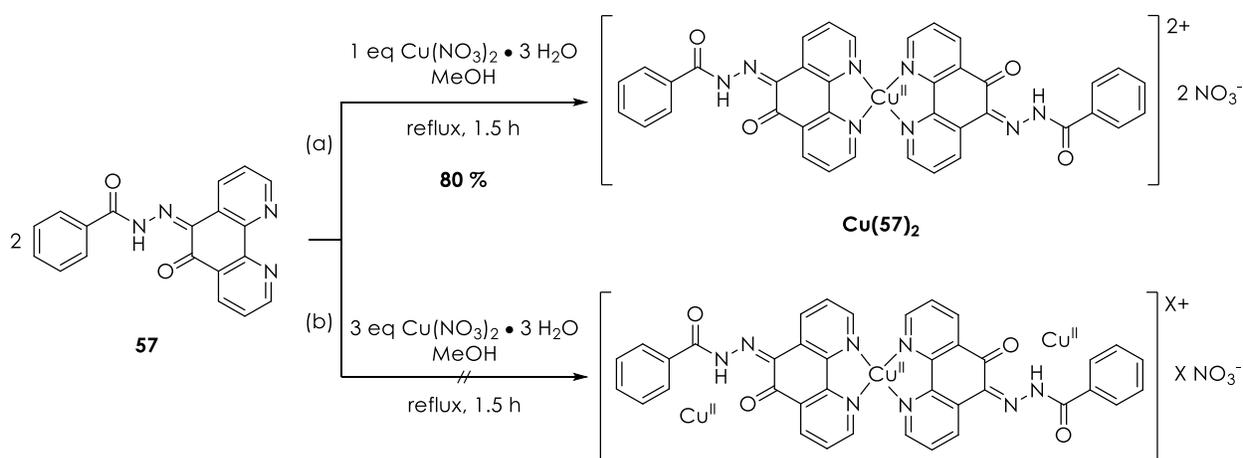


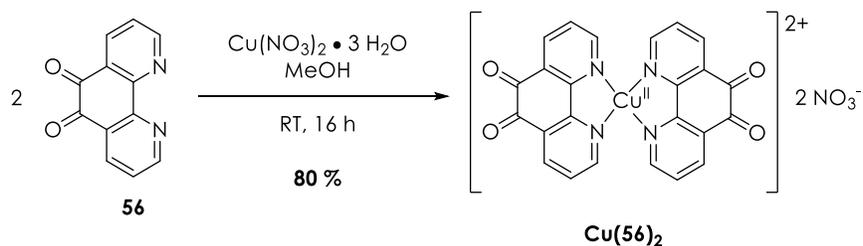
ABBILDUNG 3.100: Olex2-Darstellung der Wechselwirkungen zwischen **58** im Kristall.^[89,129–131]
(--- Wasserstoffbrückenbindungen, - - - $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen)
(Lösung/Verfeinerung: ShelXT/ShelXL, thermische Ellipsoide bei 50 % Wahrscheinlichkeit)

3.2.4.2. Komplexsynthese

Für die Untersuchung der Nucleaseaktivität von Kupfer(II)-Phenanthrolinhydrazonen wurde der Ligand **57**, von dem bereits 1 : 1-Komplexe mit Rhenium und Technetium literaturbekannt sind^[365], nach Schema 3.63 mit Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat umgesetzt. Obwohl auch Hydrazone in der Lage sind, Kupfer(II)-Ionen zu binden, konnte bei der Synthese nur der 2 : 1-Komplex isoliert werden (a). Hinweise auf 2 : 2- oder 2 : 3-Komplexe konnten auch bei der massenspektrometrischen Analyse nicht gefunden werden (b), sodass eine Untersuchung des Einflusses mehrerer Metallzentren nicht durchgeführt werden konnte. Für zukünftige Experimente wäre jedoch die Einführung weiterer Metallzentren durch Umsetzung des isolierten Komplexes **Cu(57)₂** mit Kupfer(II)-Ionen oder anderen redoxaktiven Metallen wie Eisen(II) denkbar.^[283]

SCHEMA 3.63: Synthese des Kupfer(II)-Komplexes **Cu(57)₂**.^[283]

Zum Vergleich des Einflusses der Hydrazongruppe auf die DNA-Spaltung wurde ebenfalls der Kupfer(II)-Komplex des Dions **56** synthetisiert (Schema 3.64).^[283,371]

SCHEMA 3.64: Synthese des Kupfer(II)-Komplexes **Cu(56)₂**.^[283,371]

3.2.4.3. Spaltung von Plasmid-DNA

Die DNA-Spaltaktivität des Komplexes **Cu(57)₂** wurde zunächst analog zu vorhergehenden Versuchen konzentrationsabhängig mittels Agarose-Gelelektrophorese in der An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel untersucht (Abbildung 3.101). Aufgrund der hohen Nucleaseaktivität des Phenanthrolinkomplexes **Cu(37)₂** wurden für die Untersuchung des Komplexes **Cu(57)₂** ebenfalls Konzentrationen von 5 – 25 μM gewählt (vgl. Abschnitt 3.2.3.1).^[283]

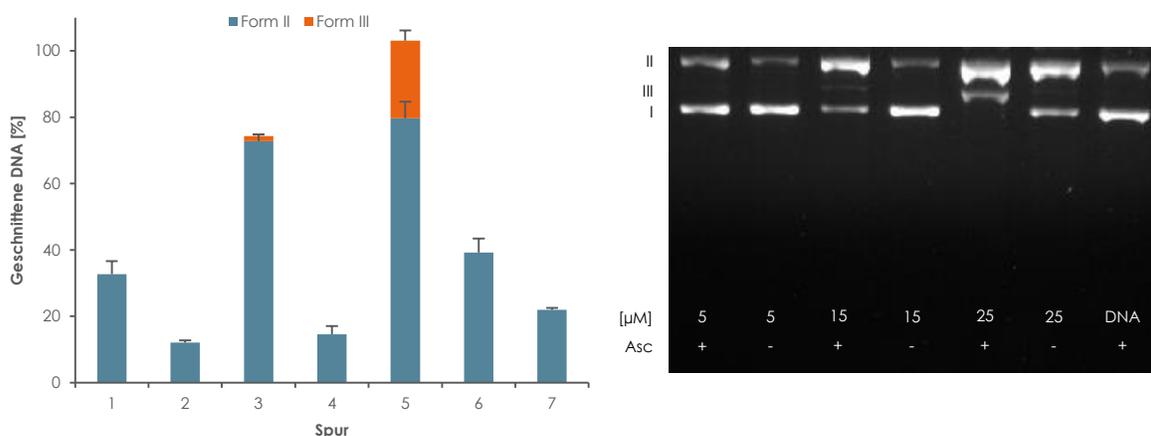


ABBILDUNG 3.101: Konzentrationsabhängige DNA-Spaltaktivität von **Cu(57)₂** bezüglich pBR322 in der An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure.^[283]
(5, 15 und 25 μM Komplex und 0,025 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Plasmid-DNA in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 in der An- und Abwesenheit von 0,25 mM Ascorbinsäure (Asc) bei 37 °C für 2 h)

Der Komplex **Cu(57)₂** spaltet die Plasmid-DNA in der Anwesenheit von Ascorbinsäure bereits bei einer Konzentration von 5 μM zu einem geringen Anteil in die Form II (11 %, Spur 1) und sehr deutlich in die Form II (51 %) und Form III (2 %, Spur 3) bei 15 μM . Neben der generellen Erhöhung der Spaltaktivität mit steigender Komplexkonzentration zeigt die Abbildung 3.101, dass die DNA auch bei 25 μM in der Abwesenheit des Reduktionsmittels gespalten wird (Spur 6). Dies kann prinzipiell mehrere Ursachen haben: Die Möglichkeit der hydrolytischen Spaltung kann dabei durch die Ergebnisse eines BNPP-Assays ausgeschlossen werden, da sich weder bei einer Komplexkonzentration von 75 μM noch bei 125 μM die Absorptionsbande des BNPP-Spaltprodukts bei 400 nm in den Spektren findet (Abbildung 3.102) (vgl. Abschnitt 3.2.3.1).^[283]

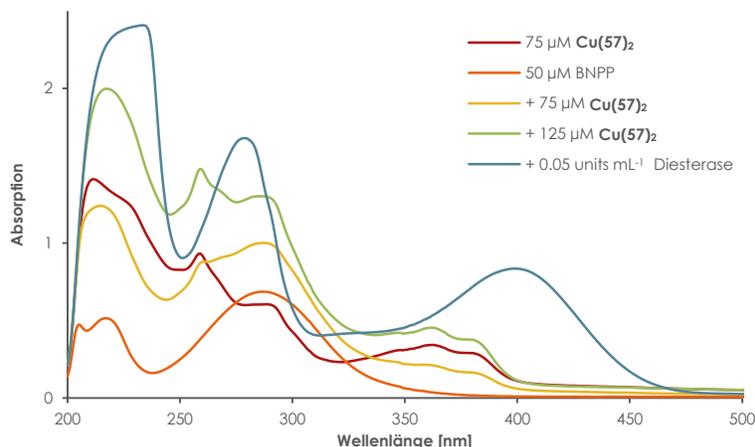
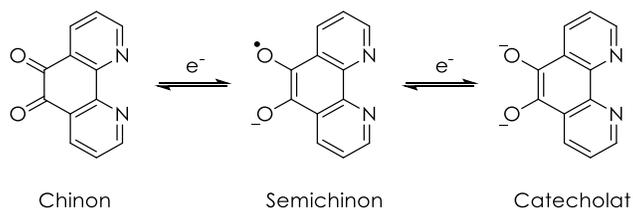


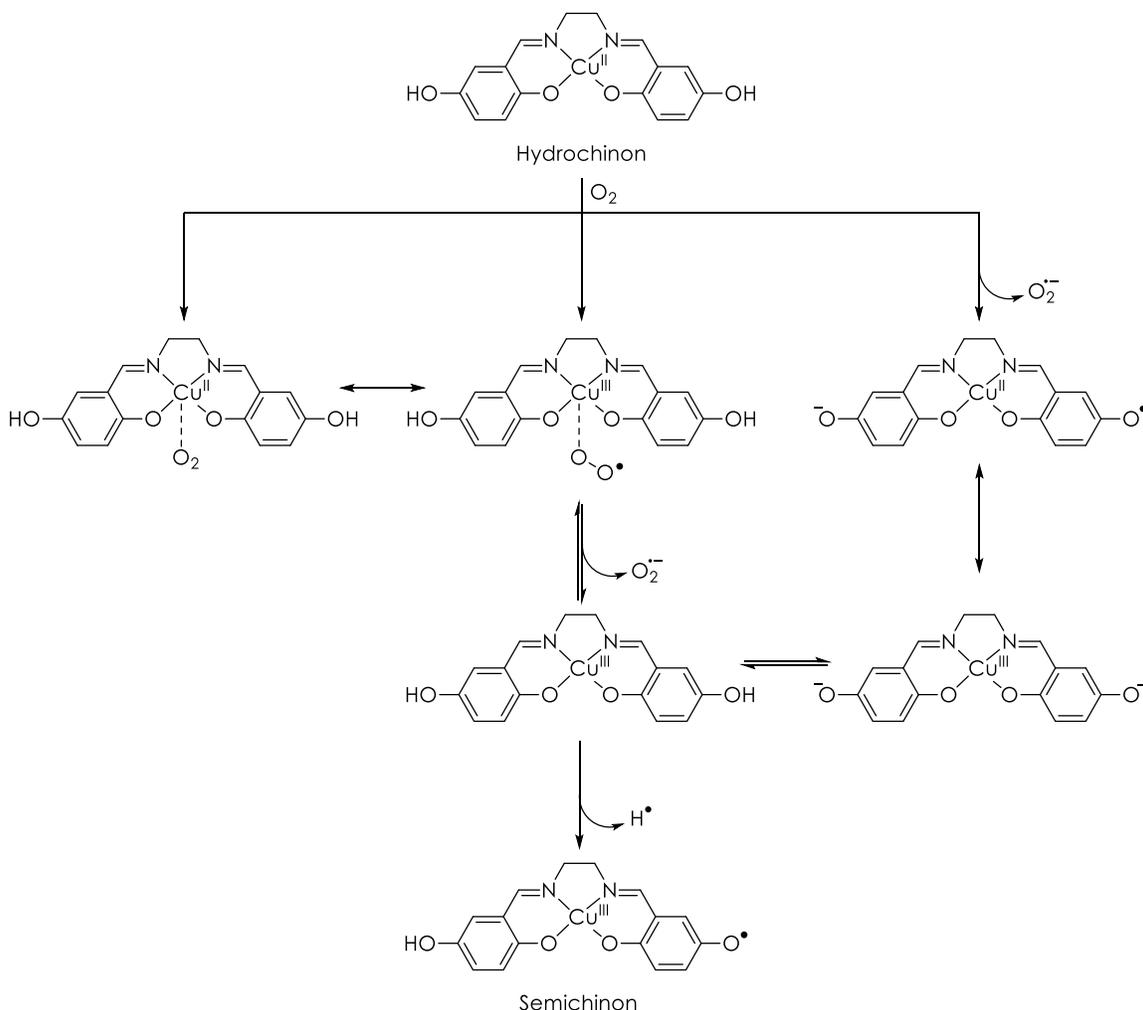
ABBILDUNG 3.102: UV/Vis-Spektren von BNPP nach der Inkubation mit dem Komplex **Cu(57)₂**.^[283]
(75 µM und 125 µM Komplex bzw. 0.05 units mL⁻¹ Phosphodiesterase I mit 50 µM BNPP
in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 bei 37 °C für 2 h)

Da als Schlussfolgerung angenommen werden muss, dass die DNA-Spaltung weiterhin über einen oxidativen Mechanismus verläuft, kommen als Erklärung sowohl die Selbstaktivierung durch Reduktion des Kupfer(II)-Zentrums über die Oxidation des Liganden als auch die Umkehrung dessen in Frage, d.h. Oxidation von Cu^{II} zu Cu^{III} durch Reduktion des Liganden. Über diese Betrachtungen hinaus wäre aber auch ein Einfluss des Tris-HCl-Puffer auf die DNA-Spaltung denkbar (vgl. Abschnitt 3.2.3.1). Vernachlässigt man zunächst letzteren Punkt und geht davon aus, dass der Ligand **57** ebenso wie Phenanthrolin (**37**) gegenüber weiteren Oxidationen einigermaßen inert ist^[370], ist die Reduktion des Liganden der plausibelste Weg der Selbstaktivierung. Diese Annahme wird umso wahrscheinlicher, wenn man die Verbindung **57** ausgehend von **56** nicht als Ketonderivat des Phenanthrolins, sondern vielmehr als Chinonanalogon betrachtet. Die Bildung von Radikalanionen durch Reduktion von Chinonen nach dem Schema 3.65 wurde bereits 1938 von *LEONOR MICHAELIS* beschrieben und ist auch anhand des Liganden **56** in der Literatur intensiv untersucht worden.^[372–375]



SCHEMA 3.65: Redoxgleichgewichte für *ortho*-Chinone am Beispiel des Liganden **57**.^[372–375]

Obwohl die spontane Bildung von Kupfer(III) über die Reduktion des Liganden eine eher selten beobachtete Reaktion zur DNA-Spaltung ist, konnte die Arbeitsgruppe um *HERVÉ VEZIN* über EPR-Spektroskopie und Cyclovoltammetrie die Schädigung von DNA mittels eines Kupfer(II)-Hydroxysalenkomplexes durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies nachweisen (Schema 3.66).^[376]



SCHEMA 3.66: Postulierter Mechanismus zur Bildung von Radikalen durch einen Kupfer(II)-Hydroxysalenkomplex in der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff.^[376]

Inwiefern die Reaktionen in Schema 3.66 auch auf den Komplex **Cu(57)₂** übertragbar sind, der anstelle einer zweiten Ketogruppe eine Imingruppe aufweist, müsste durch weitere Experimente beispielsweise mittels der Detektion von radikalischen Spezies über EPR-Spektroskopie untersucht werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Analyse der Effizienz der DNA-Spaltung stellt der Vergleich des Kupfer(II)-Hydrazonkomplexes **Cu(57)₂** mit dem unsubstituierten Derivat **Cu(56)₂** und dem Komplex der Stammverbindung Phenanthrolin (**Cu(37)₂**) dar (Abbildung 3.103).^[283]

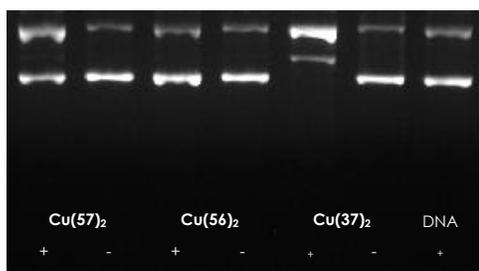
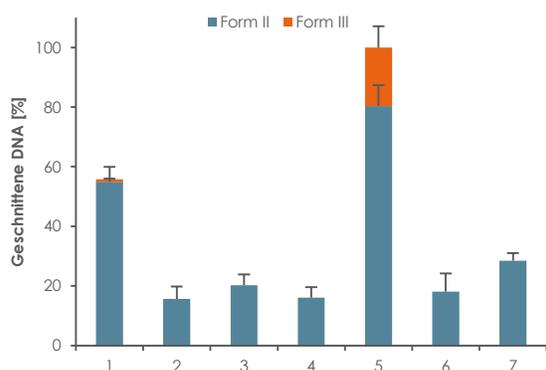


ABBILDUNG 3.103: DNA-Spaltaktivität von **Cu(57)₂** im Vergleich mit den Komplexen **Cu(56)₂** und **Cu(37)₂**.^[283]

(5 μM Komplex und 0.025 μg μL⁻¹ Plasmid-DNA in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der An- und Abwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure (Asc) bei 37 °C für 2 h)

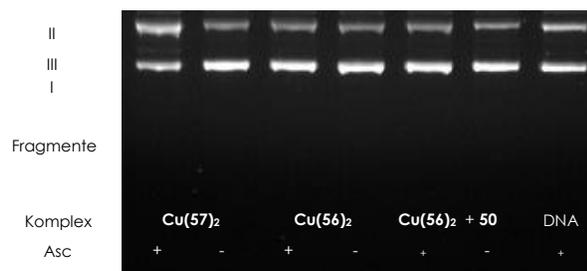
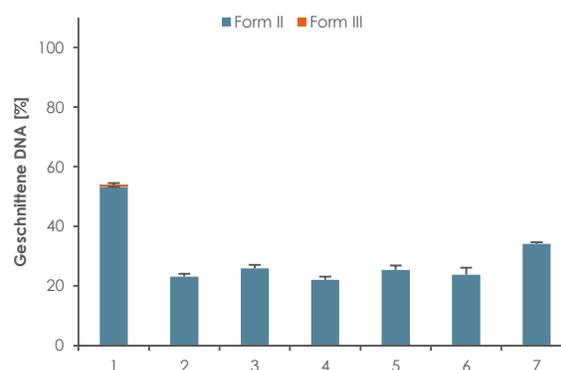


ABBILDUNG 3.104: DNA-Spaltaktivität von **Cu(57)₂** im Vergleich mit **Cu(56)₂** und **Cu(37)₂** sowie **Cu(56)₂ + 50**.^[283]

(5 μM Komplex bzw. 50 und 0.025 μg μL⁻¹ Plasmid-DNA in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.4 in der An- und Abwesenheit von 0.25 mM Ascorbinsäure (Asc) bei 37 °C für 2 h)

Das Vergleichsgel zeigt deutlich, dass der Hydrazonkomplex **Cu(57)₂** trotz einer Spaltung von etwa 26 % der DNA bezüglich Form II in der Anwesenheit von Ascorbinsäure (Spur 1) bei weitem nicht die Effizienz des Komplexes **Cu(37)₂** erreicht (Spur 5). Das Ergebnis für den Komplex **Cu(56)₂** zeigt dagegen das Fehlen jeglicher Nucleaseaktivität (Spur 3). Obwohl der Ligand **56** in Verbindung mit Cobalt(II), Zink(II), Platin(II) und Silber(I) eine äußerst hohe Cytotoxizität zeigt^[377–380], weist der Kupfer(II)-Komplex unter den gewählten Bedingungen keinerlei Nucleaseaktivität auf, womit verdeutlicht wird, dass die Cytotoxizität des Dions **56** nicht durch die Spaltung der DNA, sondern, wie in bereits aus der Literatur bekannt, durch Inhibierung der DNA-Synthese in den Zellen bedingt ist.^[378] Die fehlende Spaltaktivität kann damit einerseits darauf zurückgeführt werden, dass das Dion **56** nicht in der Lage ist in die DNA zu interkalieren.^[378] Auf der anderen Seite kann

die Ursache auch in der verglichen zum Phenanthrolin (**37**) stark veränderten elektronischen Struktur des Liganden **56** durch die Aufhebung der Aromatizität des mittleren Benzolringes bei der Oxidation liegen, wodurch gleichzeitig auch das Redoxpotential des Kupfer(II)-Zentrums verändert wird.^[272,381] Beide Argumente werden dadurch gestützt, dass es für die DNA-Spaltung durch den Komplex **Cu(57)₂** zwingend notwendig ist, dass die Hydrazongruppe intakt bleibt. Wird der Komplex **Cu(56)₂** lediglich in der Anwesenheit des Hydrazids **50** mit Plasmid-DNA und Ascorbinsäure inkubiert, kann ebenso keine Spaltaktivität gefunden werden (Abbildung 3.104 , Spur 5). Damit zeigt sich jedoch gleichzeitig, dass es bei einem pH-Wert von 7.4 nicht zur Spaltung der Hydrazonbindung kommt. Für den Einsatz des Komplexes **Cu(57)₂** bei niedrigeren pH-Werten wie sie z.B. in Tumorgewebe vorherrschen, bedeutet dies allerdings, dass eine eventuelle Spaltung der Bindung nicht zur Aktivierung des Komplexes bzw. zur Freisetzung von Cu^{II}-Ionen führt, sondern das Gegenteil, die Deaktivierung des Komplexes, stattfindet (vgl. Abschnitt 3.2.4).

Die Untersuchung des Hydrazonkomplexes **Cu(57)₂** konnte zwar zusammengefasst nicht die gewünschten Ergebnisse einer generell gesteigerten Nucleaseaktivität oder einer gezielten Aktivierung des Komplexes liefern, jedoch können dessen ungeachtet die vorliegenden Versuche als guter Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Nucleasen durch Kombination der spezifischen Eigenschaften verschiedener Substanzklassen genutzt werden. Interessant wäre zudem die Untersuchung des Komplexes **Cu(57)₂** hinsichtlich weiterer biologischer Anwendungsmöglichkeit beispielsweise als Protease, Antioxidans oder Antibiotikum.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Anmerkungen

Übersicht

Eine Übersicht aller Strukturen mit den entsprechenden Nummern und Kürzeln zur besseren Veranschaulichung befindet sich am Ende des experimentellen Teils.

Analytik

Sofern die synthetisierten Verbindungen literaturbekannt sind, wurden zur Charakterisierung in der Regel ausschließlich $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen. Weitere analytische Methoden (ESI-MS, CHN-Analyse) wurden für Verbindungen durchgeführt, bei denen keine NMR-Spektroskopie anwendbar war bzw. falls die NMR-Spektren nicht vollkommen eindeutig waren.

Für die Peptide wurden zur Charakterisierung ausschließlich ESI-Massenspektren aufgenommen. Die Reinheit der Verbindungen wurde mittels RP-HPLC überprüft.

Synthesen

Sämtliche Angaben zu Ausbeuten im Syntheseabschnitt 4.3 beziehen sich auf die in den Reaktionsschemata gezeigten Produkte ohne Beachtung der Ergebnisse der CHN-Analysen. Den Konzentrationsberechnungen für die Gelelektrophorese- und Spektroskopie-Experimente wurden hingegen die Resultate der CHN-Analysen zugrunde gelegt.

Für die Versuche der Darstellung der Kupfer(II)-Komplexe der Liganden **48** und **49** wurden beispielhaft nur zwei Synthesen aufgezeigt (vgl. Abschnitte 4.3.2.17 und 4.3.2.18).

Gelelektrophoresen und Spektroskopie

Die genauen Reaktionsbedingungen (Komplekonzentration, Inkubationszeit, Puffer, Temperatur, pH-Wert) können für jeden Versuch den Abbildungsunterschriften entnommen werden.

4.2. Methoden und Materialien

4.2.1. Analysemethoden

Kernspinresonanzspektren

Die Protonen-Kernspinresonanzspektren wurden auf einem *Jeol ECS 400 FT-NMR-Spektrometer* bei 399.74 MHz aufgenommen. ^{13}C -, COSY-, DEPT-, HMBC- und HMQC-Spektren wurden bei 700.23 MHz bzw. 176.07 MHz an einem *JEOL Eclipse+ 500-Spektrometer* gemessen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Trimethylsilan als externen Standard.

Massenspektren

Die ESI-Massenspektren wurden auf einem *Agilent 6210 ESI-ToF-Massenspektrometer* der Firma *Agilent Technologies* gemessen.

Infrarotspektren

IR-Spektren wurden an einem *Nicolet iS10 FT-IR-Spektrometer* der Firma *Thermo Scientific* gemessen.

Absorptions- und Emissionsspektren

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden auf einem Gerät des Typs *Cary100* von *Agilent Technologies* und die Emissionsspektren auf einem *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* der Firma *Varian* aufgenommen.

Circulardichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden auf einem *Jasco J-810 Spectropolarimeter* mit kontinuierlichem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur aufgenommen.

Elementaranalysen

Die Messung der CHN-Analysen erfolgte an einem Gerät des Typs *VarioEL* der *Elementar Analysensysteme GmbH*.

RP-HPLC

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mittels einer HPLC des Typs *Chromaster 5000* von *Hitachi* und *VWR*. Als Eluenten wurden Acetonitril und Millipore-Wasser verwendet.

Agarose-Gelelektrophorese

Alle Agarose-Gelelektrophoresen wurden mit einer *Rotiphorese® PROfessional I*-Kammer der Firma *Roth* bei 40 V für 2 h durchgeführt. 1 %ige Agarosegele wurden mit 0.5X TBE-Puffer von *life technologies* und Agarose von *Fisher Scientific* angefertigt. Die Anfärbung erfolgte mit Ethidiumbromid (1 %ige Lösung von *Fisher Scientific*) und die Auswertung über einen *Bio-Rad GelDoc EZ Imager* mit der Software *ImageLab 5.0*.

SDS-PAGE

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden mit einem *Mini-PROTEAN® Tetra*-System der Firma *Bio-Rad* durchgeführt. Als reduzierender Ladepuffer wurde *Roti®-Load 1 (Roth)* eingesetzt. Die Elektrophoresen erfolgten mit färbungsfreien *Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™*-Gelen von *Bio-Rad* in 1X SDS-Puffer für 35 min bei 200 V. Die Auswertung der Gele erfolgte über einen *Bio-Rad GelDoc EZ Imager* mit der Software *ImageLab 5.0*.

Kristallstrukturbestimmung

Die Einkristallstrukturbestimmung erfolgte an einem *Bruker-APEX-II Diffraktometer* mit CCD. Die Datenerfassung, -reduktion und empirische Absorptionskorrektur wurde mit den Programmen *SMART*, *SAINT* und *SADABS (Siemens Industrial Automation Inc.)* durchgeführt. Die Strukturlösung und -verfeinerung erfolgte unter Verwendung von *Olex2^[89]* mit *ShelXT* (Lösung über direkte Methoden) und *ShelXL* (Verfeinerung über die Methode der kleinsten Quadrate)^[129–131].

4.2.2. Ausgangsmaterialien

Bestand

Aceton	Magnesiumsulfat
2-Aminoethylmaleimid	Natriumacetat
Ammoniumsulfat	Natriumborhydrid
Bernsteinsäureanhydrid	Natriumcarbonat
Borsäure	Natriumethyldiamintetraacetat
Brom	Oxalylchlorid
Bromphenolblau	Phenol
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Phosphorpentachlorid
Eisessig	Phosphorsäure (85 %)
Ethanol	Saccharose
Ethylacetat	Salzsäure (32 %)
Ethylendiamin	¹ Butanol
1,1'-Ferrocendicarbonsäure	Tetrahydrofuran
Hexan	Triethylamin
Kaliumbromid	Wasser (Millipore)

Acros Organics

Bortrifluorid-Diethyletherat	Kupfer(II)-perchlorat-Hexahydrat
Bromwasserstoff (33 %) in Eisessig	Natriumazid
DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon)	1,1,3,3-Tetramethoxypropan
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (über Molekularsieb)	2-Thiobarbitursäure
Dimethylpyrrol	

Alfa Aesar

Acetohydrazid	Ferrocencarbonsäure
Benzohydrazid	Formohydrazid
4-Carboxybenzaldehyd	1,10-Phenanthrolin
2,3-Diaminopropionsäure	Triisopropylsilan

AppliChem

Dansylchlorid

Bachem

GGH (Glycylglycylhistidin)

Deutero

Methanol-D4 (99.96 Atom% D)

Euriso-Top

Chloroform-D1 (≥ 99.8 Atom% D)

Fisher Scientific

Agarose

Dimethylsulfoxid (HPLC)

Ethidiumbromid (1 %ige Lösung)

Kaliumhydroxid

MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)

Natriumchlorid

Natriumhydrogencarbonat

Natriumhydroxid

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, 10X)

Salpetersäure (65 %)

Schwefelsäure (96 %)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Wasserstoffperoxid (30 %)

Fluka (Sigma-Aldrich)

Ascorbinsäure (≥ 99.9998 %)

Fluorochem

BOC (Di-^tbutyldicarbonat)

Grüssing

ⁿButanol

1,4-Dioxan

life technologies (Fisher Scientific)

TBE (Tris-Borat-EDTA, 10X)

Merck

Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat

Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat

Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat

Nickel(II)-nitrat-Hexahydrat

Pyrrol

Selendioxid

Trichloressigsäure

New England Biolabs

Blunt/TA Ligase Master Mix

EcoRI-HF[®] RE-Mix[®]

Protein Marker (2-212 kDa)

novabiochem (Merck)

Fmoc- β -Alanin-OH
Fmoc-Histidin(Mtt)-OH

Fmoc-Serin(¹Bu)-OH
Rink-Amid MBHA-Harz

Roth

Fmoc-Chlorid
HATU
Natriumsulfat
Phenol/Chloroform
Plasmid-DNA pBR322
PyBOP

Rinderserumalbumin (> 98 %)
Roti®-Load 1
Salzsäure (≥ 25 %, ROTIPURAN®)
SDS (Natriumdodecylsulfat, 10X)
Trifluoressigsäure (≥ 99.9 %)

Sigma-Aldrich

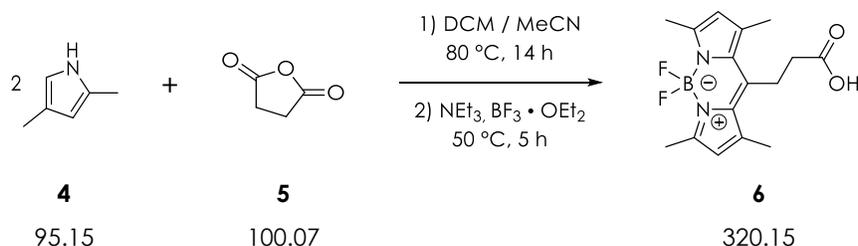
Arachidonsäure
Bis(*para*-nitrophenyl)phosphat
CT-DNA (Typ I, Fasern)
Deuteriumoxid (99.97 Atom% D)
Diisopropylethylamin
Dimethylsulfoxid-D₆ (99.96 Atom% D)
Fluoresceinisothiocyanat (Isomer I)
Katalase (Rinderleber, 2000-5000 units mg⁻¹)
Linolsäure

Neocuproin
Ölsäure
Phosphodiesterase I
(Texas-Klapperschlange, Typ IV ≥ 0.01 units mg⁻¹)
Piperidin
Rhodamin B
Stearinsäure
Superoxiddismutase (Rindererythrozyten, ≥ 3000 units mg⁻¹)
Tosylchlorid

VWR

Acetonitril (HPLC)
Chloroform
Dichlormethan
Diethylether

N,N-Dimethylformamid (HPLC)
Kieselgel 60
Methanol (HPLC)

4.3.1.2. 3-(4,4-Difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propansäure (**6**)

Ansatz und Durchführung^[125]

Dimethylpyrrol	4	0.46 g	0.5 mL	4.80 mmol
Bernsteinsäureanhydrid	5	0.20 g		2.00 mmol
Bortrifluorid-Diethyletherat		2.27 g	2.0 mL	16.00 mmol
Triethylamin		1.21 g	1.7 mL	12.00 mmol

In einem 250 mL-Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre **4** und **5** in einem Gemisch aus absolutiertem DCM (20 mL) und Acetonitril (5 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 14 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Triethylamin und nach 30 min das Bortrifluorid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h bei 50 °C erhitzt. Die Reaktion wurde mit 30 mL 0.1 M Salzsäure gequench und 4 x mit je 100 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt als orange-roter Feststoff erhalten werden.

