7 Wechselwirkungen zwischen DNA und Eisen(diarylsalen)-Komplexen

7 Wechselwirkungen zwischen DNA und Eisen(diarylsalen)-Komplexen

Um zukünftige Therapeutika oder Diagnostika mit vorteilhaften Eigenschaften entwickeln zu können, sollte die Wirkungsweise der entsprechenden Verbindungen auf molekularbiologischer Ebene, z.B. deren Affinität zur DNA, bekannt sein.^[8, 71]

Metallionen können direkt über ionische und koordinative Bindungen an Zellkomponenten, wie DNA und Zellkernproteine, binden und damit zu DNA-Spaltungen bzw. -Konformationsänderungen führen.^[117] Metallkomplexe können neben den ionischen Wechselwirkungen, die die Metallionen hauptsächlich eingehen, auch über Wasserstoff-Brückenbindungen, Van-der-Waals-Interaktionen, Charge-Transfer- und über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen an die DNA binden.^[71, 132]

Die Wechselwirkungen von unterschiedlichsten Metallkomplexen mit der DNA wurden bereits vielfach untersucht. Zum einen können Metallkomplexe in der Bioanalytik zur Strukturcharakterisierung der DNA herangezogen werden, ebenso wie zur Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen bei sogenannten *Footprint*-Analysen. Zum anderen führten die Suche nach neuen Chemotherapeutika und Versuche zur Aufklärung der Toxizität und Karzinogenität von Metallionen zur vielfältigen Betrachtungen der Interaktionen zwischen DNA und Metallkomplexen.^[133, 134]

Eisen- und Kupferkomplexe, die in der *in vitro Footprint*-Analytik genutzt werden, sind z.B. MPE-Fe (Eisen(II)-MethidiumpropyI-EDTA), EDTA-Fe und [OP]₂Cu (ein 2:1 1,10*ortho*-Phenanthrolin-Kupfer(I)-Komplex). Als *Footprints*, "Fußabdrücke", bezeichnet man Spuren, die jene Proteine hinterlassen, die an spezifische Stellen der DNA binden.^[135] Dabei nutzt man die Tatsache, dass sequenzunspezifische Nukleasen die DNA nur an den Stellen spalten können, an denen diese nicht durch gebundene Proteine geschützt wird. Die nach Spaltung der ungeschützten DNA-Bereiche erhaltenen charakteristischen Bruchstücke werden mittels Gelelektrophorese den entsprechenden Sequenzen zugeordnet. Zur DNA-Spaltung verwendet man neben enzymatischen Nukleasen (z.B. Desoxyribonuklease I und Exonuklease III) auch so genannte chemische Nukleasen. Als chemische Nukleasen werden sowohl organische Verbindungen wie Uracil und Hydrazin verwendet, als auch Metallverbindungen wie KMnO₄, OsO₄ und die bereits genannten Eisen- und Kupferkomplexe MPE-Fe, [OP]₂Cu und EDTA-Fe. Die Metallkomplexe benötigen für ihre Wirkung ein Oxidationsmittel wie H₂O₂ oder molekularen Sauerstoff, wobei die Effizienz der nukleolytischen Wirkung durch Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) verstärkt werden kann.^[135, 136]

Der Phenanthrolin-Kupfer(I)-Komplex ([OP]₂Cu) lagert sich in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix ein und führt über einen komplexen Mechanismus, bei dem überwiegend das C-1'-Atom der Desoxyribose angegriffen wird, zur DNA-Spaltung.^[137-139] Die chemische Endonuklease MPE-Fe, die ebenfalls eine Phenanthren-Teilstruktur enthält, kann in die DNA interkalieren. Bei Zugabe von H₂O₂ oder O₂ kommt es durch Entstehung von Hydroxyl-Radikalen zur Spaltung des DNA-Rückgrats.

Die Interkalation und die nachfolgende Spaltung erfolgen fast ohne Sequenzspezifität. Die Produkte an den DNA-Enden sind 5'-Phosphat (Weg A, Abbildung 7.1) und – fast zu gleichen Teilen – 3'-Phosphat und 3'-Phosphatglycolat (Weg B, Abbildung 7.1).^[138] Die dritte, häufig verwendete chemische Nuklease ist ein Eisen(II)-EDTA-Komplex, der ebenfalls über die in Kapitel 8 beschriebene Fenton-Reaktion bei Anwesenheit von H_2O_2 Hydroxyl-Radikale produzieren kann, die vorwiegend am C-4'-Atom der Desoxyribose angreifen und letztendlich zur Elimination eines Nukleotids führen. Diese Spaltung ist sequenzunspezifisch, wobei die Sequenzunspezifität eine wichtige Voraussetzung für die *Footprint*-Analytik ist.^[135, 140]



Abbildung 7.1: Reaktionsmechanismen der DNA-Spaltung nach [135, 137]

Für eine Vielzahl von Komplexen von Bis(salicyliden)ethylendiamin-Derivaten (Salen-Derivaten) mit unterschiedlichen Metall-Zentralatomen wurden ebenfalls die Wechselwirkungen mit der DNA genauer untersucht. Dabei sind ganz unterschiedliche Interaktionen mit der DNA gefunden worden.



