

**Chromatographische, NMR-spektroskopische
und massenspektrometrische Untersuchungen
der Reaktionen von
histidin- und methioninhaltigen Peptiden
mit $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Markus Hahn

Bochum 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Oktober 2000 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum erstellt.

Herrn Prof. Dr. W. S. Sheldrick danke ich für die interessante Themenstellung, sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und den mir gewährten Freiraum bei der Erstellung dieser Arbeit.

Tag der Disputation: 12.12.2000

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. C. Wöll

Referent: Prof. Dr. W. S. Sheldrick

Korreferent: Prof. Dr. M. Feigel

Prüfer: Prof. Dr. C. Wöll

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cisplatin-Analoga	2
1.2	Reaktionsmechanismus von Cisplatin	4
1.3	Konkurrierende S-Donor Liganden.....	8
2	Problemstellung	9
3	Kenntnisstand	11
3.1	Reaktionsverhalten von Pt(dien), Pt(en) und Cisplatin.....	11
3.2	Komplexverbindungen des Pt(en) mit met- und his-haltigen Peptiden	15
3.3	Komplexverbindungen des Cisplatins mit met- und his-haltigen Peptiden.....	17
3.4	Das Migrationsverhalten des Pt(dien).....	19
3.5	Koordination von <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂] und [Pt(en)(H ₂ O) ₂] ²⁺ mit 5'-GMP und Proteinen	23
3.6	Pt(II) und Pd(II) induzierte hydrolytische Spaltung der Peptidbindung.....	25
3.7	Chromatographische Untersuchungen	28
4	Peptid- und Strukturdaten	32
4.1	¹ H-NMR spektroskopische Daten.....	32
4.2	Die Struktur von Proteinen und Peptiden	34
5	Reaktionen von [Pt(dien)(H₂O)]²⁺	40
5.1	Chromatographisches System	40
5.2	Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala) ₃ metNHPH.....	43
5.2.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	44
5.2.2	Kinetische Untersuchungen	45
5.3	Charakterisierung der Komplexe	51
5.4	Diskussion.....	57
6	Reaktionen von [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺	62
6.1	Umsetzungen mit dem Tetrapeptid achis(ala) ₂ metNHPH	62
6.1.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	63
6.1.2	Kinetische Untersuchungen	64

6.2	Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala) ₃ metNHPh.....	66
6.2.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	67
6.2.2	Kinetische Untersuchungen.....	68
6.3	Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala) ₃ metH.....	71
6.3.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	71
6.3.2	Kinetische Untersuchungen.....	72
6.4	Umsetzungen mit dem Pentapeptid acmet(ala) ₃ metH.....	75
6.4.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	76
6.4.2	Kinetische Untersuchungen.....	76
6.5	Charakterisierung der Komplexe.....	79
6.5.1	Das System [Pt(en)(H ₂ O) ₂] ²⁺ / achis(ala) ₂ metNHPh.....	79
6.5.2	Das System [Pt(en)(H ₂ O) ₂] ²⁺ / achis(ala) ₃ metNHPh.....	82
6.5.3	Das System [Pt(en)(H ₂ O) ₂] ²⁺ / acmet(ala) ₃ metH.....	87
6.6	Diskussion.....	91
7	Reaktionen von <i>cis</i>-[PtCl₂(NH₃)₂]	94
7.1	Umsetzungen mit dem Tripeptid hisglymetH.....	94
7.1.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	95
7.1.2	Kinetische Untersuchungen.....	96
7.2	Umsetzungen mit achisglymetH.....	103
7.2.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	104
7.2.2	Kinetische Untersuchungen.....	105
7.3	Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala) ₃ metH.....	109
7.3.1	pH-abhängige Produktverteilung.....	110
7.3.2	Kinetische Untersuchungen.....	111
7.4	Charakterisierung der Komplexe.....	113
7.4.1	Das System <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂] / hisglymetH.....	113
7.4.2	Das System <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂] / achisglymetH.....	122
7.4.3	Das System <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂] / achis(ala) ₃ metH.....	128
7.5	Diskussion.....	134
8	Reaktionsvergleich zwischen [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ und <i>cis</i>-[PtCl₂(NH₃)₂]	139
9	Zusammenfassung	143

10	Experimenteller Teil	151
10.1	Darstellung der Ausgangsverbindungen	151
10.1.1	Darstellung von [PtI(dien)]I.....	151
10.1.2	Darstellung von [PtCl ₂ (en)]	152
10.1.2	Darstellung von <i>cis</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ NH ₃) ₂].....	153
10.2	Darstellung der Aqua-Komplexe	154
10.3	Darstellung der Reaktionslösungen	155
10.3.1	Reaktionslösungen für die Chromatographie	155
10.3.2	Reaktionslösungen für die semi-präparativen Ansätze.....	155
10.3.3	Mikroansätze.....	156
10.4	Chromatographisches System	156
10.4.1	Chromatographische Bedingungen.....	156
10.4.2	Chromatographische Säulen	158
10.4.3	Verwendete Chromatographen	159
10.5	NMR-Spektroskopie	160
10.6	Massenspektroskopie	160
10.7	IR-Spektroskopie	161
10.8	CD-Spektroskopie.....	161
10.9	Sonstiges	161
11	Literaturverzeichnis	163

Abkürzungen

5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
hisglymetH	N-Histidylglycylmethionin
achisglymetH	N-Acetylhistidylglycylmethionin
achis(ala) ₃ metH	N-Acetylhistidyltrialanylmethionin
achis(ala) ₂ metNHPH	N-Acetylhistidylodialanylmethionylphenylamin
achis(ala) ₃ metNHPH	N-Acetylhistidyltrialanylmethionylphenylamin
acmet(ala) ₃ metH	N-Acetylmethionyltrialanylmethionin
Cisplatin	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)
Carboplatin	<i>cis</i> -Diammin(1,1-dicarboxylato-cyclo-butan)platin(II)
d	Dublett
dd	Dublett von Dubletts
dien / Pt(dien)	Diethylentriamin, N-(2-Aminoethyl)ethan-1,2-diamin
en / Pt(en)	Ethylendiamin, Ethan-1,2-diamin
Glutathion	γ -Glutamylcystylglycin
HFB	Heptafluorbuttersäure, Perfluorbuttersäure
HMG	High Mobility Group
IPR	Ionenpaarreagenz
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
PFP	Pentafluorpropionsäure, Perfluorpropionsäure
RP	reversed-phase
RPIPC	reversed-phase Ionenpaarchromatographie
s	Singulett
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SGH	S-Guanosyl-L-homocystein
t	Tripllett
TFA	Trifluoressigsäure
TSP	Natrium-3-(trimethylsilyl)tetradeuteropropionat

Allgemeine Erläuterungen

Bei Angaben zu den stöchiometrischen Verhältnissen (1:1, 2:1; 1:2) nimmt die erstgenannte Zahl immer Bezug auf den entsprechenden Metall-Komplex. Die nachfolgende Ziffer steht für das Stoffmengenverhältnis der eingesetzten Peptide bezüglich der Metall-Spezies.

Die in dieser Arbeit angegebenen Prozente zur Eluentenzusammensetzung sind stets als Volumenprozent ($\% v / \% v$) zu verstehen. Bei der Auflistung der Eluentenzusammensetzung wird im allgemeinen auf die Angabe von $\% \text{H}_2\text{O}$ verzichtet.

Im Text angegebene pD-Werte sind für den Isotopeneffekt des Deuteriums unkorrigiert, d.h. , dass $\text{pH} = \text{pD}$ gesetzt wird.

1 Einleitung

Metallionen spielen bei biologischen und biomedizinischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die essentiellen anorganischen Elemente besitzen eine große Vielfalt von spezifischen Lebensfunktionen im Körper des Menschen. So kann zum Beispiel Zn^{2+} die Proteinstruktur durch Cysteinkoordination stabilisieren (sogenannte Zinkfingerproteine) und das Eisenion besitzt die biologische Funktion der Speicherung und des Transportes von Sauerstoff und ist im Hämoglobin an die Imidazolseitenketten des Histidins gebunden [1].

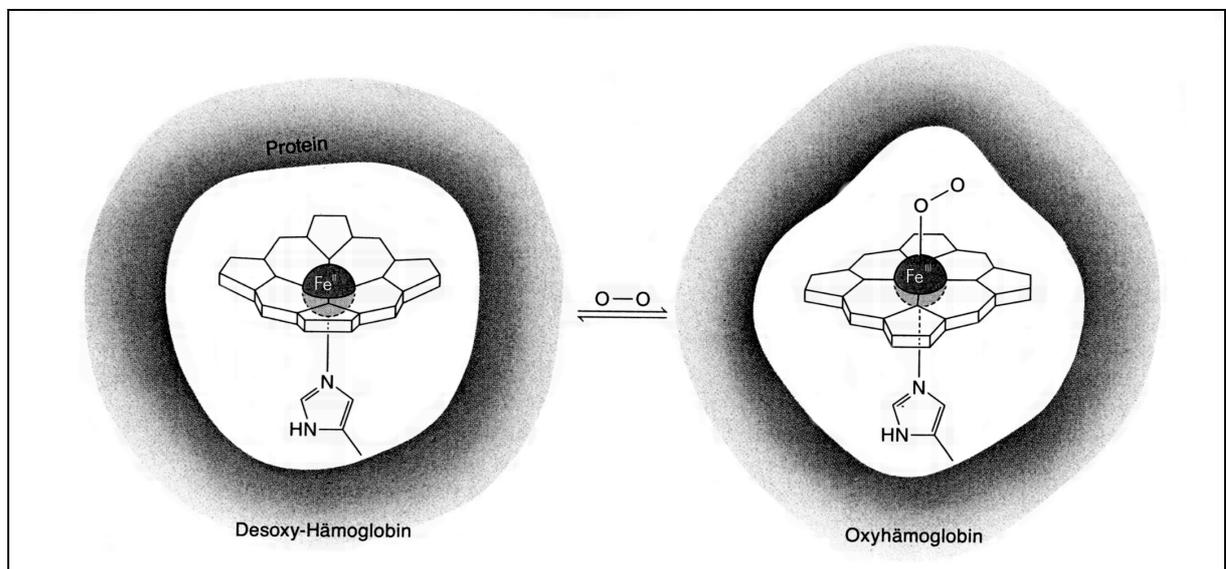


Abb. 1.1.: Funktionelle Einheit des Hämoglobins für Speicherung und Transport von O_2

Metalle können auch als Sonden für radiodiagnostische Untersuchungen eingesetzt werden und dienen schon seit Jahrhunderten als Medikamente. Im Einsatz befinden sich zur Zeit z. B. das Goldpräparat Aurofin, das oral verabreicht der Behandlung rheumatoider Arthritis dient und das radiotherapeutisch als Kontrastmittel genutzte $[\text{Tc}(\text{CNR})_6]^+$ [2, 3, 4]. Das wichtigste Antitumorreagenz ist *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (Cisplatin), das zur Behandlung von Tumoren intravenös injiziert wird. Diese einfach aufgebaute anorganische Komplexverbindung wurde bereits im Jahre 1844 von PEYRON synthetisiert [5]. Die tumorhemmende Wirkung von Cisplatin wurde erst 1965 von ROSENBERG bei Untersuchungen der Zellteilung von *Escherichia coli* unter Einfluss eines elektrischen Feldes festgestellt [6]. Er beobachtete bis zu

300 fach größeres Filamentwachstum der Bakterien in den Zellkulturen, ohne das eine Zellteilung zu beobachten war. Die Überprüfung der Versuchsbedingungen (Platinelektroden, ammoniumchloridhaltiges Nährmedium, Sonnenlicht) erklärte letztendlich die elektrolytische Bildung des *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂]. Weitere experimentelle Studien ließen darauf schließen, das im biologischen Milieu eine Reduktion zu Platin(II)-Verbindungen möglich ist. Schon im Jahre 1969 erschien die erste Veröffentlichung über den tumorhemmenden Effekt des Cisplatins bei Mäusen [7]. Die klinischen Versuchsreihen begannen im Jahr 1971 und schon 7 Jahre später bekam das Medikament die Zulassung durch die FDA und ist bis heute eines der drei meistverkauftesten Antitumorarzneimittel auf der gesamten Welt mit einem Jahresumsatz von 1 Mrd. DM [8]. Durch das breite Aktivitätsspektrum können eine Vielzahl von festen Tumoren bei Menschen, wie urogenitale, gynäkologische sowie Kopf, Hals und Nackentumore mit Cisplatin behandelt werden. In über 90 % der Fälle überleben heutzutage Patienten mit Hodenkrebs durch die Wirkung von Cisplatin [9]. Jedoch existieren auch zahlreiche Nebenwirkungen z. B. die Dosis limitierende Nephrotoxizität. Die typischen den Patienten verabreichten Dosen liegen bei 100 mg/Tag für einen Zeitraum von 5 Tagen [10].

1.1 Cisplatin-Analoga

Um unerwünschten Nebeneffekte zu vermeiden und die Wirksamkeit zu erhöhen wurden mehr als 3000 verschiedene Cisplatin-Analoga synthetisiert, von denen nur Carboplatin in die klinische Anwendung kam [11, 12]. Carboplatin besitzt eine deutlich höhere Löslichkeit und aufgrund seiner verlangsamten Reaktion eine geringe Toxizität und kann in bis zu 2000 mg Dosen verabreicht werden [10]. Nachteilig ist die Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin, wodurch es nur für die gleichen Tumorerkrankungen eingesetzt werden kann. Die Erforschung neuer Analoga sollte zu einer verbesserten therapeutische Breite, erhöhter Tumorspezifität, einer höheren Löslichkeit und zur Verabreichung in oraler Form führen [13, 14]. Auf der Suche nach verbesserten Platin-Antitumor-Medikamenten wurde z. B. das in Abb. 1.2 gezeigte AMD 473 entwickelt. Es ist seit 1997 in klinischen Studien, oral und intravenös verabreichbar und gegen Zelllinien mit Cisplatin-Resistenz aktiv. Die sterische Hinderung durch die 2-Methylgruppe führt zu einer geringeren Reaktivität und induziert eine langsame Vernetzung der Doppelstrang DNA [15, 16].

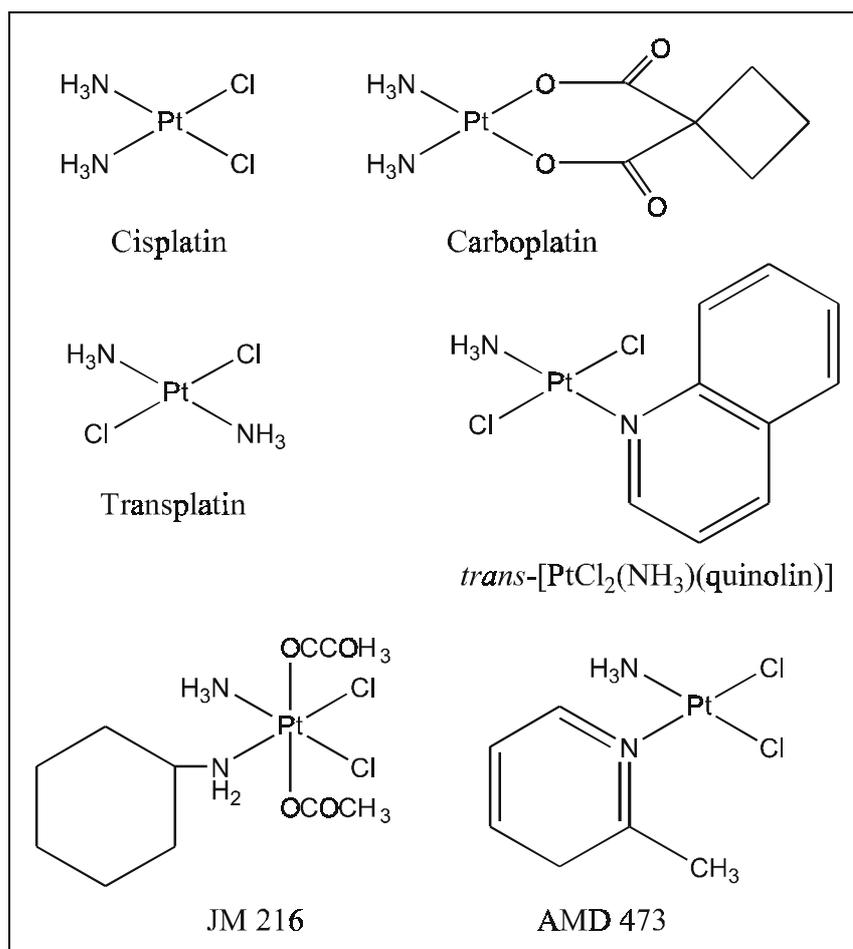


Abb. 1.2.: Antitumorwirksame Platinkomplexe

Interessant ist auch der oral wirksame Platinkomplex JM 216, der sich gegenwärtig in Phase III klinischer Untersuchungen befindet [17]. Dabei handelt es sich um eine Pt(IV)-Verbindung, die im menschlichen Plasma z.B. durch Glutathion oder Ascorbat zu Pt(II)-Komplexen reduziert wird und keine Resistenz gegenüber Cisplatin oder Carboplatin zeigt [18]. Weitere Cisplatin-Analoga besitzen z. B. über Linker gebundene Kohlenhydrate oder können photosensitive Pt(IV)-Iodkomplexe sein, die selektiv durch Licht aktivierbar sind und dadurch geringere Nebenwirkungen als klassische Chemotherapeutika besitzen [19-21]. Obwohl *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂] (Transplatin) therapeutisch inaktiv ist [22], zeigen neuste klinische Studien von *trans*-[PtCl₂(NH₃)(quinolin)] die Bildung von bis zu 30 % interstrand crosslink DNA-Produkt zwischen zwei Guaninen. Der mit Sicherheit von Cisplatin verschiedene Wirkungsmechanismus könnte somit die Cisplatinresistenz umgehen [23-25].

1.2 Reaktionsmechanismus von Cisplatin

Der genaue Reaktionsweg von Cisplatin zur DNA ist immer noch unbekannt. Nach der intravenösen Injektion bleibt *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] aufgrund der hohen Chloridkonzentration von 100 mM im Blutplasma in der Ausgangskoordination erhalten. Nach dem aktiven oder passiven Transport durch die Zellmembran in das Cytoplasma tritt dort wegen der geringeren [Cl⁻]-Konzentration von 4 mM die Hydrolyse ein [26].

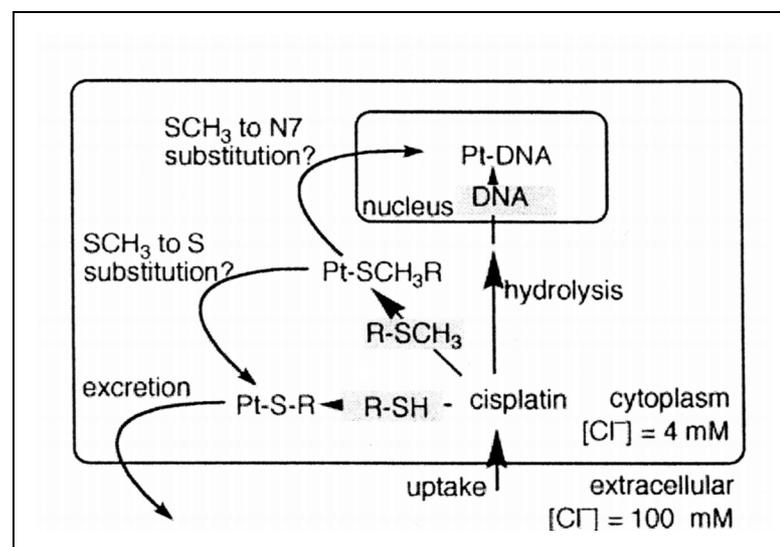


Abb. 1.3.: Möglicher Reaktionsweg von Cisplatin in der Zelle [27]

Als Hydrolyseprodukte entstehen sowohl zuerst das *cis*-[PtCl(OH₂)(NH₃)₂], als auch nach einiger Zeit die von CHOTTARD et al. für die Platinierung an der DNA vermutete *cis*-[PtCl₂(OH₂)₂]-Spezies [28]. Die in Abb. 1.3 als Zwischenprodukte vorhandenen schwefelkoordinierten Komplexe werden im Abschnitt 1.3 näher erläutert. Das Ziel von Cisplatin ist die DNA im Zellkern. Dort wird bei physiologischem pH-Wert bevorzugt der N7 Stickstoff der Nukleobase Guanin koordiniert.

Die verschiedenen Möglichkeiten der Adduktbildung sind in Abb. 1.4 zu sehen. Die resultierenden Hauptprodukte bestehen aus der chelatartigen Verknüpfung zweier benachbarter Guaninbasen (*in vivo* 65 %) und dem Guanin-Adenin-Addukt (*in vivo* 25 %) [29, 30].

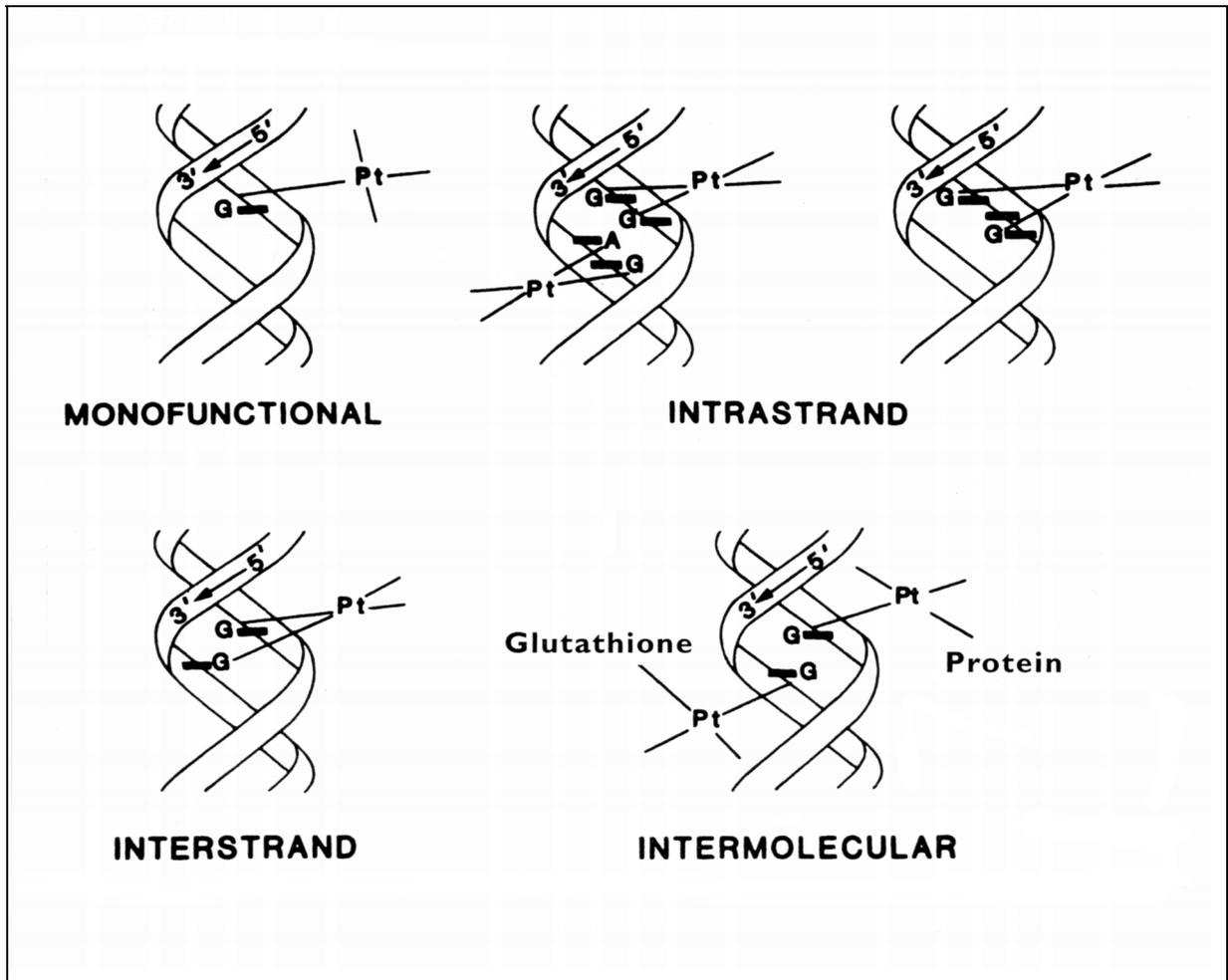


Abb. 1.4.: Strukturen verschiedener Cisplatin-DNA-Addukte [31]

Die Struktur des 1,2-d(GpG) intrastrand crosslink Adduktes mit der Doppelstrang DNA ist in Abb. 1.5 (B) dargestellt und wurde sowohl durch Röntgenstrukturanalyse [32, 33], als auch in Lösung durch NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt [34-36]. Cisplatin bindet in der großen Furche der DNA und führt zu einer Abknickung von 26 – 50° zwischen den einbezogenen Guaninbasen [37].

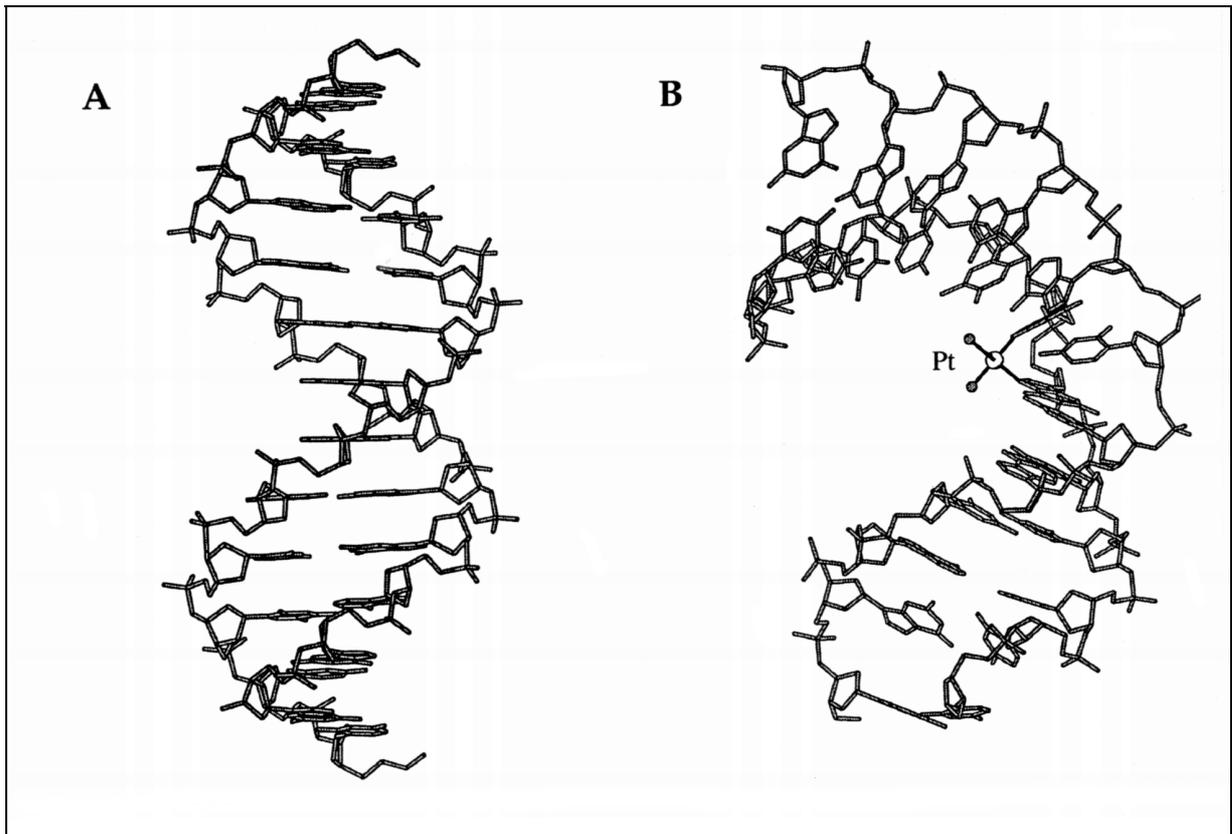


Abb. 1.5.: Veränderung der großen Furche in der DNA durch Bildung des 1,2-d(GpG)-Cisplatin intrastrand Addukt mit der Sequenz $d(\text{CCTCTG}^*\text{G}^*\text{GTCTCC})$

Diese platinierter DNA-Läsion in den Tumorzellen wird durch einen Reparaturmechanismus von sogenannten „High Mobility Group“ (HMG)-Proteinen geschützt. Das Protein HMG1 besitzt drei Strukturdomänen, wobei A und B positiv geladen sind und die dritte aus dreißig sauren Aminosäureresten am C-Terminus besteht. Die Bindung von HMG erhöht die Verbiegung der platinierter DNA bis auf 90° [38]. LIPPARD et al. konnten die Struktur eines Komplexes der A-Domäne von HMG1 mit einem aus 16 Basenpaaren bestehenden DNA-Fragmentes, das eine Cisplatin-DNA-1,2-d(GpG)-Intrastrand-Vernetzung enthält, mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmen [39]. Die genaue Funktion der HMG-Proteine ist noch unbekannt und es werden in der Literatur drei mögliche Modelle diskutiert.

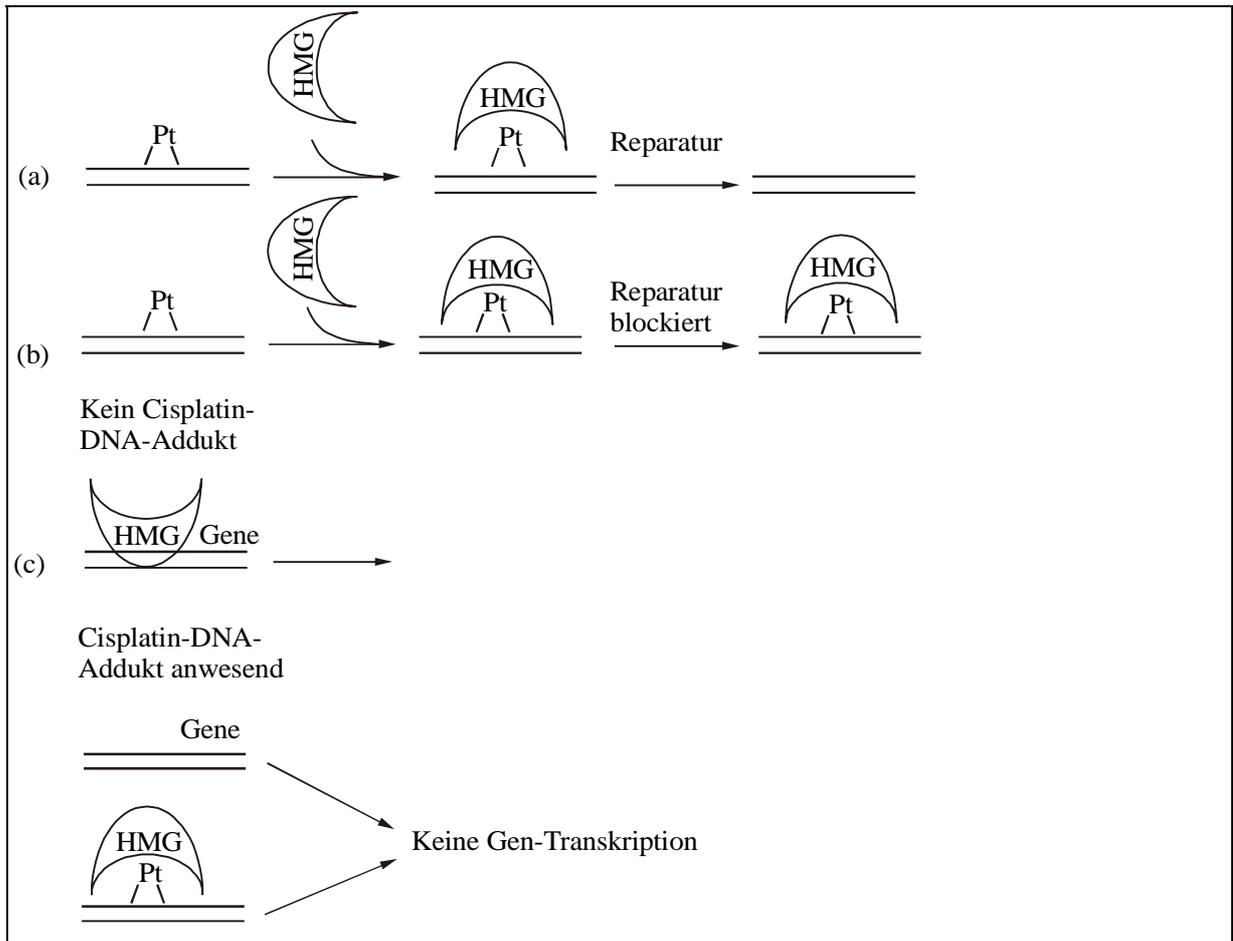


Abb. 1.6.: Vorschläge zum Mechanismus der Veränderung der Gen-Funktion durch Bindung von HMG Proteinen an Ciplatin-modifizierte DNA [40]

Zuerst wurde davon ausgegangen, dass die Proteine zur Erkennung der reparaturbedürftigen DNA-Stelle dienen. Im Augenblick liegt jedoch die Vermutung näher, dass entweder durch die HMG-Adduktbildung der Reparaturweg blockiert wird oder ein HMG-Protein an die Pt-DNA-Läsion bindet und somit nicht mehr für seine natürliche Funktion vorhanden ist. Deutlich erkennbar wird die wichtige Rolle dieser HMG-Proteine in Bezug auf den Wirkungsmechanismus von Cisplatin.

1.3 Konkurrierende S-Donor Liganden

Auf dem Weg zur DNA im Zellkern können Platinkomplexe mit einer Vielzahl von methionin-, cystein- und histidinhaltigen Biomolekülen wechselwirken. Die hohe Affinität des Platin(II) zu der „weichen“ Thiolat- oder Thioethergruppe begünstigt eine solche Komplexbildung. Diese konnte durch den im Urin von Krebspatienten nachgewiesenen Methioninkomplex der Form $[\text{Pt}(\text{metH-}\kappa^2\text{-S,N})_2]^{2+}$ bestätigt werden [41]. Die toxischen Nebenwirkungen von Cisplatin werden in Verbindung mit dessen Wechselwirkung zu Biomolekülen gesehen und es wird versucht diese durch sogenannte *rescue agents* zu kontrollieren [42, 43]. So werden z. B. Natriumdithiocarbamat, Thioharnstoff oder auch Thiosulfat eingesetzt, um Verbindungen von Cisplatin mit Glutathion wieder frei zusetzen [44-46]. In Studien von SADLER et al. bindet Platin(II) übergangsweise an Methionin und erhält darausfolgend das an den N7-Stickstoff des 5'GMP gebundene Endprodukt [47]. Im Wirkungsmechanismus kann auch GSH eine entscheidende Rolle spielen, denn es substituiert an GSMe gebundenes $\text{Pt}(\text{dien})^{2+}$ und kann somit als relativ stabiles Produkt aus der Zelle ausgeschieden werden [27]. Die deutlich verlangsamte Reaktion von Thiolen gegenüber Thiolaten lässt sich in der Literatur bestätigen [48]. Durch Kombination von Cisplatin mit Methionin konnte in vielen Fällen eine geringere Toxizität festgestellt werden, die z. B. gegen Hörverlust oder Haarausfall nach der Chemotherapie schützen kann [49, 50].

Ein erst vor kurzem erschienener Artikel verdeutlicht die Toxizitätsminderung von Cisplatin mit Methionin. Die dort als entscheidend dargestellte Rolle des Strukturelementes $\text{R-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2)_2\text{-S-R}$ für die Blockierung des Cisplatin-Transportmechanismus soll auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden [51].

2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis der Wechselwirkung von Platin(II)-Verbindungen mit Peptiden zu verbessern, um den Reaktionsmechanismus und die Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums Cisplatin zu erklären. Auf dem Weg nach der Injektion bis zur DNA im Zellkern sind die Thioethergruppe des Methionins und die Imidazolgruppe des Histidins in Peptiden und Proteinen potentielle Ankergruppen für das „weiche“ Pt(II)-Atom. Zur Untersuchung der intramolekularen Konkurrenz von Histidin- und Methioninseitenketten um die Pt(II)-Bindung werden das N-terminal ungeschützte Tripeptid hisglymetH, die N-acetylgeschützten Tetra- und Pentapeptide achisglymetH, achis(ala)₃metH und die zusätzlich auch C-terminal geschützten Tetra- und Pentapeptide achis(ala)₂metNHPh und achis(ala)₃metNHPh eingesetzt. Als Metallfragmente werden *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] und vergleichsweise auch dessen bifunktionale Modellverbindung [Pt(en)(H₂O)₂](NO₃)₂ verwendet. Die Erfassung möglicher Koordinationsstellen und die Klärung einer potentiellen intramolekularen Migration in den Peptiden soll durch das monodentat bindende [Pt(dien)(H₂O)](NO₃)₂-Fragment erfolgen. Zur Analyse der komplexen Reaktionsgemische wird die HPLC *reversed phase* Ionenpaarchromatographie mit Perfluorcarbonsäuren verwendet, die sowohl für die analytische, als auch für die semi-präparative Trennung aller Produkte, Zwischenprodukte und Edukte geeignet ist.

Die systematische chromatographische Untersuchung ermöglicht die folgende Vorgehensweise:

- Bestimmung der thermodynamisch begünstigten Reaktionsprodukte.
Hierzu werden pH-abhängige Produktverteilungskurven (Reaktionszeit 3 Wochen bei T = 40° C) erstellt. Die entstehenden Hauptprodukte können dann mittels semi-präparativem Ansätzen bei entsprechenden pH-Werten isoliert und spektroskopisch charakterisiert werden.
- Verfolgung der zeitabhängigen Reaktionsverläufe bei variierender Ansatzstöchiometrie und pH-Werten zur Klärung möglicher Zwischenprodukte und für Aufschlüsse über den Reaktionsweg.

Die aus den Versuchsreihen gewonnenen Ergebnisse sollen zur Beantwortung der folgenden Fragen dienen:

- 1.) Ist eine bei Di- und Tripeptiden beobachtete S → N1 Migration auch bei Tetra- und Pentapeptiden möglich, deren funktionelle Seitenketten durch zwei oder drei Alanineinheiten voneinander getrennt sind ?
- 2.) Welche kinetisch bzw. thermodynamisch begünstigte Produkte bilden sich mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin und ist eine Vergleichbarkeit mit der bisher häufig verwendeten Modellverbindung $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ erkennbar ?
- 3.) Spielt eine Spaltung, wie z.B. die von KOSTIC beobachtete von Peptidbindungen in den Umsetzungen mit Cisplatin eine Rolle ?

Die Antworten auf diese Fragen sollen zur Klärung der Rolle von Cisplatin in Reaktionen mit histidin- und methioninhaltigen Peptidseitenketten beitragen und noch bestehende Lücken im Wirkungsmechanismus des Chemotherapeutikums schließen.

3 Kenntnisstand

3.1 Reaktionsverhalten von Pt(dien), Pt(en) und Cisplatin

In dieser Arbeit werden die Wechselwirkungen der Modellverbindung $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und des Chemotherapeutikums *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ mit methionin- und histidinhaltenen Peptiden verglichen.

Der zweizählige Ethylendiaminligand geht aufgrund seiner zusätzliche Stabilisierung durch den Chelateffekt in der Regel keine unerwünschten Nebenreaktionen ein und so können die Untersuchungen von $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ zu einer vereinfachten Strukturaufklärung der Platin-Peptidprodukte dienen. Für Migrationsstudien ist der Einsatz des $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ -Metallfragmentes von Bedeutung, da hierbei nur eine monodentate Koordination durch den dreizähligen Diethylentriamin Liganden ermöglicht wird.

Bei *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ dagegen kann durch die Koordination an schwefelhaltige Liganden eine Schwächung der trans-ständigen Pt(dien)-Stickstoffbindung eintreten und zu einer Abspaltung der NH_3 -Gruppe führen [48]. Abspaltungen von en sind nur selten bei Zugabe eines besonders stabilen Chelatbildners im sauren pH-Bereich zu beobachten [52-54]. Cystein kann mit Pt(dien)-Verbindungen zu einer Abspaltung des dien-Liganden in 1:2 Ansätzen im neutralen pH-Bereich nach 10 Tagen führen [55].

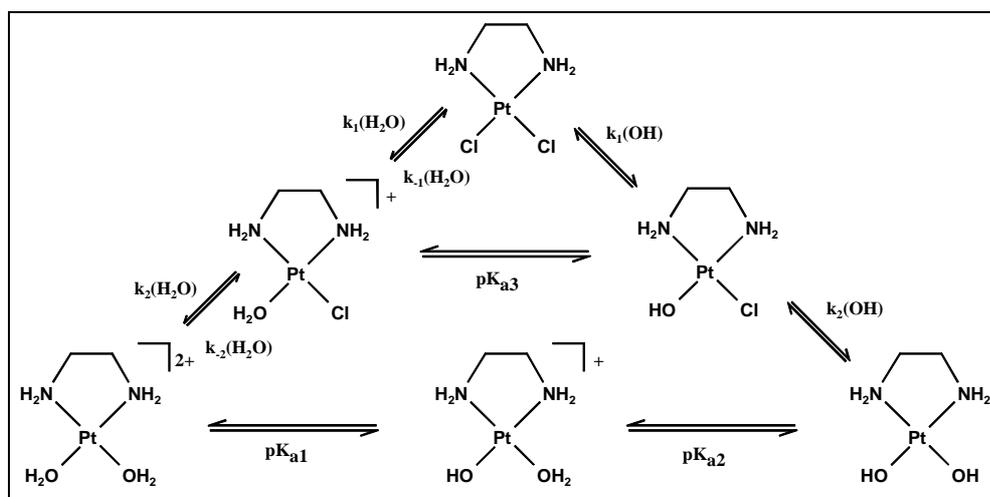


Abb. 3.1: Hauptspezies der Hydrolyse von $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$

Die beiden Pt-Modellverbindungen werden als Aquakomplexe eingesetzt, da die H₂O-Gruppen aufgrund ihrer Labilität sofort durch die Donorgruppen der Peptide ersetzt werden können, während die Chloroliganden von Cisplatin nur langsam ausgetauscht werden und eine schlechte Löslichkeit hervorrufen. Das komplexe Hydrolyseschema von [Pt(Cl)₂(en)] in Abb. 3.1 wird durch die Verwendung der Aquakomplexe auf die unteren drei Spezies reduziert. Im Basischen kann es zur Ausbildung wenig reaktiver hydroxoverbrückter Oligomere kommen [56, 57].

Tab. 3.1: Säurekonstanten und Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstanten von [PtCl₂(en)]

pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	k ₁ (H ₂ O) [s ⁻¹]	k ₋₁ (H ₂ O) [s ⁻¹ M ⁻¹]	k ₋₂ (H ₂ O) [s ⁻¹]	k ₂ (H ₂ O) [s ⁻¹ M ⁻¹]	k ₋₁₂ (OH) [s ⁻¹]	k ₋₂ (OH) [s ⁻¹]	
5,8	7,6	7,4	11·10 ⁻⁵	4,0·10 ⁻²	7,3·10 ⁻⁵	5,2·10 ⁻¹	7,2·10 ⁻⁵	8,6·10 ⁻⁵	
I = 0,2 M (KNO ₃) T = 23°C [58]			I = 0,318 M (NaClO ₄) T = 35°C [59]				I = 0,1 M (NaOH) T = 34°C [60]		

Die Vergleichbarkeit der Modellverbindungen sollte gegeben sein, da Untersuchungen von BEDARSKI und TRÜMBACH keine unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten für die verschiedenen Aminliganden in [PtCl₂(1,2-diaryl-en)], [Pt(Cl)₂(en)] und [Pt(Cl)(dien)] ergaben [61]. Das von HOUSE aufgestellte allgemeine Hydrolyseschema von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] bei T = 25° C in Abb. 3.2 wurde photometrisch bestimmt [62].

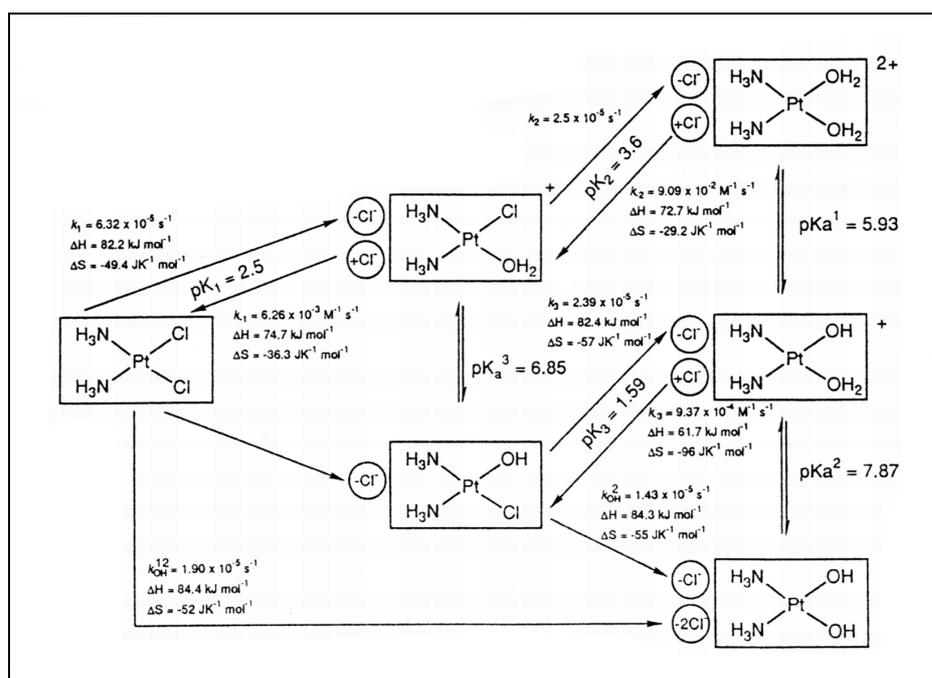


Abb. 3.2: Hydrolyseschema von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] bei T = 25° C

Die Konstanten k_1 und k_2 der beiden Hydrolysenritte bestätigen die Vergleichbarkeit der Werte mit denen von MARTIN aus Tab. 3.1.

Da im Blutplasma eine 100 mM und in den Zellen nur eine 4 mM Chloridkonzentration vorherrscht sind Untersuchungen von wässrigen Cisplatinlösungen mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen für den Wirkungsmechanismus von Interesse. Aus diesem Grund wurde die in Abb. 3.3 dargestellte pH-abhängige Verteilung der Hydrolyseprodukte von Cisplatin mit $[Cl] = 4 \text{ mM}$ und einer Temperatur von 37° C nach 1 Woche Reaktionszeit durch analytische HPLC erstellt.

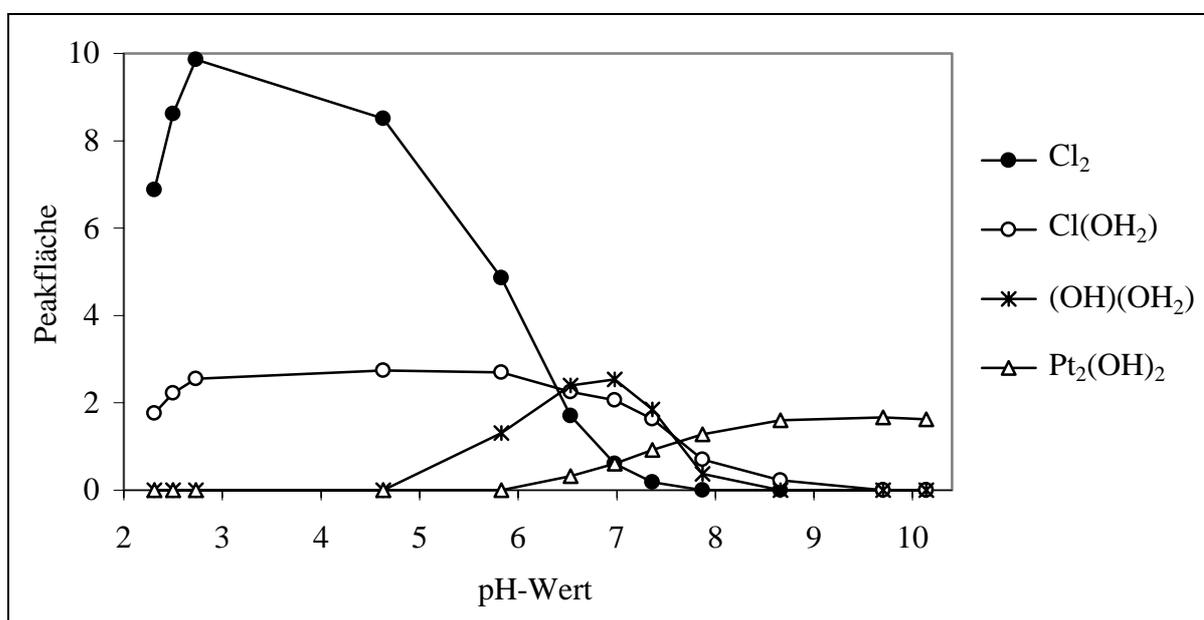


Abb. 3.3: pH-abhängige Verteilung von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit $[Cl] = 4 \text{ mM}$

Im sauren Medium liegt das Ausgangsprodukt Cisplatin im Verhältnis von 4:1 gegenüber dem Hydrolyseprodukt $[PtCl(NH_3)_2(OH_2)]$ vor. Ab $pH > 7,8$ dominiert das $[Pt_2(NH_3)_4(OH)_2]$ -Dimer, das sich aus dem $[Pt(NH_3)_2(OH)_2]$ -Komplex bildet und nahezu inert ist. Diese Spezies konnte durch ein ^{195}Pt -Spektrum bei $pH = 10,3$ mit einem Verschiebungswert von -1589 ppm bestätigt werden und ist nahezu identisch mit dem in der Literatur zu findenden Wert von -1588 ppm [63]. Im interessanten physiologischen pH-Bereich sind hauptsächlich die beiden Hydrolyseprodukte $[PtCl(NH_3)(OH_2)]$ und $[Pt(NH_3)_2(OH)(OH_2)]$ zu finden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von MARTIN, der zudem die in Abb. 3.4 gezeigte Auftragung der Hydrolysenprodukte bei $pH = 7$ mit variierendem Chloridgehalt der Lösung untersuchte [64]. Bei $[Cl] = 100 \text{ mM}$ liegt hauptsächlich Cisplatin vor und bei dieser hohen

Chloridkonzentration durchgeführte kinetische Untersuchungen mit verschiedenen Peptiden dieser Arbeit bestätigen, dass eine Reaktion unter diesen Bedingungen nicht stattfindet. Durch vergleichende Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl zeitabhängige-, als auch pH-abhängige Produktverteilungen dieser Arbeit mit $[Cl^-] = 0$ mM sich nicht von denen mit $[Cl^-] = 4$ mM unterscheiden.