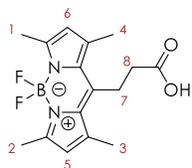
Säulenchromatographie an Kieselgel

Eluent: DCM : Ethylacetat (Gradient von 4 : 1 bis 1 : 1) / R_f, (1:1): 0.4

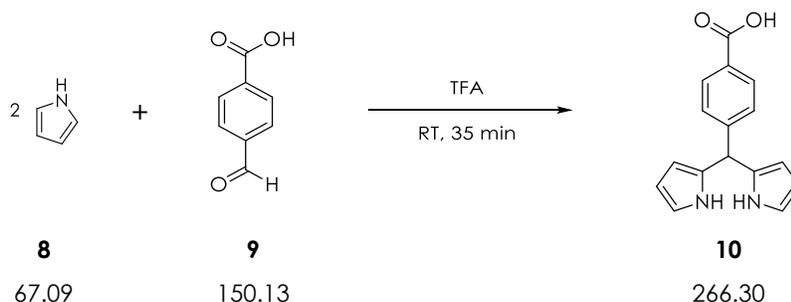
Ausbeute

78 mg (0.24 mmol, 12 %)

Literatur: 21 %^[125]

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)


δ = 2.43 (6 H, s, H^{1,2}), 2.51 (6 H, s, H^{3,4}), 2.64 (2 H, t, H⁷, J = 8.8 Hz), 3.32 (2 H, t, H⁸, J = 8.8 Hz), 6.06 (2 H, s, H^{5,6}) ppm.

4.3.1.3. 4-(Di(1H-pyrrol-2-yl)methyl)benzoesäure (**10**)**Ansatz und Durchführung**^[128]

Pyrrol	8	33.55 g	34.7 mL	500.00 mmol
4-Carboxybenzaldehyd	9	2.00 g		13.32 mmol
Trifluoressigsäure		0.16 g	0.1 mL	1.35 mmol

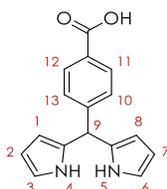
In einem 100 mL-Schlenkcolben wurde unter Argonatmosphäre **9** in Pyrrol suspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde TFA hinzugegeben und die Lösung für weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Pyrrol am Rotationsverdampfer entfernt (60 °C, 30 mbar). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und das erhaltene braune Öl wurde anschließend in Ethanol gelöst. Durch Zugabe von Wasser konnte das Produkt als silbrig-grauer Feststoff erhalten werden, der sich mit der Zeit an Luft unter Braunfärbung zersetzte.

Säulenchromatographie an Kieselgel

Eluent: DCM : Ethylacetat (3 : 1) / R_f , (3:1): 0.5

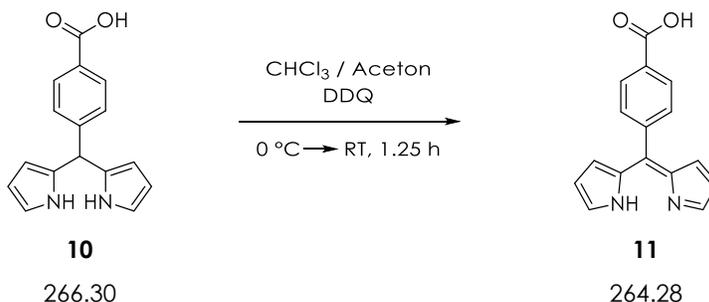
Ausbeute

2.13 g (8.00 mmol, 60 %) Literatur: 52 %^[128]

¹H-NMR ((CD₃)₂CO, 400 MHz)

δ = 5.53 (1 H, s, H⁹), 5.73-5.75 (2 H, m, H^{2,7}), 5.96-5.99 (2 H, m, H^{1,8}), 6.67-6.69 (2 H, m, H^{3,6}), 7.31 (2 H, d, H^{10,13}, J = 8.5 Hz), 7.93 (2 H, d, H^{11,12}, J = 8.5 Hz), 9.74 (2 H, br s, H^{4,5}) ppm.

4.3.1.4. 4-((1*H*-Pyrrol-2-yl)(2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl)benzoesäure (**11**)



Ansatz und Durchführung^[142]

Dipyrromethan	10	1.00 g	3.76 mmol
DDQ		0.94 g	4.14 mmol

Zu einer Lösung aus **10** in Chloroform (40 mL) und Aceton (17 mL) wurde bei 0 °C DDQ in 17 mL Aceton langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei 0 °C und anschließend für weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Säulenchromatographie an Kieselgel wurde der erhaltene Feststoff in Ethanol gelöst. Die Lösung wurde filtriert und nach Einengen bis zur Trockne wurde das Produkt als gelb-brauner Feststoff erhalten.

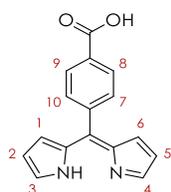
Säulenchromatographie an Kieselgel

Eluent: DCM : Methanol (5 % bis 95 %) / R_f , (95:5): 0.1

Ausbeute

0.61 g (2.31 mmol, 61 %)

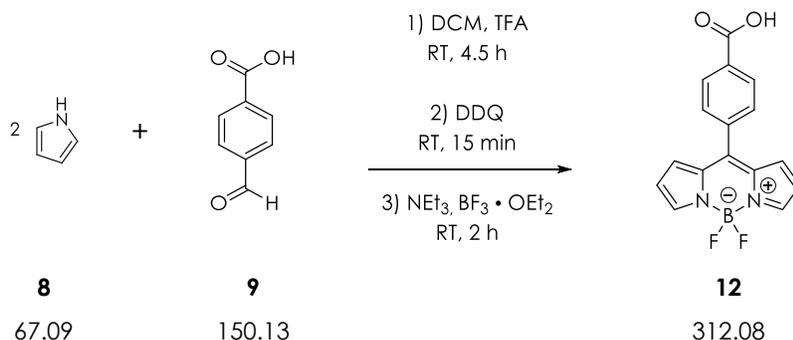
¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)



$\delta = 6.41$ (2 H, d, H^{2,5}, $J = 3.7$ Hz), 6.46 (2 H, d, H^{1,6}, $J = 3.5$ Hz), 7.43 (2 H, d, H^{7,10}, $J = 8.0$ Hz), 7.75 - 7.78 (2 H, m, H^{3,4}), 8.07 (2 H, d, H^{8,9}, $J = 7.7$ Hz) ppm.

ESI-MS (+)

$m/z = 265.1005$ [M+H]⁺ (berechnet: 265.0972)

4.3.1.5. 4-(4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)benzoesäure (**12**) (METHODE A)**Ansatz und Durchführung**

Pyrrol	8	0.29 g	0.3 mL	4.32 mmol
4-Carboxybenzaldehyd	9	0.30 g		2.00 mmol
DDQ		0.45 g		2.00 mmol
Triethylamin		2.92 g	4.0 mL	28.86 mmol
Bortrifluorid-Diethyletherat		4.48 g	4.0 mL	31.57 mmol

In einem 250 mL-Schlenkkolben mit Rückflusskühler wurden unter Argonatmosphäre destilliertes Pyrrol (**8**) und **9** in 350 mL absolutiertem DCM gelöst und mit einigen Tropfen Trifluoressigsäure versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 4.5 h wurde DDQ zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde zunächst langsam Triethylamin und dann Bortrifluorid hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde nach erneutem Rühren für 2 h bei Raumtemperatur mit 200 mL Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und zweimaliger säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt als roter, grün fluoreszierender Feststoff erhalten werden.

Säulenchromatographie an Kieselgel

Eluent: Ethylacetat : Methanol (0 % bis 10 %) / R_f , (90:10): 0.4

Ausbeute

39 mg (0.12 mmol, 6 %) Literatur: 18 %^[127]

Analytik

vgl. Abschnitt 4.3.1.6 (Methode B)

4.3.1.6. 4-(4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)benzoesäure (**12**) (METHODE B)

Ansatz und Durchführung

Dipyromethan	10	1.00 g		3.76 mmol
DDQ		0.85 g		3.76 mmol
DIPEA		3.42 g	4.5 mL	26.31 mmol
Bortrifluorid-Diethyletherat		5.87 g	5.2 mL	41.36 mmol

Zu einer Lösung aus **10** in 120 mL DCM wurde DDQ gegeben. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde DIPEA und nach weiteren 15 min das Bortrifluorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 20 min bei Raumtemperatur mit Wasser gequenchet. Die wässrige Phase wurde 2 x mit je 40 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 2 x mit je 30 mL Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Aufarbeitung mittels Säulen- und präparativer Dünnschichtchromatographie konnte das Produkt als orangefarbener Feststoff erhalten werden.

Säulenchromatographie an Kieselgel

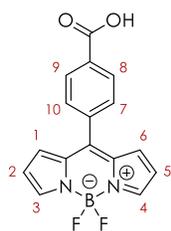
Eluent: DCM : Ethylacetat (1 : 1) / $R_f, (1:1)$: 0.3

Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Eluent: DCM : Ethylacetat (1 : 2)

Ausbeute

0.42 g (1.35 mmol, 36 %) Literatur: 18 %^[127]

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

$\delta = 6.57$ (2 H, d, H^{1,6}, $J = 3.7$ Hz), 6.89 (2 H, d, H^{2,5}, $J = 4.6$ Hz), 7.68 (2 H, d, H^{7,10}, $J = 8.6$ Hz), 7.97 (2 H, s, H^{3,4}), 8.27 (2 H, d, H^{8,9}, $J = 8.6$ Hz) ppm.

ESI-MS (-)

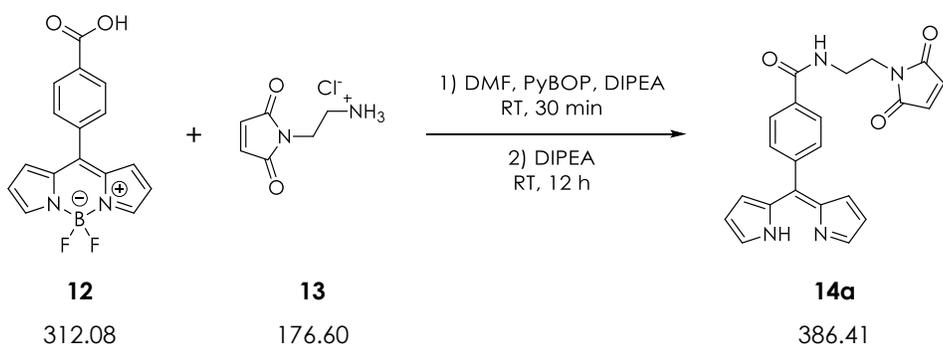
$m/z = 311.0826$ [M-H]⁻ (berechnet: 311.0809)

623.1721 [2M-H]⁻ (berechnet: 623.1691)

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: C₁₆H₁₁BF₂N₂O₂

Einkristalle für die Strukturbestimmung durch Röntgenbeugung wurden durch langsames Verdunsten einer methanolischen Lösung der Verbindung **12** erhalten.

4.3.1.7. 4-((1*H*-Pyrrol-2-yl)(2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl)-*N*-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)benzamid (**14a**)

Ansatz und Durchführung^[134]

BODIPY	12	21.6 mg	0.07 mmol
2-Aminoethylmaleimid	13	16.1 mg	0.10 mmol
PyBOP		61.0 mg	0.12 mmol
DIPEA		45.6 mg 60.0 μ L	0.37 mmol

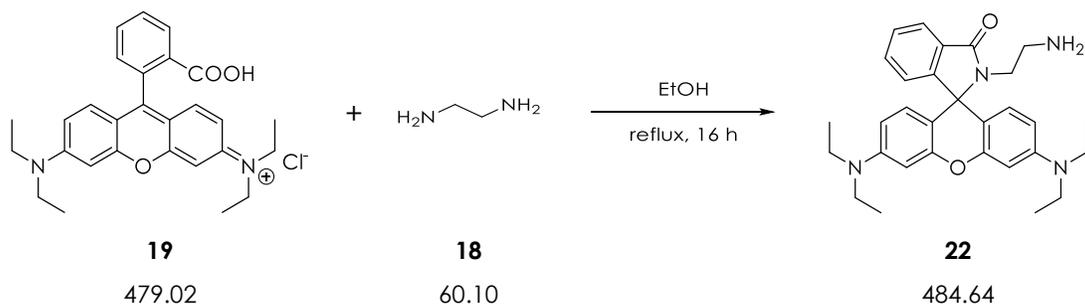
In einem 25 mL-Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre das BODIPY **12**, PyBOP und DIPEA (40 μ L) in 10 mL absolutiertem DMF gelöst. Nach Rühren für 30 min bei Raumtemperatur wurden das Maleimid **13** und weitere 20 μ L DIPEA zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht (12 h) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt als rot-violetter Feststoff erhalten. Auf eine weitere Aufreinigung wurde verzichtet, da das Produkt **14** (BODIPY-Maleimid) nicht erhalten werden konnte.

Rohausbeute

134.0 mg (0.35 mmol, 503 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 387.2322$ [M+H]⁺ (berechnet: 387.1379)

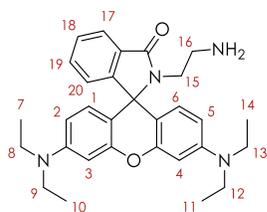
4.3.1.8. 2-(2-Aminoethyl)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isindolin-1,9'-xanthen]-3-on (**22**)**Ansatz und Durchführung** ^[102,107,138]

Rhodamin B	19	1.00 g		2.09 mmol
Ethyldiamin	18	0.90 g	1.0 mL	14.98 mmol

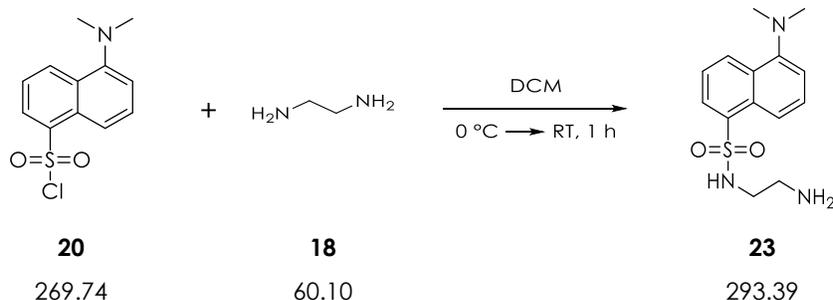
In einem 100 mL-Rundkolben wurde zu einer Lösung aus **19** in 25 mL Ethanol tropfenweise Ethyldiamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und 2 x mit je 15 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 2 x mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels als blassrosa Feststoff erhalten.

Ausbeute

0.96 g (1.98 mmol, 95 %) Literatur: 79 %^[138]

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 1.14 (12 H, t, H^{7,10,11,14}, J = 6.8 Hz), 2.38 (2 H, t, H¹⁶, J = 6.4 Hz),
 3.17 (2 H, t, H¹⁵, J = 6.8 Hz), 3.31 (8 H, q, H^{8,9,12,13}, J = 6.9 Hz),
 6.24-6.42 (6 H, m, H^{1-3,4-6}), 7.05-7.09 (1 H, m, H²⁰), 7.40-7.45
 (2 H, m, H^{18,19}), 7.86-7.90 (1 H, m, H¹⁷) ppm.

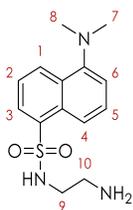
4.3.1.9. *N*-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid (**23**)

Ansatz und Durchführung^[102,107,139]

Dansylchlorid	20	0.10 g		0.37 mmol
Ethyldiamin	18	3.00 g	3.4 mL	50.00 mmol

Eine Lösung aus **20** in 10 mL DCM wurde zu einer gerührten Lösung aus **18** in 2 mL DCM in einem 50 mL-Rundkolben bei 0 °C langsam hinzugegossen. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren innerhalb von 1 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wurde anschließend mit 24 %iger Salzsäure angesäuert und 2 x mit je 20 mL DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 10 M Natronlauge auf pH 9 eingestellt und erneut 2 x mit je 20 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels als gelber Feststoff erhalten.

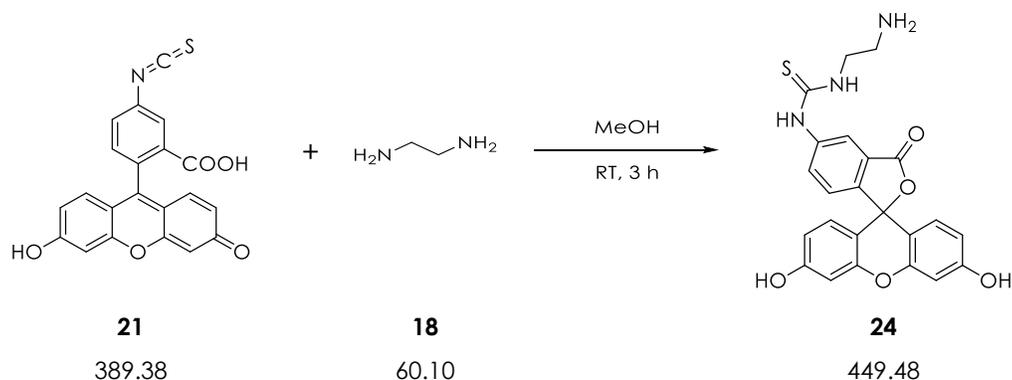
Ausbeute

44.1 mg (0.15 mmol, 41 %)

 Literatur: 92 %^[139]
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)


$\delta = 2.70$ (2 H, t, H¹⁰, $J = 6.4$ Hz), $2.87\text{-}2.91$ (8 H, m, H⁷⁻⁹), 7.17 (1 H, d, H¹, $J = 7.6$ Hz), $7.48\text{-}7.57$ (2 H, m, H^{2,5}), $8.23\text{-}8.29$ (2 H, m, H^{3,6}), 8.52 (1 H, d, H⁴, $J = 8.4$ Hz) ppm.

4.3.1.10. 1-(2-Aminoethyl)-3-(3',6'-dihydroxy-2-oxo-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thioharnstoff (**24**)



Ansatz und Durchführung^[102,107,140]

Fluoresceinisothiocyanat	21	63.0 mg		0.16 mmol
Ethyldiamin	18	9.6 mg	10.7 μ L	0.16 mmol

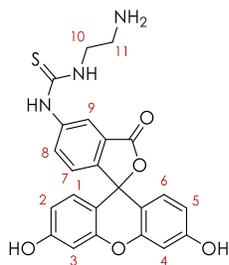
In einem 25 mL-Rundkolben wurde eine Lösung aus **18** in 5 mL Methanol tropfenweise zu einer Lösung aus **21** in 3 mL Methanol gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Methanol suspendiert. Das orange Produkt wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute

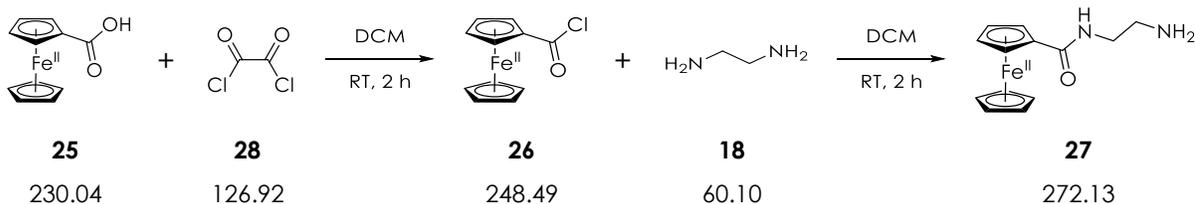
61.3 mg (0.14 mmol, 85 %)

Literatur: 97 %^[140]

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz)



δ = 3.16 (2 H, t, H¹¹, J = 6.3 Hz), 3.83 (2 H, t, H¹⁰, J = 5.7 Hz), 6.56-6.60 (4 H, m, H^{2,3,4,5}), 7.14-7.24 (3 H, m, H^{1,6,7}), 7.42 (1 H, d, H⁸, J = 8.0 Hz), 7.61 (1 H, s, H⁹) ppm.

4.3.1.11. *N*-(2-Aminoethyl)ferrocenamid (**27**) (METHODE A)

Ansatz und Durchführung^[200,201]

Ferrocencarbonsäure	25	0.20 g		0.87 mmol
Oxalylchlorid	28	0.30 g	0.2 mL	2.36 mmol
Ethylendiamin	18	0.47 g	0.5 mL	7.82 mmol

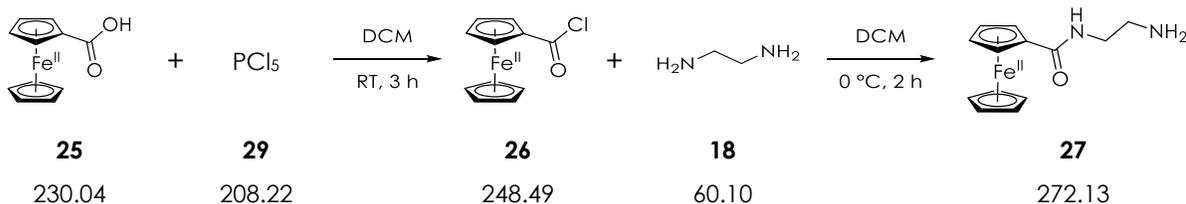
Zu einer Lösung aus der Carbonsäure **25** in 12 mL DCM wurde tropfenweise Oxalylchlorid gegeben. Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der rot-braune Rückstand in 6 mL DCM aufgenommen und tropfenweise über 30 min mit einer Lösung aus Ethylendiamin in 6 mL DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde erneut für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 2 x mit je 50 mL Kalilauge (10 % w/w) gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2 x mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bis zur Trockne eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zunächst mit Ethylacetat / Hexan (1 : 9) gewaschen und anschließend in Wasser gelöst und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute

0.17 g (0.63 mmol, 72 %) Literatur: 70 %^[200]

Analytik

vgl. Abschnitt 4.3.1.12 (Methode B)

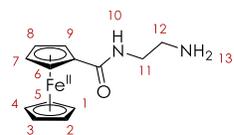
4.3.1.12. *N*-(2-Aminoethyl)ferrocenamid (**27**) (METHODE B)**Ansatz und Durchführung**^[202,203]

Ferrocencarbonsäure	25	0.23 g	1.00 mmol
Phosphorpentachlorid	29	0.21 g	1.00 mmol
Ethyldiamin	18	1.17 g 1.3 mL	19.47 mmol

Phosphorpentachlorid wurde unter Argon bei Raumtemperatur über 1.5 h in kleinen Portionen zu einer gerührten Lösung aus **25** in absolutiertem DCM gegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für weitere 1.5 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung zügig 4 x mit je 25 mL Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die rote Lösung wurde unter Argon über 2 h zu einer gerührten Lösung aus **18** in 25 mL absolutiertem DCM in einem zweiten Kolben getropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Filtrat wurde 2 x mit je 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat / Hexan (1 : 9) gewaschen, in Wasser gelöst und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt als orangebrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute

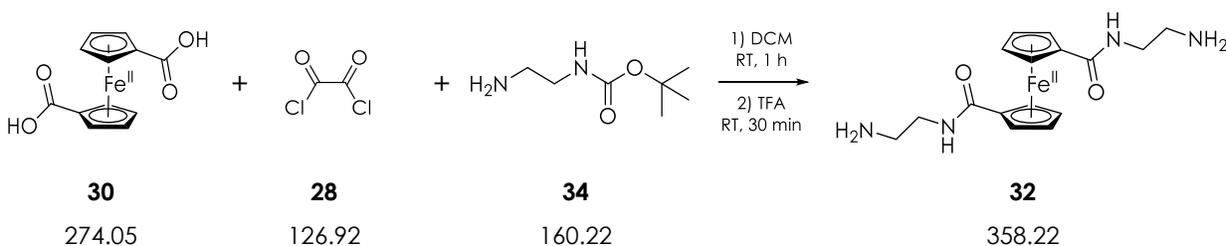
31.7 mg (0.12 mmol, 13 %)

Literatur: 70 %^[203]**¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)**

δ = 1.45 (2 H, br s, H¹³), 2.91 (2 H, t, H¹², J = 5.8 Hz), 3.42 (2 H, q, H¹¹, J = 5.8 Hz), 4.20 (5 H, s, H¹⁻⁵), 4.31-4.35 (2 H, m, H^{7,8}), 4.67-4.69 (2 H, m, H^{6,9}), 6.23 (1 H, s, H¹⁰) ppm.

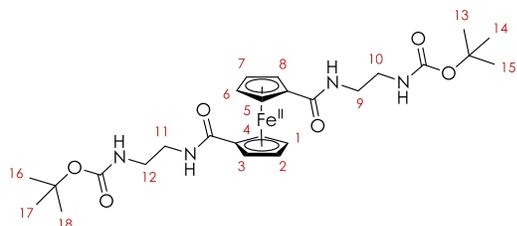
ESI-MS (+) m/z = 273.0680 [M+H]⁺

(berechnet: 273.0685)

4.3.1.13. 1,1'-Bis(*N,N'*-(2-Aminoethyl))ferrocenamid (**32**) (METHODE A)

Ansatz und Durchführung^[201]

Ferrocendicarbonsäure	30	0.10 g		0.36 mmol
Oxalylchlorid	28	0.25 g	0.2 mL	1.97 mmol
Boc-Ethylendiamin	34	0.29 g		1.80 mmol

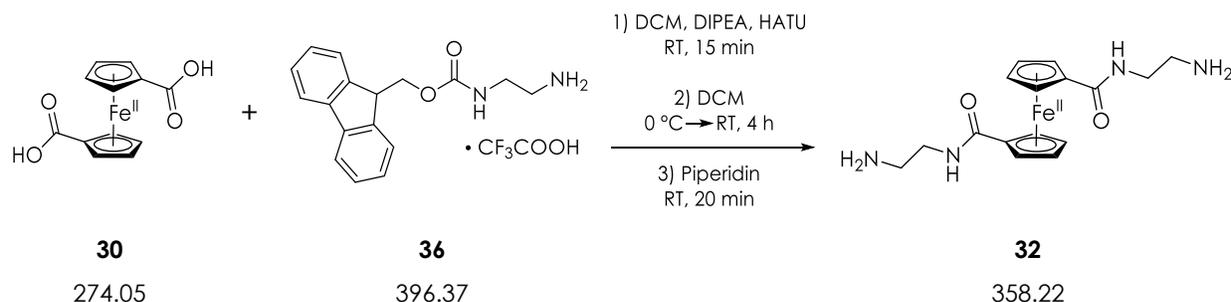
Die Carbonsäure **30** wurde in 10 mL DCM suspendiert und bei Raumtemperatur tropfenweise mit Oxalylchlorid versetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 1 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung des Säurechlorids über 1 h zu einer zweiten Lösung aus **34** in 6 mL DCM getropft. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend filtriert, 2 x mit je 50 mL Kalilauge (10 % w/w) gewaschen und im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt (Rohausbeute **32a**: 0.21 g, 0.38 mmol, 105 %). Der Rückstand wurde in 4 mL TFA gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen der überschüssigen Trifluoressigsäure und spektroskopischer Untersuchung des Rückstandes konnte kein Produkt gefunden werden.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)


32a: $\delta = 1.44$ (18 H, s, H¹³⁻¹⁸), 3.34-3.44 (4 H, m, H^{9,11}), 3.50-3.57 (4 H, m, H^{10,12}), 4.39 (4 H, t, H¹⁻⁴, $J = 1.8$ Hz), 4.55 (4 H, t, H⁵⁻⁸, $J = 1.8$ Hz) ppm.

ESI-MS (+)

$m/z = 559.2281$ [**32a**+H]⁺ (berechnet: 559.2214)

4.3.1.14. 1,1'-Bis(N,N'-(2-Aminoethyl))ferrocenamid (**32**) (METHODE B)**Ansatz und Durchführung**^[205]

Ferrocendicarbonsäure 30	1.00 g		3.65 mmol
Fmoc-Ethylendiamin 36	2.89 g		7.30 mmol
HATU	2.78 g		7.30 mmol
DIPEA	2.12 g	2.9 mL	16.43 mmol

In einem 250 mL-Schlenkcolben wurde unter Argon zu einer Lösung der Carbonsäure **30** in 70 mL frisch destilliertem DCM HATU und 1.3 mL DIPEA gegeben. Nach Rühren für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung filtriert und erneut unter Argonatmosphäre gesetzt. Das Gemisch wurde auf 0 °C abgekühlt und anschließend mit einer Lösung aus **36** und 1.6 mL DIPEA in 30 mL DCM versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit 140 mL DCM verdünnt und mit jeweils 70 mL H₂O (3 x), NaHCO₃ und 0.1 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt (Ausbeute **32b**: 2.29 g, 2.85 mmol, 78 %). Der Rückstand wurde erneut unter Argon in 50 mL DCM aufgenommen und mit ebenfalls 50 mL Piperidin versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand tropfenweise mit kaltem Methanol versetzt. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung des braunen Rückstandes mittels RP-HPLC konnte das Produkt als orange-braunes Piperidinhydrochlorid erhalten werden.

Ausbeute

0.42 g (1.17 mmol, 47 %)

Literatur: 74 %^[205]

RP-HPLC

Stationäre Phase: C₁₈-Säule, 10 µm, 10 x 250 mm

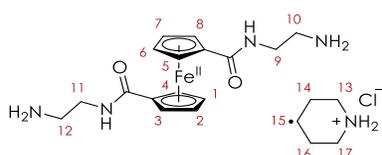
Eluent: Methanol (isokratisch)

Durchflussrate: 4 mL min⁻¹

Retentionszeit und Wellenlänge

3 min / 280 und 440 nm

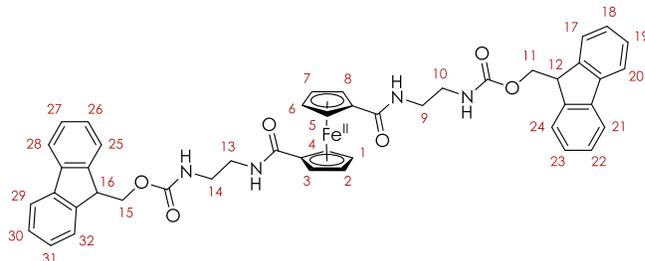
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz)



32: δ = 3.19 (4 H, t, H^{10,12}, J = 5.8 Hz), 3.61 (4 H, t, H^{9,12}, J = 5.8 Hz), 4.49 (4 H, t, H¹⁻⁴, J = 2.0 Hz), 4.82 (4 H, t, H⁵⁻⁸, J = 2.0 Hz) ppm.