R, R': H, CH₃, Cl

Abbildung 7.2: [Ni^{II}salen]-Komplexe, die zu guaninspezifischen Modifikationen der DNA und RNA führen^[133, 147-150]

Cu^{II}-Salen-Komplexe bilden in der Gegenwart von Reduktionsmitteln reaktive Sauerstoffspezies und greifen die DNA unspezifisch an.^[141] Mn^{III}-Salen-Komplexe bewirken in der Gegenwart von Oxidantien wie Magnesiummonoperoxyphthalat oder Kaliumperoxymonosulfat effiziente DNA-Strangbrüche in A·T-reichen Regionen der kleinen Furche der DNA.^[45, 134, 136, 142-145] Co^{II}-Salen-Komplexe spalten die DNA spontan ohne Zusatz weiterer Reagenzien unter aeroben Bedingungen^[146] und Ni^{II}-Salen-Komplexe, wie <u>24</u> und <u>25</u> in Abbildung 7.2, führen generell zu guaninspezifischen Modifikationen der DNA und RNA, wobei über Phenolradikalreaktionen des Liganden kovalente Bindungen mit dem C-8-Atom des Guanins, möglicherweise auch mit dem N-7-Atom des Guanins ausgebildet werden.^[133, 134, 147-152]

Der von Routier *et al.* synthetisierte funktionalisierte wasserlösliche Cu(salen)-Komplex **<u>26</u>** in Abbildung 7.3 löste nach Anlagerung an eine der DNA-Furchen Einzelstrangbrüche aus.^[141] Ebenso konnte für wasserlösliche Ru^{III}-Salen-Komplexe <u>**30**</u> in Abbildung 7.3 eine DNA-Spaltung in Anwesenheit von H₂O₂ nachgewiesen werden.^[153] Während für die Chromkomplexe <u>**27**</u>, <u>**28**</u> und <u>**29**</u> in Abbildung 7.3 eine nicht-interkalative Bindung an die große Furche der dsDNA gefunden wurde^[71, 154], können [Co^{II}salen]^[146, 155], der Mn^{III}-Salen-Komplex <u>**31**</u>^[156] und der Cu^{II}-Salen-Komplex <u>**32**^[157] in Abbildung 7.4 in die DNA interkalieren.</u>



Abbildung 7.3: Metall(salen)-Komplexe, die mit dem DNA-Rückgrat wechselwirken

Alle untersuchten Metall(salen)-Komplexe spalten die DNA über Redoxprozesse.^[41] Mit Ausnahme der Nickelkomplexe wird für Metall(salen)-Verbindungen ein Angriff am Phosphodiesterrückgrat der DNA angenommen.^[154] Für Cr^{III}-Salen-Komplexe z.B. ist eine Oxidation der C-4'-Positon der Desoxyribose mit nachfolgender Spaltung der Phosphodiesterbrücken der DNA (Weg B in Abbildung 7.1) beschrieben^[71], während für Ru^{III}-Salen-Komplexe ein Angriff am C-1' der Riboseeinheit beobachtet werden konnte.^[153]



Abbildung 7.4: Interkalierende Metall(salen)-Komplexe

7.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist die wichtigste Methode zur Nukleinsäurenanalytik. Sie ist schnell durchzuführen, benötigt nur geringste Mengen an Ausgangsmaterial und besitzt eine hohe Genauigkeit der Größentrennung.^[135]

Aus diesem Grund wurde die DNA-Spaltungsaktivität der neu synthetisierten Eisen-(diarylsalen)-Komplexe mittels Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Mengen (0.1 μ M bis 100 μ M) der Eisenkomplexe mit zirkulärer DNA des Plasmids pSK Bluescript 1 h bei 37 °C inkubiert und auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen (vgl. hierzu Kapitel 11.3.4.1). Im Fall der in den "Basis"-Aromaten unsubstituierten Verbindungen wurden den Reaktionsansätzen noch 1 μ M Dithiothreitol (DTT) oder 10 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME) als Reduktionsmittel zugesetzt.

Die DNA-Spaltungsaktivität der Eisenkomplexe wurde anhand der Konversion von zirkulärer, superhelikaler Plasmid-DNA (Form I; *supercoiled circular*, SC) in relaxierte DNA (Form II; *nicked circular*, NC) untersucht. Dabei wurde die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der beiden DNA-Formen in Agarosegelen ausgenutzt.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten zirkulärer DNA der Form I (superhelikal) und der Form II (offen) hängen in erster Linie von der Beschaffenheit des Agarosegels ab. In der Regel wandert die superhelikale DNA-Form (Form I, SC) schneller im Gel als die lineare (Form III). Relaxierte DNA-Moleküle (Form II, NC) wandern im Agarosegel wesentlich langsamer als superhelikale oder lineare DNA.^[135]

7.1.1 Eisen(diarylsalen)-Komplexe ohne Hydroxysubstitution der "Basis"-Aromaten

Die zirkuläre Plasmid-DNA wurde mit 0.1 bis 100 μ M der Eisen(diarylsalen)-Komplexe inkubiert. Dabei wurden dem jeweiligen Reaktionsansatz entweder kein Reduktionsmittel, 1 μ M Dithiothreitol (DTT) oder 10 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME) zugesetzt. Neben den synthetisierten Eisenkomplexen wurden Reaktionsansätze mit den entsprechenden Liganden oder FeCl₃ bzw. Fe(OAc)₂ als Referenz hergestellt und als Vergleich ebenfalls auf die Gele aufgetragen.