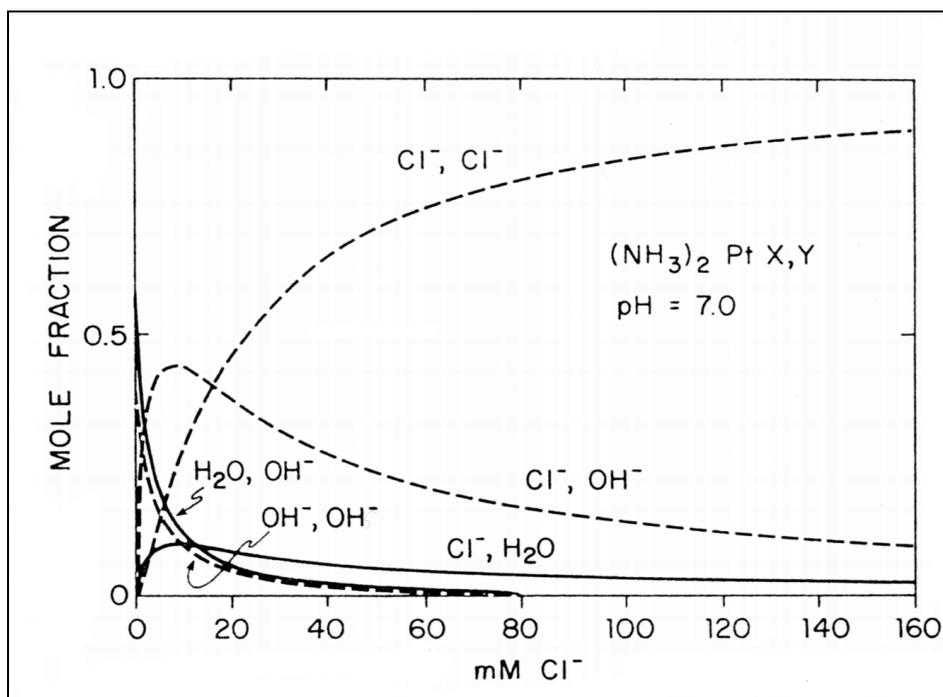


Abb. 3.4: Auftragung der Molfraktionen von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ -Komplexen gegen $[Cl^-]$ bei $pH = 7$

Die von HEUDI et al. chromatographisch bestimmte Geschwindigkeitskonstante für die erste Hydrolyse einer 1mM Cisplatinlösung bei $T = 37^\circ C$ von $k_1 = 1,67 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ und der von MOGHADDAS angegebene Wert von $k_1 = 1,3 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ sind mit dem in einer zeitabhängigen Untersuchung bestimmten Hydrolysegeschwindigkeit von $k_1 = 7,9 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ vergleichbar [65,66]. Die eigenen Untersuchungen bestätigten auch den $t_{1/2}$ -Wert von 2 h und die Entstehung eines konstanten Gleichgewichtes zwischen Cisplatin und Hydrolyseprodukt nach einer Reaktionszeit von 24 h [67]. Neuste Studien von CHOTTARD legen die Vermutung nahe, dass der Cisplatinangriff an die DNA durch das doppelt hydrolysierte Cisplatinprodukt erfolgen könnte [68].

Zu den Koordinationsstellen von Peptiden für Metallfragmente zählen die terminale Amino-, die Carboxylatgruppen, die Amidstickstoffe und in den Seitenketten vorhandene Donoratome, wie z. B. der Schwefel der Thioetherfunktion des Methionins oder die Imidazolstickstoffe des Histidins.

Als erste Koordinationsstelle bei $\text{pH} < 3$ kann die Carboxylatgruppe dienen, der weitere Umlagerungen zu stabilen Produkten in kurzer Zeit folgen. Eine deutlich stabilere Bindung bildet die Aminogruppe aus. Erst wenn schon eine Koordination an einer anderen Gruppe vorhanden ist, können die Amidstickstoffe beteiligt werden. Somit können in monodentat gebundenen Peptiden benachbarte Donoratome in Konkurrenz um die Ausbildung eines Chelatringes treten. Hierbei ist zu beachten, dass fünf- oder sechsgliedrige Chelatringe aufgrund der sterischen Verhältnisse und der Hybridisierung der Ringatome besonders stabil sind. Ringgrößen von elf oder mehr Atomen lassen die freie Drehbarkeit in den weitestgehend ungespannten Makrochelaten zu.

Nach dem HSAB-Konzept bildet die leicht polarisierbare Lewis-Säure Platin(II) bevorzugt Bindungen zu „weichen“ Liganden aus, wobei die folgende Reihenfolge zu beachten ist [69]:



Diese thermodynamische Koordinationsreihenfolge kann durch kinetische Präferenz in der Reaktion von Platinverbindungen mit methionin- und histidinhaltigen Peptiden überlagert werden:



3.2 **Komplexverbindungen des Pt(en) mit met- und his-haltigen Peptiden**

Das Koordinationsverhalten der Modellverbindung $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit histidin- und methioninhaltenen Peptiden wurde hauptsächlich von unserer Arbeitsgruppe mittels Chromatographie und multinuklearer NMR-Spektroskopie untersucht.

SIEBERT charakterisierte die mit den methioninhaltigen Peptiden metglyH, metglyglyH, glymethH, glymetglyH und glyglymethH entstehenden Produkte [57, 70]. Die chelatartige Koordination von Schwefel mit der Amino- oder Amidgruppe ist im sauren und neutralen pH-Bereich bevorzugt. Peptide mit einer C-terminalen Thioetherfunktion können tridentate κ^3 -S,N_{amid},N_{amino}-Komplexe ausbilden und bei Ligandenüberschuß entstehen (κ -S)₂-Spezies unter „arm-off“ Beteiligung des en-Liganden. Im Basischen ab pH > 7,4 stellen die κ^2 -N_{amid},N_{amino}-Chelate die Hauptprodukte der Umsetzungen dar. FRÖHLING untersuchte die intramolekulare Konkurrenz zwischen Histidin und Methionin Seitenketten in den Peptiden cyclo-hismethH, hismethH und methisH bei der Reaktion mit [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ [71, 72]. Zeitabhängige Studien des hismethH zeigen bei pH = 4,55 die Bildung eines κ^2 -S,O-Vorläufers, der zu dem 12-gliedrigen κ^2 -S,N1-Makrochelate und dem κ^2 -S,N_{amino}-Hauptprodukt führt. Nach einer Reaktionszeit von über 600 h bildet sich aus der κ^2 -S,N_{amid}-Spezies der thermodynamisch stabilere κ^2 -N_{amid},N_{amino}-Komplex. Ab pH-Werten größer als 8,5 dominiert das κ^2 -N_{amino},N3-Produkt in der pH-Verteilung. Im methisH-System entsteht im Sauren auch das κ^2 -S,N_{amino}-Chelate und ab pH > 9 dominiert das aus κ^2 -S,N_{amino} über κ^2 -N_{amid},N_{amino} gebildete κ^3 -N_{amid},N_{amino},N3-Produkt. In der Dissertation von WOLTERS wurde das Reaktionsverhalten von hisglymethH, achisglymethH und achis(ala)₃metH mit [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ studiert [73, 74]. Entscheidend dabei war die Trennung der funktionellen Gruppen durch bis zu drei Glycin- oder Alanineinheiten. Die Reaktionskinetiken der Tetra- und Pentapeptide zeigen zuerst die Bildung des κ^2 -S,O-Vorläufers, der zu dem κ^2 -S,N_{amid}-Chelate weiterreagiert und dann das κ^2 -S,N1-Makrochelate bildet. Die Verlängerung der Peptidkette führt in der pH-Verteilungskurve zu einer Zunahme der κ^2 -S,N_{imidazol}-koordinierten Produkte, die im achis(ala)₃metH-System zwischen pH = 3 und pH = 6,5 dominieren. Ab pH-Werten von 6,5 dominiert in beiden pH-Verteilungen das κ^2 -S,N_{amid}-Chelate. Bei Umsetzungen von [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ mit glyhisH in 1:1 Stöchiometrie bildete sich über den gesamten pH-Bereich das κ^3 -N_{amid},N_{amino},N3-Hauptprodukt, dessen Koordinationsmodus schon bei Cu(II) und auch Pd(II) durch Kristallstruktur bewiesen wurde [75]. KUBELLA gelang der Nachweis eines siebengliedrigen κ^2 -N1,N_{amino}-Chelatringes bei der Reaktion von [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ mit aspalahisglyH im pH-Bereich von 4 bis 9 [76]. Dieser Chelatring gilt als sterisch sehr gespannt und konnte bislang noch nicht beobachtet werden.

3.3 Komplexverbindungen des Cisplatin mit met- und his-haltigen Peptiden

Die in der Literatur veröffentlichten Reaktionen von Cisplatin mit Aminosäuren und Peptiden können in 3 Gebiete aufgeteilt werden. Das erste sind die von APPLETON durchgeführten Umsetzungen mit weder histidin- noch methioninhaltiger Aminosäuren und Peptide (glyH, alaH, acglyH, aspH, gluH, glyglyH) [77-82].

Die Untersuchungen von Cisplatin mit Histidin und histidinhaltigen Peptiden von APPLETON mit hisH und hisglyH lieferten identische Ergebnisse, wie die der Arbeitsgruppe von HADJILADIS mit den Peptiden hisalaH, hisglyalaH, proglyalahisH und hisproglyalahisH [83, 84]. In beiden Fällen bildet sich zuerst der κ -O-kordinierte Komplex, der sich dann zum stabilen κ^2 -N_{amino},N₃-Endprodukt umlagert. Der in Abb. 3.5 am Beispiel des hisglyH dargestellte Reaktionsweg verdeutlicht dies und zeigt zusätzlich die Möglichkeit der Bildung eines 2:1 Komplexes durch die Koordination eines weiteren Cisplatin an Sauerstoff und Amid des Methionins im Falle eines Metallüberschusses.

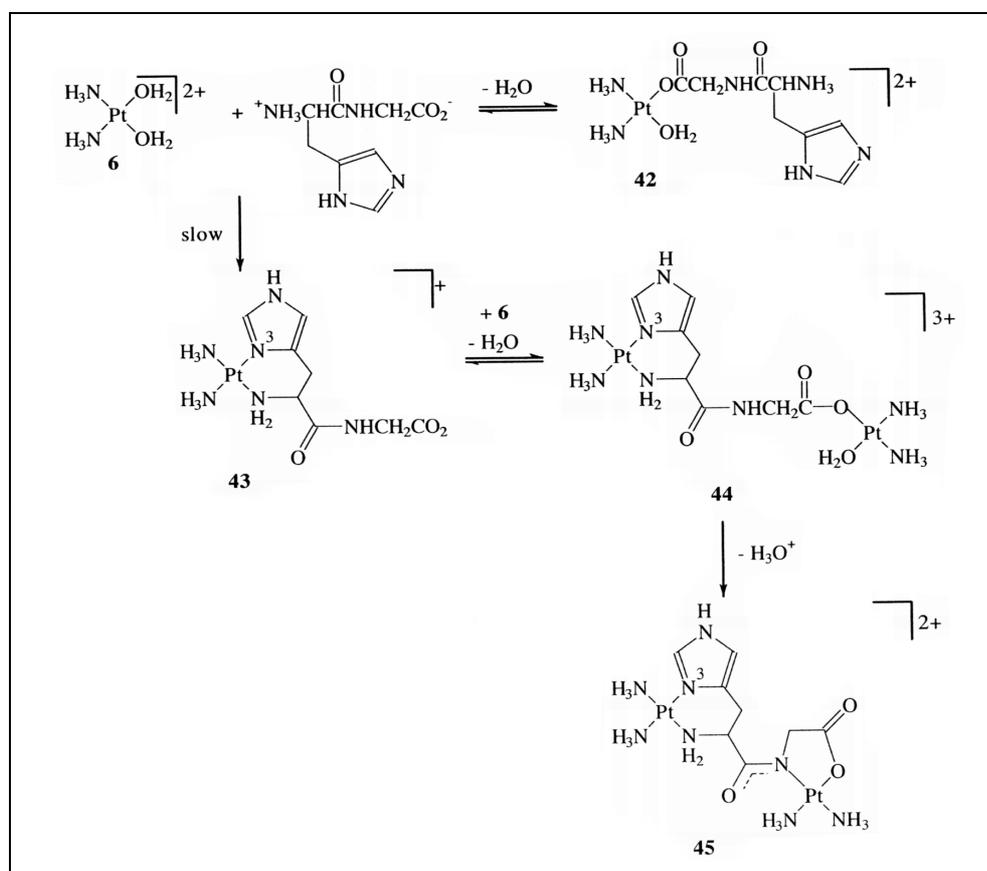


Abb. 3.5: Reaktionsweg von cis-[Pt(NH₃)₂(OH)₂] mit Histidylglycin

MORENO erhielt bei Reaktionen von Cisplatin mit dem synthetisiertem Phac-Hse(p⁵-dG)-HisH nur zwei Chelatprodukte, die über N7 des Desoxyguanosins und N1 oder N3 des Histidins koordiniert sind [85]. Das dritte und größte Gebiet sind die Studien von Cisplatin mit der Aminosäure Methionin. Der in Abb. 3.6 dargestellte mittels ¹⁵N-NMR-Spektroskopie abgesicherte Reaktionsweg von APPLETON ist im Einklang mit den von SADLER und HEUDI veröffentlichten Teilergebnissen [86, 87, 65].

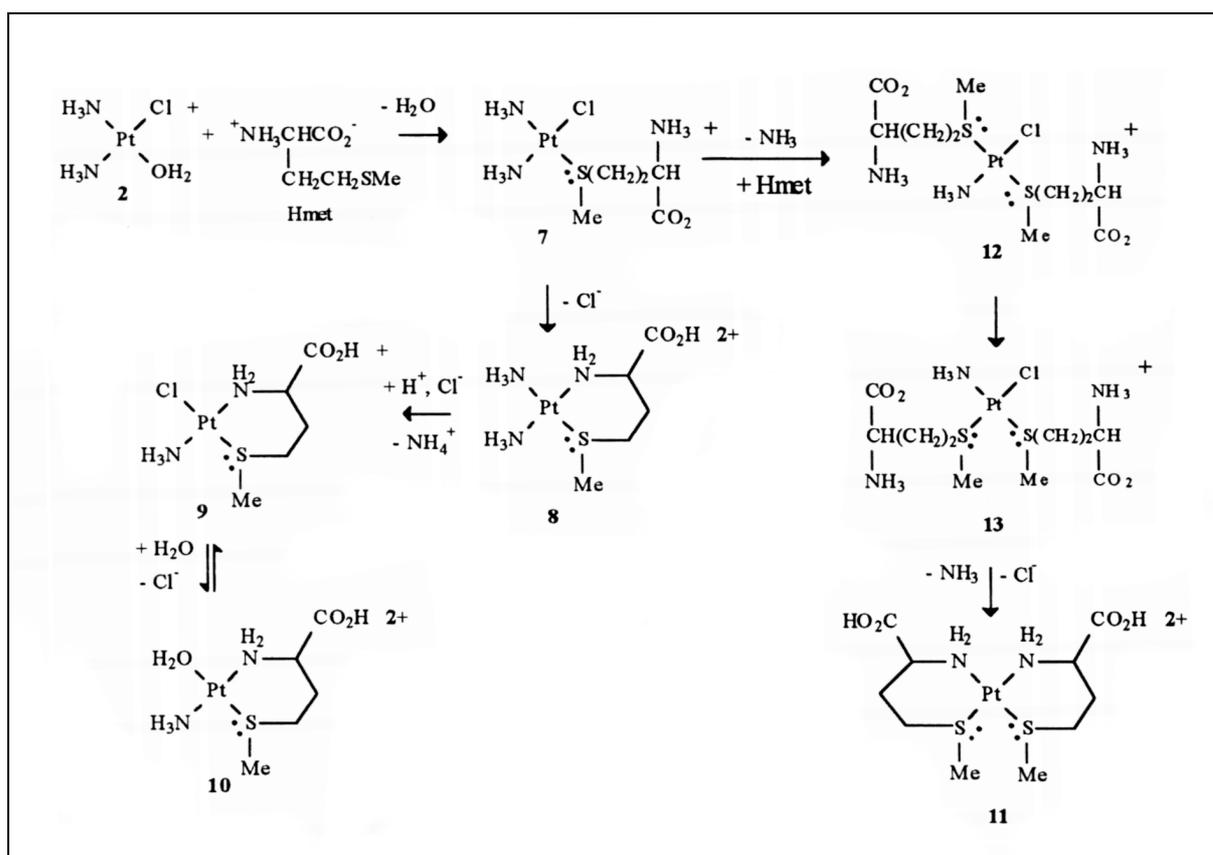


Abb. 3.6: Reaktionsweg von $cis-[Pt(NH_3)_2(OH_2)]^+$ mit Methionin

Cisplatin reagiert entweder direkt mit Methionin oder als Hydrolyseprodukt zu dem kinetisch bevorzugten monodentaten Schwefelkomplex. Zum einen kann es zur Bildung des sechsgliedrigen κ^2 -S,N_{amid}-Chelates und aufgrund des trans-Effektes zum Austausch der dem Schwefel gegenüberliegenden NH₃-Gruppe mit einem in der Lösung vorhandenen Chlorid und der nachfolgenden Hydrolyse kommen. Zum anderen kann durch den trans-Effekt ein zweites Methionin über den Schwefel an das Cisplatin koordinieren. Nachfolgend entsteht durch Isomerisierung der cis-ständige Komplex 13 und dann erfolgen die Chelatbildungen

zum cis- $(\kappa^2\text{-S,N}_{\text{amid}})_2$ -Produkt. Die Dominanz des cis-Isomers im Gleichgewicht mit dem trans-Isomer konnte auch von SADLER nachgewiesen werden [88]. Die Stöchiometrie der Komplexe 7, 8, 9 und 12 konnten von HEUDI mittels Massenspektrometrie bestätigt werden [65]. Die Kristallstruktur in Abb. 3.6 zeigt die Möglichkeit der tridentaten Koordination von Platin(II) mit glymetH in wässriger Lösung [89].

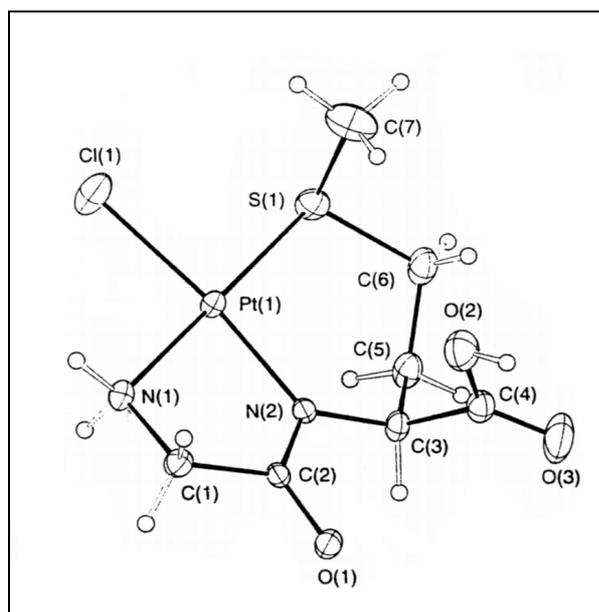


Abb. 3.7: Kristallstruktur von $[\text{PtCl}(\text{glymetH-}\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_G)]$

Das von KLEINE untersuchte Reaktionsverhalten von glymetH und glyglymetH mit Cisplatin wird in Kapitel 7.5 näher erläutert [90].

3.4 Das Migrationsverhalten des Pt(dien)

Die inter- oder intramolekularen Konkurrenzreaktionen von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ wurden in den letzten 10 Jahren hauptsächlich von den Arbeitsgruppen REEDIJK und SADLER durchgeführt, nachdem sich die Möglichkeit des Cisplatins zeigte ohne vorhergehende Hydrolyse als Dichlorid mit schwefelhaltigen Aminosäuren zu reagieren. Die Migration von Platin(II)verbindungen zwischen Koordinationsstellen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde von REEDIJK et al. gezeigt. Er beobachtete die intramolekulare reversible Wanderung von schwefelgebundenem $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{SAH})]^{2+}$ zu der Aminogruppe im S-Adenosyl-L-homocystein

(SAH) [91]. In Ansätzen mit 1:1 Stöchiometrie bildet sich bei einem $\text{pH} < 7$ nur schwefelkoordiniertes Pt(II) ($t_{1/2} = 75$ min). Sobald nach Erhöhung der Basenkonzentration ein pH -Wert von größer 7 eingestellt wird, isomerisiert das Produkt schnell ($t_{1/2} = 10$ min) zum aminokoordiniertem Komplex. Die Rückreaktion findet bei $\text{pH} < 5$ mit $t_{1/2} = 120$ min statt. Die beobachtete Migration läuft über den pentakoordinierten κ^2 -S,N-Chelatkomplex am Platin(II). Adeninkoordinierte Produkte waren nicht zu beobachten, da die Affinität am Pt(II) zu Guanin deutlich größer ist. Die Studien mit S-Guanosyl-L-homocystein (SGH) zeigen bei $\text{pH} = 2 - 6,5$ jedoch zuerst die kinetisch bevorzugte Bildung des schwefelkoordinierten Produktes ($t_{1/2} = 2$ h) und dann die langsame Isomerisierung zum thermodynamisch stabileren N7-Komplex ($t_{1/2} = 10$ h) [92].

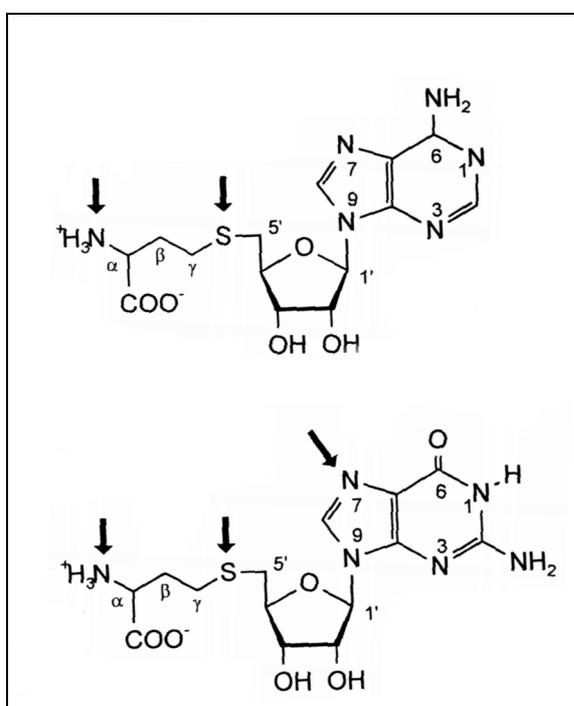


Abb. 3.8: Koordinationsstellen des Pt(dien)-Fragmentes an SAH (oben) und SGH (unten)

Weiterführend wurde das Nukleopeptid Met-d(TpG) (5'-O-methinate-N-ylcarbonylthymidine 2'-desoxyguanosin monophosphate) mit $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ umgesetzt, das keine konkurrierenden NH_2 und COOH Gruppen für Koordinationen enthält. Auch hier ist eine intramolekulare Wanderung vom S zum N7 bei einem physiologischem $\text{pH} = 7$ nachgewiesen [93].

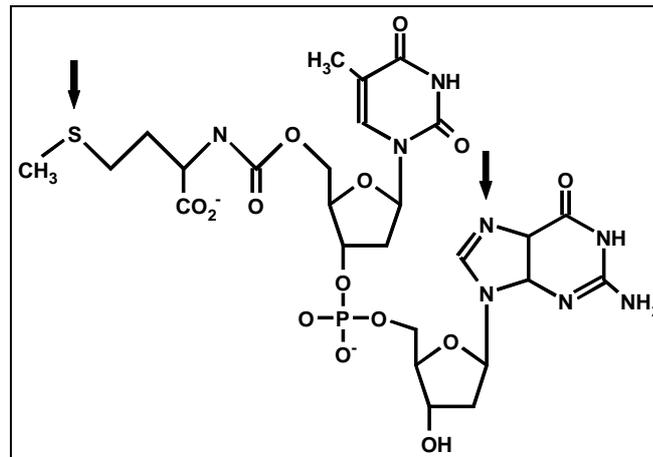


Abb. 3.9: Koordinationsstellen des Pt(dien)-Fragmentes an met-d(TpG)

REEDIJK et al. konnten zum einen die Reversibilität der Platin-Proteinbindung, als auch die intermolekulare Migration von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{GSMe})]^{2+}$ zum N7-koordiniertem 5'-GMP und d(GpG)-Produkt beobachteten [94]. Es konnte immer nur eine Wanderung zum N7 des Guanins festgestellt werden, da keine Produkte mit 5'-AMP nachgewiesen werden konnten. Das $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{GS})]^{2+}$ reagierte aufgrund seiner stabilen Platin(II)-Thiolbindung nicht weiter. Im Falle einer Konkurrenz von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{GSMe})]^{2+}$ mit GSH und 5'-GMP ab $\text{pH} > 7$ konnte eine schnelle Substitution durch GSH gefunden werden, die zur Inhibierung des Platin(II) und dem Transport aus der Zelle führen könnte [27].

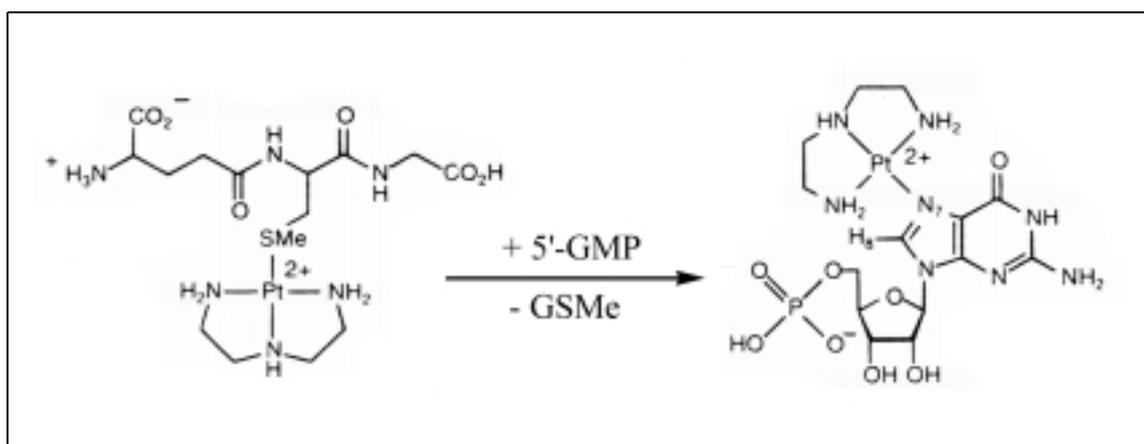


Abb. 3.10: Reaktion von 5'-GMP mit $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{GSMe})]^{2+}$

In neusten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Schwefelatom von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{GSMe})]^{2+}$ durch synthetische Oligonukleotide wie $\text{d}(\text{ATATGCATAT})$, $\text{d}(\text{ATTACCGGTAAT})$ oder $\text{d}(\text{ATCCTATTTTTTTTAGGAT})$ an N7 von Guanin substituiert werden kann [95]. Auch SADLER et al. veröffentlichten eine Reihe von Artikeln zur Untersuchung der Pt(II)-Migration. Wird die Reaktion einer Mischung aus $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$: Methionin und 5'-GMP im Verhältnis 1:2:2 bei $\text{pH} = 2$ verfolgt, so bildet sich wie erwartet sehr schnell das $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{metH-}\kappa\text{S})]^{2+}$ ($t_{1/2} = 2\text{h}$). Nach mehr als 40 h wird jedoch Methionin durch die Koordination von 5'-GMP wieder freigesetzt. Bei gleichen Umsetzungen mit 5'AMP anstelle von 5'-GMP sind nur 2,5% des 5'AMP nach 30 Tagen abreagiert [47]. Die alleinige Umsetzung von $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ mit dem 14-mer Oligonukleotid 5'- $\text{d}(\text{ATACATGGTACATA})$ und dem Oktamer 5'- $\text{d}(\text{ATACATGG})$ zeigte gleichschnelle Platinierungen der 5'-G- und 3'-G-Basen im 14 mer, wogegen im Oktamer die Platinierung des 5'G gegenüber dem 3'G um den Faktor 3 schneller ablief [96]. Das Konkurrenzverhalten von Pt(II) mit den Aminosäuren Histidin und Methionin, die in den Zellen zur Verfügung stehen, wurde bisher nur beiläufig untersucht und konnte erst in letzter Zeit durch Studien unserer Arbeitsgruppe näher geklärt werden. WOLTERS konnte bei intramolekularer Konkurrenz der beiden Aminosäuren feststellen, dass Histidin oder Histidinderivate nicht in der Lage sind, Methionin aus den gebildeten Pt(II)-Komplexen zu verdrängen [97]. FRÖHLING konnte jedoch die langsame intramolekulare Wanderung von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ vom Schwefel zum Imidazol N1 der Histidinseitenkette mit dem Dipeptid hismetH eindeutig nachweisen [98]. Bei pH-Werten größer als 6 bildet sich zuerst die $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{hismetH-}\kappa\text{S})]^{2+}$ -Spezies, die dann über das binukleare Zwischenprodukt $1\kappa\text{S}:2\kappa\text{N1}$ zum $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{metH-}\kappa\text{N1})]^{2+}$ -Komplex weiterreagiert. Die schon veröffentlichten Untersuchungen dieser Arbeit, der Umsetzungen von $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ mit $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metNHPh}$, beweisen die eindeutige Existenz des binuklearen Zwischenproduktes [99].

3.5 Koordination von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] und [PtCl₂(en)] mit 5'-GMP und Proteinen

Die Reaktion von Cisplatin mit Albumin spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Metabolismus des Chemotherapeutikums. Über 90% des nach der Injektion im Blutplasma befindlichen Platins ist an Serum-Proteine (größtenteils Albumin) gebunden [100]. Die Arbeitsgruppe von SADLER konnte 1998 erstmals mit ¹⁵N und ¹H-NMR-Spektren die hauptsächliche Bindungsstelle an den Schwefel eines Methionins identifizieren, der danach ein κ²-S,N-Makrochelat bildet [101]. Außerdem konnten sie sowohl monodentate cystein- als auch methionin Koordination als Nebenprodukte nachweisen. Der starke trans-Effekt führte zu einem vermutlich durch NH₃-Verlust entstehenden Protein-cross-link-Addukt. In weiterführenden Reaktionen von Cisplatin mit human serum transferin (80 kDa) und der rekombinaten N-lobe (40 kDa) konnten Met256 und mit langsamerer Platinierungsgeschwindigkeit Met499 als Koordinationsstellen im intakten Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bindet Cisplatin zur N-lobe des Proteins schneller an Met313, das im intakten Protein innenliegend ist, als zum Met256. Der Chloridverlust am Platin(II) führt danach zu einem Chelatringeschluß mit der deprotonierten Amidbindung, die im intakten Protein auch nach mehreren Tagen nicht zu beobachten war [102]. Die Dominanz von Methionin gegenüber Cystein als wichtigste Koordinationsstelle konnte KEPLER am Beispiel des human serum albumins bestätigen [103]. Dieses 66 kDa Protein besteht aus einer α-Helix-Kette. Die Koordinationsstelle ist das Met298, das auch einen κ²-S,N-Chelat bildet, aber als weitere Produkte werden κ²-S,N_{Imidazol}-Makrochelate mit His242 oder His247 der Domäne II vermutet. Diese Veröffentlichungen verdeutlichen die entscheidende Rolle von Methionin und auch Histidin im Wirkungsmechanismus von Cisplatin. Das Ziel des Chemotherapeutikums ist das Guanin N7 der DNA. SADLER et al. konnten 1992 NMR-spektroskopisch das reagierende Hydrolyseprodukt [PtCl(NH₃)₂(OH₂)]⁺, die monodentate [Pt(GMP-N7)Cl(NH₃)₂]⁺-Spezies und das thermodynamisch stabile [Pt(GMP-N7)₂(NH₃)₂]-Endprodukt nachweisen [104]. In weiteren Untersuchungen konnte die Beschleunigung der Platinierung von 5'-GMP durch Methionin gezeigt werden [105]. Hierbei bildet sich schnell das Zwischenprodukt [Pt(metH-κ²-S,N)(NH₃)₂]⁺, das aufgrund des trans-Effektes nukleophile Angriffe des 5'-GMP erleichtert und folglich das thermodynamisch stabile Hauptprodukt 9

$[\text{Pt}(\text{metH-}\kappa^2\text{-S,N})(5'\text{-GMP-}\kappa\text{S})(\text{NH}_3)]^+$ charakterisiert werden konnte. Der vermutliche Reaktionsweg von Cisplatin mit 5'-GMP in Anwesenheit von Methionin ist in Abb. 3.11 zu sehen.

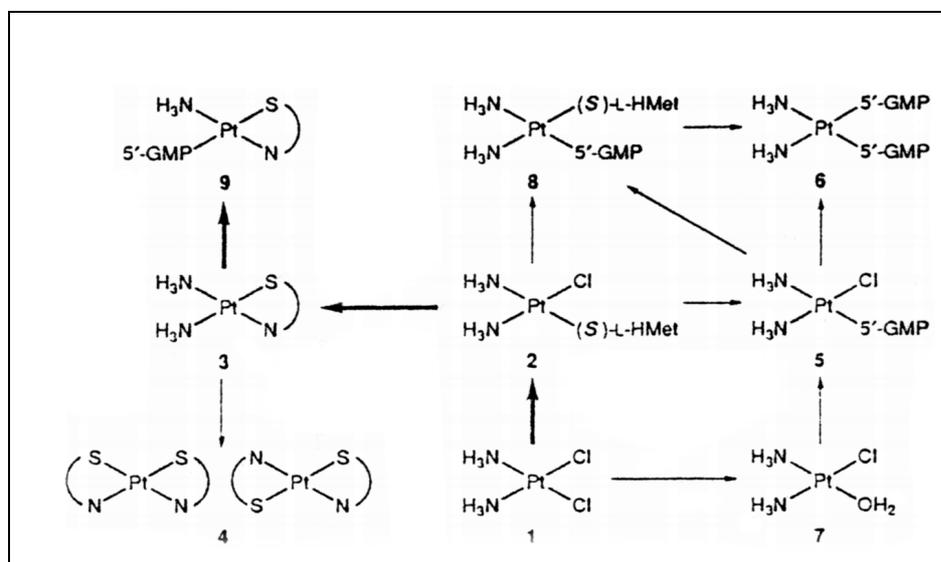


Abb. 3.11: Möglicher Reaktionsweg von $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2]$ mit 5'-GMP in Anwesenheit von Methionin

Interessanterweise konnte zudem nachgewiesen werden, dass sowohl 5'-GMP als auch GpG in der Lage sind, den äußerst stabilen $\kappa^2\text{-S,N}$ -Chelatring des $[\text{Pt}(\text{en})(\text{N-acmet-}\kappa^2\text{-S,N})(\text{NH}_3)_2]^+$ zu öffnen, um den sehr stabilen $[\text{Pt}(\text{en})(\text{N-acmet-}\kappa\text{S})(5'\text{-GMP-}\kappa\text{N7})]^+$ bzw. den $[\text{Pt}(\text{en})(\text{N-acmet-}\kappa\text{S})(5'\text{GpG-}\kappa\text{N7})]^+$ -Komplex zu bilden [106]. In wieweit diese Ringöffnung auch für Cisplatin mit acmetH gültig ist, werden zukünftige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen. Die Substitution der beiden Schwefel im $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{GSMe})_2]$ durch 5'-GMP als auch durch synthetische Oligonukleotide konnte genau wie im Falle des Pt(dien) von REEDIJK et al. bestätigt werden [94, 95].

Die Arbeitsgruppe von LINDNER bestimmte mittels Kapillarelektrophorese die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Reaktionen von Cisplatin und $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ mit 5'-GMP. Die $t_{1/2}$ -Werte der zweifach Guanin N7 koordinierten Endprodukte betragen mit Cisplatin 12 h und mit $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ 7 h [107]. Neuste kinetische Studien zeigen jedoch eine Zunahme der Reaktionszeit von 8 auf 12 h durch die Beteiligung von Methionin an der Umsetzung von Cisplatin mit 5'-GMP zur Bildung des $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{GMP-}\kappa\text{N7})_2]$ -Produktes bei physiologischen Bedingungen ($[\text{met}] = 32 \mu\text{M}$). Bei Beteiligungen von Cystein ist $t_{1/2} = 16 \text{ h}$

und damit doppelt so lang. Für den Fall der äquimolaren Umsetzung (Platin(II) : Aminosäure) ist die Reaktion mit Methionin nach 19 h und die mit Cystein erst nach 114 h beendet [108].

3.6 Pt(II) und Pd(II) induzierte hydrolytische Spaltung der Peptidbindung

In eine Vielzahl von biologischen Prozessen ist die Hydrolyse von Peptiden und Proteinen vorhanden, jedoch ist von dem Mechanismus nur wenig bekannt. Verschiedene proteolytische Enzyme werden für die Spaltung der Peptidbindung eingesetzt [109], aber geringe Variationsmöglichkeiten bei Temperatur und pH-Wert begrenzen deren Verwendung. KOSTIC et al. konnten zeigen, dass sowohl Palladium(II), als auch Platin(II)-Komplexe die hydrolytische Spaltung von Peptiden bewirken. Die Metallfragmente können entweder durch Bindung an den Schwefel in der Methioninseitenkette oder durch Koordination an Imidazol N3 des Histidins nach einbeziehen der Carboxylatgruppe der jeweiligen Aminosäure zur Bindungsspaltung führen. Im Falle des Histidins als Ankergruppe kann die Reaktion über zwei Mechanismen verlaufen (Abb. 3.12). In der ersten Möglichkeit wirkt Palladium(II) als Lewis-Säure und bildet über Imidazol N3 und den Sauerstoff der Carboxylatgruppe einen Chelatring aus. Die Wechselwirkung mit dem Sauerstoffatom polarisiert die Carbonylgruppe und aktiviert das Kohlenstoffatom gegenüber einem externen Angriff eines Wassermoleküls. Wenn das Wassermolekül für die Hydrolyse der Amidbindung aus der Lösung kommt, spricht man vom Mechanismus des externen Angriffs. Im zweite Mechanismus wird ein Wasserligand an Palladium(II) zum Kohlenstoff der Peptidbindung geliefert. Solange das Wasser für die Hydrolyse vom imidazolkoordiniertem Palladiumkomplex kommt liegt ein interner Angriff vor.

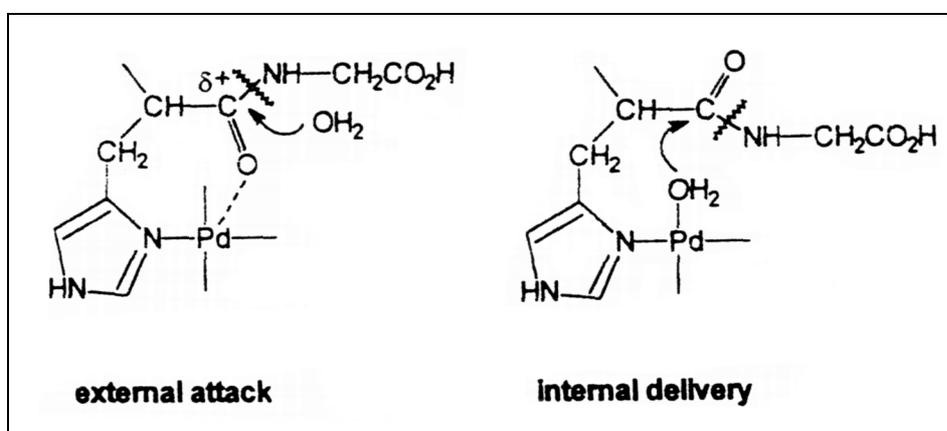


Abb. 3.12: Reaktionsschema für die Hydrolyse histidinhaltiger Peptide

Eine weitere Möglichkeit wäre ein kombinierter Mechanismus, indem das Pd(II) die Amidbindung durch Koordination am Carbonylsauerstoff aktiviert, als auch das Wassermolekül für diese Bindung zur Verfügung stellt.

Die bisherigen Ergebnisse von KOSTIC et al. zeigten für die Reaktion von *cis*-[Pd(H₂O)₂(en)]²⁺ mit Peptiden des Typs MeCO-His-X (X = Gly, Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Phe) und für acglyhisgly eine vollständige Hydrolyse der Peptidbindung an der C-terminalen Seite von Histidin nach 24 h bei T = 60° C und 1,46 ≤ pH* ≤ 2,61 [110-112]. Die im Cytochrom C auftretende Spaltung der Amidbindung zwischen His18 und Thr19 konnte anhand der Modellverbindung achisala und accysmehisgly nachvollzogen werden. Der Pd(II)-Komplex unterstützt auch hier die selektive Spaltung der His-Ala und der His-Gly Peptidbindungen [113]. Die Bestätigung für den Mechanismus des internen Angriffs liefert ein Vergleichsexperiment mit [PdCl₄]²⁻ und [Pd(H₂O)₄]²⁺ bei Reaktionen mit den Peptiden achis und achisgly [114]. Während bei beiden Palladium(II)komplexen eine Spaltung der His-Gly Bindung zu beobachten ist, lässt sich erstaunlicherweise die Acetylgruppe durch [Pd(H₂O)₄]²⁺ abspalten. Zudem konnte KOSTIC beweisen, dass die saure Lösung nicht die Reaktion katalysiert, sondern nur die Konzentration des reaktiven Komplexes reguliert [115].

Studien von DJURAN und MILINKOVIC bestätigen das Nichtauftreten der hydrolytischen Spaltung bei den C-terminal endständigen Histidineinheiten der Peptide alahis, acalahis, serhis und achserhis mit Pd(II) [116]. Sie konnten außerdem eine Koordination an Imidazol N3 und der deprotonierten Aminogruppe des Histidins im Peptid MeCOglyhisgly nachweisen, die zur Stabilisierung der glyhis-Einheit führt und so Abspaltungen der acetyl- und auch der endständigen glycy-Gruppe zu beobachten waren [117]. Hydrolytische Peptidspaltungen treten auch mit der Beteiligung der Methioninseitenkette auf. KOSTIC et al. postulierten den in Abb. 3.13 dargestellten Mechanismus, der dem mit Histidinbeteiligung sehr ähnelt. Hierbei ist die Ankergruppe nicht das Imidazol N3, sondern der Thioetherschwefel des Methionins. Die Amidbindung wird auf der C-terminalen Seite des Methionins gespalten, aber durch die Ausbildung eines 7-gliedrigen κ²-S,N-Chelates kann eine Abspaltung verhindert werden. Die Hydrolyse läuft hierbei sowohl mit Platin(II), als auch Palladium(II) ab.

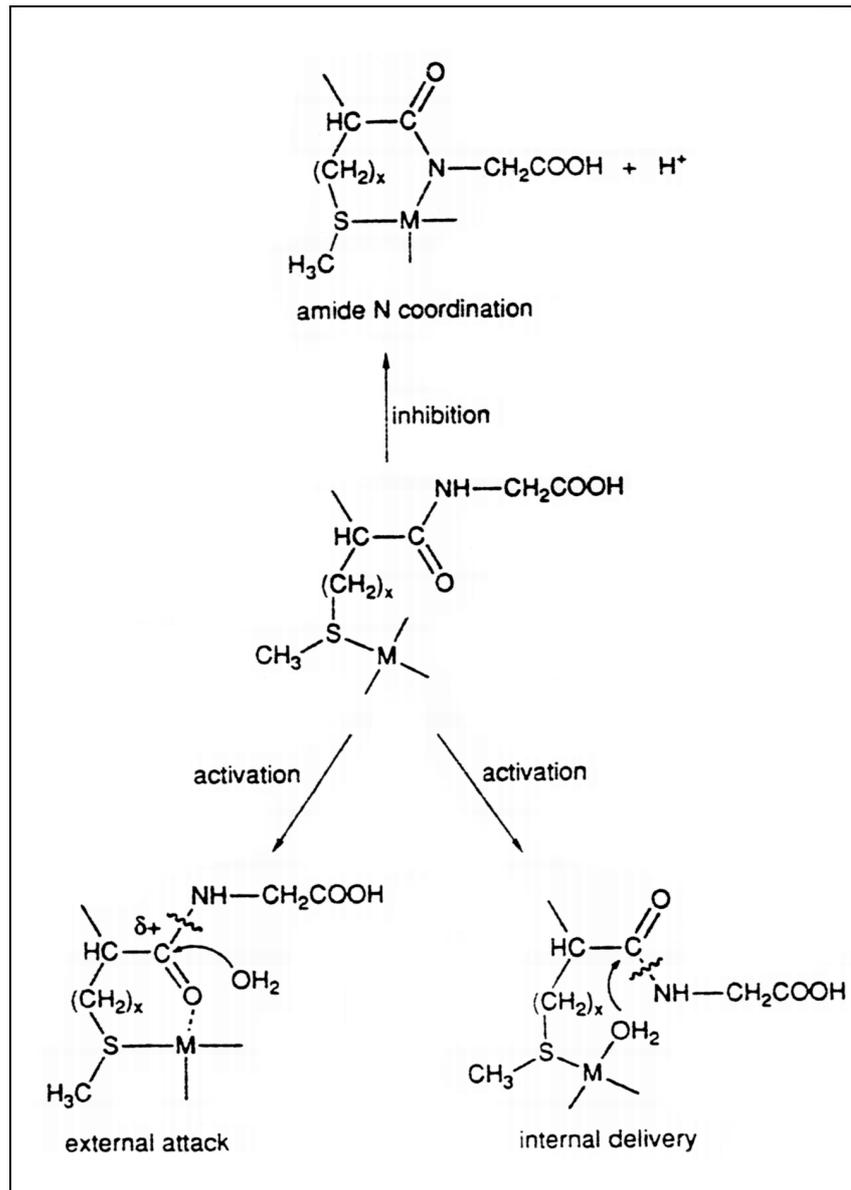


Abb. 3.13: Reaktionsschema für die Hydrolyse methioninhaltiger Peptide

KOSTIC konnte bei acmet-X Peptiden (X = gly, ala, val ser, leu, alaser, glygly) immer die Spaltung der Met-X Bindung beobachten [118-124]. Sobald ein C-terminal endständiges Methionin vorhanden ist, findet eine Abspaltung der Acetylgruppe statt. Auch bei der hydrolytischen Spaltung mit Methioninbeteiligung fungiert die saure Lösung nicht als Katalysator und je mehr H₂O-Liganden am Metallzentrum vorhanden sind, umso schneller verläuft die Hydrolyse.

Mit diesen beiden erläuterten Mechanismen lässt sich die in dieser Arbeit gefundene Peptidbindungsspaltung nicht erklären. Der vermutete Mechanismus ist in Kapitel 7.5 näher erläutert.

3.7 Chromatographische Untersuchungen

Reaktionsprodukte von Platin(II)-Komplexen mit Aminosäuren, Peptiden oder auch Nukleotiden können mit der *reversed-phase* – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) gut isoliert und quantifiziert werden. Es existiert ein großer Umfang von chromatographischen Trennverfahren, die zur Erforschung der Reaktion von Cisplatin und seiner Analoga entwickelt wurde. Einen guten Überblick der Vielfalt an möglichen flüssigchromatographischen Techniken geben Übersichtsartikel [57, 125, 126]. Die Reaktion von Pt(II) mit Bioliganden finden meistens in wässriger Lösung statt, da z. B. Plasma oder Urin-Proben typische *in vivo* Bedingungen darstellen. Die zusätzlich noch gute Löslichkeit der Verbindungen in Wasser spricht demnach für wässrige oder damit mischbare Eluenten als mobile Phase. Somit ist die Umkehrphasenchromatographie die Methode der Wahl. Ein Problem liegt jedoch darin, dass sich die RP-Chromatographie alleine nicht zur Trennung von Pt(II) Aminosäure oder Peptidkomplexen eignet, da keine ausreichende Wechselwirkung zwischen den hydratisierten hydrophilen Probenmolekülen und der hydrophoben stationären Phase auftreten kann. Eine Möglichkeit bietet die Methode der Ionenunterdrückung. Hierbei wird durch Pufferung des Eluenten bei einem geeigneten pH-Wert erreicht, dass die Probensubstanzen als neutrale Spezies vorliegen und so auf der apolaren stationären Phase retardiert werden können. Es ist zu beachten, dass der Anwendungsbereich von modifiziertem Silicagel im Bereich von $2,5 < \text{pH} < 7,5$ liegt [127]. Die zwitterionischen Aminosäuren und Peptide können jedoch nicht durch Pufferung in eine ungeladene Form überführt werden, da immer eine funktionelle Gruppe in ionischer Form vorliegt. Kationenaustauscher könnten alternativ verwendet werden, bieten aber eine zu geringe Trennleistung. Zur Reinigung präparativer Produktgemische kann auch die Gel- oder Größenausschlusschromatographie dienen. Hierbei erlaubt eine definierte Porengröße der stationären Phase den kleinen Molekülen in die Poren einzudringen, während große Moleküle vom chromatographischen Prozess ausgeschlossen werden [127].

Zur Lösung des Retentionsproblems bietet sich die *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie (RPIPC) an, die sowohl für ungeladene, als auch für geladene Stoffe eine hohe Trennleistung besitzt. Durch Zugabe eines Ionenpaarreagenzes (IPR) wird mit dem ionischen Probemolekül ein nach außen hin neutrales Ionenpaar gebildet, dass die Retention ermöglicht.