1.64-1.80 (6 H, m, H¹⁴⁻¹⁶), 3.10-3.20 (4 H, m, H^{13,17}) ppm.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)



32b: δ = 3.28-3.57 (8 H, m, H^{9,10,13,14}), 4.16 (2 H, t, H^{12,16}, J = 4.2 Hz), 4.28-4.44 (8 H, m, H^{1-4,11,15}), 4.51 (4 H, br s, H⁵⁻⁸), 7.22 (4 H, t, H^{18,23,26,31}, J = 7.0 Hz), 7.33 (4 H, t, H^{19,22,27,30}, J = 7.3 Hz), 7.55 (4 H, d, H^{17,24,25,32}, J = 7,4 Hz), 7.70 (4 H, d, H^{20,21,28,29}, J = 7.5 Hz) ppm.

ESI-MS (+)

m/z = 359.1214 [**32**+H]⁺ (berechnet: 359.1165)

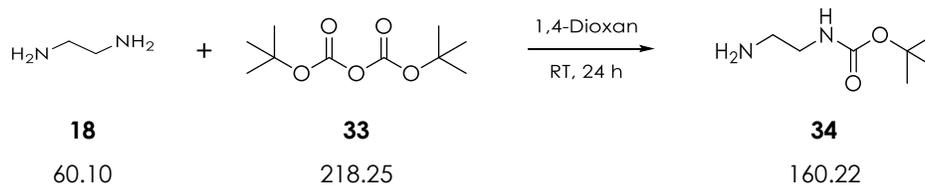
86.1004 [Piperidin+H]⁺ (berechnet: 86.0964)

CHN

C₁₆H₂₂FeN₄O₂ • 7 CH₃OH • 6 C₅H₁₂ClN

gefunden: 48.15 % C 11.02 % N 9.34 % H

berechnet: 48.51 % C 10.67 % N 9.37 % H

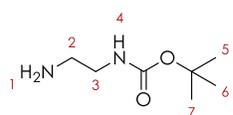
4.3.1.15. *N*-*tert*-Butoxycarbonylethan-1,2-diamin (**34**)**Ansatz und Durchführung**^[204]

Ethyldiamin	18	5.25 g	5.83 mL	87.35 mmol
Di- <i>t</i> butyldicarbonat	33	2.45 g		11.23 mmol

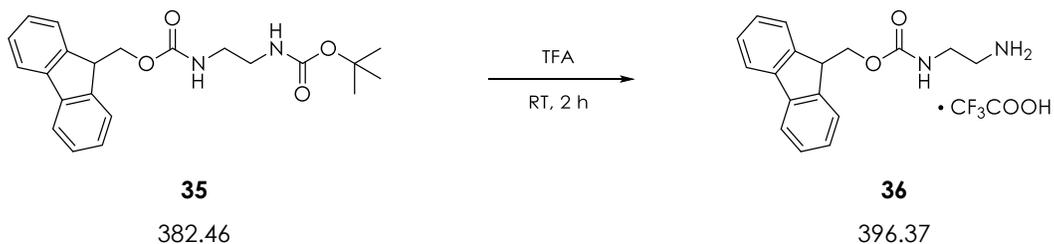
Eine Lösung aus **33** in 30 mL 1,4-Dioxan wurde über 2 h zu einer Lösung aus Ethyldiamin in 30 mL 1,4-Dioxan hinzuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Das unlösliche zweifach geschützte Produkt wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend 3 x mit je 50 mL DCM extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute

1.26 g (7.86 mmol, 70 %) Literatur: 90 %^[204]

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

$\delta = 1.17$ (2 H, s, H¹), 1.37 (9 H, s, H⁵⁻⁷), 2.72 (2 H, t, H², $J = 5.9$ Hz), 3.09 (2 H, q, H³, $J = 5.7$ Hz), 5.12 (1 H, br s, H⁴) ppm.

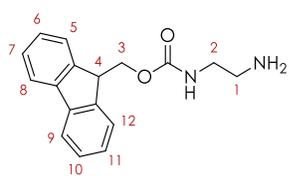
4.3.1.17. *N*-Fluorenylmethoxycarbonylethan-1,2-diamin-Trifluoracetat (**36**)**Ansatz und Durchführung**^[206]

N-Fmoc-*N'*-Boc-Ethylenediamin **35** 2.10 g 5.49 mmol

Das Ethylenediamin **35** wurde in 6 mL TFA gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die überschüssige Trifluoressigsäure wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde aus DCM umkristallisiert. Nach Filtration konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

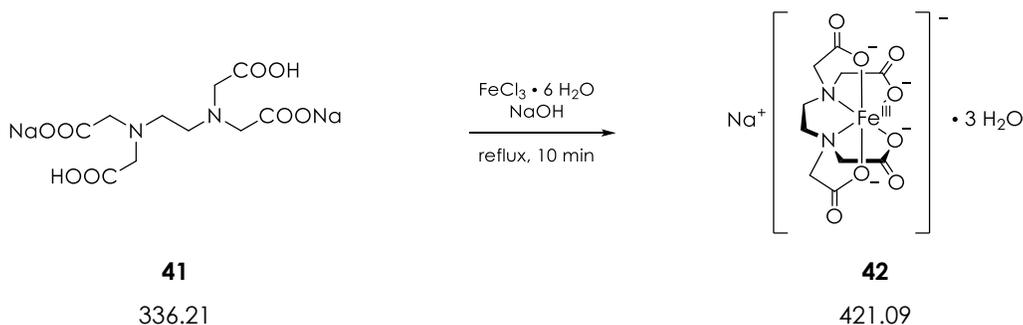
Ausbeute

1.96 g (4.94 mmol, 90 %) Literatur: 91 %^[206]

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz)

$\delta = 3.03$ (2 H, t, H¹, $J = 5.8$ Hz), 3.38 (2 H, t, H², $J = 5.9$ Hz), 4.21 (1 H, t, H⁴, $J = 6.5$ Hz), 4.42 (2 H, d, H³, $J = 6.6$ Hz), 7.31 (2 H, t, H^{6,11}, $J = 7.9$ Hz), 7.39 (2 H, t, H^{7,10}, $J = 7.4$ Hz), 7.65 (2 H, d, H^{5,12}, $J = 7.4$ Hz), 7.80 (2 H, d, H^{8,9}, $J = 7.5$ Hz) ppm.

4.3.1.18. Natrium[(ethyldiamintetracetato)ferrat(III)]-Trihydrat (**42**)



Ansatz und Durchführung ^[246]

Natriumethyldiamintetraessigsäure 41	3.36 g	10 mmol
Eisen(II)-chlorid-Hexahydrat	2.43 g	9 mmol
Natriumhydroxid	0.40 g	10 mmol

Natriumhydroxid und EDTA **41** wurden unter leichtem Erwärmen in 10 mL Wasser gelöst. Nach Zugabe von Eisen(III)-chlorid in 5 mL Wasser wurde das Reaktionsgemisch solange erhitzt bis das Produkt begann auszufallen. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Das Produkt konnte nach Lösen in Wasser und Fällung mit Aceton als gelber, kristalliner Feststoff erhalten werden.

Ausbeute

2.65 g (6.30 mmol, 70 %)

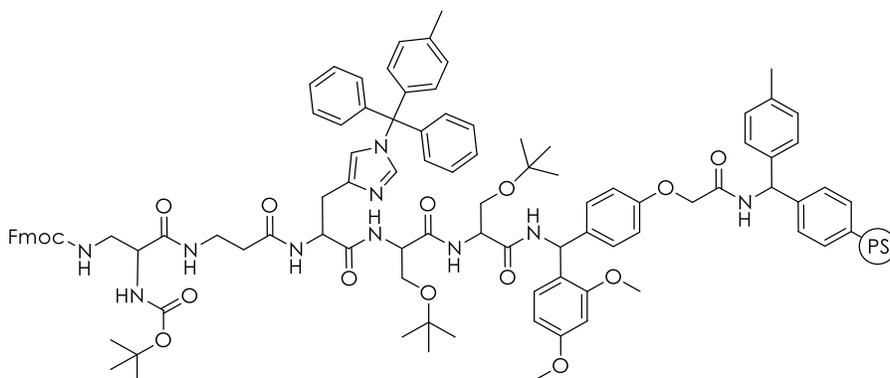
CHN

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{FeN}_2\text{NaO}_{11}$

gefunden: 28.52 % C 4.28 % N 6.60 % H

berechnet: 28.52 % C 4.31 % N 6.65 % H

4.3.1.19. ((N²-Boc)-(N³-Fmoc)-2,3-diaminopropanoyl)- β -alanyl-histidyl(Mtt)-seryl(^tBu)-seryl(^tBu)-Harz (Fmoc-P-NH-Harz / Fmoc-P₂-NH-Harz))

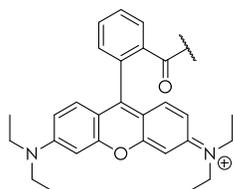
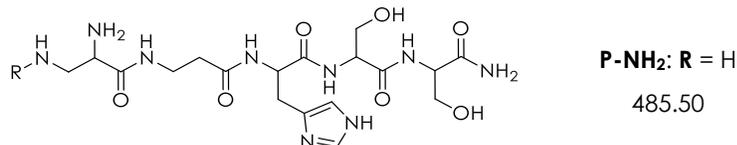


Ansatz und Durchführung^[105]

Rink-Amid MBHA-Harz	200.0 mg	118.0 μ mol
Fmoc-Serin(^t Bu)	181.5 mg	472.0 μ mol
Fmoc-Histidin(Mtt)	299.1 mg	472.0 μ mol
Fmoc- β -Alanin	147.0 mg	472.0 μ mol
Diaminopropansäure 3	201.2 mg	472.0 μ mol
PyBOP	245.6 mg	472.0 μ mol

Das Peptidgrundgerüst wurde mittels Fmoc-Strategie durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese aufgebaut. Das Rink-Amid MBHA-Harz (Beladung: 0.59 mmol/g) diente in einer 10 mL-Spritze aus Polypropylen mit Fritte als Festphase. Nach Trocknung aller Edukte im Vakuum für 1 h wurde das Harz für 1 h in 2 mL DMF aufgeschwemmt. Die Entschützungen wurden in je 2 mL 20 % Piperidin / DMF für 20-30 min und die Kopplungsschritte in DMF für 2 h unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde mit 5 x 2 mL DMF gewaschen. Für einen Ansatz von 200 mg des Harzes wurden jeweils vier Äquivalente der geschützten Aminosäure und des Aktivierungsreagenz' PyBOP sowie 200 μ L DIPEA zur Kopplung in 2-3 mL DMF verwendet. Nach dem letzten Kopplungsschritt wurde das Peptid 5 x mit je 2 mL DMF gewaschen, im Vakuum getrocknet und zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert (vgl. Abschnitt 4.3.1.20). Das Peptid Fmoc-P₂-NH-Harz wurde analog vorbereitet.

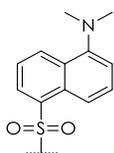
4.3.1.20. R-2,3-diaminopropanoyl-β-alanylhistidylserylserylamid (P-R)



P-RhB

R = Rhodamin B 19

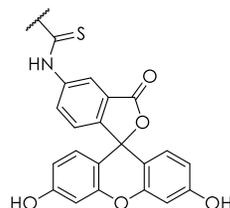
911.05



P-Dns

R = Dansyl 20

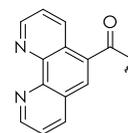
718.79



P-FITC

R = Fluorescein 21

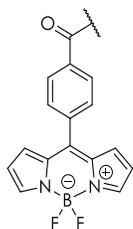
874.88



P-Phen

R = Phenanthrolin 40

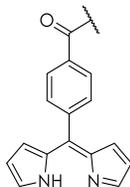
691.71



P-BODIPY

R = BODIPY 12

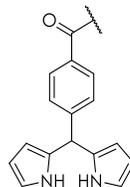
779.57



P-DPMe

R = Dipyromethen 11

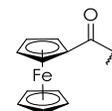
731.77



P-DPMa

R = Dipyromethan 10

733.79



P-Fc

R = Ferrocen 25

697.53

Ansatz und Durchführung^[105]

Fmoc-P-NH-Harz		200.0 mg	118.0 μmol
Rhodamin B	19	226.1 mg	472.0 μmol
Dansylchlorid	20	127.3 mg	472.0 μmol
Fluoresceinisothiocyanat (Isomer I)	21	183.8 mg	472.0 μmol
5-Phenanthrolinecarbonsäure	40	105.8 mg	472.0 μmol
BODIPY	12	147.3 mg	472.0 μmol
Dipyromethan	10	125.7 mg	472.0 μmol
Ferrocencarbonsäure	25	108.6 mg	472.0 μmol
PyBOP		245.6 mg	472.0 μmol

Für alle Peptide wurde jeweils ein Ansatz von 200 mg von Fmoc-**P-NH**-Harz, bezogen auf die eingesetzte Menge des Rink-Amid MBHA-Harzes, funktionalisiert. Die Kopplungen von Rhodamin B (**19**), der Carbonsäuren **25** und **40**, des BODIPY-Farbstoffes **12** sowie der Vorstufe **10** erfolgte analog zur Synthesebeschreibung unter Abschnitt 4.3.1.19. Für das Dansylchlorid **20** wurden als tertiäre Base 200 μ L Triethylamin anstelle von DIPEA verwendet. Ein zusätzliches Aktivierungsreagenz wurde hierbei und für die Kopplung des Fluoresceins **21** nicht benötigt, da beide Verbindungen bereits aktiviert sind.

Nach den Kopplungen bzw. der Fmoc-Abspaltung für das Peptid **P-NH₂** wurden die Harze jeweils 5 x mit je 2 mL DMF und je 2 mL DCM gewaschen und anschließend für 2 h im Vakuum getrocknet. Die Abspaltung der Schutzgruppen sowie der Peptide vom Harz wurde mit 2 mL TFA / H₂O / TIPS (bzw. Phenol statt TIPS für **P-Fc**) (95 : 2.5 : 2.5) innerhalb von 2 h durchgeführt. Nach Entfernen der Abspatlösung aus der Spritze wurden die Peptide durch Zugabe von 20 mL kaltem Diethylether ausgefällt. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, die Lösungsmittel abdekantiert und die Rückstände 2 x mit je 20 mL Ether gewaschen. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte über RP-HPLC.

RP-HPLC

Stationäre Phase: C₁₈-Säule, 10 μ m, 10 x 250 mm

Eluent: 0.1 % TFA in H₂O (A) / 0.1 % TFA in Acetonitril (B)

Gradient: 5–50 % B in 30 min, 50 % B für 3 min, zurück zu 5 % B in 2 min, 5 % B für 5 min

Durchflussrate: 4 mL min⁻¹

Retentionszeiten und Wellenlängen

P-NH₂ :	4.8 min / 280 nm
P-RhB :	19.4 min (Lactam-Form) und 26.3 min (offene Form) / 280 und 552 nm
P-Dns :	10.1 min / 280 und 330 nm
P-FITC :	18.4 min / 280 und 488 nm
P-Phen :	6.9 min / 220 und 330 nm
P-BODIPY :	16.0 min / 220 und 500 nm
P-DPMe :	10.5 min / 220 und 500 nm (bei der Reinigung von P-BODIPY isoliert)
P-DPMa :	nicht detektiert (zerfällt zu Verbindung 16 (13.0 min) und 17 (11.5 min))
P-Fc :	11.2 min / 280 und 440 nm

Ausbeuten (UV/Vis-Spektroskopie vgl. Abschnitt 4.5)

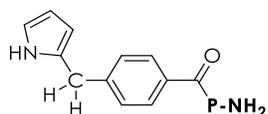
P-NH₂:	14.6 mg (30.1 μmol, 26 %)
P-RhB:	47.3 mg (46.2 μmol, 30 %)
P-Dns:	44.6 mg (62.0 μmol, 53 %)
P-FITC:	3.4 mg (3.9 μmol, 3 %)
P-Phen:	48.4 mg (70.0 μmol, 59 %)
P-BODIPY:	7.9 mg (10.1 μmol, 8 %)
P-DPMe:	19.1 mg (26.1 μmol, 22 %)
P-Fc:	41.8 mg (60.0 μmol, 51 %)

ESI-MS (+)

P-NH₂:	m/z = 486.2441 [M+H] ⁺	(berechnet: 486.2419)
P-RhB:	m/z = 910.4592 [M _{Lactam} +H] ⁺	(berechnet: 910.4570)
P-Dns:	m/z = 719.2906 [M+H] ⁺	(berechnet: 719.2930)
P-FITC:	m/z = 875.2719 [M+H] ⁺	(berechnet: 875.2777)
P-Phen:	m/z = 692.2922 [M+H] ⁺	(berechnet: 692.2899)
P-BODIPY:	m/z = 780.3197 [M+H] ⁺	(berechnet: 780.3195)
P-DPMe:	m/z = 732.3240 [M+H] ⁺	(berechnet: 732.3212)
P-Fc:	m/z = 698.2348 [M+H] ⁺	(berechnet: 698.2344)

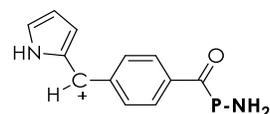
Anmerkungen

Das Peptid **P-DPMe** konnte nicht isoliert werden, da es laut ESI-MS zu den Verbindungen **16** und **17** zerfällt.



16

m/z = 669.3100 [**16**+H]⁺
(berechnet: 669.3103)

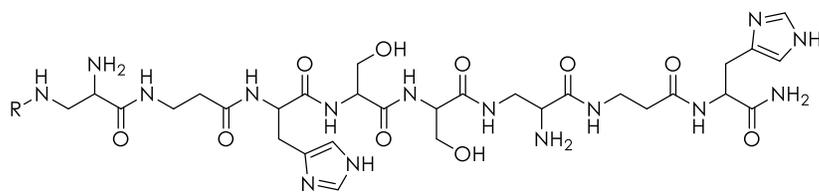


17

m/z = 667.2959 [**17**]⁺
(berechnet: 667.2947)

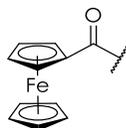
Das Peptid **P-DPMe** wurde nicht synthetisiert, sondern konnte während der Reinigung von **P-BODIPY** isoliert werden.

4.3.1.21. **R-2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylserylseryl-2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylamid (**P₂-R**)**



P₂-NH₂: R = H

779.82



P₂-Fc

R = Ferrocen 25

991.85

Ansatz und Durchführung^[105]

Rink-Amid MBHA-Harz		200.0 mg	118.0 μ mol
Fmoc-Serin(^t Bu)		181.5 mg	472.0 μ mol
Fmoc-Histidin(Mtt)		299.1 mg	472.0 μ mol
Fmoc- β -Alanin		147.0 mg	472.0 μ mol
Diaminopropansäure	3	201.2 mg	472.0 μ mol
Ferrocencarbonsäure	25	108.6 mg	472.0 μ mol
PyBOP		245.6 mg	472.0 μ mol

Die Synthese der Peptide erfolgte analog zu Abschnitt 4.3.1.19, wobei die Aminosäuresequenz um die Einheit 2,3-Diaminopropanoyl- β -alanylhistidin erweitert wurde. Für die Abspaltung des Peptids **P₂-NH₂** wurde ein Gemisch aus TFA / H₂O / TIPS und für **P₂-Fc** ein Gemisch aus TFA / H₂O / Phenol (jeweils 95 : 2.5 : 2.5) verwendet. Die Aufreinigung der gefällten Peptide erfolgte mittels RP-HPLC.

RP-HPLC

Stationäre Phase: C₁₈-Säule, 10 μ m, 10 x 250 mm

Eluent: 0.1 % TFA in H₂O (A) / 0.1 % TFA in Acetonitril (B)

Gradient: 5–50 % B in 30 min, 50 % B für 3 min, zurück zu 5 % B in 2 min, 5 % B für 5 min

Durchflussrate: 4 mL min⁻¹

Retentionszeiten und Wellenlängen

P₂-NH₂: 5.1 min / 280 nm

P₂-Fc: 12.7 min / 280 und 440 nm

Ausbeuten (UV/Vis-Spektroskopie vgl. Abschnitt 4.5)

P₂-NH₂: 8.8 mg (11.3 µmol, 10 %)

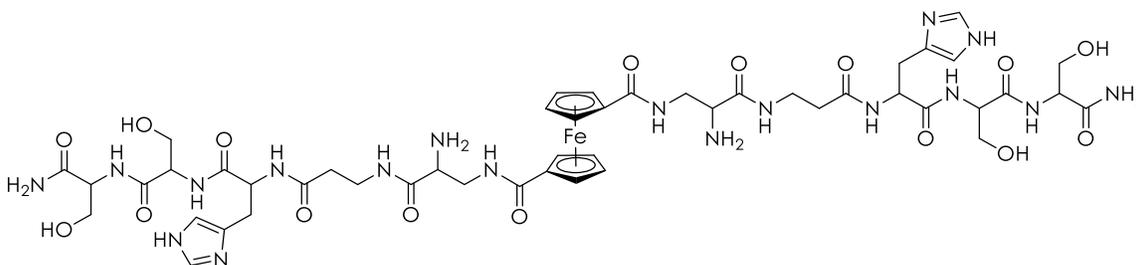
P₂-Fc: 17.0 mg (17.1 µmol, 15 %)

ESI-MS (+)

P₂-NH₂: m/z = 780.3873 [M+H]⁺ (berechnet: 780.3860)

P₂-Fc: m/z = 992.3757 [M+H]⁺ (berechnet: 992.3784)

4.3.1.22. 1,1'-Bis(2,3-diaminopropanoyl- β -alanylhistidylserylserylamid)ferrocenamid (P-Fc-P)

**P-Fc-P**

1208.44

Ansatz und Durchführung^[105]

Rink-Amid MBHA-Harz		200.0 mg	118.0 μ mol
Fmoc-Serin(^t Bu)		181.5 mg	472.0 μ mol
Fmoc-Histidin(Mtt)		299.1 mg	472.0 μ mol
Fmoc- β -Alanin		147.0 mg	472.0 μ mol
Diaminopropansäure	3	201.2 mg	472.0 μ mol
Ferrocencarbonsäure	30	16.2 mg	472.0 μ mol
PyBOP		245.6 mg	472.0 μ mol

Analog zur Synthesevorschrift in Abschnitt 4.3.1.19 wurde zunächst das Peptid Fmoc-**P-NH**-Harz aufgebaut. Entgegen der typischen Peptidsynthese wurde jedoch für die Kopplung der Ferrocencarbonsäure **30** diese mit 0.5 Äquivalenten im Unterschuss eingesetzt, damit ein Ferrocen- mit zwei Peptidmolekülen reagieren kann. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde die Reaktionszeit auf 5 h verlängert. Die Abspaltung wurde erneut mit TFA / H₂O / TIPS (95 : 2.5 : 2.5) und die anschließende Aufreinigung mittels RP-HPLC durchgeführt.

RP-HPLC

Stationäre Phase: C₁₈-Säule, 10 μ m, 10 x 250 mm

Eluent: 0.1 % TFA in H₂O (A) / 0.1 % TFA in Acetonitril (B)

Gradient: 5–50 % B in 30 min, 50 % B für 3 min, zurück zu 5 % B in 2 min, 5 % B für 5 min

Durchflussrate: 4 mL min⁻¹

Retentionszeit und Wellenlängen

8.2 min / 280 und 440 nm

Ausbeute (UV/Vis-Spektroskopie vgl. Abschnitt 4.5)

9.0 mg (7.5 μmol , 6 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 1209.4485$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet: 1209.4483)

4.3.1.23. Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe der ATCUN-Peptide

Durchführung

Zu 500 μL einer 1 mM Lösung der Peptide in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) wurden 500 μL einer 0.8 mM (1 : 1-Komplexe) bzw. 1.6 mM (1 : 2-Komplexe) Lösung Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat bzw. Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat gegeben. Die Lösungen wurden für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

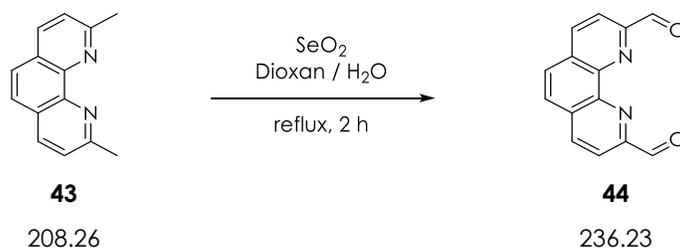
Für die Komplexe des Peptids **P-Phen** wurde zunächst die Peptidlösung mit einer Lösung des Kupfer(II)- bzw. Nickel(II)-Salzes für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Assoziationskonstante des ATCUN-Komplexes größer ist, wurde erst im zweiten Schritt diese Lösung mit einer 0.8 mM Lösung des Komplexes **Cu(37)** versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

ESI-MS (+)

Cu(P-NH₂):	$m/z = 547.1553 [M+H]^+$	(berechnet: 547.1559)
Cu₂(P₂-NH₂):	$m/z = 451.6069 [M+2H]^{2+}$	(berechnet: 451.6106)
Cu(P-RhB):	$m/z = 971.3707 [M_{\text{Lactam}}+H]^+$	(berechnet: 971.3710)
Cu(P-Dns):	$m/z = 780.2089 [M+H]^+$	(berechnet: 780.2069)
Cu(P-FITC):	$m/z = 958.1742 [M+H]^+$	(berechnet: 958.1746)
Cu(P-Fc):	$m/z = 759.1498 [M+H]^+$	(berechnet: 759.1483)
Cu(P₂-Fc):	$m/z = 557.6063 [M+2H]^{2+}$	(berechnet: 557.6068)
Cu(P-Fc-P):	$m/z = 666.1430 [M+2H]^{2+}$	(berechnet: 666.1417)
Cu(phen)(P-Phen):	$m/z = 467.1425 [M-2 \text{NO}_3]^{2+}$	(berechnet: 467.1400)
Cu(phen)Cu(P-Phen):	$m/z = 497.5938 [M-2 \text{NO}_3]^{2+}$	(berechnet: 497.5969)
Cu(P-Phen):	$m/z = 753.2048 [M+H]^+$	(berechnet: 753.2039)
Cu₂(P-Phen):	$m/z = 407.5635 [M-2 \text{Cl}]^{2+}$	(berechnet: 407.5626)
Cu(phen)Ni(P-Phen):	$m/z = 495.1043 [M-2 \text{NO}_3]^{2+}$	(berechnet: 495.0998)
Ni(P-Phen):	$m/z = 748.2092 [M+H]^+$	(berechnet: 748.2096)
Ni₂(P-Phen):	$m/z = 840.1073 [M-\text{Cl}]^+$	(berechnet: 840.1060)

4.3.2. 2,9-Disubstituierte Phenanthroline

4.3.2.1. 1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarboxaldehyd (**44**)



Ansatz und Durchführung^[281]

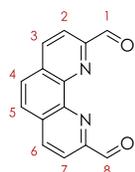
Neocuproin	43	10.00 g	48.02 mmol
Selen(IV)-oxid		25.00 g	225.31 mmol

In einem 1 L-Rundkolben wurden Neocuproin und Selen(IV)-oxid in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan (643.2 mL) und Wasser (4 % = 26.8 mL) gelöst und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde heiß über Celite filtriert. Nach dreimaliger Umkristallisation des ausgefallenen Feststoffs aus 1,4-Dioxan / Wasser (4 %) wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

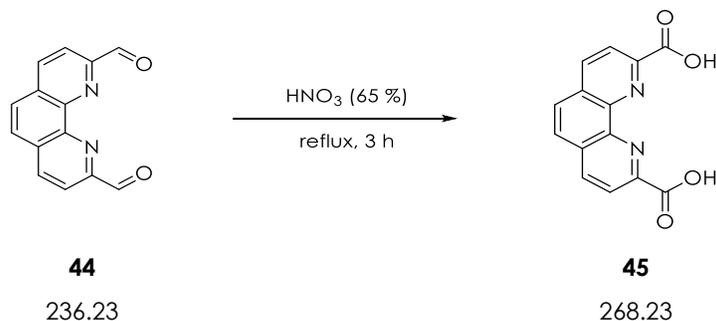
Ausbeute

5.37 g (22.73 mmol, 47 %) Literatur: 70 %^[281]

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)



$\delta = 8.28$ (2 H, s, H^{4,5}), 8.31 (2 H, d, H^{3,6}, $J = 8.2$ Hz), 8.79 (2 H, d, H^{2,7}, $J = 8.2$ Hz), 10.35 (2 H, s, H^{1,8}) ppm.

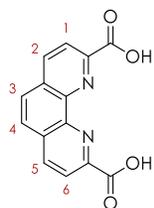
4.3.2.2. 1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarbonsäure (**45**)**Ansatz und Durchführung** ^[281]

Dicarboxaldehyd **44** 0.50 g 2.12 mmol

Der Dialdehyd **44** wurde in 14 mL Salpetersäure (65 %) gelöst und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf Eis gegeben und der Niederschlag wurde abfiltriert. Nach Umkristallisation aus Acetonitril konnte das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten werden.

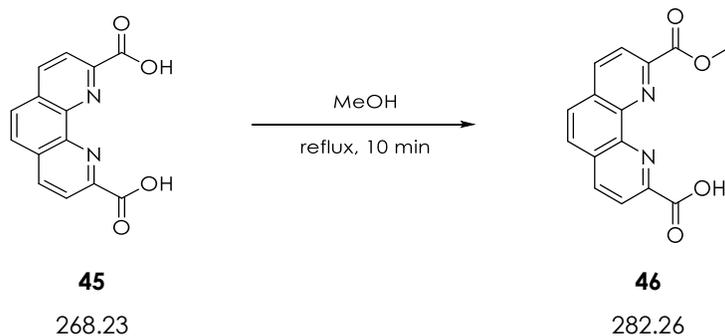
Ausbeute

0.35 g (1.31 mmol, 62 %) Literatur: 61 %^[281]

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)

$\delta = 8.18$ (2 H, s, H^{3,4}), 8.38 (2 H, d, H^{1,6}, $J = 8.3$ Hz), 8.70 (2 H, d, H^{2,5}, $J = 8.3$ Hz) ppm.

4.3.2.3. 9-Methoxycarbonyl-1,10-phenanthrolin-2-carbonsäure (**46**)



Ansatz und Durchführung

Dicarbonsäure **45** 0.27 g 0.93 mmol

Nach Umkristallisation der Carbonsäure **45** aus Methanol wurde das Produkt als grün-gelber, kristalliner Feststoff erhalten.

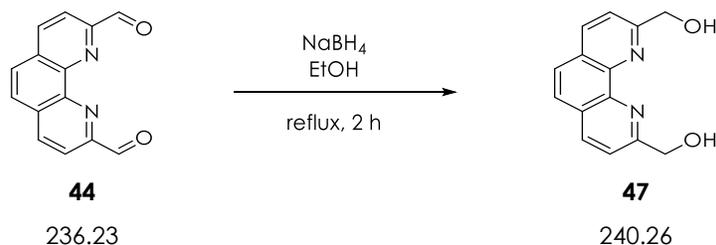
Ausbeute

0.15 g (0.53 mmol, 57 %)

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)



$\delta = 3.99$ (3 H, s, H⁷), 8.18 (2 H, d, H^{3,4}, $J = 1.6$ Hz), 8.38 (2 H, dd, H^{1,6}, $J = 8.3, 1.6$ Hz), 8.71 (2 H, dd, H^{2,5}, $J = 8.3, 1.6$ Hz) ppm.