Die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der superhelikalen DNA (Form I; SC) und der ringoffenen Form II (NC) sind in allen Gelen deutlich zu erkennen.



Abbildung 7.5: Gelelektrophorese nach einstündiger Inkubation bei 37 °C von zirkulärer Plasmid-DNA mit *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m) bzw. dessen Liganden (11) und FeCl₃ als Vergleichssubstanzen:

- ohne Zusatz eines Reduktionsmittels
- + DTT: Zusatz von 1 µM Dithiothreitol
- + 2-ME: Zusatz von 10 µM 2-Mercaptoethanol

Der *m*[Fe^{III}4'OCH₃]CI-Komplex (**104m**) in Abbildung 7.5 führte ohne Zusatz eines Reduktionsmittels in einer Konzentration von 0.1 μ M und 1 μ M kaum zu Plasmid-Einzelstrangbrüchen (Spur 1 und 4). Erst in einer Konzentration von 10 μ M wurde eine deutlich sichtbare *nicked-circular*-Plasmid-DNA-Bande im Gel erkennbar (Spur 7). Die Inkubation von FeCl₃ mit Plasmid-DNA ohne Zusatz eines Reduktionsmittels in Konzentrationen von 0.1 μ M und 1 μ M ließ kaum NC-Plasmid-DNA erkennen (Spur 12 und 15). Der Ligand (**11**) des Eisenkomplexes führte ebenfalls auch in 10-fach höherer Konzentration lediglich zu einer geringen Menge an *nicked-circular*-Plasmid-DNA (Spur 10 und 11).

Die Zugabe eines Reduktionsmittels zu dem DNA-Eisenkomplex-Reaktionsgemisch bewirkte ein deutlich vermehrtes Auftreten von DNA-Strangbrüchen. Nach Zusatz von DTT zu dem 0.1 μ M *m*[Fe^{III}4'OCH₃]CI-Komplex/Plasmid-Gemisch konnte kaum noch *supercoiled-circular*-Doppelstrang-DNA detektiert werden. Fast die gesamte Menge an SC-DNA wurde in NC-DNA konvertiert (Spur 2). Der Zusatz von 10 μ M 2-Mercaptoethanol bewirkte ebenfalls die Entstehung einer größeren Menge an NC-DNA (Spur 3).

Die Zugabe von DTT zu einer 1 bzw. 10 µM konzentrierten Lösung des Eisenkomplex/DNA-Gemischs führte zu multiplen DNA-Doppelstrangbrüchen und damit zu einer Vielzahl kleiner DNA-Fragmente (erkennbar an der "Schweif"-Bildung), so dass die SC- bzw. NC-Bande in den Spuren 5 und 8 nur noch schwach erkennbar waren.

Der Zusatz von 2-Mercaptoethanol zum Reaktionsansatz führte hauptsächlich zum Auftreten von Einzelstrangbrüchen (Spur 3, 6 und 9).

Nach der Inkubation von FeCl₃ mit der Plasmid-DNA unter Zusatz eines Reduktionsmittels (DTT oder 2-ME) war kaum noch SC-Plasmid-DNA erkennbar. Als Hauptbande wurde die NC-Bande erhalten (Spur 13, 14, 16 und 17). Im Gegensatz zu dem Eisen(diarylsalen)-Komplex **(104m)** war eine erhöhte Rate multipler DNA-Doppelstrangbrüche nach Einwirkung von FeCl₃ nicht zu erkennen.

Die Komplexierung von Fe³⁺ an den Azomethin-Liganden führt offensichtlich zu einer deutlichen Veränderung der Art der Wechselwirkung des komplexierten Eisens mit der Plasmid-DNA. Interessanterweise ist für die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe eine geringere Hydroxyl-Radikalproduktion gefunden worden als für die Eisensalze (vgl. Kapitel 8). Daher ist anzunehmen, dass das größere DNA-Spaltungsvermögen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe nicht auf veränderte Redoxeigenschaften beruht. Diese Tatsache lässt eher auf spezifische Wechselwirkungen der Eisenkomplexe mit der DNA schließen.



Abbildung 7.6: Gelelektrophorese nach einstündiger Inkubation bei 37 °C von zirkulärer Plasmid-DNA mit *m*[Fe^{II}4'OCH₃] (97m) bzw. dessen Liganden (11) sowie Fe(OAc)₂ als Vergleichssubstanzen:

- ohne Zusatz eines Reduktionsmittels
- + DTT: Zusatz von 1 µM Dithiothreitol
- + 2-ME: Zusatz von 10 µM 2-Mercaptoethanol

Prinzipiell zeigte der Eisen(II)-Komplex m[Fe^{II}4'OCH₃] (97m) ein ähnliches Verhalten wie der analoge Eisen(III)-Komplex (siehe Abbildung 7.6). Allerdings scheint er die DNA besser angreifen zu können. Nach Zusatz von 10 µM Eisen(II)-Komplex zur Plasmid-DNA wurde auch ohne Zusatz eines Reduktionsmittels kaum noch eine SC-DNA-Bande detektiert. Da die Fenton-Reaktion mit Fe²⁺ als Reaktionspartner abläuft, ist die größere Spaltungsaktivität des Eisen(II)-Komplexes im Vergleich zu dem analogen Eisen(III)-Komplex auch leicht erklärbar.

