

10 Zusammenfassung

10 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und biologische Testung potentiell anti-tumorwirksamer Eisen(diarylsalen)-Komplexe, deren zytotoxische Wirkung auf einer Bindung an die Phosphatbrücken der DNA und nachfolgender DNA-Spaltung durch ROS beruhen könnte.

Ausgehend von der Eisen(salen)-Grundstruktur (Salen = 1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien) sollte der Austausch der Ethanbrücke des Salens durch eine 1,2-Diarylethan-Teilstruktur eine Steigerung der Zytotoxizität bewirken. Analog zu dem bei Platinkomplexen bereits erfolgreich entwickelten Carrier-Konzept sollte die Diarylethan-Partialstruktur dabei die Funktion eines Carriers übernehmen und damit eine höhere Akkumulation der Eisenkomplexe in den Tumorzellen ermöglichen. So wurden neuartige Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe mit der allgemeinen Grundstruktur [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahexa-1,5-dien]eisen(II) bzw. [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-diaryl-2,5-diazahexa-1,5-dien]eisen(III)-chlorid synthetisiert.

Die Darstellung dieser Verbindungen gelang über die Koordinierung vierzähniger Diarylsalenliganden an ein Fe²⁺- bzw. Fe³⁺-Zentralatom. Die verwendeten tetraarylsubstituierten, doppelten Aldiminliganden wurden durch Kondensation von *meso*- bzw. *d,l*-konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen mit unterschiedlich substituierten 2-Hydroxybenzaldehyden erhalten. Die als Synthesevorstufen benötigten *meso*-konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-diarylethane wurden mit Hilfe der Diaza-Cope-Umlagerung bei Temperaturen < 120 °C stereoselektiv dargestellt. Die Isolierung der *d,l*-konfigurierten diastereomeren Diamine erfolgte unter Ausnutzung der zumindest teilweise eintretenden Stereoisomerisierung der 2,2'-Diaza-[3.3]-sigmatropen-Umlagerung bei Temperaturen oberhalb von 120 °C.

Um den Einfluss der Ligandenstruktur auf die zytotoxische Wirksamkeit der synthetisierten Eisenkomplexe näher untersuchen zu können, wurden Liganden mit unterschiedlichen Substitutionsmustern dargestellt. Dazu wurden diverse Substituenten in verschiedene Positionen der Aromaten der 1,2-Diarylethan-„Brücke“ (OCH₃, F, OH, OCOCH₃, CF₃, Cl, N(CH₃)₂, NO₂) bzw. in die „Basis“-Aromaten des Salengrundgerüsts (OCH₃, OH) eingeführt. Als weitere Strukturmodifikationen wurden Variationen am Azomethingrundgerüst vorgenommen (z.B. Hydrierung der Azomethindoppelbindung, Einführung einer Phenylendiamin-Teilstruktur).

Mit Hilfe von *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays wurde anschließend die Antitumorwirkung der dargestellten Verbindungen an sechs verschiedenen Tumorzelllinien (MCF7, MDA-MB-231, HeLa, LNCaP/FGC, LAMA84 und K562) überprüft, wobei eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden konnten. Es zeigte sich, dass zum einen die Oxidationsstufe des Eisenzentralatoms der Komplexe einen bedeutenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Verbindungen hatte. Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe besaßen an allen Zelllinien eine wesentlich stärkere Wirksamkeit als ihre Eisen(II)-Analoga. Zum anderen konnte eine Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung der getesteten Verbindungen von der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur gefunden werden. Je nach Zelllinie und Art der Substituenten hatten *d,l*-konfigurierte Verbindungen häufig höhere zelltoxische Wirkungen als ihre *meso*-konfigurierten Diastereomere.

Weiterhin konnte ein Einfluss der Art und der Position der Substituenten der „Brücken“- wie auch der „Basis“-Aromaten auf die zytotoxische Wirksamkeit der Verbindungen gesehen werden. Beispielsweise waren in den „Brücken“-Aromaten fluorsubstituierte Verbindungen aktiver als methoxysubstituierte Komplexe und Eisenverbindungen mit Substituenten in 3'- oder 2'-Position der „Brücken“-Aromaten häufig wirksamer als Komplexe mit Substituenten in 4'-Position. Die Einführung von Hydroxy- oder Methoxy-substituenten in die „Basis“-Aromaten des Salengrundgerüsts führte generell zu einer Wirkungsabschwächung.

Als wirksamste Verbindungen wurden in den Zytotoxizitäts-Assays neben den in den „Brücken“-Aromaten unsubstituierten Verbindungen *m/d,l*[Fe^{II}DPS] (**89m**) bzw. (**89d,l**), *m/d,l*[Fe^{III}DPS]Cl (**90m**) bzw. (**90d,l**) und den difluorsubstituierten Eisen(diarylsalen)-Komplexen (z.B. *m*[Fe^{III}2',4'F]Cl (**126m**) und *d,l*[Fe^{III}2',6'F]Cl (**128d,l**)) die überbrückten Verbindungen [Fe^{II}salophen] (**140**) und [Fe^{III}salophen]Cl (**141**) erkannt, deren Gesamt-molekül durch die Einführung einer Phenylendiamin-Teilstruktur eine wesentlich größere Planarität und Rigidität im Vergleich zu den Diarylsalen-Verbindungen aufweist.