4.3.2.4. 2,9-Bis(hydroxymethyl)-1,10-phenanthrolin (**47**)**Ansatz und Durchführung**^[281]

Dicarboxaldehyd 44	2.13 g	9.02 mmol
Natriumborhydrid	0.43 g	11.28 mmol

Eine Lösung aus **44** und Natriumborhydrid in 215 mL Ethanol wurde für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Umkristallisation des Rückstands wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

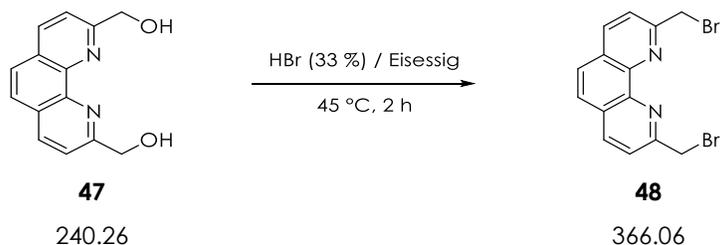
Ausbeute

0.98 g (4.08 mmol, 45 %) Literatur: 68 %^[281]

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)

$\delta = 4.84$ (4 H, d, H^{2,9}, $J = 4.4$ Hz), 5.65 (2 H, t, H^{1,10}, $J = 5.3$ Hz), 7.83 (2 H, d, H^{3,8}, $J = 8.3$ Hz), 7.89 (2 H, s, H^{5,6}), 8.44 (2 H, d, H^{4,7}, $J = 8.3$ Hz) ppm.

4.3.2.5. 2,9-Bis(brommethyl)-1,10-phenanthrolin (**48**)



Ansatz und Durchführung^[282]

Dialkohol **47** 0.64 g 2.66 mmol

Der Dialkohol **47** in 35 mL HBr (33 %) / Eisessig wurde bei 45-50 °C für 20 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf 200 mL Diethylether gegeben und der Niederschlag wurde abfiltriert. Der gelbe Feststoff wurde durch Lösen in 100 mL gesättigter Natriumcarbonatlösung neutralisiert und anschließend 3 x mit je 150 mL DCM extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

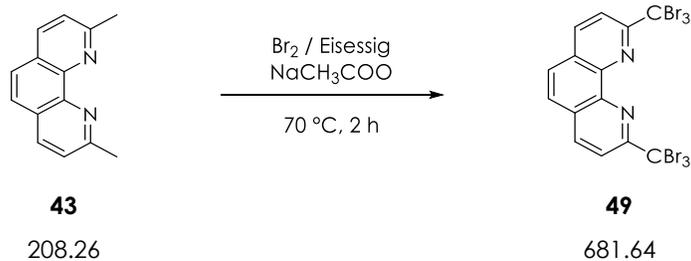
Ausbeute

0.45 g (1.22 mmol, 45 %) Literatur: 69 %^[282]

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)



$\delta = 4.96$ (4 H, s, H^{1,8}), 7.81 (2 H, s, H^{4,5}), 7.90 (2 H, d, H^{3,6}, $J = 8.3$ Hz), 8.28 (2 H, d, H^{2,7}, $J = 8.3$ Hz) ppm.

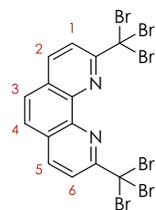
4.3.2.6. 2,9-Bis(tribrommethyl)-1,10-phenanthrolin (**49**)**Ansatz und Durchführung**^[281]

Neocuproin	43	1.00 g	4.80 mmol
Natriumacetat		4.40 g	53.64 mmol
Brom		4.40 g 1.4 mL	27.53 mmol

Zu einer Lösung aus Neocuproin und Natriumacetat in 150 mL Eisessig wurde bei 70 °C eine Lösung aus Brom in 20 mL Eisessig über 15 min hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 100 mL Wasser zur Reaktionslösung gegeben und der gebildete Feststoff wurde abfiltriert. Nach Umkristallisation aus Methanol wurde das Produkt als gelb-oranger Feststoff erhalten.

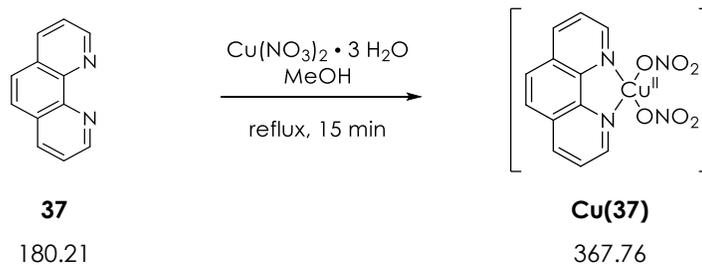
Ausbeute

1.27 g (1.86 mmol, 39 %) Literatur: 76 %^[281]

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)

$\delta = 8.19$ (2 H, s, H^{3,4}), 8.50 (2 H, d, H^{2,5}, $J = 8.6$ Hz), 8.72 (2 H, d, H^{1,6}, $J = 8.6$ Hz) ppm.

4.3.2.7. [(1,10-Phenanthrolin)(dinitrato)kupfer(II)] (Cu(37))



Ansatz und Durchführung^[211]

Phenanthrolin	37	200.0 mg	1.11 mmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		268.2 mg	1.11 mmol

Zu einer Lösung aus Phenanthrolin in 9 mL Methanol wurde das Kupfer(II)-Salz in 1 mL Methanol unter Rühren hinzugegeben. Nach Erhitzen der Lösung für 10 min unter Rückfluss wurde der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wurde als dunkelblauer, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute

320.0 mg (0.87 mmol, 78 %)

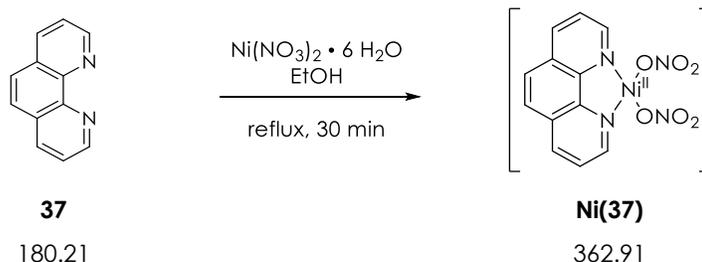
ESI-MS (+)

m/z = 304.9836 [M-NO₃]⁺ (berechnet: 304.9862)

CHN

C₁₂H₈CuN₄O₆

gefunden:	39.30 % C	15.20 % N	2.21 % H
berechnet:	39.19 % C	15.23 % N	2.19 % H

4.3.2.8. **[(1,10-Phenanthrolin)(dinitrato)nickel(II)] (Ni(37))****Ansatz und Durchführung**

Phenanthrolin	37	500.0 mg	2.77 mmol
Nickel(II)-nitrat-Hexahydrat		805.5 mg	2.77 mmol

Zu einer Lösung aus Phenanthrolin in 8 mL heißem Ethanol wurde das Nickel(II)-Salz in 2 mL Ethanol unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 30 mL Diethylether hinzugegeben und der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert. Nach Umkristallisation aus Ethanol und Trocknung im Vakuum wurde das Produkt als helllila Feststoff erhalten.

Ausbeute

440.0 mg (1.21 mmol, 44 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 299.9911$ $[\text{M-NO}_3]^+$ (berechnet: 299.9919)

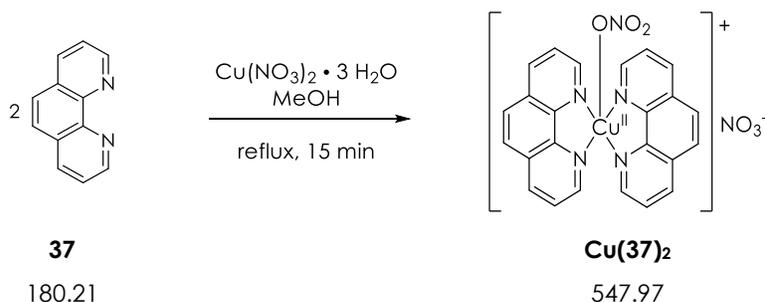
CHN

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{NiO}_6 \cdot 0.25 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \cdot 4.5 \text{H}_2\text{O}$

gefunden: 33.12 % C 12.44 % N 4.03 % H

berechnet: 32.96 % C 12.30 % N 4.09 % H

4.3.2.9. [Bis(1,10-phenanthrolin)(nitrato)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(37)₂**)



Ansatz und Durchführung^[211]

Phenanthrolin	37	200.0 mg	1.11 mmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		135.3 mg	0.56 mmol

In einem 25 mL-Rundkolben wurde zu einer Lösung aus Phenanthrolin in 9 mL Methanol das Kupfer(II)-Salz in 1 mL Methanol unter Rühren hinzugegeben. Nach Erhitzen der Lösung für 15 min unter Rückfluss wurde der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wurde als türkis, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute

224.7 mg (0.41 mmol, 73 %)

ESI-MS (+)

m/z = 485.0666 [M-NO₃]⁺ (berechnet: 485.0549)

CHN

C₂₄H₁₆CuN₆O₆ · CH₃OH

gefunden: 51.65 % C 14.49 % N 3.57 % H

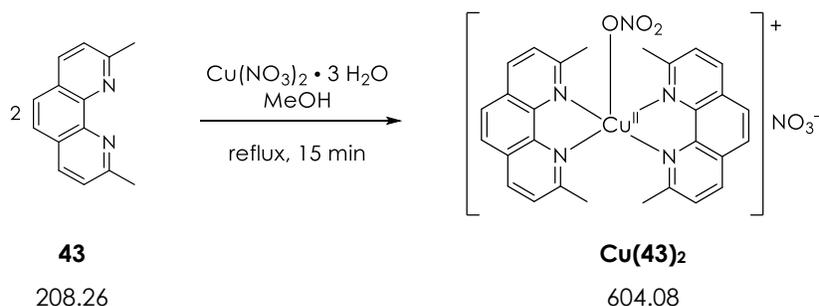
berechnet: 51.77 % C 14.49 % N 3.48 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: C₂₄H₁₆CuN₆O₆ · CH₃OH

Einkristalle für die Strukturbestimmung durch Röntgenbeugung wurden durch Etherdiffusion in eine methanolische Lösung des Komplexes **Cu(37)₂** erhalten.

4.3.2.11. [Bis(2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin)(nitrato)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(43)₂**)



Ansatz und Durchführung^[211]

Neocuproin	43	200.0 mg	0.96 mmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		116.0 mg	0.48 mmol

Zu einer Lösung aus Neocuproin in 9 mL Methanol wurde unter Rühren das Kupfer(II)-Salz in 1 mL Methanol hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 15 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abfiltration und Trocknung des Niederschlags wurde das Produkt als limettengrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute

175.2 mg (0.29 mmol, 60 %)

ESI-MS (+)

m/z = 479.1225 [M-2 NO₃]⁺ (berechnet: 479.1297)

CHN

C₂₈H₂₄CuN₆O₆ · H₂O

gefunden: 54.06 % C 13.51 % N 4.28 % H

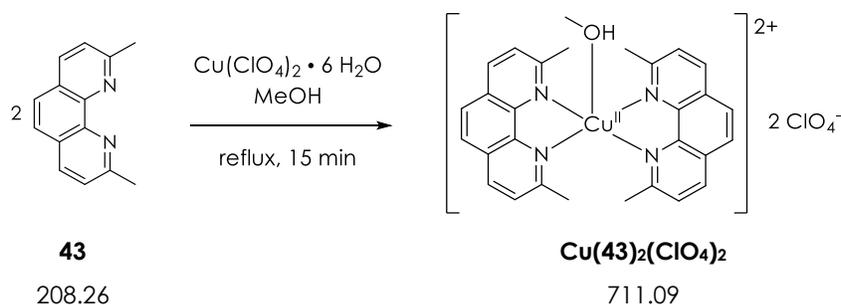
berechnet: 54.06 % C 13.51 % N 4.21 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: C₂₈H₂₄CuN₆O₆

Einkristalle für die Strukturbestimmung durch Röntgenbeugung wurden durch Etherdiffusion in eine methanolische Lösung des Komplexes **Cu(43)₂** erhalten.

4.3.2.12. [Bis(2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin)(methanol)kupfer(II)]-perchlorat
(**Cu(43)**₂(ClO₄)₂)



Ansatz und Durchführung

Neocuproin	43	200.0 mg	0.96 mmol
Kupfer(II)-perchlorat-Hexahydrat		177.9 mg	0.48 mmol

Zu einer Lösung aus Neocuproin in 4 mL Methanol wurde unter Rühren das Kupfer(II)-Salz in 1 mL Methanol hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 10 min unter Rückfluss erhitzt. Der gebildete Niederschlag wurde durch Zugabe von weiteren 10 mL Methanol gelöst und die Lösung wurde erneut für 5 min refluxiert. Nach Abkühlen auf -20 °C für 24 h wurde das Produkt in Form von dunkelgrünen Kristallnadeln erhalten.

Ausbeute

256.0 mg (0.36 mmol, 75 %)

ESI-MS (+)

m/z = 479.1238 [M-2 ClO₄-MeOH]⁺ (berechnet: 479.1297)

CHN

C₂₈H₂₄Cl₂CuN₄O₈ · CH₃OH · 0.05 C₁₄H₁₂N₂

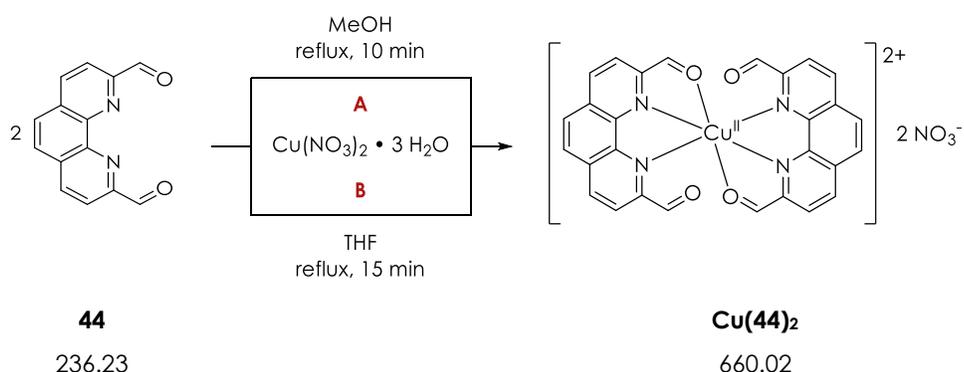
gefunden: 49.56 % C 8.25 % N 4.29 % H

berechnet: 49.45 % C 7.96 % N 4.00 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: C₂₈H₂₄Cl₂CuN₄O₈(CH₃OH)

Einkristalle für die Strukturbestimmung wurden durch Kristallisation des Komplexes **Cu(43)₂(ClO₄)₂** aus einer methanolischen Lösung bei -20 °C erhalten.

4.3.2.13. [Bis(1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxaldehyd)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(44)**)₂

Ansatz und Durchführung

Dialdehyd	44	50.0 mg	211.7 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		25.6 mg	105.8 μmol

Der Ligand **44** wurde in 4 mL heißem Methanol (**A**) bzw. 6 mL heißem THF (**B**) gelöst. Nach Zugabe des Kupfer(II)-Salzes in 1 mL des entsprechenden Lösungsmittels wurde das Reaktionsgemisch für 10-15 min unter Rückfluss erhitzt.

A: Die Lösung wurde heiß filtriert und das Produkt wurde nach Einengen der Lösung als grüner Feststoff erhalten.

B: Der Niederschlag wurde abfiltriert und aus THF / H₂O (1 : 1) umkristallisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der grüne Rückstand an der Luft getrocknet.

Ausbeute

A: 29.8 mg (45.2 μmol, 43 %) **B:** 26.4 mg (40.0 μmol, 38 %)

ESI-MS (+)

A / B: m/z = 534.0384 [M-2 NO₃-H]⁺ (berechnet: 534.0395)

CHN

A: C₂₈H₁₆CuN₆O₁₀ • 2 CH₃OH • 3 H₂O

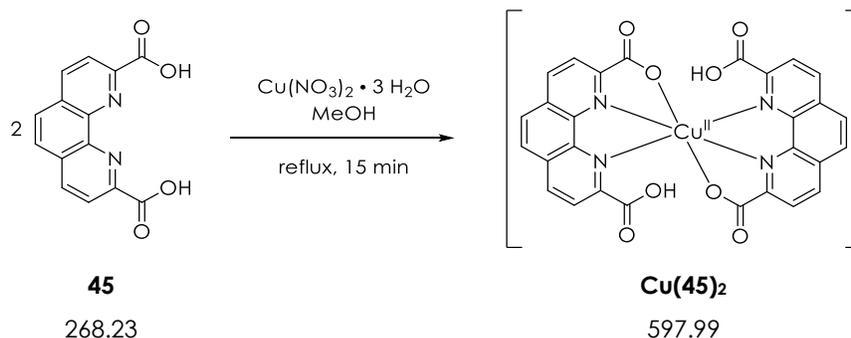
gefunden: 46.34 % C 10.85 % N 3.97 % H

berechnet: 46.31 % C 10.80 % N 3.89 % H

B: C₂₈H₁₆CuN₆O₁₀ • 1.5 C₄H₈O • 2 H₂O

gefunden: 50.77 % C 10.72 % N 3.83 % H

berechnet: 50.78 % C 10.45 % N 4.01 % H

4.3.2.14. [Bis(9-carboxy-1,10-phenanthrolin-2-carboxylato)kupfer(II)] (Cu(45)₂)**Ansatz und Durchführung**

Dicarbonsäure	45	50.0 mg	186.4 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		22.5 mg	93.2 μmol

Zu einer Lösung des Liganden **45** in 4 mL heißem Methanol wurde eine Lösung des Kupfer(II)-Salzes in 4 mL Methanol gegeben. Die Lösung wurde für 15 min unter Rückfluss erhitzt und der gebildete Feststoff anschließend heiß abfiltriert. Das Produkt wurde nach Trocknung im Vakuum als hellgrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute

16.5 mg (27.6 μmol, 30 %)

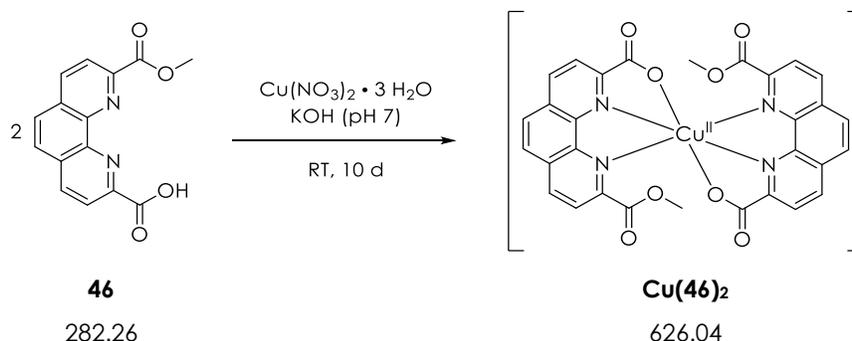
ESI-MS (+)

$m/z = 598.0498$ [M+H] ⁺	(berechnet: 598.0180)
329.9712 [M-L] ⁺	(berechnet: 329.9702)

CHN

$\text{C}_{28}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}_8 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$

gefunden:	55.14 % C	8.79 % N	2.89 % H
berechnet:	55.29 % C	8.89 % N	2.88 % H

4.3.2.15. [Bis(9-methoxycarbonyl-1,10-phenanthrolin-2-carboxylato)kupfer(II)]
 (Cu(46)₂)

Ansatz und Durchführung

Carbonsäureester	46	25.0 mg	88.6 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		10.7 mg	44.3 μmol

Der Ligand **46** und das Kupfer(II)-Salz wurden in einem 1 : 1-Gemisch aus Methanol und Wasser (20 mL) unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde mit verdünnter Kaliumhydroxidlösung auf pH 7 eingestellt und anschließend in ein Becherglas filtriert. Das Glas wurde mit perforiertem Parafilm verschlossen und die Lösungsmittel langsam verdampft. Nach 10 Tagen wurden die grünen Kristalle abfiltriert.

Ausbeute

20.1 mg (32.1 μmol, 72 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 626.0521$ [M+H]⁺ (berechnet: 626.0493)

CHN

C₃₀H₁₈CuN₄O₈ • 2 H₂O

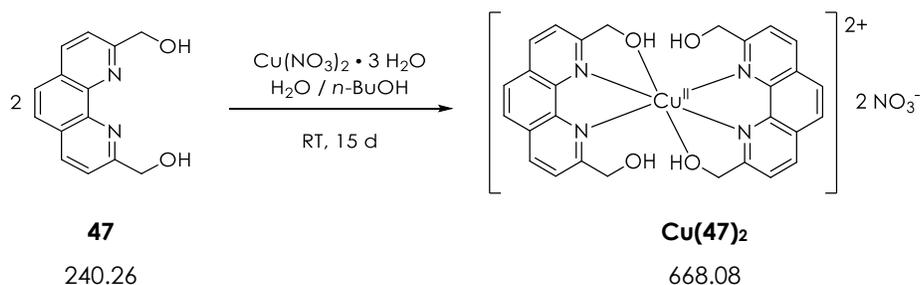
gefunden: 54.46 % C 8.36 % N 2.99 % H

berechnet: 54.42 % C 8.46 % N 3.35 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: C₃₀H₁₈CuN₄O₈ • 2 H₂O

Einkristalle für die Strukturbestimmung wurden nach der Synthesvorschrift erhalten.

4.3.2.16. [Bis(2,9-bis(hydroxymethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(47)₂**)**Ansatz und Durchführung**

Dialkohol	47	24.0 mg	99.9 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		12.1 mg	49.9 μmol

Eine Lösung des Dialkohols **47** in 10 mL *n*-Butanol wurde in einem Becherglas über eine Lösung des Kupfer(II)-Salzes in 10 mL Wasser geschichtet. Das Becherglas wurde mit perforiertem Parafilm abgedeckt und die Lösungsmittel langsam verdampft. Nach 15 d wurde das Produkt als hellgrüne Kristalle abfiltriert.

Ausbeute

17.5 mg (26.2 μmol, 53 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 542.1191$ $[\text{M} - 2 \text{ NO}_3 - \text{H}]^+$	(berechnet: 542.1015)
543.1091 $[\text{M} - 2 \text{ NO}_3]^+$	(berechnet: 543.1094)

CHN

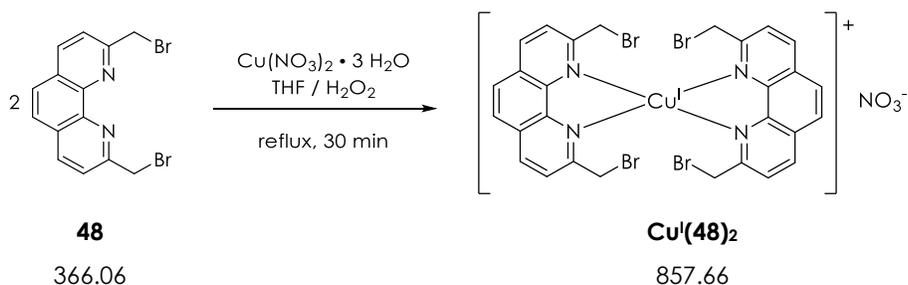
$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{CuN}_6\text{O}_{10} \cdot 0.5 \text{ H}_2\text{O} \cdot 0.5 \text{ C}_4\text{H}_{10}\text{O}$

gefunden:	50.37 % C	12.11 % N	4.21 % H
berechnet:	50.46 % C	11.77 % N	4.23 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{CuN}_6\text{O}_{10} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$

Einkristalle für die Strukturbestimmung wurden nach der Synthesevorschrift erhalten.

4.3.2.17. [Bis(2,9-bis(bromomethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(I)]-nitrat (**Cu^I(48)₂**)

Ansatz und Durchführung

Monobromid	48	50.0 mg	136.6 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		16.5 mg	68.3 μmol

Zu einer heißen Lösung des Liganden **48** in 6 mL THF wurde eine Lösung des Kupfer(II)-Salzes in 1 mL THF getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min refluxiert. Der gebildete Feststoff wurde abfiltriert, in THF suspendiert und unter Rühren mit 1 mL H₂O₂ (30 %) versetzt. Die grüne Lösung wurde erneut für 15 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Komplex nach Filtration als gelb-brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute

26.1 mg (30.4 μmol, 45 %)

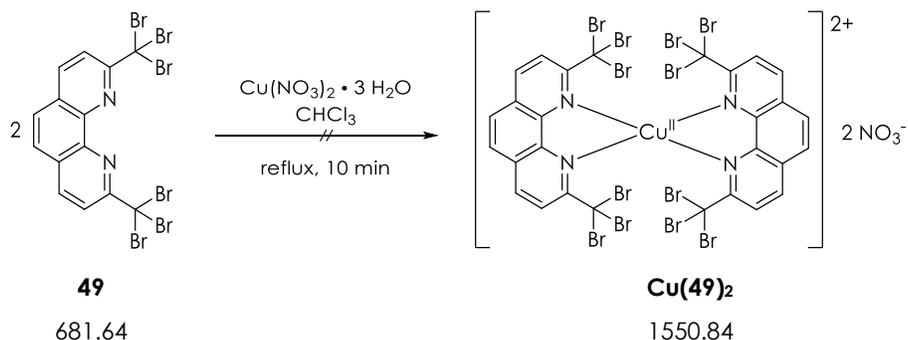
ESI-MS (+)

m/z = 794.7722 [M-NO₃]⁺ (berechnet: 794.7677)

CHN

C₂₈H₂₀Br₄CuN₅O₃ • 6 H₂O

gefunden:	35.07 % C	7.17 % N	3.62 % H
berechnet:	34.82 % C	7.25 % N	3.34 % H

4.3.2.18. [Bis(2,9-bis(tribromomethyl)-1,10-phenanthrolin)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(49)₂**)**Ansatz und Durchführung**

Tribromid	49	100.0 mg	146.7 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		17.7 mg	73.4 μmol

Der Ligand **49** wurde in 4 mL Chloroform erwärmt und portionsweise mit dem Kupfer(II)-Salz versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung für 10 min unter Rückfluss erwärmt und anschließend bei -20 °C gelagert. Nach 2 d wurden hellgelbe Kristalle (Ligand **49**) aus der blauen Lösung (Kupfer(II)-nitrat) abfiltriert und an der Luft getrocknet.

Ausbeute

49: 83.6 mg (122.7 μmol, 84 %)

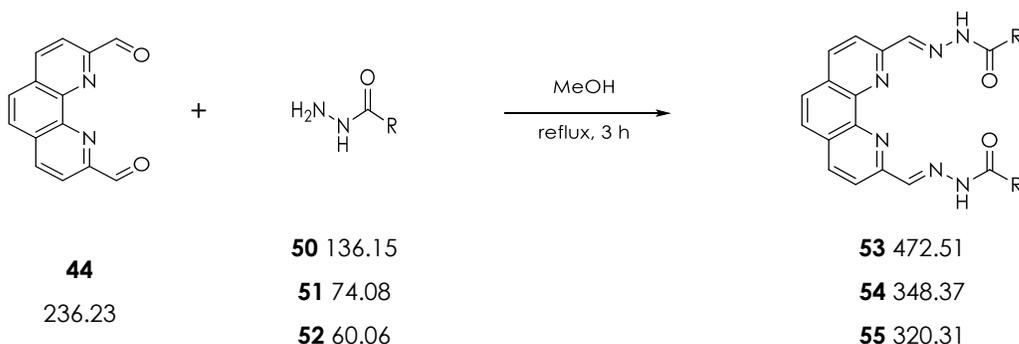
ESI-MS (+)

49: m/z = 682.5642 [**49**+H]⁺ (berechnet: 682.5643)

4.3.3. Phenanthrolinhydrazone

 4.3.3.1. *N',N''*-(1,10-Phenanthrolin-2,9-diyI)bis(methanylyliden)di(Rhydrazid) (**53-55**)

53: R = benzo (C₆H₅) / **54:** R = aceto (CH₃) / **55:** R = formo (H)


Ansatz und Durchführung ^[107,277,283,363]

Dialdehyd	44	1.00 g / 0.50 g	4.23 mmol / 2.12 mmol
Benzohydrazid	50	1.19 g	8.74 mmol
Acetohydrazid	51	0.62 g	8.37 mmol
Formohydrazid	52	0.28 g	4.66 mmol

Der Dialdehyd **44** und das entsprechende Hydrazid **50**, **51** oder **52** wurden in 220 mL bzw. 110 mL (**52**) Methanol gelöst und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert. Nach Filtration und Trocknung der Niederschläge an der Luft wurden die Produkte als graue Feststoffe erhalten.

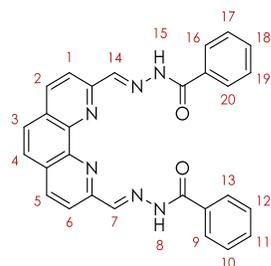
Ausbeute

53: 1.32 g (2.79 mmol, 66 %)

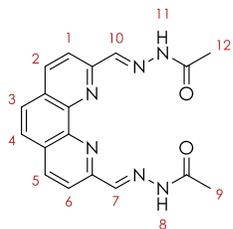
Literatur: nicht angegeben^[363]

54: 0.45 g (1.29 mmol, 30 %)

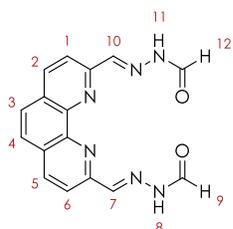
55: 0.40 g (1.25 mmol, 59 %)

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)


53: δ = 7.57-7.67 (6 H, m, H^{10-12,17-19}), 7.96 (4 H, d, H^{1,13,16,20}, J = 7.3 Hz), 8.07 (2 H, s, H^{3,4}), 8.39 (2 H, d, H^{2,5}, J = 8.3 Hz), 8.57 (2 H, d, H^{1,6}, J = 8.3 Hz), 8.82 (2 H, s, H^{7,14}), 12.26 (2 H, s, H^{8,15}) ppm.

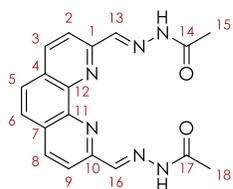


54: $\delta = 2.06$ (2 H, s, H^{9,12} (*E,Z*-Isomerie)), 2.32 (4 H, s, H^{9,12} (*E,Z*-Isomerie)), 8.04 (2 H, s, H^{3,4}), 8.26 (2 H, d, H^{2,5}, $J = 8.5$ Hz), 8.38 (2 H, s, H^{7,10}), 8.51 (2 H, d, H^{1,6}, $J = 8.6$ Hz), 11.74 (2 H, s, H^{8,11}) ppm.

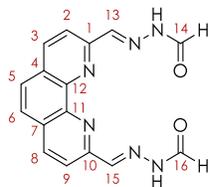


55: $\delta = 8.04$ (2 H, s, H^{3,4}), 8.25 (2 H, d, H^{2,5}, $J = 8.4$ Hz), 8.43 (2 H, s, H^{7,10}), 8.52 (2 H, d, H^{1,6}, $J = 8.5$ Hz), 8.83 (2 H, s, H^{9,12}), 12.19 (2 H, s, H^{8,11}) ppm.

¹³C-NMR ((CD₃)₂SO, 500 MHz)



54: $\delta = 20.1$ (C^{15,18}), 118.5 (C^{3,8}), 121.3 (C^{2,9}), 127.6 (C^{5,6}), 137.1 (C^{4,7}), 144.7 (C^{11,12}), 147.3 (C^{13,16}), 152.2 (C^{1,10}), 159.8 (C^{14,17}) ppm.



55: $\delta = 118.9$ (C^{3,8}), 120.7 (C^{2,9}), 127.4 (C^{5,6}), 137.1 (C^{4,7}), 144.2 (C^{11,12}), 146.1 (C^{13,16}), 150.2 (C^{1,10}), 153.6 (C^{14,16}) ppm.