Vergleichbar mit dem Eisen(III)-Komplex führte die Inkubation des *m*[Fe^{II}4'OCH₃]-Komplexes **(97m)** mit Plasmid-DNA ohne Reduktionsmittel in einer Konzentration von 0.1 µM kaum zu DNA-Strangbrüchen (Abbildung 7.6, Spur 1). Der Zusatz von DTT bewirkte jedoch in dieser Konzentration bereits ein deutliches Auftreten von multiplen Doppelstrangbrüchen (Spur 2), während nach Zugabe von 2-ME hauptsächlich DNA-Einzelstrangbrüche in Form der NC-Bande detektiert wurden (Spur 3).

Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung an Eisen(II)-Komplex (1 µM) ließ sich bei Zugabe von DTT keine SC- und NC-DNA-Banden beobachten. Die Plasmid-DNA wurde vollständig in kleine Fragmente gespalten, die sich über die gesamte Laufstrecke verteilten ("Schweif"-Bildung), so dass keine charakteristische Bande erhalten wurde (Spur 5). Der Zusatz von 2-ME bewirkte hingegen hauptsächlich die Konversion von SC-Plasmid-DNA in einzelstranggebrochene NC-DNA (Spur 6).

Die Inkubation mit 10 µM bzw. 100 µM des Eisenkomplexes mit der DNA führte bereits ohne den Zusatz eines Reduktionsmittels zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Spur 7 und 10). Generell bewirkte die Zugabe von DTT bereits ab einer Komplexkonzentration von 0.1 µM multiple Doppelstrangbrüche, während nach der DNA-Inkubation mit Komplex und 2-ME lediglich DNA-Einzelstrangbrüche in Form der NC-Banden beobachtet werden konnten.

Der Ligand des Eisenkomplexes rief auch in einer Konzentration von 100 μ M nur ein sehr geringes Ausmaß an Einzelstrangbrüchen hervor. Im Gegensatz zu FeCl₃ führte Fe(OAc)₂ als ebenfalls unkomplexiertes Eisensalz auch ohne Reduktionsmittel bereits in einer Konzentration von 0.1 μ M zu einem deutlichen Auftreten von DNA-Plasmid-Einzelstrangbrüchen (Spur 15) und in einer Konzentration von 1 μ M zu multiplen Doppelstrangbrüchen (Spur 18). Der Zusatz eines Reduktionsmittels erhöhte dabei deutlich das Auftreten von multiplen DNA-Strangbrüchen (Spur 16, 17, 19 und 20).



- + DTT: Zusatz von 1 µM Dithiothreitol
- + 2-ME: Zusatz von 10 µM 2-Mercaptoethanol

Auf dem Gel in Abbildung 7.7 wurde ersichtlich, dass der Ligand (73) der untersuchten Eisenkomplexe auch bei Zusatz eines Reduktionsmittels keinerlei DNA-Spaltungsaktivität besaß. Der Eisen(III)-Komplex [Fe^{III}salophen]Cl (141) hatte ohne Reduktionsmittel kaum Auswirkungen auf die DNA. In allen drei untersuchten Konzentrationen (0.1 μ M, 1 μ M und 10 μ M) war die SC-Bande fast unverändert sichtbar (Spur 10, 13 und 16).

Der Zusatz von DTT als Reduktionsmittel zu dem [Fe^{III}salophen]CI-Komplex führte bei einer Komplexkonzentration von 0.1 μ M hauptsächlich zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Spur 11). Die SC-Plasmid-Bande verschwand fast völlig. In höheren Konzentrationen des Komplexes (1 μ M und 10 μ M) traten multiple DNA-Doppelstrangbrüche auf (Spur 14 und 17). Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 10 μ M Eisenkomplex waren die SC- und die NC-Banden nicht mehr detektierbar (Spur 17). Die schwache Bande knapp unterhalb der SC-Bande in Spur 14 stellt denaturierte Plasmid-DNA dar. Der Zusatz von 2-ME als Reduktionsmittel hatte auch hier einen geringeren Einfluss als die Zugabe von DTT. Bei einer Komplexkonzentration von 10 μ M und einem 2-ME-Zusatz von 10 μ M war eine deutliche NC-Bande erkennbar. Prinzipiell verhielt sich der Eisen(II)-Komplex [Fe^{II}salophen] **(140)** ähnlich wie die analoge Eisen(III)-Verbindung **(141)**. Ohne Zusatz eines Reduktionsmittels kam es bei Inkubation des Eisen(II)-Komplexes mit der Plasmid-DNA kaum zu Strangbrüchen. Bei einer Komplexkonzentration von 0.1 μ M und der Zugabe von 1 μ M DTT kam es vermehrt zu DNA-Einzelstrangbrüchen, erkennbar an dem Auftreten der NC-Bande (Spur 20). In Spur 21 des Gels erkannte man wie bei dem Eisen(III)-Komplex auch eine schwache Bande denaturierter DNA. Dagegen verschwanden in einer Komplexkonzentration von 10 μ M und dem Zusatz von DTT die SC- und NC-Bande völlig. Es kam wiederum zu multiplen DNA-Strangbrüchen.





