9 Diskussion

9 Diskussion

9.1 Möglicher Bindungsmechanismus der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an die DNA

Die im Handel befindlichen Zytostatika weisen sehr vielfältige Wirkungsmechanismen auf. Neben Antimetaboliten, Hormonen, Enzymen, Immunmodulatoren (z.B. Interferone und Interleukine) und Hemmstoffen des Spindelapparates werden in der Therapie maligner Erkrankungen Substanzen eingesetzt, deren Hauptangriffspunkt die DNA darstellt. Bei diesen Verbindungen kann zweifellos ein Zusammenhang zwischen der Affinität der Zytostatika zur DNA (DNA als endogener Rezeptor) und der *in vitro* sowie der *in vivo* Antitumoraktivität gefunden werden.^[132, 194] Mit der DNA interagieren können u.a. Platinkomplexe und alkylierende Agentien, wie Stickstofflost- und Nitrosoharnstoff-Derivate. Außer den alkylierenden Verbindungen finden in der Tumortherapie auch interkalierende Substanzen Anwendung. Beispiele dafür sind die bereits mehrfach erwähnten Anthracyclinantibiotika und das Glykopeptidantibiotikum Bleomycin, die nach Anlagerung an die DNA Strangbrüche durch Bildung freier Radikale bewirken können (siehe Kapitel 8).

Metallionen haben nur wenige Möglichkeiten mit Nukleinsäuren zu interagieren. Durch Koordinierung der Metallionen an Liganden entstehen neben den ionischen Wechselwirkungen durch Van-der-Waals-Interaktionen, Charge-Transfer-, hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen vielfältige weitere Interaktionsmöglichkeiten.^[117, 132] Prinzipiell sind bei der Interaktion von strukturell unterschiedlichen Substanzen mit der DNA hauptsächlich drei Grundorientierungen möglich: die Interkalation (**a** in Abbildung 9.1), die Anlagerung an die große oder kleine Furche (*major* oder *minor groove binding*) (**b** in Abbildung 9.1) und die Bildung eines *Outside*-Komplexes nach Hamilton (**c** in Abbildung 9.1).^[132]

Unter der Interkalation von Wirkstoffen in die DNA wird das Einschieben eines planaren Molekülteils zwischen zwei gestapelten Basenpaaren verstanden. Primärund Sekundärstruktur der DNA bleiben dabei intakt. Die DNA-Tertiärstruktur wird partiell verlängert und im Vergleich zur ursprünglichen Form etwas aufgewunden.^[195, 196] Durch Interkalation vergrößert sich der mittlere Abstand von zwei gestapelten Basenpaaren von 3.4 Å auf ca. 7 bis 8 Å. Durch die veränderte DNA-Topologie resultiert auf biochemischer Ebene eine Blockade der Matrizenfunktion.^[132, 194] Sobald Verbindungen in die DNA interkalieren, verändern sich verschiedene physikochemische Eigenschaften der Nukleinsäure. Außer einer Viskositätserhöhung von DNA-Lösungen kann eine Erhöhung der thermischen Stabilität der DNA gefunden werden. Die Schmelzpunkterhöhung durch interkalierende Substanzen beruht darauf, dass die thermische Energie, die zur Trennung der beiden DNA-Stränge benötigt wird, durch die zusätzliche Energie, die zur Entfernung der gebundenen Moleküle aufgewendet werden muss, vergrößert wird.^[194]



Abbildung 9.1: Komplexierungstopologien von DNA-interagierenden Stoffen:^[132]
 a) Interkalation, b) Anlagerung an die große Furche, c) *Outside*-Komplex nach Hamilton

9.1.1 Eisenkomplex-DNA-UV/Vis-Spektren und DNA-Schmelzpunktkurven

Der DNA-Schmelzpunkt T_m ist ein Maß für die Stabilität der DNA-Doppelhelix. Das Ausmaß der Schmelzpunktdifferenz ΔT_m zwischen reiner CT-DNA und CT-DNA, die einen Metallkomplex-Zusatz enthält, wird häufig als Indikator für die Bindungsmechanismen und -eigenschaften von Metallkomplexen herangezogen.^[159] Die Erhöhung der Schmelztemperatur von CT-DNA durch den Zusatz der Eisen(diarylsalen)-Komplexe, die in Kapitel 7.2 beschrieben wurde, zeigt, dass die synthetisierten Verbindungen die DNA gegen Denaturierungsprozesse stabilisieren können. Klassische Interkalatoren führen in der Regel zu großen Schmelzpunktdifferenzen. Für Ruthenium-1,10-phenanthrolin-Komplexe, die in die DNA interkalieren können, wurden z.T. Schmelzpunkterhöhungen um bis zu 20 °C gemessen.^[197] Allerdings findet man in der Literatur für interkalierende Cr^{III}-, Ni^{II}- und Co^{III}-Dipyridophenazin-Komplexe, die sehr stark an die DNA binden, nur Schmelzpunktdifferenzen von 6 bis 8 °C.^[164, 172] Offensichtlich können Interkalatoren für große wie auch für kleine Schmelzpunkt-differenzen verantwortlich gemacht werden.

Für Metallkomplexe, die mit der DNA-Oberfläche interagieren, wird häufig ein geringerer Einfluss dieser Verbindungen auf die Schmelztemperatur gefunden. Für Chrom(salen)-Komplexe, die in die große Furche der DNA binden, wurden Schmelzpunktdifferenzen von 5 bis 6 °C gemessen.^[71] Allerdings konnten für Eisen(III)salene, bei denen elektrostatische Interaktionen zwischen dem [Fe^{III}salen]⁺-Kation und den DNA-Phosphatbrücken angenommen werden, je nach DNA/Komplex-Verhältnis (0.25-2.0) Schmelzpunktdifferenzen von 12 bis 23 °C gefunden werden.^[41]

Die Stabilität der DNA ist neben ihrer molaren Zusammensetzung (prozentualer Anteil der G·C- und A·T-Basenpaare) stark von äußeren Faktoren wie dem pH-Wert der Lösung und der Art und der Konzentration der Ionen in dem Lösungsmittel abhängig, so dass die gemessenen Schmelzpunkte und Schmelzpunktdifferenzen sehr stark von den gewählten Versuchsbedingungen beeinflusst werden.^[168, 171]

Durch die Wechselwirkungen von Substanzen mit der DNA werden neben der Schmelzpunkterhöhung durch die Stabilisierung gegen Denaturierungsprozesse weitere physikochemische Eigenschaften von DNA-Lösungen beeinflusst. Bei der photometrischen Untersuchung von Metallkomplex-DNA-Wechselwirkungen werden häufig hypochrome Auswirkungen auf das UV/Vis-Spektrum des Metallkomplexes bei Zusatz von DNA-Lösungen gefunden. Diese hypochromen Effekte deuten in der Regel auf interkalative Wechselwirkungen zwischen der untersuchten Verbindung und der DNA hin. Dabei gilt das Ausmaß der Hypochromie häufig als Maß für die interkalative Bindungsstärke.^[159-161, 164, 172, 198] Allerdings konnte bei funktionalisierten Kupfer(salen)- und Nickel(salen)-Komplexen, die nicht in die DNA interkalieren können, ebenfalls eine Hypochromie im UV/Vis-Spektrum der Komplexe bei DNA-Zusatz nachgewiesen werden.^[141, 147]

Bei Zugabe von CT-DNA zu einer Lösung von [Fe^{III}salen]Cl bzw. der Chrom(salen)-Komplexe <u>25</u> und <u>26</u> (vgl. Kapitel 7, Abbildung 7.3) wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen ein hyperchromer Effekt auf das UV/Vis-Spektrum der Metallkomplexe beobachtet. Die beiden Chromkomplexe zeigten zusätzlich einen geringen bathochromen Shift des $\pi \to \pi^*$ -Maximums.^[41, 71] Diese hyperchromen Effekte auf das UV/Vis-Spektrum von Metallkomplexen bei DNA-Zusatz werden mit einer Bindung der Komplexe an die DNA-Oberfläche, insbesondere im Bereich der Furchen, in Verbindung gebracht.^[41, 71, 162] U.a. wurden in den UV/Vis-Spektren von Eisen-, Kupfer- und Nickelporphyrin-Derivaten, die mit dem DNA-Rückgrat interagieren, ähnliche hyperchrome Effekte gesehen.^[199] Für Kupfer(I)- und Cobalt(II)-Phenanthrolin-Derivate, die hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen nahe der Zuckerphosphatbrücken in eine der Furchen der DNA binden, ist dieser Effekt ebenfalls beschrieben worden.^[158, 166]