ESI-MS (+)

53: $m/z = 473.1733$ [**53**+H]⁺ (berechnet: 473.1721)

54: $m/z = 371.1264$ [**54**+Na]⁺ (berechnet: 371.1227)

55: $m/z = 321.1089$ [**55**+H]⁺ (berechnet: 321.1095)

CHN

54: C₁₈H₁₆N₆O₂ • 0.25 CH₃OH • 1.25 H₂O

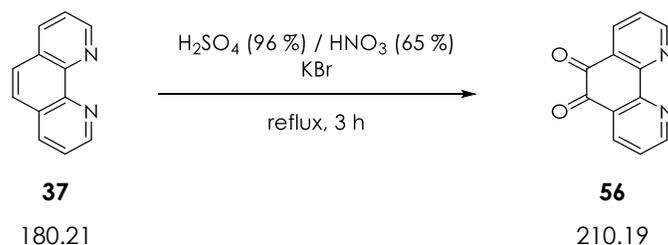
gefunden: 58.02 % C 21.95 % N 4.83 % H

berechnet: 57.85 % C 22.18 % N 5.19 % H

55: C₁₆H₁₂N₆O₂ • 2 H₂O

gefunden: 53.85 % C 23.21 % N 4.15 % H

berechnet: 53.93 % C 23.58 % N 4.53 % H

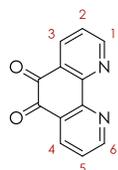
4.3.3.2. 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (**56**)

Ansatz und Durchführung^[366]

Phenanthrolin 37	2.00 g	11.10 mmol
Kaliumbromid	11.90 g	100.00 mmol

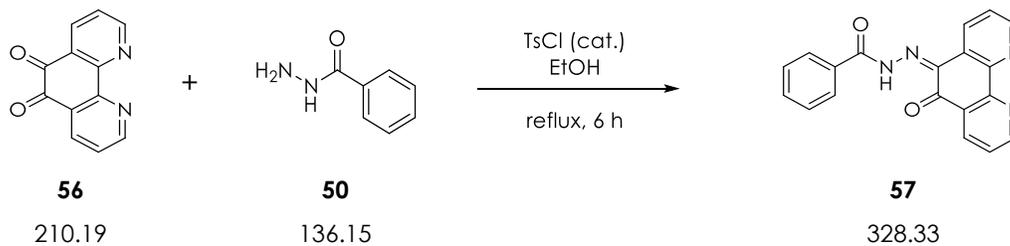
In einem 100 mL-Rundkolben wurden 30 mL Schwefelsäure (96 %) und 15 mL Salpetersäure (65 %) nacheinander zu Phenanthrolin und Kaliumbromid gegeben. Die Lösung wurde für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 400 mL Wasser verdünnt und mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Die Lösung wurde 3 x mit 50 mL DCM extrahiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation des Rückstands aus Methanol wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute

1.31 g (6.23 mmol, 56 %) Literatur: 95 %^[366]

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)


$\delta = 7.56$ (2 H, dd, H^{2,5}, $J = 7.9, 4.7$ Hz), 8.47 (2 H, dd, H^{3,4}, $J = 7.9, 1.9$ Hz), 9.09 (2 H, dd, H^{1,6}, $J = 4.7, 1.9$ Hz) ppm.

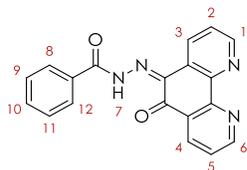
4.3.3.3. *N'*-(6-Oxo-1,10-phenanthrolin-5(6*H*)-yliden)benzohydrazid (**57**)**Ansatz und Durchführung**^[365]

5,6-Phenanthrolindion	56	0.50 g	2.38 mmol
Benzohydrazid	50	0.32 g	2.38 mmol
Tosylchlorid		0.01 g	0.06 mmol

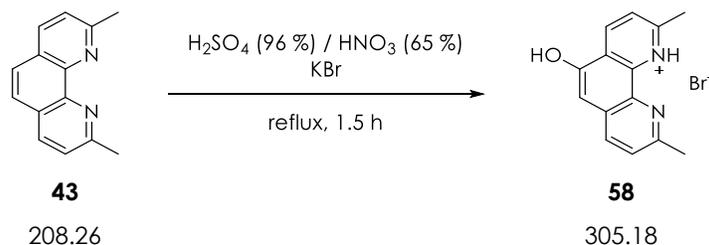
Zu einer Lösung aus **50** in 100 mL Ethanol wurden unter Rühren **56** und Tosylchlorid gegeben. Die Lösung wurde für 6 h unter Rückfluss erhitzt und nach beendeter Reaktion über Nacht bei -20 °C gelagert. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknung des Niederschlags im Vakuum wurde das Produkt als gelb-oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute

0.61 g (1.86 mmol, 78 %)

Literatur: 83 %^[365]**¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz)**

δ = 7.55-7.70 (5 H, m, H⁸⁻¹²), 8.08-8.11 (2 H, m, H^{2,5}), 8.69 (1 H, dd, H³, J = 8.0, 1.8 Hz), 8.88 (1 H, d, H⁴, J = 8.4 Hz), 9.00 (1 H, d, H⁶, J = 5.2 Hz), 9.20 (1 H, dd, H¹, J = 4.6, 1.8 Hz), 15.58 (1 H, br s, H⁷) ppm.

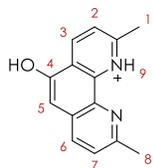
4.3.3.4. 5-Hydroxy-2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin-1-iumbromid (**58**)

Ansatz und Durchführung^[366]

Neocuproin	43	2.00 g	9.60 mmol
Kaliumbromid		11.90 g	100.00 mmol

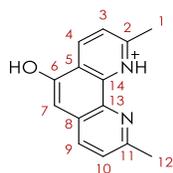
Eine Lösung aus Neocuproin und Kaliumbromid in 30 mL Schwefelsäure (96 %) und 15 mL Salpetersäure (65 %) wurde für 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch mit 400 mL Wasser verdünnt und mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Die wässrige Phase wurde 3 x mit 50 mL DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation des Rückstands aus Methanol wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute

0.84 g (2.75 mmol, 29 %)

¹H-NMR ((CD₃)₂SO, 700 MHz)


$\delta = 2.93$ (3 H, s, H⁸), 3.00 (3 H, s, H¹), 7.30 (1 H, s, H⁵), 7.91 (1 H, d, H⁷, $J = 8.6$ Hz), 8.00 (1 H, d, H², $J = 8.5$ Hz), 8.71 (1 H, d, H⁶, $J = 8.4$ Hz), 8.84 (1 H, d, H³, $J = 8.5$ Hz), 11.58 (1 H, br s, H⁹) ppm.

¹³C-NMR ((CD₃)₂SO, 180 MHz)


$\delta = 21.6$ (C¹), 24.5 (C¹²), 103.4 (C⁷), 122.5 (C⁸), 126.5 (C¹⁰), 126.9 (C³), 129.6 (C⁵), 131.7 (C¹⁴), 134.0 (C⁹), 138.6 (C¹³), 142.4 (C⁴), 152.9 (C⁶), 154.4 (C²), 160.4 (C¹¹) ppm.

ESI-MS (+)

m/z = 225.1036 [M-Br] ⁺	(berechnet: 225.1022)
305.0287 [M+H] ⁺	(berechnet: 305.0284)

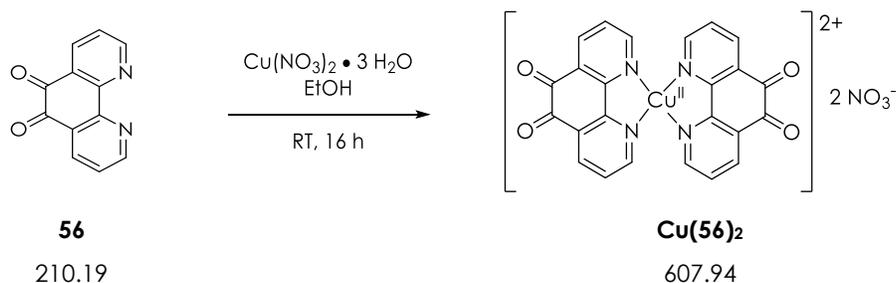
CHN

gefunden:	52.28 % C	8.38 % N	4.51 % H
berechnet:	52.03 % C	8.67 % N	4.68 % H

Röntgenstrukturanalyse

Zusammensetzung: $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$

Einkristalle für die Strukturbestimmung durch Röntgenbeugung wurden durch langsames Einengen einer Lösung von **58** in Chloroform erhalten.

4.3.3.5. [Bis(1,10-phenanthrolin-5,6-dion)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(56)₂**)

Ansatz und Durchführung^[283,371]

5,6-Phenanthroline-10,9-dion	56	100.0 mg	0.48 mmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		58.0 mg	0.24 mmol

Zu einer Lösung des Dions **56** in 13 mL heißem Ethanol wurde das Kupfer(II)-Salz in 2 mL Ethanol hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Niederschlags und Trocknung im Vakuum wurde das Produkt als mintgrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute

115.5 mg (0.19 mmol, 80 %) Literatur: 71 %^[371]

ESI-MS (+)

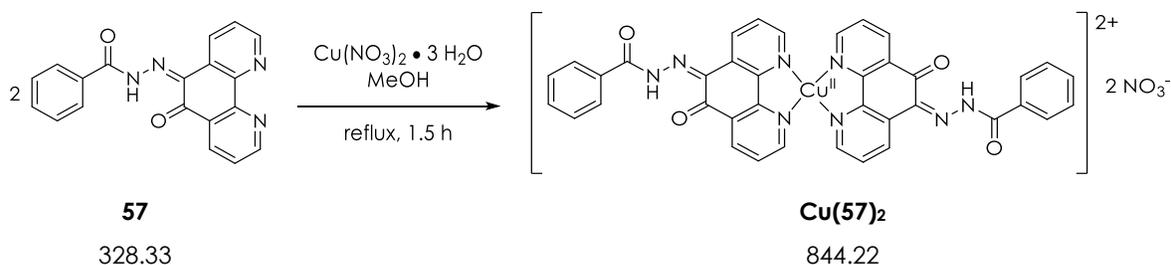
m/z = 719.1218 [M-2 NO₃]⁺ (berechnet: 719.1217)

CHN

C₃₈H₂₄CuN₁₀O₁₀ • 0.5 CH₃OH

gefunden: 53.75 % C 16.40 % N 2.94 % H

berechnet: 53.76 % C 16.28 % N 3.05 % H

4.3.3.6. [Bis(*N'*-(6-oxo-1,10-phenanthrolin-5(6*H*)-yliden)benzohydrazid)kupfer(II)]-nitrat (**Cu(57)**)₂**Ansatz und Durchführung**^[283]

Hydrazid	57	57.0 mg	173.6 μmol
Kupfer(II)-nitrat-Trihydrat		21.0 mg	86.8 μmol

Das Hydrazid **57** wurde unter leichtem Erwärmen in 10 mL Methanol gelöst. Das Kupfer(II)-Salz in 1 mL Methanol wurde anschließend langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf -20 °C wurde der Niederschlag abfiltriert, im Vakuum getrocknet und das Produkt wurde als grün-gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute

58.6 mg (69.4 μmol, 80 %)

ESI-MS (+)

$m/z = 241.5086$ [$M - 2 \text{ NO}_3$]²⁺ (berechnet: 241.5072)

CHN

C₂₄H₁₂CuN₆O₁₀

gefunden:	47.38 % C	13.76 % N	1.99 % H
berechnet:	47.42 % C	13.82 % N	1.99 % H

4.4. Gelelektrophoresen

4.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Allgemeine Durchführung

Für die Untersuchung der DNA-Spaltaktivität der synthetisierten Kupfer(II)- und Nickel(II)-Komplexe wurden 1 %ige Agarosegele verwendet (300 mg Agarose in 30 mL 0.5X TBE-Puffer). Zur späteren Detektion der DNA-Banden wurde die Agarose nach Erhitzen in der Mikrowelle mit $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidiumbromid versetzt.

Die Komplexe wurden unter verschiedenen Aspekten untersucht. Im Allgemeinen wurden sie dazu in Eppendorfgefäßen in 10 mM (ATCUN-Komplexe) oder 50 mM (Phenanthrolinkomplexe) Tris-HCl-Puffer bei pH 7.4 in der An- oder Abwesenheit von $250 \mu\text{M}$ Ascorbinsäure mit $0.2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pBR322 für 1 h bzw. 2 h bei 37°C inkubiert. Für die Nickel(II)- und Ferrocen-ATCUN-Komplexe wurde anstelle der Ascorbinsäure das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (0.5 mM) verwendet. In allen Fällen umfassten die Probenansätze jeweils $8 \mu\text{L}$. Nach der Inkubation wurden die Proben mit $1.5 \mu\text{L}$ Ladepuffer (Bromphenolblau und Saccharose in Wasser) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 2 h bei 40 V in 0.5X TBE-Puffer. Für die Auswertung der Gele wurde die Fluoreszenz des Ethidiumbromids ausgenutzt. Die Anteile jeder Form der DNA in einer Spur wurden dabei durch Division der Intensität jeder Bande durch die Gesamtintensität der Banden in dieser Spur berechnet. Für die Form I der DNA wurde dabei ein Korrekturfaktor von 1.22 verwendet, da Ethidiumbromid schlechter in die *supercoiled* DNA interkaliert als in die offenkettige und lineare DNA.^[382] Zur Berechnung der Standardabweichung wurde jeder Versuch dreimal durchgeführt.

Konzentrations- und zeitabhängige DNA-Spaltung

Die Abhängigkeit der DNA-Spaltung von der Konzentration der Komplexe bzw. von der Inkubationszeit wurde untersucht, indem die Proben unter Variation dieser Bedingungen wie oben beschrieben vorbereitet wurden. Die genauen Angaben sind in den Abbildungsunterschriften für jeden Versuch angegeben.

Untersuchung des Spaltmechanismus'

Die Komplexe wurden zur Untersuchung des DNA-Spaltmechanismus' über ROS-Fänger mit einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ in der Anwesenheit von $250 \mu\text{M}$ Ascorbinsäure inkubiert. Die einzelnen Proben wurden dabei mit den unterschiedlichen ROS-Fängern

versetzt (200 mM *tert*-Butanol bzw. 200 mM DMSO für OH-Radikale, 10 mM NaN₃ für Singulett-Sauerstoff, 2.5 mg mL⁻¹ CAT für H₂O₂ oder 313 units mL⁻¹ SOD). Zur Vergleichbarkeit wurde dabei allen Proben 0.125X PBS zugesetzt, da die Katalase bei 37 °C in 1X PBS für 30 min vorinkubiert wurde. Dies führte zu einer Konzentration von 0.125X PBS in der Inkubationslösung.

Für die genauere Untersuchung der Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an der DNA-Spaltung wurden die Komplexe nach der allgemeinen Vorschrift vorbereitet. Das zur Verdünnung verwendete Wasser in den Inkubationslösungen wurde jedoch vollständig durch deuteriertes Wasser ersetzt.

Auch für die Verifizierung der Beteiligung von Kupfer(I)-Ionen an der Spaltung wurden die Komplexe standardmäßig vorbereitet, aber vor der Inkubation zusätzlich mit 0.1 oder 1.0 mM Neocuproin versetzt.

DNA-Religation

Für den Versuch der DNA-Religation wurden die Proben zunächst nach der allgemeinen Vorschrift in der Abwesenheit von Ascorbinsäure vorbereitet und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde die Plasmid-DNA einer Probe vollständig mit dem *EcoRI-HF*[®] *Re-Mix*[®] von New England Biolabs bei 37 °C für 15 min durch hydrolytische Spaltung in die Form III überführt.

Die Extraktion der DNA-Formen II und III erfolgte mit dem *GenElute*[™] *Gelextraktionskit* der Firma *Sigma-Aldrich*. Die extrahierte DNA wurde anschließend mit dem *Blunt/TA Ligase Master Mix* (*New England Biolabs*) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse des Religationsergebnisses mittels Gelelektrophorese wurde die Ligase über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aus den Proben entfernt.

4.4.2. SDS-PAGE

Allgemeine Durchführung

Die Untersuchung der Proteaseaktivität der Phenanthrolin-ATCUN-Komplexe erfolgte mit dem *Mini-PROTEAN® Tetra*-System von *Bio-Rad*. Als Gele wurden die färbungsfreien *Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™*-Gele verwendet.

Die Komplexe wurden für die Elektrophorese in einem Gesamtvolumen von 100 μL in einer Konzentration von 200 μM mit 0.66 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ BSA in der An- und Abwesenheit von 5 mM Ascorbinsäure und/oder 10 mM Wasserstoffperoxid in 60 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) für 3 h inkubiert. 10 μL der Inkubationslösung wurden anschließend mit 3.3 μL reduzierendem Ladepuffer (*Roti®-Load 1* von *Carl Roth*) versetzt und 5 min bei 85 °C denaturiert. Wiederum 10 μL der Proben wurden auf das Gel aufgetragen und für 35 min bei 200 V aufgetrennt.

Zeitabhängige Proteinspaltung

Für die Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit auf die Spaltung von BSA durch Wasserstoffperoxid wurden die Proben in der Abwesenheit der Komplexe wie oben beschrieben vorbereitet. Die Inkubationszeit wurde dabei zwischen 0 und 180 min variiert.

4.5. Spektroskopie

4.5.1. UV/Vis-Spektroskopie

Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Vergleichsverbindungen zur Ausbeuteberechnung der Peptide erfolgte durch die Messung von Konzentrationsreihen der Verbindungen bei 25 °C. Durch die Auftragung der Absorption über die Konzentration wurde aus der Steigung der Geraden der Koeffizient ermittelt. War eine Bestimmung der Ausbeute über eine Vergleichsverbindung nicht möglich, wurde die Berechnung über die Titration des Peptids mit Kupfer(II)-chlorid durchgeführt. Dazu wurde die Ausbeute des Peptids grob über Wägung bestimmt und eine anhand dieses Wertes angefertigte 1 mM Lösung in 10 mM Tris-HCl-Puffer mit CuCl_2 titriert. Nach jeder Titration wurde die Lösung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und vermessen.

Komplexstabilität

Die Stabilität der Kupfer(II)-ATCUN-Komplexe bei unterschiedlichen pH-Werten wurde mit einer 2 mM Peptidlösung in Wasser durchgeführt, deren pH-Wert mit 25 %iger HCl auf pH 2 eingestellt wurde. Durch Zugabe von verdünnter Kalilauge wurde der pH-Wert in Eineschritten auf 14 erhöht. Nach jedem Schritt wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein Spektrum aufgenommen.

DNA-Schmelzkurven

Für die Erstellung der DNA-Schmelzkurven wurde eine Lösung der CT-DNA mit einer Konzentration von 50 μM jeweils mit 3 μM des zu untersuchenden Komplexes in 10 mM Tris-HCl-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mittels des Temperaturblocks des UV/Vis-Spektrometers auf 50-95 °C erhitzt (1 °C min^{-1}), wobei je 1 °C die Absorption bei 260 nm gemessen wurde. Die Normierung der Messdaten zwischen 0 und 1 erfolgte mit *Microsoft® Excel*.

Die Konzentration der CT-DNA wurde zuvor über die Messung der Absorption bei 260 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.^[383]

BNPP-Assay

Für die Untersuchung der hydrolytischen DNA-Spaltung über die Spaltung von BNPP wurden die Komplexe in 500 μL 10 mM Tris-HCl-Puffer in einer Konzentration von 100 μM

mit 50 μM BNPP versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Vergleich diente die BNPP-Spaltung durch 0.05 units mL^{-1} Phosphodiesterase I.

Thiobarbitursäure-Assay

Für die Untersuchung der Spaltung von CT-DNA über den TBA-Assay wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μL 20 mM Tris-HCl-Puffer die Komplexe (100 μM) mit 0.5 mM Ascorbinsäure und 1 mM CT-DNA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 200 μL 10 %iger Trichloressigsäure und 300 μL TBA (0.67 % in 50 mM NaOH) versetzt und für 30 min bei 99 °C erneut inkubiert. Für die Aufnahme der UV/Vis-Spektren wurden die Lösungen zusätzlich mit 400 μL Wasser verdünnt.

Die Auswertung erfolgte über den Extinktionskoeffizienten des MDA-TBA-Farbstoffes bei 532 nm, der zuvor aus einer entsprechenden Konzentrationsreihe bestimmt wurde. Dazu wurde 1,1,3,3-Tetramethoxypropan in 1 %iger Schwefelsäure für 2 h bei Raumtemperatur hydrolysiert, mit TBA und TCA umgesetzt und UV/Vis-spektroskopisch vermessen.

Identisch dazu wurde die Oxidation der Fettsäuren untersucht, wobei 100 μM Komplex mit jeweils 100 mg mL^{-1} Säure (bzw. 20 μM Komplex mit 20 mg mL^{-1} Arachidonsäure) umgesetzt wurden.

DNA-Bindungskonstante K_{int}

Zu einer Lösung des zu untersuchenden Komplexes in einer Konzentration von 10 μM in 10 mM Tris-HCl-Puffer wurde in Äquivalenzschritten von 0-20 CT-DNA hinzutitriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde vor der Messung des UV/Vis-Spektrums die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte in *Microsoft® Excel*, wobei sich der Fehler der Konstanten aus der Standardabweichung zweier Messungen ergibt.

4.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

DNA-Spaltung

Zur Untersuchung der DNA-Spaltung mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden jeweils 50 μM Lösungen der Peptide und der zugehörigen Komplexe vermessen. Mit Ausnahme der Untersuchung des Peptids **P-RhB** und des Komplexes **Cu(P-RhB)** erfolgten die Messungen in 10 mM Tris-HCl-Puffer. Für **P-RhB** wurde der Britton-Robinson-Puffer bei pH 5 verwendet.^[182] Für die Messung der Fluoreszenz nach der DNA-Spaltung wurden die ATCUN-Komplexe zuvor im entsprechenden Puffer in der Anwesenheit von 250 μM Ascorbinsäure und 0.2 μg Plasmid-DNA pBR322 für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Fluoreszenzquenching

Das Fluoreszenzquenching durch Kupfer(II)-Ionen wurde über die Titration der Peptide bei einer Konzentration von 50 μM mit 0–1 Äquivalenten CuCl_2 in 10 mM Tris-HCl-Puffer durchgeführt. Nach jedem Äquivalent wurde die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend spektroskopisch vermessen.

Für die Untersuchung des Quenchmechanismus' wurden 1 mM Lösungen der Peptide in Ethanol zunächst vermessen und anschließend mit 1 mM CuCl_2 -Lösung versetzt. Nach Inkubation der Lösungen bei Raumtemperatur für 1 h wurden erneut Fluoreszenzspektren aufgenommen. Durch vorsichtiges und langsames Gefrieren der Proben über etwa 10 min in Quarzglas-Küvetten bei -196 °C und aus der Beobachtung der Auswirkungen auf die Fluoreszenz wurde der Quenchmechanismus abgeleitet.

Die Schaltbarkeit der Fluoreszenz wurde anhand der Peptide **P-RhB** und **P-Dns** untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz der Peptide bei einer Konzentration von 50 μM zunächst durch Zugabe von 50 μM Kupfer(II)-chlorid gequencht. Anschließend wurden abwechselnd je 250 μM Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und vermessen.

DNA-Bindungskonstante K_{app}

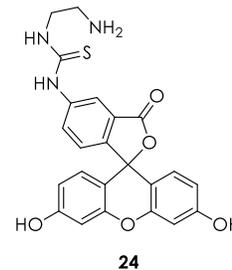
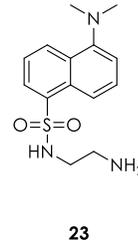
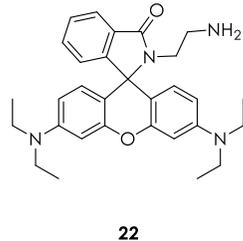
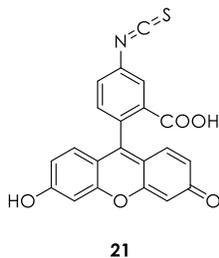
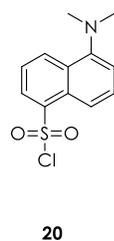
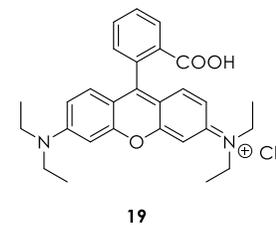
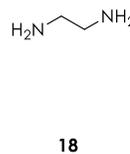
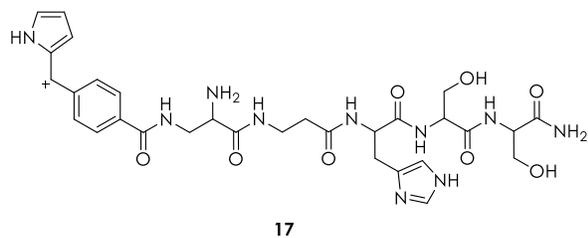
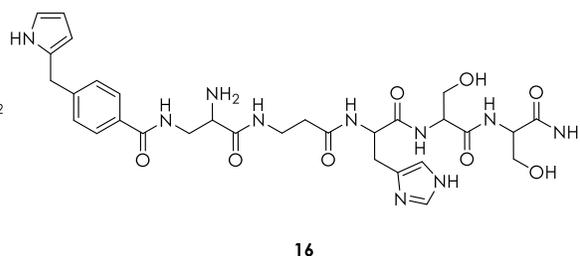
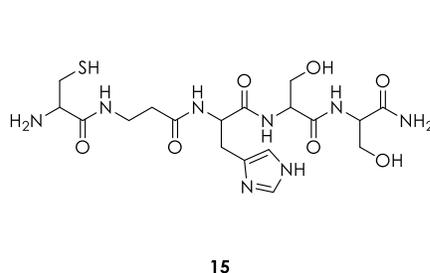
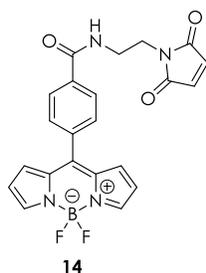
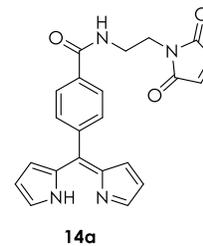
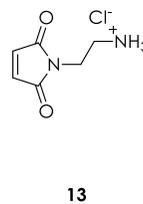
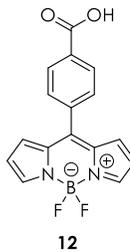
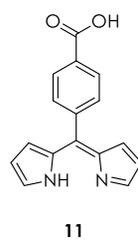
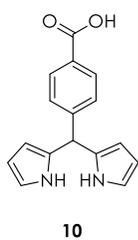
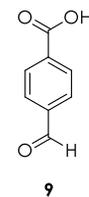
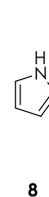
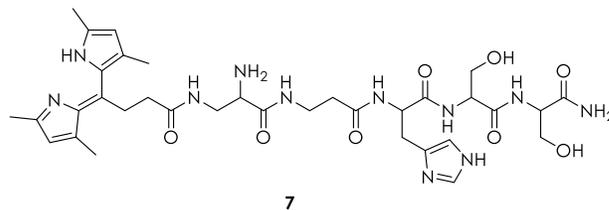
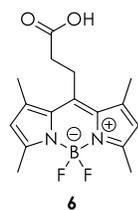
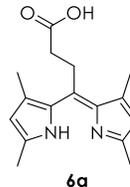
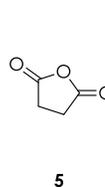
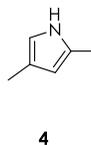
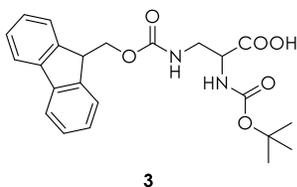
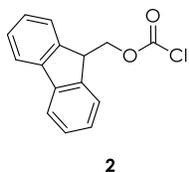
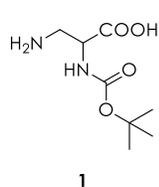
Zu einer Lösung aus 20 μM CT-DNA und 5 μM Ethidiumbromid, die zuvor für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurden die Komplexe in Äquivalenzschritten von 0-5 bzw. 6 hinzutitriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde vor der Messung des Fluoreszenzspektrums die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte in *Microsoft® Excel*.

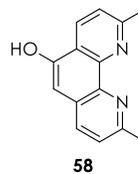
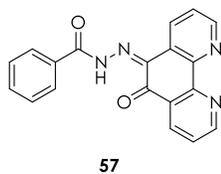
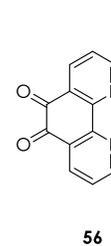
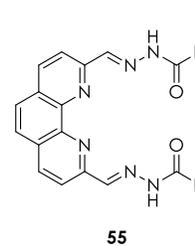
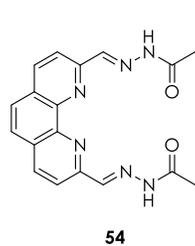
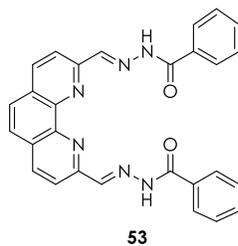
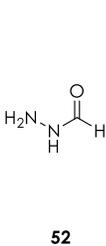
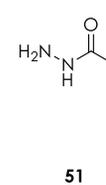
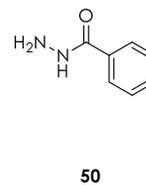
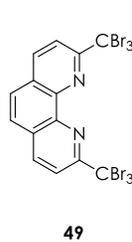
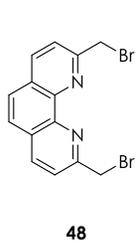
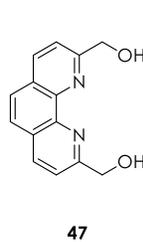
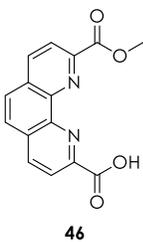
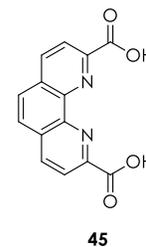
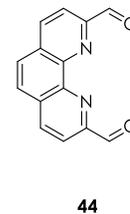
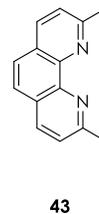
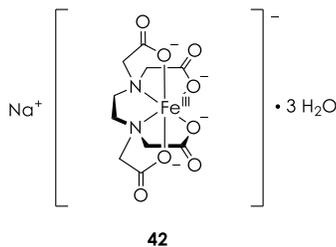
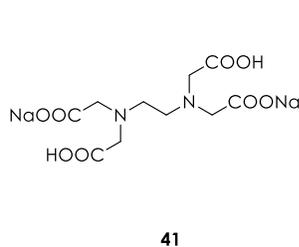
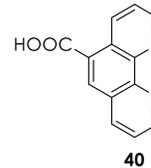
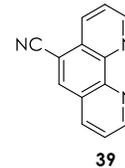
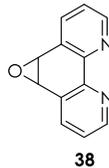
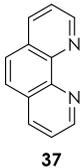
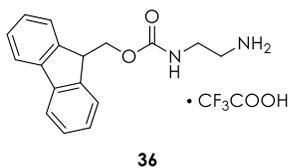
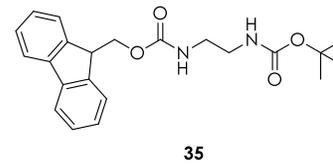
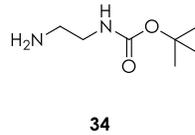
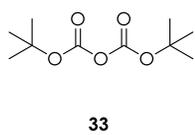
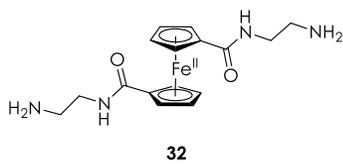
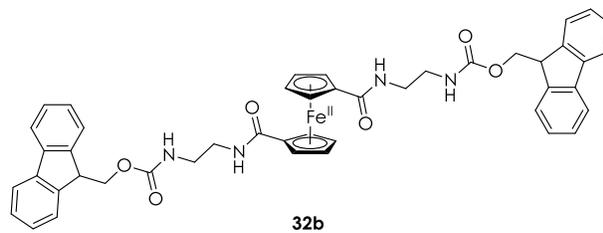
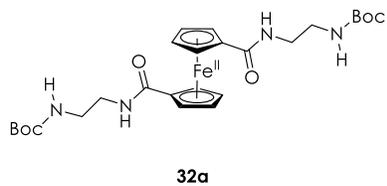
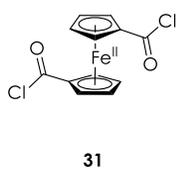
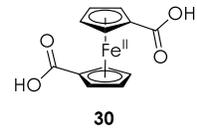
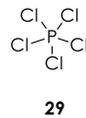
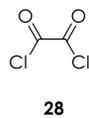
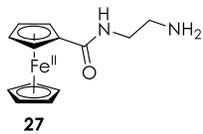
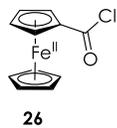
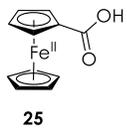
4.5.3. CD-Spektroskopie

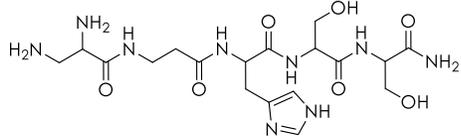
Untersuchung der DNA-Wechselwirkung

Für die Analyse der Wechselwirkung der Phenanthrolinkomplexe mit linearer DNA über CD-Spektroskopie wurde zunächst eine CT-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 100 μM in 10 mM Tris-HCl-Puffer spektroskopisch als Referenz vermessen. Der Einfluss der Komplexe wurde durch die Zugabe von 10 μM Komplex zur CT-DNA nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur untersucht. Das Gesamtprobenvolumen betrug bei jeder Messung 1 mL. Die einzelnen Spektren wurden mit kontinuierlichem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur aufgenommen.