+ 2-ME: Zusatz von 10 µM 2-Mercaptoethanol

Insgesamt gesehen ist die DNA-Spaltungsaktivität beider phenylendiaminüberbrückten Komplexe [Fe^{III}salophen] (140) und [Fe^{III}salophen]Cl (141) vergleichbar mit der der Diarylsalen-Komplexe (97m) und (104m). Die wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung der beiden phenylendiaminüberbrückten Verbindungen (Kapitel 4.2 und 4.3) ist also offensichtlich nicht auf eine höhere DNA-Spaltungsaktivität zurückzuführen.

Juglon, als ROS-produzierende Referenzsubstanz (siehe Abschnitt 6.2.2), besaß ohne Zusatz eines Reduktionsmittels keine Auswirkung auf Plasmid-DNA. Die Zugabe von DTT oder 2-ME führte bei einer Substanzkonzentration von 10 µM zum Auftreten multipler DNA-Strangbrüche. Juglon verhält sich im Hinblick auf seine Reaktivität mit der DNA offensichtlich recht ähnlich wie die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe.

Im Gegensatz zu Juglon und den Eisenkomplexen zeigte der Cobalt(diarylsalen)-Komplex m[Co^{II}4'OCH₃] **(149m)** bei Zusatz der Reduktionsmittel zwar ein vermehrtes Auftreten von NC-Plasmid-DNA, aber keine multiplen Doppelstrangbrüche. Bei der Inkubation der Plasmid-DNA mit 10 μ M Cobaltkomplex und 10 μ M 2-ME wurde z.T. denaturierte DNA erhalten (Spur 15).

7.1.2 Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Hydroxysubstitution der "Basis"-Aromaten

Die Spaltungsaktivitäten der Eisenkomplexe, die in den "Basis"-Aromaten neben den Hydroxygruppen der Salicyliden-Teilstruktur eine weitere Hydroxygruppe tragen, wurden ohne Zusatz eines aktivierenden Agens (DTT oder 2-ME) untersucht. Aufgrund ihrer Grundstruktur kann eine Wechselwirkung der Hydrochinon-Teilstruktur mit dem Eisenredoxsystem vermuten werden, so dass es sich bei diesen Komplexen um "selbstaktivierende" Nukleasen handeln könnte.

Die Eisen(III)-Komplexe wurden in Konzentrationen von $0.01 \,\mu\text{M}$ bis $10 \,\mu\text{M}$ eine Stunde mit Plasmid-DNA inkubiert. In Abbildung 7.9 ist das erhaltene Elektrophorese-gel dargestellt.

Die Liganden der Komplexe (38), (39) und (40) führten wiederum zu keiner bzw. nur zu einer geringen Konversion von SC-DNA in NC-DNA und damit kaum zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Spur 18 bis 23). Der Eisen(III)-Komplex $m[Fe^{III}(4OH) 4'OCH_3]CI$ (106m), der keine chinoide Grundstruktur aufweist, führte auch in einer Konzentration von 10 µM ohne Zusatz eines Reduktionsmittels nur zu einer schwachen NC-DNA-Bande und damit kaum zu Einzelstrangbrüchen (Spur 9). Im Gegensatz dazu spalteten die beiden Eisen(III)-Komplexe $m[Fe^{III}(3OH) 4'OCH_3]CI$ (105m) und $m[Fe^{III}(5OH) 4'OCH_3]CI$ (107m) mit chinoider Teilstruktur auch ohne Zusatz eines Aktivators in einer Konzentration von 1 und 10 µM die DNA (Spur 4 und 5 sowie Spur 12 und 13). Dabei führte die DNA-Spaltung nahezu vollständig zum Auftreten von Form-II-DNA (NC-DNA), wobei keine linearisierte DNA (Form III) gefunden werden konnte. Der Salenkomplex [Fe^{III}(5OH) salen]Cl **(84)** mit ebenfalls Chinon-Teilstruktur verhielt sich ähnlich wie der 4'-methoxysubstituierte Diarylsalen-Komplex m[Fe^{III}(5OH)-4'OCH₃]Cl **(107m)**. Fast die gesamte Menge an SC-DNA wurde durch eine Komplex-konzentration von 1 bzw. 10 µM in NC-DNA konvertiert (Spur 16 und 17). Bei beiden Komplexen ([Fe^{III}(5OH) salen]Cl **(84)**, Spur 16 und 17 und m[Fe^{III}(5OH) 4'OCH₃]Cl **(107m)**, Spur 13) wurde auf dem Gel eine schwache Bande denaturierter DNA sichtbar.



Abbildung 7.9: Gelelektrophorese nach 1 h Inkubation zirkulärer Plasmid-DNA mit den Eisen(hydroxydiarylsalen)-Komplexen (105m), (106m), (107m) sowie deren Liganden (38), (39), (40) und dem Eisen(hydroxysalen)-Komplex (84)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DNA-Spaltungsaktivität der Eisen-(hydroxydiarylsalen)-Komplexe stark von der Position der zweiten Hydroxygruppen abhing. Die Aktivität des Eisen(III)-Komplexes m[Fe^{III}(4OH) 4'OCH₃]Cl (**106m**) ohne chinoider Teilstruktur, entsprach in etwa der Aktivität des in den "Basis"-Aromaten unsubstituierten m[Fe^{III}4'OCH₃]Cl-Komplexes (**104m**). Im Gegensatz zu den beiden Komplexen (**106m**) und (**104m**) besaßen die beiden Eisen(III)-Komplexe m[Fe^{III}(3OH)-4'OCH₃]Cl (**105m**) und m[Fe^{III}(5OH) 4'OCH₃]Cl (**107m**) mit Hydrochinon-Teilstruktur eine wesentlich größere Spaltungsaktivität. Bereits ab einer Konzentration von 1 μ M wurde fast die gesamte SC-Plasmid-DNA auch ohne Zusatz eines aktivierenden Reduktionsmittels in NC-DNA umgewandelt.