Der Zusatz von CT-DNA zu einer Lösung des *m*[Fe^{III}4'OCH₃]CI-Komplexes **(104m)** führte im UV/Vis-Spektrum zu einem ausgeprägten hyperchromen Effekt über das gesamte Spektrum, zu einem bathochromen Shift des Maximums bei λ_1 =226 nm und zu einem hypsochromen Shift des Maximums bei λ_2 = 269 nm (siehe Kapitel 7.2, Abbildung 7.10). Diese beobachteten Effekte sprechen für eine Bindung des Komplexes an die DNA-Oberfläche. Silvesteri *et al.* fanden für [Fe^{III}salen]Cl ähnliche Spektren und postulierten eine elektrostatische Interaktion des kationischen Salenkomplexes mit den negativen geladenen Phosphatbrücken der DNA.^[41] Bei Fe³⁺-Ionen ist die besonders stabile Komplexbildung mit der DNA bereits bekannt. Durch Neutralisation der Phosphodiestergruppen kann sogar eine DNA-Kondensation bewirkt werden.^[200] Auch für kationische Kupfer- und Zinkporphyrazin-Komplexe ist eine Bindung an die Phosphatbrücken der DNA bereits beschrieben worden.^[201]

Interessanterweise wurde bei einem DNA_{Phosphat}/Eisenkomplex-Verhältnis von r₁ = 1 der maximale hyperchrome Effekt erhalten (vgl. Kapitel 7.2, Abbildung 7.10). Bei Zusatz weiterer Mengen an CT-DNA ($r_1 = 1.5$ und $r_1 = 2.0$) wurde im Vergleich zu diesem Maximaleffekt wieder eine geringere Absorption im Bereich der LMCT-Bande gemessen. Einen ähnlichen Effekt haben auch Silvestri et al. gefunden. Dieser hypochrome Shift bei ca. 320 nm ist offensichtlich auf sogenannte self stacking-Interaktionen zwischen den planaren [Fe^{III}salen]⁺-Kationen zurückzuführen, die auch schon für kationische Porphyrinderivate^[202] und bei Kupfer-Porphyrazin-Komplexen^[201] bekannt sind. Die parallele Anordnung der planaren kationischen Verbindungen an die DNA-Oberfläche bewirkt die Ausbildung einer superhelikalen elektrostatischen Doppelschicht, wobei ab einem DNA_{Phosphat}/Eisenkomplex-Verhältnis von $r_1 = 1$ alle elektrostatischen Bindungsstellen der DNA durch Salenkomplex-Kationen besetzt sind. Daher resultiert bei einem Verhältnis von $r_1 = 1$ der maximale hyperchrome Shift im DNA-UV/Vis-Spekrtum nach Eisenkomplexzusatz. Bei Erhöhung der Eisenkomplexkonzentration ($r_1 > 1$) ist die maximalen Anzahl der DNA-Bindungsstellen besetzt, so dass die Eisen(diarylsalen)-Kationen nicht mehr an die DNA binden können.^[41]

Mittels Ethidiumbromid-Verdrängung haben Liu *et al.* eine interkalative Bindung von [Co^{II}salen] an die DNA nachgewiesen. In derselben Arbeitsgruppe wurde auch ein hypochromer Shift im UV/Vis-Spektrum des Cobaltkomplexes bei DNA-Zusatz gefunden.^[155] Für die beiden strukturell ähnlichen Salen-analogen Komplexe <u>27</u> und <u>28</u> (vgl. Abbildung 7.4, Kapitel 7) wurde ebenfalls Interkalation als Hauptbindungsmechanismus an die DNA festgestellt.^[156, 157]

Für eine interkalative Wechselwirkung einer Verbindung mit der DNA sind verschiedene strukturelle Voraussetzungen von Bedeutung. Unter anderem ist ein planarer Molekülteil mit einer Mindestfläche von 28 Å² erforderlich. Damit liegt das Optimum bei drei bis vier aromatischen Ringen. Neben dem planaren Molekülteil sind die Ladungen der Substituenten von entscheidender Bedeutung. Die Moleküle sollten neutrale oder positiv geladene Substituenten oder Atome aufweisen.^[132, 195, 203]

Tanaka *et al.* fanden, dass alle Kupferkomplexe, deren Grundstruktur in Abbildung 9.2 dargestellt ist, stark an die DNA binden. Die Art dieser Bindung an die DNA zeigte jedoch eine deutliche Abhängigkeit von der *N*,*N'*-Brückenstruktur des Liganden. Kupferkomplexe mit aliphatischen Brückengruppen wie einer Ethanbrücke (X: -(CH₂)₂-) binden über elektrostatische und hydrophobe Interaktionen an die Oberfläche oder in eine der Furchen der DNA. Verbindungen mit aromatischen Brückengruppen, wie Phenyl- oder Naphthylreste (X: C₆H₄ bzw. C₁₀H₆, R: CH₃ bzw. C₂H₅), können aufgrund der erhöhten strukturellen Rigidität und der Erhöhung der aromatischen Flächen, die mit der DNA in Wechselwirkung treten können, in die Basenpaare interkalieren. Erkennbar war die jeweilig bevorzugte Bindung an den charakteristischen Unterschieden der UV/Vis-Spektren bei Zusatz von DNA-Lösungen.^[162]



Abbildung 9.2: Grundkörper der von Tanaka *et al.* synthetisierten Kupferkomplexe^[162]

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Sato *et al.* Die Arbeitsgruppe berichtete einerseits von einer stereospezifischen Bindung von [Cu^{II}salen]-Komplexen an die DNA und zeigte andererseits, dass der Ersatz der Ethanbrücke des Salens durch eine Phenyl- oder Naphthylbrücke zu einer Veränderung im Bindungsverhalten der Komplexe führte. Die überbrückten Derivate waren nicht mehr in der Lage, in eine der Furchen der DNA zu binden und interkalierten stattdessen. Ihre Koordinationsebene lag dabei senkrecht zur DNA-Strang-Achse.^[157]

Analog zu Silvestri und Sato fanden Routier *et al.*, dass der funktionalisierte Kupferkomplex <u>23</u> (siehe Kapitel 7, Abbildung 7.3) nicht in die DNA interkaliert. Er lagert sich stattdessen parallel orientiert zu den Basenpaaren in die große Furche der DNA ein. Die Koordinationsebene der Komplexe ist dabei senkrecht zur Längsachse der DNA-Helix orientiert.^[141]

Die Art der Bindung der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe an die DNA lässt sich mit den durchgeführten Untersuchungen nicht endgültig klären. Neben der reinen Affinitätsanalyse, die u.a. Viskositätsmessungen, die Bestimmung bathochromer und hypochromer Effekte im UV/Vis-Spektrum der Komplexe, die Ermittlung der Sedimentationskonstanten und die Bestimmung der veränderten elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA beinhaltet, sind insbesondere molekülspektroskopische Methoden wie die Röntgenstrukturanalyse für das Studium der Bindungsarten von Substanzen an die DNA von ausschlaggebender Relevanz.^[132]

Aufgrund der räumlichen Struktur der synthetisierten Diarylsalen-Komplexe (geringe Anzahl planerer, aromatischer Flächen, siehe Abschnitt 9.1.3), der geringen DNA-Schmelzpunktdifferenzen ΔT_m bei Komplexzusatz (siehe Kapitel 7.2.2) und des hyperchromen Shifts der Komplex-UV/Vis-Spektren bei Zusatz von DNA-Lösungen (siehe Kapitel 7.2.1) kann Interkalation nicht als Hauptbindungsmechanismus der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an die DNA angesehen werden. Vielmehr sprechen die erhaltenen Ergebnisse für eine elektrostatische Wechselwirkung der Eisenkomplexe mit dem Phosphatrückgrat der DNA. Untermauert werden die Ergebnisse der photometrischen Untersuchung und der Schmelzpunktanalytik durch die Zytotoxizitätsuntersuchungen (siehe Kapitel 4). Die wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung der Eisen(III)-Komplexe im Vergleich zu ihren Eisen(II)-Analoga ist ein wichtiger Hinweis auf eine Bindung der Komplexe an die Phosphatbrücken der DNA, zumal in den Zellaufnahmestudien eine geringere Aufnahme der Eisen(III)-Komplexe in die Zellen gefunden wurde.

Bei den beiden zytotoxisch wirksamsten Verbindungen [Fe^{II}salophen] **(140)** und [Fe^{III}salophen]Cl **(141)** sind im Gegensatz zu den Diarylsalen-Komplexen auch andere Wechselwirkungen mit der DNA vorstellbar. Durch die Phenylendiamin-Teilstruktur erhalten die Gesamtmoleküle eine wesentlich höhere Planarität und Rigidität, so dass analog zu den Ergebnissen von Sato *et al.* und Tanaka *et al.* eine Interkalation in die DNA möglich wird.^[157, 162] Einen wichtigen Hinweis für den interkalierenden Wirkungsmechanismus der beiden Komplexe liefert auch die DNA-Schmelzpunktbestimmung (siehe Kapitel 7.2.2). Der [Fe^{II}salophen]-Komplex **(140)** weist bei einem [Fe-Komplex]/[DNA_{Phosphat}]-Verhältnis von r₂ = 0.5 mit $\Delta T_m = 7.1$ °C die größte Schmelzpunktdifferenz aller untersuchten Komplexe auf. Er bindet damit am stärksten an die DNA und vermag sie besonders gut zu stabilisieren.