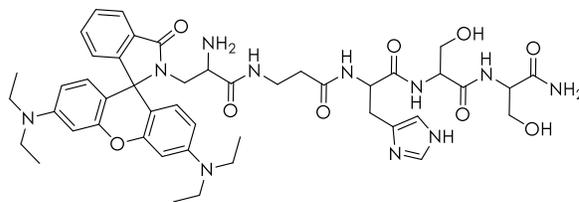
Strukturenverzeichnis



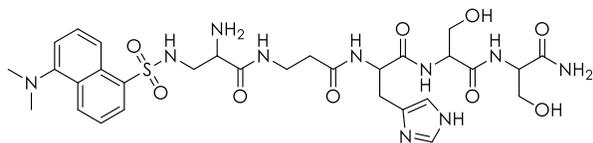




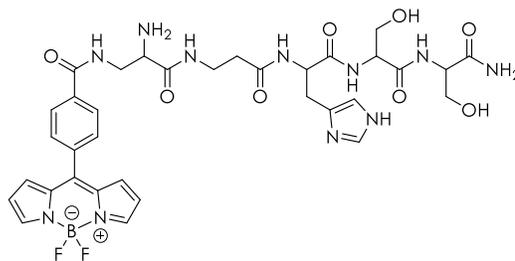
P-NH₂



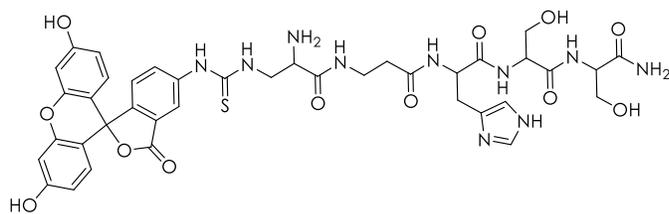
P-RhB



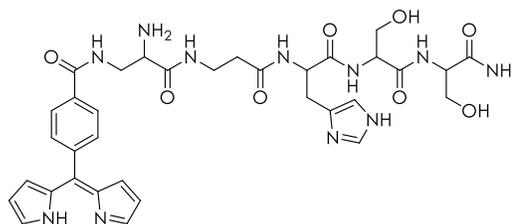
P-Dns



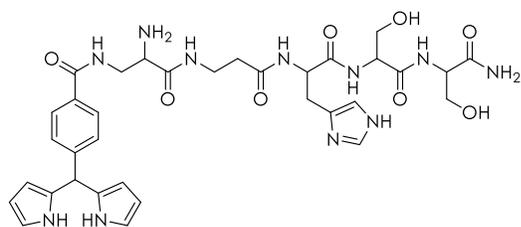
P-BODIPY



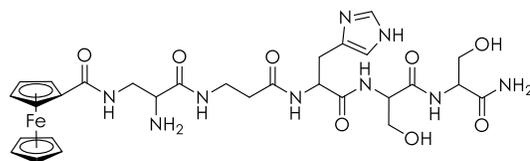
P-FITC



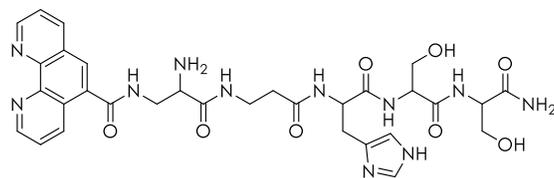
P-DPME



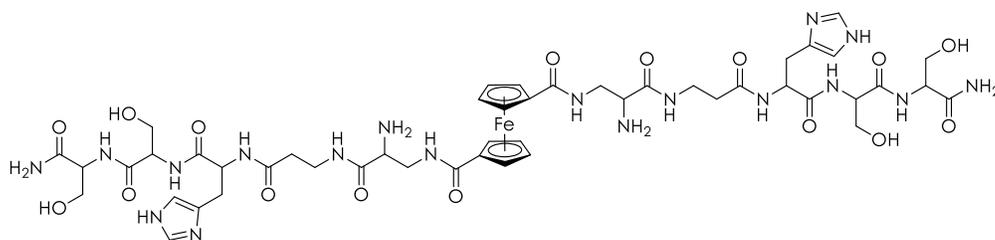
P-DPMa



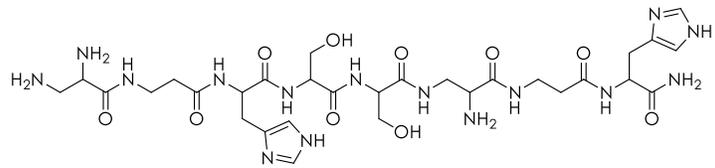
P-Fc



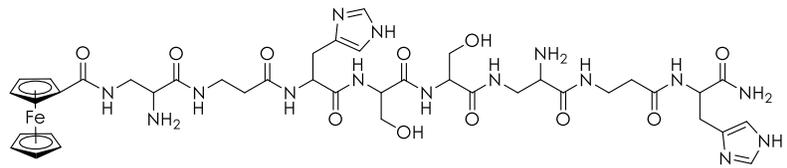
P-Phen



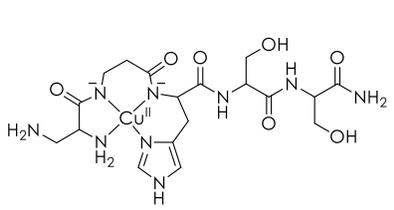
P-Fc-P



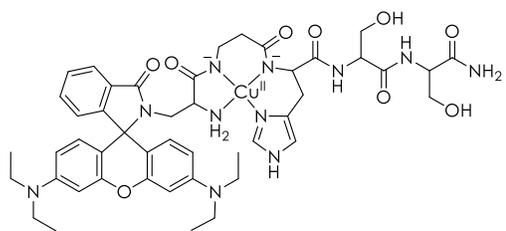
P₂-NH₂



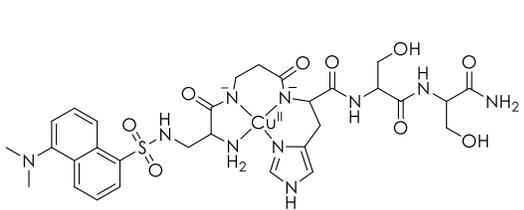
P₂-Fc



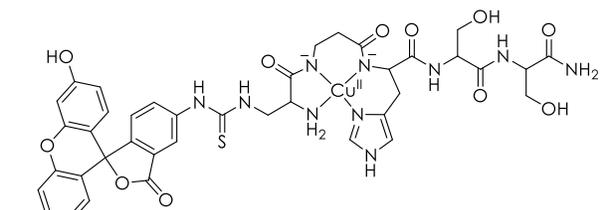
Cu(P-NH₂)



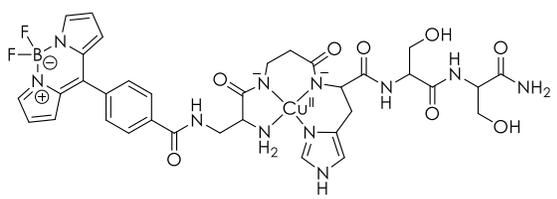
Cu(P-RhB)



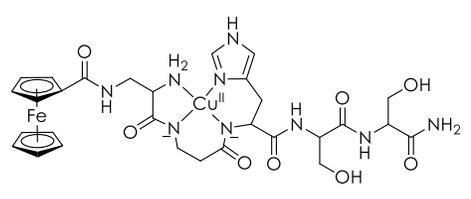
Cu(P-Dns)



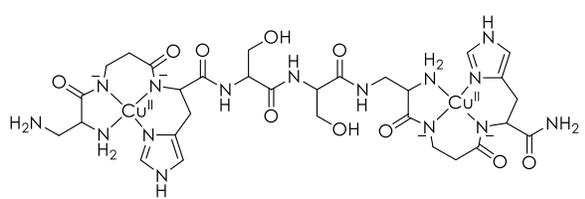
Cu(P-FITC)



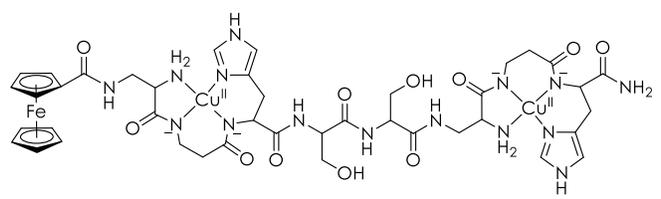
Cu(P-BODIPY)



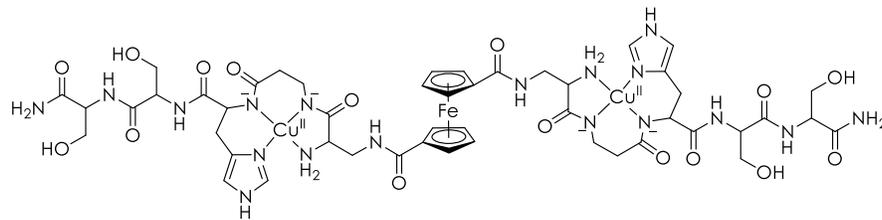
Cu(P-Fc)



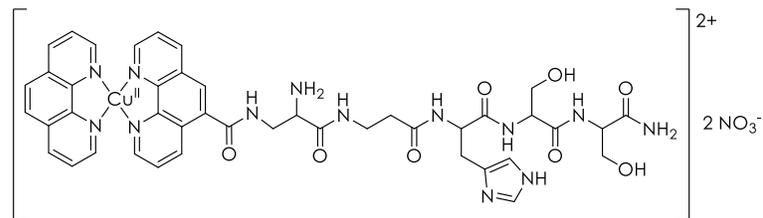
Cu₂(P₂-NH₂)



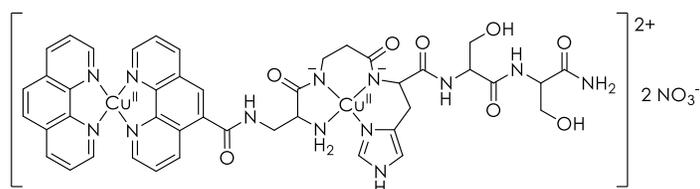
Cu₂(P₂-Fc)



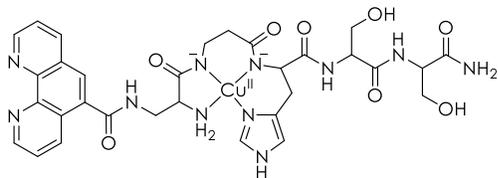
Cu₂(P-Fc-P)



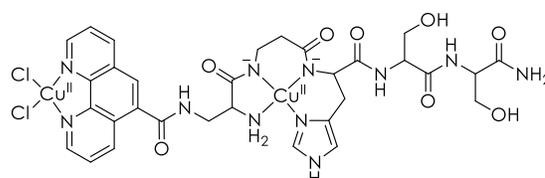
Cu(phen)(P-Phen)



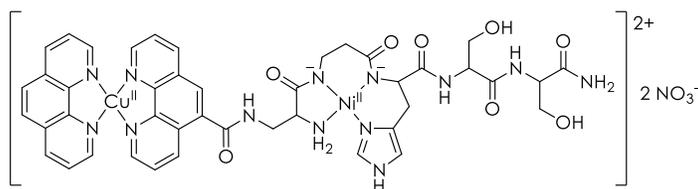
Cu(phen)Cu(P-Phen)



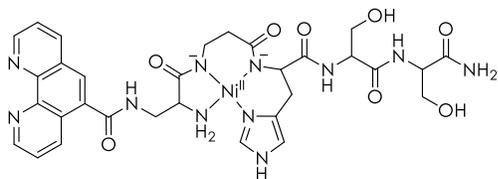
Cu(P-Phen)



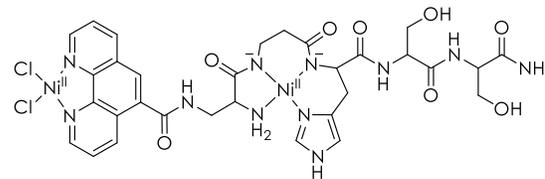
Cu₂(P-Phen)



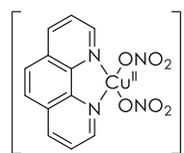
Cu(phen)Ni(P-Phen)



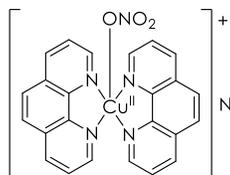
Ni(P-Phen)



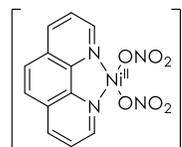
Ni₂(P-Phen)



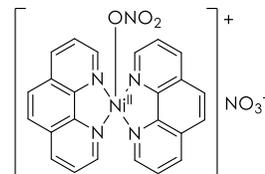
Cu(37)



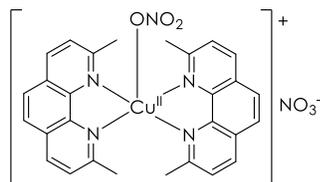
Cu(37)₂



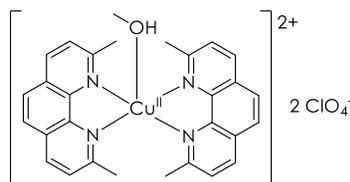
Ni(37)



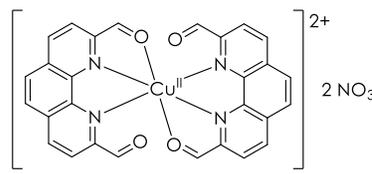
Ni(37)₂



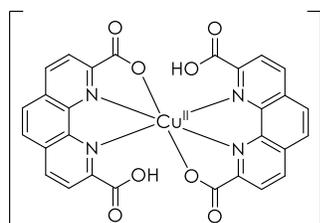
Cu(43)₂



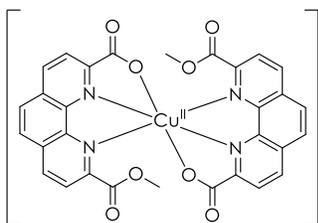
Cu(43)₂(ClO₄)₂



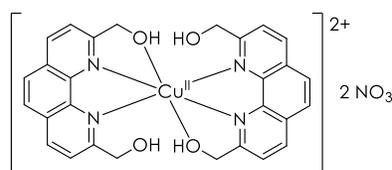
Cu(44)₂



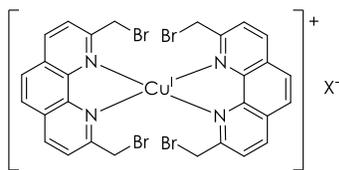
Cu(45)₂



Cu(46)₂

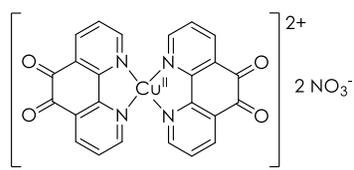


Cu(47)₂

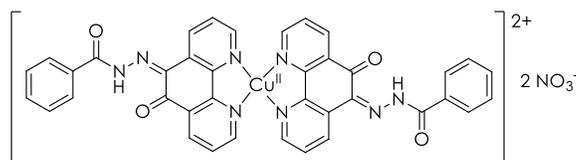


Cu^I(48)₂

X⁻ = NO₃⁻, ClO₄⁻, CF₃SO₃⁻



Cu(56)₂



Cu(57)₂

Literaturverzeichnis

- [1] Robert-Koch-Institut / Zentrum für Krebsregisterdaten, "Krebs in Deutschland 2009/2010", http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html, **2013**.
- [2] Statistisches Bundesamt, "Todesursachen in Deutschland 2013", <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>, **2014**.
- [3] K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland, **2009**.
- [4] H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, **2006**.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [6] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, in *Organische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, **2005**, pp. 1406–1411.
- [7] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 564–574.
- [8] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science* **1995**, 267, 90–93.
- [9] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 4052–4055.
- [10] J. D. Watson, in *Molekularbiologie*, Pearson Education Deutschland GmbH, München, Deutschland, **2001**, pp. 125–167.
- [11] C. O. Pabo, R. T. Sauer, *Ann. Rev. Biochem.* **1984**, 53, 293–321.
- [12] X.-L. Yang, A. H.-J. Wang, *Pharmacol. Ther.* **1999**, 83, 181–215.
- [13] W. D. Wilson, F. A. Tanious, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox, R. L. Wydra, L. Strekowski, *Biochemistry* **1990**, 29, 8452–8461.
- [14] J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 430–440.
- [15] K. Samejima, W. C. Earnshaw, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 677–688.
- [16] B. Epe, *Chem. Biol. Interact.* **1991**, 80, 239–260.
- [17] N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, 20, 203–209.
- [18] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171–1200.
- [19] F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5545–5559.
- [20] E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 173, 133–165.
- [21] D. E. Wilcox, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2435–2458.
- [22] J. A. Cowan, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1067–1088.
- [23] A. Changela, K. Perry, B. Taneja, A. Mondragón, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 15–22.
- [24] C. Liu, L. Wang, *Dalton Trans.* **2009**, 227–239.
- [25] J. S. Seo, N.-D. Sung, R. C. Hynes, J. Chin, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7472–7473.
- [26] N. E. Dixon, R. J. Geue, J. N. Lambert, S. Moghaddas, D. A. Pearce, A. M. Sargeson, *Chem. Commun.* **1996**, 1287–1288.
- [27] D. A. Knight, J. B. Delehanty, E. R. Goldman, J. Bongard, F. Streich, L. W. Edwards, E. L. Chang, *Dalton Trans.* **2004**, 2006–2011.

- [28] J. Rammo, R. Hettich, A. Roigk, H.-J. Schneider, *Chem. Commun.* **1996**, 105–107.
- [29] A. Roigk, R. Hettich, H.-J. Schneider, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 751–756.
- [30] J. A. Cowan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 634–642.
- [31] A. Sreedhara, J. A. Cowan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 337–347.
- [32] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1089–1108.
- [33] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109–1152.
- [34] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1966**, 19, 200–209.
- [35] H. Umezawa, M. Ishizuka, K. Maeda, T. Takeuchi, *Cancer* **1967**, 20, 891–895.
- [36] C. A. Claussen, E. C. Long, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2797–2816.
- [37] D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D' Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12269–12272.
- [38] D. S. Sigman, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 180–186.
- [39] T. E. Goynes, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2846–2848.
- [40] J. M. Veal, K. Merchant, R. L. Rill, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 3383–3388.
- [41] G. R. A. Johnson, N. B. Nazhat, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1990–1994.
- [42] M. Pitié, G. Pratviel, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1018–1059.
- [43] L. E. Marshall, D. R. Graham, K. A. Reich, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1981**, 20, 244–250.
- [44] R. M. Burger, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1153–1169.
- [45] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc. Trans.* **1894**, 65, 899–910.
- [46] F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. London. Ser. A* **1934**, 147, 332–351.
- [47] S. Udenfried, C. T. Clark, J. Axelrod, B. B. Brodie, *J. Biol. Chem.* **1954**, 208, 731–740.
- [48] C. Walling, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 125–131.
- [49] S.-H. Chiou, *J. Biochem.* **1983**, 94, 1259–1267.
- [50] A. Gilman, F. S. Philips, *Science* **1946**, 103, 409–415.
- [51] A. Gilman, *Am. J. Surg.* **1963**, 105, 574–578.
- [52] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, 205, 698–699.
- [53] B. Rosenberg, L. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, 222, 385–386.
- [54] M. R. Osborne, D. E. V. Wilman, P. D. Lawley, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8, 316–320.
- [55] M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey, K. Whalen, in *Pharmacology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, **2011**, pp. 496–497.
- [56] D. Wang, S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Deliv.* **2005**, 4, 307–320.
- [57] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Nature* **1995**, 377, 649–652.
- [58] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12309–12321.
- [59] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. J. den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, 24, 707–713.
- [60] J. C. Dabrowiak, in *Metals in Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Großbritannien, **2009**, pp. 73–107.
- [61] Y. Iitaka, H. Nakamura, T. Nakatani, A. Fujii, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 1070–1072.
- [62] R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 313–315.
- [63] Y. Kidani, K. Inagaki, M. Iigo, A. Hoshi, K. Kuretani, *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315–1318.
- [64] M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.* **1973**, 2, 187–210.

- [65] H. Choy, C. Park, M. Yao, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1633–1638.
- [66] L. R. Kelland, G. Abel, M. J. McKeage, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, B. A. Murrer, K. R. Harrap, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2581–2586.
- [67] N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8113–8127.
- [68] J. C. Dabrowiak, in *Metals in Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Großbritannien, **2009**, pp. 109–147.
- [69] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185–229.
- [70] M. S. Melvin, J. T. Tomlinson, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6333–6334.
- [71] M. S. Melvin, K. E. Wooton, C. C. Rich, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *87*, 129–135.
- [72] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3706–3728.
- [73] T. Peters, Jr., F. A. Blumenstock, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1574–1578.
- [74] C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 123–130.
- [75] Y. Jin, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8408–8415.
- [76] W. T. Shearer, R. A. Bradshaw, R. N. Gurd, Frank, T. Peters, Jr., *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 5451–5459.
- [77] R. A. Bradshaw, T. Peters, Jr., *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 5582–5582.
- [78] N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *124*, 925–932.
- [79] D. J. McKay, B. S. Renaux, G. H. Dixon, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 5–8.
- [80] R. F. Troxler, G. D. Offner, T. Xu, J. C. Vanderspek, F. G. Oppenheim, *J. Dent. Res.* **1990**, *69*, 2–6.
- [81] A. Bujacz, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2012**, *68*, 1278–1289.
- [82] T. Kreutzig, in *Biochemie*, Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland, **2002**, pp. 455–458.
- [83] J. W. Dixon, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5872–5877.
- [84] C. W. Heizmann, G. Müller, E. Jenny, K. J. Wilson, F. Landon, A. Olomucki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 74–77.
- [85] Deutsche Gesellschaft für Neurologie, “Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Morbus Wilson”, <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/030-091.html>, **2012**.
- [86] S.-J. Lau, T. P. A. Kruck, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5878–5884.
- [87] N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1309–1316.
- [88] E. Kimoto, H. Tanaka, J. Gyotoku, F. Morishige, L. Pauling, *Cancer Res.* **1983**, *43*, 824–828.
- [89] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339–341.
- [90] D. P. Mack, B. L. Iverson, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7572–7574.
- [91] D. P. Mack, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4604–4606.
- [92] D. P. Mack, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9399–9405.
- [93] M. Nagaoka, M. Hagihara, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4085–4086.
- [94] J.-A. Feng, R. C. Johnson, R. E. Dickerson, *Science* **1994**, *263*, 348–355.
- [95] L. Qi, P. Denney Eason, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9625–9631.
- [96] M. Chikira, T. Sato, W. E. Antholine, D. H. Petering, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2859–2863.
- [97] R. Nagane, T. Koshigoe, M. Chikira, E. C. Long, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 17–23.
- [98] R. Nagane, T. Koshigoe, M. Chikira, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *93*, 204–212.

- [99] Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8353–8361.
- [100] A. Torrado, G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 609–610.
- [101] Y. Zheng, K. M. Gattás-Asfura, V. Konka, R. M. Leblanc, *Chem. Commun.* **2002**, 2350–2351.
- [102] C. Wende, N. Kulak, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12395–12398.
- [103] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [104] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [105] S. I. Kirin, F. Noor, N. Metzler-Nolte, *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 108–111.
- [106] F. Ruan, Y. Chen, K. Itoh, T. Sasaki, P. B. Hopkins, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4347–4354.
- [107] C. Wende, *Masterarbeit (Synthese und Evaluation von Fluorophor-ATCUN- und Hydrazon- Komplexen des Kupfers und Nickels zur Spaltung von DNA)*, Freie Universität Berlin, Deutschland, **2012**.
- [108] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, **2005**.
- [109] A. Jabłoński, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [110] P. W. Atkins, J. de Paula, in *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, **2006**, pp. 483–493.
- [111] S. G. Telfer, T. M. McLean, M. R. Waterland, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 3097–3108.
- [112] A. Beer, *Ann. Phys. Chem.* **1852**, *86*, 78–88.
- [113] G. G. Stokes, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1853**, *142*, 463–562.
- [114] L. Meitner, *Z. Phys. A Hadron. Nucl.* **1922**, *11*, 35–54.
- [115] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, **1994**.
- [116] J. Rosenthal, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5536–5537.
- [117] K. Tram, H. Yan, H. A. Jenkins, S. Vassiliev, D. Bruce, *Dyes Pigments* **2009**, *82*, 392–395.
- [118] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [119] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223.
- [120] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [121] J. Karolin, L. B.-A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801–7806.
- [122] M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- [123] I. J. Arroyo, R. Hu, G. Merino, B. Z. Tang, E. Penón-Cabrera, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5719–5722.
- [124] A. Schmitt, B. Hinkeldey, M. Wild, G. Jung, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 755–758.
- [125] D. Wang, J. Fan, X. Gao, B. Wang, S. Sun, X. Peng, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7675–7683.
- [126] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172.
- [127] A. Cui, X. Peng, J. Fan, X. Chen, Y. Wu, B. Guo, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *186*, 85–92.
- [128] P. D. Rao, S. Dhanalekshmi, B. J. Littler, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7323–7344.
- [129] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2008**, *64*, 112–122.
- [130] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C* **2015**, *71*, 3–8.
- [131] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2015**, *71*, 3–8.
- [132] P. van der Sluis, A. L. Spek, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, *46*, 194–201.
- [133] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5597–5604.
- [134] S. Reichert, P. Welker, M. Calderón, J. Khandare, D. Mangoldt, K. Licha, R. K. Kainthan, D. E. Brooks, R. Haag, *Small* **2011**, *7*, 820–829.

- [135] S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319–326.
- [136] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [137] S. J. Compton, C. G. Jones, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369–374.
- [138] X. Zhang, Y. Shiraishi, T. Hirai, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5039–5042.
- [139] E. L. Doyle, C. A. Hunter, H. C. Phillips, S. J. Webb, N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4593–4599.
- [140] R. Gentsch, F. Pippig, K. Nilles, P. Theato, R. Kikkeri, M. Maglinao, B. Lepenies, P. H. Seeberger, H. G. Börner, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9239–9247.
- [141] E. Birtalan, B. Rudat, D. K. Kölmel, D. Fritz, S. B. L. Vollrath, U. Schepers, S. Bräse, *Biopolym. Pept. Sci.* **2011**, *96*, 694–701.
- [142] M. Artigau, A. Bonnet, S. Ladeira, P. Hoffmann, A. Vigroux, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 7149–7152.
- [143] S. Zhu, J. Zhang, G. Vegesna, F.-T. Luo, S. Green, H. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 438–441.
- [144] W. Zhang, J. Song, B. Zhang, L. Liu, K. Wang, R. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1410–1415.
- [145] L. Fülöp, B. Penke, M. Zarándi, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 397–401.
- [146] K. P. Neupane, A. R. Aldous, J. a. Kritzer, *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *139*, 65–76.
- [147] J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, E. Kurowska, T. Frączyk, M. Jeżowska-Bojczuk, W. Bal, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 13927–13933.
- [148] S. Adkins, M. Burmeister, *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 17–23.
- [149] O. J. Lumpkin, P. Déjardin, B. H. Zimm, *Biopolymers* **1985**, *24*, 1573–1593.
- [150] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–282.
- [151] S. C. Jain, H. M. Sobell, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1984**, *1*, 1179–1194.
- [152] J.-B. Le Pecq, C. Paoletti, *Anal. Biochem.* **1966**, *17*, 100–107.
- [153] J.-B. Le Pecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87–106.
- [154] M. von Piechowski, M.-A. Thelen, J. Hoigné, R. E. Bühler, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 1448–1454.
- [155] E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7474–7481.
- [156] A. Sreedhara, J. D. Freed, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8814–8824.
- [157] R. Ren, P. Yang, W. Zheng, Z. Hua, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5454–5463.
- [158] R. Franco, M. I. Panayiotidis, J. A. Cidowski, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30452–30465.
- [159] É. Hideg, C. Spetea, I. Vass, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1186*, 143–152.
- [160] J. E. Packer, J. S. Mahood, V. O. Mora-Arellano, T. F. Slater, R. L. Willson, B. S. Wolfenden, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *98*, 901–906.
- [161] J. D. Lambeth, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 181–189.
- [162] F. C. Fang, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 820–832.
- [163] F. L. Muller, M. S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, H. van Remmen, *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 477–503.
- [164] M. G. Bonini, S. Miyamoto, P. Di Mascio, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51836–51843.
- [165] G. F. Gaetani, S. Galiano, L. Canepa, A. M. Ferraris, H. N. Kirkman, *Blood* **1989**, *73*, 334–339.
- [166] G. F. Gaetani, A. M. Ferraris, M. Rolfo, R. Mangerini, S. Arena, H. N. Kirkman, *Blood* **1996**, *87*, 1595–1599.
- [167] J. R. Kanofsky, *Chem. Biol. Interact.* **1989**, *70*, 1–28.
- [168] L. F. Agnez-Lima, J. T. A. Melo, A. E. Silva, A. H. S. Oliveira, A. R. S. Timoteo, K. M. Lima-Bessa, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, R. S. Galhardo, et al., *Mutat. Res.* **2012**, *751*, 15–28.