Im Augenblick stehen die folgenden drei Modelle des Retentionsmechanismus zur Diskussion [128-130]. Bei dem ersten Ionenpaarmodell bilden die im Eluenten vorhandenen Ionenpaarreagenzien mit dem entgegengesetzt geladenen Probemolekül ein nach außen hin neutrales Ionenpaar, das von der hydrophoben stationären Phase ausreichend retardiert wird. Das zweite Modell nach dem Prinzip des dynamischen Ionenaustauschers geht von der Belegung der stationären Phase mit dem Ionenpaarreagenz aus, da das IPR mit seiner unpolaren Alkylseitenkette eine Affinität zu den Alkylketten der stationären Phase hat. Die an der stationären Phase adsorbierten IPRs stehen somit in einem reversiblen Gleichgewicht mit denen im Eluenten vorliegenden Ionenpaarreagenzien, so dass die stationäre Phase insgesamt zu einem dynamischen Ionenaustauscher wird. Da diese zwei Modelle allerdings die experimentellen Daten nur unzureichend beschreiben konnten, wurde der von BIDLINGMEYER et al. entwickelte Ioneninteraktionsmechanismus publiziert. Hierbei wird von einer elektrischen Doppelschicht aus adsorbiertem IPR in der ersten Ionenschicht und einem

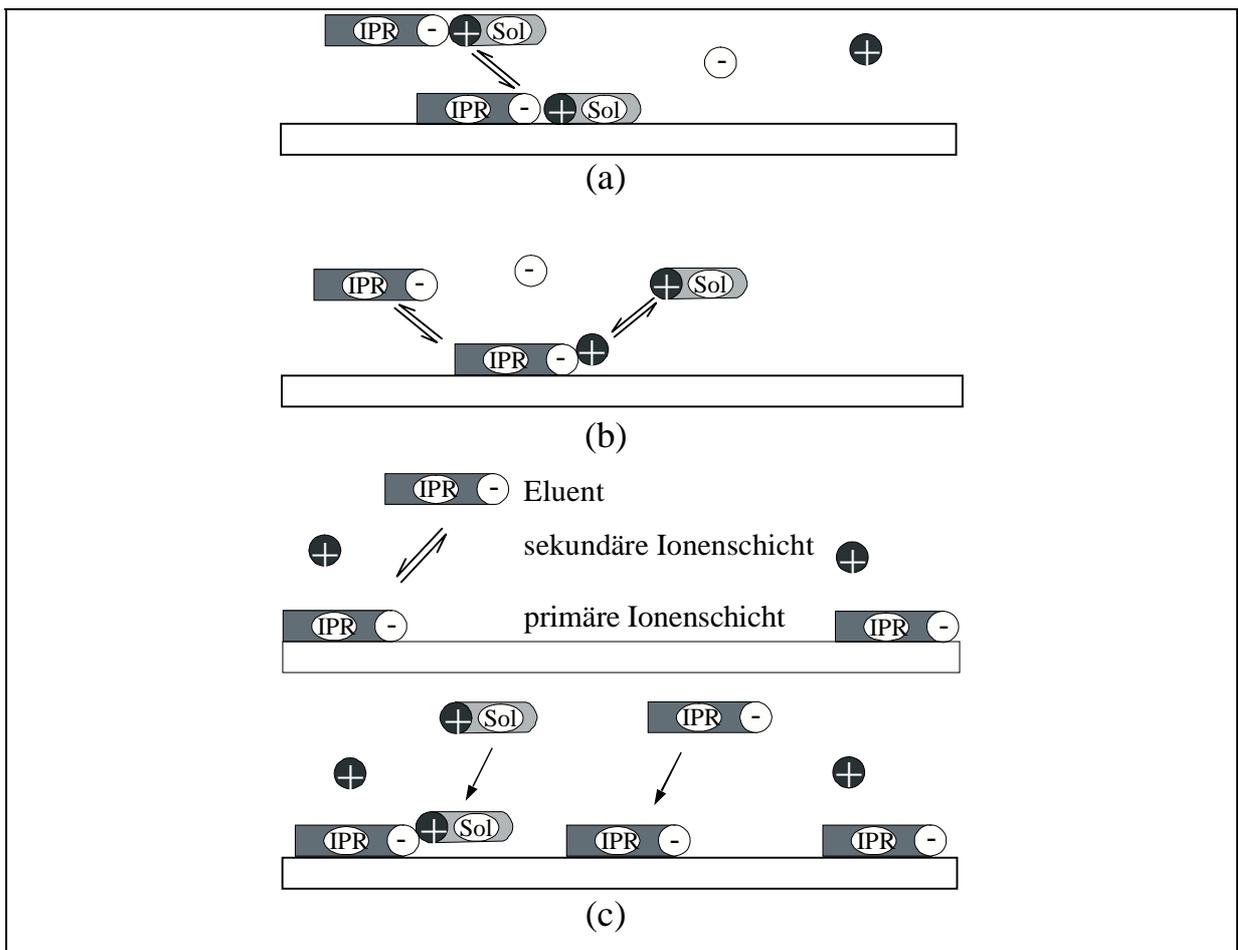


Abb. 3.14: Modelle des Ionenpaarmechanismus

geeignetem Gegenion in der zweiten Ionenschicht ausgegangen, wobei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und im Eluenten vorhandenen Ionenpaarreagenzien vorliegt. Über ein weiteres dynamische Gleichgewicht wird das Gegenion durch ein Probemolekül ausgetauscht. Dieses kann auf diese Weise an der stationären Phase adsorbieren und erfährt somit Retention. Auf Grund des notwendigen Ladungsausgleichs muss an einer anderen Stelle in der primären Ionenschicht ein weiteres IPR adsorbiert werden. Insgesamt wird damit nicht unbedingt ein Ionenpaar, sondern ein Paar von Ionen adsorbiert. Zur Trennung von Platin(II)-Reaktionsprodukten mit Biomolekülen werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten erwähnt. Zur Aufreinigung eines Produktgemisches aus Koordinationsisomeren des $[\text{PtCl}(\text{dien})]^+$ mit 9-Ethylguanin verwendete REEDIJK et al. den Kationenaustauscher Sephadex C-25 [131]. BOSE et al. trennten Pt(dien)-Komplexe aus Konkurrenzreaktionen von Cystein und Glutathion mit 5'-GMP auf analytischen C18-Säulen und Phosphatpuffern (0,05 – 0,1 M, pH \approx 7) [55]. Eluenten mit Ammoniumacetat (0,1 M) oder Natriumperchlorat (0,05 M) mit geringen Methanolkonzentrationen (0 - 5%) wurden von LIPPERT und ARPALAHTI für die Reinheitskontrolle von Cisplatin auf modifiziertem C18-Silikagel verwendet [132]. Zur chromatographischen Bestimmung von Cisplatin-Hydrolyseprodukten und Reaktionsprodukten mit Plasma nutzten APPLETON et al. Natriumdodecylsulfat (0,05 M) mit einem 3 % igem Methanoleluenten, der durch Trifluoressigsäure auf pH = 2,5 eingestellt wurde auf einer C18-Säule [133]. Die Wechselwirkungen von Cisplatin mit der mobilen Phase konnten für Acetonitril und Phosphat nachgewiesen werden [41, 134, 135].

Komplexgemische von Aminosäuren und Peptiden konnten mit verschiedenen Metallfragmenten wie $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ unter Verwendung der RPIPIC mit den Perfluorcarbonsäuren Trifluoressigsäure (TFA), Pentafluorpropionsäure (PFP) und Heptafluorbuttersäure (HFB) getrennt werden. Die semi-präparative Isolierung von Fraktionen und die anschließende Charakterisierung ist aufgrund der Eigenschaften der verwendeten IPRs gut möglich. Die Ionenpaarreagenzien sind leicht flüchtig, einfach anwendbar, besitzen keine störenden $^1\text{H-NMR}$ -Signale, haben eine ausreichende UV-Transparenz und eine Konditionierung der Trennsäule ist in kurzer Zeit möglich. Durch Variation des IPRs, des Eluenten (MeOH, ACN oder THF) bei isokratischem oder Gradientenbetrieb und der Säulentemperatur sind optimale Trennbedingungen auf

Nucleosil 100 C18 Phasen möglich. Die Abb. 3.15 zeigt die Chromatogramme eines Produktgemisches von $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit glymethH unter Verwendung der verschiedenen Perfluorcarbonsäuren als Ionenpaarreagenz im Eluenten [136].

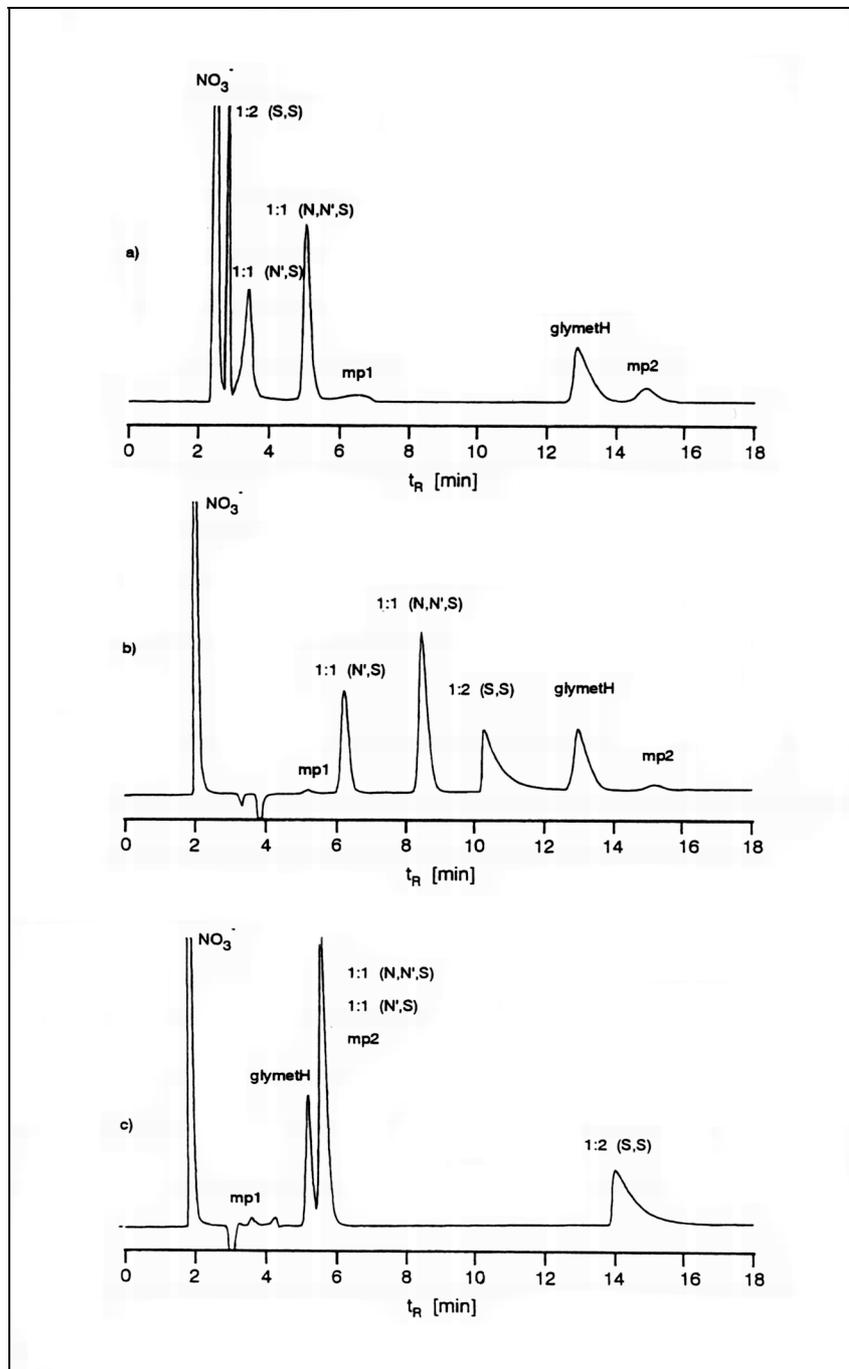


Abb. 3.15: Chromatogramme für das $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ /glymethH-System ($\text{pH} = 3,9$)

- a) 0,073 % TFA, 100 % Wasser
- b) 0,1 % PFP, 4 % Acetonitril
- c) 0,124 % HFB, 19 % Acetonitril

4 Peptid- und Strukturdaten

4.1 $^1\text{H-NMR}$ spektroskopische Daten

Zur Veranschaulichung der in den folgenden Kapitel verwendeten Peptide sind deren Strukturen mit Benennung der einzelnen Atomgruppen in Abb. 4.1 dargestellt. Die beiden Tabellen zeigen die zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Daten der unkoordinierten Peptide und dienen als Vergleich zu den chemischen Verschiebungen der charakterisierten Komplexverbindungen.

Tab. 4.1: $^1\text{H-NMR}$ -Daten für die eingesetzten Peptide

Signalzuordnung	hisglymetH	achisglymetH	acmet(ala) ₃ metH
H2	8.63 s	8.62 s	
H5	7.42 s	7.32 s	
α_{his}	4.37 dd	4.48 dd	
β_{his}	3.42 dd	3.16 dd / 3.30 dd	
α_{met}	4.60 dd	4.68 dd	4.28 dd / 4.42 dd
β_{met}	1.94 m / 2.10 m	2.00 m / 2.17m	1.99 m / 2.09 m
γ_{met}	2.55 m	2.55 m	2.58 m
δ_{met}	2.08 s	2.10 s	2.11 s / 2.12 s
α_{gly}	3.98 d / 4.08 d	3.96 s	
α_{ala}			4.31 m
β_{ala}			1.40 m
ac		2.00 s	2.04 s
pH*-Wert	2,0	3,2	10,1

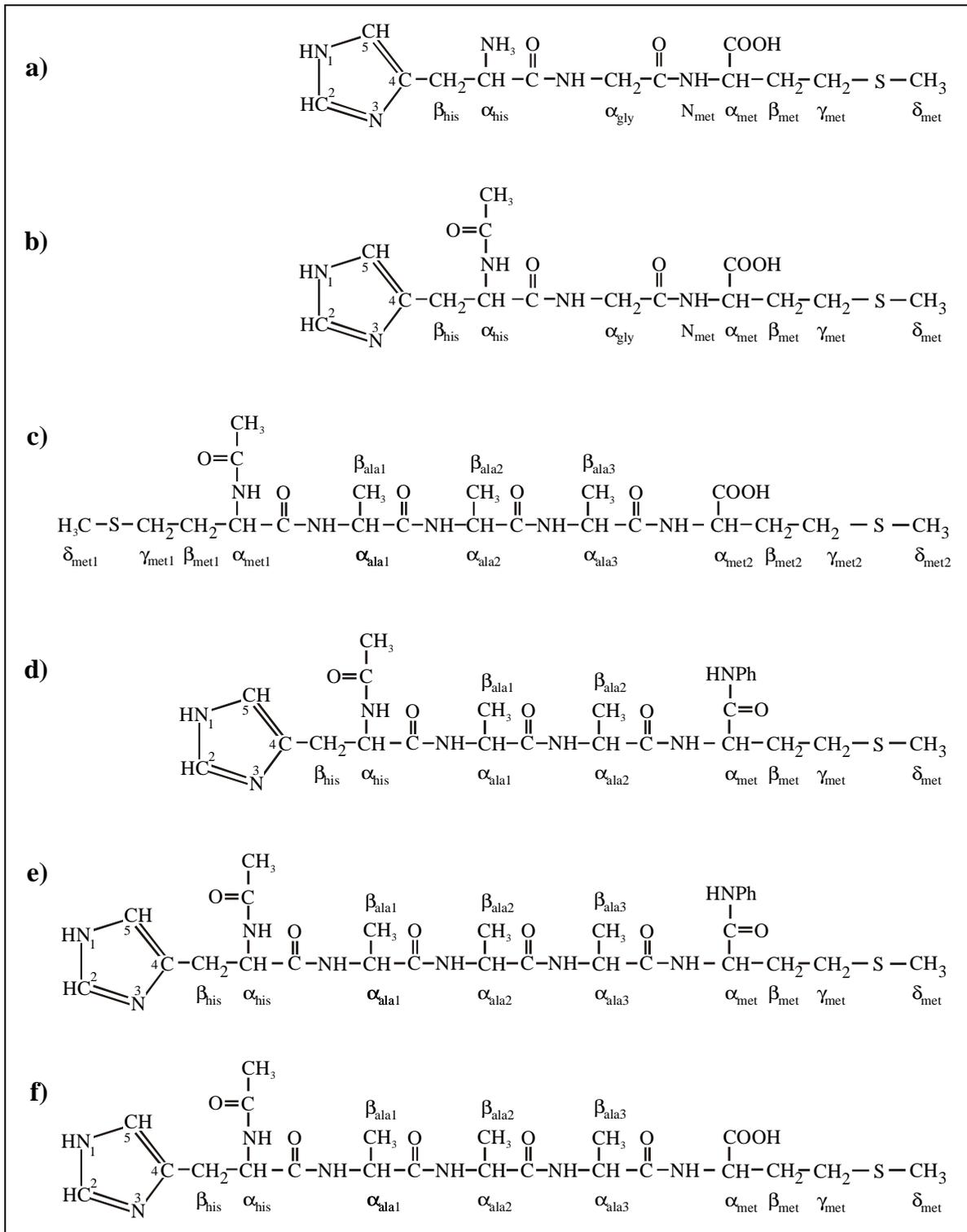


Abb. 4.1: Strukturen und Benennung der eingesetzten Peptide

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| a) hisglymeth | d) achis(ala) ₂ metNHPh |
| b) achisglymeth | e) achis(ala) ₃ metNHPh |
| c) acmet(ala) ₃ methH | f) achis(ala) ₃ methH |

Tab. 4.2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten für die eingesetzten Peptide

Signalzuordnung	achis(ala) ₂ metNHPH	achis(ala) ₃ metNHPH	achis(ala) ₃ metH
H2	8.54 s	7.94 s	8.63 s
H5	7.29 s	7.05 s	7.32 s
α_{his}	4.65 dd	4.53 m	4.67 m
β_{his}	3.11 dd / 3.23 dd	3.01 dd / 3.10 dd	3.17 dd / 3.24 dd
α_{met}	4.58 dd	4.51 m	4.40 dd
β_{met}	2.09 m / 2.19 m	2.07 m / 2.17m	2.01 m / 2.13 m
γ_{met}	2.61 m	2.59 m	2.55 m
δ_{met}	2.12 s	2.09 s	2.09 s
α_{ala}	4.33 m	4.27 m	4.31 dd
β_{ala}	1.41 m	1.36 m	1.39 m
ac	2.00 s	1.96 s	2.00 s
Phenyl	7.24 m / 7.43 m	7.18 m / 7.37 m / 7.56 m	
pH*-Wert	2,4	6,3	2,3

4.2 Die Struktur von Proteinen und Peptiden

Metallionen spielen bei der Mitbestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen eine wichtige Rolle. In Zinkfingerproteinen dient das Zink(II)atom durch die Bindung an zwei Cysteine und zwei Histidine der Stabilisierung der helicalen Struktur [137]. Die Stabilisierung von gefalteten gegenüber ungefalteten Konformationen beträgt normalerweise nur die geringe Energie von 3 – 15 kcal/mol [138]. Mit dem *de novo design* von Proteinen werden Metallionen genutzt, um die α -Helix der Sekundärstruktur aufzubauen. Hiermit sollen erste Schritte in der Proteinbildung nachvollzogen und peptidhaltige Therapeutika entwickelt werden. Durch Vereinigung unterschiedlicher Metallionen mit verschiedenen Peptideinheiten in einem hochselektiven Selbstaggregationsprozeß gelang GHADIRI et al. erstmals das *de novo design* eines heteronuklearen Metalloproteins [139]. Peptide mit einer Kettenlänge von weniger als 20

Aminosäuren können durch die Chelatbildung von zweiwertigen Übergangsmetallionen [Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)] an zwei Histidinen oder Histidin und Cystein zum Entstehen von 75 % α -Helixanteil in wässriger Lösung führen. Der Abstand zwischen den zwei koordinierenden Seitenketten muß mind. 3 Aminosäuren betragen, damit eine Bindung zwischen der 1. und der 4. Position eintreten kann, um die Helix zu stabilisieren [140]. Dies lässt sich anhand der Periodizität der α -Helix von 3,6 Einheiten je Windung erklären.

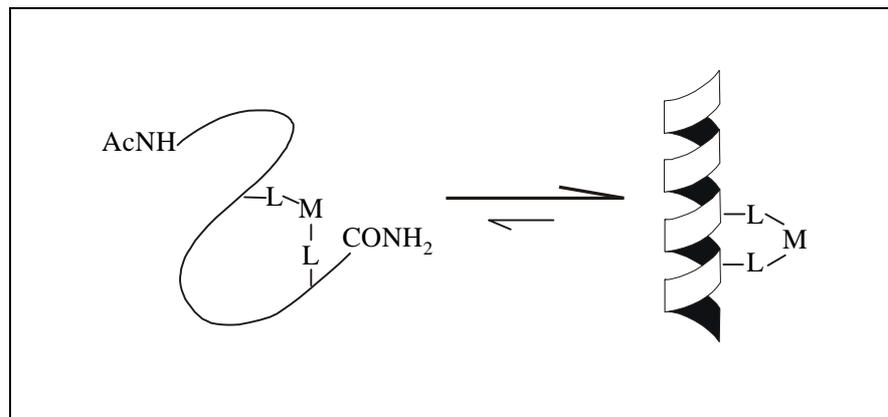


Abb. 4.2: Metall induziertes Knäuel-Helix-Gleichgewicht eines Polypeptides

L = Histidin oder Cystein / M = Metall

In Modellberechnungen konnte für die 1. Reihe der Übergangsmetalle die Sekundärstruktur von His-His Derivaten in Abhängigkeit der Peptidkettenlänge bestimmt werden. Für den $i, i+2$ Abstand der Histidinmoleküle ergab sich eine β -Faltblattstruktur, für $i, i+3$ ein reverse β -turn und für $i, i+4$ eine α -Helix-Sekundärstruktur. Diese Bedingungen gelten auch, wenn der Schwefel als Koordinationsstelle bei der Chelatbildung beteiligt ist, wie z.B. bei Cystein oder Cystein und Histidin enthaltenden Peptiden [141].

Tab. 4.3: Möglichkeiten der Metallchelatisierung am Bsp. von Histidylhistidinderivaten

Sequenz	α -Helix	β -Faltblatt	Reverse β Turn
HH	–	–	–
HXH	–	+	–
HX ₂ H	–	–	+
HX ₃ H	+	–	–
HX ₄ H	–	–	–

Die Frage, inwieweit Aminosäuren die Sekundärstruktur induzieren können, wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht und die Ergebnisse sind aufgrund der Vielzahl von Abhängigkeiten und unterschiedlichen Bestimmungsmethoden häufig widersprüchlich.

Übereinstimmung herrscht in der α -Helix unterstützenden Wirkung der Aminosäuren Alanin und Methionin, die jedoch beide in der Peptidkette zu einer geringen Wasserlöslichkeit führen. Alanin ist wegen der kleinen Seitenkette, die keine Wechselwirkungen mit anderen Aminosäureeinheiten eingeht, als Helixbildner zu bezeichnen. Den größten Destabilisierungseffekt besitzt Glycin. Die Abhängigkeit dieses Effektes von der Position in der Peptidkette konnte durch Substitution von AlaH durch GlyH-Einheiten nachgewiesen werden [142].

Zu einer Stabilisierung der Sekundärstruktur können auch Ladungswechselwirkungen der N-terminalen Amino und der C-terminalen Carboxylatgruppe führen. Des Weiteren kann eine Pseudo-Verlängerung des Peptides um 2 Einheiten durch die von Schutzgruppen auf beiden Seiten entstehenden Peptidbindungen erreicht werden [143]. Die häufig vorhandene Acetylgruppe auf N-terminaler Seite erhöht die Helixbildungswahrscheinlichkeit zusätzlich [144].

Um eine Vorstellung der Molekülkonformation der in dieser Arbeit verwendeten Pentapeptide achis(ala)₃metNHPH und achis(ala)₃metH in wässriger Lösung zu gewinnen, wurden Kraftfeldberechnungen (MM3) mit dem Programm MACROMODEL durchgeführt. Die nachoptimierte energetisch günstigste Konformation wurde durch Monte-Carlo Simulation des entsprechenden Peptides im Lösungsmittel Wasser nach 10.000 Berechnungsschritten bestimmt. Das so bestimmte Energieminimum liegt für das Pentapeptid achis(ala)₃metNHPH bei 163,75 kJ/mol und für das achis(ala)₃metH bei 194,61 kJ/mol. In den beiden folgenden Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen sich die so ermittelten helixförmigen Strukturen der Peptide.

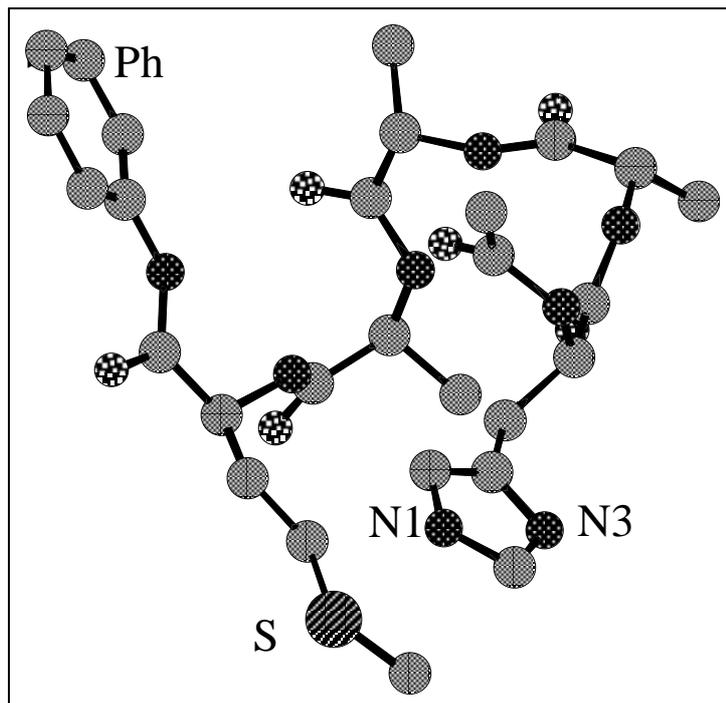


Abb. 4.3: Energiegünstigste Konformation des Pentapeptids $achis(ala)_3metNHPH$

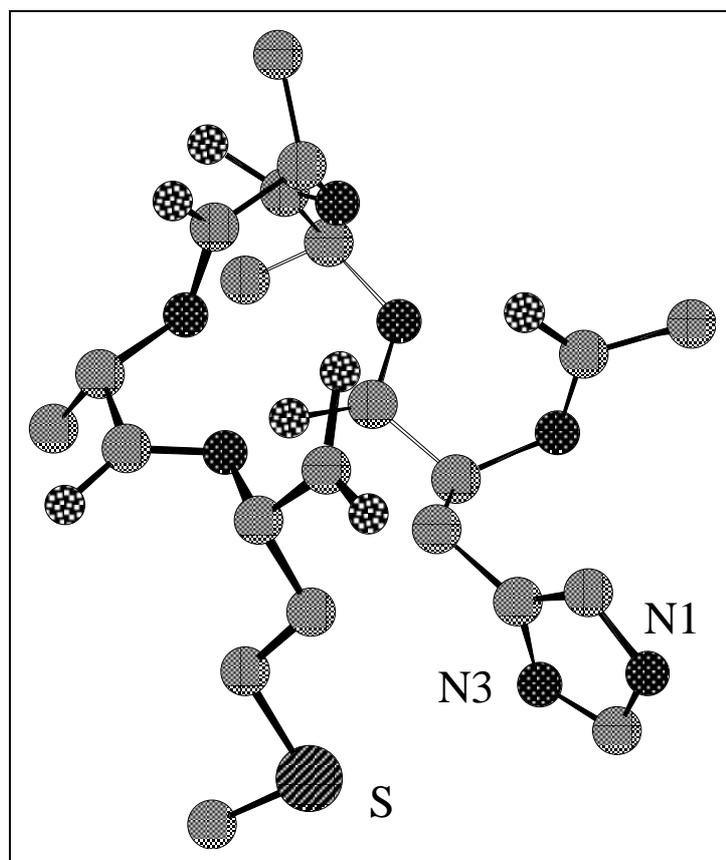


Abb. 4.4: Energiegünstigste Konformation des Pentapeptids $achis(ala)_3metH$

Die Abstände der Imidazolstickstoffe zu dem Thioetherschwefel in diesen Konformationen sind noch kleiner als der S, N_{met} -Abstand der potentiellen Donoratome eines 6-gliedrigen Chelatringes, obwohl die koordinierenden Seitenketten des Histidins und des Methionins durch drei Alanineinheiten getrennt sind. Die experimentellen Ergebnisse bestätigen die thermodynamisch bevorzugte Bildung der beiden imidazolkoordinierten Makrochelate im $Pt(en)^{2+}$ - $achis(ala)_3metNHPH$ -System. Sogar die favorisierte Bildung des $\kappa^2-S, N1$ - Chelates wird durch die berechneten Bindungsabstände verdeutlicht.

Der Unterschied zum $achis(ala)_3metH$ -Peptid ist durch den geringen Energieunterschied und der damit verbundenen Drehbarkeit des Imidazolringes zu erklären.

Tab. 4.4: Bindungsabstände der potentiellen Donoratome

Koordinationsmodus	$achis(ala)_3metH$	$achis(ala)_3metNHPH$
$\kappa^2-S, N1$	4,75 Å	4,09 Å
$\kappa^2-S, N3$	3,88 Å	4,21 Å
κ^2-S, N_{met}	4,69 Å	4,66 Å

Da das Auskristallisieren von längerkettigen Peptiden in Anwesenheit von Pt(II)-Komplexen in den seltensten Fällen gelingt, wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur der Platinpeptidkomplexe die CD-Spektroskopie verwendet. Die Vergleichbarkeit zwischen der Kristallstruktur und der aus den CD-Spektren ermittelten ist in der Regel sehr gut [145]. Polypeptide mit einer α -Helixkonformation zeigen im fernen UV einen komplexen Circular dichroismus mit drei charakteristischen Komponenten bei 193, 204 und 222 nm. Die pH-Werte der untersuchten Reaktionslösungen lagen im neutralen pH-Bereich, da bei pH-Werten von 5 bis 7 ein maximaler Helixgehalt beobachtet werden kann. Durch Temperaturniedrigung von 20° C auf 4° C ist eine merkliche Zunahme an α -Helix festzustellen. Die aufgenommenen CD-Spektren zeigen die Stabilisierung der α -Helix durch die Platin(II)koordination am Schwefel und Imidazol(N1) des $achis(ala)_3metNHPH$. Der genaue α -Helix Anteil lässt sich mit den in der Literatur vorhandenen Formeln nicht berechnen, da diese als Referenz Daten aus der Röntgenstrukturanalyse längerkettiger Peptide oder Proteine verwenden. Das von der Firma Jasco mitgelieferte Programm, J-700 for Windows Secondary Structure Estimation, zur Berechnung der Helizität liefert 65 %

α -Helixkonformation, die durch einen Vergleich mit den CD-Spektren von FASMAN et al. bestätigt werden kann [145].

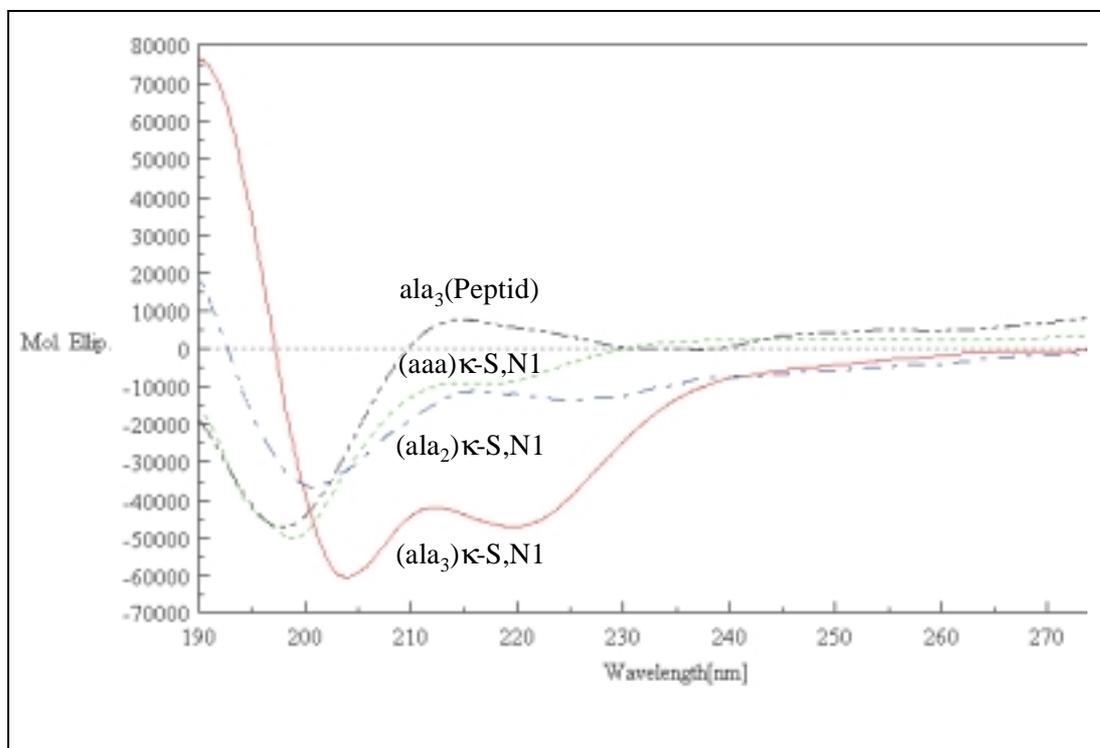


Abb.4.5: CD-Spektren des Peptides im Vergleich zu den Metallpeptidkomplexen

$ala_{2/3} = achis(ala)_{2/3}metNHPH$; $aaa = achis(ala)_3metH$

$pH = 5,5$; $c = 35 \mu M$; $T = 20^\circ C$

Der gleiche κ -S,N1 Koordinationsmodus zeigt beim Tetrapeptid $achis(ala)_2metNHPH$ keinen vergleichbaren Anteil an α -Helix. Diese Untersuchung bestätigt den von ARNOLD gefundenen günstigen $i, i+4$ Abstand zwischen den beiden koordinierenden Seitenketten eines Peptides, der durch Chelatisierung zur Bildung einer α -Helix führt [141]. Der Pt(en) κ -S,N1 koordinierte $achis(ala)_3metH$ - und der zusätzlich untersuchte Pt(en) κ -S,S' $acmet(ala)_3metH$ -Komplex liegen beide in wässriger Lösung offensichtlich nicht als α -Helix vor. Die Erklärung hierfür liegt in der durch die NH-Phenyl-Schutzgruppe verlängerte Peptidkette des $achis(ala)_3metNHPH$ begründet.

5 Reaktionen von $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$

5.1 Chromatographisches System

In dieser Arbeit wurde die *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie mit perfluorierten Carbonsäuren zur Trennung der Reaktionsgemische von $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$, $[Pt(en)(H_2O)]^{2+}$ und *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit den Peptiden hisglymetH, achisglymetH, achis(ala)_{2/3}metNHPH, achis(ala)₃metH und acmet(ala)₃metH eingesetzt. Die wasserlöslichen Perfluorcarbonsäuren TFA, PFP und HFB eignen sich zur Trennung analytischer und semi-präparativer Ansätze, weil sie zum einen UV-durchlässig und zum anderen im Ölpumpenvakuum flüchtig sind [146, 136]. Da sich unterhalb eines Eluenten pH-Wertes von 2 die Alkylketten des Silikagels abspalten, ist die maximale Konzentration an Ionenpaarreagenz auf 10 mM beschränkt, um die Lebensdauer des Trennmaterials nicht zu drastisch zu senken. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit im Laboralltag hat sich die Volumenmenge von 0,1% PFP (9,52 mM) und 0,124% HFB (9,52 mM) der in der vorliegenden Arbeit verwendeten IPRs als günstig erwiesen.

Um optimale Trennbedingungen für die unterschiedlichen Reaktionsgemische zu erhalten wurden folgende Parameter in der angegebenen Reihenfolge angepasst:

Tab. 5.1: Optimierungsparameter bei der RPIPC

variable Parameter	Auswirkung auf
Art des Ionenpaarreagenzes	Elutionszeit und Selektivität
Konzentration des Modifiers	Elutionszeit und Selektivität
Gradientenbetrieb	Elutionszeit und Auflösung
Konzentration des IPRs	Selektivität und Elutionszeit
Art des Modifiers	Selektivität
Temperatur	Selektivität, Elutionszeit und Auflösung

Aus den Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe beginnt ein typischer Optimierungsprozess mit Pentafluorpropionsäure als IPR sowie einer hohen Methanolkonzentration (30%) als Modifier, um sämtliche Reaktionsprodukte zu detektieren. Durch Reduzierung des

Methanolgehaltes werden die Trennbedingungen weiter verbessert. Falls die Reaktionsprodukte noch nicht trennbar sind, wird das IPR gewechselt. Um kürzere Retentionszeiten zu erhalten wird die IPR-Konzentration verringert, wodurch Komplexe mit höherer Ladung stärker beeinflusst werden was zu einer Selektivitätsverbesserung führen kann [57, 147]. Unter Nutzung der Gradientenelution lassen sich mit einer guten Auflösung sowohl Komplexe die schnell, als auch Komplexe die langsamer eluieren voneinander trennen. Außerdem gewährleisten sie eine stabile Basislinie und sind einfacher zu optimieren, als lineare Gradienten. Da das dynamische Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und gelöstem IPR von der Modifikonzentration abhängt, bewirkt eine Erhöhung bei einem Elutionswechsel eine partielle Desorption des Ionenpaarreagenzes. Diese führt aufgrund einer UV-Absorption zu einem Störpeak und einer nachfolgenden Reäquilibrationszeit von mehreren Minuten im Chromatogramm (vgl. Abb. 5.1).

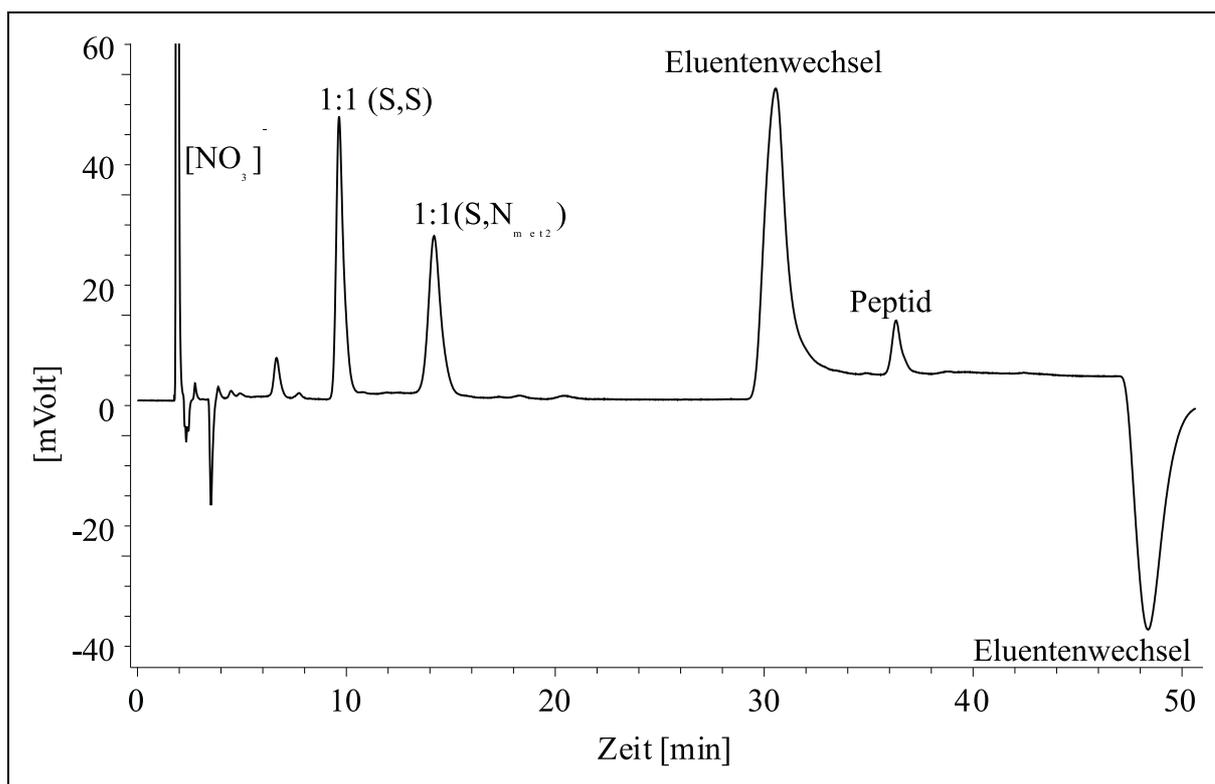


Abb. 5.1: Chromatogramm eines 1:1 Ansatzes bei $pH = 6,70$ des Systems $[Pt(en)(H_2O)]^{2+}$ / $achmet(ala)_3metH$; 18 – 30% MeOH; 0,1% PFP, $T = 35^\circ C$

Die Einstellung der konstanten Grundlinie lässt sich durch Verringerung der IPR-Konzentration und Erhöhung des Modifizieranteils beschleunigen. Die Benetzung der stationären Phase mit dem Eluenten ist notwendig für die Adsorption des IPR und hängt vom organischen Anteil des Lösungsmittel ab. Falls die Methanolkonzentration unter 20% (v/v) sinkt, ist keine vollständige Benetzung gewährleistet und unterhalb von 10% MeOH fallen die Oktadecylketten zusammen und ragen nicht mehr in die mobile Phase hinein [148]. Da sich die C_{18} -Ketten ab 65% MeOH wieder vollständig aufrichten, ist der tägliche Spülvorgang wichtig für das Retentionsverhalten.

Bei allen in der vorliegenden Arbeit optimierten chromatographischen Systemen wurde Methanol als Modifizier verwendet, obwohl mit Acetonitril kleinere Peakhalbwidthen und bei geringeren Drücken bessere Auflösungen erzielt werden können. Da Acetonitril jedoch mit nicht umgesetztem $[Pt(en)(H_2O)]^{2+}$ und den Hydrolyseprodukten des *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ *on-column*-Reaktionen zu (MeCN- κ N)- oder (MeCN- κ N)₂-koordinierten Komplexen eingeht und zur Peakverbreiterung und unerwünschten Reaktionsprodukten führen kann, wurde auf Acetonitril als Modifizier verzichtet [57, 149, 134].

Aufgrund der kinetischen Inertheit des Pt(II) treten bei der chromatographischen Trennung basischer Reaktionslösungen mit dem stark saurem Eluenten lediglich Protonierungen, aber sonst keine wesentlichen Reaktionen der koordinativ abgesättigten Produkte ein.

Der Temperatureinfluss auf chromatographische Trennungen ist nicht zu unterschätzen. Die Verwendung eines Säulenthmostaten im Temperaturbereich zwischen 20° und 40° C kann nicht nur für konstante und reproduzierbare Bedingungen sorgen, sondern durch Temperaturwahl lassen sich die Selektivität, die Auflösung und das Retentionsverhalten eines chromatographischen Systems mitbestimmen.

Sämtliche chromatographischen Trennungen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 ml·min⁻¹ und einer Detektionswellenlänge von 220 nm durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden mit einer Einwaagekonzentration von 0,8 mM, bezogen auf das Peptid angesetzt. Danach wurden sie für 3 Wochen bei 40° C inkubiert, chromatographiert und anschließend die pH-Werte gemessen. Während der anschließenden Lagerung bei 4° C im Kühlschrank ändert sich die Speziesverteilung nur noch unwesentlich.

5.2 Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metNHPh

Für die Umsetzungen des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPh wurden stöchiometrische Ansätze im Verhältnis 1:1 im Bereich von 3,1 bis 10,4 hergestellt. Die chromatographische Trennung der Ansätze erfolgte isokratisch mit einem Eluenten bestehend aus 38% MeOH und 0,1% PFP innerhalb von 50 min. Eine Säulentemperatur von 20°C erwies sich für dieses System als optimal. Die in den ersten 10 min auftretenden Peaks wurden mit geringerer Methanolkonzentration aufgetrennt und mittels UV-Spektren als Verunreinigungen des Peptides identifiziert und in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

In Abb. 5.2 sind drei Chromatogramme der Reaktionslösungen dargestellt, die repräsentativ für die pH-abhängige Produktverteilung sind.

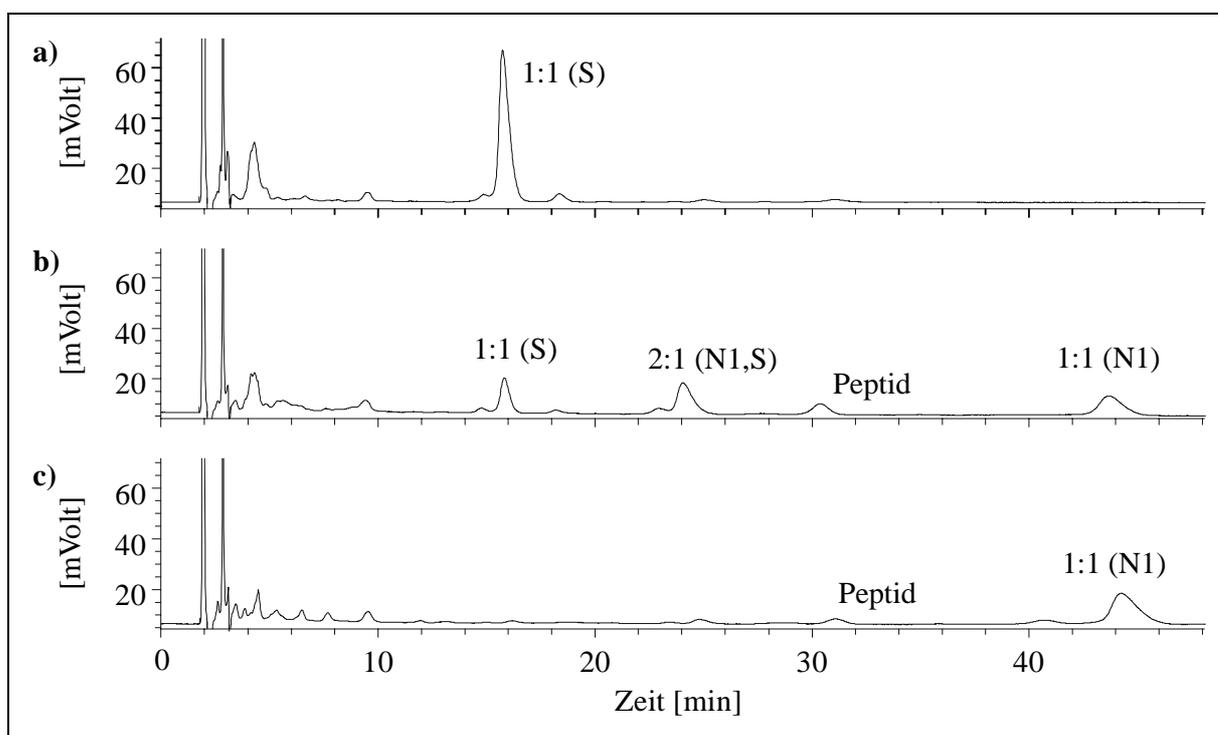


Abb. 5.2: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems $[Pt(dien)H_2O]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPh ; 38% MeOH; 0,1% PFP; 20°C

a) pH = 3,1

b) pH = 5,6

c) pH = 8,7

5.2.1 pH-abhängige Produktverteilung

Zur Erstellung der pH-abhängigen Produktverteilung wurden den analytischen Reaktionslösungen (0,8 mM) mit 1:1 Stöchiometrie die entsprechenden Äquivalentanteile von 0,1 M Salpetersäure oder Natronlauge zugesetzt. Die Auftragung der chromatographisch ermittelten Peakflächen nach einer Reaktionszeit von 21 Tagen gegen den zugehörigen pH-Wert der Reaktionslösung ergibt die pH-abhängigen Produktverteilungskurven. Die Reaktion ist zwar nach 3 Wochen noch nicht vollständig abgeschlossen, da sich die Peakflächen aber in wenigen Tagen bei einer Lagerungstemperatur von 4° C nur unwesentlich ändern sind Wiederholungsmessungen zur Vergleichbarkeit möglich.

Die Untersuchungen mit dem monodentat bindenden $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ - Fragment sollen zur Klärung der bevorzugten Koordinationsstellen dienen und die möglichen Reaktionswege verdeutlichen.

Die pH-abhängigen Produktverteilungskurven des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$ sind in Abb. 5.3 zu sehen.

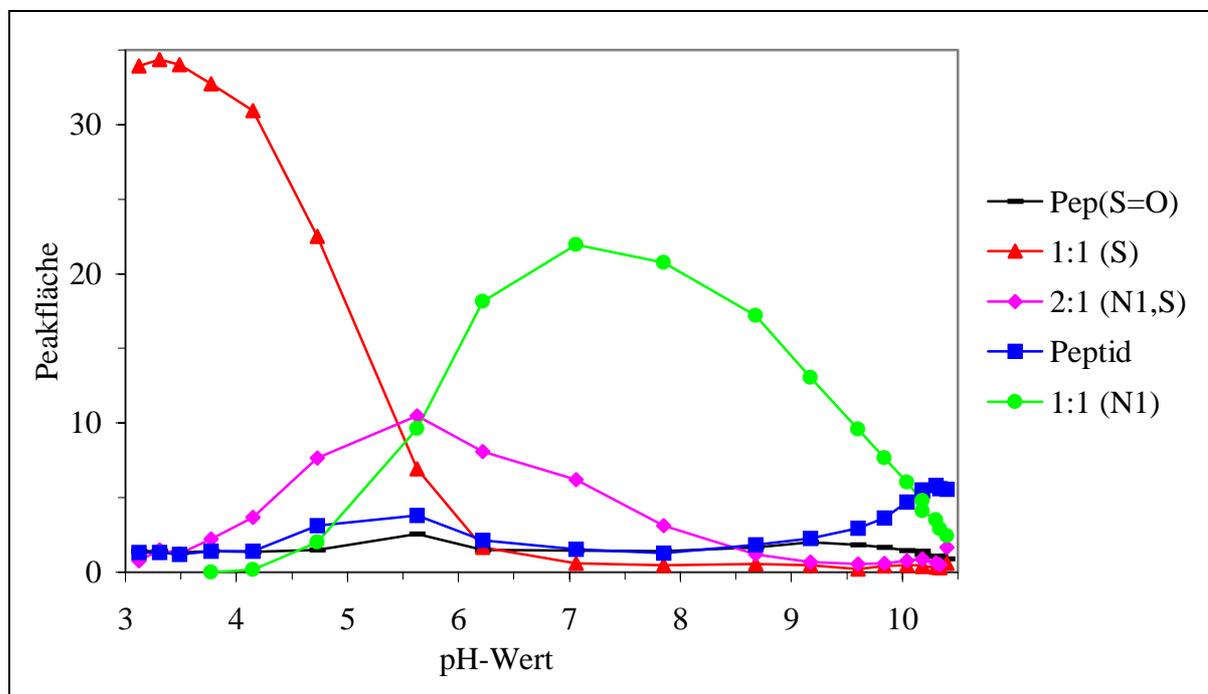


Abb. 5.3: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$ (1:1)

Im sauren pH-Bereich um $pH = 3$ dominiert die schwefelkoordinierte Spezies $[\{Pt(dien)\}achis(ala)_3metNHPH-\kappa S]^{3+}$, die bis zu einem pH-Wert von 5,4 das Hauptprodukt darstellt und ab $pH > 7$ nur noch mit einer geringen Peakfläche als Nebenprodukt detektierbar ist. Der Thioetherschwefel ist somit nur im Sauren, wenn der Imidazolring protoniert vorliegt, die bevorzugte Koordinationsstelle. Der pK_a -Wert für die erste Imidazolprotonierung der Aminosäure Histidin liegt bei $pK_a = 6,0$ [150]. Die Peakfläche des Imidazol-N1 koordiniertem Produktes steigt mit gleichzeitiger Abnahme des schwefelkoordiniertem Komplexes an und ist ab einem pH-Wert von 5,7 als Hauptprodukt mit einem Maximum bei $pH = 7$ zu detektieren und nimmt dann langsam wieder ab.

Ab pH-Werten größer als 10 findet keine Peptidkoordination mehr statt. Die Bildung von Platinhydroxospezies ist im stark Basischem häufig zu beobachten. An dem Schnittpunkt der Kurven der κS und $\kappa N1$ koordinierten Produkte bei $pH = 5,6$ ist die Peakfläche des 2:1 Produktes $[\{Pt(dien)\}_2achis(ala)_3metNHPH-1\kappa N1:2\kappa S]^{4+}$ maximal. Über den gesamten pH-Bereich ist in geringen Konzentrationen das am Schwefel oxidierte Peptid zu finden, das aus der Verunreinigung des eingesetzten Peptides resultiert. Da diese Spezies jedoch 40 mal langsamer als das eingesetzte Peptid mit Pt(II) reagiert, beeinflusst es die Reaktion nicht. Ein Imidazol-N3 koordinierter Komplex ist in der Produktverteilung nicht zu finden.

5.2.2 Kinetische Untersuchungen

Der zeitabhängige Reaktionsverlauf wurde sowohl bei einem pH-Wert von 5,1, als auch bei einem pH-Wert von 8,0, jeweils mit eigens dafür angesetzten Lösungen chromatographisch verfolgt. Diese wurden über den gesamten Zeitraum bei $40^\circ C$ im Trockenschrank aufbewahrt. Auf eine zeitabhängige Untersuchung im stark sauren pH-Bereich wurde verzichtet, weil dort sofort der unter diesen Bedingungen thermodynamisch stabile schwefelkoordinierte Komplex entsteht. Im Basischen bei $pH = 8,0$ wird innerhalb der ersten 5 Stunden die schwefelkoordinierte Spezies rasch gebildet. Nach 24 Stunden nimmt allerdings die Peakfläche zugunsten des $\kappa N1$ -koordinierten Produktes ab, was durch den gleichzeitig steilen Peakanstieg des $[\{Pt(dien)\}achis(ala)_3metNHPH-\kappa N1]^{2+}$ verdeutlicht wird. In diesem Zeitraum nimmt auch die Peakfläche des $[\{Pt(dien)\}_2achis(ala)_3metNHPH-1\kappa N1:2\kappa S]^{4+}$ zu und erreicht nach 100 Stunden ein Maximum. Der Rückgang der 2:1 Spezies findet mit einer gleichzeitigen Zunahme des $\kappa N1$ -Produktes statt.