In den Zytotoxizitätsstudien zeigten beide Komplexe eine wesentlich stärkere zytotoxische Wirksamkeit an den Tumorzelllinien als die Diarylsalen-Komplexe. Der Eisen(III)-Komplex [Fe^{III}salophen]Cl **(141)** erwies sich in den MCF7-Zytotoxizitätstests als 10-fach wirksamer als beispielsweise der diarylethansubstituierte *m*[Fe^{III}DPS]Cl-Komplex **(90m)**. Die mögliche Interkalation ist allerdings nur eine Erklärung für die wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung der beiden Komplexe. Mit Hilfe der Zellaufnahmestudien konnte eine 4- bis 5-fach höhere Akkumulation beider Komplexe in MCF7-Zellen im Vergleich zu den diarylethansubstituierten Verbindungen gefunden werden. Damit ist die wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung der beinden Wirkung offensichtlich auch durch eine selektiv höhere Aufnahme bedingt.

9.1.2 Zellaufnahmestudien

Generell werden die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe gut in MCF7- und MDA-MB-231-Tumorzellen aufgenommen. Die ermittelten Anreicherungsgrade sind wesentlich höher als die, die für die klinisch angewendeten Platinkomplexe in der Literatur gefunden werden können. Von Ghezzi *et al.* wurden für Cisplatin lediglich eine 5-fache Anreicherung in MCF7-Zellen gegenüber dem Außenmedium bestimmt, für Oxaliplatin eine ca. 6-fache Anreicherung und für Carboplatin lediglich eine 1.6-fache Anreicherung.^[92]

Eine wesentlich stärkere Akkumulation von Platinkomplexen in Tumorzellen konnte durch Reile *et al.* durch die Einführung einer Diaminteilstruktur als Neutralligand in Platinkomplexe erreicht werden. *D,I*-konfigurierte [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]-platin(II)-Komplexe reicherten sich 20-fach in MCF7-Brustkrebszellen an, die diastereomeren *meso*-konfigurierten Komplexe ca. 10-fach.^[38, 39]

Der entgegengesetzte Effekt konnte bei Co(salen)-Komplexen beobachtet werden. *Meso*-konfigurierte Cobalt(diarylsalen)-Komplexe reicherten sich ca. 15- bis 25-fach gegenüber dem Außenmedium in MCF7-Zellen an. Die zytotoxisch wirksameren *d,I*-konfigurierten Diastereomere wurden dagegen lediglich 5- bis 6-fach in den Zellen akkumuliert.^[35, 36]

Die Aufnahme der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe in MCF7-Zellen liegt in einem vergleichbaren Größenordnungsbereich. Der [Fe^{III}salen]-Komplex **(85)** wird ähnlich wie die *d,I*-konfigurierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe **(97d,I)**, **(104d,I)**, **(117d,I)** und **(122d,I)** ca. 20-fach in den Zellen angereichert. *Meso*-konfigurierte Komplexe, insbesondere die 4'-fluorsubstituierten Komplexe **(117m)** und **(122m)**, werden dagegen ca. 30-fach angereichert. Vergleichbar mit den Cobalt(diarylsalen)-Verbindungen zeigen Eisen(diarylsalen)-Komplexe ebenfalls eine stereoselektive Aufnahme in MCF7-Zellen. Der Unterschied der Zellaufnahme der beiden Stereoisomere ist jedoch wesentlich geringer als der, der für *meso*- bzw. *d,I*-konfigurierte Cobaltkomplexe gefunden wurde.

Trotz der höheren intrazellulären Konzentration besaßen *meso*-konfigurierte Komplexe in den Zytotoxizitätstestungen (siehe Kapitel 4.2 und 4.3) wesentlich geringere zytozide Wirkungen als ihre *d,I*-konfigurierten Analoga. Obwohl der Eisen(salen)-Komplex [Fe^{III}salen]Cl **(85)** eine geringere zelltoxische Wirkung zeigte, konnte in den Zellaufnahmestudien kein Unterschied in der Aufnahme des Salenkomplexes und der Diarylsalen-Komplexe gefunden werden. Eine durch die Diarylsalenliganden vermittelte bessere Aufnahme der Komplexe in die Tumorzellen konnte damit nicht bestätigt werden.

Besonders auffällig ist auch die unterschiedliche Akkumulation der Eisenkomplexe in MDA-MB-231- und MCF7-Zellen. Obwohl die Eisenkomplexe in der Zytotoxizitätstestung an MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu der MCF7-Zelllinie in z.T. 100-fach geringeren Konzentrationen zytotoxische Wirkungen zeigten, wurden sie nur halb so stark (10- bis 15-fach) in MDA-MB-231-Zellen akkumuliert.

Die hohe Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität von der Ligandenstruktur der Eisen-(diarylsalen)-Komplexe, vor allem bei Komplexen mit nahezu identischer Akkumulation in den Tumorzellen, lässt sich mit der Hypothese der Produktion frei diffundierbarer Hydroxyl-Radikale allein nicht erklären. Stattdessen legen die ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen einen spezifischen Bindungsprozess in den Zellen nahe, der der Produktion von ROS vorangeht. Die sehr hohe zytozide Wirksamkeit der Komplexe an MDA-MB-231-Zellen bei wesentlich geringerer Zellaufnahme ist ebenfalls ein wichtiger Hinweis auf einen Eingriff der synthetisierten Verbindungen in spezifische Reaktionsabläufe. Allerdings sei an dieser Stelle erwähnt, dass bei den Zellaufnahmestudien lediglich die Aufnahme der Eisenkomplexe in die gesamte Zelle bestimmt wurde. Die Konzentration in den einzelnen Zellkompartimenten, z.B. dem Zellkern als eigentlichem Target, blieb dabei unberücksichtigt. Prinzipiell kann eine selektive Aufnahme bestimmter Komplexe in den Zellkern ebenso wenig ausgeschlossen werden wie eine stärkere intrazelluläre Bindung gewisser Komplexe an Zellmatrixbestandteile.

9.1.3 Mögliche Bindungsorientierung

Eisen-EDTA-Komplexe, die aufgrund ihrer negativen Ladung nicht elektrostatisch an die DNA binden können, führen über eine Produktion von Hydroxyl-Radikalen zu einer unselektiven DNA-Spaltung und werden aus diesem Grund bei *Footprint*-Analysen angewendet.^[204] Für Eisen(II)- und Eisen(III)-lonen wurde dagegen eine relativ spezifische Bindung an die DNA gefunden. Über die Sauerstoffatome der Phosphat-gruppen, der DNA-Basen und von Wassermolekülen sowie über die Stickstoffatome der Basen kommt es zu einer selektiven Komplexierung der Ionen an die DNA.^[187, 205, 206]

Für Metallkomplexe ist nicht nur eine starke Abhängigkeit der Art der Wechselwirkung mit der DNA von den strukturellen Voraussetzungen bekannt, sondern auch eine bevorzugte Interaktion mit speziellen DNA-Regionen. Gravert *et al.* synthetisierten 26 strukturell unterschiedliche [Mn^{III}salen]⁺-Komplexe, wobei alle Mangankomplexe die DNA in A·T-reichen Regionen spalteten. Es wird angenommen, dass die Mangankomplexe an die elektronenreichen A·T-Regionen der relativ schmalen kleinen Furche binden. Die hervorstehende Aminogruppe des Guanins behindert die Wechselwirkung der Komplexe mit der DNA an G·C-reichen Sequenzen, so dass daraus eine Selektivität der Spaltungsaktivität resultiert. Das Ausmaß der DNA-Spaltung und das DNA-Spaltungsmuster waren jedoch stark von der Struktur und der Stereochemie der Brücke des Salengrundgerüsts abhängig. Komplexe, deren Ethanbrücke der Salengrundstruktur durch eine Hexylteilstruktur ersetzt wurde, wurden von der DNA in unterschiedlichen Ausmaßen stereo- und enantiospezifisch gebunden.^[45, 143, 145]

Eine stereospezifische Bindung ist ebenfalls für Ruthenium- oder Cobalt-Tris(phenanthrolin)-Komplexe bekannt, wobei das eine Isomer eher eine Oberflächenbindung in der kleinen Furche der DNA eingeht und das andere Isomer eher im Bereich der großen Furche interkaliert.^[207, 208] Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den *in vitro* Zytotoxizitätstestungen eine deutliche Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Struktur der Eisen(diarylsalen)-Komplexe festgestellt (siehe Kapitel 4). Mit dem Ersatz der Ethanbrücke im Salengrundgerüst des Liganden durch eine Diarylethan-Teilstruktur wurden wirksamere Komplexe erhalten. Die Wirkstärke der synthetisierten Komplexe war von der Konfiguration der Diarylethan-"Brücke" und der Art und Position der Substituenten der "Brücken"-Aromaten deutlich abhängig. Dabei erwiesen sich *d,I*-konfigurierte Komplexe z.T. als wesentlich wirksamer als ihre *meso*-konfigurierten Analoga. Die Einführung von Methoxysubstituenten bewirkte im Vergleich zu den in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierten Verbindungen einen Wirkungsverlust. Eine größere zytotoxische Wirkung wurde lediglich durch die Einführung eines Fluorsubstituenten in 2'-Position bzw. durch die Einführung von zwei Fluorsubstituenten erreicht.