- [169] M. K. Eberhardt, R. Colina, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1071–1074.
- [170] A. Tefler, S. M. Bishop, D. Phillips, J. Barber, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13244–13253.
- [171] J. G. Parker, W. D. Stanbro, *J. Photochem.* **1984**, *25*, 545–547.
- [172] J. M. Aubry, B. Cazin, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013–2014.
- [173] L. Guilloreau, S. Combalbert, A. Sournia-Saquet, H. Mazarguil, P. Faller, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1317–1325.
- [174] C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari, E. Guillon, P. Faller, P. Dorlet, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10151–10160.
- [175] G. F. Smith, W. H. McCurdy, Jr., *Anal. Chem.* **1952**, *24*, 371–373.
- [176] R. Krämer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 804–806.
- [177] G. K. Rollefson, R. W. Stoughton, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1517–1520.
- [178] W.-Y. Lin, H. E. Van Wart, *J. Inorg. Biochem.* **1988**, *32*, 21–38.
- [179] J. Brunner, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13626–13627.
- [180] H. Korpi, P. J. Figiel, E. Lankinen, P. Ryan, M. Leskelä, T. Repo, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2465–2471.
- [181] K. P. Neupane, A. R. Aldous, J. A. Kritzer, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 2729–2735.
- [182] H. T. S. Britton, R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1931**, 1456–1462.
- [183] G. De Santis, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, D. Sacchi, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3581–3582.
- [184] L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, D. Sacchi, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 75–82.
- [185] C. B. Murphy, Y. Zhang, T. Troxler, V. Ferry, J. J. Martin, W. E. Jones, Jr., *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1537–1543.
- [186] G. D. Scholes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 57–87.
- [187] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836–850.
- [188] T. Forster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
- [189] J. Fan, H.-Q. Guo, S.-L. Feng, *J. Fluoresc.* **2007**, *17*, 257–264.
- [190] S. Feng, X. Chen, J. Fan, G. Zhang, J. Jiang, X. Wei, *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 463–474.
- [191] A. Kumar, J. P. Chinta, A. K. Ajay, M. K. Bhat, C. P. Rao, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 10865–10872.
- [192] G. Roelfes, M. E. Branum, L. Wang, L. Que, Jr., B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11517–11518.
- [193] P. U. Maheswari, S. Roy, H. den Dulk, S. Barends, G. van Wezel, B. Kozlevčar, P. Gamez, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 710–711.
- [194] A. Kelleth, M. O'Connor, M. McCann, O. Howe, A. Casey, P. McCarron, K. Kavanagh, M. McNamara, S. Kennedy, D. D. May, P. S. Skell, D. O'Shea, M. Devereux, *MedChemComm* **2011**, *2*, 579–584.
- [195] K. Suntharalingam, D. J. Hunt, A. A. Duarte, A. J. P. White, D. J. Mann, R. Vilar, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15133–15141.
- [196] K. Li, L.-H. Zhou, J. Zhang, S.-Y. Chen, Z.-W. Zhang, J.-J. Zhang, H.-H. Lin, X.-Q. Yu, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1768–1772.
- [197] G. Park, J. T. Tomlinson, M. S. Melvin, M. W. Wright, C. S. Day, R. A. Manderville, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 113–116.
- [198] S. Borah, M. S. Melvin, N. Lindquist, R. a Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4557–4562.
- [199] S. Rodríguez-Hermida, C. Wende, A. B. Lago, R. Carballo, N. Kulak, E. M. Vázquez-López, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 5843–5853.
- [200] N. Plumeré, B. Speiser, *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 1244–1251.
- [201] J. Guo, C. Yuan, M. Guo, L. Wang, F. Yan, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3261–3266.

- [202] P. L. Pauson, W. E. Watts, *J. Chem. Soc.* **1963**, 2990–2996.
- [203] J. Liu, P. He, J. Yan, X. Fang, J. Peng, K. Liu, Y. Fang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2508–2511.
- [204] A. P. Krapcho, C. S. Kuell, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2559–2564.
- [205] X. de Hatten, Z. Cournia, I. Huc, J. C. Smith, N. Metzler-Nolte, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8139–8152.
- [206] M. Adamczyk, J. Grote, *Org. Prep. Proced. Int.* **1995**, *27*, 239–242.
- [207] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, Mi. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253–2256.
- [208] F. M. Fomin, K. S. Zaitseva, *Russ. J. Phys. Chem. A* **2014**, *88*, 466–470.
- [209] B. Higgins, B. A. DeGraff, J. N. Demas, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 6662–6669.
- [210] C. Lüdtkke, *Dissertation (Synthese fluorierter 1,10-Phenanthrolin-Derivate und Erfassung der biologischen Aktivität derer Kupfer(II)-Komplexe)*, Freie Universität Berlin, Deutschland, **2016**.
- [211] A. Oehrl, *Bachelorarbeit (Kupferkomplexe verschiedener Phenanthrolinderivate und deren Plasmid-DNA-Spaltaktivität)*, Freie Universität Berlin, Deutschland, **2013**.
- [212] N. Türkölçü, C. Sahin, *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 694–699.
- [213] E. C. Long, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 827–836.
- [214] C. V. Banks, R. I. Bystroff, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6153–6158.
- [215] C. Harford, S. Narindrasorasak, B. Sarkar, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4271–4278.
- [216] Q. Liang, D. C. Ananias, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 248–257.
- [217] S. Inoue, S. Kawanishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 445–451.
- [218] J. G. Muller, R. P. Hickerson, R. J. Perez, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1501–1506.
- [219] J. C. Stockert, *J. Theor. Biol.* **1989**, *137*, 107–111.
- [220] L. A. Moran, H. R. Horton, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, in *Principles of Biochemistry*, Pearson Education, Inc., New York City, USA, **2012**, pp. 583–586.
- [221] R. L. Ornstein, R. Rein, D. L. Breen, R. D. Macelroy, *Biopolymers* **1978**, *17*, 2341–2360.
- [222] M. S. A. Begum, S. Saha, A. Hussain, A. R. Chakravarty, *Indian J. Chem.* **2009**, *48A*, 9–14.
- [223] R. Buchčík, Z. Trávníček, J. Vančo, R. Herchel, Z. Dvořák, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9404–9412.
- [224] F. Bernheim, M. L. C. Bernheim, K. M. Wilbur, *J. Biol. Chem.* **1948**, *174*, 257–264.
- [225] R. O. Sinnhuber, T. C. Yu, T. C. Yu, *Food Res.* **1958**, *23*, 626–633.
- [226] D. R. Janero, *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 515–540.
- [227] H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, *Method. Enzymol.* **1990**, *186*, 407–421.
- [228] J. M. C. Gutteridge, *FEBS Lett.* **1981**, *128*, 343–346.
- [229] J. M. C. Gutteridge, *FEBS Lett.* **1979**, *105*, 278–282.
- [230] R. M. Burger, A. R. Berkowitz, J. Peisach, S. B. Horwitz, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 11832–11838.
- [231] J. M. C. Gutteridge, S. Wilkins, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *759*, 38–41.
- [232] L. Giloni, M. Takeshita, F. Johnson, C. Iden, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 8608–8615.
- [233] C. B. Kenaston, K. M. Wilbur, A. Ottolenghi, F. Bernheim, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1955**, *32*, 33–35.
- [234] H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, M. U. Dianzani, G. Poli, T. F. Slater, *Biochem. J.* **1982**, *208*, 129–140.
- [235] J. M. C. Gutteridge, *Anal. Biochem.* **1975**, *69*, 518–526.
- [236] J. M. C. Gutteridge, B. Halliwell, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 2801–2805.
- [237] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Method. Enzymol.* **1990**, *186*, 1–85.

- [238] K. Umegaki, M. Hashimoto, H. Yamasaki, Y. Fujii, M. Yoshimura, A. Sugisawa, K. Shinozuka, *Free Radic. Res.* **2001**, *34*, 427–435.
- [239] H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jürgens, *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 341–390.
- [240] A. Gießauf, E. Steiner, H. Esterbauer, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1256*, 221–232.
- [241] W. L. Smith, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 315–324.
- [242] L. K. Dahle, E. G. Hill, R. T. Holman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *98*, 253–261.
- [243] W. A. Pryor, J. P. Stanley, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3615–3617.
- [244] E. N. Frankel, W. E. Neff, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *754*, 264–270.
- [245] H. Kosugi, K. Kikugawa, *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 205–207.
- [246] D. T. Loots, M. V. Lieshout, G. Lachmann, *Eur. J. Clin. Nutr.* **2007**, *61*, 287–289.
- [247] D. Bar-Or, L. T. Rael, E. P. Lau, N. K. R. Rao, G. W. Thomas, J. V. Winkler, R. L. Yukl, R. G. Kingston, C. G. Curtis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 856–862.
- [248] B. Cuenoud, T. M. Tarasow, A. Schepartz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895–898.
- [249] M. Kito, Y. Takenaka, R. Urade, *FEBS Lett.* **1995**, *362*, 39–42.
- [250] J. Gallagher, O. Zelenko, A. D. Walts, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2096–2104.
- [251] K. C. Brown, S.-H. Yang, T. Kodadek, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4733–4739.
- [252] K. C. Brown, Z. Yu, A. L. Burlingame, C. S. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4397–4406.
- [253] E. D. Horowitz, M. G. Finn, A. Asokan, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1059–1066.
- [254] G. J. S. Cooper, A. C. Willis, A. Clark, R. C. Turner, R. B. Sim, K. B. M. Reid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 8628–8632.
- [255] A. E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza, P. C. Butler, *Diabetes* **2003**, *52*, 102–110.
- [256] C.-Y. Lin, T. Gurlo, R. Kaye, A. E. Butler, L. Haataja, C. G. Glabe, P. C. Butler, *Diabetes* **2007**, *56*, 1324–1332.
- [257] R. A. Ritzel, J. J. Meier, C.-Y. Lin, J. D. Veldhuis, P. C. Butler, *Diabetes* **2007**, *56*, 65–71.
- [258] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486–490.
- [259] R. Kaye, Y. Sokolov, B. Edmonds, T. M. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46363–46366.
- [260] A. Demuro, E. Mina, R. Kaye, S. C. Milton, I. Parker, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17294–17300.
- [261] L. A. Moran, H. R. Horton, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, in *Principles of Biochemistry*, Pearson Education, Inc., New York City, USA, **2012**, pp. 148–152.
- [262] J. Suh, W. S. Chei, T. Y. Lee, M. G. Kim, S. H. Yoo, K. Jeong, J. Y. Ahn, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 693–701.
- [263] W. S. Chei, H. Ju, J. Suh, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 511–519.
- [264] H. Schägger, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368–379.
- [265] H. Schägger, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 16–22.
- [266] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [267] Bio-Rad Laboratories, "Bio-Rad Laboratories: Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels," <http://www.bio-rad.com/de-de/category/protein-gels/mini-protean-precaster-gels>.
- [268] J. C. Joyner, J. Reichfield, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15613–15626.
- [269] Y. Ishikawa, T. Kobayashi, Y. Nishida, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *67*, 150.
- [270] S. R. Abdelraheim, S. Královicová, D. R. Brown, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1429–1440.

- [271] D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York City, USA, **2005**, pp. 99–100.
- [272] G. Sanna, M. I. Pilo, M. A. Zoroddu, R. Seeber, S. Mosca, *Inorg. Chim. Acta* **1993**, *208*, 153–158.
- [273] F. P. Bossu, K. L. Chellappa, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2195–2203.
- [274] C.-H. B. Chen, L. Milne, R. Landgraf, D. M. Perrin, D. S. Sigman, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 735–740.
- [275] K. A. Reich, L. E. Marshall, D. R. Graham, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3582–3584.
- [276] T. B. Thederahn, M. D. Kuwabara, T. A. Larsen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4941–4946.
- [277] C. Wende, C. Lüdtkke, N. Kulak, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2597–2612.
- [278] S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 693–700.
- [279] T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Arii, M. Chikira, P. Tamil Selvi, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1205–1219.
- [280] S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3927–3934.
- [281] C. J. Chandler, L. W. Deady, J. A. Reiss, *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 599–601.
- [282] G. B. Bates, E. Cole, D. Parker, R. Katakya, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996**, 2693–2698.
- [283] J. Heinrich, *Forschungsbericht (Synthese von Kupferkomplexen mit Hydrazon-Phenanthrolin-Liganden und Evaluation der Plasmid-DNA-Spaltaktivität)*, Freie Universität Berlin, Deutschland, **2015**.
- [284] G. Wang, D. E. Bergstrom, *Synlett* **1992**, 422–424.
- [285] S. Chhabra, K. K. Verma, *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 569–575.
- [286] R. Krishnakumar, G. Aravamudan, M. R. Udupa, M. Seshasayee, T. A. Hamor, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996**, 2253–2259.
- [287] K. C. Malhotra, R. Sharma, S. C. Chaudhry, N. Sharma, *Curr. Sci.* **1989**, *58*, 1188–1191.
- [288] H. A. Jahn, E. Teller, *Proc. R. Soc. London. Ser. A* **1937**, *161*, 220–235.
- [289] A. F. Holleman, N. Wiberg, in *Lehrbuch Der Anorganischen Chemie*, Walter De Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland, **2007**, pp. 1363–1368.
- [290] K. Lacková, I. Potočňák, *Acta Crystallogr. Sect. E* **2012**, *68*, 1553–1554.
- [291] K. J. Catalan, S. Jackson, J. D. Zubkowski, D. L. Perry, E. J. Valente, L. A. Feliu, A. Polanco, *Polyhedron* **1995**, *14*, 2165–2171.
- [292] S. P. Watton, *Acta Crystallogr. Sect. E* **2009**, *65*, 585–586.
- [293] S. Itoh, N. Kishikawa, T. Suzuki, H. D. Takagi, *Dalton Trans.* **2005**, 1066–1078.
- [294] H. Nakai, Y. Deguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2557–2560.
- [295] D. Tran, B. W. Skelton, A. H. White, L. E. Laverman, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2505–2511.
- [296] S. P. Watton, *Acta Crystallogr. Sect. E* **2010**, *66*, 1449–1449.
- [297] J. G. Moffat, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3741–3746.
- [298] W. E. Razzell, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3028–3030.
- [299] L. B. Dolapchiev, R. A. Vassileva, D. Dimitrov, *Molec. Biol. Rep.* **1979**, *5*, 185–188.
- [300] X.-Q. Chen, X.-J. Peng, J.-Y. Wang, Y. Wang, S. Wu, L.-Z. Zhang, T. Wu, Y.-K. Wu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 5400–5407.
- [301] S. T. Abedon, *Genetics* **2000**, *155*, 481–486.
- [302] C. Mülhardt, in *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*, Springer Science + Business Media, Berlin, Deutschland, **2013**, pp. 134–140.
- [303] I. R. Lehman, *Science* **1974**, *186*, 790–797.

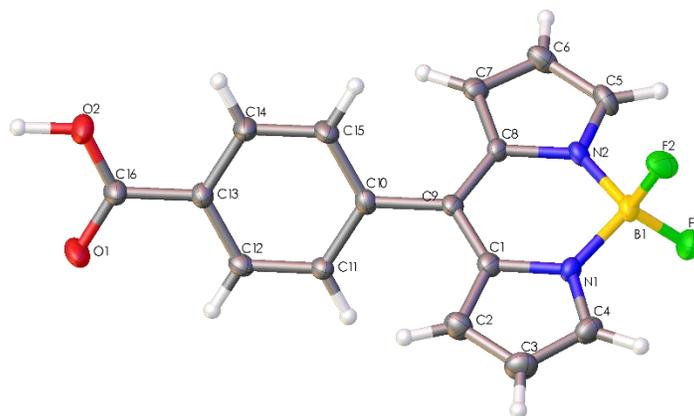
- [304] N. Metzler-Nolte, U. Schatzschneider, in *Bioinorganic Chemistry: A Practical Course*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland, **2009**, pp. 31–46.
- [305] J. M. Kelly, A. B. Tossi, D. J. McConnell, C. OhUigin, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 6017–6034.
- [306] S. A. Tysøe, R. J. Morgan, A. D. Baker, T. C. Streckas, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 1707–1711.
- [307] B. Selvakumar, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, H. Stoeckli-Evans, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 316–330.
- [308] D. E. V. Schmechel, D. M. Crothers, *Biopolymers* **1971**, *10*, 465–480.
- [309] J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469–489.
- [310] O. Stern, M. Volmer, *Phys. Z.* **1919**, *20*, 183–188.
- [311] M. R. Eftink, C. A. Ghiron, *Anal. Biochem.* **1981**, *114*, 199–227.
- [312] A. J. Geall, I. S. Blagbrough, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 849–859.
- [313] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 793–804.
- [314] B. C. Baguley, M. Le Bret, *Biochemistry* **1984**, *23*, 937–943.
- [315] P. Tamil Selvi, H. Stoeckli-Evans, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2110–2118.
- [316] X. Sheng, X.-M. Lu, Y.-T. Chen, G.-Y. Lu, J.-J. Zhang, Y. Shao, F. Liu, Q. Xu, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9703–9712.
- [317] S. Roy, A. K. Patra, S. Dhar, A. R. Chakravarty, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 5625–5633.
- [318] A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4960–4962.
- [319] A. Raja, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, R. Balamurugan, C. A. Kilner, M. A. Halcrow, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1717–1732.
- [320] S. Ramakrishnan, V. Rajendiran, M. Palaniandavar, V. S. Periasamy, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, M. A. Akbarsha, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1309–1322.
- [321] W. Y. Lee, Y. K. Yan, P. P. F. Lee, S. J. Tan, K. H. Lim, *Metallomics* **2012**, *4*, 188–196.
- [322] E. L. Eliel, S. H. Wilen, in *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York City, USA, **1994**, pp. 992–1007.
- [323] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčičuk, M. Vorlíčková, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–1725.
- [324] N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3166–3172.
- [325] P. W. Atkins, J. de Paula, in *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, **2006**, pp. 548–549.
- [326] R. W. Woody, *Method. Enzymol.* **1995**, *246*, 34–71.
- [327] S. Venkadesh, P. K. Mandal, N. Gautham, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 307–312.
- [328] S. Arai, T. Chatake, T. Ohhara, K. Kurihara, I. Tanaka, N. Suzuki, Z. Fujimoto, H. Mizuno, N. Niimura, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3017–3024.
- [329] N. Narayana, N. Shamala, K. N. Ganesh, M. A. Viswamitra, *Biochemistry* **2006**, *45*, 1200–1211.
- [330] H. Vasmel, J. Greve, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1329–1332.
- [331] D. M. Gray, R. L. Ratliff, M. R. Vaughan, *Method. Enzymol.* **1992**, *211*, 389–406.
- [332] T. Miyahara, H. Nakatsuji, H. Sugiyama, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 42–55.
- [333] T. Miyahara, H. Nakatsuji, *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 8269–8278.
- [334] A. Rodger, I. S. Blagbrough, G. Adlam, M. L. Carpenter, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1583–1593.
- [335] I. Correia, S. Roy, C. P. Matos, S. Borovic, N. Butenko, I. Cavaco, F. Marques, J. Lorenzo, A. Rodríguez, V. Moreno, J. C. Pessoa, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *147*, 134–146.

- [336] S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1711, 1–11.
- [337] S. Zhang, Y. Zhu, C. Tu, H. Wei, Z. Yang, L. Lin, J. Ding, J. Zhang, Z. Guo, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 2099–2106.
- [338] P. Uma Maheswari, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 219–230.
- [339] L.-M. Chen, J. Liu, J.-C. Chen, S. Shi, C.-P. Tan, K.-C. Zheng, L.-N. Ji, *J. Mol. Struct.* **2008**, 881, 156–166.
- [340] Z. Chen, X. Wang, Y. Li, Z. Guo, *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, 11, 1392–1396.
- [341] B. Nordén, F. Tjerneld, *Biopolymers* **1982**, 21, 1713–1734.
- [342] C. Bargossi, M. C. Fiorini, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 208, 17–32.
- [343] M. B. Gumpu, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, J. B. B. Rayappan, *Sensor. Actuator. B* **2015**, 213, 515–533.
- [344] H.-H. Wang, L. Xue, Z.-J. Fang, G.-P. Li, H. Jiang, *New J. Chem.* **2010**, 34, 1239–1242.
- [345] Y. You, Y. Han, Y.-M. Lee, S. Y. Park, W. Nam, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11488–11491.
- [346] D. J. van Dijken, P. Kovaříček, S. P. Ihrig, S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 14982–14991.
- [347] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, in *Organic Chemistry*, Oxford, Vereinigtes Königreich, **2001**, pp. 349–352.
- [348] Z. Xu, L. Zhang, R. Guo, T. Xiang, C. Wu, Z. Zheng, F. Yang, *Sensor. Actuator. B* **2011**, 156, 546–552.
- [349] E. Espada-Bellido, M. D. Galindo-Riaño, A. Aouarram, M. García-Vargas, *Anal. Sci.* **2009**, 25, 903–909.
- [350] Z.-Y. Yang, *Synth. React. Inorg. Met. Chem.* **2000**, 30, 1265–1271.
- [351] P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A. H. Cowley, R. R. Butorac, N. Dharmaraj, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3376–3387.
- [352] P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, E. Jayanthi, R. R. Butorac, A. H. Cowley, N. Dharmaraj, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, 384, 83–96.
- [353] N. Patel, R. S. P. Rawat, M. Choudhary, V. P. Sondhiya, D. K. Patel, K. K. Shukla, D. K. Patel, Y. Singh, R. Pandey, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, 392, 283–291.
- [354] D. S. Raja, N. S. P. Bhuvanesh, K. Natarajan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, 17, 223–237.
- [355] C. Gökçe, R. Gup, *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, 122, 15–23.
- [356] C. Gökçe, R. Gup, *Appl. Organomet. Chem.* **2013**, 27, 263–268.
- [357] M. Alagesan, N. S. P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 7210–7223.
- [358] Ş. G. Küçükgülzel, S. Rollas, I. Küçükgülzel, M. Kiraz, *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, 34, 1093–1100.
- [359] S. Banerjee, S. Mondal, S. Sen, S. Das, D. L. Hughes, C. Rizzoli, C. Desplanches, C. Mandal, S. Mitra, *Dalton Trans.* **2009**, 6849–6860.
- [360] X. Yu, L. Shi, S. Ke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 5772–5776.
- [361] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, 49, 4373–4384.
- [362] M. Calderón, P. Welker, K. Licha, I. Fichtner, R. Graeser, R. Haag, F. Kratz, *J. Control. Release* **2011**, 151, 295–301.
- [363] M. Carcelli, G. Corazzari, S. Ianelli, G. Pelizzi, C. Solinas, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, 353, 310–314.
- [364] M. Carcelli, S. Ianelli, P. Pelagatti, G. Pelizzi, D. Rogolino, C. Solinas, M. Tegoni, *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 358, 903–911.
- [365] P. Barbazán, A. Hagenbach, E. Oehlke, U. Abram, R. Carballo, S. Rodríguez-Hermida, E. M. Vázquez-López, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2010, 4622–4630.
- [366] W. Guo, B. J. Engelman, T. L. Haywood, N. B. Blok, D. S. Beaudoin, S. O. Obare, *Talanta* **2011**, 87, 276–283.
- [367] G. F. Smith, F. W. Cagle, Jr., *J. Org. Chem.* **1947**, 12, 781–784.

- [368] E. Amouyal, A. Homsy, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 1841–1845.
- [369] E. Berl, F. Becker, W. Begerow, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1932**, 209, 264–266.
- [370] R. H. Zheng, H. C. Guo, H. J. Jiang, K. H. Xu, B. B. Liu, W. L. Sun, Z. Q. Shen, *Chinese Chem. Lett.* **2010**, 21, 1270–1272.
- [371] O. Das, T. K. Paine, *Dalton Trans.* **2012**, 41, 11476–11481.
- [372] L. Michaelis, M. P. Schubert, R. K. Reber, J. A. Kuck, S. Granick, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 1678–1683.
- [373] L. Michaelis, M. P. Schubert, *Chem. Rev.* **1938**, 22, 437–470.
- [374] H. Bock, P. Hänel, *Z. Naturforsch. B* **1990**, 45, 287–300.
- [375] D. M. Murphy, K. McNamara, P. Richardson, V. Sanchez-Romaguera, R. E. P. Winpenny, L. J. Yellowlees, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, 374, 435–441.
- [376] E. Lamour, S. Routier, J.-L. Bernier, J.-P. Catteau, C. Bailly, H. Vezin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1862–1869.
- [377] T. F. S. Silva, P. Smoleński, L. M. D. R. S. Martins, M. F. C. Guedes da Silva, A. R. Fernandes, D. Luis, A. Silva, S. Santos, P. M. Borralho, C. M. P. Rodrigues, A. J. L. Pombeiro, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3651–3658.
- [378] C. Deegan, B. Coyle, M. McCann, M. Devereux, D. A. Egan, *Chem. Biol. Interact.* **2006**, 164, 115–125.
- [379] M. McCann, A. L. S. Santos, B. A. da Silva, M. T. V. Romanos, A. S. Pyrrho, M. Devereux, K. Kavanagh, I. Fichtner, A. Kellett, *Toxicol. Res.* **2012**, 1, 47–54.
- [380] S. Roy, K. D. Hagen, P. Uma Maheswari, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk, G. P. van Wenzel, *ChemMedChem* **2008**, 3, 1427–1434.
- [381] A. L. Furst, M. G. Hill, J. K. Barton, *Langmuir* **2015**, 31, 6554–6562.
- [382] R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1984**, 23, 3934–3945.
- [383] M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3047–3053.

Kristallographischer Anhang

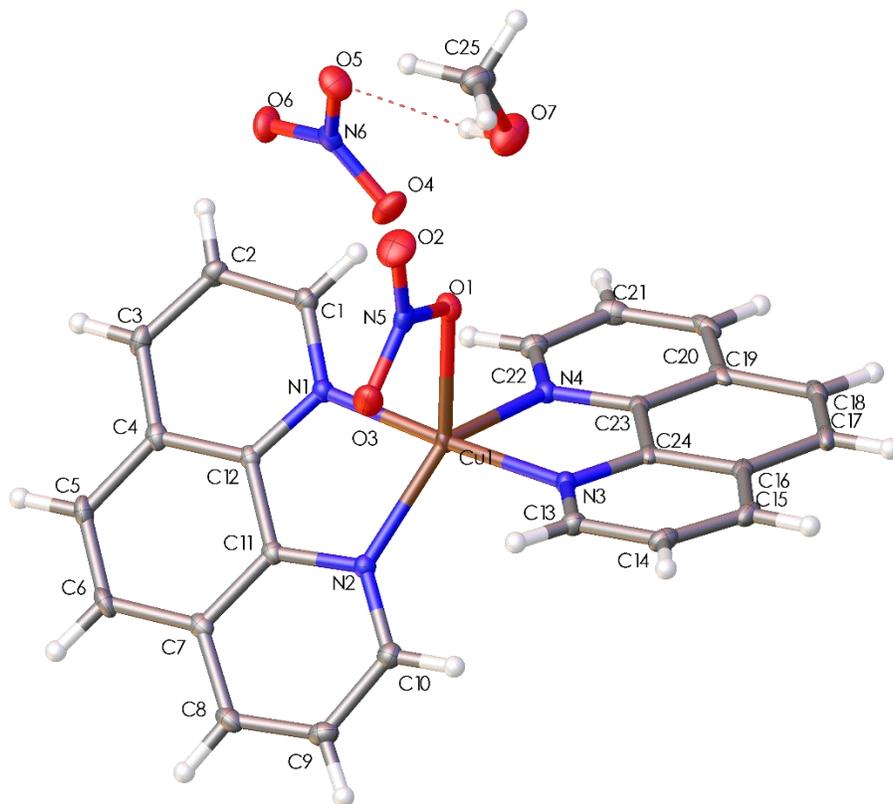
BODIPY 12



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
F1	B1	1.375(2)	C9	C10	1.477(2)
F2	B1	1.392(2)	C1	C2	1.420(2)
O2	C16	1.264(2)	C12	C11	1.378(2)
N1	C1	1.390(2)	C12	C13	1.390(2)
N1	C4	1.343(2)	C11	C10	1.404(2)
N1	B1	1.553(2)	C4	C3	1.380(3)
O1	C16	1.261(2)	C7	C6	1.358(3)
N2	C8	1.390(2)	C5	C6	1.398(3)
N2	C5	1.343(2)	C13	C16	1.482(2)
N2	B1	1.548(3)	C13	C14	1.389(2)
C8	C9	1.397(2)	C3	C2	1.373(3)
C8	C7	1.414(2)	C10	C15	1.394(2)
C9	C1	1.394(2)	C15	C14	1.382(3)

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
C1	N1	B1	125.26(15)	C12	C13	C16	120.69(15)
C4	N1	C1	107.81(15)	C14	C13	C12	119.69(17)
C4	N1	B1	126.44(15)	C14	C13	C16	119.60(16)
C8	N2	B1	125.45(14)	O2	C16	C13	118.50(16)
C5	N2	C8	107.40(15)	O1	C16	O2	122.65(17)
C5	N2	B1	127.08(15)	O1	C16	C13	118.85(16)
N2	C8	C9	120.91(15)	C2	C3	C4	107.43(17)
N2	C8	C7	107.65(15)	C11	C10	C9	120.48(15)
C9	C8	C7	131.04(16)	C15	C10	C9	120.39(15)
C8	C9	C10	119.83(15)	C15	C10	C11	119.13(16)
C1	C9	C8	119.93(16)	C3	C2	C1	107.25(17)
C1	C9	C10	120.23(15)	C14	C15	C10	120.44(16)
N1	C1	C9	121.33(15)	C15	C14	C13	120.19(17)
N1	C1	C2	107.11(16)	C7	C6	C5	107.42(17)
C9	C1	C2	131.50(17)	F1	B1	F2	109.09(15)
C11	C12	C13	120.47(16)	F1	B1	N1	111.26(15)
C12	C11	C10	120.07(16)	F1	B1	N2	111.43(16)
N1	C4	C3	110.40(17)	F2	B1	N1	109.43(16)
C6	C7	C8	107.54(16)	F2	B1	N2	109.99(14)
N2	C5	C6	109.98(16)	N2	B1	N1	105.59(14)

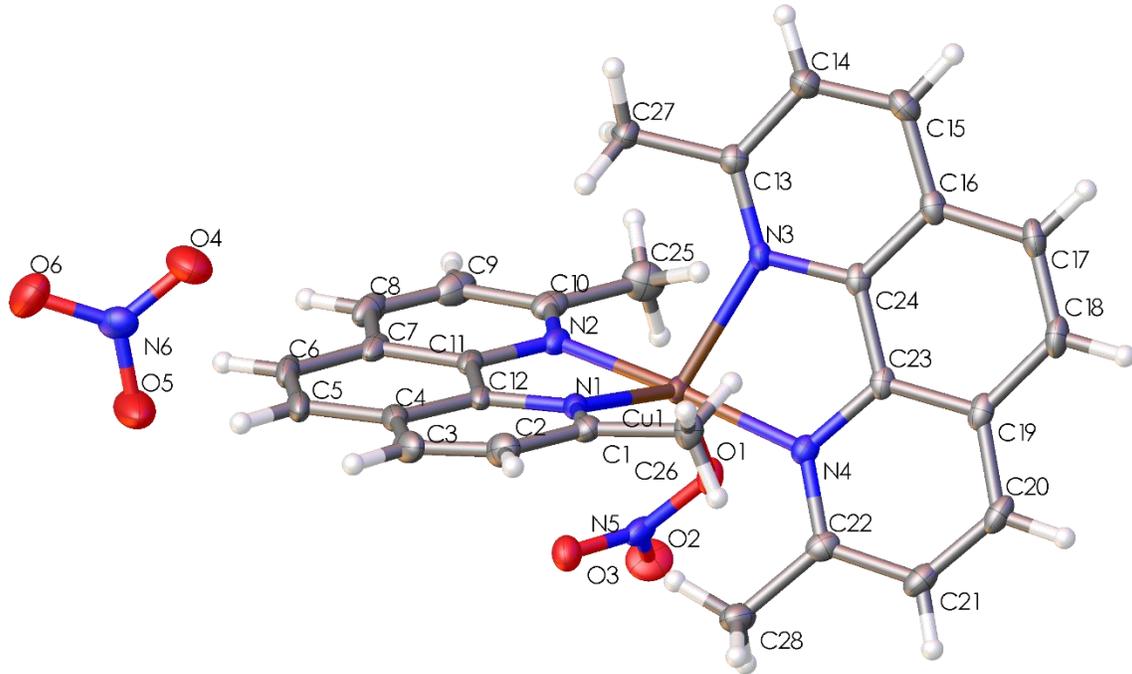
Cu(37)₂



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
Cu1	O1	2.1550(13)	C5	C4	1.434(3)
Cu1	O3	2.7637(15)	C5	C6	1.358(3)
Cu1	N4	2.0883(15)	C12	C4	1.401(2)
Cu1	N1	1.9801(15)	C23	C24	1.434(2)
Cu1	N2	2.0435(15)	C23	C19	1.405(2)
Cu1	N3	1.9873(15)	C2	C3	1.373(3)
O1	N5	1.280(2)	C2	C1	1.399(3)
O5	N6	1.265(2)	C13	C14	1.400(3)
O6	N6	1.242(2)	C7	C6	1.437(3)
O4	N6	1.250(2)	C7	C8	1.414(3)
O3	N5	1.250(2)	C24	C16	1.405(2)
O2	N5	1.236(2)	C18	C17	1.356(3)
N4	C23	1.356(2)	C18	C19	1.435(3)
N4	C22	1.328(2)	C17	C16	1.436(3)
N1	C12	1.357(2)	C16	C15	1.413(3)
N1	C1	1.331(2)	C4	C3	1.415(3)
N2	C11	1.360(2)	C22	C21	1.404(3)
N2	C10	1.329(2)	C19	C20	1.408(3)
N3	C13	1.328(2)	C14	C15	1.372(3)
N3	C24	1.362(2)	C8	C9	1.369(3)
O7	C25	1.411(3)	C10	C9	1.407(3)
C11	C12	1.433(2)	C21	C20	1.368(3)
C11	C7	1.402(2)			