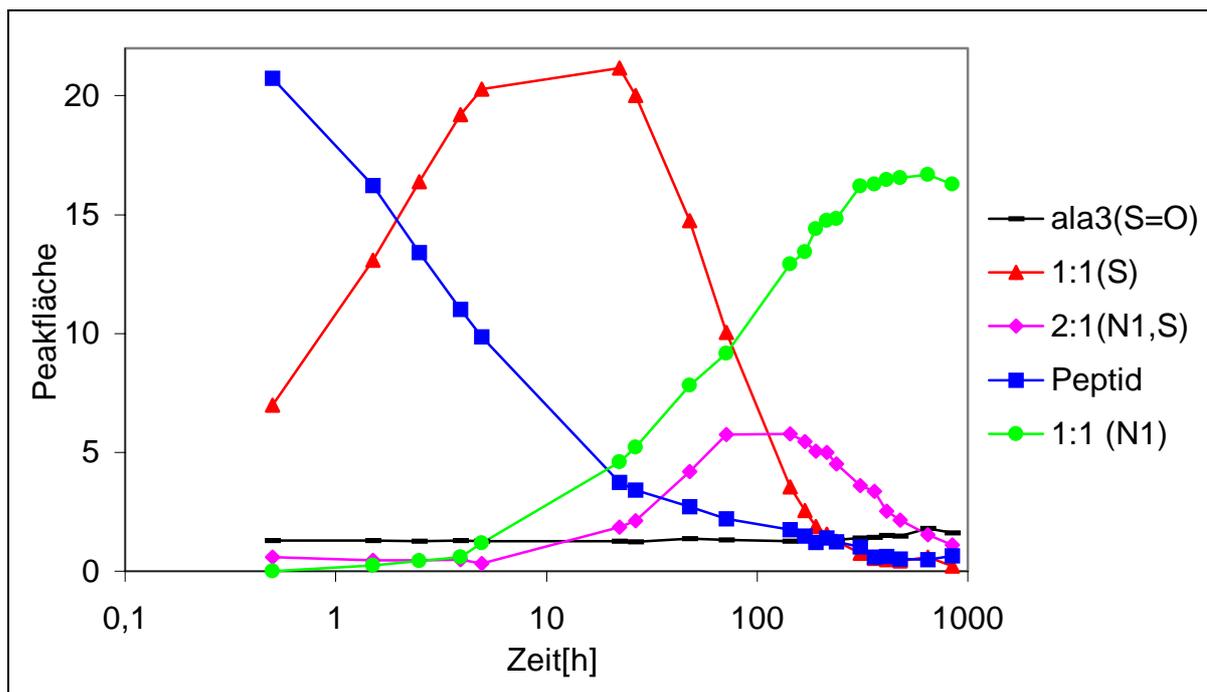


Abb. 5.4: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$ (1:1); $pH = 8,0$

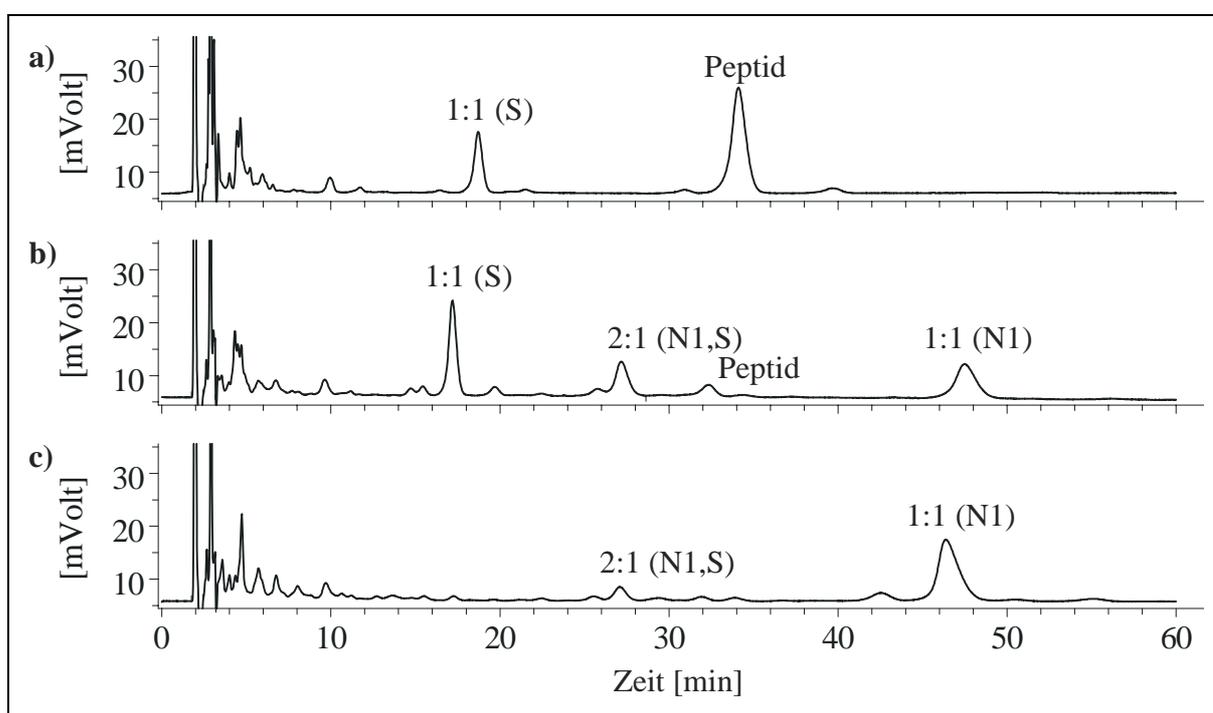


Abb. 5.5: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(dien)H_2O]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$; 38% MeOH; 0,1% PFP; 20°C; $t =$ Reaktionszeit $pH = 8,00$ a) $t = 0,5 h$ b) $t = 1,33 h$ c) $t = 479 h$

Da zu diesem Zeitpunkt der κS -Komplex nur noch in geringen Konzentrationen vorhanden ist, beruht hier der Reaktionsmechanismus offensichtlich auf einer indirekten Migration des $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ -Fragmentes vom Schwefel zum Imidazol N1 intramolekular über die $1\kappa N1:2\kappa S$ -koordinierte 2:1 Spezies.

Die in Abb. 5.6 dargestellte lineare zeitabhängige Produktverteilung lässt allerdings auf zwei zeitgleiche Reaktionswege schließen, um den thermodynamisch bevorzugten Imidazol N1 Komplex zu bilden.

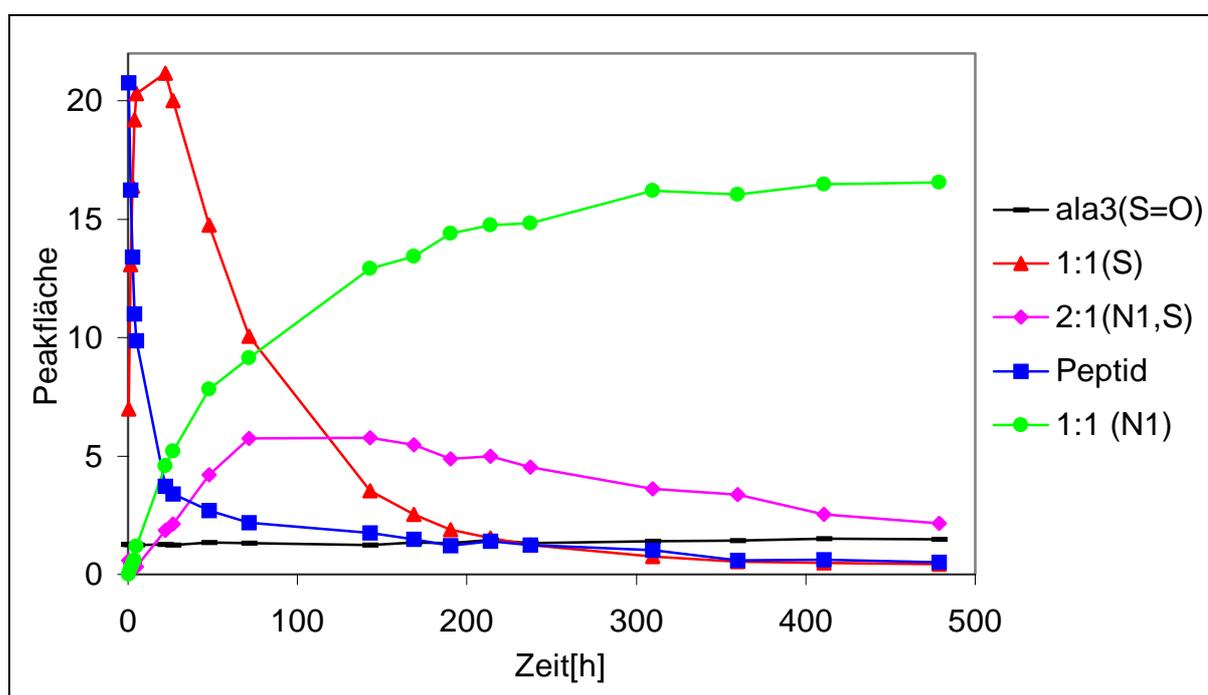


Abb. 5.6: Lineare zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+} / achis(ala)_3metNHPH$ (1:1); $pH = 8,0$

In beiden Fällen findet zuerst eine schnell Schwefelkoordination statt (Schritt a in Abb. 5.7), die von einer langsamen direkten intramolekularen Migration (Schritt b) zur Histidinseitenkette gefolgt ist. Alternativ kann die Koordination eines zweiten $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ -Fragmentes (Schritt c) über den 2:1 μ -N1,S Komplex, mit darauffolgender Spaltung (Schritt d) der instabileren Pt-S Bindung zum $\kappa N1$ Endprodukt führen.

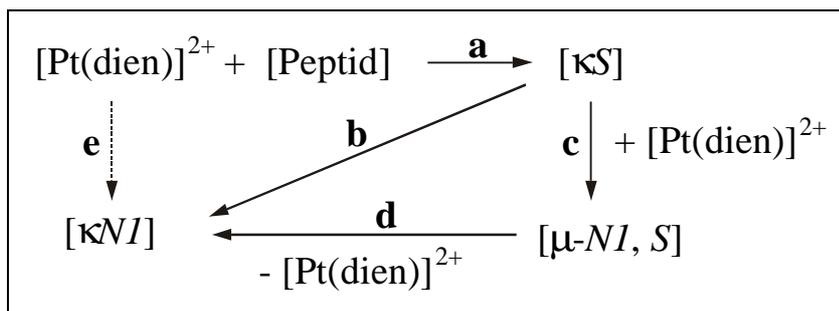


Abb. 5.7: Reaktionsweg der Bildung des Imidazol κNI -koordiniertem $[Pt(dien)]^{2+}$ Komplexes

Unter Annahme einer Kinetik 1. Ordnung für die beiden Schritte b und d ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{d[\kappa NI]}{dt} = k_b \cdot [\kappa S] + k_d \cdot [\mu - NI, S] \quad \dots (1)$$

Durch umstellen ergibt sich daraus:

$$\frac{d[\kappa NI]}{dt} \cdot \frac{1}{[\kappa S]} = k_b + k_d \cdot \frac{[\mu - NI, S]}{[\kappa S]} \quad \dots (2)$$

Die Konzentrationen der Spezies in Gleichung 2 wurden mit Hilfe der Peakflächen der getrennten Produkte bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm und des mit einem kleinsten Quadratsummenverfahrens berechneten molaren Absorptionskoeffizienten mit den Daten über den gesamten pH-Bereich bestimmt. Aus der Auftragung nach einer Kinetik 1. Ordnung ergibt sich eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,934 (Abb. 5.8). Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten liegen bei Werten von $k_b = 2.0 \cdot 10^{-6} s^{-1}$ und $k_d = 1.4 \cdot 10^{-6} s^{-1}$.

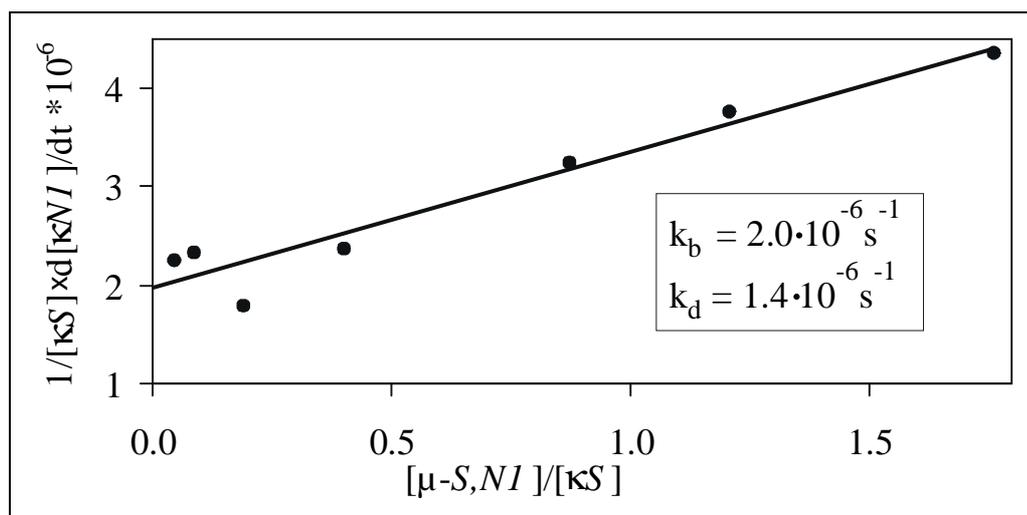


Abb. 5.8: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Bildung von $\kappa N1$ über die Reaktionsschritte b und d ($26,5 \text{ h} \leq t \leq 309,8 \text{ h}$)

Die zweite kinetische Untersuchung erfolgte mit einer Lösung bei einem pH-Wert von 5,1. Hier überwiegt der deutlich verlangsamte direkte Reaktionsweg von S zu N1 (Schritt b) im Gegensatz zur Kinetik bei pH = 8,0.

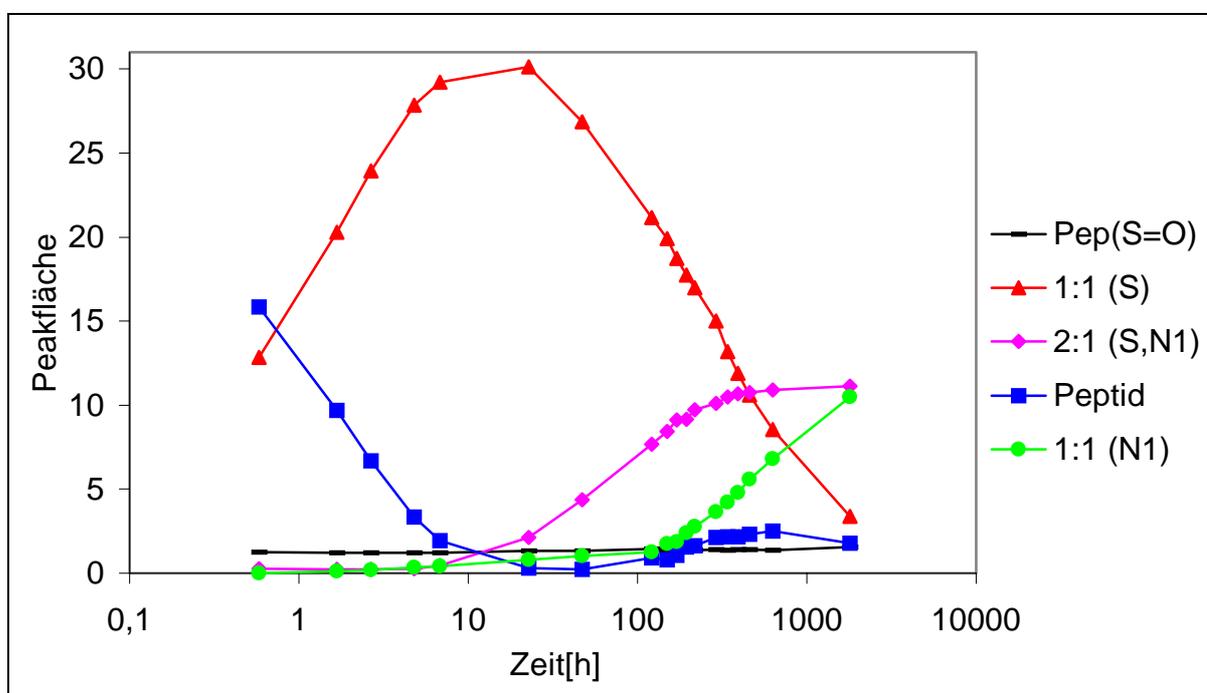


Abb. 5.9: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+} / \text{achis}(\text{ala})_3\text{metNHPH}$ (1:1); pH = 5,1

Die Konzentration der 2:1 Spezies bleibt nach 500 Stunden konstant, während das $\kappa N1$ Produkt zugunsten des κS Produktes gebildet wird. Die Reaktion ist nach einer Inkubationszeit von 1000 Stunden bei 40° C noch nicht beendet.

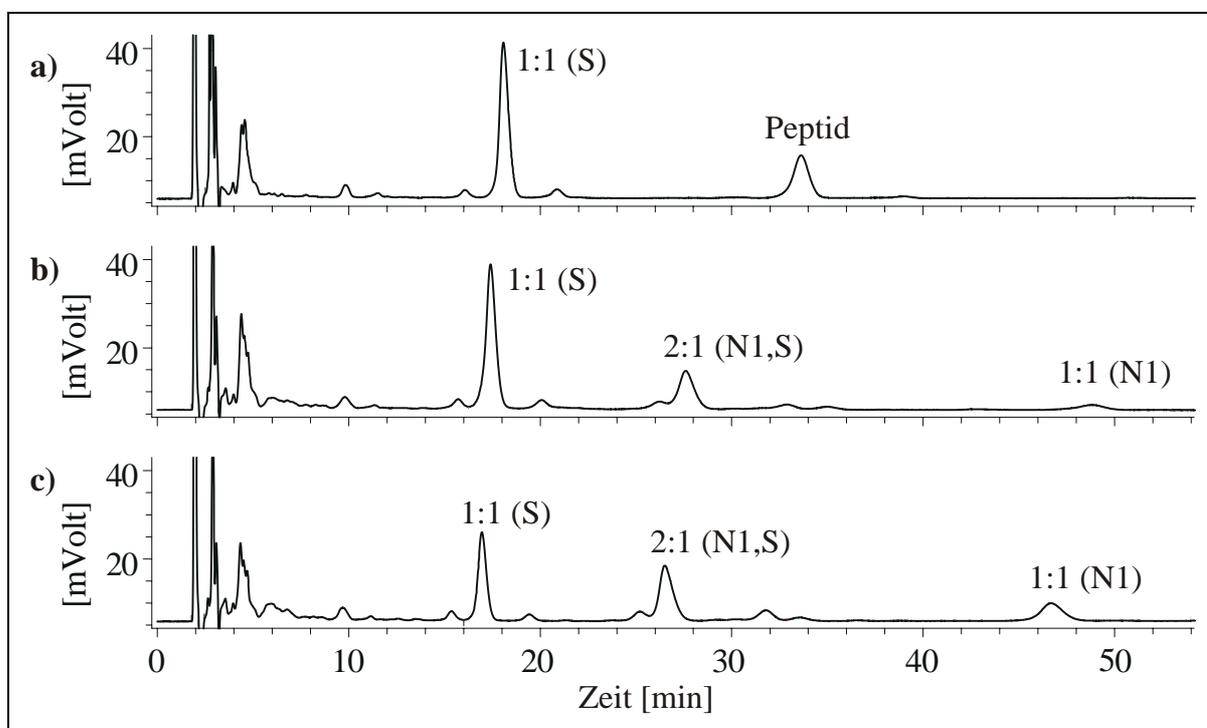


Abb. 5.10: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(dien)H_2O]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPe$; 38% MeOH; 0,1% PFP; 20°C; t = Reaktionszeit
t = 1,67 h b) $t = 149$ h c) $t = 461$ h

5.3 Charakterisierung der Komplexe

Die Charakterisierung der in dieser Arbeit beschriebenen Pt(II)-Peptidkomplexe erfolgte durch spektroskopische Untersuchung semi-präparativ mit der RPIP-Chromatographie isolierter Verbindungen. Die Koordinationsstellen wurden mit multinuklearer NMR-Spektroskopie (1H , ^{195}Pt , ^{15}N) bestimmt. Sowohl FAB- als auch ESI-massenspektroskopische Untersuchungen dienten zur Feststellung der Stöchiometrie und Molmasse der Komplexe. Zum Vergleich identischer Koordinationsmodi am Platin mit verschiedenen Peptiden wurden bei gestopptem Fluss UV-Spektren mit Hilfe des UV-Detektors des Chromatographen registriert. Die Reinheit aller zur Charakterisierung verwendeten NMR-Proben wurde vor und nach den Messungen chromatographisch überprüft, um Zerfall oder Umlagerung der Produkte auszuschließen. Die Zuordnung der 1H -NMR-Signale der jeweiligen Protonen beruht bei fast allen Verbindungen auf der Auswertung zweidimensionaler $^1H^1H$ -COSY-NMR-Spektren. Als aussagekräftige 1H -NMR-Resonanzen gegenüber den benachbarten Donoratomen dienen die Methylgruppe des Methionins und die Imidazolprotonen H2 und H5 des Histidins. Das Singulett der S-CH₃ Thioethergruppe wird im Falle einer Koordination von ca. 2,1 ppm zu 2,5 ppm hin verschoben. Zur Bestimmung des Koordinationsmodus der Histidinseitenkette kann nicht nur die chemische Verschiebung dienen, sondern auch die Auswertung der heteronuklearen Kopplung zwischen ^{195}Pt und 1H bei niedrigen Feldstärken (80 MHz) genutzt werden. Durch skalare Kopplung wird ein der natürlichen Häufigkeit von 33% entsprechender Teil eines Signals im 1H -NMR zu einem Dublett aufgespalten, während 66% der Signalintensität unverändert bleiben. Die Grösse der Kopplungskonstante ist abhängig von der Anzahl der Atome zwischen denen wo die Kopplung auftritt. Eine N1-Koordination liegt vor, wenn beide Kopplungskonstanten von H2 und H5 gleichgroß sind (ca. 18-22 Hz). Im Falle einer N3-Koordination ergeben sich unterschiedliche Entfernungen und somit verschiedene Kopplungskonstanten. Die $^3J(^{195}Pt-^1H)$ Kopplungskonstante an H2 bleibt gleich (18 - 20 Hz), während die $^4J(^{195}Pt-^1H)$ Kopplungskonstante von H5 sich auf 8 Hz verringert [151, 97, 152, 153]. Um zweifelsfrei die koordinierten Donoratome am Platinzentrum zu belegen werden ^{195}Pt -NMR-Spektren aufgenommen, die eine genaue Aussage über Art und Anzahl der bindenden Atome liefern. Als Indiz für die Beteiligung der terminalen Amino- oder Carboxylatgruppe kann die Verschiebung der α -Protonen gegenüber der Resonanz des freien

Peptides dienen. Im Falle einer Sauerstoffkoordination verschiebt sich die Resonanz des benachbarten α -CH zu tiefen Feld, während die α -Protonen nahe der Aminogruppe durch Koordination zu höherem Feld verschoben werden.

Die Charakterisierung der drei Reaktionshauptprodukte des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPPh erfolgte durch die Untersuchung der semi-präparativ getrennten Produkte. Das im sauren pH-Bereich dominierende Produkt der 1:1 Verteilung ist die monodentate schwefelkoordinierte $[Pt(dien)\{achis(ala)_3metNHPPh-\kappa S\}]^{3+}$ -Spezies.

Durch den deutlich Tieffeldshift der Methylprotonen der Thioetherfunktion um +0,45 ppm gegenüber den Resonanzen des freien Peptides wird dieses belegt. Die als weitere Koordinationsstelle in betracht kommenden Imidazolstickstoffe N1 und N3 der Histidinseitenkette bleiben unkoordiniert. Im ¹H-NMR-Spektrum des κS -Komplexes zeigen beide H2 und H5 Protonen mit einer Verschiebung von 8,60 ppm und 7,29 ppm die gleiche Verschiebung wie das unkoordiniertem Peptid bei einem pH*-Wert von 1,2. Die Zuordnung aller weiteren Protonen erfolgte mittels zweidimensionaler ¹H-¹H-COSY-Spektren.

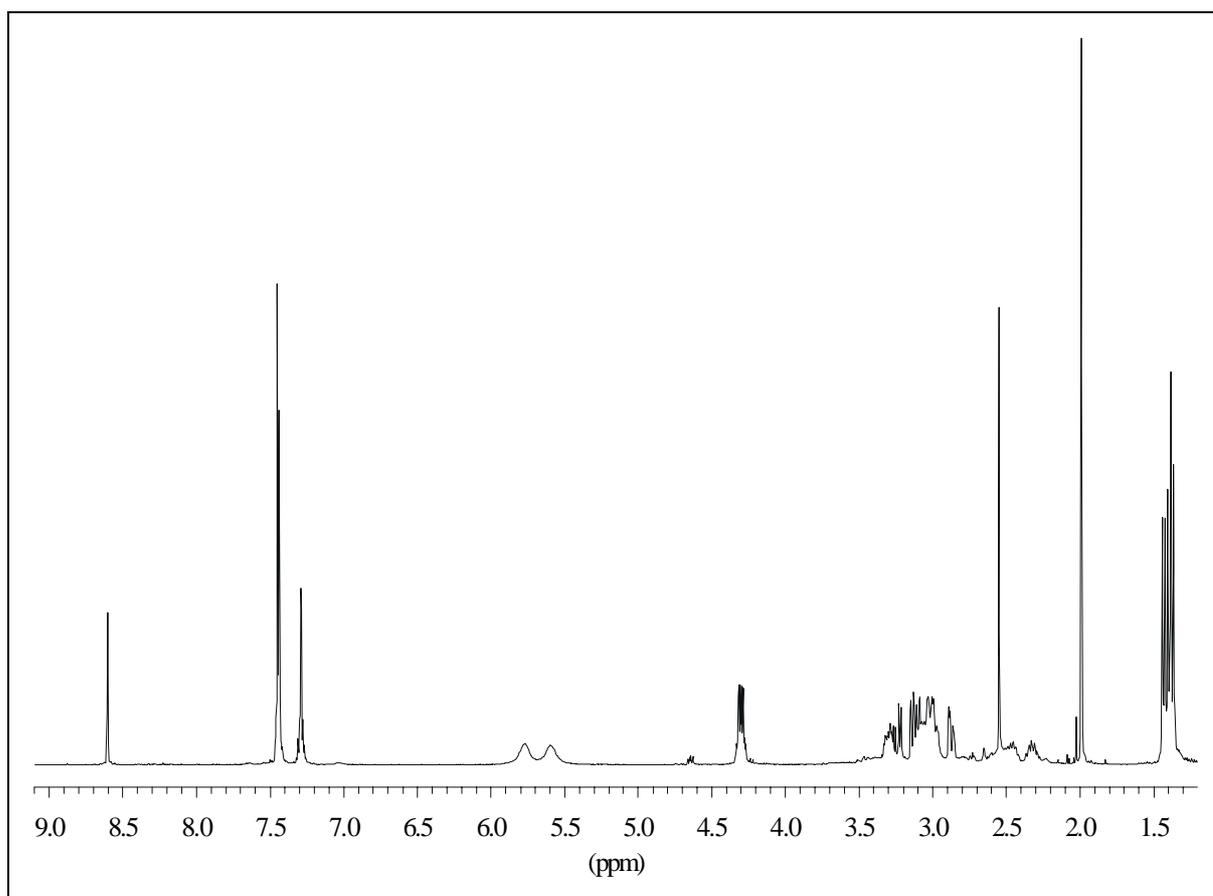


Abb. 5.11: ¹H-NMR-Spektrum von $[Pt(dien)\{achis(ala)_3metNHPPh-\kappa S\}]^{3+}$ (400 MHz)

Im ^{195}Pt -Spektrum weist ein Peak mit einer Verschiebung von -3385 ppm eindeutig auf die N_3S -Umgebung des $Pt(II)$ hin, die durch die drei Stickstoffe des dien-Liganden und das Schwefelatom des Peptides erzeugt wird. Als vergleichbare chemische Verschiebung mit tridentaten Liganden wird von REEDIJK et al. für den schwefelkoordinierten $Pt(dien)^{2+}$ -Komplex mit GSMe ein Wert von -3358 ppm angegeben [91]. WOLTERS konnte für $[Pt(dien)\{hisglymet-\kappa S\}]^{3+}$ und FRÖHLING für $[Pt(dien)\{hismet-\kappa S\}]^{3+}$ die chemischen Verschiebungen von -3385 ppm und -3378 ppm ermitteln [73, 71].

Auch die massenspektrometrische Analyse unterstützt den Befund einer monomolekularen Koordination mit einem Molekülionenpeak bei $m/z = 913$ (100%) und den beiden Fragmentierungsprodukten $[1:1-NHPh]^+$ $m/z = 819$ (21%) und $[1:1-achis]^+$ $m/z = 777$ (7%).

Die im basischen pH-Bereich der Produktverteilung dominierende Imidazol N1 koordinierte Komplexverbindung reagierte aufgrund des sauren pH-Wertes nach der semi-präparativen Trennung teilweise zum κS Produkt und ließ sich aus dem Vergleich der beiden Spektren charakterisieren. Das $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ -Fragment ist in diesem Fall nicht über den Schwefel gebunden, da die Methylgruppe der Thioetherseitenkette keine Verschiebung ($\delta = 2,12$) aufweist. Eine Koordination einer der Imidazolstickstoffe ist deutlich an dem starken Hochfeldshift um $-0,75$ ppm für H2 und $-0,42$ ppm für H5 zu erkennen.

Die genaue Koordinationsstelle im Imidazolring wurde durch Aufnahme eines 80 MHz-NMR-Spektrums festgestellt. In Tabelle 5.2 sind u.a. die $^3J(^{195}Pt-^1H)$ Kopplungskonstanten für den Komplex $[Pt(dien)\{achis(ala)_3metNHPh-\kappa N1\}]^{2+}$ zu finden. Da beide Kopplungskonstanten 18 Hz betragen liegt eine N1 Koordination vor. Die noch verbleibende Signalgruppenzuordnung erfolgte durch ein $^1H^1H$ -COSY-Spektrum.

Die chemische Verschiebung im ^{195}Pt -Spektrum von -2867 ppm entspricht einer N_4 -Umgebung. Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem von APPELTON et al. angegebenen Bereich von -2800 bis -2900 ppm. Ähnliche Werte fand FRÖHLING für die $\kappa N1$ koordinierten Komplexe der Reaktion von $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ mit den Dipeptiden cyclo-hismet, hismet und methis bei ca. -2860 ppm [71]. Die 1:1 Stöchiometrie des Komplexes wird durch den Molekülionenpeak bei einer Masse von $m/z = 913$ bestätigt.

Tab. 5.2: Chemische Verschiebungen der $Pt(dien)H_2O]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPPh$ Komplexe

Signalzuordnung	κS	κNI	$1\kappa S:2\kappa NI$
H2 $^3J(^1H-^{195}Pt)$	8.60(s)	7.85(s) 18 Hz	7.87(s) 19 Hz
H5 $^3J(^1H-^{195}Pt)$	7.29(s)	6.87(s) 18 Hz	6.87(s) 19 Hz
α_{his}	4.64(m)	4.56(m)	4.54(m)
β_{his}	3.10, 3.24(dd)	3.04, 3.12(m)	3.10, 3.24(m)
α_{met}	4.7(m)	4.6(m)	4.69(m)
β_{met}	2.30, 2.46(m)	2.27, 2.41(m)	2.31, 2.45(m)
γ_{met}	2.87, 2.98(m)	2.61, 2.68(m)	2.87, 2.97(m)
δ_{met}	2.55(s)	2.12(s)	2.55(s)
α_{ala}	4.3(m)	4.3(m)	4.3(m)
β_{ala}	1.4(m)	1.41(m)	1.42(m)
Ac	1.99(s)	1.98(s)	1.97(s)
Phenyl	7.29, 7.44, 7.45(3m)	7.29, 7.44, 7.44(3m)	7.29, 7.44, 7.45(3m)
Dien	2.8 – 3.4	2.8 – 3.4	2.8 – 3.4
^{195}Pt	-3385	-2867	-2869, -3386
pH*-Wert	1.2	1.5	1.8

Das binukleare $[Pt(dien)]_2achis(ala)_3metNHPPh-1\kappa N1:2\kappa S]^{4+}$ Produkt konnte auch durch die semi-präparative Trennung in ausreichender Reinheit zur vollständigen Charakterisierung erhalten werden. Im 1H -NMR-Spektrum ist eine deutliche Verschiebung der Methylprotonen der Thioethergruppe von +0,45 ppm zu tiefen Feld zu sehen, die durch eine Koordination des $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ an den Schwefel der Methioninseitenkette zu erklären ist.

Die Imidazolsignale von H2 bei 7,87 ppm und H5 bei 6,87 ppm stimmen mit denen des mononuklearen $\kappa N1$ Komplexes genau überein und legen die Vermutung einer N1-Koordination nahe. Diese kann erwartungsgemäß mit einem 80 MHz-NMR-Spektrum und der Kopplungskonstanten von $^3J(^{195}Pt-^1H) = 19$ Hz bestätigt werden.

Das in Abb. 5.12 dargestellte ^{195}Pt -Spektrum zeigt zwei Signale bei -2869 ppm und -3386 ppm und bestätigt den binuklearen Koordinationsmodus. Sämtliche NMR-spektroskopischen Daten sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst dargestellt.

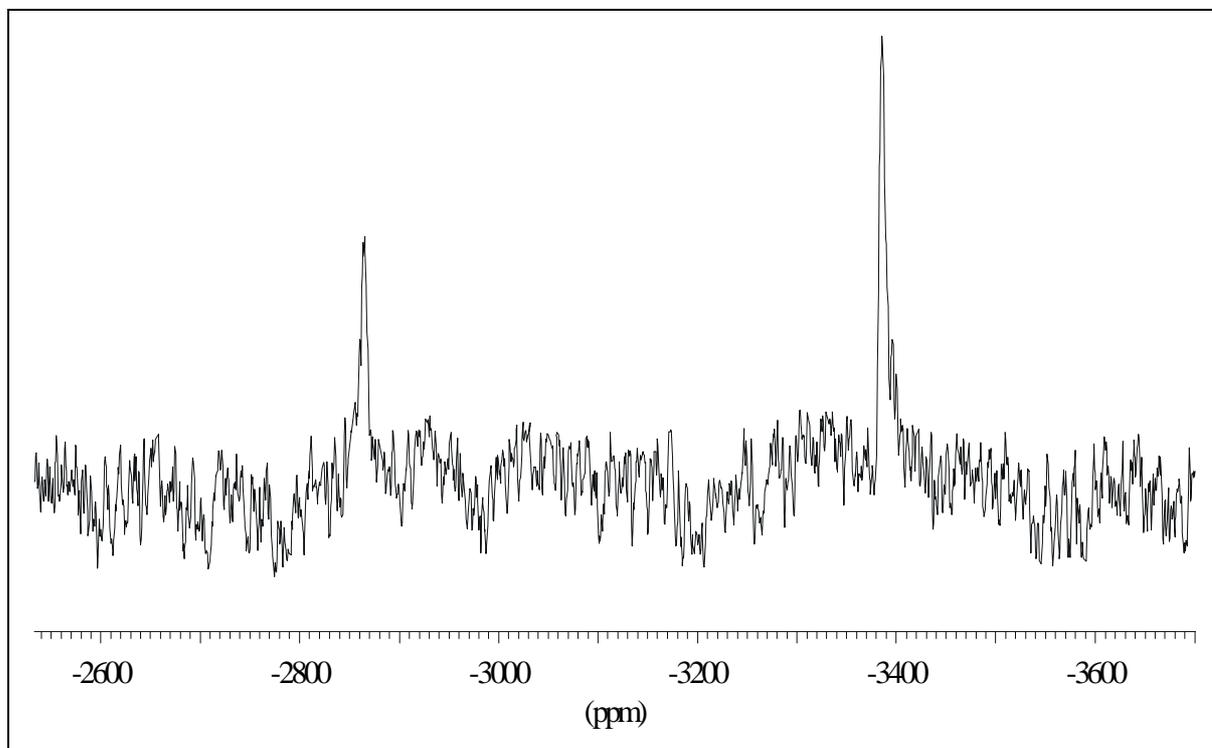


Abb. 5.12: ^{195}Pt -NMR-Spektrum von $[Pt(dien)\{achis(ala)_3metNHPH-1\}K_2]^{4+}$
(400 MHz)

Im FAB-Massenspektrum ist sowohl der 2:1 Molekülionenpeak bei $m/z = 1210$ (100%) und die Fragmentierung zum 1:1 Komplex mit einer Masse von $m/z = 913$ (50%), als auch die Adduktbildung mit der in der semi-präparativ verwendeten Pentafluorpropionsäure zu $[2:1+1PFP]^+$ $m/z = 1373$ (18%) und $[2:1+2PFP]^+$ $m/z = 1537$ (15%) zu sehen.

Die Strukturen der drei charakterisierten Reaktionsprodukte sind in Abb. 5.13 dargestellt.

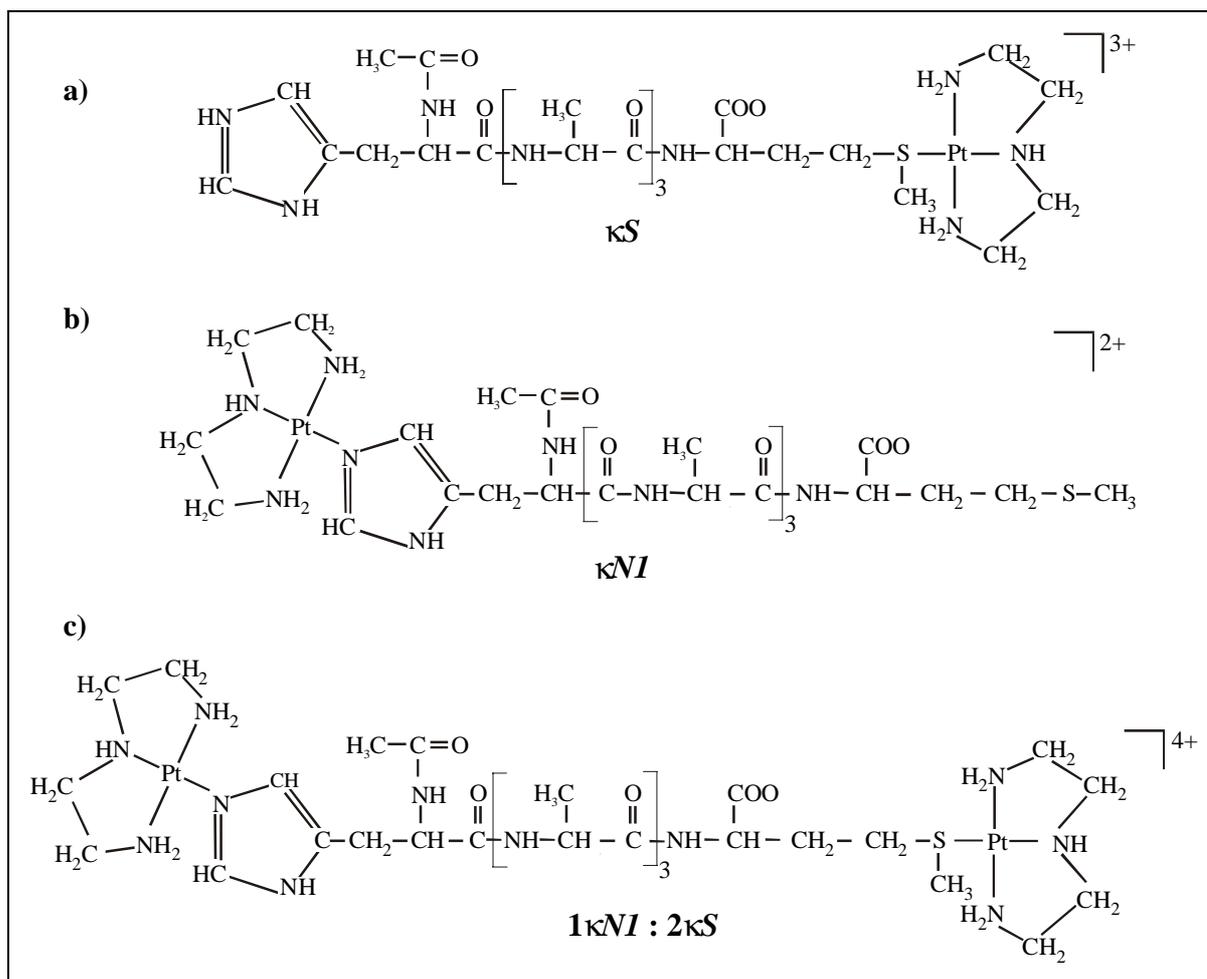


Abb. 5.13: Strukturen von a) $[Pt(dien)achis(ala)_3metNHPh-\kappa S]^{3+}$
 b) $[Pt(dien)achis(ala)_3metNHPh-\kappa NI]^{2+}$
 c) $[Pt(dien)_2achis(ala)_3metNHPh-1\kappa NI:2\kappa S]^{4+}$

5.4 Diskussion

Vergleich der Reaktionen von $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ mit den Peptiden hismethH, hisglymethH und achis(ala)₃metNHPH

In diesem Abschnitt werden die Reaktionen des $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ -Fragmentes mit histidin- und methioninhaltigen Peptiden unterschiedlicher Kettenlänge betrachtet. Es werden sowohl das von FRÖHLING untersuchte Dipeptid hismethH, als auch die von WOLTERS beschriebenen Reaktionen mit dem Tripeptid hisglymethH, den Ergebnissen des Pentapeptids achis(ala)₃metNHPH aus dieser Arbeit gegenübergestellt [71, 73].

Eine vergleichende Betrachtung der drei pH-abhängigen Verteilungskurven im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 verdeutlicht die große Übereinstimmung in den einzelnen Produktkurven.

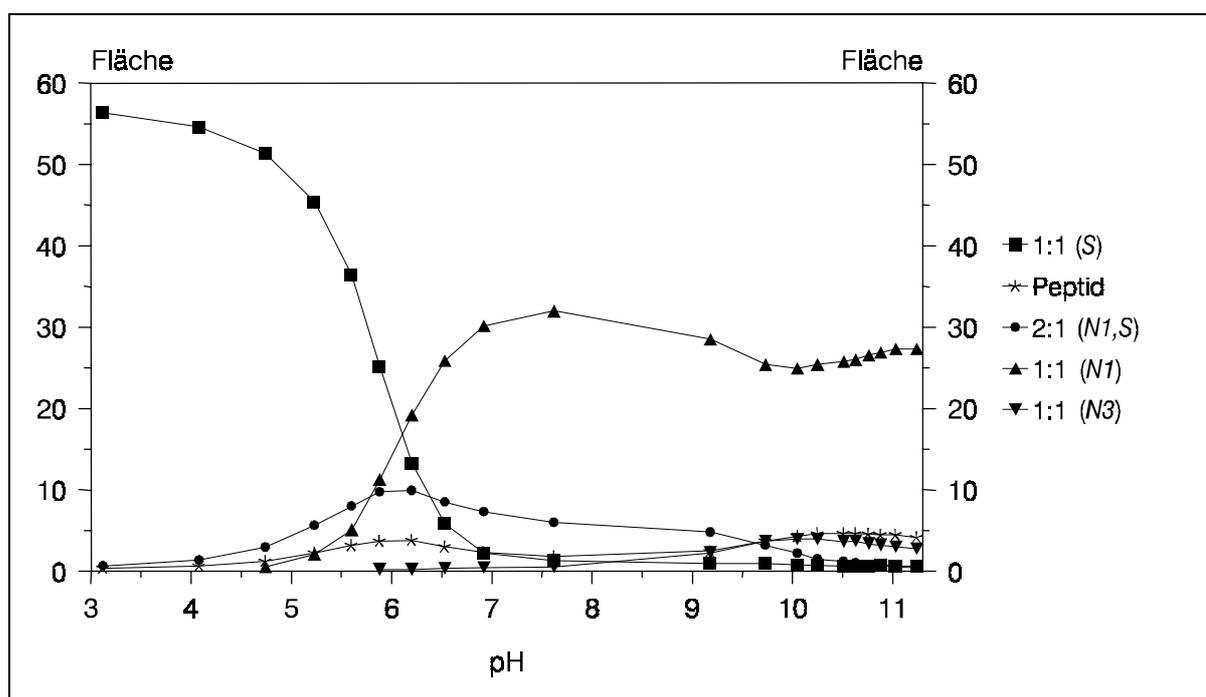


Abb.5.14: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hismethH; (1:1)

Im stark sauren pH-Bereich bei pH-Werten um 3 bildet sich nur die schwefelkoordinierte Spezies, die bis zu einem pH-Wert von 5,5 dominiert und ab $pH > 7$ nur noch in geringen Mengen detektiert werden kann. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von SADLER et. al.,

der als einziges stabiles Reaktionsprodukt von $[Pt(dien)Cl]^+$ mit der Aminosäure Methionin bei $pH = 3$ die schwefelkoordinierte Spezies beschreibt [154]. Die Produktverteilungskurven der schwefelkoordinierten Spezies zeigen aber auch Unterschiede im Verlauf. Im System $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hismetH bleibt die Konzentration bis $pH = 5$, im System mit $achis(ala)_3metNHPH$ bis zu einem pH -Wert von 4 konstant, während im $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hisglymetH – System die Konzentration des κ -S-Produktes mit steigendem pH -Wert linear abnimmt. Die κ -N1-kordinierten Komplexe steigen oberhalb von $pH = 4$ auf die maximale Peakfläche, die bei einem pH -Wert von 7 bis 8 erreicht wird, an. Der Anstieg erfolgt im $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hismetH –System erst bei $pH = 5$. Ab $pH > 8$ konnte FRÖHLING im Reaktionssystem des Dipeptides hismetH eine leichte Abnahme der κ -N1-Spezies und ab $pH > 10$ wieder eine Zunahme feststellen [98]. Im Reaktionssystem des Tripeptides hisglymetH bei WOLTERS zeigte sich dagegen eine kontinuierliche Abnahme und eine parallel dazu verlaufende Zunahme des Peptides und der Platinhydroxospezies. In dem in dieser Arbeit untersuchten Pentapeptid $achis(ala)_3metNHPH$ ist eine vollständige Abnahme der κ -N1-Spezies bis $pH = 10,5$ und damit verbunden eine Zunahme des Ausgangspeptides zu finden.

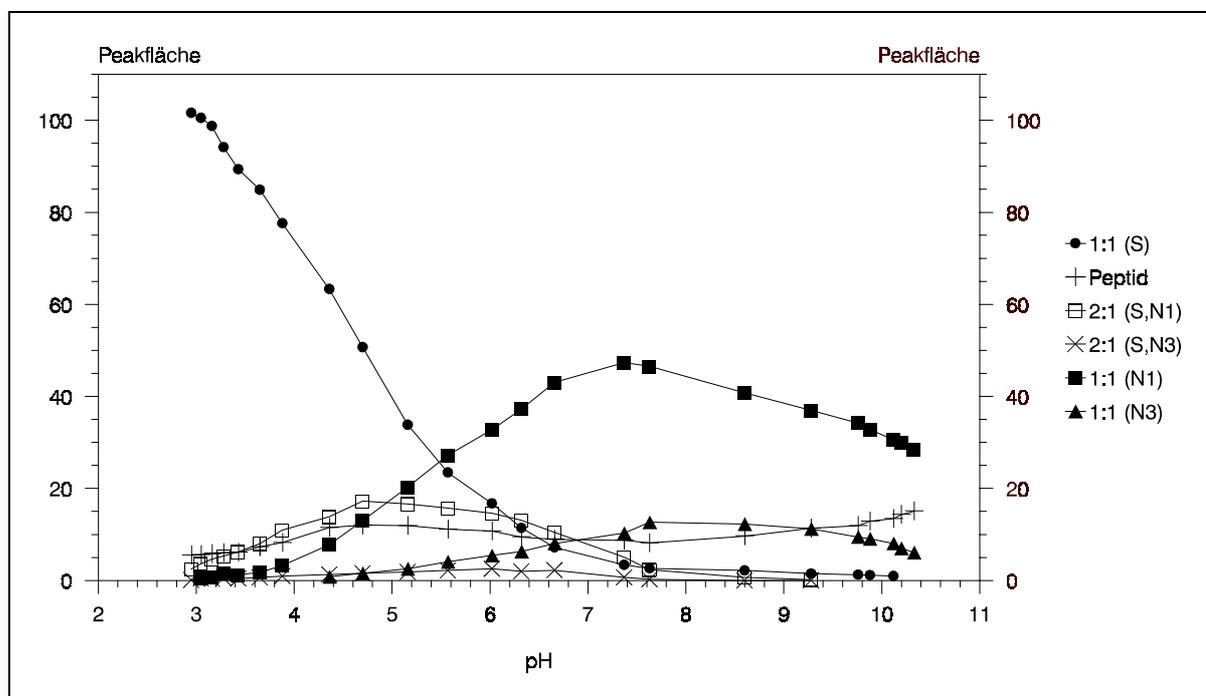


Abb. 5.15: pH -abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hisglymetH, (1:1)

Die Schnittpunkte der κ -S und κ -N1-koodinierten Spezies sind bei den Systemen $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ mit den längerkettigen Peptiden hisglymetH und achis(ala)₃metNHPH bei pH = 5,5 zu finden, während dieser für das System mit hismet um eine halbe pH-Einheit höher bei pH = 6,0 liegt. An dieser Stelle lassen sich auch die Peakmaxima der 2:1(1 κ S:2 κ N1) Produkte ermitteln. Diese 2:1 Spezies kann im System des Pentapeptides in signifikant größeren Mengen im Gegensatz zu den anderen beiden Peptiden nachgewiesen werden. In allen drei pH-Verteilungskurven wird die überraschend starke Bevorzugung κ -N1-koodinierten Spezies gegenüber der κ -N3-koodinierten Verbindung deutlich.

Tab. 5.3: N3:N1 – Isomerenverhältnis der monodentat koordinierten Histidinverbindungen

Verbindung	N1 : N3	pH-Wert
Pt(dien)(hismetH)	50 : 1	7,6
Pt(dien)(hisglymetH)	5 : 1	7,6

Im $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPH-System konnte der κ -N3-koodinierte Komplex nicht detektiert werden und verdeutlicht somit die Bevorzugung des κ -N1-koodinierten Produktes.