Substitutionen der "Basis"-Aromaten (OH und OCH₃) führten dagegen ebenso wie die meisten Variationen am Salengrundgerüst (z.B. Hydrierung der Azomethindoppelbindung und Ersatz des Iminprotons durch eine Methylgruppe) an der MCF7-Zelllinie zu einem Wirkungsverlust der Verbindungen, an der MDA-MB-231-Zelllinie zu einer Verringerung der zytotoxischen Wirkung. Die geringere Wirksamkeit der in den "Basis"-Aromaten hydroxysubstituierten Komplexe ((**105m**), (**106m**) und (**107m**)) und des hydrierten [Fe^{III}hydrosal]-Komplexes (**147**) lässt sich leicht durch eine wesentlich geringere Aufnahme der Verbindungen, in deren "Basis"-Aromaten eine Methoxygruppe eingeführt wurde, ist allerdings nicht auf eine geringere Akkumulation in den Zellen zurückzuführen. Die Anreicherung dieser Komplexe ((**108m**), (**109m**) und (**110m**)) ist mit der Aufnahme des in den "Basis"-Aromaten unsubstituierten Komplexes *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (**104m**) durchaus vergleichbar. Die unterschiedlichen zytotoxischen Effekte bei gleicher Akkumulation in MCF7-Zellen können u.a. auf eine spezifische Bindung der Komplexe an die DNA zurückgeführt werden.

Binden Moleküle an die DNA-Oberfläche, ergeben sich – insbesondere bei der Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat – zwei unterschiedliche Orientierungsmöglichkeiten der Moleküle. Zum einen ist eine parallele Ausrichtung der Eisen(diarylsalene) zu den Basen der DNA denkbar. Dabei ist durch eine dichte Stapelung der Moleküle die Ausbildung einer elektrostatischen Doppelschicht möglich (**a** in Abbildung 9.3). Zum anderen sind auch weniger dichte, unregelmäßige Bindungen in Form der *Outside*-Komplexe nach Hamilton (**b** in Abbildung 9.3, siehe auch Abbildung 9.1) bekannt.



 Abbildung 9.3:
 Orientierungsmöglichkeiten für die Bindung von Molekülen an die DNA-Oberfläche:

 DNA-Oberfläche:
 [201]

 a) self stacking
 b) Outside-Komplex nach Hamilton

Für die Bindung von Eisen(II)-Ionen an die DNA ist ebenso wie für Eisen(II)-Mercaptoimidazol-Komplexe in der Literatur ein Fe²⁺ bzw. Eisenkomplex-DNA_{Monomer}-Verhältnis von 1:1 beschrieben worden.^[200] Das gleiche stöchiometrische Verhältnis wurde von Silvestri *et al.* für die [Fe^{III}salen]⁺-Kationen gefunden.^[41] Bei der Aufnahme der UV/Vis-Spektren der Eisen(diarylsalen)-Komplexe bei Zusatz steigender DNA-Mengen wurde ein maximaler hyperchromer Effekt bei einem DNA_{Phosphat}/Eisenkomplex-Verhältnis von r₁ = 1 beobachtet (vgl. Kapitel 7.2, Abbildung 7.10). Wurden größere DNA_{Monomer}/Eisenkomplex-Verhältnisse (r₁ = 1.5 und r₁ = 2.0) eingestellt, erhielt man wieder geringere Absorptionswerte. Außerdem konnte bei der Aufnahme der Schmelzpunktkurven (vgl. Kapitel 7.2.2) bei höheren Komplexkonzentrationen (r₂ = 0.75 bis 1) ein steiler Anstieg der Kurven beobachtet werden. Nach Plum und Bloomfield bedeutet diese Schärfung der Schmelzpunktkurven einen Beginn der Sättigung der Bindungsstellen der DNA.^[173] Beide Tatsachen sprechen für ein Eisenkomplex/DNA-Verhältnis von 1:1, das nur durch eine parallele Ausrichtung der Koordinationsebene der Eisenkomplexe zu den DNA-Basen erreicht werden kann.

Röntgenkristallstrukturanalysen des kristallisierten [Fe^{III}salen]CI-Komplexes können weitere Hinweise für eine parallele Ausrichtung der gebundenen Moleküle liefern. Während der Chlorid-Ligand die apikale Position des quadratisch pyramidalen Komplexes besetzt, befindet sich der vierbindige Schiffsche-Base-Ligand nach Koordinierung an das Eisen(III)-Zentralatom in der planaren äquatorialen Ebene.^[209] Die Koordinationsebene um ein Eisen(II)-Zentralatom ist ebenfalls planar (siehe Abbildung 9.4).^[52] In den Röntgenkristallstrukturanalysen wurde im festen Aggregat-zustand eine parallel übereinander gelagerte Struktur der ionisch planaren [Fe^{III}salen]⁺-Kationen gefunden. Die Chlorid-Ionen befanden sich dabei in derselben Ebene der kationischen Komplexe.

Obwohl der Abstand übereinander gelagerter vergleichbarer aromatischen Systemen in der Regel 3.7 Å beträgt, besaßen zwei übereinander liegende Schichten der [Fe^{III}salen]⁺-Kationen einen Abstand von 3.4 Å. Der Grund dafür ist die Mitbestimmung des Schichtabstands durch die freien elektrostatischen Ladungen der Eisen-Kationen und Chlorid-Anionen.^[41, 51, 210] Die planare Teilstruktur der Komplexe lässt eine parallele Ausrichtung der Moleküle bei der Bindung an die DNA vermuten, zumal der axiale Abstand der Monomereinheiten nativer B-DNA ebenfalls 3.4 Å beträgt.^[41] Durch die Bindung einer maximalen Anzahl an geladenen Komplexmolekülen an die DNA-Oberfläche könnte sich durchaus ein 1:1 System Eisen(salen)/DNA_{Phosphat} ausbilden, so dass die DNA-Ladung neutralisiert werden kann.







δ **(***R,R***)**

Abbildung 9.4: Angenommene räumliche Struktur der δ (*R*,*S*) und δ (*R*,*R*)-Isomere der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe, die nach den in [211-215] angegebenen Bindungslängen und -winkeln ermittelt wurde

Wenn man von einer parallelen Anlagerung der Verbindungen an die DNA ausgeht, sind für die Annäherung der Komplexe an die DNA prinzipiell drei Grundorientierungen denkbar (siehe Abbildung 9.5):

- a) Annäherung von der Seite der "Brücken"-Aromaten
- b) Annäherung von Seite der "Basis"-Aromaten oder
- c) seitliche Annäherung des Komplexes



Abbildung 9.5: Orientierungsmöglichkeiten der Eisen(diarylsalen)-Komplexe bei der Bindung an die DNA:
a) mit den "Brücken"-Aromaten zuerst
b) mit den "Basis"-Aromaten zuerst
c) mit der "Seite" zuerst

Die Art und die Position der Substituenten der "Brücken"-Aromaten haben einen entscheidenden Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit der Eisen(diarylsalen)-Komplexe. Dennoch ist eine Annäherung von der Seite der "Brücken"-Aromaten her eher unwahrscheinlich (vgl. **a** in Abbildung 9.5). Damit eine Wechselwirkung des positiv geladenen Zentralatoms mit den Phosphatresten der DNA möglich wird, müssten die "Brücken"-Aromaten tief in die DNA-Basenstapel eindringen und partiell interkalieren können. Bei einer Betrachtung der strukturellen Voraussetzung der synthetisierten Komplexe (siehe Abbildung 9.4) wird deutlich, dass die "Brücken"-Aromaten insbesondere bei den *meso*-konfigurierten Komplexen weit aus der Koordinationsebene herausragen. Die Einführung der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur wäre für diese Bindungsorientierung aufgrund einer sterischen Hinderung sehr nachteilig. Im Widerspruch dazu steht die deutliche Wirkungssteigerung, die durch die Einführung einer Diarylethan-Teilstruktur in das Salengrundgerüst der Eisenkomplexe erreicht werden konnte.