Offensichtlich werden die Verbindungen als chemische Nukleasen wirksam, die aufgrund ihrer strukturellen Voraussetzungen (Chinon-Teilstruktur und Eisenredoxsystem) auch ohne Reduktionsmittel DNA spalten können.

7.2 Interaktion der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit CT-DNA

7.2.1 UV/Vis-Absorptionsspektren

7.2.1.1 Theoretische Betrachtungen

Wechselwirkungen der DNA mit Metallkomplexen lassen sich gut an UV/Vis-Spektren verfolgen. Setzt man einer Lösung eines Metallkomplexes steigende Mengen CT-DNA (*calf thymus DNA*) hinzu, kommt es zu charakteristischen spektralen Änderungen. Bei Interkalatoren wird häufig ein bathochromer Shift der maximalen Wellenlänge der LMCT-Bande (*Ligand-Metall-Charge-Transfer*-Bande), wie auch ein charakteristischer hypochromer Effekt beobachtet. Wenn Metallkomplexe in die DNA interkalieren, dringt das chromophore System des Komplexes tief in die DNA-Basenstapel ein. Dabei kommt es aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen insbesondere mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der aromatischen Systeme der Liganden und den DNA-Basen zu spektralen Änderungen. Je nach Konzentration, Bindungsstärke und genauer Bindungsart des Interkalators (z.B. "klassische" Interkalatoren, partielle Interkalatoren) ist dabei eine Abnahme der Absorptionsintensität des Metallkomplexes bei CT-DNA-Zusatz um 10 bis 63 % beobachtet worden.^[141, 155, 156, 158-165]

Binden Metallkomplexe an die Oberfläche oder in eine der Furchen der DNA hat dies geringere Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum der Metallkomplexe.^[162] Dabei werden häufig hyperchrome Effekte im Absorptionsspektrum beobachtet.^[71, 166, 167]

7.2.1.2 UV/Vis-Spektren

Als Vorversuch für die Aufnahme der DNA-Schmelzpunktkurven und um eine Vorstellung von den Wechselwirkungen zwischen CT-DNA und den synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexen zu bekommen, wurden zunächst UV/Vis-Absorptionsspektren einer 100 μ M konzentrierten Metallkomplex-Lösungen der Eisen(III)-Verbindung *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl **(104m)** unter Zugabe steigender Mengen CT-DNA aufgenommen. Unter Konstanthaltung der Komplexkonzentration wurden stöchiometrische Verhältnisse r₁ = [μ M DNA_{Phosphat}]/[μ M Fe-Komplex] von 0.0 bis 2.0 eingestellt. In Abbildung 7.10 sind die erhaltenen UV/Vis-Spektren dargestellt.



Abbildung 7.10: UV/Vis-Spektren von *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl **(104m)** in einer Konzentration von 100 μM unter Zusatz steigender Mengen an CT-DNA

Das UV/Vis-Spektrum in wässriger Lösung unterscheidet sich von dem des Komplexes in DMF (siehe Kapitel 3.4). Dennoch ist als Hauptpeak der $\pi \to \pi^*$ -Übergang des substituierten Benzolringes bei 226 nm deutlich zu erkennen. Bei dem Maximum bei 268 nm handelt es sich um den $\pi \to \pi^*$ -Übergang der Azomethingruppe, an den sich die *Ligand-Metall-Charge-Transfer*-Interaktion (LMCT-Bande) als Schulter anschließt.

Der Zusatz von DNA zu einer 100 μ M Lösung des Eisen(III)-Komplexes *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m) bewirkte erkennbare Änderungen im UV/Vis-Spektrum. So führte der Zusatz von 150 μ M bzw. 200 μ M DNA (r₁ = 1.5 bzw. r₁ = 2.0) zu einem leicht bathochromen Shift des Hauptpeaks bei 226 nm um 4 nm und einen deutlich hypsochromen Shift des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 269 nm um 18 nm.

Besonders auffälliger war der starke hyperchrome Effekt über das gesamte UV/Vis-Spektrum. Interessanterweise war bei einem DNA_{Phosphat}/Eisenkomplex-Verhältnis von $r_1 = 1.0$ der größte hyperchrome Effekt zu verzeichnen. Die weitere Steigerung der DNA-Konzentration zu einem DNA/Komplex-Verhältnis $r_1 = 1.5$ bzw. 2.0 führte im Vergleich zu den DNA/Komplex-Verhältnissen $r_1 \le 1.0$ zu einem hypochromen Shift.

7.2.2 Einfluss der Eisen(diarylsalen)-Komplexe auf die Schmelztemperatur von CT-DNA

7.2.2.1 Theoretische Grundlagen

Wird eine Lösung von Duplex-DNA über eine kritische Temperatur hinaus erhitzt, kollabiert die ursprüngliche Struktur. Die komplementären Stränge trennen sich und nehmen eine zufällige, ungeordnete Knäuelkonfiguration an. Dieser Prozess der Denaturierung geht mit qualitativen Veränderungen in den physikalischen Eigenschaften der DNA einher.