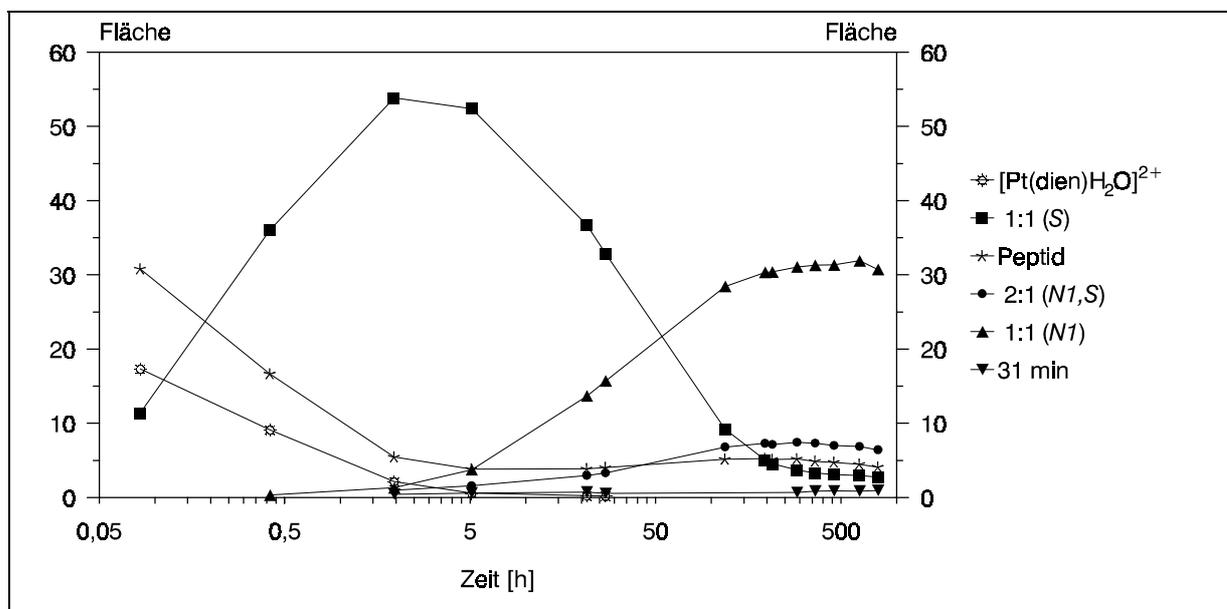


Abb. 5.16: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hismetH; pH = 6,52

Bei den kinetischen Untersuchungen des Reaktionsverlaufes ($pH \approx 7$) der drei Systeme stimmen interessanterweise nur die $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hismetH und hisglymetH Systeme nahezu vollständig überein. Sowohl der schnelle Anstieg der schwefelkoordinierten Spezies, als auch die nach 10 Stunden einsetzende Migration vom Schwefel zum Imidazol N1 ist annähernd identisch. Nach 200 Stunden verändern sich die Peakflächen nur noch unwesentlich, sodass von einem thermodynamischen Gleichgewicht ausgegangen werden kann. Im Gegensatz hierzu verdeutlicht die zeitabhängige Produktverteilung des Pentapeptides achis(ala)₃metNHPH mit dem Maximum des Zwischenproduktes nach 100 Stunden und dem thermodynamisch stabilen κ -N1- Endprodukt nach 1000 Stunden den in Abb. 5.7 dargestellten Reaktionsweg über den 2:1 Komplex. Aus kinetischen Untersuchungen bei $pH = 5$ überwiegt der zweite Reaktionsweg und zwar direkt von S zum N1 der Histidinseitenkette [99].

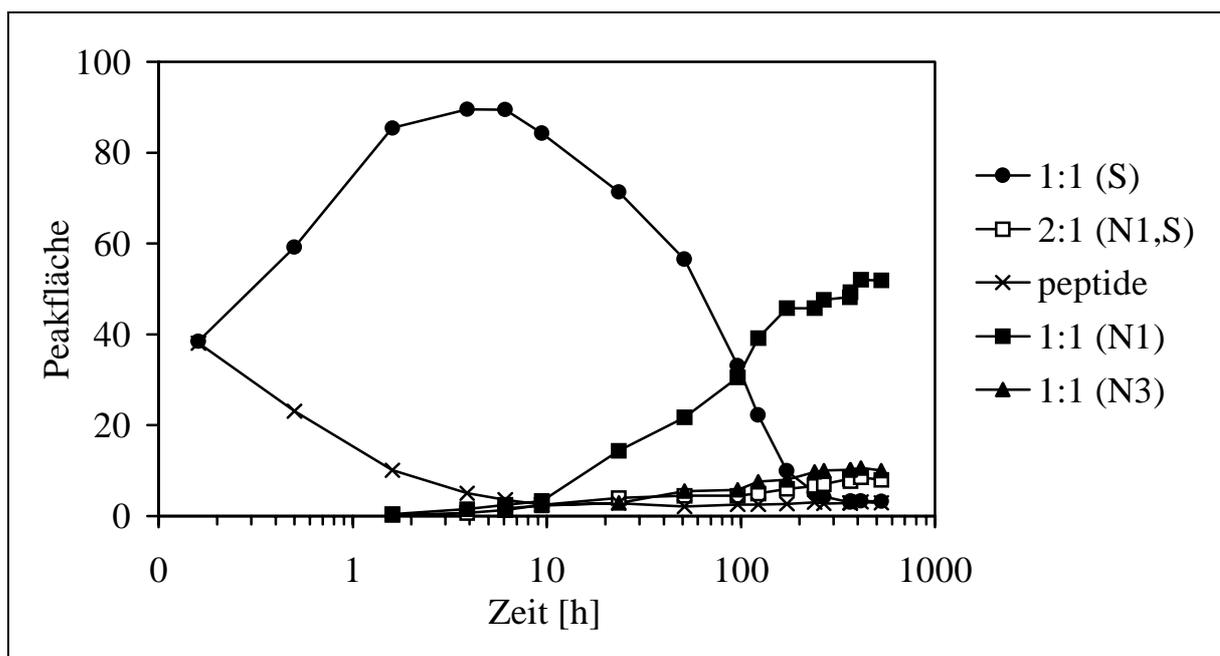


Abb. 5.17: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ / hisglymet (1:1); $pH = 7,98$

WOLTERS und SADLER et. al. haben gezeigt, dass an $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ gebundenes Methionin unabhängig von pH-Wert, Reaktionszeit und Stöchiometrie nicht durch Histidin oder N-Acetyhistidin substituiert werden kann [47, 97]. In Abb. 5.18 ist die pH-abhängige Produktverteilung der intermolekularen Konkurrenzreaktion von Histidin und Methionin um

die Koordination am $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ gezeigt. In diesem Fall ist die Bindung der Aminogruppe des Methionins anstelle der Thioetherfunktion an Pt(II) bei hohen pH-Werten zu beobachten. Die Histidinseitenkette spielt bei der Komplexbildung nur eine Nebenrolle, obwohl in intramolekularen Konkurrenzreaktionen die Präferenz des Platins für den Imidazolringes anstelle der NH_2 -Gruppe festgestellt wurde. Dies ist demnach ein Beweis für die Bevorzugung von intramolekularen Reaktionswegen wie der $S \rightarrow N1$ (Imidazol) Migration über den 2:1($1\kappa S:2\kappa N1$) Komplex.

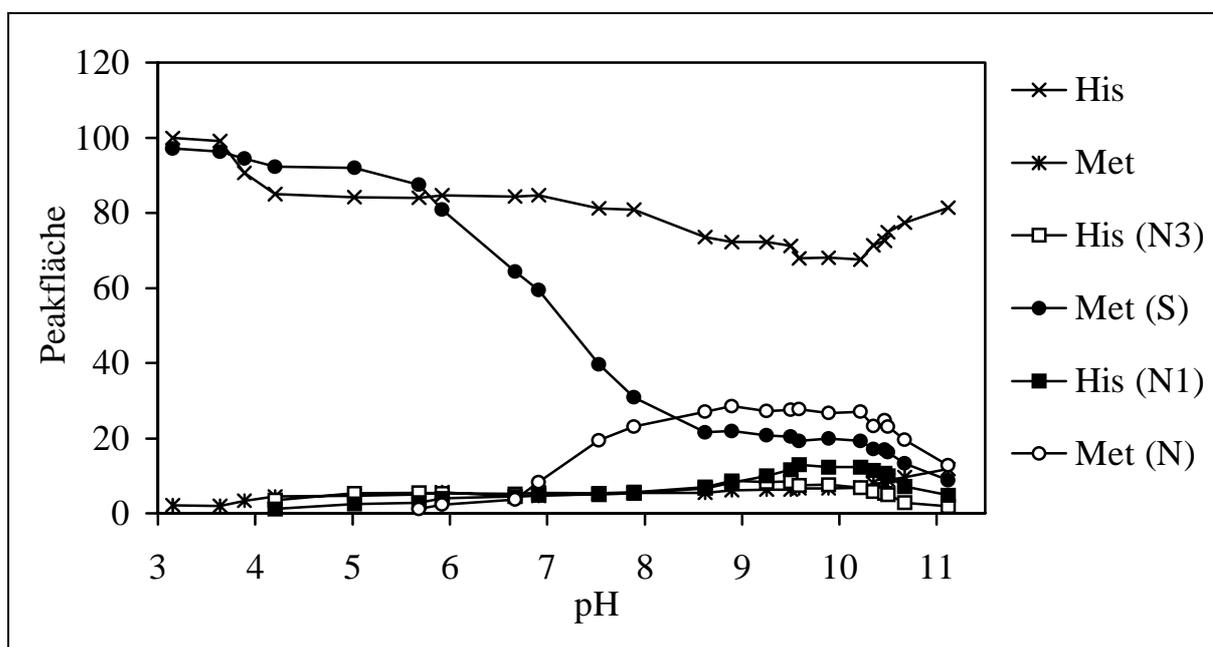


Abb. 5.18: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+} / hisH / methH (1:1:1)$

Das Koordinationsverhalten von $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ gegenüber den Di-, Tri- und Pentapeptiden hismethH, hisglymethH und achis(ala)₃metNHPH ist somit im Wesentlichen gleich.

Die intramolekulare Migration von der kinetisch bevorzugten Methioninseitenkette zum thermodynamisch stabileren Imidazol N1-Produkt spielt unabhängig von der Kettenlänge bei methionin- und histidinhaltenen Peptiden die Hauptrolle, auch wenn die Seitenketten durch eine unterschiedliche Zahl von Aminosäureresten voneinander getrennt sind. Bei der Wanderung des $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$ -Fragmentes tritt eine eindeutige Bevorzugung des Imidazol N1 gegenüber dem Imidazol N3 Stickstoff auf.

6 Reaktionen von $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$

6.1 Umsetzungen mit dem Tetrapeptid achis(ala)₂metNHPH

$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ wurde mit achis(ala)₂metNHPH im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 bei pH = 2,8 bis 10,4 umgesetzt. Die chromatographischen Trennungen konnten isokratisch mit einem Eluenten bestehend aus 30% MeOH und 0,1% PFP bei einer Temperatur von 25° C innerhalb von 70 min durchgeführt werden. Die in den ersten 10 min auftretenden Peaks wurden mit einer niedrigen Methanolkonzentration aufgetrennt und anhand von bei gestopptem Fluss aufgenommenen UV-Spektren als Verunreinigungen aus dem Peptid bestimmt, da sie deutlich unterschiedliche UV-Absorptionen gegenüber den Platin-Peptid-Komplexen aufwiesen. Die Beispielchromatogramme in der nachfolgenden Abb. 6.1 verdeutlichen die Elutionsreihenfolge der entstandenen Produkte.

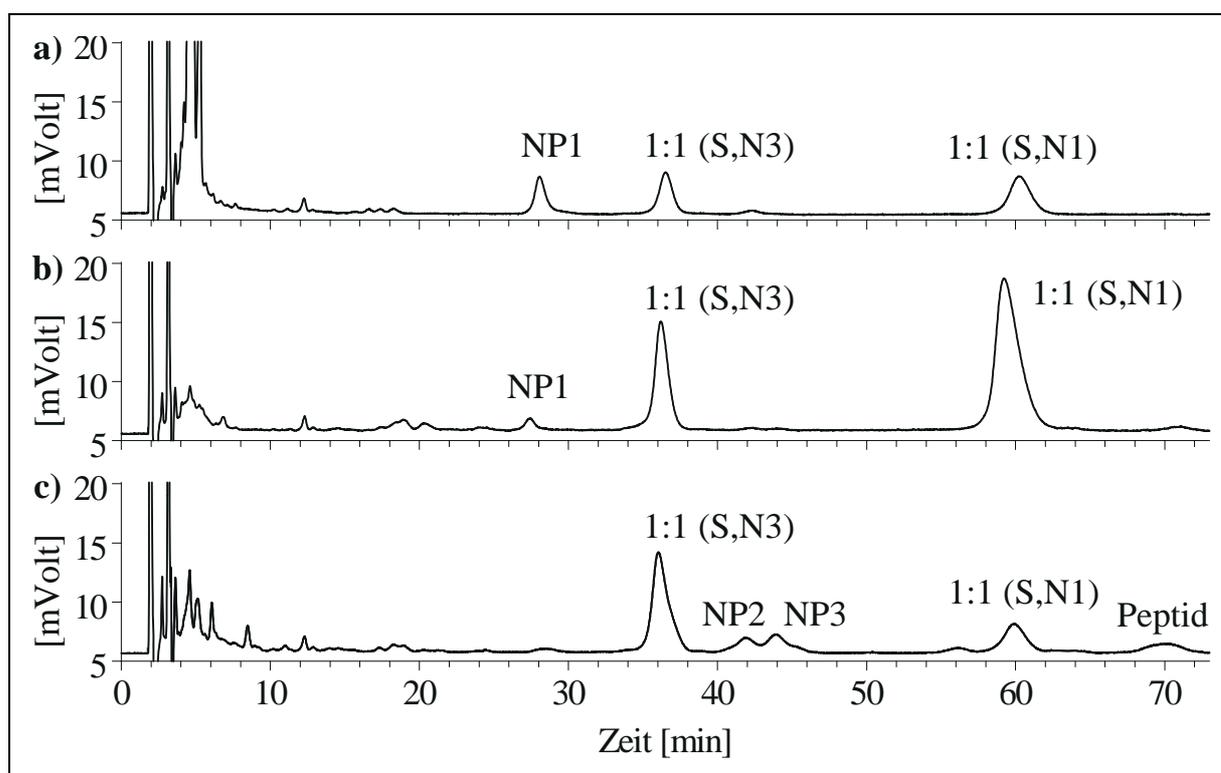


Abb. 6.1: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ / achis(ala)₂metNHPH ; 30% MeOH; 0,1% PFP; 25°C
 a) pH = 3,03 b) pH = 7,12 c) pH = 9,66

6.1.1 pH-abhängige Produktverteilung

Die äquimolare Umsetzung von $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit $achis(ala)_2metNHPH$ führt zu den zwei über den gesamten pH-Bereich vorhandenen κ -S, $N_{imidazol}$ -koordinierten Hauptprodukten und zur Bildung von drei Nebenprodukten. Die κ -S, $N1$ -Spezies dominiert die pH-Verteilung ab $pH > 3$ bis $pH = 8,8$ und besitzt zwischen $pH = 3$ und $pH = 7$ ihre maximale Peakfläche. Die Konzentration des parallel verlaufenden κ -S, $N3$ -Komplex ist in diesem Bereich nur halbsogross. Im Basischen ab $pH > 9$ dominiert jedoch diese Spezies und nimmt dann ab pH-Werten größer als 10 langsam ab. Die beiden in geringen Konzentrationen vorhandenen Nebenprodukte NP2 und NP3 bilden sich ab $pH = 8$ und durchlaufen ihr Maximum bei $pH = 10$. Das im Sauren ab $pH < 6$ entstehende NP1 liegt zwischen $pH = 3$ und 5 in konstant geringer Konzentration vor.

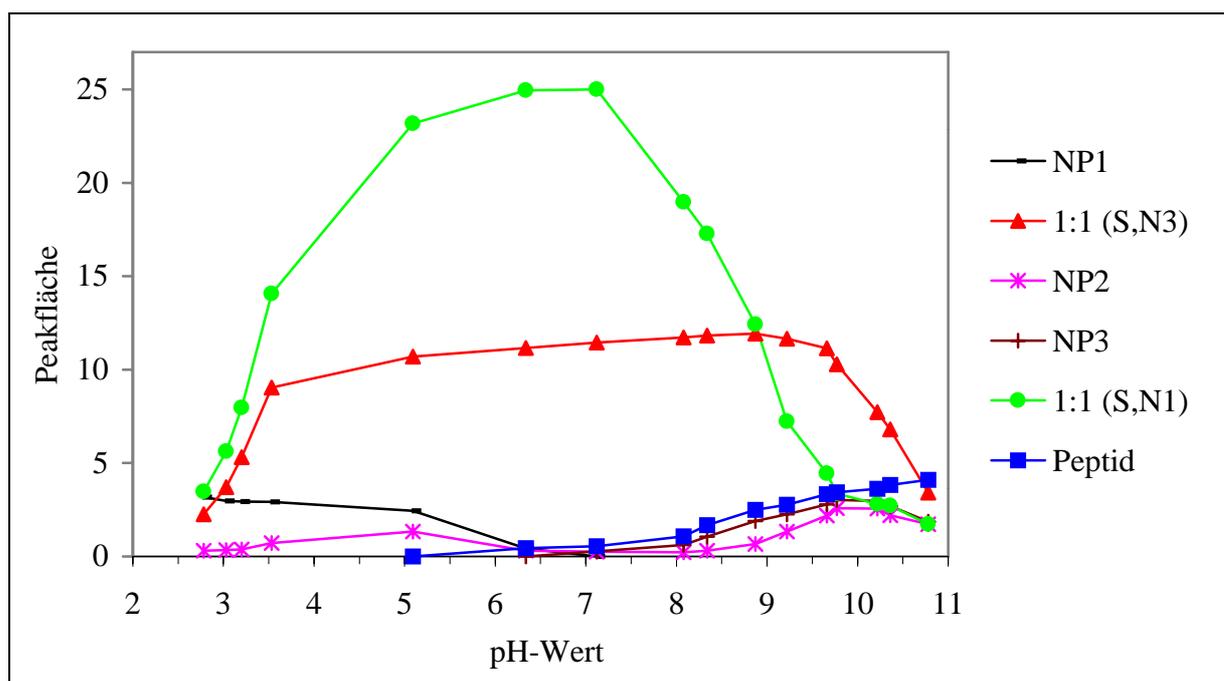


Abb. 6.2: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $achis(ala)_2metNHPH$ (1:1); Reaktionszeit $t = 3$ Wochen

6.1.2 Kinetische Untersuchungen

Für die zeitabhängige Untersuchung wurden zwei Ansätze mit 1:1 Stöchiometrie im sauren Medium bei $pH = 3,65$ und im Neutralen bei $pH = 6,82$ betrachtet. Im Sauren bildet sich sofort der κ^2-S,N_M -Komplex, der nach 2 h sein Maximum durchläuft und dann langsam abnimmt und nach einer Woche nicht mehr detektierbar ist. Aus diesem Vorläuferprodukt entstehen parallel nach einer Reaktionszeit von 30 min die beiden $\kappa^2-S,N_{Imidazol}$ -koordinierten Hauptprodukte. Diese erreichen schon nach 48 h ihre maximale Konzentration und sind nach 1000 h noch stabil. Das Nebenprodukt NP1 ist zu Reaktionsbeginn und im gesamten Verlauf in gleichbleibender Konzentration vorhanden. Es könnte sich hierbei vielleicht um das bei der Peptidsynthese entstandene reaktionsträge am Schwefelatom oxidierte Peptid oder einen damit reagierten Platinkomplex handeln.

In der zeitlichen Peakflächenverteilung bei $pH = 6,82$ erfolgte die Reaktion deutlich schneller. Das κ^2-S,N_M -Vorläuferprodukt besitzt ein kleineres Maximum nach 30 min und ist schon nach 4 h nicht mehr detektierbar. Die beiden $\kappa-S,N_{Imidazol}$ -Produkte bilden sich von Reaktionsbeginn an und erreichen nach 24 h eine von diesem Zeitpunkt an gleichbleibende Konzentrationsmenge.

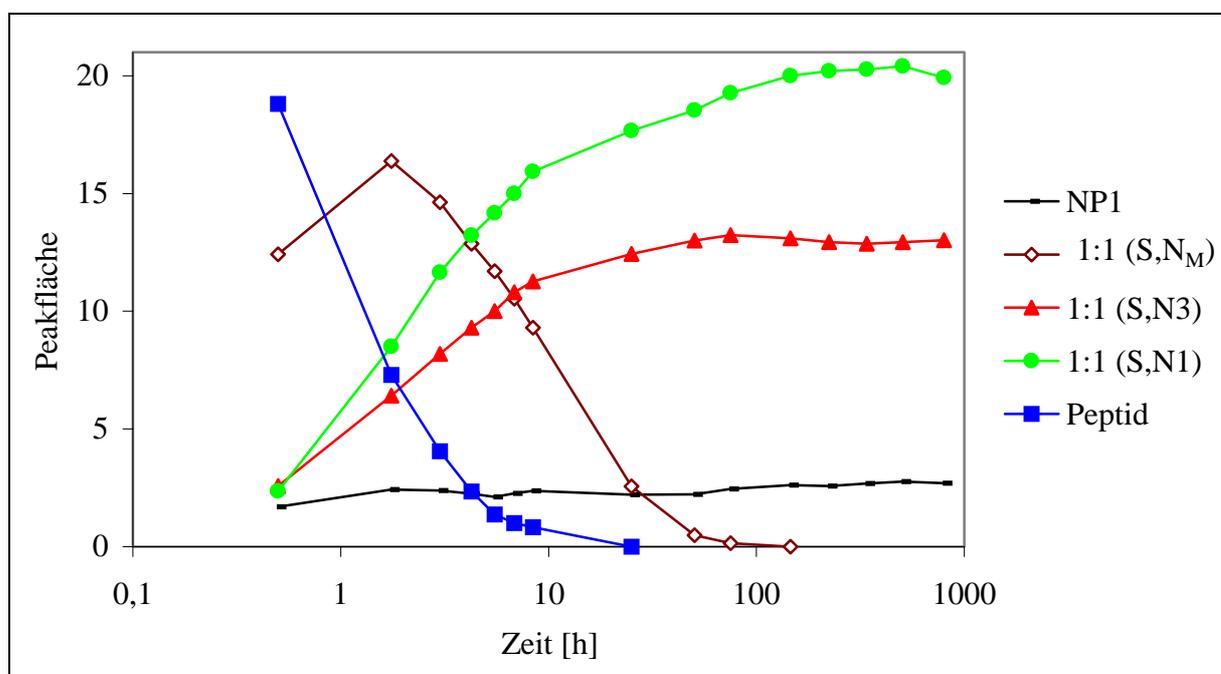


Abb. 6.3: Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} /$
 $achis(ala)_2metNHP (1:1); pH = 3,65$

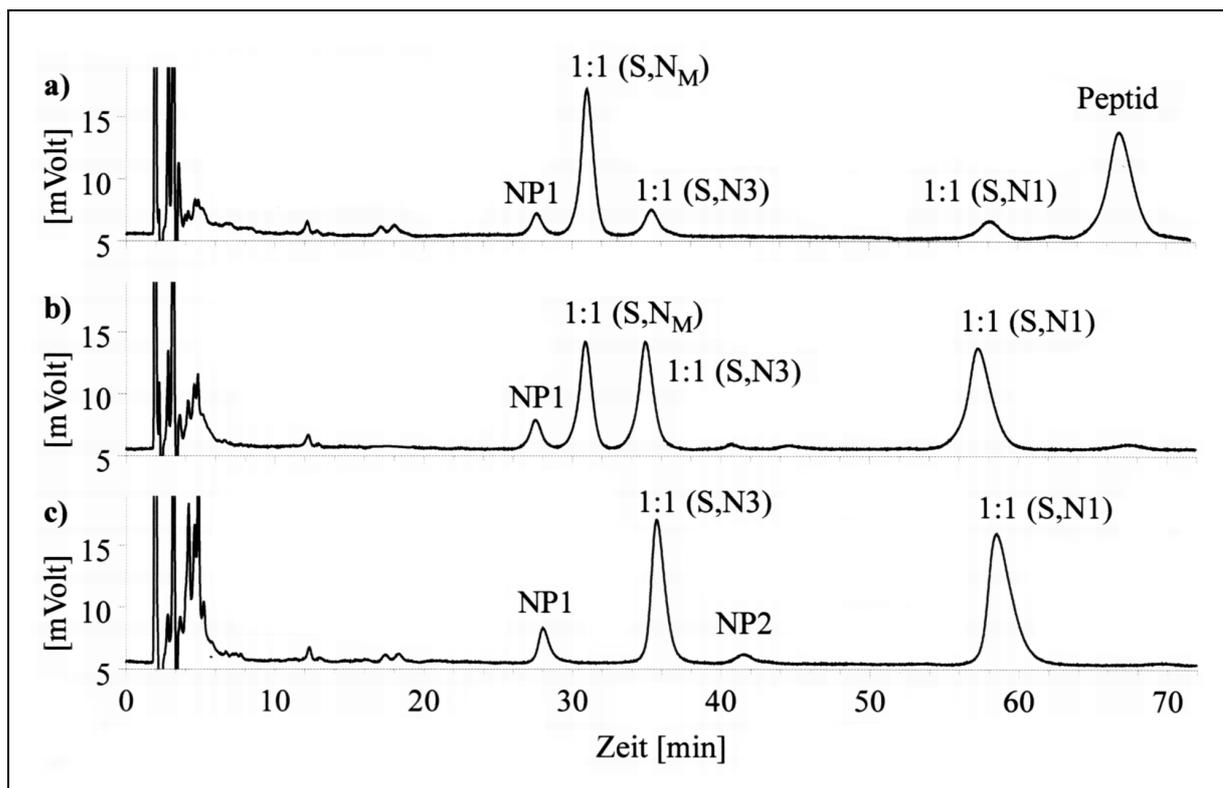


Abb. 6.4: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)*₂*metNHP*; 30% MeOH; 0,1% PFP; 25°C; t = Reaktionszeit
 $pH = 3,65$ a) $t = 0,5$ h b) $t = 8,42$ h c) $t = 145,75$ h

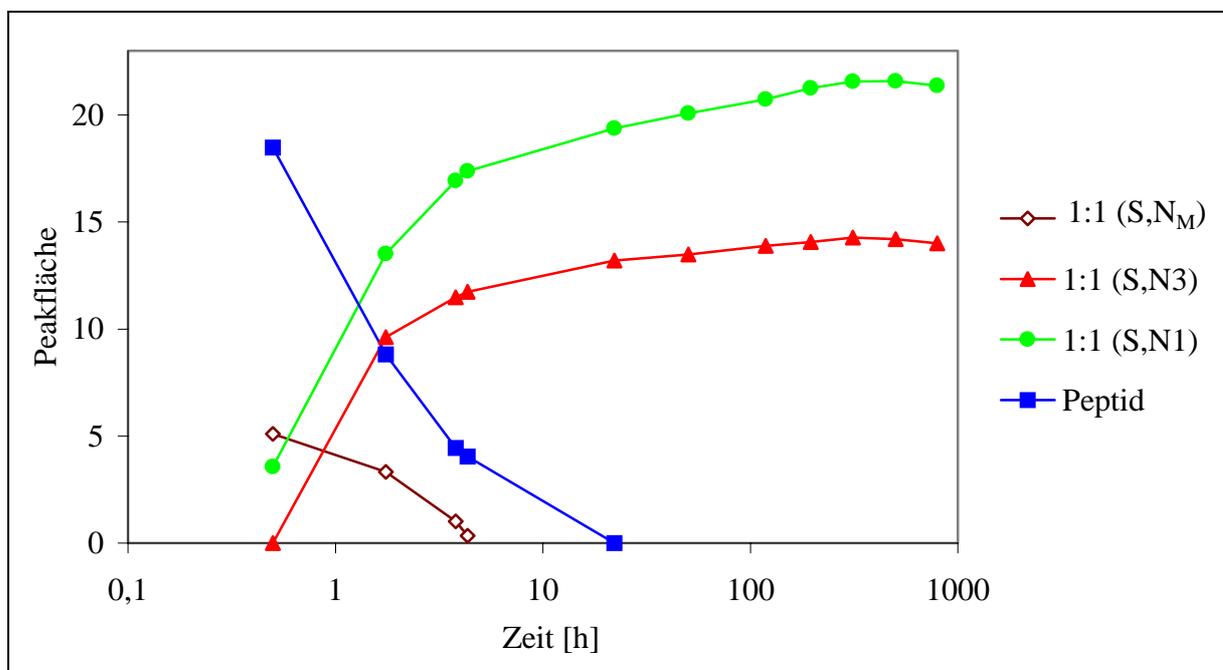


Abb. 6.5: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)*₂*metNHP* (1:1); $pH = 6,82$

6.2 Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metNHPH

Die Optimierung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metNHPH gelang unter ähnlichen Bedingungen wie im System des Tetrapeptides. Als geeignet erwies sich eine 38 % ige MeOH-Konzentration mit 0,1 % PFP als Ionenpaarreagenz bei einer Säulentemperatur von 20° C. Die chromatographische Trennung erfolgte so innerhalb von 40 min. Für die semi-präparative Trennung wurde aufgrund des durch die hohe Methanolkonzentration entstehenden hohen Druckes TFA als Ionenpaarreagenz gewählt. Hierdurch ist bei einer Temperatur von 25° C nur ein 25% ige MeOH-Konzentration erforderlich, um sämtliche Produkte aufzutrennen.

Das Chromatogramm dieser semi-präparativen Trennung ist in Abb. 6.6 zu sehen.

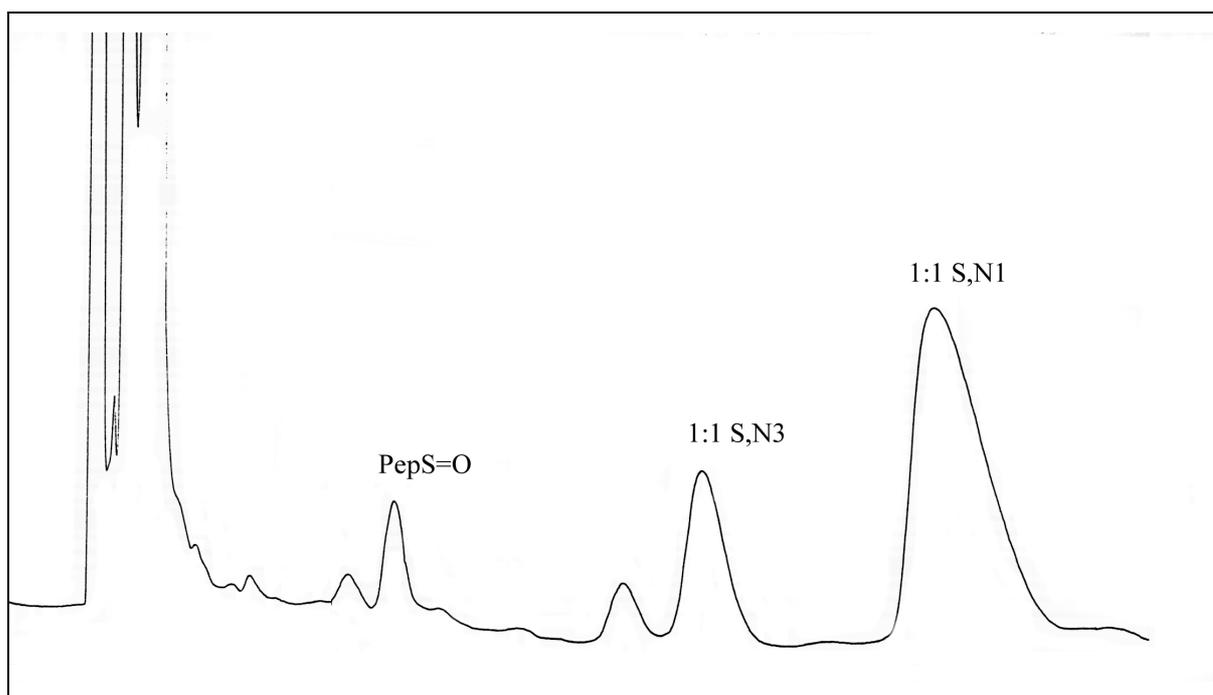


Abb. 6.6: Chromatogramm der semi-präparativen Trennung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPH ; 25% MeOH; 0,073% TFA; 25°C;

Um die Reinheit der nach der Trennung erhaltenen Produktfraktionen zu überprüfen, werden diese mit dem gleichen Eluenten chromatographiert. Die in Abb. 6.7 gezeigten Chromatogramme verdeutlichen die hohe Reinheit und Stabilität der drei charakterisierten Spezies.

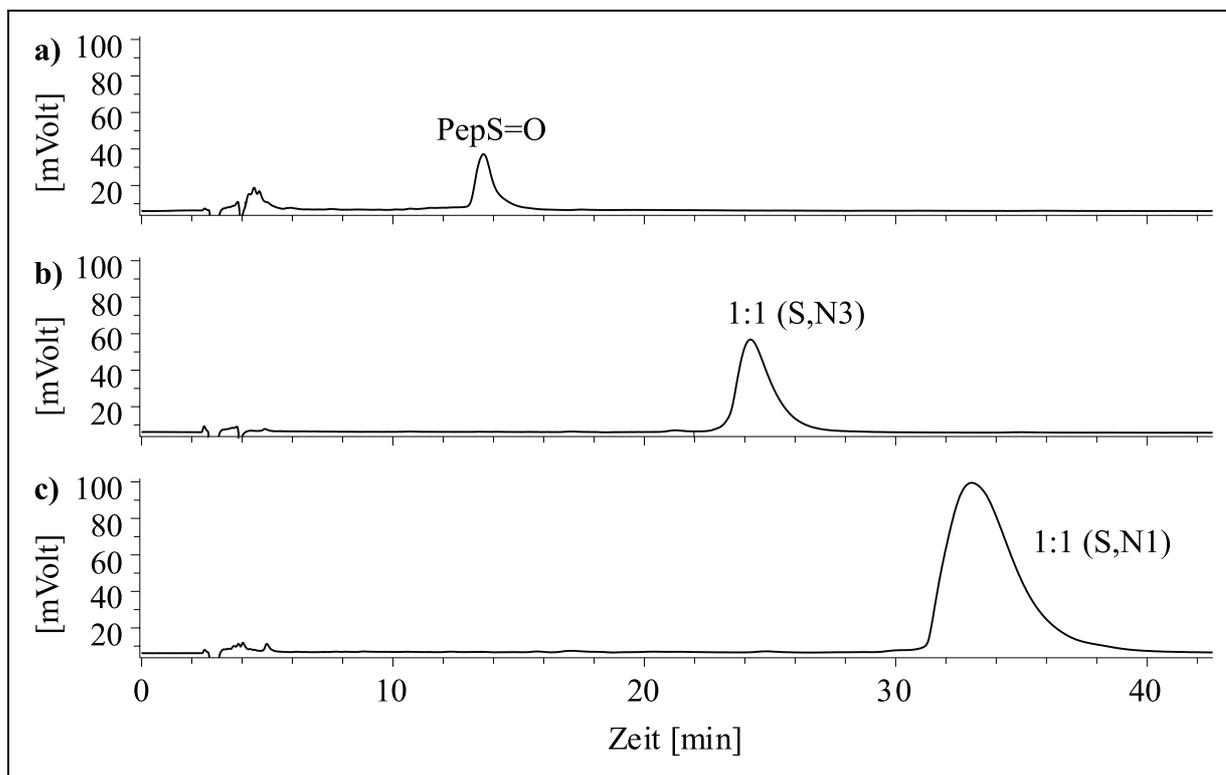


Abb. 6.7: Chromatogramme der drei semi-präparativ getrennten Fraktionen des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$; 25% MeOH; 0,073% TFA; 25°C;
 a) oxidiertes Peptid b) κ^2 -S,N3-Produkt c) κ^2 -S,N1-Produkt

6.2.1 pH-abhängige Produktverteilung

Die pH-abhängige Produktverteilung von $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit $achis(ala)_3metNHPH$ zeigt viel Ähnlichkeit mit der des $achis(ala)_2metNHPH$ -Systems. Die durch eine weitere Alanineinheit vergrößerte Entfernung zwischen den beiden Aminosäuren Histidin und Methionin führt zu einer noch deutlicheren Bevorzugung des κ -S,N1-Produktes. Es ist über den gesamten pH-Bereich mit einem konstanten Maximum zwischen pH = 4 und 9 als Hauptprodukt zu finden. Der Verlauf des κ -S,N3-Komplexes ist parallel zu dem des κ -S,N1-Produktes. Es wird jedoch

nur 30% der Peakfläche des κ - S,N_I -Produktes erreicht und ab $pH > 10$ ist es nur noch in geringer Menge nachweisbar. Über den gesamten pH-Bereich sind als Nebenprodukte das oxidierte Peptid, als auch der ab $pH > 7$ entstehende κ - S,N_M -Vorläuferkomplex vorhanden.

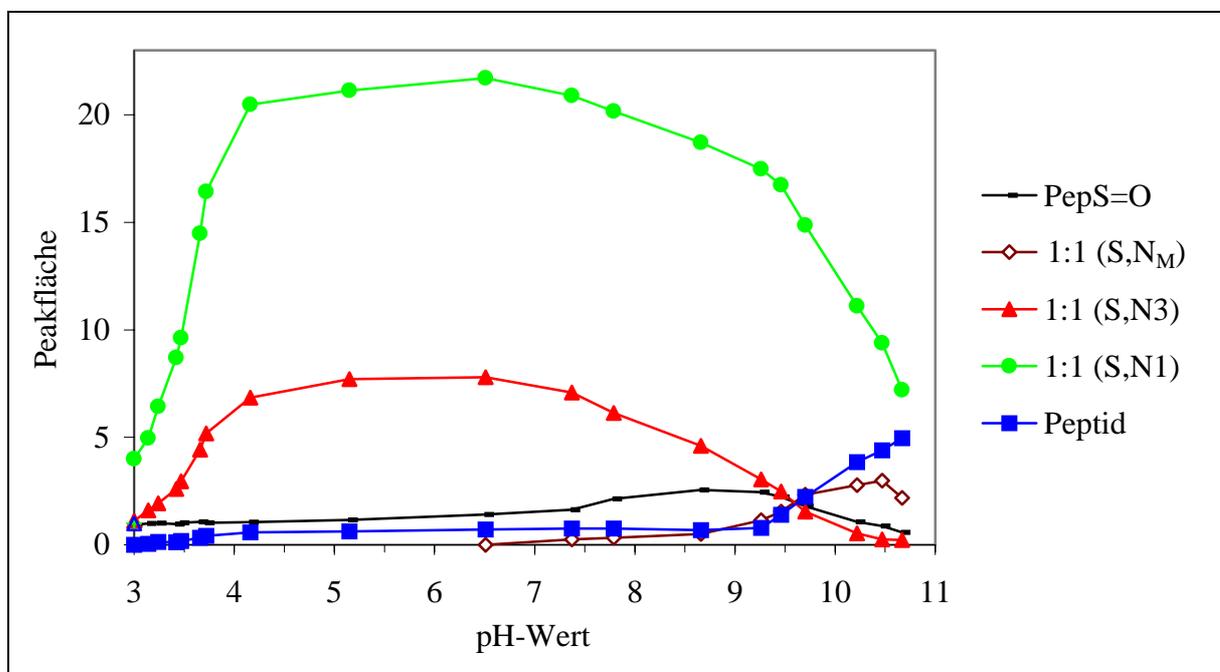


Abb. 6.8: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / achis(ala)_3metNHPH (1:1)$

6.2.2 Kinetische Untersuchungen

Der zeitliche Ablauf der Komplexbildung des Reaktionssystems aus $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ und $achis(ala)_3metNHPH$ mit 1:1 Stöchiometrie wurde anhand der beiden im Sauren bei $pH = 3,39$ und im Neutralen bei $pH = 6,95$ ausgewählten Reaktionslösungen untersucht. Die Veränderung der Peakflächen im sauren pH-Bereich zeigt die schnelle Bildung des κ - S,N_M -Vorläufers, der sein Maximum nach 3 h durchläuft und nach 100 h vollständig zu den beiden κ - $S,N_{imidazol}$ -Endprodukten abreagiert ist. Diese bilden sich von Reaktionsbeginn an und erreichen schon nach 48 h ihre maximale Konzentration und bleiben konstant. Die Peakfläche des oxidierten Peptides nimmt nach 3 h leicht zu und durchläuft sein Maximum nach 12 h und ist ab einer Reaktionszeit von 3 Tagen nur noch in geringen Mengen detektierbar.

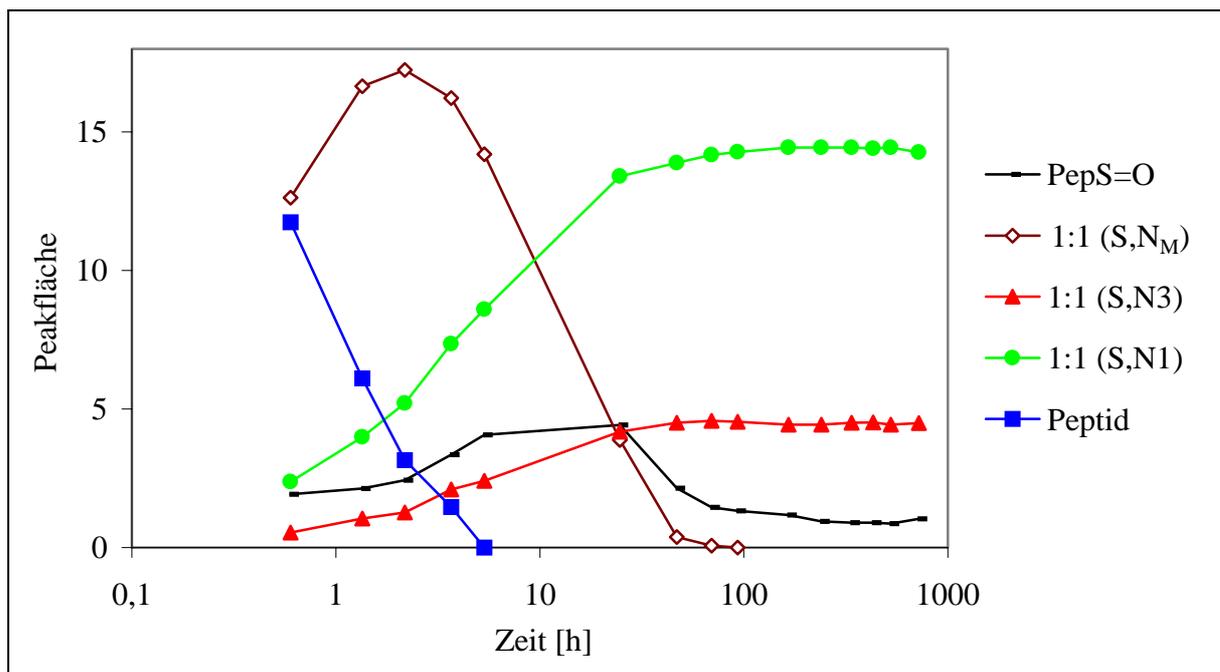


Abb. 6.9: Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃metNHP* (1:1); pH = 3,39

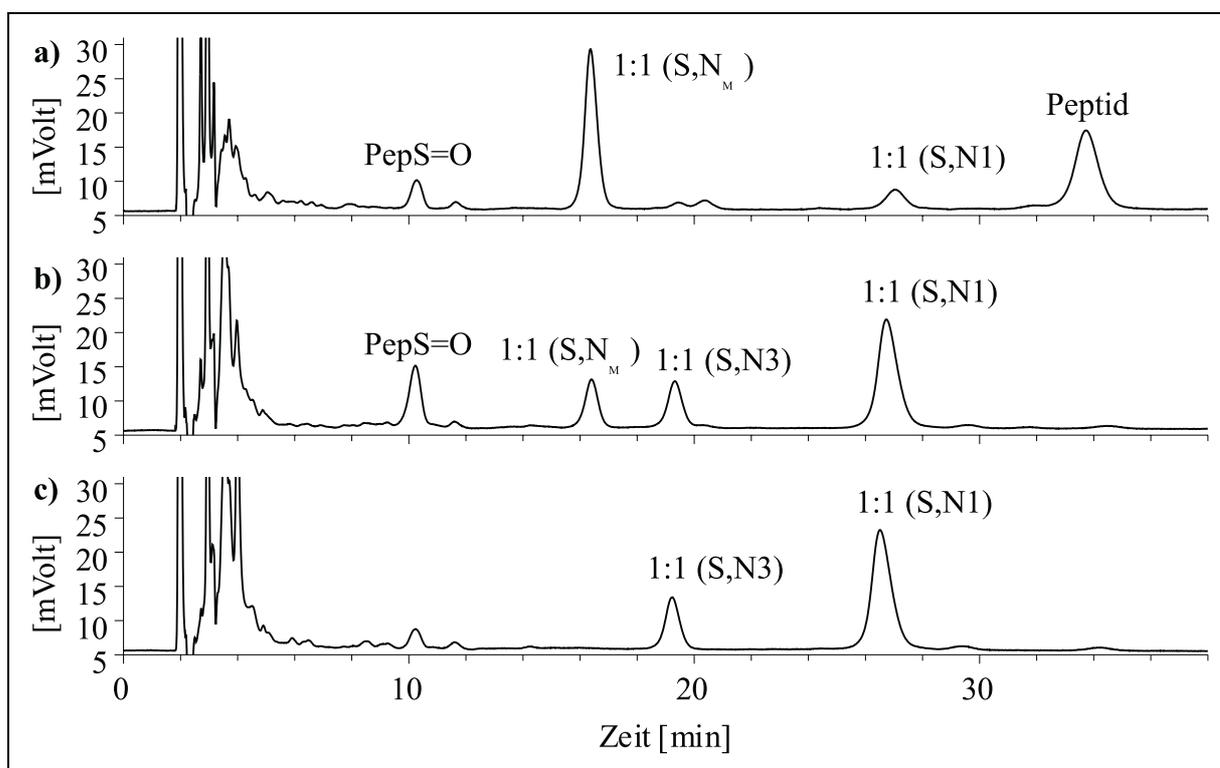


Abb. 6.10: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃metNHP*; 38% MeOH; 0,1% PFP; 20°C; t = Reaktionszeit
 pH = 3,39 a) t = 0,6 h b) t = 24,65 h c) t = 165,65 h

Im Neutralen entstehen die beiden κ - $S,N_{Imidazol}$ -koordinierten Produkte schneller und erreichen nach 6 h den stabilen Endzustand. Der κ - S,N_M -Vorläufer wird nur noch in geringen Mengen gebildet und ist nach 24 h vollständig weiterreagiert. Das oxidierte Peptid ist über den gesamten Kinetikverlauf in gleichbleibend geringer Konzentration detektierbar.

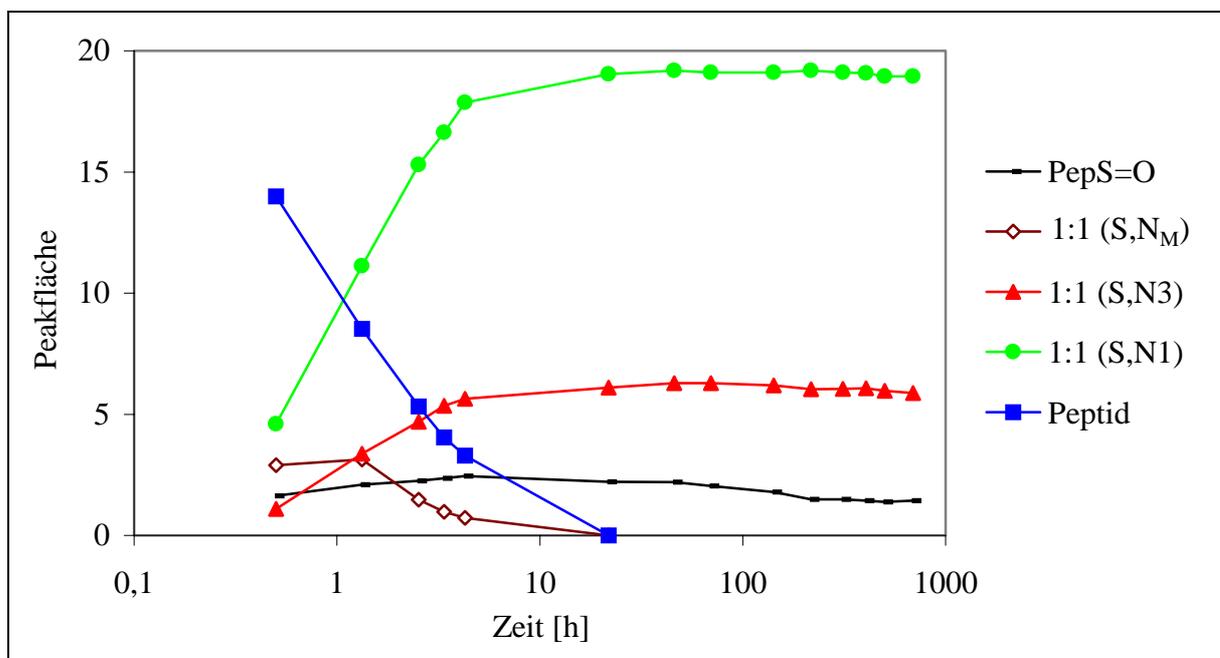


Abb. 6.11: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / achis(ala)_3metNHP (1:1); pH = 6,95$

6.3 Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metH

Das System $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₃metH wurde schon von WOLTERS mit Trifluoressigsäure als Ionenpaarreagenz und einem Stufengradienten von 5 – 20% MeOH bei einer Temperatur von 20° C optimiert [73]. Die in der Dissertation von WOLTERS fehlenden kinetischen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit erstellt.

6.3.1 pH-abhängige Produktverteilung

In diesem System ist das Peptid im Gegensatz zum achis(ala)₃metNHPh-System nicht an der Carboxylatfunktion durch eine sterisch anspruchsvolle NH-Phenylgruppe geschützt. Dieses führt im Säuren ab pH < 4 zur Bildung des vermutlich κ^2 -S,O-Chelates und im Säuren ab pH < 3,5 und im Basischen ab pH > 6,5 zu dem sechsgliedrigen κ^2 -S,N_M-Hauptprodukt. Die beiden κ^2 -S,N1 und κ^2 -S,N3 imidazolkoordinierten Makrochelate dominieren wie in der vorhergehenden pH-Verteilung im Bereich von pH = 3,4 bis 6,5. Die von WOLTERS untersuchten Reaktionslösungen der pH-Verteilung wurden im Gegensatz zu denen in dieser Arbeit eine Woche länger, also 4 Wochen bei 40° C getempert.

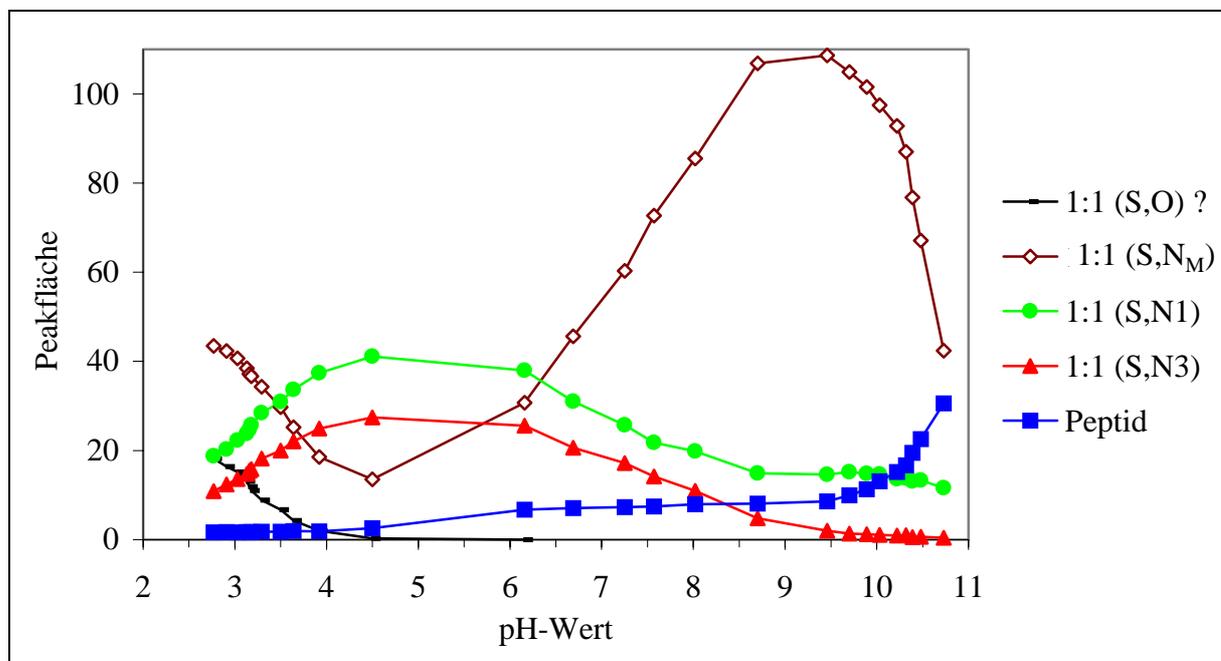


Abb. 6.12: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₃metH (1:1)

6.3.2 Kinetische Untersuchungen

Die zeitabhängige Produktverteilung mit einer 1:1 Stöchiometrie bei $pH = 4,00$ zeigt zuerst die Bildung des vermuteten κ^2 - S,O -Vorläufers, der dann zum κ^2 - S,N_M -Chelat weiterreagiert. Dieser durchläuft nach 10 h sein Maximum und nimmt dann mit der parallelen Entstehung der beiden κ^2 - S,N_I - und κ^2 - S,N_3 -Komplexe ab. Nach einer Reaktionszeit von mehr als 1000 h sind die beiden thermodynamisch stabilen Imidazol-Makrochelate als Hauptprodukte zu finden. Das in der pH-Verteilung nicht vorhandene Nebenprodukt NP1 bildet sich mit geringer Konzentration sofort und erreicht sein Maximum nach 3 h und nimmt ab dann kontinuierlich ab.