Der 4'-fluorsubstituierte Diarylsalen-Komplex *d*,*I*[Fe^{III}4'F]Cl **(122d,I)** zeigte beispielsweise in der Zytotoxozitätstestung an der MCF7-Zelllinie (siehe Kapitel 4.2) in einer Konzentration von 10 μ M stark zytozide Effekte, während der [Fe^{III}salen]Cl-Komplex **(85)** in dieser Konzentration lediglich eine zytostatische Wirksamkeit aufwies. Die Konzentration beider Komplexe in den Zellen war jedoch identisch (109 μ M nach 24 h Inkubation mit 5 μ M Eisenkomplex; vgl. Kapitel 7.2.3.1).

Eine Annäherung der Komplexe an die DNA von der Seite der "Brücken"-Aromaten her stellt für die Diarylsalen-Verbindungen offensichtlich nicht die Hauptorientierungsrichtung dar. Für die phenylendiaminüberbrückten Komplexe (140) und (141) wäre diese Orientierung jedoch durchaus denkbar. Die Planarität des Gesamtmoleküls könnte – wie bereits erwähnt – eine Interkalation und damit eine Wechselwirkung der aromatischen Fläche des Phenylenrestes mit der DNA ermöglichen.

Als zweite Möglichkeit wäre ein Herantreten der Komplexe an die DNA von der Seite der "Basis"-Aromaten her vorstellbar. Die Zytotoxizitätsstudien zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Wirksamkeit der Komplexe von einer Substitution dieser Aromaten. Eisenkomplexe, deren "Basis"-Aromaten außer der für die Komplexbildung benötigten Hydroxygruppe der Salicyliden-Teilstruktur keine weiteren Substituenten tragen, zeigten wesentlich höhere zytotoxische Effekte als methoxy- oder hydroxysubstituierte Verbindungen (vgl. Kapitel 4.2). Verbindungen mit Methoxysubstitution der "Basis"-Aromaten besaßen keine oder lediglich antiproliferative Wirkungen auf MCF7-Zellen. Verbindungen mit Hydroxysubstituierten Verbindungen ist zum Großteil durch deren geringe Aufnahme in die Tumorzellen bedingt (siehe Abschnitt 5.2.3.1). Im Gegensatz dazu lässt sich die geringere Wirksamkeit der in den "Basis"-Aromaten methoxysubstituierten Komplexe nicht über deren Zellaufnahme erklären. Die Konzentrationen der unsubstituierten und der methoxysubstituierten Komplexe in MCF7-Zellen, die nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bestimmt wurden, sind nahezu identisch.

Wenn die Komplexe mit der Seite der "Basis"-Aromaten zuerst an die DNA binden, ist es leicht vorstellbar, dass eine Methoxysubstitution der "Basis"-Aromaten die Bindung an die Phosphatbrücken behindert und folglich ein Wirkungsverlust eintritt. Die geringste Abschirmung des Eisenzentralatoms kann bei einer Methoxysubstitution in 5-Position erwartet werden. In den Zytotoxizitätstestungen an der MCF7-Zelllinie wurden bei den 5-methoxysubstituierten Eisen(III)-Komplexen häufig antiproliferative bis zytozide Effekte gefunden. Komplexe mit Methoxygruppen in 4- bzw. 3-Position zeigten an der MCF7-Zelllinie eine wesentlich geringere Wirksamkeit. Methoxysubstitutionen in 3-Position der "Basis"-Aromaten behindern die Wechselwirkungen des Zentralatoms mit den Phosphatresten der DNA so stark, dass diese Komplexe auch die geringste Wirksamkeit in der Reihe der methoxysubstituierten Komplexe aufwiesen. Bei dieser Orientierung haben auch die Konfiguration der Diarylethan-"Brücke" und die Substitution der "Brücken"-Aromaten einen großen Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit der Komplexe. Für eine maximale Besetzung der Bindungsstellen der DNA bei paralleler Anlagerung ist ein möglichst planares Gesamtmolekül von entscheidender Bedeutung. Nur dann könnte sich ein nahezu 1:1-Eisenkomplex-DNA_{Monomer}-Verhältnis ausbilden.

Im Gegensatz zu den *d,I*-konfigurierten Komplexen ragen die "Brücken"-Aromaten ihrer *meso*-Diastereomere weit aus der Ebene des Gesamtmoleküls heraus. Durch diese sterische Hinderung ist eine dichte parallele Anlagerung der Komplexmoleküle unmöglich. Die synthetisierten *d,I*-Komplexe zeigten trotz einer geringeren Akkumulation in den Tumorzellen oft eine wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung im Vergleich zu ihren *meso*-Analoga. Diese Wirkungssteigerung durch Änderung der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-"Brücke" könnte auf einer verbesserten Bindungsmöglichkeit der Komplexe an die DNA beruhen, so dass eine höhere Anzahl an Bindungsstellen besetzt werden kann.

Werden Methoxygruppen in die "Brücken"-Aromaten der Verbindungen eingeführt, wird eine räumliche Hinderung bei der Annäherung der Komplexe an die DNA vorstellbar. Eine gegenseitige Behinderung bei der dichten Übereinanderlagerung der Moleküle ist offensichtlich. Damit stellen unsubstituierte "Brücken"-Aromaten ein Optimum für eine parallele Bindung an die DNA und damit auch für die zytotoxische Wirkung dar. Somit wird die wesentlich größere Wirksamkeit der unsubstituierten Verbindungen (**(89m)**, **(89d,I)**, **(90m)** und **(90d,I)**) an der MCF7-Zelllinie im Vergleich zu den methoxysubstituierten Komplexen erklärbar.

Fluorierte Verbindungen weisen an der MCF7-Zelllinie eine mit den in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierten Verbindungen vergleichbare Wirkstärke auf. Durch den Austausch eines Protons gegen ein Fluoratom erfolgt lediglich eine geringe Änderung des Van-der-Waals-Radius von 1.20 Å des Protons zu 1.47 Å des Fluorsubstituenten, so dass eine optimale Bindung und "Stapelung" an die DNA weiterhin möglich ist. Die Planarität der phenylendiaminüberbrückten Verbindungen **(140)** und **(141)** kann auch bei einer Bindung von der Seite der "Basis"-Aromaten her als Vorteil für ein 1:1-Bindungsverhältnis angesehen werden.

Als dritte Möglichkeit der Annäherung der Komplexe an die DNA ist eine seitliche Orientierung denkbar. Um eine Wechselwirkung des Eisenzentralatoms mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen zu ermöglichen, müssten auch bei dieser Orientierung die "Brücken"-Aromaten partiell in die DNA-Basenstapel eindringen können. In dieser Orientierung würde eine Methoxygruppe in 5-Position der "Basis"-Aromaten die größte sterische Hinderung bedeuten. Bei der *in vitro* Zytotoxizitätstestung an der MCF7-Zelllinie zeigten jedoch gerade die in 5-Position methoxysubstituierten Verbindungen eine wesentlich größere zytotoxische Aktivität als die in 3oder 4-Position substituierten Verbindungen. Besonders störend für eine seitliche Annäherung der Komplexe an die DNA wären auch 3'- und 2'-Substitutionen der "Brücken"-Aromaten. Im Widerspruch dazu steht die Steigerung der zytotoxischen Wirksamkeit der Eisen(diarylsalen)-Komplexe, die durch eine Verschiebung der Methoxy- oder Fluorsubstituenten von der 4'-Position der "Brücken"-Aromaten in die 3'bzw. 2'-Position erreicht wurde. Damit ist diese seitliche Bindungsorientierung der Eisenkomplexe eher unwahrscheinlich.

Für die Wirksamkeit der Komplexe ist offensichtlich Planarität, zumindest aber eine planare Teilstruktur, von entscheidender Bedeutung. Die Hydrierung der Azomethindoppelbindung (Komplex **(147)** und **(148m)**) führt auch nach Komplexierung des Eisenzentralatoms zu einer nicht-planaren Raumstruktur des Liganden.^[161, 52] Infolgedessen kommt es offensichtlich auch zu einer geringeren Akkumulation der Verbindung in den Tumorzellen. Der hydrierte Eisen(III)salen-Komplex **(147)** wird nur noch halb so stark in den Zellen angereichert wie der [Fe^{III}salen]CI-Komplex **(85)**.

Durch die Erweiterung der Ethanbrücke der Salenstruktur um eine CH₂-Einheit zu einer 1,3-Diaminopropan-Teilstruktur ([Fe^{II}propyl] **(142)**) erhält das Molekül ebenfalls eine höhere Flexibilität. Die durch die weniger planare Struktur der Komplexe erfolgende sterische Behinderung bei der Ausbildung einer parallelen Anordnung bei Bindung der Eisenzentralatome an die Phosphatreste der DNA ist leicht vorstellbar. Die beiden hydrierten Komplexe (**(147)** und **(148m)**) besitzen ebenso wie der [Fe^{II}propyl]-Komplex **(142)** in den untersuchten Konzentrationen keine antiproliferativen Wirkungen.