Neben der Abnahme der für native DNA-Lösungen charakteristisch hohen Viskosität kommt es im UV-Spektrum zu einem hyperchromen Effekt. Die UV-Absorption der DNA, die ausschließlich von ihren aromatischen Basen bewirkt wird, erhöht sich als Folge der Aufhebung der Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den benachbarten Basen und der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den gestapelten Basen über das gesamte Spektrum um ca. 40 %.

Die hyperchrome Verschiebung, die üblicherweise am Absorptionsmaximum für Nukleotide (260 nm) gemessen wird, läuft in einem engen Temperaturbereich ab. Die Denaturierung der DNA könnte man auch als Schmelzen eines eindimensionalen Festkörpers beschreiben. Charakteristisch für diesen Prozess ist eine Schmelzkurve, wobei die Temperatur im Wendepunkt der Kurve, bei der 50 % der maximalen Absorptionsänderung erfolgt sind, Schmelztemperatur **T**_m genannt wird.^[168-170]

Die Stabilität der DNA und damit ihre T_m ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen spielt die Natur des Lösungsmittels, der pH-Wert der Lösung sowie Art und Konzentration der Ionen in der Lösung eine wichtige Rolle. Zum anderen hat der molare Anteil an G·C-Basenpaaren einen bedeutenden Einfluss auf die Schmelztemperatur der DNA. G·C-Basenpaare sind durch die Ausbildung dreifacher Wasserstoff-Brückenbindungen stabiler als A·T-Basenpaare, die nur zwei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden können, für deren Dissoziation weniger Energie in Form von Wärme benötigt wird.^[168, 171]

Binden kleinere Moleküle an die DNA, wird deren Stabilität und damit auch deren Schmelzverhalten verändert. Die Schmelztemperatur steigt, wenn Verbindungen eine größere Affinität zur Doppelstrang-DNA besitzen, da dieser Zustand dadurch stabilisiert wird. Im Gegensatz dazu sinkt die Schmelztemperatur, wenn Verbindungen eine höhere Affinität zur Einzelstrang-Form besitzen.^[132]

Durch Messung der Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm unter Zusatz verschiedener Konzentrationen der Eisenkomplexe als Funktion der Temperatur werden Schmelzkurven erhalten, die eine Aussage über die Komplex-DNA-Wechselwirkungen zulassen. Da das Ausmaß der Schmelzpunktdifferenzen ΔT_m ($\Delta T_m = T_m^{Komplex-DNA} - T_m^{DNA}$) von der Stärke der Interaktion zwischen den zugesetzten Verbindungen und der DNA abhängig ist, lassen sich durch Messung der Schmelztemperaturverschiebungen Aussagen über das Bindungsverhalten und die Bindungsstärke treffen.^[159]

7.2.2.2 Schmelzpunktkurven

Eisen(salen)-Verbindungen ohne weitere funktionelle Gruppen (z.B. quartäre Aminfunktionen) sind sehr schlecht wasserlöslich. Eine sehr gute Löslichkeit besitzen die Komplexe jedoch in einer DMSO-H₂O-Mischung. Da Lösungsmittel in Abhängigkeit von deren Konzentration genau wie die Ionenkonzentration der Lösung das Schmelzverhalten der DNA beeinflussen können, wurde der DMSO-Anteil auf maximal 1 % begrenzt. Die Komplexe wurden in DMSO angelöst und dann einer entsprechend konzentrierten CT-DNA-Lösung zugesetzt. Die DNA-Konzentration wurde dabei konstant gehalten. Durch Variation der Konzentration der Eisen(diarylsalen)-Komplexe wurden $r_2 = [\mu M \text{ Fe-Komplex}]/[\mu M DNA_{Phosphat}]$ -Verhältnisse von 0, 0.25, 0.5, 0.75 und 1.0 eingestellt.

Zunächst wurde der Schmelzpunkt reiner CT-DNA (ohne Eisenkomplex-Zusatz) unter den gewählten Bedingungen bestimmt und alle weiteren Schmelzpunkte darauf bezogen. CT-DNA mit einem DMSO-Zusatz in äquimolarer Menge schmilzt bei 65.9 °C. Für ähnliche Bedingungen kann in der Literatur für CT-DNA ein vergleichbarer Schmelzpunkt gefunden werden.^[71, 164, 172]

Der Zusatz der Eisen(diarylsalen)-Komplexe zu CT-DNA führte zunächst zu einer Erhöhung der DNA-Schmelztemperatur und damit zu einer Rechtsverschiebung der DNA-Denaturierungskurven. Bei einer weiteren Erhöhung der Komplexkonzentration kam es dann jedoch häufig zu einer Linksverschiebung der Schmelzpunktkurven. Trotz der Erhöhung der Komplexkonzentration wurden wieder niedrigere Schmelztemperaturen T_m ermittelt (siehe z.B. Abbildung 7.11 und 7.12). Prinzipiell sollte eine Erhöhung der Substanzkonzentrationen aufgrund einer besseren Stabilisierung der DNA auch zu einer Erhöhung der DNA-Schmelzpunkte führen. Eine mögliche Erklärung für die auftretende Verringerung der Schmelztemperatur T_m bei einer weiteren Erhöhung der Komplexkonzentration ist eine Überlagerung des Schmelzens der DNA mit einem oxidativen Angriff der Eisen(diarylsalen)-Komplexe. Aufgrund der Nukleaseaktivität der synthetisierten Verbindungen ist solch eine Überlagerung der Schmelzprozesse durch eine partielle Zerstörung der DNA-Doppelhelixstruktur durchaus denkbar.