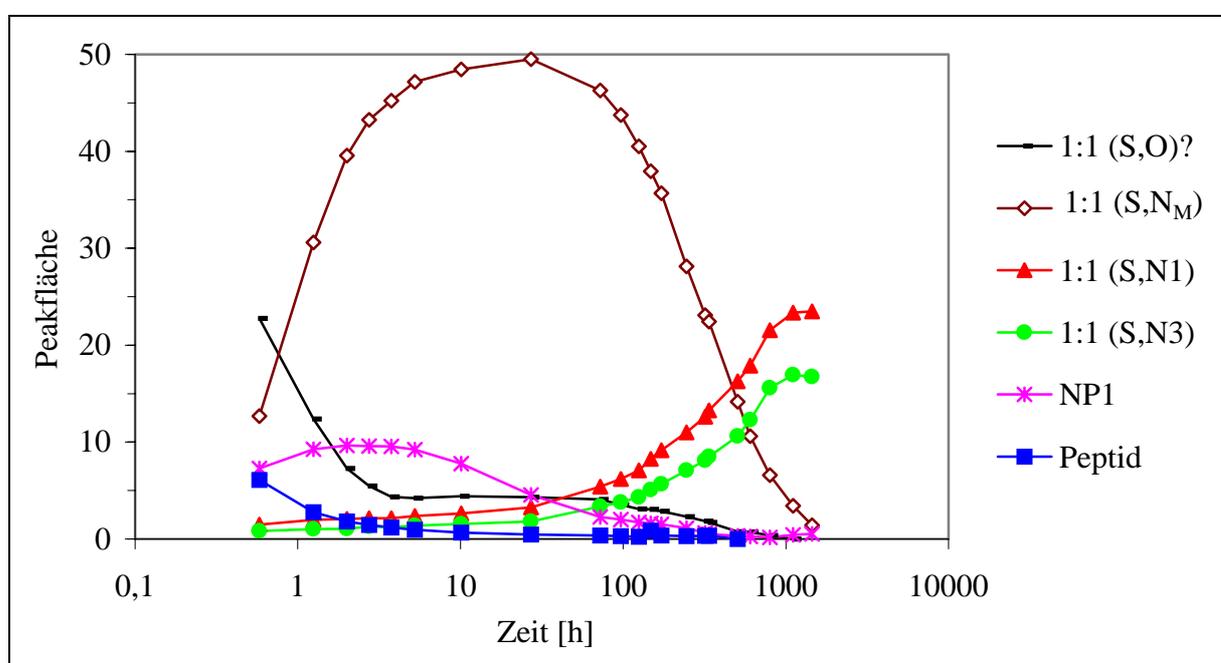


Abb. 6.13: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} /$
achis(ala)₃methH (1:1); pH = 4,00

Im neutralen pH-Bereich bei $pH = 7,08$ bildet sich ebenfalls der κ^2 - S,O -Vorläufer und reagiert innerhalb von 8 h zum κ^2 - S,N_M -Produkt, das von diesem Zeitpunkt an schon in konstant maximaler Menge als Hauptprodukt vorliegt. Auch SADLER konnte den κ^2 - S,O -Vorläufer und das κ^2 - S,N_M -Produkt in der Reaktion von $[Pt(en)(NO_3)_2]$ mit Methionin nachweisen [106]. Das aufgrund der geringen Konzentration nicht charakterisierte NP1 tritt als Zwischenprodukt auf. Als Nebenprodukte bilden sich von Beginn an langsam die beiden imidazolkoordinierten Komplexe.

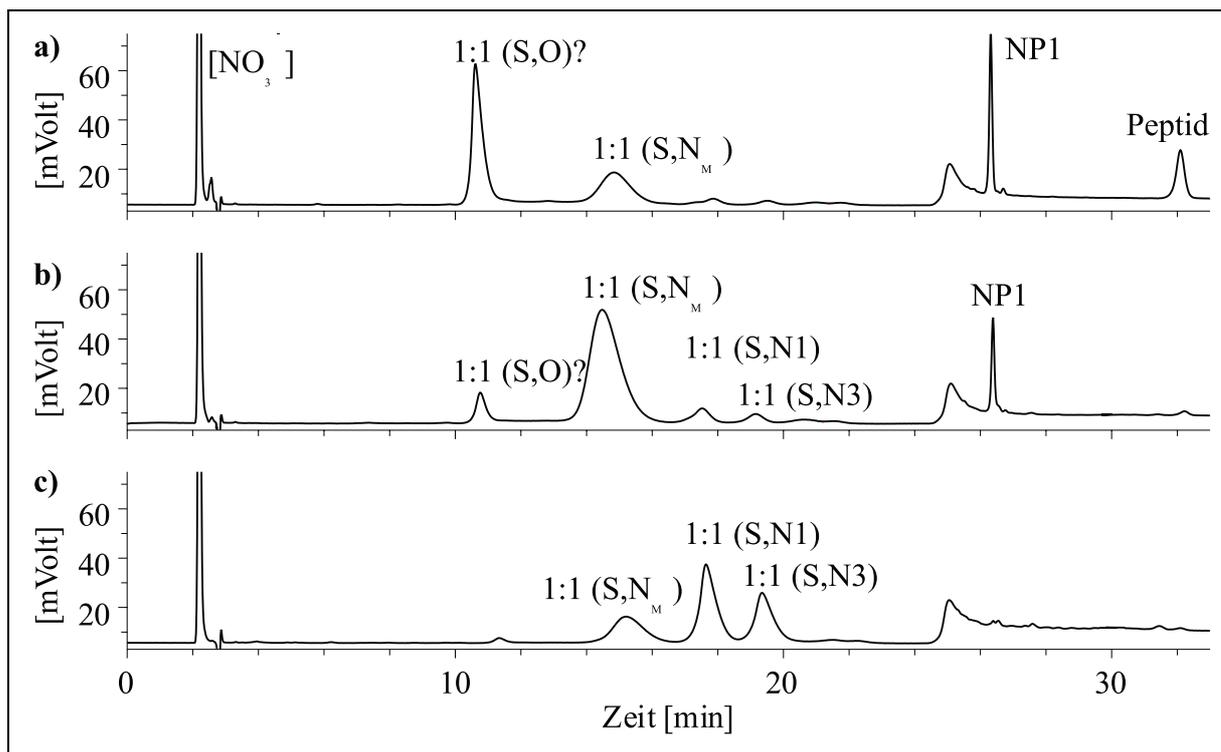


Abb. 6.14: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃methH*; 5 - 20% MeOH; 0,073% TFA; 25°C; *t* = Reaktionszeit
pH = 4,00 a) *t* = 0,58 h b) *t* = 27,17 h c) *t* = 1107,0 h

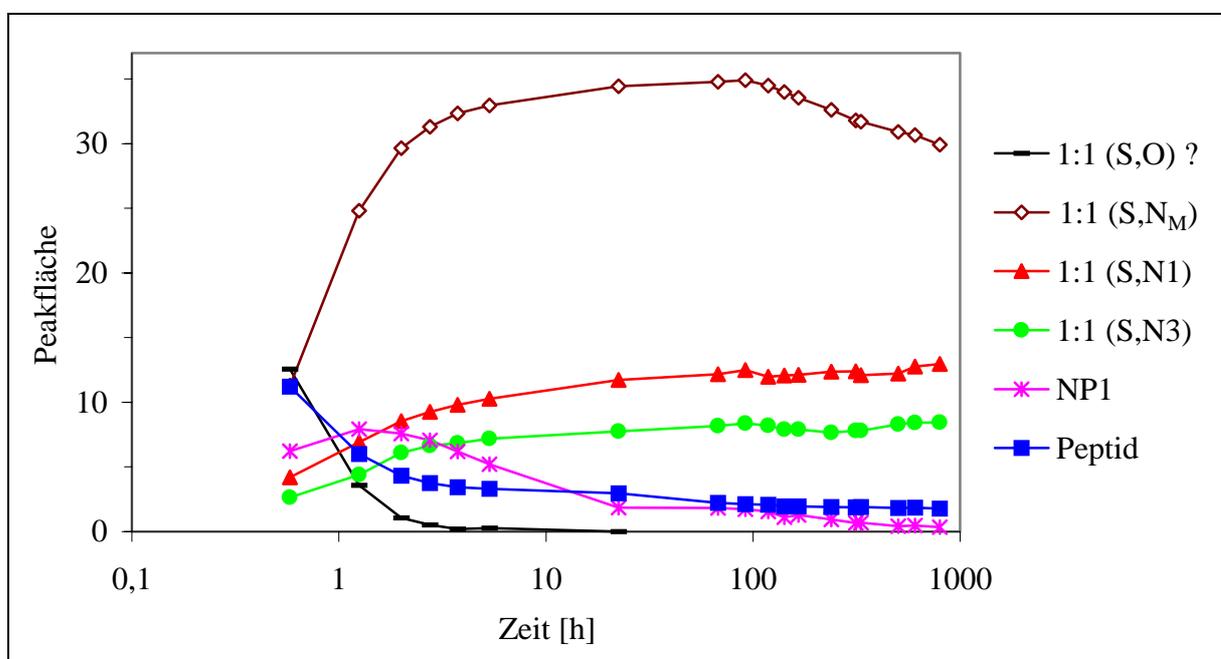


Abb. 6.15: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃methH* (1:1); *pH* = 7,08

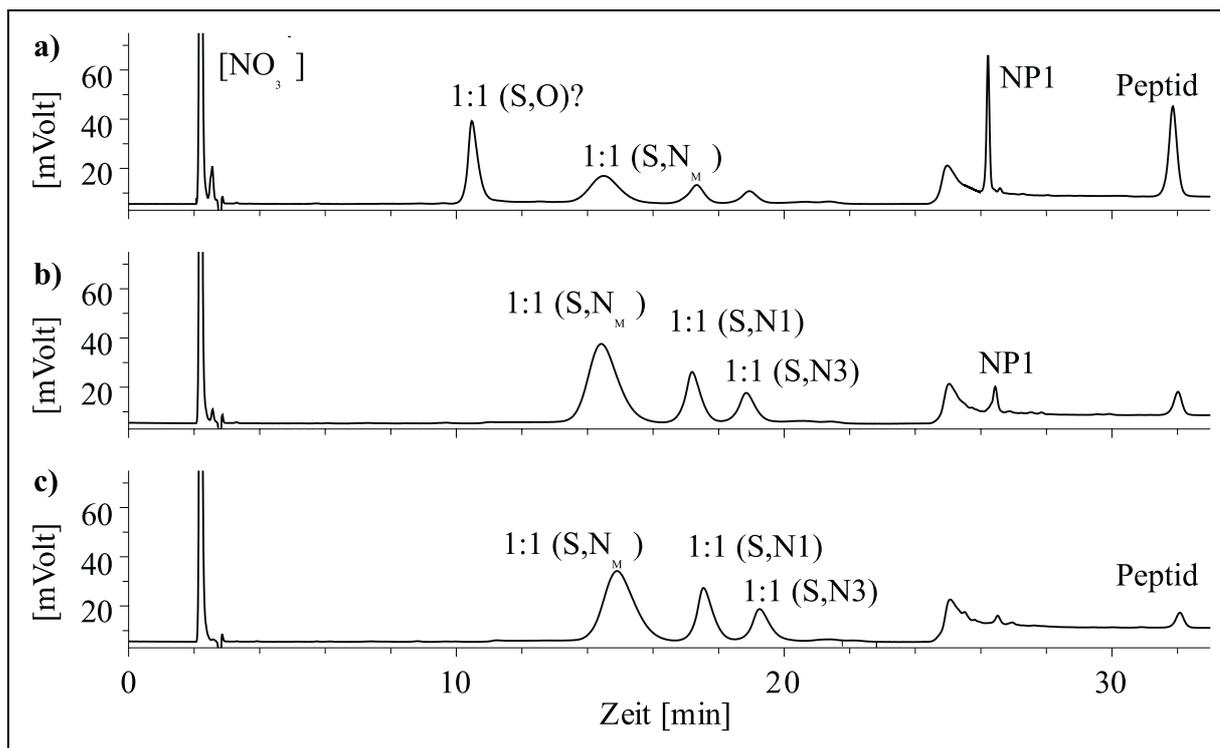


Abb. 6.16: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃methH*; 5 - 20% MeOH; 0,073% TFA; 25°C; *t* = Reaktionszeit
pH = 7,08 a) *t* = 0,58 h b) *t* = 22,42 h c) *t* = 502,25 h

6.4 Umsetzungen mit dem Pentapeptid acmet(ala)₃metH

Das System $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / acmet(ala)₃metH wurde im stöchiometrischen Ansatzverhältnis von 1:1 im pH-Bereich von 2,7 bis 10,5 chromatographisch untersucht. Die Trennung erfolgte innerhalb von 45 min mit einem Stufengradienten von 18 – 30% MeOH und 0,1% PFP. Eine Säulentemperatur von 35° C erwies sich für dieses System als vorteilhaft.

In der nachfolgenden Abb. 6.17 sind drei Chromatogramme gezeigt, die die pH-abhängige Produktverteilung repräsentieren. Als problematisch erwies sich die semi-präparative Trennung des κ -S,N_M-Komplexes, der sich aufgrund des sauren pH-Wertes zu dem im Sauren stabilen κ -S,S-Produkt umlagerte. Die Spezies konnte jedoch durch Erstellen eines präparativen Ansatzes im Basischen und der ohne Trennung erfolgten Einrotierung charakterisiert werden.

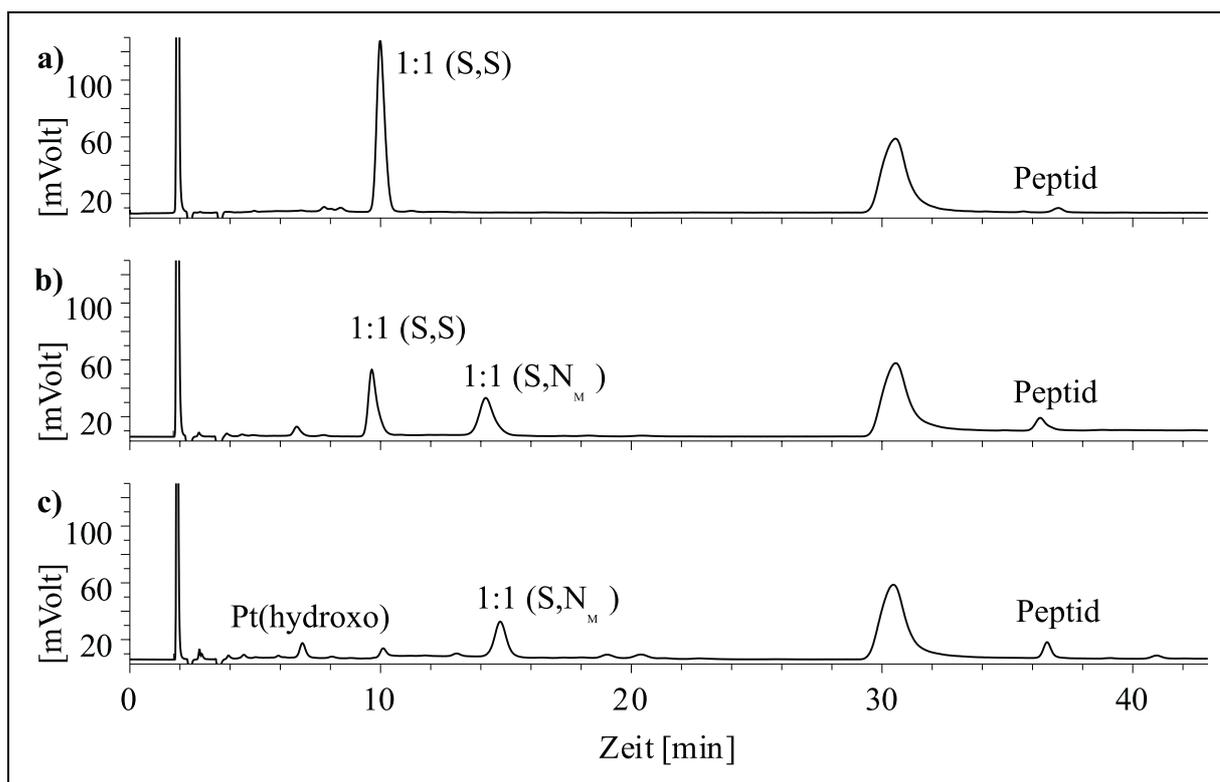


Abb. 6.17: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / acmet(ala)₃metH ; 18 - 30% MeOH; 0,1% PFP; 35° C
 a) pH = 2,66 b) pH = 6,70 c) pH = 9,89

6.4.1 pH-abhängige Produktverteilung

Bei der Reaktion von $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit dem sowohl N- als auch C-terminal Methionin enthaltenden *acmet(ala)₃metH* konnten nur 2 Produkte detektiert werden. Die κ^2 -*S,S'*-koordinierte Spezies ist von pH = 2,5 bis pH = 5,5 bei konstanter Peakfläche das Hauptprodukt. Ab diesem pH-Wert bildet sich das κ^2 -*S,N_M*-Chelat und durchläuft bei pH = 7,5 sein Maximum und nimmt dann bis pH = 10 etwas ab. Das κ^2 -*S,S'*-Produkt kann ab pH = 8 nur noch in geringen Konzentrationen Mengen detektiert werden. In diesem System konnte ab pH > 5,5 nach ca. 50 h die dimere Pt-hydroxo-Spezies gefunden werden.

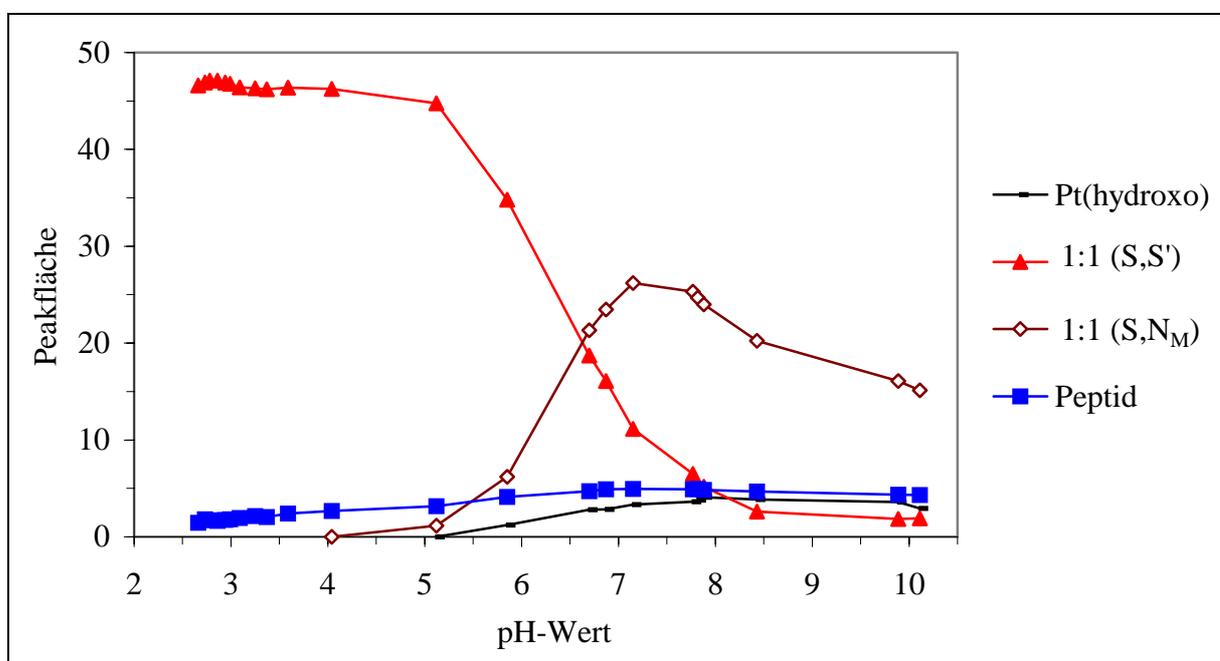


Abb. 6.18: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *acmet(ala)₃metH* (1:1)

6.4.2 Kinetische Untersuchungen

Da aus der pH-abhängigen Verteilungskurve bei pH-Werten im sauren Bereich nur eine Reaktion zum κ^2 -*S,S'*-Produkt zu erwarten ist, wurde eine zeitabhängige Untersuchung nur im Basischen bei pH = 9,49 erstellt. Selbst bei diesem pH-Wert bildet sich die κ^2 -*S,S'*-Spezies und erreicht nach 24 h ihr Maximum, nimmt dann kontinuierlich ab und ist nach 1000 h nicht mehr detektierbar. Aus diesem Komplex bildet sich das κ^2 -*S,N_M*-Produkt und ist nach einer

Woche als Hauptprodukt vorhanden. Seine maximale Konzentration erreicht es nach einer Reaktionszeit von 1000 h. Parallel zu diesem Komplex entsteht in deutlich geringerer Konzentration die Pt-hydroxo-Spezies.

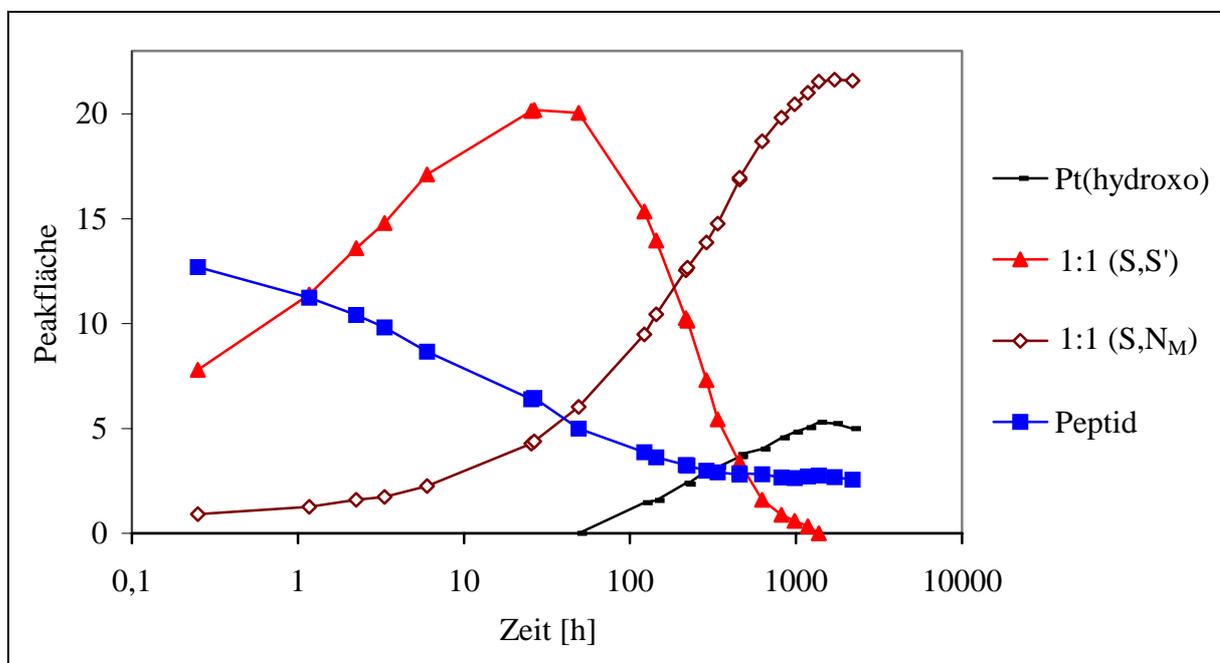


Abb. 6.19: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *acmet(ala)₃metH* (1:1); pH = 9,49

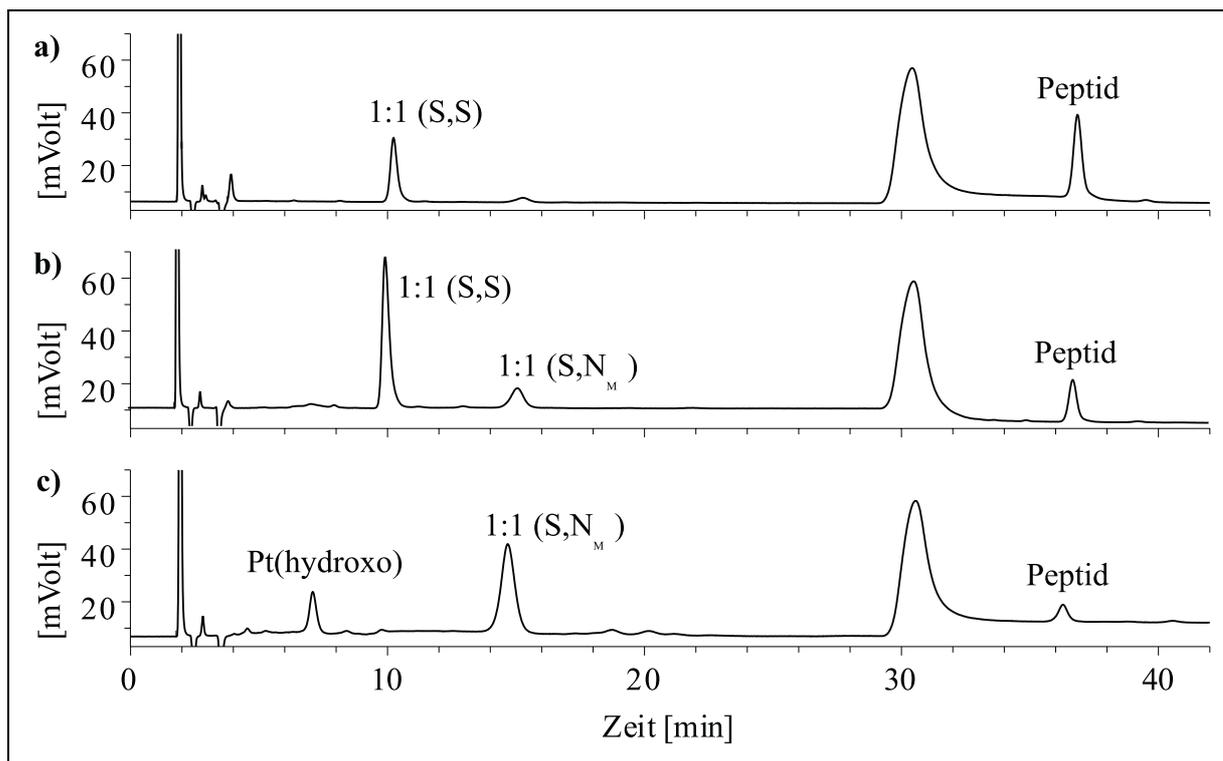


Abb. 6.20: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $acmet(ala)_3meth$; 18 - 30% MeOH; 0,1% PFP; 35°C; t = Reaktionszeit
 $pH = 7,08$ a) $t = 0,25$ h b) $t = 49,0$ h c) $t = 1178$ h

6.5 Charakterisierung der Komplexe

6.5.1 Das System $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₂metNHPH

Bei den Umsetzungen von $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit achis(ala)₂metNHPH entstehen zwei mononukleare Hauptprodukte. Durch FAB-massenspektrometrische Untersuchungen konnte deren 1:1 Stöchiometrie eindeutig nachgewiesen werden. Der zuerst eluierende κ^2 -S,N3 Makrochelat zeigt einen M^+ Peak bei $m/z = 799$, zudem tritt das Addukt als $[M+HFB]^+$ sowie noch der Verlust des Ethylendiammins bei einer Masse von $m/z = 740$ auf. Im 1H -NMR-Spektrum deutet ein Hochfeldshift der Imidazolprotonen H2 und H5 mit den dazugehörigen charakteristischen $^{3,4}J(^{195}Pt-^1H)$ - Kopplungskonstanten aus einem 80 MHz-NMR-Spektrum von 19 Hz für H2 und 9 Hz für das H5 Imidazolproton auf die N3-Koordination hin, die im Einklang mit Literaturwerten steht [150, 153]. Die Verschiebung der δ -Protonen der Thioethergruppe des Methionins um +0,16 ppm zu tiefem Feld bestätigt die Schwefelkoordination.

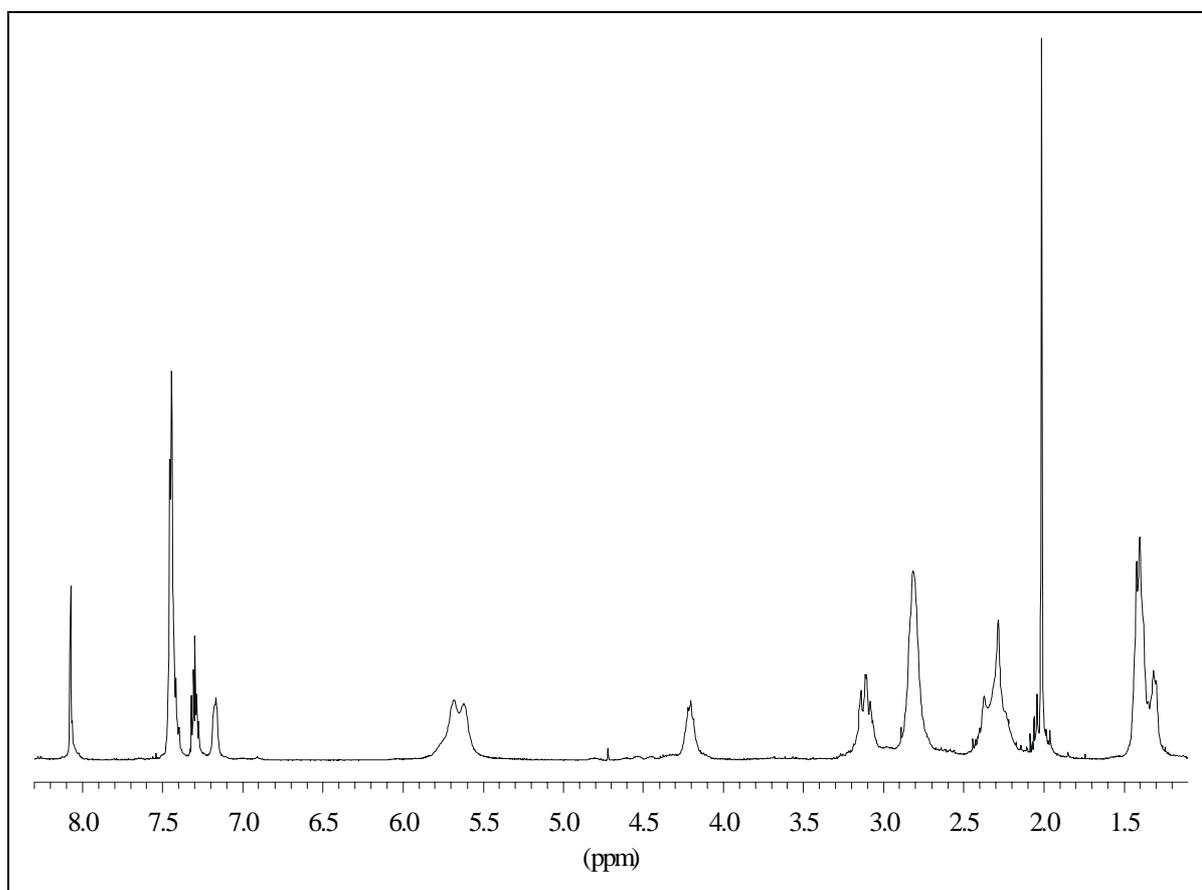


Abb. 6.21: 1H -NMR-Spektrum von $[Pt(en)]achis(ala)_2metNHPH-\kappa^2S,N3]^{2+}$ (400 MHz)

Auch das ^{195}Pt -Spektrum beweist mit einer chemischen Verschiebung von -3216 ppm die N_3S -Umgebung am Platin [87].

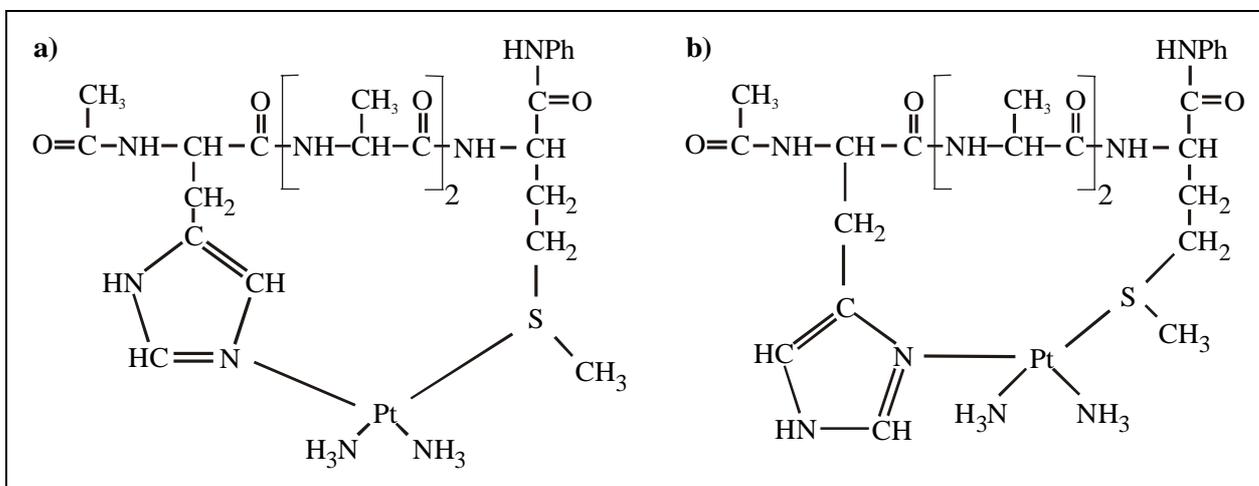


Abb. 6.22: Strukturen von a) $[\{Pt(en)\} \text{achis}(ala)_2\text{metNHPh}-\kappa^2\text{S},\text{N1}]^{2+}$
b) $[\{Pt(en)\} \text{achis}(ala)_2\text{metNHPh}-\kappa^2\text{S},\text{N3}]^{2+}$

Das zweite Hauptprodukt ist ebenfalls $\text{S},\text{N}_{\text{Imidazol}}$ -koordiniert. Die 1:1 Stöchiometrie wird durch das Molekülion mit der Masse $m/z = 800$ und den gleichen Fragmentierungen wie beim $\kappa^2\text{-S},\text{N3}$ Komplex klar nachgewiesen. Der deutliche Tieffeldshift der δ -Thioetherprotonen um $+0,46$ ppm und der Hochfeldshift der Imidazolprotonen betätigen den vermuteten $\kappa^2\text{-S},\text{N1}$ Koordinationsmodus. Aus einem bei niedriger Feldstärke aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum konnten aufgrund der Signalverbreiterungen der Phenylprotonen keine $^{3,4}\text{J}(^{195}\text{Pt}-^1\text{H})$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden. Da die H2 und H5-Resonanzen jedoch gegenüber des $\kappa^2\text{-S},\text{N3}$ Produktes zu höherem Feld verschoben sind, ist die N1-Koordination bewiesen [74]. Die N_3S -Umgebung am Platinzentrum konnte mit einem Verschiebungswert von -3184 ppm im ^{195}Pt -NMR-Spektrum bestätigt werden.

Tab. 6.1: FAB-MS Daten der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / \text{achis}(ala)_2\text{metNHPh}$ Komplexe

Signalzuordnung	$\kappa^2\text{S},\text{N1}$ m/z (rel. Anteil)	$\kappa^2\text{S},\text{N3}$ m/z (rel. Anteil)
$[1:1]^+$	800 (1)	799 (1)
$[1:1+\text{HFB}]^+$	964 (0,08)	963 (0,07)
$[1:1-\text{en}]^+$	740 (0,15)	740 (0,22)

Das Verhältnis der κ^2 -S,N_{imidazol}-Koordinationsmodi in der pH-Verteilung steht mit denen von Wolters im achis(gly)₂metH- und achis(ala)₃metH-System im Einklang [73]. Es zeigt sich immer die bevorzugte Bildung des κ^2 -S,N_I Komplexes. Die in allen ¹H-NMR-Spektren zwischen 5,5 und 5,8 ppm befindlichen Signale sind auf die NH-Protonen der Ethylendiamingruppe zurückzuführen [155].

Tab. 6.2: Verschiebungswerte der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₂metNHPH Produkte

Signalzuordnung	κ^2 S,N _I	κ^2 S,N ₃
H2 ³ J(¹ H- ¹⁹⁵ Pt)	7.98(s)	8.07(s) 19 Hz
H5 ⁴ J(¹ H- ¹⁹⁵ Pt)	7.13(s)	7.16(s) 9 Hz
α_{his}	4.70(m)	4.61(m)
β_{his}	3.66, 3.09(m)	3.10(m)
α_{met}	4.65(m)	4.79(m)
β_{met}	2.37, 2.28(m)	2.37, 2.29(m)
γ_{met}	3.25, 3.09(m)	3.10, 2.80(m)
δ_{met}	2.59(s)	2.29(s)
α_{ala}	4.31, 4.20(m)	4.20(m)
β_{ala}	1.46, 1.35(m)	1.40, 1.31(m)
Ph	7.44, 7.30(m)	7.44, 7.30(m)
ac	2.06(s)	2.01(s)
en	2.82	2.81
¹⁹⁵ Pt	-3184	-3216
pH*-Wert	1.8	1.5

6.5.2 Das System $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₃metNHPH

Die Verlängerung des Peptides achis(ala)₂metNHPH durch ein Alanin zwischen den Aminosäuren Histidin und Methionin zum Pentapeptid achis(ala)₃metNHPH führt zu einer sehr ähnlichen Produktverteilung mit der gleichen Dominanz der beiden κ^2 -S,N_{Imidazol}-Produkte. Deren 1:1 Stöchiometrie konnte anhand des M⁺ Peaks bei m/z = 870 im FAB-Massenspektrum bestimmt werden. Des weiteren sind die Molekülionenaddukte mit Natrium, Natrium und HFB und die Abspaltung der Ethylendiammingruppe zu beobachten. Das über den gesamten pH-Bereich vorhandene zuerst eluierende Produkt ist κ^2 -S,N3 koordiniert. Wie zu erwarten ist, sind die δ -Wasserstoffatome dieses Komplexes um +0,22 ppm zu tiefem Feld verschoben und das 80 MHz-NMR-Spektrum weist die Bindung des Platins an N3 mit den $^{3,4}J(^{195}Pt-^1H)$ - Kopplungskonstanten von 16 Hz für H2 und 9 Hz für H5 zweifelsfrei nach. Das ^{195}Pt -NMR-Spektrum bestätigt die N₃S-Umgebung des Platins mit einer chemischen Verschiebung von -3236 ppm.

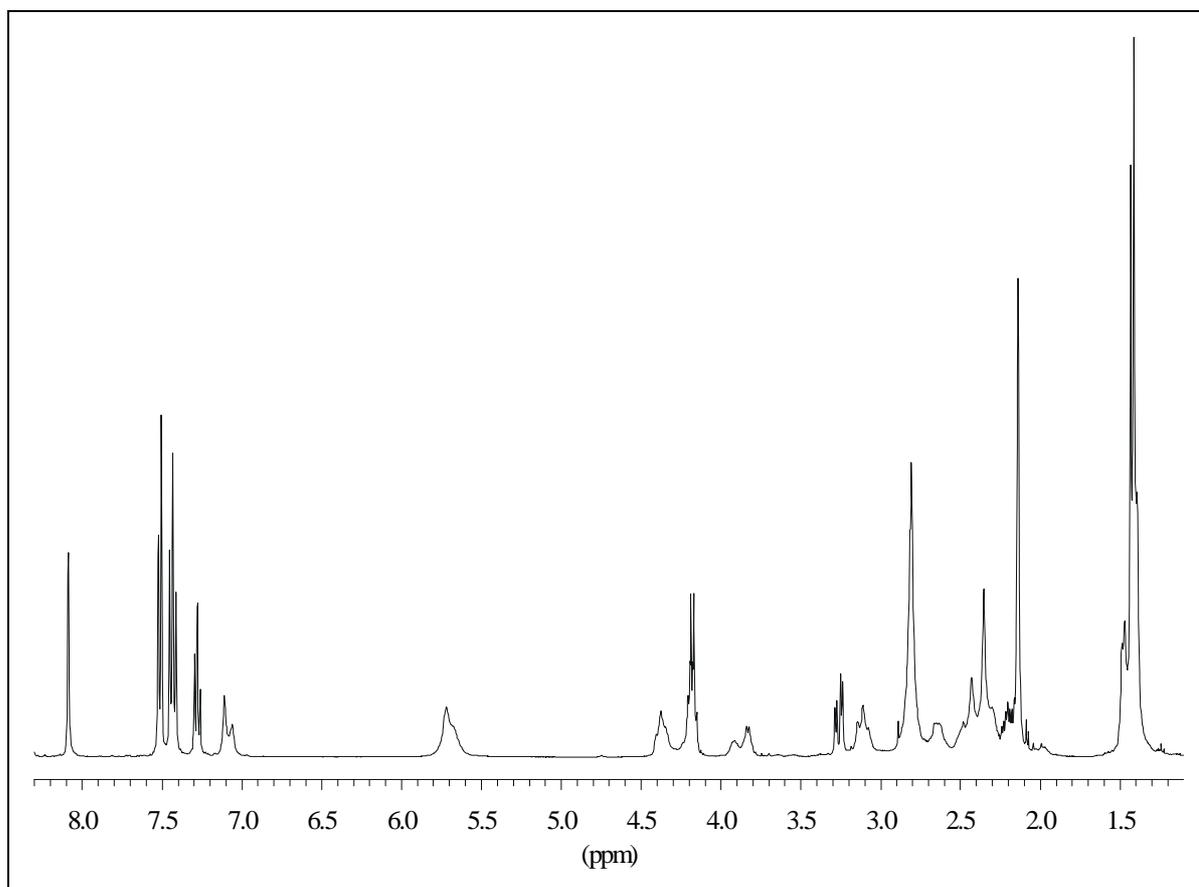


Abb. 6.23: 1H -NMR-Spektrum von $[Pt(en)]\{achis(ala)_3metNHPH-\kappa^2S,N1\}^{2+}$ (400 MHz)

Genau wie das κ^2 -S,N3 Produkt, gelang es ebenso den κ^2 -S,N1 koordinierten Komplex mit guter Reinheit semi-präparativ zu trennen. Die Verbreiterung aller Signale im 1H -NMR-Spektrum ist auf das 19 gliedrige makrozyklische Ringsystem zurückzuführen. Die Schwefelkoordination ist durch den Tieffeldshift von +0,17 ppm der Thioethergruppe bewiesen und das 80 MHz-NMR-Spektrum in Abb. 6.24 verdeutlicht die N1-Imidazolkoordination mit einer $^3J(^{195}Pt-^1H)$ -Kopplungskonstanten von 22 Hz. Die Signallage im ^{195}Pt -NMR-Spektrum bei -3221 ppm sichert die N₃S-Umgebung ab.

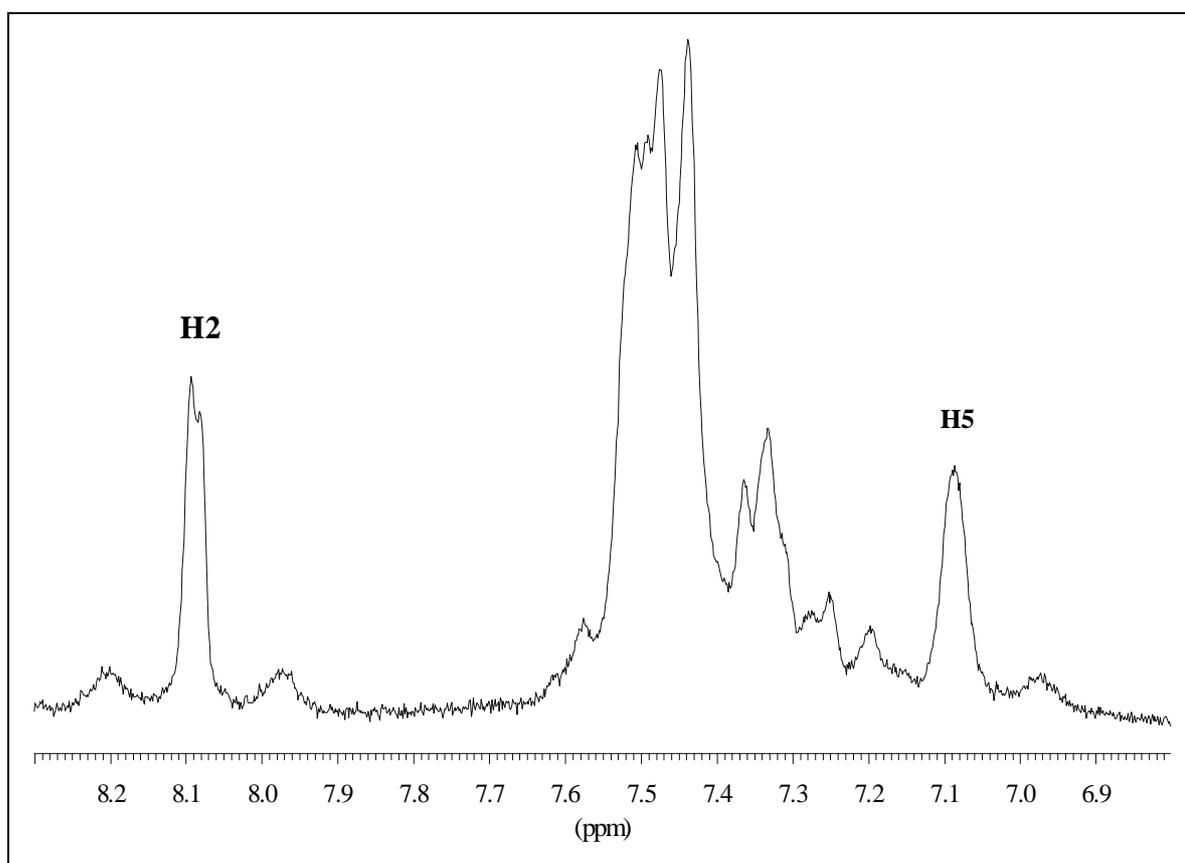


Abb. 6.24: 1H -NMR-Spektrum von $[Pt(en)\{achis(ala)_3metNHPH-\kappa^2S,N1\}]^{2+}$
(80 MHz) (Ausschnitt)

Die in der pH-Verteilung und in den zeitabhängigen Untersuchungen mit einer Retentionszeit von ca. 10 min auftretende Spezies konnte mittels einer semi-präparativen Trennung als das am Schwefelatom des Methionins oxidierte Peptid charakterisiert werden. Die Resonanzlagen im 1H -NMR-Spektrum sind identisch mit denen des eingesetzten Peptides, bis auf die außergewöhnlich stark bis nach 2,73 ppm zu tiefem Feld verschobenen δ -Protonen. Dieser

Verschiebungswert stimmte mit dem zur Vergleichbarkeit durch H_2O_2 oxidierten des Methionins von 2,75 ppm gut überein. Den endgültigen Beweis liefert das Massenspektrum mit einem Molekülionenpeak bei $m/z = 633$ und der charakteristischen Fragmentierung zu $m/z = 569$ durch den Verlust von $S-OH-CH_3$ [156]. In der Literatur ist die Oxidation des Schwefels der Methioninseitenkette durch geringe Konzentrationen an H_2O_2 häufig zu finden [157-159]. Die Reaktion solcher Sulfoxide mit Platin(II)verbindungen ist im Gegensatz zu Methionin um den Faktor ca. 40 verlangsamt [160].