Die genaue Bindungsorientierung bei der Wechselwirkung der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit der DNA lässt sich endgültig nur mit einer Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmen, die aber weiterführenden Arbeiten überlassen werden muss. Weitere DNA-Bindungsstudien mit Hilfe der AAS sind allerdings Gegenstand derzeitiger Arbeiten.

9.2 Erläuterungen zur DNA-Spaltung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe

9.2.1 DNA-Gelelektrophorese der Eisen(diarylsalen)-Komplexe ohne Hydroxysubstitution der "Basis"-Aromaten

Die synthetisierten Eisen(II)- und Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe ohne Hydroxysubstitution der "Basis"-Aromaten können Plasmid-DNA in Konzentrationen ab 10 μ M ohne Zusatz eines aktivierenden Agens (z.B. Dithiothreitol) spalten. Die Wirksamkeit der Komplexe kann durch Zugabe eines Reduktionsmittels wesentlich verstärkt werden. Dabei konnten bei Zusatz von Dithiothreitol schon in geringen Komplexkonzentrationen (0.1 μ M bei *m*[Fe^{II}4'OCH₃] (97m)) multiple DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. Ausgangspunkt der Fenton-Reaktion sind Fe²⁺-Ionen, die in einer Reaktion mit H₂O₂ das hochreaktive OH⁻-Radikal bilden. Somit scheint es leicht erklärbar, dass der Eisen(II)-Komplex *m*[Fe^{III}4'OCH₃] (97m) in dem DNA-Spaltungs-Assay wirksamer ist als der Eisen(III)-Komplex *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m). Durch Reduktionsmittelzusatz kann eine Regeneration der in der Fenton-Reaktion verbrauchten Eisen(II)-Spezies erreicht werden, so dass dadurch eine vermehrte DNA-Spaltung auftritt.

FeCl₃ ist auch bei Zusatz eines Reduktionsmittels im Gegensatz zu dem Eisen(III)-Komplex *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl **(104m)** nicht in der Lage multiple Plasmid-DNA-Strangbrüche hervorzurufen. Die Komplexierung von Fe³⁺ an den Azomethinliganden bewirkt damit eine deutliche Änderung der DNA-Spaltungsaktivität. Obwohl für die komplexierten Verbindungen in Kapitel 8.2 eine geringere Hydroxyl-Radikalbildung gefunden wurde, zeigten zumindest die Eisen(III)-Komplexe in den Gelelektrophoresen eine höhere Aktivität als FeCl₃. Diese lässt eine spezifische Wechselwirkung der Eisenkomplexe mit der DNA vermuten, die nicht allein auf Redoxprozessen beruht.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Eisenzentralatom zu, da der Cobalt(II)-Komplex m[Co^{II}4'OCH₃] **(149m)** ebenfalls keine multiplen DNA-Strangbrüche erzeugen kann.

9.2.2 DNA-Gelelektrophorese der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Hydroxysubstitution der "Basis"-Aromaten

Im Gegensatz zu den in den "Basis"-Aromaten unsubstituierten Komplexen führen 3und 5-hydroxysubstituierte Verbindungen (**(105m)** und **(107m)**) bereits ab einer Konzentration von 1 µM selbständig (also ohne Zusatz eines regenerierenden Agens) zu DNA-Strangbrüchen. Der in 4-Position hydroxysubstituierte Komplex **(106m)** kann ohne Zusatz eines Reduktionsmittels in den getesteten Konzentrationen in einem nur sehr geringen Ausmaß Plasmid-DNA-Strangbrüche hervorrufen.

Offensichtlich kommt es zu einer Wechselwirkung des Hydrochinonsystems des Liganden mit dem Fe²⁺/Fe³⁺-Redoxsystem. Für Mn^{II}(hydroxysalen)-Komplexe und Cu^{II}(hydroxysalen)-Komplexe wurde dieser Effekt bereits untersucht.^[216, 217] Dabei ist mit Hilfe von ESR-Studien die Produktion von Radikalen belegt worden.

Für die Kupferkomplexe werden von Lamour *et al.* zwei Hauptreaktionswege vorgeschlagen (siehe Abbildung 9.6). Der erste Reaktionsweg beinhaltet die direkte Aktivierung des Chinonsystems. Durch diese Aktivierung kommt es zur Bildung eines Semichinons und damit zur Entstehung von O₂⁻⁻-Radikalen. Die dabei gebildete Cu^{II}- Chinon⁻-Spezies geht dann in eine korrespondierende Cu^{III}-Chinon⁻-Form über. In einem zweiten möglichen Reaktionsweg entsteht zunächst ein Sauerstoff-Cu^{II}- Komplex, der in ein Superoxo-Cu^{III}-Intermediat übergeht und dabei Superoxid-Anionen bildet. Die Bildung der Cu^{III}-Spezies ist dabei direkt an das Vorhandensein der Hydroxygruppen in 3- bzw. 5-Position geknüpft, die den σ-Donor-Effekt der Hydroxygruppen, die das Metall-Atom komplexieren, verstärken.^[217] Die DNA-Spaltung ohne Zusatz eines reduzierenden Agens durch Eisen(III)(hydroxydiarylsalen)-Komplexe (**(105m)** und **(107m)**) kann nach einem analogen Reaktionsschema erfolgen. Prinzipiell ist aber auch eine Bildung höher oxidierter Ferryl-Spezies möglich.

9.2.3 Mögliche Bildung eines reaktiven Zwischenprodukts

Es gibt sehr unterschiedliche Möglichkeiten, mit denen Metallkomplexe mit der DNA in Wechselwirkung treten können. Platinkomplexe wie Cisplatin bauen bevorzugt – ebenso wie [Ni^{II}salen]-Komplexe – direkte Metallbindungen zum N7-Atom von Guanin auf. Allerdings können Nickelkomplexe über die Bildung von Superoxid-Intermediaten ebenso eine oxidative Spaltung der DNA katalysieren.^[149, 150, 218]



Abbildung 9.6: Möglicher Mechanismus der ROS-Produktion durch Cu^{ll}(hydroxysalen)-Komplexe nach [217]

Für [Ru^{III}salen]⁺-Komplexe konnte in Anwesenheit von H₂O₂ eine Spaltung der DNA über die Bildung von Metall-Hydroperoxid-Spezies (Ru-OOH) und Oxoruthenium(IV)-Spezies nachgewiesen werden.^[153] Die DNA-Spaltung durch [Mn^{III}salen]⁺-Komplexe kommt ebenfalls durch die Bildung aktivierter Intermediate, wie z.B. [O=Mn^Vsalen]⁺-Kationen, zustande. Dabei stellen diese Intermediate ein A·T-spezifisches DNAdar.^[45, 136, 142, 219] Spaltungsreagenz Kupfer-1,10-Phenanthrolin-Bindungsund Komplexe greifen die Desoxyriboseeinheiten der DNA über aktivierte Kupfer-Oxo-Intermediate an^[139, 167], und von Chrom(salen)-Komplexen ist die Bildung von Oxo-Intermediaten für die selektive Oxidation organischer Sulfide ebenfalls bekannt.^[220] Eisenionen sind in lebenden Organismen als generelle Elektronenüberträger in biologischen Oxidations- und Reduktionsprozessen Bestandteil einer Vielzahl elektronenübertragender Proteine und als wesentlicher Bestandteil von Hämoglobin für den Sauerstofftransport im Blut mit verantwortlich. Während im Hämoglobin Sauerstoff in Form von O₂ lediglich reversibel zum Zweck des Transports gebunden wird, kommt es bei den Elektronenübertragungsprozessen der Cytochrom-P450-Isoenzyme und der Katalasen zur Bildung reaktiver Zwischenstufen.