Besonders auffällig war die herausragende zytotoxische Wirksamkeit der Eisen(diarylsalene) an der MDA-MB-231-Zelllinie. Die synthetisierten Komplexe zeigten bereits ab einer Konzentration von 0.1 bis 0.5 µM stark zytotide Effekte. Derart hohe zelltoxische Wirkungen von Metallkomplexen an dieser Brustkrebszelllinie sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Durch Zellaufnahmestudien, die unter Verwendung atomabsorptionsspektroskopischer Methoden durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen antiproliferativen Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe nicht allein durch eine selektive Aufnahme bedingt sind.

Trotz der größeren zytotoxischen Aktivität wurden Eisen(III)-Komplexe im Vergleich zu ihren Eisen(II)-Analoga in einem geringeren Ausmaß in den Tumorzellen akkumuliert. Für die wesentlich wirksameren *d,l*-konfigurierten Komplexe wurden ebenfalls erheblich geringere intrazelluläre Konzentrationen gefunden als für ihre *meso*-Diastereomere. Besonders erstaunlich ist die starke zytotoxische Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an MDA-MB-231-Zellen, obwohl die Verbindungen im Vergleich zur MCF7-Zelllinie nur etwa halb so stark in den Zellen angereichert werden.

Die hohe zelltoxische Wirkung der Komplexe bei einer geringeren intrazellulären Konzentration lässt einen generellen zytotoxischen Effekt der synthetisierten Eisenkomplexe, so wie er z.B. durch eine unselektive Hydroxyl-Radikalproduktion verursacht werden würde, unwahrscheinlich werden. Vielmehr rücken strukturabhängige Angriffspunkte innerhalb spezifischer Reaktionskaskaden der Zellen in den Mittelpunkt.

Die streng konzentrationsabhängige Akkumulation der Komplexe in den Zellen und die zunächst lineare Aufnahmekinetik deuten auf passive Diffusion als Hauptaufnahmemechanismus hin. Eine erleichterte Carrier-vermittelte Diffusion durch die Diarylethan-Partialstruktur konnte nicht gefunden werden. Vielmehr spricht die geringere zytotoxische Aktivität der $[Fe^{II/III}salen]$ -Komplexe bei vergleichbarer intrazellulärer Konzentration ebenfalls für spezifische, strukturabhängige Angriffspunkte innerhalb der Zellen.

Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden konnten die apoptoseauslösenden Eigenschaften der Eisenkomplexe belegt werden. Durch Anfärben von COS7-Zellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) wurden nach Inkubation der Zellen mit $[Fe^{III}salophen]Cl$ (**141**) für Apoptosevorgänge charakteristische morphologische Strukturen gefunden. Bei dem Nachweis von Einzelstrang-DNA (ssDNA) zeigten der $[Fe^{III}salophen]Cl$ -Komplex (**141**) und die *d,l*-konfigurierten Verbindungen $d,l/[Fe^{III}4'OC_6H_4Cl]Cl$ (**104d,I**) und $d,l/[Fe^{III}4'F]Cl$ (**122d,I**) im Gegensatz zu ihren *meso*-Analoga ebenfalls eine Auslösung apoptotischer Effekte an zwei Leukämiezelllinien.

Die zytotoxische Aktivität und die apoptoseauslösenden Eigenschaften der Komplexe waren Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Wechselwirkungen der Verbindungen mit der DNA. Durch die Aufnahme von DNA-Schmelzpunktkurven konnte gezeigt werden, dass die Eisenkomplexe an die DNA binden und diese dadurch gegen denaturierende Einflüsse stabilisieren. Mittels gelelektrophoretischer Untersuchungen konnte die DNA-Spaltungsaktivität der Verbindungen nachgewiesen werden. Für Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit chinoider Teilstruktur wurde dabei eine „selbstaktivierende“ Nukleasewirkung gefunden.

Die DNA-spaltende Wirkung der Komplexe könnte auf einer Fenton-analogen Hydroxyl-Radikalproduktion beruhen, die auch durch die Entfärbung von *p*-Nitroso-dimethylanilinlösungen nachgewiesen werden konnte. Letztendlich konnte aber nicht geklärt werden, ob wirklich die Hydroxyl-Radikale für die DNA-Spaltung und damit für die zytotoxischen und apoptoseauslösenden Effekte verantwortlich gemacht werden können. Denkbar wäre auch eine Bildung aktiver Oxo-Intermediate, wie sie für die DNA-Spaltung durch Bleomycin z.T. beschrieben werden.

Insgesamt bietet diese Arbeit eine gute Grundlage für weiterführende Forschungsarbeiten. Von besonderem Interesse sollten dabei die endgültige Klärung der herausragenden zytotoxischen Wirkungen an der MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie, die genaue Analytik der Apoptosevorgänge und die weitere Untersuchung der DNA-Bindung der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe (z.B. mit Röntgenkristallstrukturanalysen und atomabsorptionsspektroskopischen Methoden) sein.