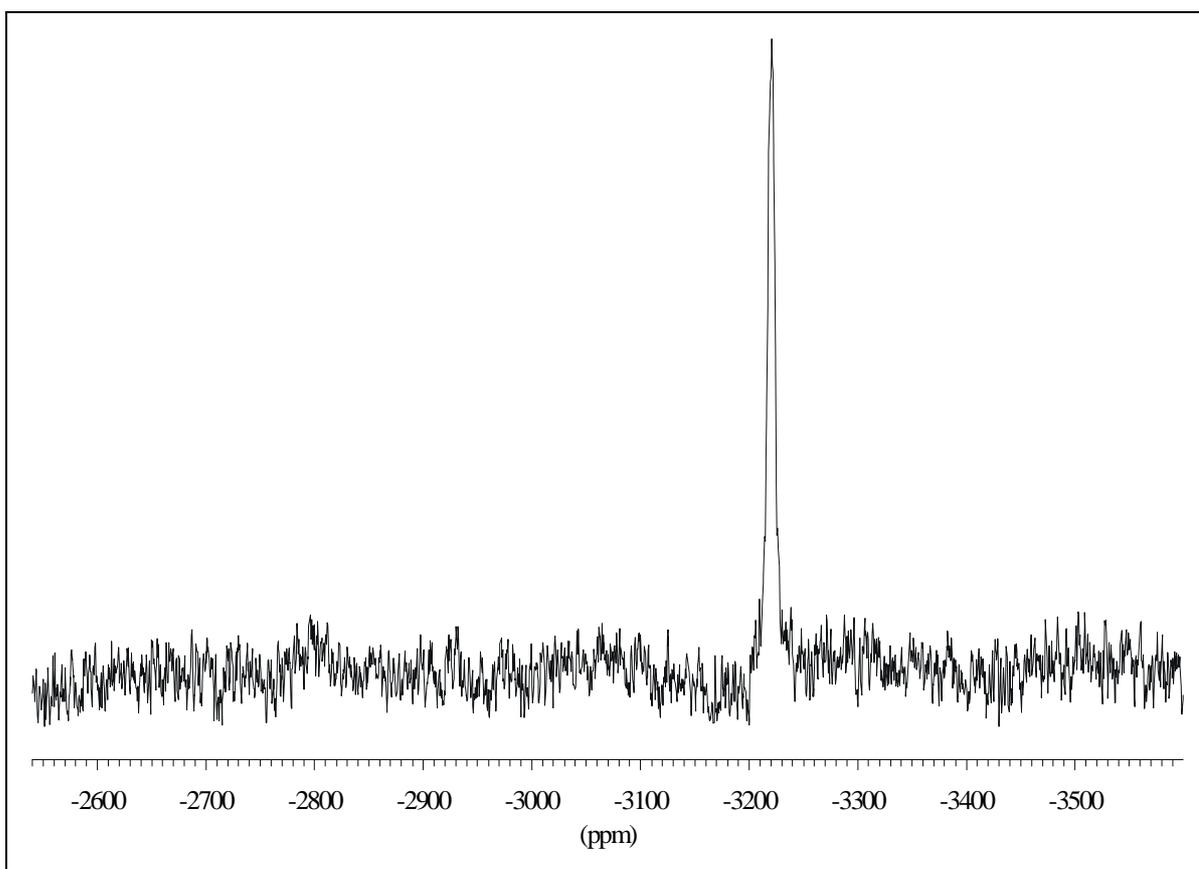


Abb. 6.25: ^{195}Pt -NMR-Spektrum von $[Pt(en)\{achis(ala)_3metNHPH-\kappa^2S,N1\}]^{2+}$ (400 MHz)

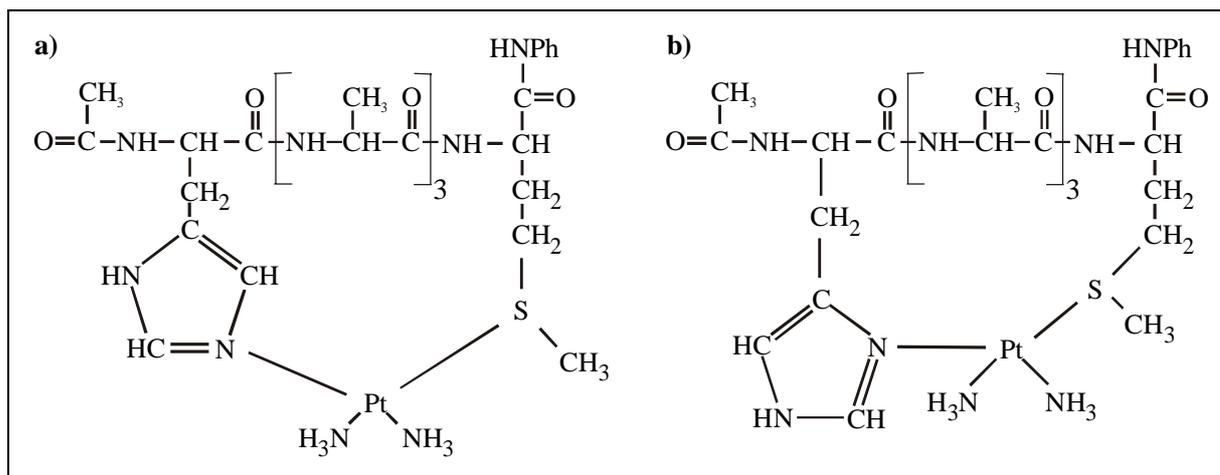


Abb. 6.26: Strukturen von a) $[\{Pt(en)\} achis(ala)_3metNHPH-\kappa^2S,N1]^{2+}$

b) $[\{Pt(en)\} achis(ala)_3metNHPH-\kappa^2S,N3]^{2+}$

Tab. 6.3: Verschiebungswerte der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $achis(ala)_3metNHPH$ Produkte

Signalzuordnung	$\kappa^2S,N1$	$\kappa^2S,N3$	PepS=O
H2 $^3J(^1H-^{195}Pt)$	8.09(s) 22 Hz	8.12(s) 16 Hz	8.59(s)
H5 $^{3,4}J(^1H-^{195}Pt)$	7.11(s) 22 Hz	7.23(s) 9 Hz	7.29(s)
α_{his}	4.38(m)	4.37(m)	4.68(m)
β_{his}	3.26, 3.17(m)	3.46, 3.27(m)	3.23, 3.13(q)
α_{met}	4.40(m)	4.70(m)	4.61(m)
β_{met}	2.37, 2.20(m)	2.42, 2.23(m)	2.38, 2.27(m)
γ_{met}	2.65, 2.48(m)	2.65, 2.48(m)	2.99(m)
δ_{met}	2.35(s)	2.30(s)	2.73(s)
α_{ala}	4.18, 3.92, 3.83(m)	4.26(m)	4.29(m)
β_{ala}	1.46, 1.35(m)	1.43(m)	1.40(m)
Ph	7.51, 7.43, 7.28(m)	7.45, 7.29(m)	7.43, 7.29(m)
ac	2.14(s)	2.05(s)	1.98(s)
en	2.81	2.78	
^{195}Pt	-3221	-3236	
pH*-Wert	1.31	2.21	2.3

Tab. 6.4: FAB-MS-Daten der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *achis(ala)₃metNHPH* Komplexe

Signalzuordnung	$\kappa^2S,N1$ <i>m/z (rel. Anteil)</i>	$\kappa^2S,N3$ <i>m/z (rel. Anteil)</i>	PepS=O <i>m/z (rel. Anteil)</i>
$[1:1]^+$	870 (1)	870 (1)	633 (1)
$[1:1+Na]^+$	893 (0,23)	893 (0,08)	655 (1,04)
$[1:1+Na+HFB]^+$	1056 (0,07)	1057 (0,06)	
$[1:1-en]^+$	811 (0,12)	810 (0,08)	
$[1:1-S-(OH)-CH_3]^+$			569 (0,18)
$[1:1-S-(OH)-CH_3+Na]^+$			591 (0,22)

6.5.3 Das System $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}/acmet(ala)_3metH$

Bei Umsetzungen von $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ mit $acmet(ala)_3metH$ entstehen nur 2 Produkte. In der pH-abhängigen Produktverteilung ist im Sauren die κ^2-S,S' -Spezies und im Basischen der κ^2-S,N_M -Komplex zu beobachten. Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben für beide Produkte eine 1:1 Stöchiometrie mit einem Molekülionenpeak bei $m/z = 789$ und die in Tab. 6.6 gezeigte Fragmentierung. Im 1H -NMR-Spektrum des κ^2-S,S' -Komplexes sind die beiden durch Koordination am Schwefel tieffeldverschobenen δ -Thioetherprotonen bei 2,61 und 2,63 ppm zu sehen. Der eindeutige Beweis für den N_2S_2 -Koordinationsmodus am Platin liefert das ^{195}Pt -NMR-Spektrum mit den Verschiebungswerten von -3770 und -3757 ppm für die Diastereomeren. Dies ist in Übereinstimmung mit dem für die Schwefelkoordination zweier Cysteine am Cisplatin bestimmten Wert von -3766 ppm [66]. Die gleiche κ^2-S,S' -Koordination konnte LAUSSAC et. al. für das Tetrapeptid Boc-Cys(SMe)-Ser-Ala-Cys(SMe)CONH₂ mit $[Pt(en)(NO_3)_2]$ feststellen [161].

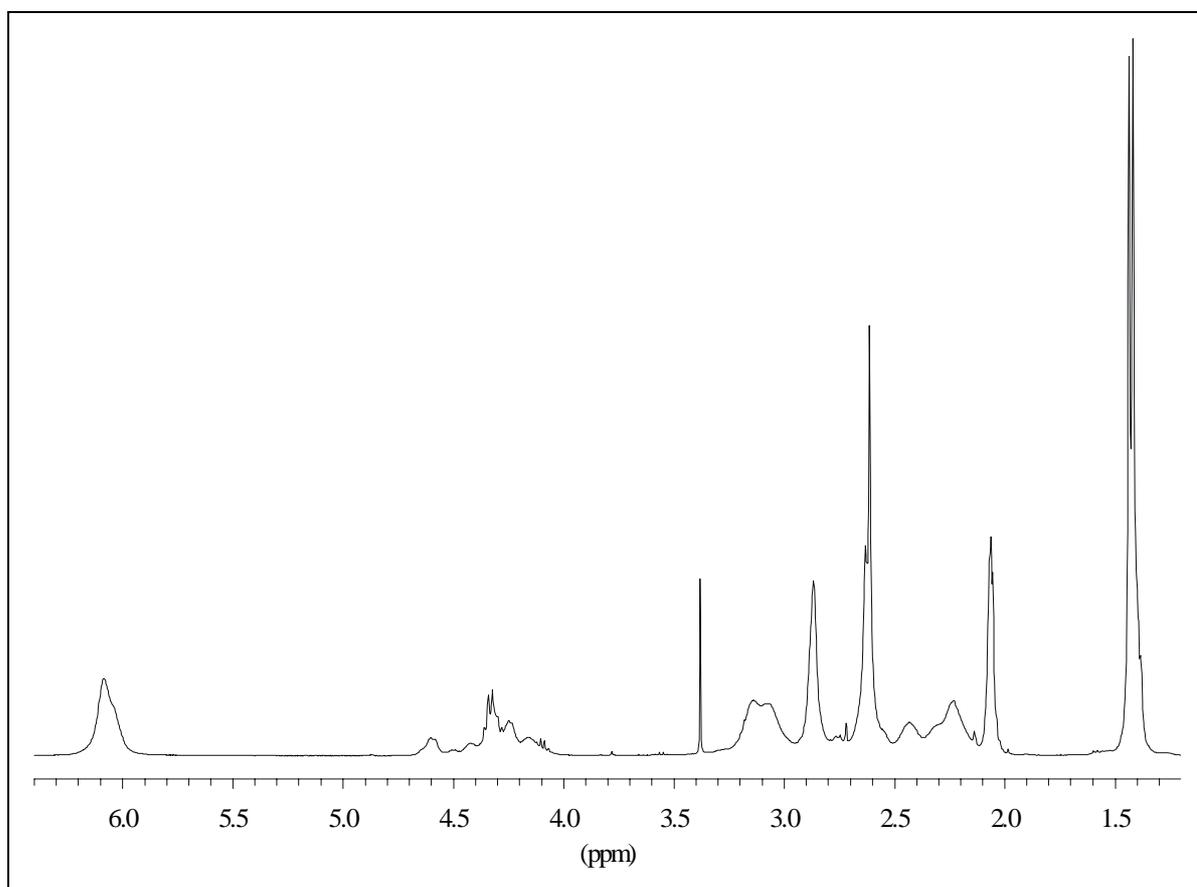


Abb. 6.27: 1H -NMR-Spektrum von $[Pt(en)acmet(ala)_3metH-\kappa^2S,S']^{2+}$ (400 MHz)

Da sich das im Basischen stabile κ^2 - S,N_M -Produkt nach der semi-präparativen Trennung aufgrund des niedrigen pH-Wertes, der durch das Ionenpaarreagenz zustande kommt, immer in den κ^2 - S,S' -Komplex umlagerte, wurde eine präparative Lösung im Basischen ohne Trennung einrotiert. Die so erhaltene κ^2 - S,N_M -Spezies zeigte Resonanzen der δ -Protonen sowohl für den unkoordinierten, als auch für den um +0,35 ppm zu tiefem Feld verschobenen koordinierten Schwefel des Methionins. Die α -met Protonen liegen ebenfalls in unkoordinierter bei 4,65 ppm, als auch in koordinierter Form bei 4,44 ppm vor. Diese Ergebnisse deuten auf einen κ^2 - S,N_M -Chelat des C-terminalen Methionins hin, da eine Methioninseitenkette unkoordiniert vorliegt. Der Verschiebungswert von -3281 ppm im ^{195}Pt -NMR-Spektrum bestätigt die N_3S -Umgebung.

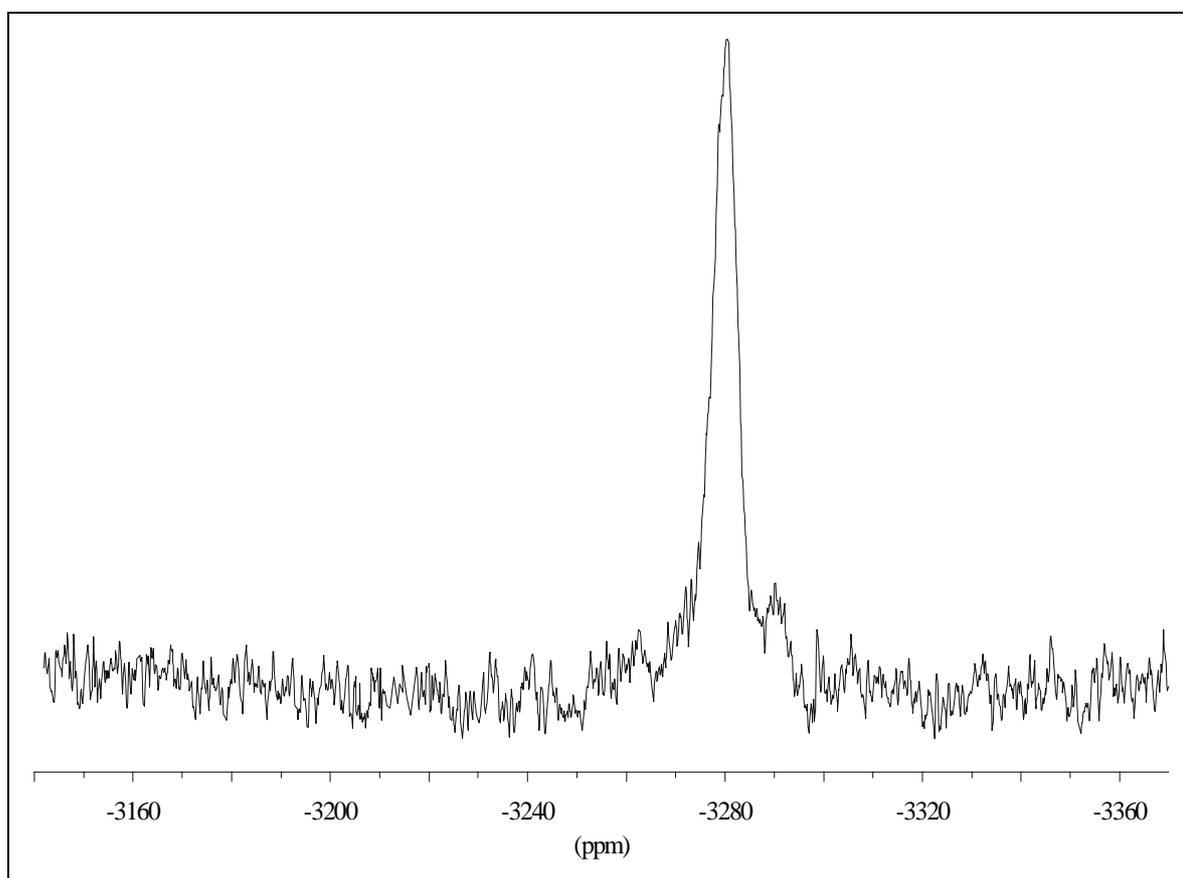


Abb. 6.28: ^{195}Pt -NMR-Spektrum von $[\{Pt(en)\} acmet(ala)_3metH-\kappa^2S,N_M]^+$ (400 MHz)

Das in der pH-Verteilung ab $pH > 5,5$ gebildete Produkt ist vermutlich die $[Pt_2(NH_3)_4(OH)_2](NO_3)_2$ -Spezies. Die Struktur der Verbindung konnte von ROSENBERG und LIPPERT mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Die ebenfalls von ihnen aufgenommenen IR-Spektren zeigen die gleichen charakteristischen Banden [162, 163].

Tab. 6.5: Chemische Verschiebungen der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / acmet(ala)_3metH$ Produkte

Signalzuordnung	κ^2S,S'	κ^2S,N_M
α_{met}	4.59(m)	4.65, 4.44(m)
β_{met}	2.43, 2.23(m)	2.55, 2.09, 2.00(m)
γ_{met}	3.14, 3.07(m)	2.87, 2.62(m)
δ_{met}	2.63, 2.61(s)	2.48, 2.13(s)
α_{ala}	4.43, 4.16(m)	2.43(m)
β_{ala}	1.43(m)	1.40(m)
ac	2.06(s)	2.05(s)
en	2.87	2.80
^{195}Pt	-3770, -3757	-3281
pH*-Wert	1,0	9,3

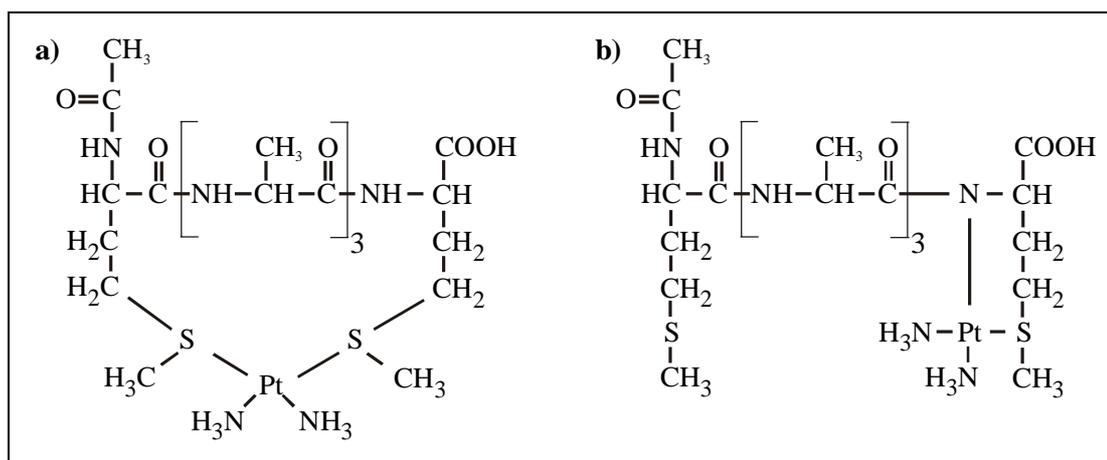


Abb. 6.29: Strukturen von a) $[Pt(en)_2(acmet(ala)_3metH-\kappa^2S,S')]^{2+}$
b) $[Pt(en)_2(acmet(ala)_3metH-\kappa^2S,N_M)]^+$

Tab. 6.6: FAB-MS-Daten der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / *acmet(ala)₃metH* Komplexe

Signalzuordnung	κ^2S,S' <i>m/z (rel. Anteil)</i>	κ^2S,N_M <i>m/z (rel. Anteil)</i>
$[1:1]^+$	789 (1)	789 (1)
$[1:1+Na]^+$	811 (0,28)	812 (1,06)
$[1:1+2Na]^+$		834 (0,24)
$[1:1-en]^+$	730 (0,2)	
$[1:1-en-COOH]^+$	685 (0,17)	
$[1:1-acetyl]^+$		745 (0,24)

6.6 Diskussion

Der Vergleich des Reaktionsverhaltens der in dieser Arbeit untersuchten histidinhaltigen Peptide mit $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ zeigt die Bildung von nur drei Hauptprodukten. In allen drei Systemen bildet sich zuerst der κ^2 - S,N_M -Komplex und anschließend die beiden κ - $S,N1$ - und κ - $S,N3$ -Spezies. Die zeitabhängigen Produktverteilungen der Peptide achis(ala)₂metNHPh und achis(ala)₃metNHPh besitzen im sauren pH-Bereich einen identischen Verlauf. Dagegen bildet sich mit dem C-terminal ungeschütztem achis(ala)₃metH das κ^2 - S,N_M -Produkt deutlich langsamer und durchläuft nach 24 h sein Maximum im Gegensatz zu 2 h der beiden anderen geschützten Peptide. Daraus folgernd ist in der von WOLTERS aufgenommenen pH-Verteilung nach einer Reaktionszeit von 4 Wochen der κ^2 - S,N_M -Chelat als Hauptprodukt zu finden. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten muss in Verbindung mit der sterisch anspruchsvollen NH-Phenyl Schutzgruppe stehen, die vor allem die Bildung des κ^2 - S,O -Vorläufers verhindert und zum anderen durch räumliche Anordnung zu einer bevorzugten Bildung der κ^2 - $S,N_{Imidazol}$ -Komplexe führt. Die in Kapitel 4 berechneten $S,N_{Imidazol}$ -Abstände zwischen den in wässriger Lösung in einer α -Helix-Konformation befindlichen Pentapeptide sind fast immer kleiner als der S,N_M -Abstand und können aus diesem Grund zur bevorzugten Bildung der κ^2 - $S,N_{Imidazol}$ -Makrochelate führen.

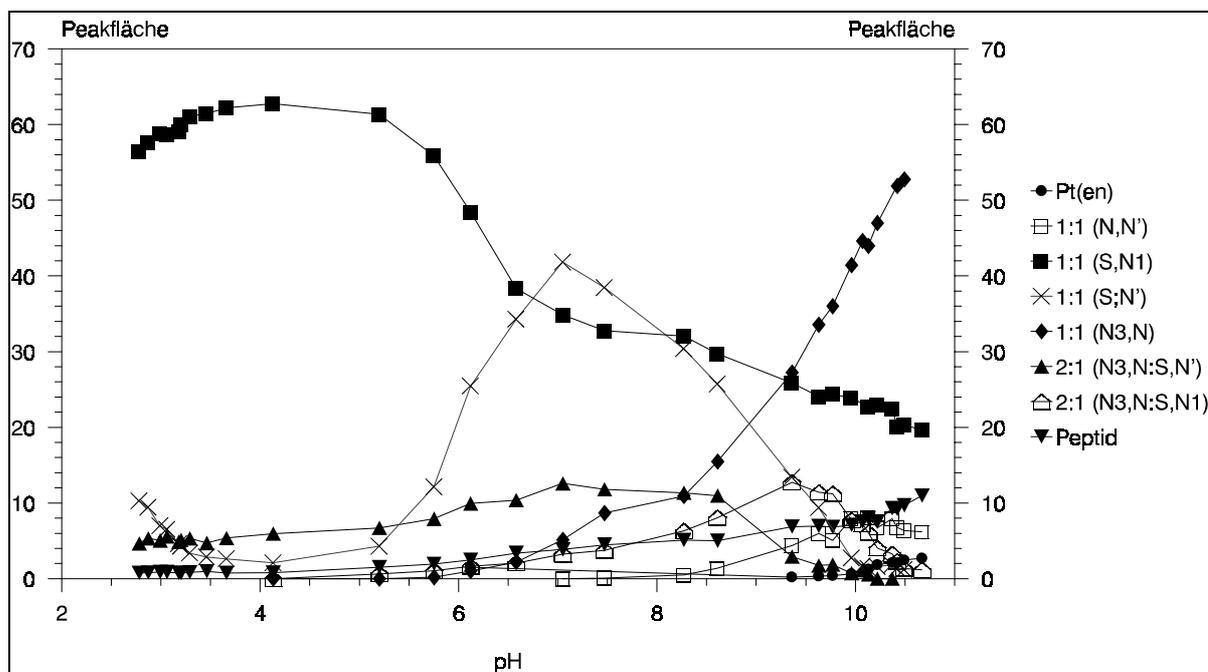


Abb. 6.30: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / hisglymetH (1:1); Reaktionszeit $t = 4$ Wochen

In allen drei pH-abhängigen Produktverteilungen sind kongruente Peakflächenverläufe zu beobachten, in denen der κ^2 -*S,N1*-Komplex immer dominiert. Die Verlängerung des achis(ala)₂metNHPH Peptides um eine Alanineinheit zwischen den Aminosäuren Histidin und Methionin verändert das N1:N3 Produktverhältnis von 2,2:1 zu 2,9:1 (pH = 6,5). Im achis(ala)₃metH-System liegt für einen pH-Wert von 6,2 ein 1,5:1 Verhältnis vor.

Die Ergebnisse des acmet(ala)₃metH-Systems bestätigen zum einen die hohe thermodynamische Stabilität der Pt-S Bindung in saurer Lösung mit der Bildung des κ^2 -*S,S'*-Komplexes und verdeutlichen zum anderen die kinetische Bevorzugung des weichen Schwefels gegenüber dem harten Stickstoff im basischen pH-Bereich. Dort liegt nach einer Reaktionszeit von einer Woche der auf C-terminaler Seite entstandene sechsgliedrige κ^2 -*S,N_M*-Chelat als Hauptprodukt vor, der sich aufgrund des möglichen κ^2 -*S,O*-Vorläufers bevorzugt auf dieser Seite bildet.

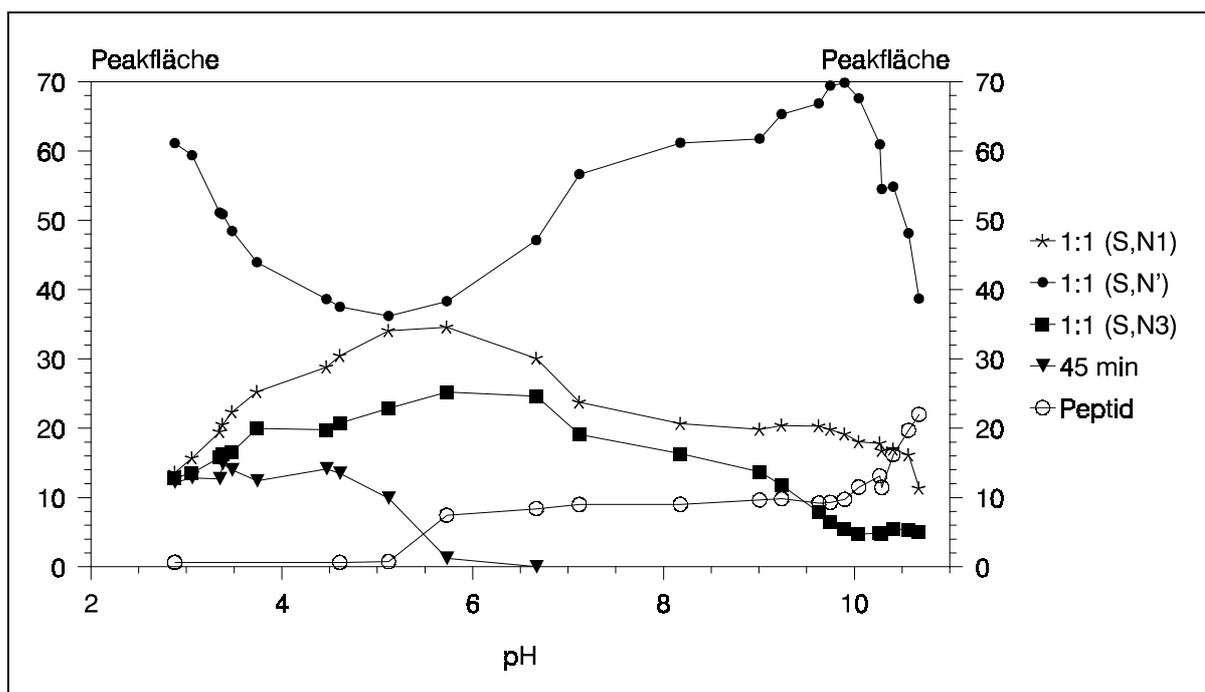


Abb. 6.31: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(gly)₂metH (1:1); Reaktionszeit $t = 4$ Wochen

Die Peakflächenverläufe für die Reaktionsprodukte der von WOLTERS untersuchten achis(gly)₂metH- und achis(ala)₃metH-Systeme sind nahezu deckungsgleich und das dort vorhandene N1:N3 Produktverhältnis beträgt 1,5:1 bei pH = 5,7 [73]. Das ebenfalls von WOLTERS analysierte N-terminal ungeschützte Tripeptid hisglymetH zeigt ein

unterschiedliches Reaktionsverhalten gegenüber den übrigen Peptiden (Abb. 6.30). Durch die Möglichkeit der Aminogruppenkoordination bildet sich ab $pH > 6,5$ die 1:1 $\kappa^2-N_H,N3$ -Spezies im Basischen als Hauptprodukt. Des weiteren sind zusätzlich die beiden binuklearen $1\kappa^2-N_H,N3:2\kappa^2-S,N_M$ und $1\kappa^2-N_H,N3:2\kappa^2-S,N_I$ koordinierten Komplexe und das mononukleare κ^2-N_H,N_M -Produkt in geringen Konzentrationen zu finden. Aus den von WOLTERS erstellten Kraftfeldberechnungen geht aufgrund des um $1,3 \text{ \AA}$ kürzeren Abstand gegenüber dem $\kappa^2-S,N3$ -Komplex die Bevorzugung des 15 gliedrigen κ^2-S,N_I -Makrochelates hervor.

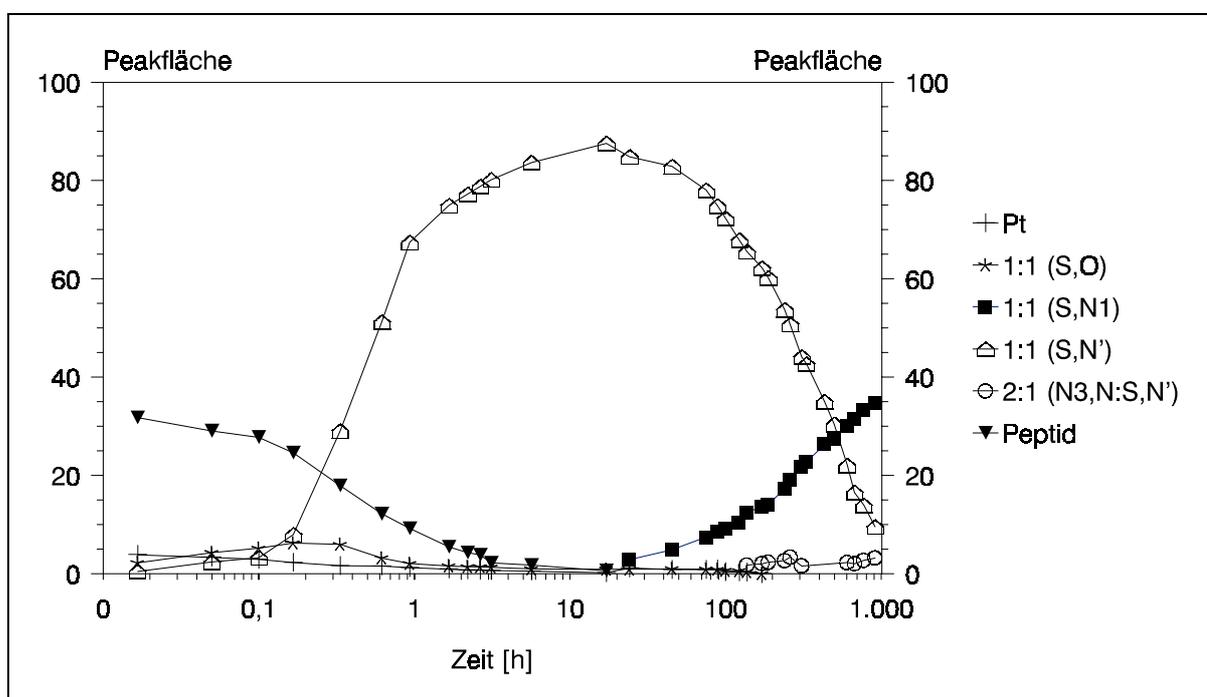


Abb. 6.32: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / hisglymethH (1:1); $pH = 2,99$

Kinetische Untersuchungen im Verhältnis von 1:1 bei $pH = 2,99$ des $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / hisglymethH- und des $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / achis(ala)₃methH-Systems sind bis auf die fehlende Bildung des $\kappa^2-S,N3$ -Komplexes identisch. Auch hier erreicht das κ^2-S,N_M -Produkt ein Maximum nach 24 h gegenüber 2 h bei den achis(ala)_{2/3}methH Peptidsystemen.

Die Ergebnisse der $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ -Modellverbindung veranschaulichen die Rolle der N- und C-terminalen Schutzgruppen und die Beeinflussung der Produktbildung durch eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren zwischen den koordinierenden funktionellen Gruppen der Aminosäuren Histidin und Methionin.

7 Reaktionen von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]

7.1 Umsetzungen mit dem Tripeptid hisglymethH

cis-[PtCl₂(NH₃)₂] wurde mit hisglymethH im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 bei pH = 2,4 bis 10 umgesetzt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Methanol als Modifier und einer Konzentrationserhöhung von 16 auf 25 % MeOH als Stufengradient. Bei einer Säulentemperatur von 25° C und 0,124% HFB als Ionenpaarreagenz konnten sämtliche Produkte innerhalb von 60 Minuten getrennt werden. In der nachfolgenden Abbildung sind drei ausgewählte Chromatogramme abgebildet, die die Elutionsreihenfolge der Produkte und Edukte verdeutlichen.

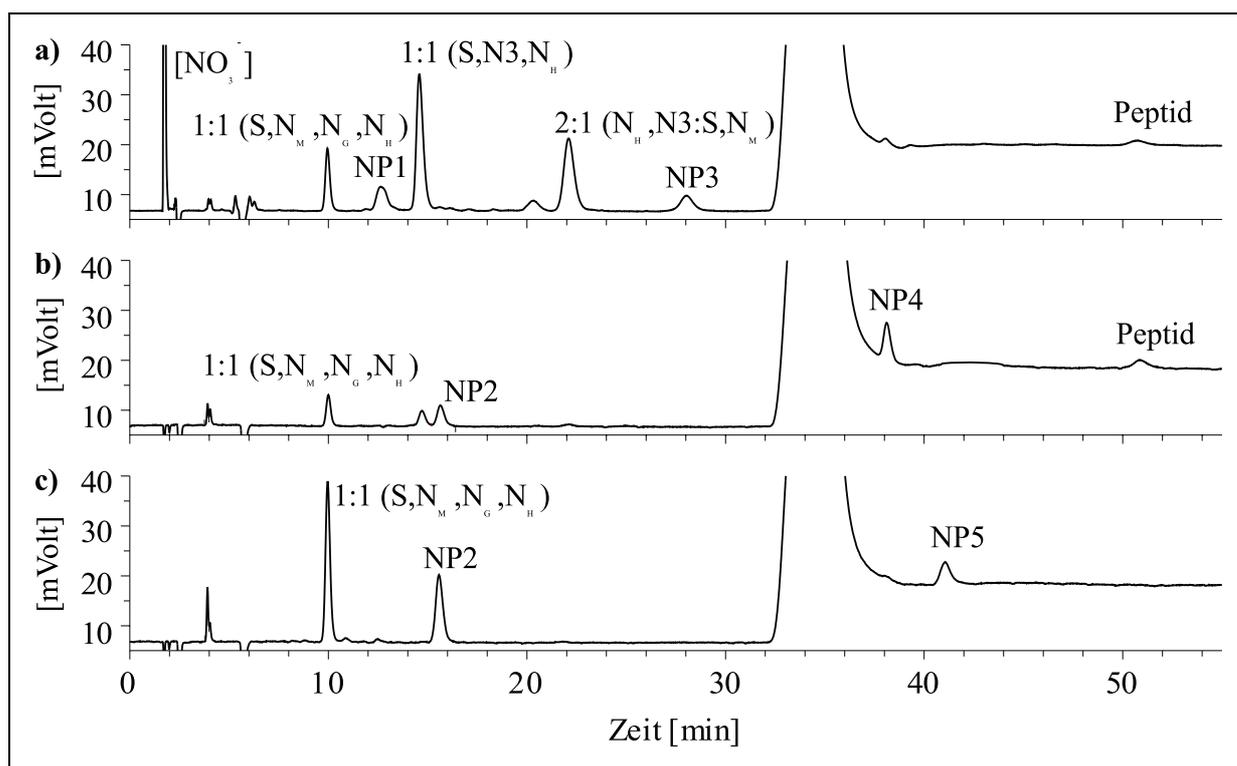


Abb. 7.1: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymethH ; 16 - 25% MeOH; 0,124% HFB; 25°C
 a) pH = 2,46 b) pH = 6,60 c) pH = 9,38

7.1.1 pH-abhängige Produktverteilung

Die pH-abhängige Produktverteilungskurve zeigt die Vielzahl der gebildeten Produkte, die aufgrund des durch den trans-Effekt des Schwefels begünstigten NH_3 -Verlusts des $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ entstehen können.

Über den gesamten pH-Bereich ist die tetradentatkoordinierte $\kappa^4 S, N_M, N_G, N_H$ -Spezies zu finden und dominiert von $pH = 3,2 - 5,5$ und ab pH-Werten größer als 9 die pH-Verteilung. Ab $pH > 5$ nimmt gleichzeitig auch die Konzentration des Nebenproduktes NP2 zu, die bei einem pH-Wert von 9 ihr Maximum erreicht. Das Nebenprodukt NP5 entsteht parallel dazu mit halb so großer Peakfläche.

Im Säuren bei $pH < 3$ bilden sich 2 Hauptprodukte in fast gleicher Konzentration. Zum einen entsteht der tridentat koordinierte $\kappa^3 S, N_3, N_H$ -Komplex und zum anderen das $1\kappa^2 N_H, N_3 : 2\kappa^2 S, N_M$ -Produkt mit einer 2:1 Stöchiometrie, die sowohl durch HPLC/ESI-MS Messungen, als auch durch kinetische Untersuchungen bestätigt wurde. Das im neutralen pH-Bereich bei $pH = 5,5 - 7,5$ bevorzugt entstehende wahrscheinlich imidazolkoordinierte Produkt NP4 existiert in geringen Konzentrationen über den gesamten pH-Bereich.

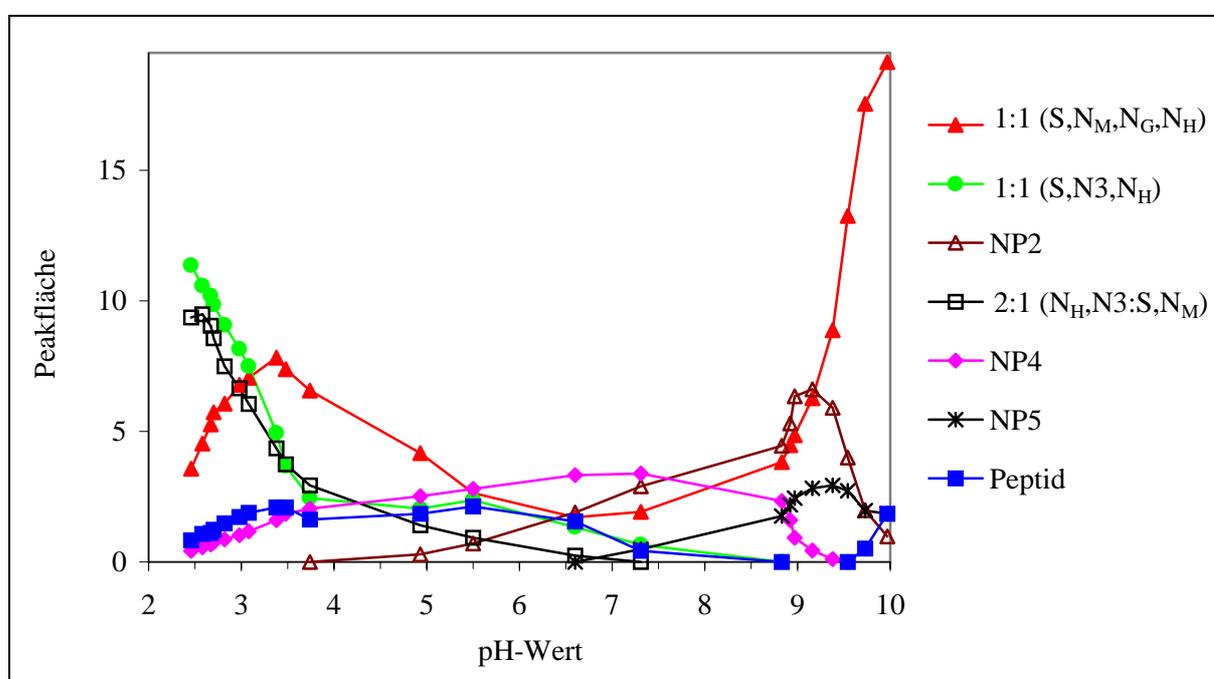


Abb. 7.2: pH -abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $hisglymetH$ (1:1); Reaktionszeit $t = 3$ Wochen

7.1.2 Kinetische Untersuchungen

Der zeitliche Ablauf der Komplexbildung von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit dem Tripeptid hisglymetH wurde anhand von vier exemplarisch ausgewählten Reaktionslösungen verfolgt. Durch Einstellung der pH-Werte wurden drei Lösungen mit 1:1 Stöchiometrie im Sauren, im Neutralen und im Basischen untersucht. Zur Aufklärung des Reaktionsweges der $1\kappa^2N_H, N3:2\kappa^2S, N_M$ -Spezies diente eine Reaktionslösung mit 2:1 Stöchiometrie bei pH = 2,38. Die Reaktionslösungen wurden in möglichst kurzen Intervallen chromatographiert, um in der logarithmischen Auftragung insbesondere die kinetischen Vorläuferkomplexe, wie z.B. κ^2S und κ^2S, N_M zu beobachten, die in der pH-Produktverteilungskurve nach einer Reaktionszeit von 21 Tagen schon zu den thermodynamisch stabileren Komplexen abreagiert sind. Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Reaktionslösungen wurden zur Bestimmung der Reaktionskinetiken verwendet.

Tab. 7.1: Ansätze für die Untersuchungen der Reaktionskinetik des [PtCl₂(NH₃)₂]/hisglymetH Systems

1:1 Stöchiometrie	2:1 Stöchiometrie
pH = 2,99	pH = 2,38
pH = 6,52	
pH = 9,30	

pH-Wert der Lösung nach 21 Tagen Reaktionszeit

Der nur in den kinetischen Untersuchungen auftauchende κ^2S, N_M -Vorläuferkomplex besitzt die selbe Retentionszeit und ist in den Chromatogrammen unter dem Peptidpeak zu finden. Die Zuordnung konnte mittels bei gestopptem Fluss aufgenommenen UV-Spektren und einer ¹H-NMR-Kinetik getroffen werden.

Die zeitliche Abfolge der Produktbildung bei pH = 2,99 verdeutlichen die in Abb. 7.4 gezeigten Chromatogramme. Das harte Donoratom Sauerstoff bildet hierbei nicht den kinetisch bevorzugten κ^2S, O -Chelat, wie es aus Untersuchungen von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit Methionin von APPELTON et al. zu vermuten wäre [164]. Aufgrund der Resonanzlage der α -CH_{met}-Protonen in einer mit dem Peptid achisglymetH durchgeführten ¹H-NMR Kinetik im

Sauren kann eine Sauerstoffkoordination ausgeschlossen werden. Als Vorläuferkomplexe bildet sich das monodentat schwefelkoordinierte $\kappa\text{-S}$ Produkt mit einem Maximum nach 3 h. Innerhalb eines Tages ist es vollständig zu dem sechsgliedrigen $\kappa^2\text{-S,}N_M$ -koordiniertem Komplex weiterreagiert. Aus der monodentatkoordinierten $\kappa\text{-S}$ Spezies bilden sich außerdem nach 6 h parallel die beiden Nebenprodukte und der $\kappa^3\text{-S,}N_3, N_H$ -Komplex in deutlich geringerer Konzentration. Die aufgrund der geringen Konzentration nicht näher charakterisierten NP1 und NP3 erlangen nach 1 Woche und das tridentat über imidazolkoordinierte Produkt nach 3 Wochen ihre maximale Peakfläche. Nach einer Reaktionszeit von 48 h bilden sich aus dem $\kappa^2\text{-S,}N_M$ -Produkt sowohl das $\kappa^4\text{-S,}N_M, N_G, N_H$, als auch in doppelter Menge der 2:1 Komplex und bleiben nach 1000 h Stunden konstant. Sämtliche übrigen Produkte sind zu diesem Zeitpunkt nahezu nicht mehr detektierbar.

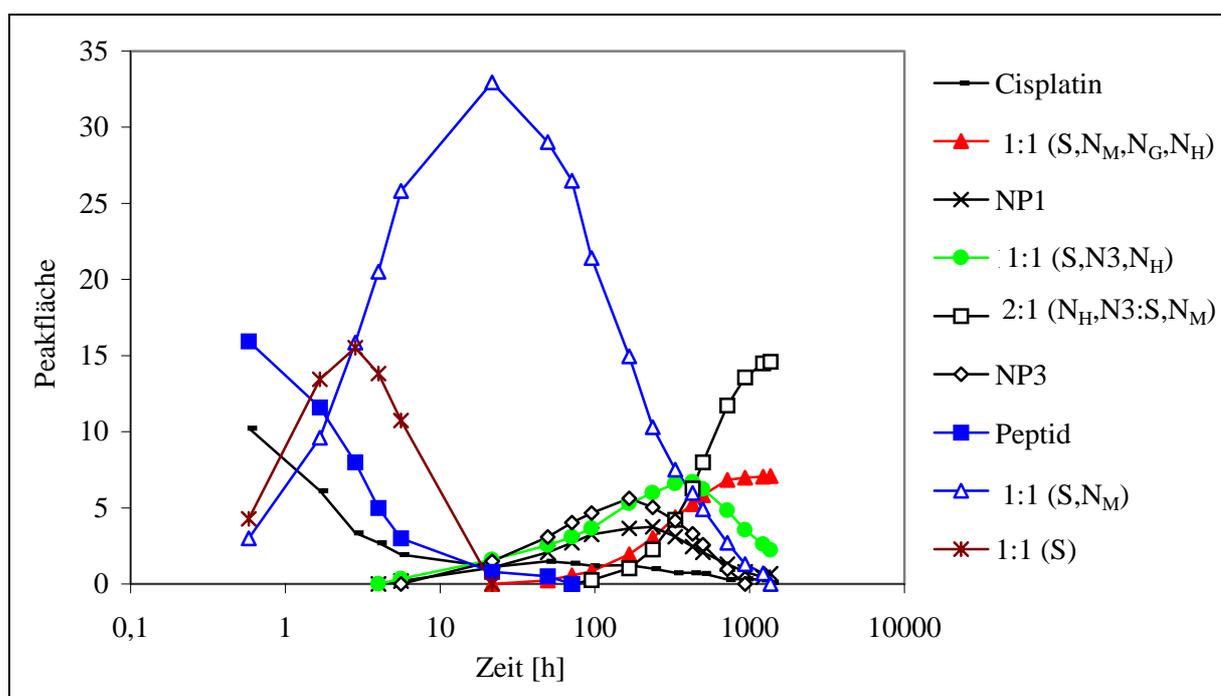


Abb. 7.3: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ / hisglymeth (1:1); $\text{pH} = 2,99$

Im Vergleich zu der $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -Kinetik von WOLTERS zeigt sich ein identischer Kurvenverlauf der $\kappa^2\text{-S,}N_M$ -Spezies. Als thermodynamisch stabiles Endprodukt entsteht hier jedoch nicht ein imidazolkoordinierter Makrochelate, sondern aufgrund des NH_3 -Verlustes die tetradentat koordinierte Spezies. Der gleiche 2:1 Komplex entstand bei den Untersuchungen von WOLTERS nur in sehr geringen Konzentrationen.

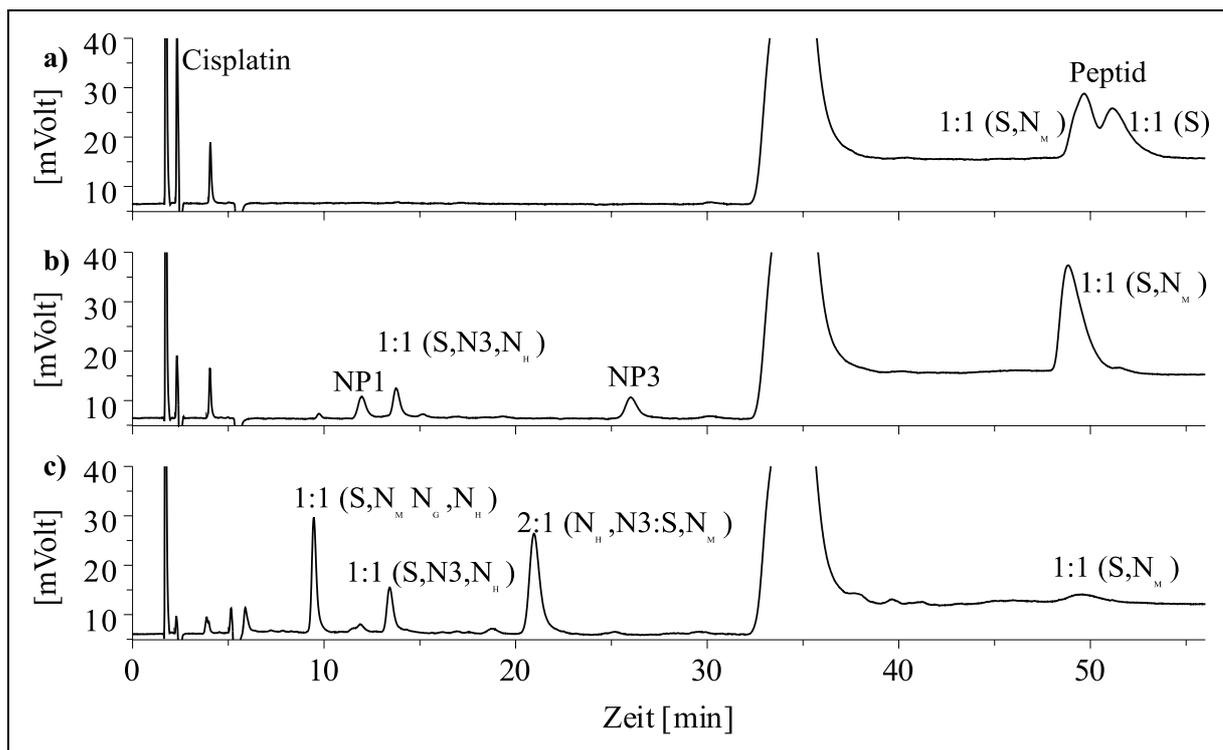


Abb. 7.4: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / *hisglymeth*; 16 - 25% MeOH; 0,124% HFB; 25°C; *t* = Reaktionszeit
 pH = 2,99 a) *t* = 2,83 h b) *t* = 49,51 h c) *t* = 933 h

Die zeitabhängige Produktverteilung für eine Reaktionslösung mit einem pH-Wert von 6,52 zeigt den gleichen Reaktionsverlauf der κ^2S und κ^2S, N_M -Vorläuferprodukte. Zusätzlich bildet sich jedoch ein weiteres Zwischenprodukt, das nach 6 h sein Peakflächemaximum durchläuft und nach 24 h nicht mehr detektierbar ist. Aus ¹H-NMR kinetischen Untersuchungen könnte es sich hierbei um einen imidazolkoordinierten Komplex NP4 handeln, der dann zu dem tridentat koordiniertem $\kappa^3S, N3, N_H$ -Komplex weiterreagiert, das sich parallel zu dem κ^2S, N_M -Komplex bildet. Die Bildung des NP4 und damit auch des $\kappa^3S, N3, N_H$ -Produktes ist im Neutralen bei pH-Werten um 7 wesentlich schneller, da der pK_a-Wert für die Imidazoldeprotonierung von freiem Histidin bei pH = 6,00 liegt [150]. Nach einer Reaktionszeit von 1000 h dominiert mit konstanter Peakfläche das tetradentate κ^4S, N_M, N_G, N_H -Produkt. In geringen Konzentrationen sind auch noch das NP2 und das sich vermutlich aus dem Zerfall des $\kappa^3S, N3, N_H$ -Komplex entstehende NP4 vorhanden.