Als Monooxygenase ist Cytochrom P450 in der Lage, molekularen Sauerstoff zu spalten, wobei ein Sauerstoffatom in ein Substrat eingeführt wird und das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Die charakteristische prosthetische Gruppe dieser Isoenzyme ist das Eisen-Protoporphyrin(IX)-Chromophor, das im Ruhezustand als Eisen(III)-low-spin-Komplex vorliegt. Die aktive Form des Eisenkomplexes wird im Allgemeinen als Ferryl-Sauerstoff-Komplex [FeO]³⁺ oder als Fe^V=O bzw. Fe^{IV}=O/Porphyrin-Radikal-Kation formuliert. Allerdings konnten diese Zwischenstufen bisher nicht direkt beobachtet werden. Sie sind lediglich aus spektroskopischen Daten und theoretischen Berechnungen abgeleitet worden.^[221-223] Für Katalasen und Peroxidasen, die auch eine Häm-Grundstruktur aufweisen, werden ebenfalls Ferryl-Komplexe als aktive Zwischenstufen beschrieben, bei denen das Eisenzentral-Ion formal in der Oxidationsstufe +5 vorliegt.^[178, 223, 224]

Vielfach untersucht wurde ebenso die Aktivierung des Glykopeptidantibiotikums Bleomycin in Gegenwart von Fe^{II} und O₂ und die nachfolgende DNA-Spaltung. Dabei ist die genaue Struktur des aktivierten Eisen-Bleomycin-Komplexes noch Gegenstand aktueller Diskussionen. Bisher am besten charakterisiert ist der initial gebildete Eisen-Superoxid-Komplex ('O₂⁻-Fe^{III}-Bleomycin). Das bisher letzte charakterisierte Zwischenprodukt im Reaktionszyklus der Aktivierung von Fe^{II}-Bleomycin durch Sauerstoff ist der Eisen-Hydroperoxid-Komplex (HOO-Fe^{III}-Bleomycin). Dieses "aktivierte Bleomycin" kann spontan über Hetero- oder Homolyse der O–O-Bindung zerfallen und monooxygeniertes Eisen-Bleomycin bilden, das als O=Fe^V-Bleomycin oder O=Fe^{IV}-Bleomycin das eigentlich oxidierende Agens darstellt.^[15, 225-227]

Generell ist neben diesem P450-ähnlichen Weg auch ein Fenton-analoger Reaktionsablauf denkbar, bei dem aus einer Reaktion des Fe^{III}-Bleomycin-Komplexes mit H₂O₂ direkt Hydroxyl-Radikale gebildet werden. Allerdings sprechen Untersuchungen, bei denen eine Ineffizienz von Radikalfängern belegt wurde, hauptsächlich für die Bildung von Oxo-Eisen-Bleomycin-Komplexen und damit für den P450-Weg.^[204, 228]

Anhand der in Kapitel 8 beschriebenen Entfärbungsreaktion von *p*-Nitrosodimethylanilin konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe in einer Fenton-analogen Reaktion Hydroxyl-Radikale bilden können. Da Hydroxyl-Radikale sehr reaktiv sind, reagieren sie in unmittelbarer Nähe ihres Entstehungsortes ab. Durch die Bindung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an die Phosphatbrücken der DNA wird diese zum Hauptschädigungsort der entstehenden Hydroxyl-Radikale. Prinzipiell ist aber auch für die Eisen(diarylsalen)-Komplexe die Bildung reaktiver Fe^{IV}und Fe^V-Oxospezies möglich, die auch für andere Eisenkomplexe angenommen werden.^[224, 229] Die Stabilisierung dieser reaktiven Zwischenstufe kann durch den Liganden beeinflusst werden. Es ist leicht vorstellbar, dass elektronenziehende Substituenten das gebildete Oxo-Intermediat eher destabilisieren und damit für eine höhere Reaktivität sorgen, während Substituenten, die eher Elektronen in das System schieben können, es auf diese Weise stabilisieren, so dass Zwischenstufen mit einer geringeren Reaktivität gebildet werden. Der Einfluss der Substituenten auf die elektrochemischen Eigenschaften von Metallsalen-Komplexen ist bisher für Nickel(II)-, Kupfer(II)-, Mangan(III)- und auch für Eisen(III)-Komplexe belegt worden.^[224, 230-232]

Insgesamt zeigten die untersuchten Eisenkomplexe eine geringere Entfärbung einer *p*-Nitrosodimethylanilin-Lösung als eine Eisen(II)-acetat und damit eine geringere Hydroxyl-Radikalproduktion in dem Eisen/H₂O₂-System. Die Reaktivität der Verbindungen im Sinne einer Fenton-Reaktion wird durch die Komplexierung offensichtlich abgeschwächt. Eine mögliche Erklärung dafür ist neben der Veränderung der Redoxeigenschaften auch die starke Sauerstoffempfindlichkeit der synthetisierten Komplexe. Die oxidierende Wirkung in wässrigen Lösungen wird durch die pH-abhängige Bildung eines dimeren [Fe(salen)]₂O-Derivats limitiert.^[50, 52, 224, 233, 234]

Da nur 4'-methoxy- und 4'-fluorsubstituierte Komplexe näher untersucht wurden, ließ sich der Einfluss der Ligandenstruktur auf die Hydroxyl-Radikalentstehung nicht eindeutig klären. Es konnte lediglich eine leicht geringere Entfärbung der PNDA-Lösung und damit eine etwas geringere Hydroxyl-Radikalproduktion für die methoxy-substituierten Komplexe im Vergleich zu den 4'-Fluoranaloga bestimmt werden. Dieser geringe Unterschied kann wohl kaum für die starken Wirkungsunterschiede der Verbindungen im Zytotoxizitätsassay (siehe Kapitel 4.2 und 4.3) verantwortlich gemacht werden.

Durch die Entfärbungsreaktion der PNDA-Lösung konnte zwar die Produktion von Hydroxyl-Radikalen belegt werden. Ob diese ROS für die Spaltung der DNA aber letztendlich verantwortlich sind, konnte mit dieser Reaktion natürlich nicht geklärt werden. Für die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe sind für die DNA-Spaltung prinzipiell – wie für Bleomycin auch – beide Wege, die Hydroxyl-Radikalproduktion und ein P450-analoger Weg über höher oxidierte Ferryl-Spezies, denkbar.

9.3 Apoptoseauslösung

Die meisten anti-neoplastischen Agenzien, deren Hauptangriffspunkt die DNA darstellt (z.B. Cisplatin, 5-Fluoruracil und Etoposid, aber auch γ - und UV-Strahlungen), induzieren Apoptose über die tumorsupressive Wirkung von *p*53. Als Folge sind diese Antitumorwirkstoffe an *p*53 Wildtyp-Zellen wesentlich wirksamer als an *p*53-mutierten Tumorzellen.^[114, 116, 235] Für Cisplatin wurde beispielsweise von Vekris *et al.* in einer ausgedehnten Literatursuche die enge Verknüpfung der zytotoxischen Wirkung an die Funktionsfähigkeit der *p*53-Reaktionskaskade an 60 Krebszelllinien des *National Cancer Institutes* (NCI) belegt.^[25, 236]

Die bessere Wirksamkeit etablierter Zytostatika an p53-positiven Tumorzelllinien wurde im Prinzip auch durch Ott mit Hilfe einer Bestimmung von IC₅₀-Werten an den beiden Brustkrebszelllinien MCF7 und MDA-MB-231 gefunden (siehe Tabelle 9.1).^[31] Die MCF7-Brustkrebszelllinie besitzt einen p53-Wildtypstatus, während MDA-MB-231-Zellen hemmende Mutationen am p53-Gen aufweisen und dazu kaum p53 exprimieren können.

Verbindung	MCF7 (µM)	MDA-MB-231 (μM)
Cisplatin	2.0 (± 0.3)	4.0 (± 1.5)
Tamoxifen	2.3 (± 0.4)	10.6 (± 0.3)
5-Fluorouracil	4.8 (± 0.6)	9.6 (± 0.3)
Co-Ass ¹	1.4 (± 0.3)	1.9 (± 0.3)

Tabelle 9.1:IC₅₀-Werte etablierter Zytostatika und Co-Ass¹ nach [31]

Im Vergleich mit etablierten Zytostatika, deren IC₅₀-Werte in demselben Testsystem bestimmt wurden, weisen die neu synthetisierten *meso*-Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MCF7-Zelllinie eine schwächere Wirkung auf. Für die *d,l*-konfigurierten Eisenverbindungen wurden dagegen IC₅₀-Werten gefunden, die mit denen der etablierten Zytostatika durchaus vergleichbar sind. An der MDA-MB-231-Zelllinie zeigten die Eisen(diarylsalen)-Komplexe deutlich geringere IC₅₀-Werte als die etablierten Zytostatika. Z.T. besaßen die synthetisierten Eisenkomplexe mit IC₅₀-Werten um 0.1 µM einen 100-fach geringeren IC₅₀-Wert als beispielsweise 5-Fluorouracil.

¹ Hexacarbonyl[2-propyn-1-ylacetylsalicylat]dicobalt

Dass Eisenkomplexe eine derart hohe Antitumorwirksamkeit an MDA-MB-231-Zellen besitzen, ist bisher noch nicht beschrieben worden. In der Regel wurde auch für Metallkomplexe (z.B. Co-Ass Tabelle 9.1) eine geringere Zytotoxizität an MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu den MCF7-Brustkrebszellen gefunden.^[31, 35] Der Grund für diese starke zytotoxische Wirkung ist wahrscheinlich – gerade bei Berücksichtigung einer geringeren Aufnahme in MDA-MB-231-Zellen (siehe Kapitel 5, insbesondere die Abschnitte 5.2.3.1 und 5.2.3.3) – in den molekularbiologischen Voraussetzungen der Tumorzelllinie zu finden.