Insgesamt gesehen sind die ermittelten Schmelzpunktdifferenzen eher als gering einzuschätzen. Je nach Art und Konzentration der Eisenkomplexe konnten Differenzen zwischen 2 und 7 °C ermittelt werden.

Häufig wurden bei hohen Eisenkomplex-Konzentrationen von 75 bzw. 100 µM nicht nur eine wieder eintretende Verringerung der Schmelztemperatur der DNA gefunden, sondern auch das Auftreten steilerer Schmelzkurven (siehe z.B. ebenfalls Abbildung 7.11 und 7.12). Die DNA schmilzt in einem sehr engen Temperaturintervall, so dass ein steiler Anstieg der Kurven beobachtete werden kann. In der Literatur werden solche Veränderungen der Schmelzpunktkurven u.a. mit dem Beginn der Sättigung der DNA-Bindungsstellen in Zusammenhang gebracht.^[173]



Abbildung 7.11: DNA-Denaturierungskurve von 100 μM CT-DNA unter Zusatz steigender Mengen des Eisen(III)-Komplexes *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m) (25 - 100 μM)



Abbildung 7.12: DNA-Denaturierungskurve von 100 μM CT-DNA unter Zusatz steigender Mengen des Eisen(III)-Komplexes *d*,/[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104d,I) (25 - 75 μM)

Bei Zugabe des *m*[Fe^{III}4'OCH₃]CI-Komplexes (**104m**) zu CT-DNA in einem [Fe-Komplexe]/[DNA_{Phosphat}]-Verhältnis von $r_2 = 0.5$ wurde eine maximale Schmelzpunktdifferenz ΔT_m von 6.2 °C ermittelt (siehe Abbildung 7.11), während für den analogen *d*,*l*-konfigurierten *d*,*l*[Fe^{III}4'OCH₃]CI-Komplex (**104d**,I) in gleicher Konzentration lediglich eine Schmelzpunktdifferenz von 4.6 °C gefunden werden konnte (siehe Abbildung 7.12).



Abbildung 7.13: Denaturierungskurve von 100 μM CT-DNA unter Zusatz steigender Mengen des Eisen(II)-Komplexes [Fe^{II}salophen] (140) (25 - 50 μM)

Die größte Schmelzpunktdifferenz der untersuchten Eisenkomplexe konnte für den phenylendiaminüberbrückten Komplex [Fe^{II}salophen] (140) gefunden werden. Für ein [Fe-Komplexe]/[DNA_{Phosphat}]-Verhältnis von $r_2 = 0.5$ wurde eine Schmelzpunktdifferenz ΔT_m von 7.1 °C ermittelt (siehe Abbildung 7.13). Der analoge Eisen(III)-Komplex [Fe^{III}salophen]Cl (141) zeigte bei dem gleichen [Fe-Komplexe]/[DNA_{Phosphat}]-Verhältnis lediglich eine Schmelzpunktdifferenz von 3.1 °C. Für den [Fe^{III}salophen]Cl-Komplex (141) wurde die größte Schmelzpunktdifferenz mit 4.4 °C für $r_2 = 0.25$ gefunden. Die Zugabe des Eisen(II)-Komplex [Fe^{III}salophen] (140) führte bei demselben [Fe-Komplexe]/[DNA_{Phosphat}]-Verhältnis zu einer Schmelzpunktdifferenz von 3.5 °C. Allerdings verringerte sich die Schmelzpunktdifferenz bei Erhöhung der Konzentration des [Fe^{III}salophen]Cl-Komplexe (141), so dass für das Verhältnis $r_2 = 0.75$ lediglich eine Schmelzpunktdifferenz von 2.6 °C ermittelt wurden (siehe Abbildung 7.14).



Abbildung 7.14: Denaturierungskurve von 100 μM CT-DNA unter Zusatz steigender Mengen des Eisen(III)-Komplexes [Fe^{III}salophen]Cl (141) (25 - 75 μM)

Die Schmelzpunktdifferenzen des Eisen(salen)-Komplexes [Fe^{III}salen]Cl (85) und des hydrierten Eisen(salen)-Komplexes [Fe^{III}hydrosal]Cl (147) lagen mit 3.2 °C bzw. 4.4 °C bei $r_2 = 0.75$ in etwa in dem Bereich der ΔT_m -Werte der Diarylsalen-Komplexe (104m) und (104d,I). Die Schmelzpunktdifferenzen der beiden Eisen(diarylsalen)-Komplexe, die in 3-Position (105m) bzw. in 5-Position (107m) der "Basis"-Aromaten Hydroxy-substituenten tragen, betrugen 3.8 °C bzw. 5.4 °C (für $r_2 = 0.75$). Sie lagen damit ebenfalls in einem ähnlichen Bereich wie die Werte der unsubstituierten Analoga (siehe Abbildung 7.15).



Abbildung 7.15: Denaturierungskurven von 100 μM CT-DNA unter Zusatz von 75 μM verschiedener Eisen(salen)- und Eisen(diarylsalen)-Komplexe