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
O1	Cu1	O3	50.61(4)	C6	C5	C4	120.83(17)
N4	Cu1	O1	93.48(5)	N1	C12	C11	116.33(16)
N4	Cu1	O3	142.69(5)	N1	C12	C4	123.08(16)
N1	Cu1	O1	86.81(6)	C4	C12	C11	120.59(16)
N1	Cu1	O3	89.29(5)	N4	C23	C24	116.65(15)
N1	Cu1	N4	99.60(6)	N4	C23	C19	123.44(16)
N1	Cu1	N2	82.21(6)	C19	C23	C24	119.91(16)
N1	Cu1	N3	175.58(6)	C3	C2	C1	119.86(17)
N2	Cu1	O1	134.51(5)	N3	C13	C14	122.66(17)
N2	Cu1	O3	85.11(5)	C11	C7	C6	118.97(16)
N2	Cu1	N4	131.82(6)	C11	C7	C8	116.83(17)
N3	Cu1	O1	88.87(6)	C8	C7	C6	124.20(16)
N3	Cu1	O3	87.26(5)	N3	C24	C23	117.13(16)
N3	Cu1	N4	81.57(6)	N3	C24	C16	122.86(16)
N3	Cu1	N2	100.22(6)	C16	C24	C23	120.00(16)
N5	O1	Cu1	109.75(10)	C17	C18	C19	121.16(17)
N5	O3	Cu1	81.23(10)	C18	C17	C16	120.99(17)
C23	N4	Cu1	110.79(11)	C24	C16	C17	118.96(17)
C22	N4	Cu1	130.99(13)	C24	C16	C15	117.30(16)
C22	N4	C23	118.10(15)	C15	C16	C17	123.74(17)
C12	N1	Cu1	113.53(12)	C12	C4	C5	118.78(17)
C1	N1	Cu1	127.33(12)	C12	C4	C3	116.78(16)
C1	N1	C12	119.02(15)	C3	C4	C5	124.44(17)
C11	N2	Cu1	111.18(11)	N4	C22	C21	122.47(18)
C10	N2	Cu1	130.81(13)	C5	C6	C7	121.24(17)
C10	N2	C11	117.97(15)	C23	C19	C18	118.96(17)
C13	N3	Cu1	127.61(12)	C23	C19	C20	116.81(17)
C13	N3	C24	118.28(16)	C20	C19	C18	124.23(17)
C24	N3	Cu1	113.57(12)	C2	C3	C4	119.55(17)
O6	N6	O5	119.92(16)	C15	C14	C13	119.60(17)
O6	N6	O4	120.50(16)	C9	C8	C7	119.19(17)
O4	N6	O5	119.59(16)	N2	C10	C9	122.11(17)
O3	N5	O1	118.41(15)	C8	C9	C10	120.08(17)
O2	N5	O1	118.81(16)	C14	C15	C16	119.26(17)
O2	N5	O3	122.76(16)	N1	C1	C2	121.68(17)
N2	C11	C12	116.65(15)	C20	C21	C22	119.43(17)
N2	C11	C7	123.79(16)	C21	C20	C19	119.74(17)
C7	C11	C12	119.54(16)				

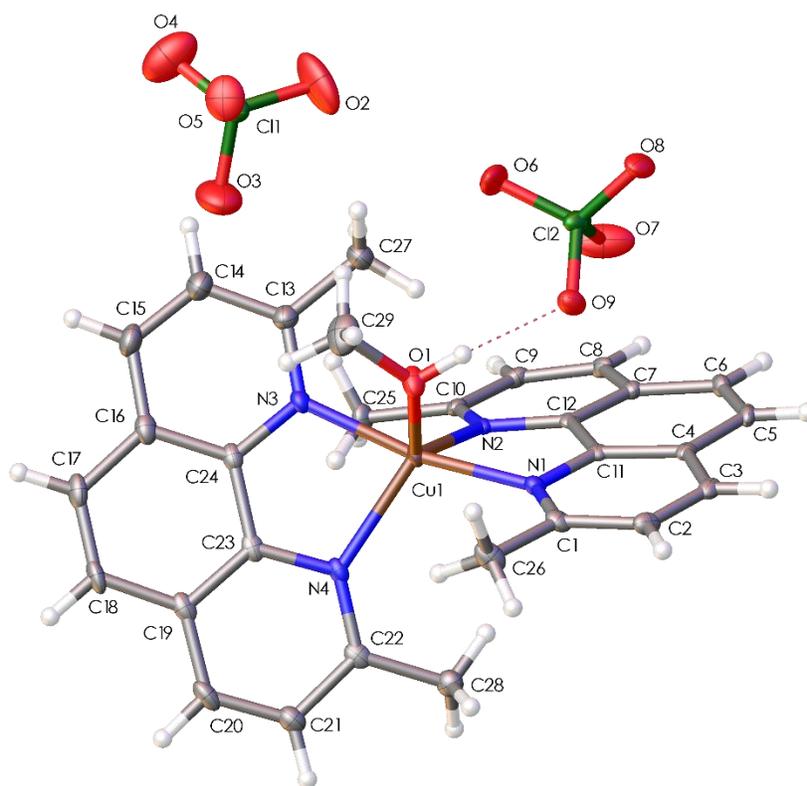
Cu(43)₂



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
Cu1	O1	2.0486(13)	C19	C23	1.401(2)
Cu1	N3	2.1395(14)	C19	C20	1.413(3)
Cu1	N2	2.0035(15)	C18	C17	1.353(3)
Cu1	N1	2.1050(15)	C1	C2	1.412(3)
Cu1	N4	2.0030(15)	C1	C26	1.491(3)
O1	N5	1.297(2)	C15	C16	1.410(3)
O3	N5	1.238(2)	C15	C14	1.366(3)
N3	C24	1.367(2)	C22	C21	1.411(3)
N3	C13	1.335(2)	C22	C28	1.491(3)
N2	C11	1.369(2)	C16	C17	1.434(2)
N2	C10	1.335(2)	C20	C21	1.363(3)
N1	C12	1.368(2)	C13	C27	1.490(2)
N1	C1	1.335(2)	C13	C14	1.409(2)
O2	N5	1.231(2)	C6	C5	1.354(3)
N4	C23	1.370(2)	C6	C7	1.436(3)
N4	C22	1.334(2)	C4	C5	1.427(3)
N6	O4	1.235(2)	C4	C3	1.407(3)
N6	O6	1.251(2)	C11	C7	1.404(2)
N6	O5	1.211(2)	C2	C3	1.361(3)
C12	C4	1.403(3)	C10	C9	1.413(3)
C12	C11	1.431(3)	C10	C25	1.493(3)
C24	C23	1.429(2)	C7	C8	1.406(3)
C24	C16	1.404(2)	C8	C9	1.359(3)
C19	C18	1.432(3)			

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
O1	Cu1	N3	120.53(5)	N4	C23	C24	117.18(15)
O1	Cu1	N1	132.44(5)	N4	C23	C19	122.61(16)
N2	Cu1	O1	88.39(6)	C19	C23	C24	120.15(16)
N2	Cu1	N3	103.35(6)	N1	C1	C2	121.40(17)
N2	Cu1	N1	81.95(6)	N1	C1	C26	118.77(16)
N1	Cu1	N3	107.01(5)	C2	C1	C26	119.83(17)
N4	Cu1	O1	82.67(5)	C14	C15	C16	118.77(16)
N4	Cu1	N3	80.81(6)	N4	C22	C21	120.42(17)
N4	Cu1	N2	171.03(6)	N4	C22	C28	119.12(16)
N4	Cu1	N1	104.60(6)	C21	C22	C28	120.46(16)
N5	O1	Cu1	118.31(11)	C24	C16	C15	117.72(16)
C24	N3	Cu1	108.90(11)	C24	C16	C17	119.02(17)
C13	N3	Cu1	132.54(12)	C15	C16	C17	123.22(17)
C13	N3	C24	118.53(15)	C21	C20	C19	119.65(17)
C11	N2	Cu1	111.96(12)	N3	C13	C27	118.43(15)
C10	N2	Cu1	127.90(13)	N3	C13	C14	121.34(16)
C10	N2	C11	119.50(16)	C14	C13	C27	120.23(16)
C12	N1	Cu1	108.86(12)	C5	C6	C7	120.36(18)
C1	N1	Cu1	132.68(12)	C18	C17	C16	121.17(17)
C1	N1	C12	118.32(15)	C20	C21	C22	120.72(17)
C23	N4	Cu1	113.22(11)	C12	C4	C5	119.20(19)
C22	N4	Cu1	126.61(12)	C12	C4	C3	117.48(17)
C22	N4	C23	119.57(15)	C3	C4	C5	123.31(18)
O3	N5	O1	119.49(15)	N2	C11	C12	117.61(15)
O2	N5	O1	117.55(16)	N2	C11	C7	122.49(17)
O2	N5	O3	122.96(16)	C7	C11	C12	119.86(17)
O4	N6	O6	122.02(18)	C15	C14	C13	120.74(17)
O5	N6	O4	119.00(19)	C3	C2	C1	120.38(18)
O5	N6	O6	118.98(19)	N2	C10	C9	120.23(18)
N1	C12	C4	122.87(17)	N2	C10	C25	119.24(17)
N1	C12	C11	117.40(16)	C9	C10	C25	120.52(18)
C4	C12	C11	119.69(16)	C6	C5	C4	121.47(18)
N3	C24	C23	117.57(15)	C11	C7	C6	119.32(19)
N3	C24	C16	122.72(16)	C11	C7	C8	117.22(18)
C16	C24	C23	119.65(16)	C8	C7	C6	123.46(18)
C23	C19	C18	119.18(17)	C9	C8	C7	119.60(18)
C23	C19	C20	117.01(17)	C8	C9	C10	120.95(19)
C20	C19	C18	123.80(17)	C2	C3	C4	119.32(17)
C17	C18	C19	120.73(17)				

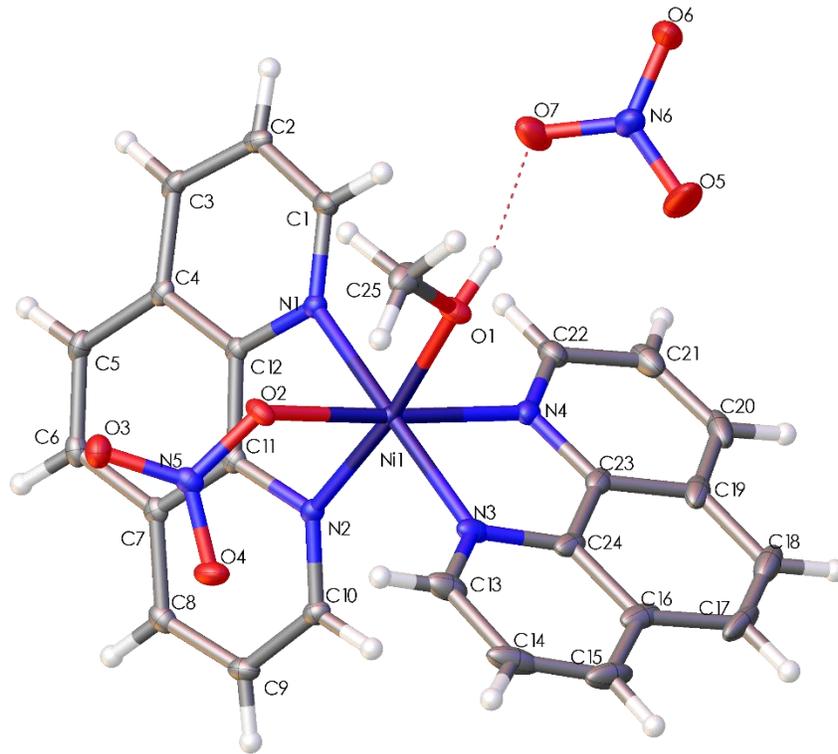
Cu(43)₂(ClO₄)₂



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
Cu1	O1	2.115(2)	C4	C5	1.430(4)
Cu1	N2	2.082(2)	C4	C3	1.411(4)
Cu1	N1	1.996(2)	C4	C12	1.401(4)
Cu1	N4	2.141(2)	C8	C9	1.363(4)
Cu1	N3	1.984(2)	C9	C10	1.411(4)
Cl2	O9	1.460(2)	C11	C12	1.432(4)
Cl2	O8	1.431(2)	C6	C5	1.354(4)
Cl2	O7	1.424(3)	C3	C2	1.367(4)
Cl2	O6	1.431(3)	C16	C24	1.400(4)
Cl1	O5	1.428(3)	C16	C17	1.437(4)
Cl1	O2	1.412(3)	C16	C15	1.406(5)
Cl1	O4	1.432(3)	C22	C21	1.416(4)
Cl1	O3	1.433(3)	C22	C28	1.487(4)
O1	C29	1.465(4)	C23	C24	1.436(4)
N2	C11	1.366(4)	C23	C19	1.403(4)
N2	C10	1.335(4)	C2	C1	1.412(4)
N1	C12	1.366(4)	C10	C25	1.501(4)
N1	C1	1.338(4)	C13	C27	1.495(4)
N4	C22	1.336(4)	C13	C14	1.409(5)
N4	C23	1.363(4)	C1	C26	1.492(4)
N3	C13	1.332(4)	C21	C20	1.364(5)
N3	C24	1.366(4)	C19	C18	1.437(4)
C7	C8	1.417(4)	C19	C20	1.399(5)
C7	C11	1.399(4)	C17	C18	1.345(5)
C7	C6	1.427(4)	C15	C14	1.365(5)

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
N2	Cu1	O1	127.22(9)	C10	C9	C8	120.6(3)
N1	Cu1	O1	82.52(9)	C7	C11	N2	123.3(3)
N1	Cu1	N2	81.90(10)	C12	C11	N2	117.0(3)
N4	Cu1	O1	116.58(9)	C12	C11	C7	119.6(3)
N4	Cu1	N2	116.20(9)	C5	C6	C7	121.2(3)
N4	Cu1	N1	108.56(10)	C6	C5	C4	120.6(3)
N3	Cu1	O1	85.42(9)	C2	C3	C4	119.6(3)
N3	Cu1	N2	101.57(10)	C4	C12	N1	123.0(3)
N3	Cu1	N1	166.91(10)	C11	C12	N1	117.1(3)
N3	Cu1	N4	81.43(10)	C11	C12	C4	119.9(3)
O8	C12	O9	109.14(14)	C17	C16	C24	119.1(3)
O7	C12	O9	108.43(16)	C15	C16	C24	117.4(3)
O7	C12	O8	110.42(19)	C15	C16	C17	123.5(3)
O6	C12	O9	109.07(16)	C21	C22	N4	121.2(3)
O6	C12	O8	109.39(16)	C28	C22	N4	119.6(3)
O6	C12	O7	110.4(2)	C28	C22	C21	119.2(3)
O2	C11	O5	110.13(18)	C24	C23	N4	117.5(3)
O4	C11	O5	108.62(18)	C19	C23	N4	123.3(3)
O4	C11	O2	110.0(2)	C19	C23	C24	119.2(3)
O3	C11	O5	111.3(2)	C1	C2	C3	120.4(3)
O3	C11	O2	109.6(2)	C9	C10	N2	121.3(3)
O3	C11	O4	107.1(2)	C25	C10	N2	119.6(3)
C29	O1	Cu1	131.7(2)	C25	C10	C9	119.1(3)
C11	N2	Cu1	108.99(19)	C27	C13	N3	119.4(3)
C10	N2	Cu1	132.4(2)	C14	C13	N3	120.4(3)
C10	N2	C11	118.4(2)	C14	C13	C27	120.2(3)
C12	N1	Cu1	111.60(19)	C2	C1	N1	120.8(3)
C1	N1	Cu1	128.4(2)	C26	C1	N1	119.2(3)
C1	N1	C12	119.1(2)	C26	C1	C2	120.0(3)
C22	N4	Cu1	133.3(2)	C20	C21	C22	120.3(3)
C23	N4	Cu1	108.36(19)	C16	C24	N3	122.3(3)
C23	N4	C22	118.2(3)	C23	C24	N3	117.4(3)
C13	N3	Cu1	126.5(2)	C23	C24	C16	120.3(3)
C24	N3	Cu1	113.2(2)	C18	C19	C23	119.2(3)
C24	N3	C13	119.8(3)	C20	C19	C23	117.3(3)
C11	C7	C8	117.1(3)	C20	C19	C18	123.4(3)
C6	C7	C8	123.6(3)	C18	C17	C16	120.7(3)
C6	C7	C11	119.3(3)	C17	C18	C19	121.4(3)
C3	C4	C5	123.7(3)	C14	C15	C16	119.6(3)
C12	C4	C5	119.3(3)	C15	C14	C13	120.6(3)
C12	C4	C3	117.0(3)	C19	C20	C21	119.5(3)
C9	C8	C7	119.1(3)				

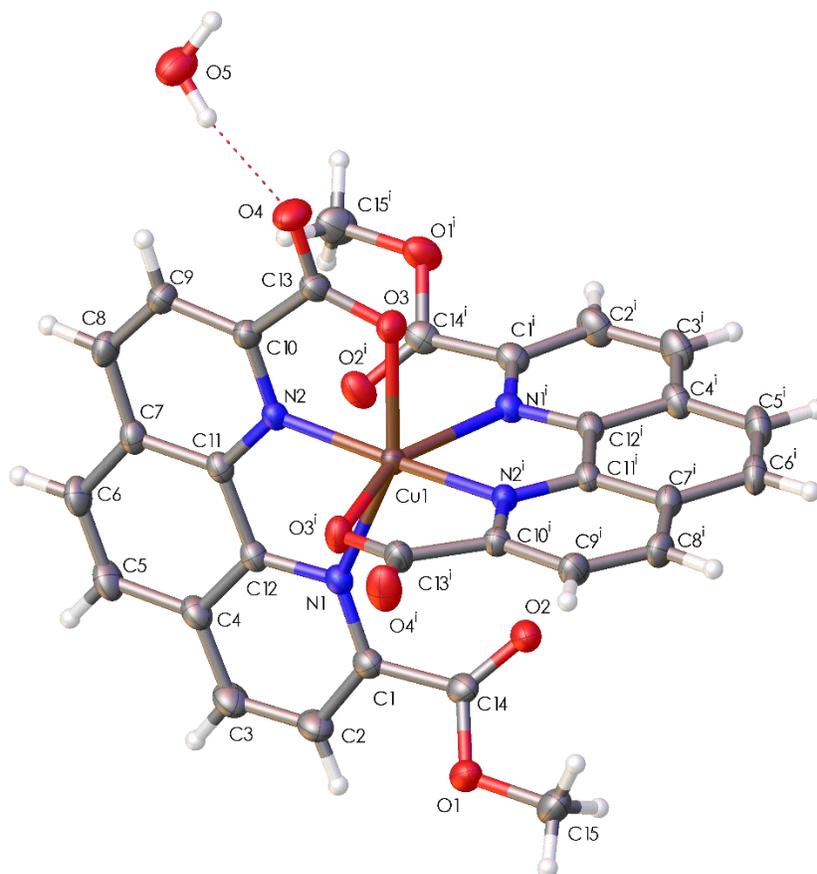
Ni(37)₂



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
Ni1	O2	2.1023(11)	C5	C4	1.439(2)
Ni1	O1	2.0899(11)	C5	C6	1.356(2)
Ni1	N1	2.1009(12)	C10	C9	1.405(2)
Ni1	N2	2.0689(12)	C4	C3	1.413(2)
Ni1	N3	2.0811(13)	C11	C7	1.405(2)
Ni1	N4	2.0718(13)	C9	C8	1.374(2)
O2	N5	1.2875(16)	C6	C7	1.438(2)
O1	C25	1.4340(19)	C8	C7	1.413(2)
O3	N5	1.2396(17)	C2	C3	1.373(2)
O4	N5	1.2408(17)	C2	C1	1.403(2)
N1	C12	1.3621(18)	C24	C23	1.434(2)
N1	C1	1.3301(19)	C24	C16	1.405(2)
N2	C10	1.3275(19)	C23	C19	1.413(2)
N2	C11	1.3612(18)	C22	C21	1.402(2)
O7	N6	1.2572(18)	C19	C18	1.427(3)
O6	N6	1.2440(18)	C19	C20	1.408(3)
N3	C24	1.368(2)	C16	C17	1.439(3)
N3	C13	1.323(2)	C16	C15	1.405(3)
N4	C23	1.359(2)	C13	C14	1.414(2)
N4	C22	1.328(2)	C21	C20	1.368(3)
C12	C4	1.406(2)	C14	C15	1.366(3)
C12	C11	1.438(2)	C17	C18	1.346(3)
N6	O5	1.230(2)			

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
O1	Ni1	O2	85.82(4)	C6	C5	C4	121.48(13)
O1	Ni1	N1	95.41(5)	N2	C10	C9	122.83(14)
N1	Ni1	O2	85.59(4)	C12	C4	C5	118.72(13)
N2	Ni1	O2	88.73(4)	C12	C4	C3	117.14(13)
N2	Ni1	O1	172.93(5)	C3	C4	C5	124.12(13)
N2	Ni1	N1	79.66(5)	N2	C11	C12	116.83(12)
N2	Ni1	N3	97.47(5)	N2	C11	C7	123.03(13)
N2	Ni1	N4	96.41(5)	C7	C11	C12	120.07(13)
N3	Ni1	O2	98.57(5)	C8	C9	C10	119.26(14)
N3	Ni1	O1	87.81(5)	C5	C6	C7	120.64(13)
N3	Ni1	N1	174.93(5)	C9	C8	C7	119.36(13)
N4	Ni1	O2	174.85(4)	C3	C2	C1	119.41(14)
N4	Ni1	O1	89.09(5)	C2	C3	C4	119.39(13)
N4	Ni1	N1	95.66(5)	N3	C24	C23	117.30(14)
N4	Ni1	N3	80.45(5)	N3	C24	C16	123.30(16)
N5	O2	Ni1	126.22(9)	C16	C24	C23	119.39(16)
C25	O1	Ni1	123.82(9)	N4	C23	C24	117.16(14)
C12	N1	Ni1	110.71(9)	N4	C23	C19	122.67(16)
C1	N1	Ni1	130.98(10)	C19	C23	C24	120.17(15)
C1	N1	C12	118.00(12)	C11	C7	C6	119.07(13)
C10	N2	Ni1	129.13(10)	C11	C7	C8	117.30(13)
C10	N2	C11	118.15(12)	C8	C7	C6	123.58(13)
C11	N2	Ni1	111.66(9)	N1	C1	C2	122.73(14)
O3	N5	O2	118.22(12)	N4	C22	C21	122.97(16)
O3	N5	O4	121.73(12)	C23	C19	C18	119.24(18)
O4	N5	O2	120.05(12)	C20	C19	C23	117.21(16)
C24	N3	Ni1	112.19(10)	C20	C19	C18	123.55(16)
C13	N3	Ni1	129.87(12)	C24	C16	C17	118.64(18)
C13	N3	C24	117.90(14)	C15	C16	C24	117.33(18)
C23	N4	Ni1	112.90(10)	C15	C16	C17	124.01(17)
C22	N4	Ni1	128.88(11)	N3	C13	C14	122.25(18)
C22	N4	C23	118.22(14)	C20	C21	C22	119.13(17)
N1	C12	C4	123.14(13)	C15	C14	C13	119.98(17)
N1	C12	C11	117.02(12)	C18	C17	C16	122.12(16)
C4	C12	C11	119.77(13)	C17	C18	C19	120.41(17)
O6	N6	O7	119.47(14)	C21	C20	C19	119.77(15)
O5	N6	O7	118.75(15)	C14	C15	C16	119.22(16)
O5	N6	O6	121.78(15)				

Cu(46)₂



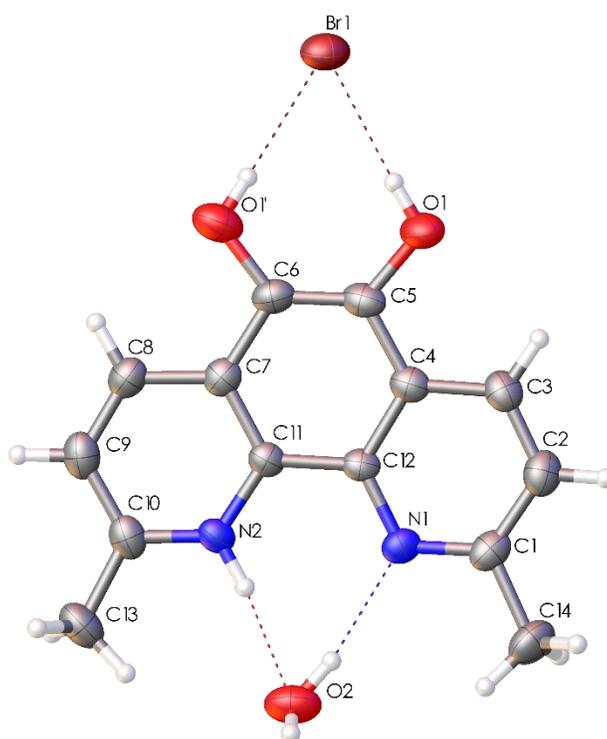
Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
Cu1	O3	2.1329(12)	C10	C13	1.519(2)
Cu1	O3*	2.1329(12)	C10	C9	1.398(2)
Cu1	N2	1.9377(12)	C12	C11	1.436(2)
Cu1	N2*	1.9378(12)	C12	C4	1.4100(19)
Cu1	N1*	2.3481(12)	C11	C7	1.4016(19)
Cu1	N1	2.3481(12)	C14	C1	1.500(2)
O3	C13	1.2590(18)	C1	C2	1.407(2)
O2	C14	1.2023(19)	C8	C9	1.379(2)
O4	C13	1.240(2)	C8	C7	1.408(2)
N2	C10	1.3280(18)	C6	C7	1.436(2)
N2	C11	1.3492(17)	C6	C5	1.349(2)
O1	C14	1.3300(19)	C4	C5	1.433(2)
O1	C15	1.452(2)	C4	C3	1.405(2)
N1	C12	1.3525(18)	C2	C3	1.366(2)
N1	C1	1.3289(19)			

*3/2-X,+Y,1-Z

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
O3*	Cu1	O3	98.54(7)	N1	C12	C4	124.05(14)
O3	Cu1	N1	155.23(4)	C4	C12	C11	118.31(13)
O3	Cu1	N1*	87.18(5)	N2	C11	C12	117.09(12)
O3*	Cu1	N1	87.18(5)	N2	C11	C7	121.70(13)
O3*	Cu1	N1*	155.23(4)	C7	C11	C12	121.20(12)
N2*	Cu1	O3*	78.82(5)	O2	C14	O1	124.87(15)
N2*	Cu1	O3	94.74(5)	O2	C14	C1	124.19(14)
N2	Cu1	O3*	94.74(5)	O1	C14	C1	110.93(13)
N2	Cu1	O3	78.82(5)	N1	C1	C14	116.24(13)
N2	Cu1	N2*	170.22(7)	N1	C1	C2	123.35(14)
N2*	Cu1	N1	110.02(5)	C2	C1	C14	120.40(14)
N2*	Cu1	N1 ¹	76.70(5)	C9	C8	C7	119.91(13)
N2	Cu1	N1	76.70(5)	O3	C13	C10	114.88(13)
N2	Cu1	N1 ¹	110.02(5)	O4	C13	O3	126.32(14)
N1*	Cu1	N1	97.68(6)	O4	C13	C10	118.80(13)
C13	O3	Cu1	113.36(9)	C5	C6	C7	120.68(14)
C10	N2	Cu1	118.24(9)	C8	C9	C10	118.89(14)
C10	N2	C11	120.34(12)	C11	C7	C8	117.48(13)
C11	N2	Cu1	121.34(10)	C11	C7	C6	118.70(14)
C14	O1	C15	115.25(13)	C8	C7	C6	123.82(14)
C12	N1	Cu1	107.10(9)	C12	C4	C5	119.53(14)
C1	N1	Cu1	135.48(10)	C3	C4	C12	116.83(14)
C1	N1	C12	117.00(12)	C3	C4	C5	123.65(14)
N2	C10	C13	113.78(12)	C6	C5	C4	121.55(14)
N2	C10	C9	121.64(13)	C3	C2	C1	119.18(15)
C9	C10	C13	124.58(13)	C2	C3	C4	119.54(14)
N1	C12	C11	117.64(12)				

*3/2-x,+y,1-z

Verbindung 58



Atome		Bindungslänge [Å]	Atome		Bindungslänge [Å]
N1	C12	1.355(5)	C7	C6	1.434(6)
N1	C1	1.334(6)	C5	C6	1.357(7)
N2	C11	1.367(5)	C5	O1	1.369(7)
N2	C10	1.333(5)	C1	C2	1.400(7)
C11	C12	1.418(6)	C1	C14	1.508(7)
C11	C7	1.399(6)	C8	C9	1.356(7)
C4	C12	1.411(6)	C10	C9	1.405(7)
C4	C5	1.439(6)	C10	C13	1.491(7)
C4	C3	1.410(6)	C3	C2	1.361(7)
C7	C8	1.424(6)	C6	O1'	1.382(9)

Atome			Bindungswinkel [°]	Atome			Bindungswinkel [°]
C1	N1	C12	119.2(4)	C6	C5	O1	128.0(4)
C10	N2	C11	124.4(4)	O1	C5	C4	111.1(4)
N2	C11	C12	120.1(4)	N1	C1	C2	121.4(4)
N2	C11	C7	118.4(4)	N1	C1	C14	117.2(4)
C7	C11	C12	121.5(4)	C2	C1	C14	121.4(4)
C12	C4	C5	120.3(4)	C9	C8	C7	120.9(4)
C3	C4	C12	117.1(4)	N2	C10	C9	118.4(4)
C3	C4	C5	122.6(4)	N2	C10	C13	118.5(4)
N1	C12	C11	119.6(4)	C9	C10	C13	123.1(4)
N1	C12	C4	122.4(4)	C2	C3	C4	119.5(4)
C4	C12	C11	117.9(4)	C5	C6	C7	120.0(4)
C11	C7	C8	117.9(4)	C5	C6	O1'	129.4(5)
C11	C7	C6	119.5(4)	O1'	C6	C7	110.6(5)
C8	C7	C6	122.6(4)	C8	C9	C10	119.9(4)
C6	C5	C4	120.8(4)	C3	C2	C1	120.4(4)