Der Hauptangriffspunkt der nach DNA-Spaltung ausgelösten *p*53-proteingesteuerten Apoptosekaskade sind die mitochondrialen Membranen. Es kommt zu einem Zusammenbruch des inneren Membranpotentials, einer Unterbrechung des Elektronentransports und zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, so dass Cytochrom C, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) und Endonuklease G aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) und der Procaspase-9 sogenannte Apoptosomen, die die am Ende der Reaktionskaskade stehende Caspase-3 aktivieren können. Caspase-3 bewirkt seinerseits die Aktivierung von Nukleasen, die dann zu den typischen Chromatinkondensationen und -fragmentierungen apoptotischer Zellen führen.^[186, 237]

Apoptose ist jedoch kein einheitlicher Prozess. Er ist abhängig vom Zelltyp und vom auslösenden Agens.^[238] Krebszellen haben meist Defekte in den klassischen Apoptosesignalwegen. Dennoch haben sie die Fähigkeit zum programmierten Zelltod (*programmed cell death*, PCD) nicht völlig verloren. Treten z.B. Defekte in den Caspase-Signalwegen auf, werden Caspase unabhängige Signalwege dominant.^[239]

Neben den "klassischen" Formen der Nekrose und Apoptose gibt es außerdem verschiedenste Zwischenformen, z.B. caspaseabhängige bzw. -unabhängige PCDs, apoptoseähnliche oder nekroseähnliche PCDs, Paraptosis, Anoikis, Onkosis und Autophagie.^[238]

Gerade für Metallionen und Metallkomplexe wurden die ausgelösten Reaktionskaskaden vielfach untersucht. Dabei wurde u.a. gefunden, dass Mn²⁺-Ionen Apoptose in HeLa-Zellen ohne Beteiligung der Mitochondrien induzieren.^[240] HeLa-Zellen weisen zwar einen *p*53wt auf, können das Protein aber lediglich gering exprimieren.^[241] Für Mn²⁺-ausgelöste Apoptose in NIH3T3-Zellen fand dieselbe Arbeitsgruppe hauptsächlich eine Caspase-12-Aktivierung.^[242] Strand *et al.* konnten zeigen, dass Kupfer-Ionen (250 µM) in Hepatom-Zellen Apoptose CD95 (APO-1/Fas) vermittelt auslösen, während der PCD, der in NIH3T3-Zellen durch As³⁺ und Cd²⁺ausgelöst wird, offensichtlich über eine Caspase-3-Aktivierung erfolgt.^[243] Del Rio *et al.* schrieben Hydroxyl-Radikalen eine zentrale Rolle in der durch Metalle ausgelösten Reaktionskaskade zu und fanden für Cr(III)-Ionen einen *p*53- und NF-κBunabhängigen Reaktionsablauf.^[186] In Lymphozytenkulturen wurde hingegen eine Cr^{III}vermittelte Aktivierung von Tyrosinkinasen und nachfolgender Caspase-3-Aktivierung entdeckt.^[118] Zusammengenommen können Metallionen und Metallkomplexe in Krebszellen verschiedenste apoptoseauslösende Mechanismen aktivieren. Dabei nehmen ROS in dem durch Metallkomplexen-vermittelten Zelltod eine zentrale Rolle ein.

Intrazellulär gebildete ROS sind generell für verschiedene Signalsysteme von Bedeutung. Der wichtigste Faktor ist dabei die Dosis des Redox-Signals. Zellen, die mit moderaten Mengen an ROS behandelt werden, zeigen einen *p*53-vermittelten Arrest des Zell-Zyklus. Sehr geringe Dosen induzieren einen mitogenen Effekt, d.h. die Zellproliferation wird stimuliert. Hohe Radikalkonzentrationen bewirken eine Änderung der Art des Zelltods von der Apoptose hin zu nekrotischen Prozessen.^[113, 244]

Bei den synthetisierten Eisen(hydroxysalen)- und Eisen(hydroxydiarylsalen)-Komplexen (z.B. bei [Fe^{II}(5OH) salen] **(84)**, *m*[Fe^{II}(3OH) 4'OCH₃] **(98m)** und *m*[Fe^{III}(5OH) 4'OCH₃]Cl **(107m)**) konnte in geringeren Testkonzentrationen von 1 und 5 μ M bei den Zytotoxizitätstestungen an MCF7-Zellen häufig der beschriebene proliferationsfördernde Effekt beobachtet werden. Wenn Zellen mit ROS stimuliert werden, laufen dieselben Signalwege ab, die auch bei der Aktivierung von Wachstumsfaktoren stattfinden. H₂O₂ aktiviert z.B. den EGF-Rezeptor, MAPKs, Protein Kinase C und andere Kinasen.^[244] Normalerweise resultiert aus der Aktivierung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen über eine Stimulation der MAPKs eine Förderung der Zellproliferation.^[244]

MDA-MB-231-Zellen haben einen besonders hoch exprimierten EGF-Rezeptor.^[245] Interessanterweise ist bei dieser Zelllinie eine Zellproliferationshemmung und eine Induktion der Apoptose über die Aktivierung des EGF-Rezeptors beschrieben worden.^[244] Der Mechanismus der EGF-induzierten Apoptose ist allerdings bisher kaum charakterisiert. Die starke Empfindlichkeit der MDA-MB-231-Zelllinie für die zytotoxischen Wirkungen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe könnte auch über eine ROS-stimulierte Aktivierung der EGF-Rezeptoren erklärt werden.

Neben der Aktivierung von Wachstumsfaktoren ist für ROS eine *down-regulation* der anti-apoptotisch wirksamen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L bekannt. Bcl-2 und Bcl-x_L sind negative Regulatoren der Apoptose. Sie schützen Zellen vor einem PCD. Die Inhibition der beiden Proteine ist eigentlich als ein Schutzmechanismus vor durch ROS-ausgelöste Schäden anzusehen.^[244] Diese ROS-vermittelte *down-regulation* könnte ebenfalls für die hohe Empfindlichkeit der MDA-MB-231-Zellen verantwortlich sein.

Zur endgültigen Klärung der Ursachen der unerwartet hohen zytotoxischen Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an MDA-MB-231-Zellen müssten sich allerdings weitere molekularbiologische Untersuchungen anschließen.

Im Allgemeinen bieten schnell proliferierende Zellen Zytostatika mehr Ansatzpunkte, in den Zellzyklus einzugreifen. Dennoch scheinen die ermittelten zytotoxischen Effekte nicht von der Verdopplungszeit der Zellen abhängig zu sein. Für die HeLa-Zelllinie wurde mit 13.5 Stunden zwar die geringste Generationszeit ermittelt, dennoch ist die Wirkung der Komplexe eher vergleichbar mit der wesentlich langsamer proliferierenden MCF7-Zelllinie (Verdopplungszeit rund 32 Stunden).

Besonders interessant ist auch die hohe strukturelle Abhängigkeit der Apoptoseeffekte, die an den beiden Leukämiezelllinien LAMA84 und BV173 gefunden wurden (siehe Kapitel 6.3). Neben phenylendiaminüberbrückten Eisen(III)-Komplex dem [Fe^{III}salophen]Cl (141) konnten lediglich die *d*,*l*-konfigurierten Komplexe d,/[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104d,I) und d,/[Fe^{III}4'F]Cl (122d,I) Apoptose auslösen. Diese Tatsache lässt wiederum spezifische Ansatzpunkte in der Apoptosekaskade vermuten.

Einen weiteren Anhaltspunkt für einen spezifischen Eingriff in spezielle Reaktionsabläufe liefert auch die zeitabhängige Zytotoxizitätstestung. Der Kurvenverlauf der Tests wies eine deutliche Abhängigkeit von der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur der Eisenkomplexe auf. *D,I*-konfigurierte Verbindungen zeigten häufig erst zu einem späten Zeitpunkt des Zytotoxizitätstests (nach etwa 5 bis 6 Tagen) einen sehr nachhaltigen zytoziden Effekt (siehe Abbildung 4.6, Kapitel 4.2.1.3). Die Zellen erholten sich nicht mehr. Im Gegensatz dazu wurde die maximale Wirkung der *meso*-konfigurierten Verbindungen bereits am ersten Abstoppzeitpunkt (nach etwa 3 Tagen) erhalten. Die zytotoxischen Wirkungen der *meso*-Verbindungen waren dabei bei fast allen getesteten Komplexen reversibel.

Die deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf der Zytotoxizitätstests der *meso-* bzw. *d,I-*konfigurierten Verbindungen deuten – wie oben erwähnt – besonders unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Apoptosetestung an den Leukämiezelllinien auf einen offensichtlich stereospezifischen Eingriff der Verbindungen in spezielle Reaktionskaskaden hin.

Die genauere Untersuchung dieser spezifischen Angriffspunkte kann mittels Westernblotanalytik unter Verwendung spezieller Antikörper erfolgen. Sie ist derzeit – ebenso wie die Bestimmung des genauen Bindungsmodus der Eisenkomplexe an die DNA (Abschnitt 9.1.3) – Gegenstand weiterführender Arbeiten.