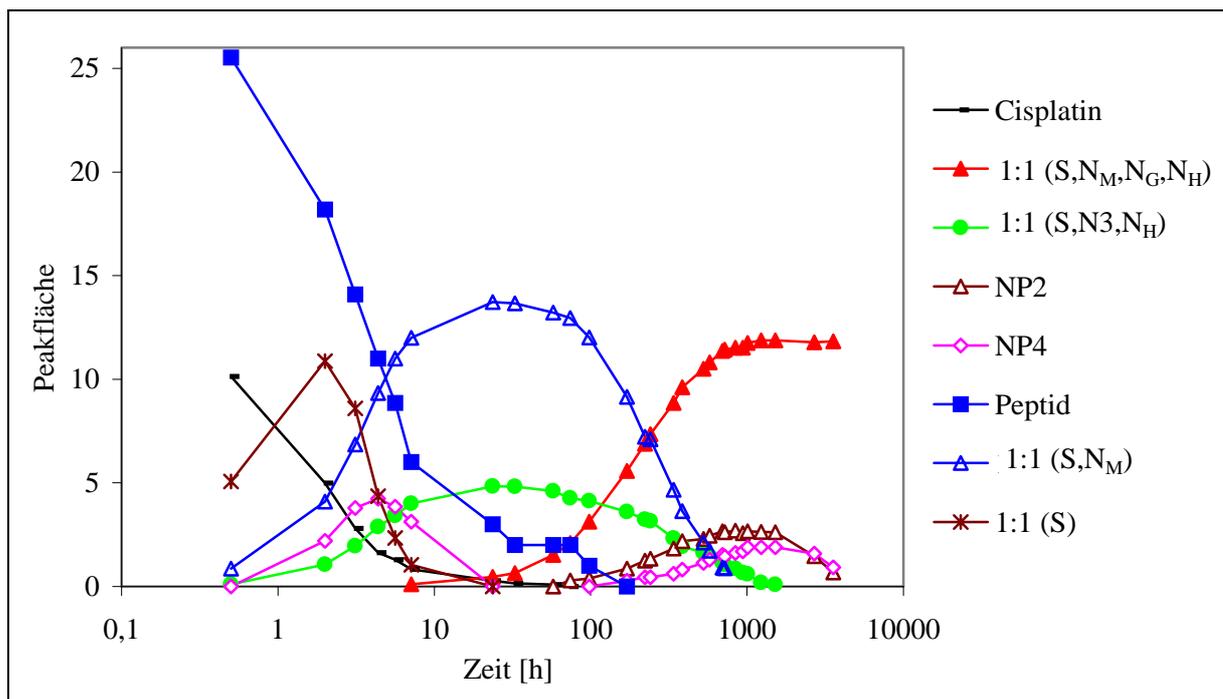


Abb. 7.5: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymeth (1:1); pH = 6,52

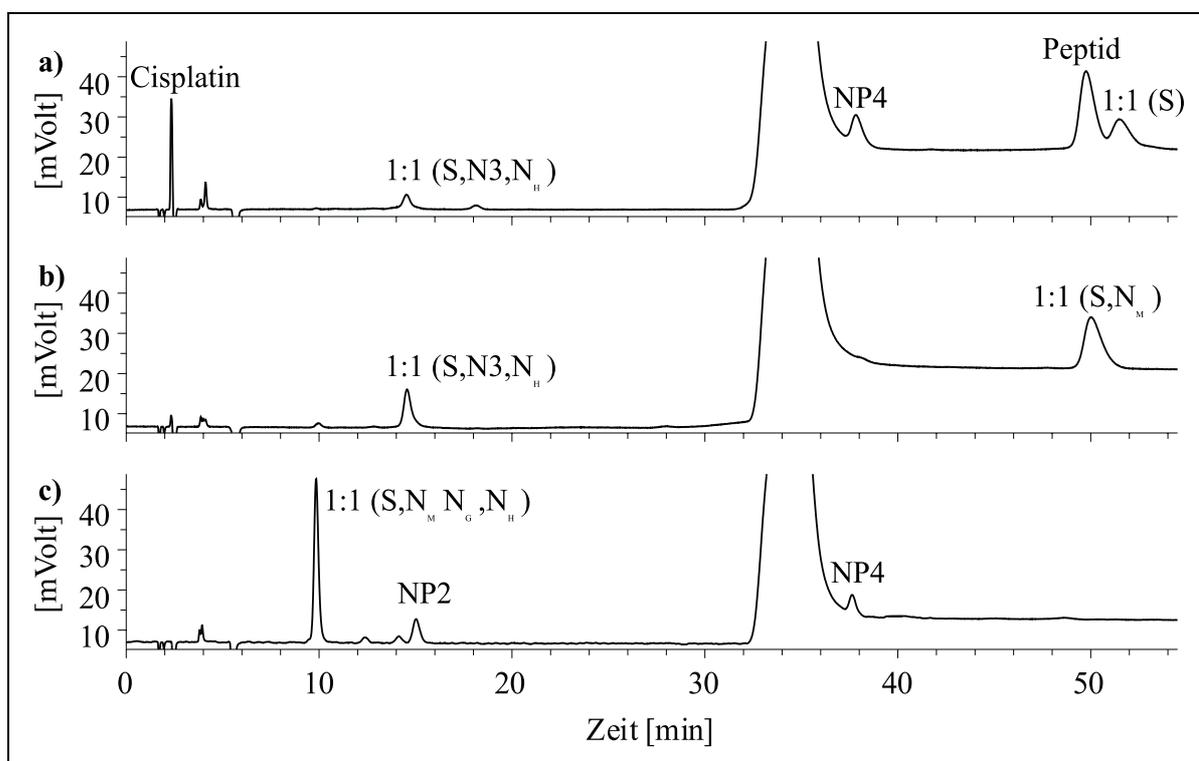


Abb. 7.6: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymeth; 16 - 25% MeOH; 0,124% HFB; 25°C; t = Reaktionszeit
pH = 6,52 a) $t = 3,12$ h b) $t = 23,62$ h c) $t = 938$ h

Im Basischen bei einem pH-Wert von 9,3 verläuft der Reaktionsmechanismus wie aus Abb. 7.7 ersichtlich anders. Der monodentat schwefelkoordinierte Komplex ist nicht und das NP4 nur in sehr geringen Konzentrationen detektierbar. Auch der κ^2S,N_M -Vorläuferkomplex zeigt ein niedrigeres Maximum und reagiert schon nach 1 Woche vollständig weiter. Von Reaktionsbeginn an besteht der κ^3S,N_3,N_H -Komplex und erreicht nach 100 h sein Maximum um anschließend zu dem tetradentaten Komplex weiterzureagieren, der nach 1000 h das alleinige Hauptprodukt darstellt.

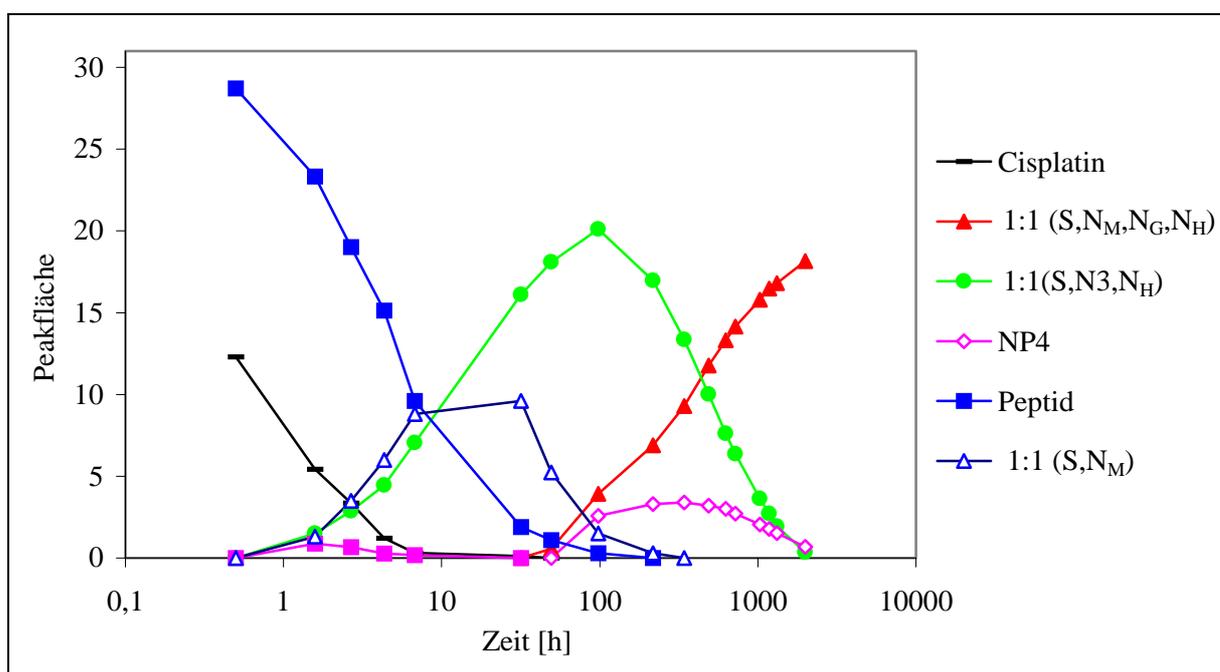


Abb. 7.7: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymeth (1:1); pH = 9,30

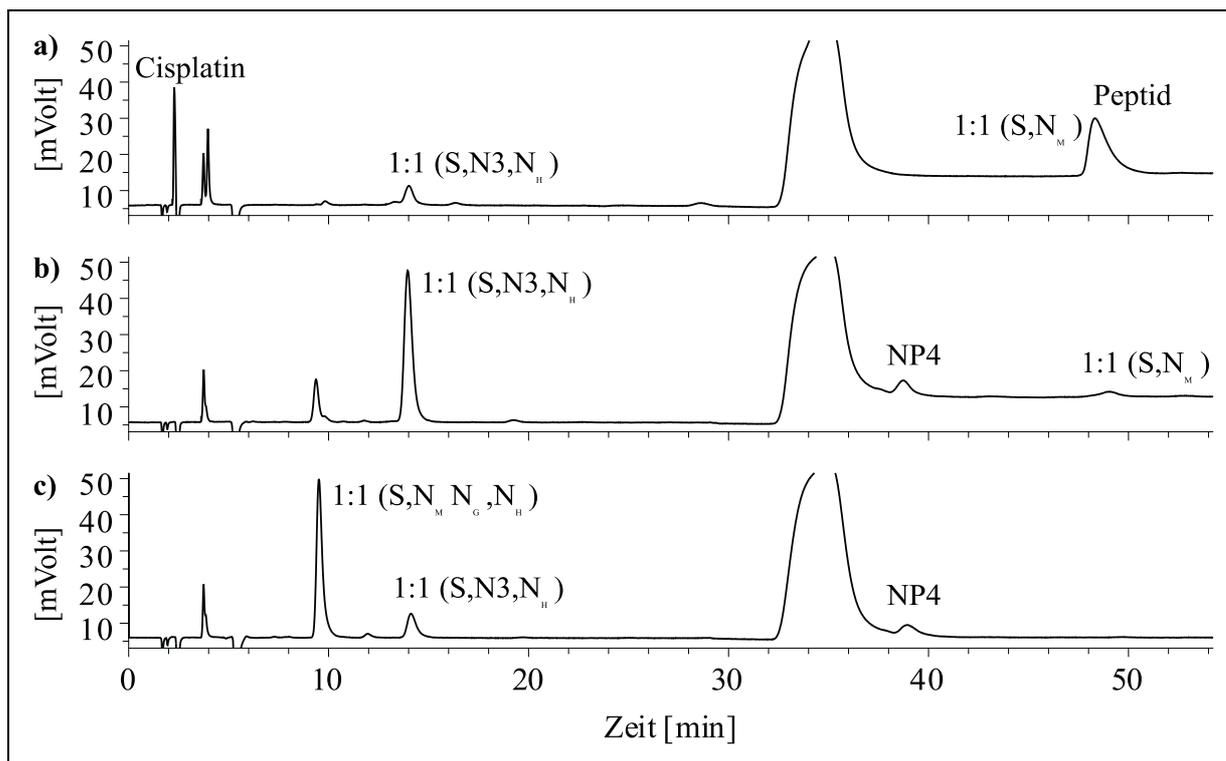


Abb. 7.8: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymethH ; 16 - 25% MeOH; 0,124% HFB; 25°C; t = Reaktionszeit
 pH = 9,30 a) $t = 2,67$ h b) $t = 97,92$ h c) $t = 1031$ h

Die Kinetik der Reaktion von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit hisglymethH im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 bei pH = 2,38 aus Abb. 7.9 ist der entsprechenden 1:1 zeitabhängigen Produktverteilung sehr ähnlich. Auch hier bilden sich aus den Vorläufern κS und $\kappa^2 S, N_M$ die tridentate $\kappa^3 S, N_3, N_H$ -Spezies und die beiden Nebenprodukte NP1 und NP3. Nach 1000 h ist jedoch nur noch die 2:1 Spezies vorhanden und in sehr geringen Konzentrationen das tetradentate Produkt.

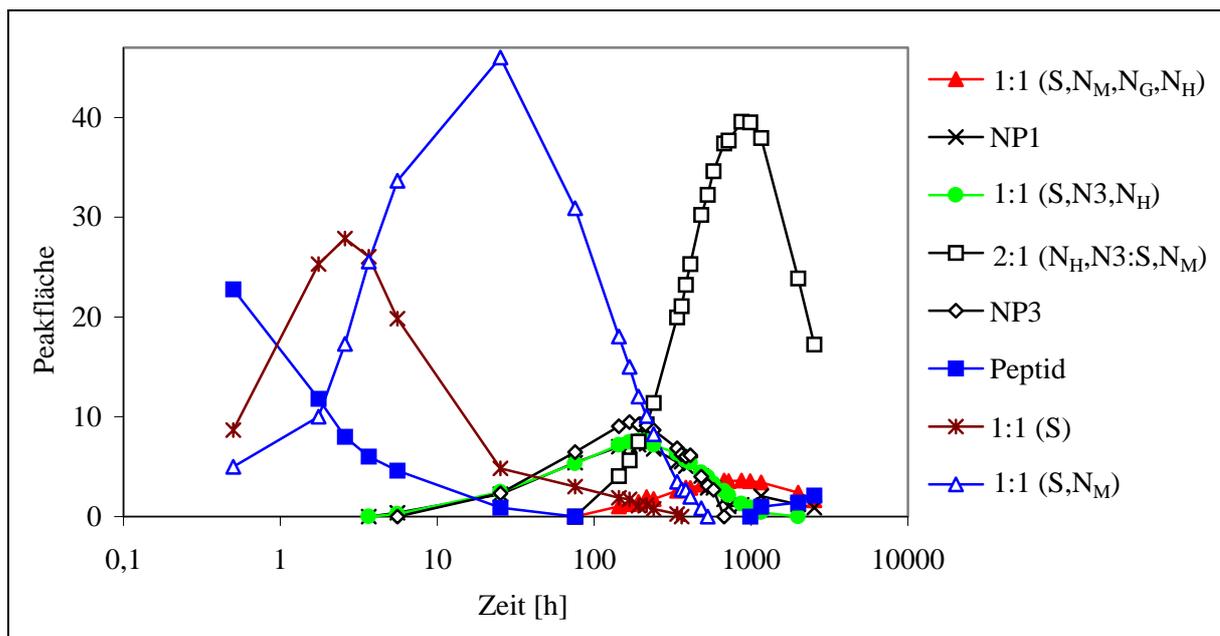


Abb. 7.9: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymeth (2:1); $pH = 2,38$

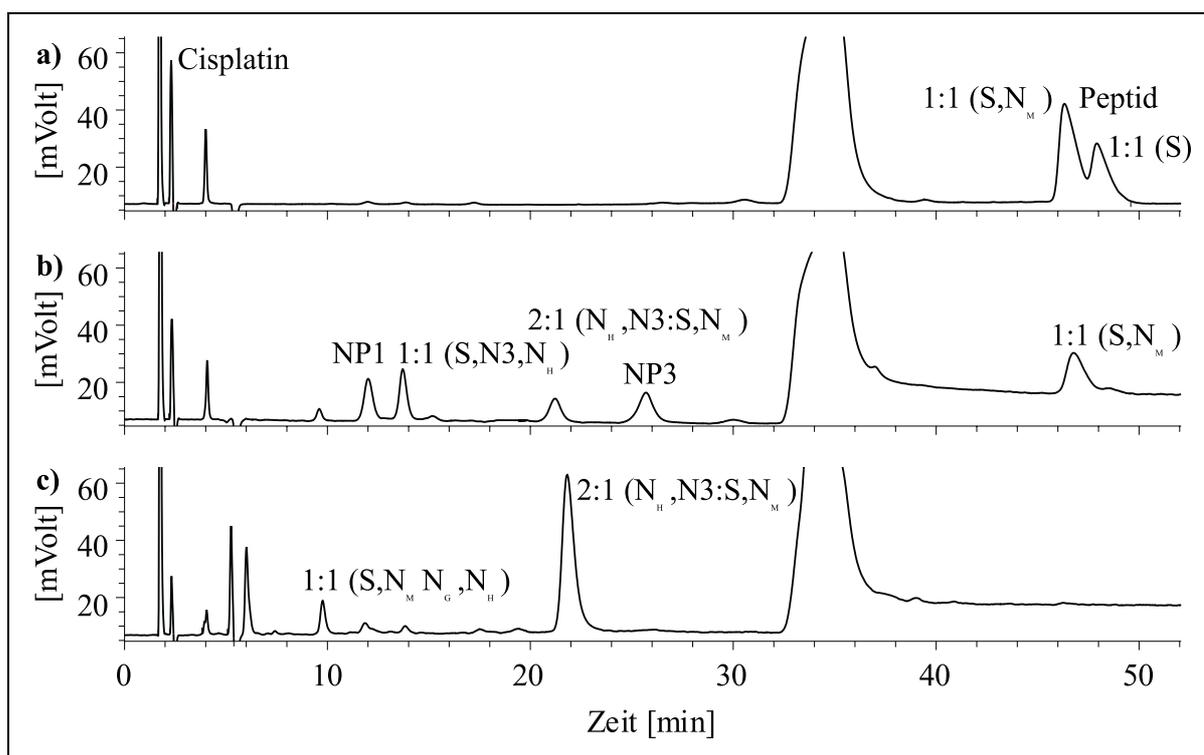


Abb. 7.10: Chromatogramme eines 2:1 Ansatzes des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / hisglymeth; 16 - 25% MeOH; 0,124% HFB; 25°C; $t =$ Reaktionszeit $pH = 2,38$ a) $t = 5,58 h$ b) $t = 167,91 h$ c) $t = 988 h$

7.2 Umsetzungen mit achisglymethH

Die chromatographische Trennung des Reaktionsgemisches von [PtCl₂(NH₃)₂] und achisglymethH ließ sich nur schwer optimieren, weil mehrere Produkte vergleichbare Selektivitäten und somit ähnliche Retentionszeiten bzgl. der Veränderung der Elutionsbedingungen hatten. Zudem sind die Retentionszeiten sehr unterschiedlich, sodass mit einem 2-stufigem Gradienten mit den Methanolkonzentrationen von 7 % / 10 % / 18 % und 0,124 % HFB und einer Säulentemperatur von 35° C die besten Trennbedingungen gefunden wurden. Sämtliche Produkte konnten so in einer Analysenzeit von 65 min getrennt werden.

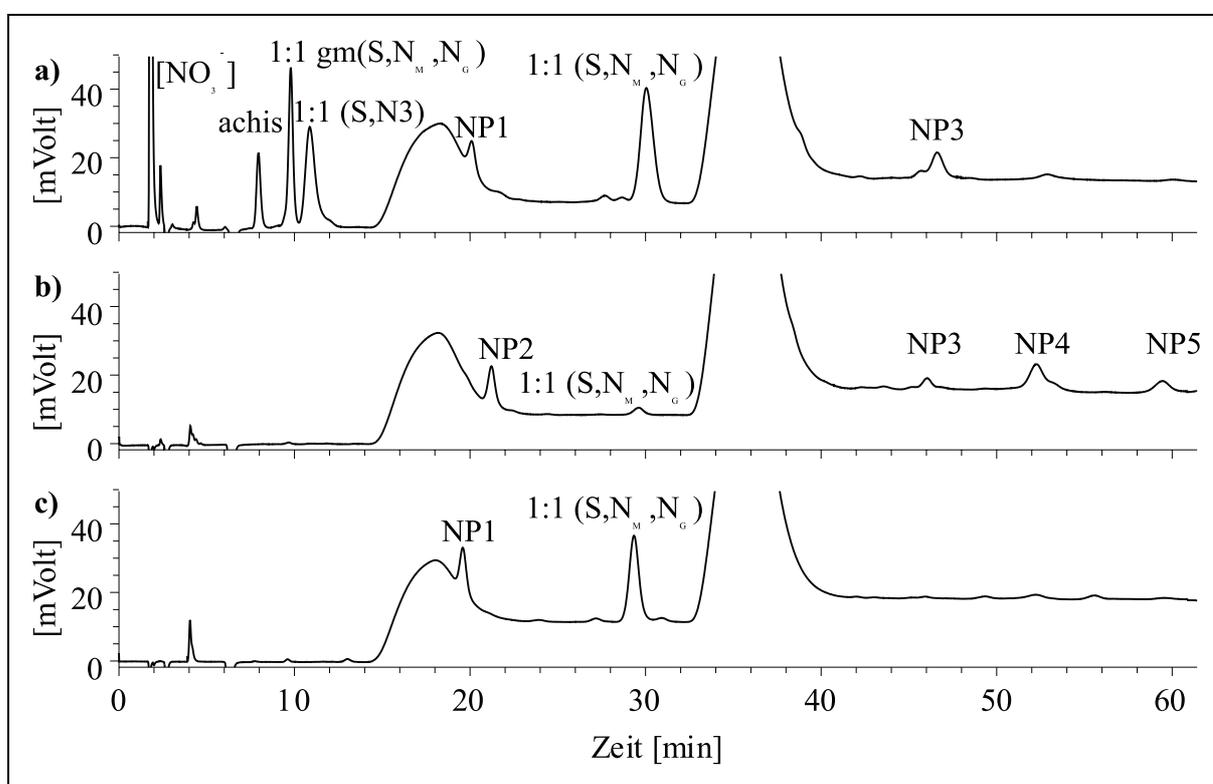


Abb. 7.11: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymethH ; 7 – 10 - 18% MeOH; 0,124% HFB; 35°C
 a) pH = 2,71 b) pH = 6,58 c) pH = 9,17

7.2.1 pH-abhängige Produktverteilung

In der pH-abhängigen Produktverteilungskurve ist eine Vielzahl von Produkten sichtbar. Der tridentate κ^3S,N_M,N_G -Komplex ist ab $pH < 4$ und ab $pH > 7,5$ als bevorzugtes Hauptprodukt zu finden. Seine Abnahme nach Erreichen des Maximums bei $pH = 9$ wird durch die gleichzeitige Zunahme an Peptid verdeutlicht. Der gleiche Kurvenverlauf bei einer deutlich verringerten Konzentration zeigt das Nebenprodukt NP1. Es könnte sich hierbei aufgrund von UV-Spektren um die gleiche tridentate Koordination handeln, die in diesem Fall ein Isomer des κ^3S,N_M,N_G -Komplex durch unterschiedliche Anordnung der achis-Gruppe ist. Die Dritte im Basischen anzutreffende Spezies ist vermutlich der sechsgliedrige κ^2S,N_M -Chelat, der mit Hilfe von 1H -NMR kinetischen Untersuchungen bestätigt werden kann. Im Säuren bilden sich bei $pH < 4$ aus dem Zerfall des tridentaten Hauptproduktes die κ^3S,N_M,N_G -glymetH und achisH Spaltprodukte. Den gleichen Kurvenverlauf besitzt auch der κ^2S,N_3 -Makrochelat mit einer maximalen Peakfläche bei $pH = 3$.

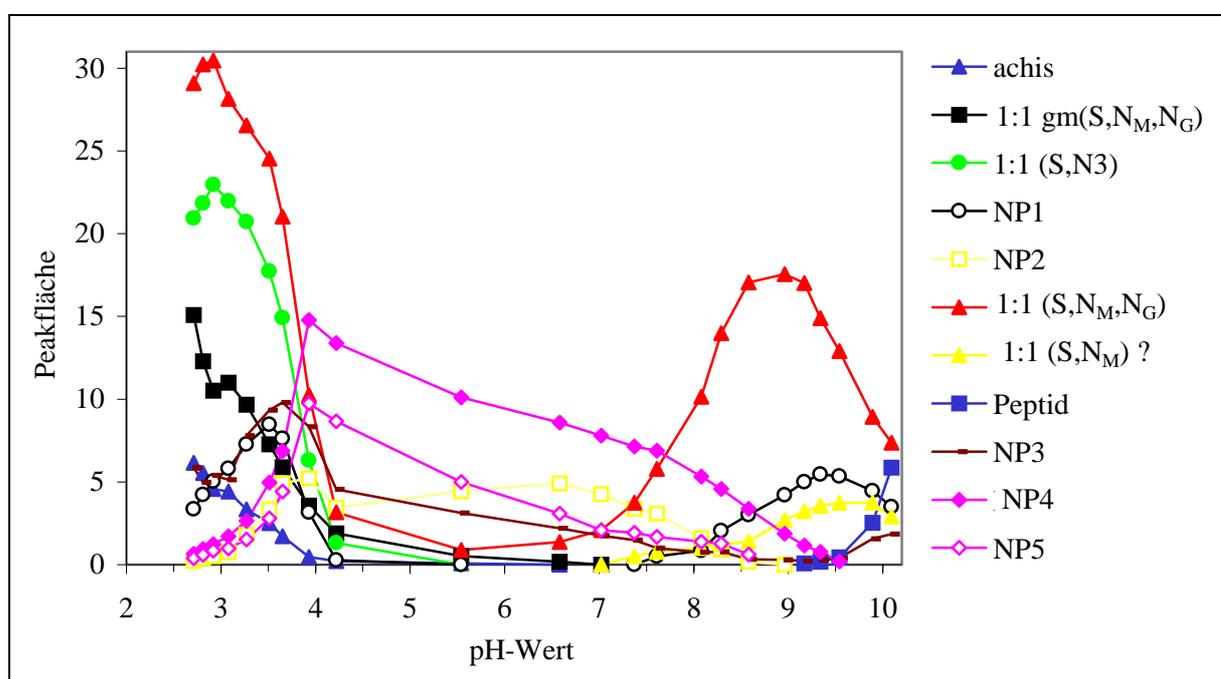


Abb. 7.12: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / achisglymetH (1:1); Reaktionszeit $t = 3$ Wochen

Die Bestimmung der Koordinationsmodi der vier im pH-Bereich zwischen 4 und 7,5 dominierenden Produkte konnte aufgrund von Umlagerungen und Zerfällen der semi-präparativ-getrennten Fraktionen nicht erfolgen. Als Vermutung aus ¹H-NMR Kinetiken könnten die vier Produkte NP2, NP3, NP4 und NP5 imidazolkoordiniert sein. Alle besitzen eine 1:1 Stöchiometrie, da eine erstellte 2:1 pH-abhängige Produktverteilung keine Veränderungen gegenüber der hier vorliegenden zeigte. Die Möglichkeit der Substitution der NH₃-Gruppe am Platin durch ein Chlorid könnte für die verschiedenen ungeklärten Produkte verantwortlich sein.

7.2.2 Kinetische Untersuchungen

Die zeitliche Peakflächenverteilung bei einem pH-Wert von 2,83 zeigt gegenüber der pH-Verteilungskurve nur eindeutig charakterisierte Produkte. Zuerst bildet sich der monodentat schwefelkoordinierte Komplex, der nach 3 h ein Maximum durchläuft und mit der schnellen Abnahme in 24 h bildet sich der $\kappa^2 S, N_M$ -Chelat. Dieser ist jedoch auch nur ein Vorläuferkomplex des tridentaten $\kappa^3 S, N_M, N_G$ -koordiniertem Komplex, der sein Maximum

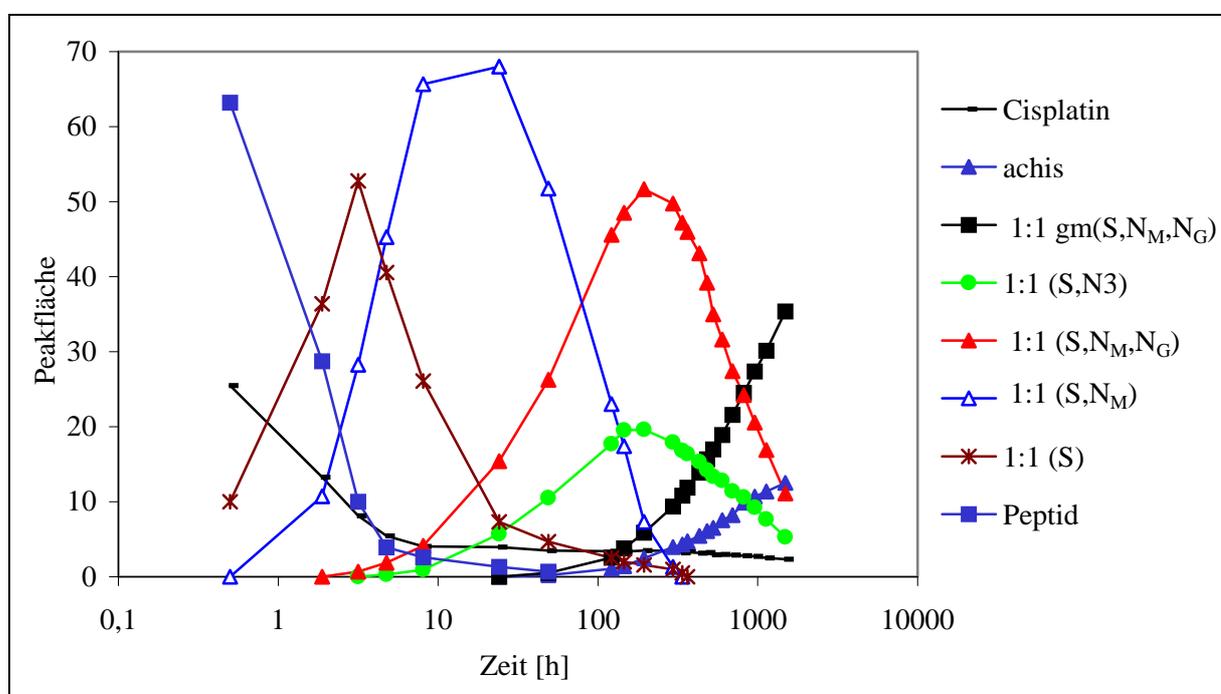


Abb. 7.13: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / *achisglymeth* (1:1); pH = 2,83

nach 200 h erreicht und ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich zu dem nach 1500 h übrig bleibenden Spaltprodukte κ^3S,N_M,N_G -glymethH und achisH zerfällt. Parallel zu dem tridentaten Produktkurvenverlauf bildet sich nach 8 h der κ^2S,N_3 -Makrochelate, der aber auch ab 200 h langsam abnimmt.

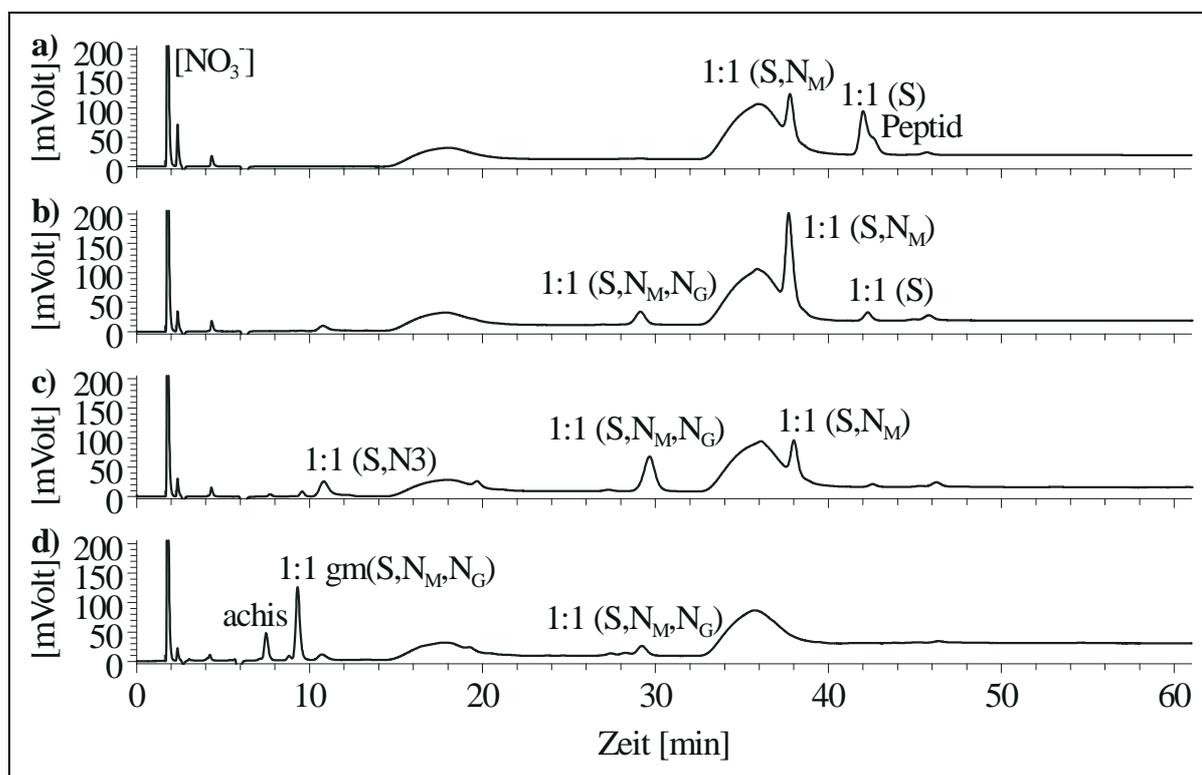


Abb. 7.14: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymethH ; 7 – 10 - 18% MeOH; 0,124% HFB; 35°C; *t* = Reaktionszeit
pH = 2,83 a) *t* = 3,17 h b) *t* = 24 h c) *t* = 122 h d) *t* = 1489 h

Um die Rolle der Chloridsubstitution der NH₃-Gruppe am Platin genau zu betrachten, wurde die gleiche Reaktionskinetik noch einmal untersucht. Hierbei wurde jedoch nach 24 h mit 1,6 mM AgNO₃ das gesamte in der Lösung vorhandene Chlorid ausgefällt und abzentrifugiert, um dann den weiteren Reaktionsverlauf zu beobachten. Wie aus Abb. 7.15 am Sprung in der κ^2S,N_M -Kurve ersichtlich, wird durch die Fällung des letzten am Platin verbleibenden Chlorids am monodentat schwefelkoordiniertem Komplex die Bildung des κ^2S,N_M -Vorläuferkomplexes beschleunigt. Da die gesamte zeitabhängige Produktverteilung sich ab diesem Zeitpunkt nicht gegenüber der ohne Chloridfällung ändert, enthalten die vorhandenen

Produkte kein Chlorid. Damit besitzt der $\kappa^2 S, N_M$ -Vorläuferkomplex noch die beiden NH_3 -Gruppen am Platin.

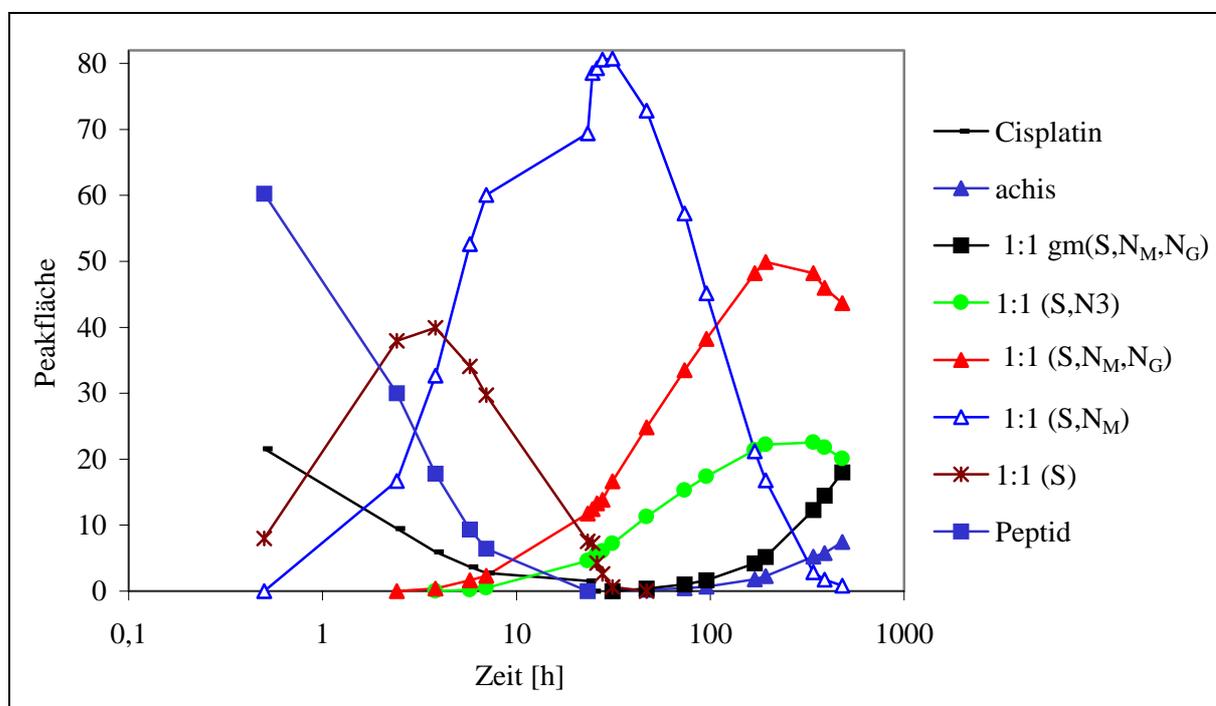


Abb. 7.15: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / *achisglymeth* (1:1); pH = 2,60; nach 24 h Zugabe von 1,6 mM $AgNO_3$

Im basischen pH-Bereich bei pH = 8,88 ist ein deutlich vom Säuren verschiedener Reaktionsmechanismus zu finden. Zu Beginn bildet sich zwar auch die schwefelkoordinierte Spezies, aber danach entsteht das Nebenprodukt NP2 mit einem Maximum nach 4 h. Außerdem bildet sich nach 2 h das in der pH-Verteilung als Nebenprodukt vorkommende NP3 und durchläuft ein Maximum nach 24 h. Zu diesem Zeitpunkt nimmt kontinuierlich das tridentate $\kappa^3 S, N_M, N_G$ -Komplex zu und bleibt nach 3 Wochen in etwa konstant. In geringeren Konzentrationen kann nach ca. 100 h das vermutete tridentat koordinierte $\kappa^3 S, N_M, N_G$ -Isomer NP1 detektiert werden.

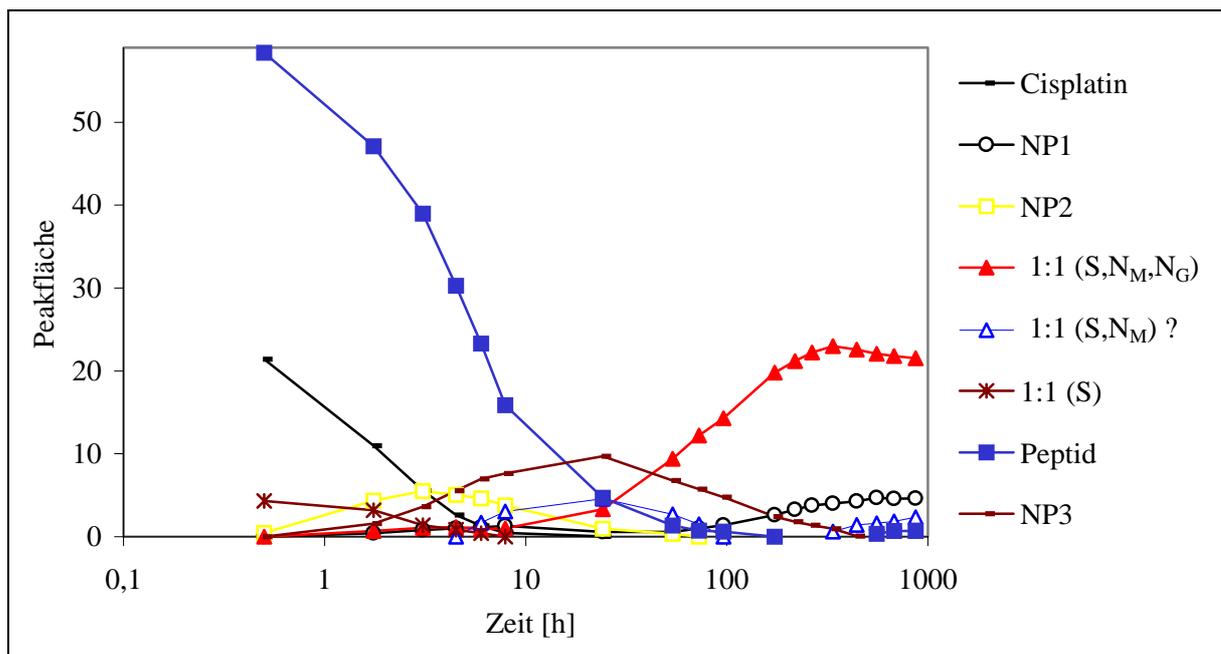


Abb. 7.16: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achisglymeth$ (1:1); $pH = 8,88$

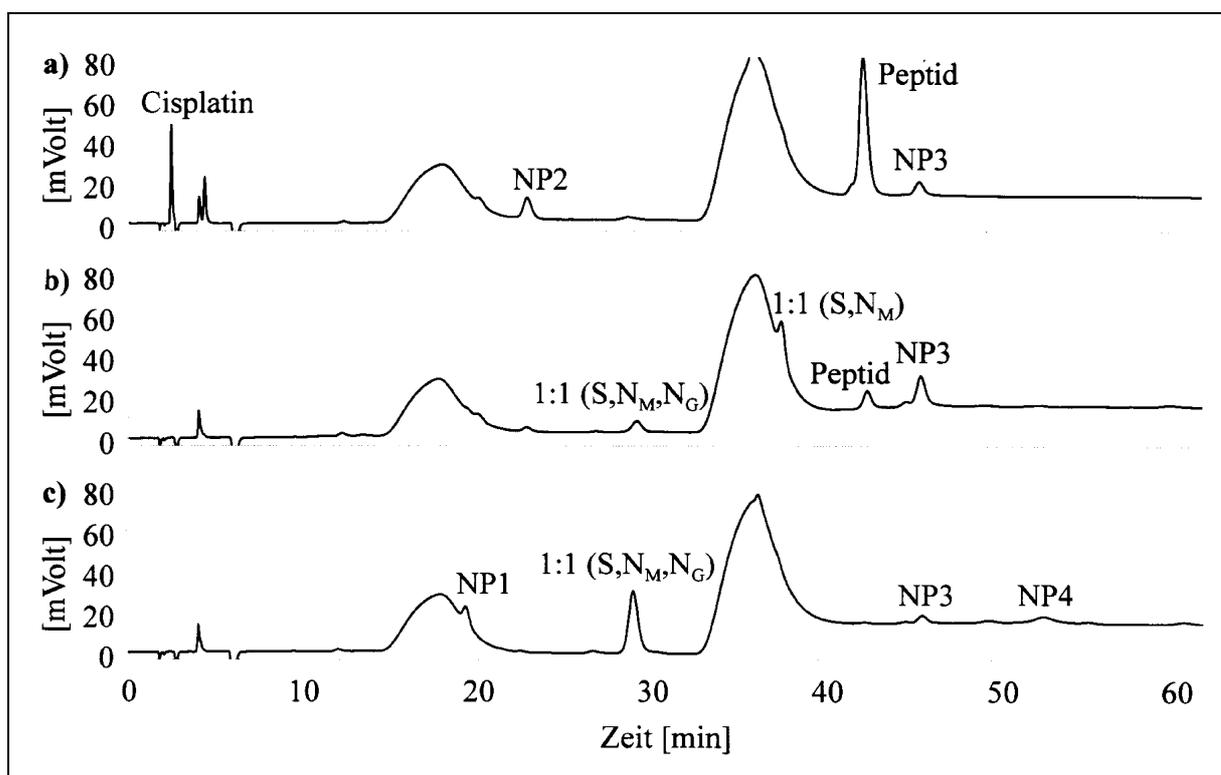


Abb. 7.17: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achisglymeth$; 7 - 10 - 18% MeOH; 0,124% HFB; 35°C; $t =$ Reaktionszeit $pH = 8,88$ a) $t = 3,68$ h b) $t = 24$ h c) $t = 173$ h

7.3 Umsetzungen mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metH

Bei der Reaktion von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metH bilden sich bei der 1:1 Stöchiometrie nur 5 Produkte. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem 18% / 22% MeOH Stufengradienten, einer Säulentemperatur von 20° C und 0,124% HFB als Ionenpaarreagenz innerhalb von 70 Minuten.

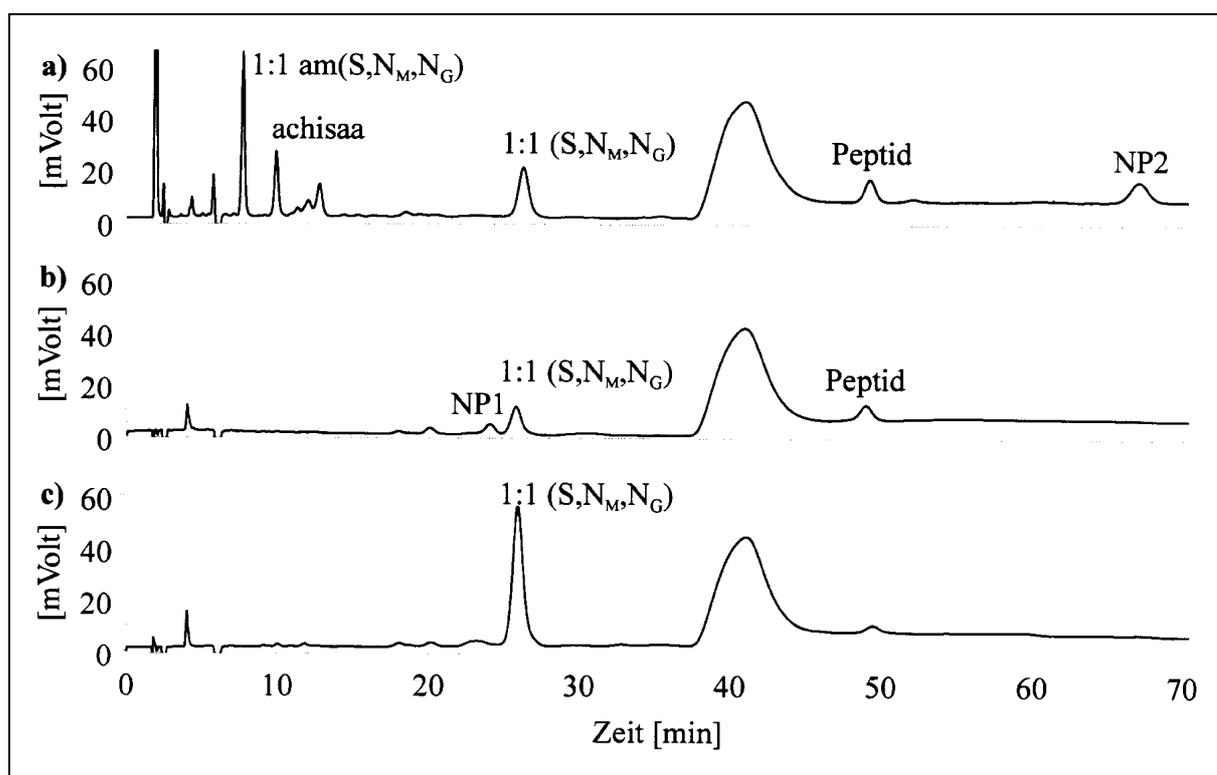


Abb. 7.18: Chromatogramme der 1:1 Ansätze des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ /

achis(ala)₃metH 18 - 22% MeOH; 0,124% HFB; 20°C

a) pH = 2,75

b) pH = 7,08

c) pH = 8,67

7.3.1 pH-abhängige Produktverteilung

Die pH-abhängige Verteilung zeigt eine deutliche Bevorzugung des tridentat koordiniertem κ^3S,N_M,N_G -Produkt über den gesamten pH-Bereich. Nur zwischen pH = 4,5 bis 6,5 zeigt das Nebenprodukt NP1 eine größere Peakfläche. Es könnte sich aufgrund des ähnlichen Kurvenverlaufs der kinetischen Untersuchungen von WOLTERS um eine $\kappa^3S,N3$ -Imidazol Spezies handeln. Ab pH-Werten kleiner als 4,5 entstehen sowohl das Nebenprodukt NP2, als auch die beiden aus der Spaltung des tridentaten Hauptprodukt hervorgehenden κ^3S,N_M,N_G -alametH und achis(ala)₂H. Noch nicht abreagiertes Peptid ist in geringen Konzentrationen in allen Reaktionslösungen zu finden.

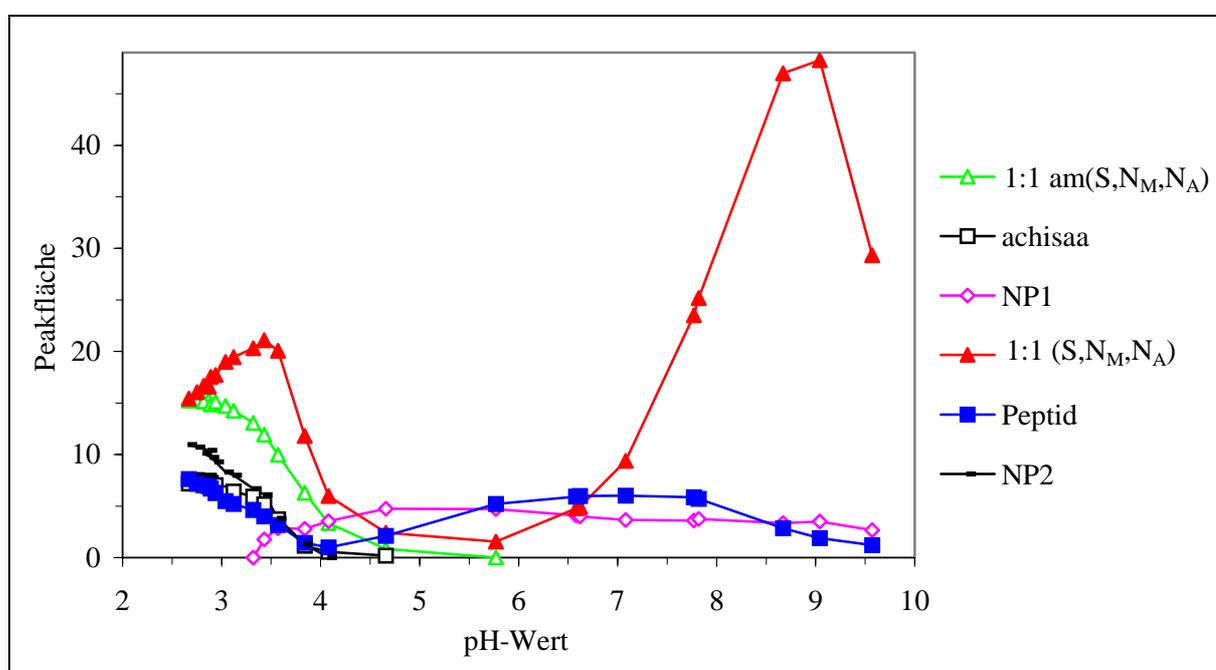


Abb. 7.19: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3methH$ (1:1)

7.1.2 Kinetische Untersuchungen

Die zeitabhängige Produktverteilung von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit dem Pentapeptid $achis(ala)_3metH$ bei $pH = 2,80$ zeigt einen ähnlichen Verlauf, wie die des Tripeptides $achisglymetH$. Allerdings konnte im Gegensatz zu dem kürzeren Peptid keine Bildung eines $\kappa S, N_3$ -Makrochelates nachgewiesen werden. Sofort entsteht der monodentat schwefelkoordinierte Komplex, der nach 6 h durch ein Maximum läuft und erst nach 100 h nicht mehr detektierbar ist. Daraus bildet sich mit maximaler Konzentration nach 24 h der $\kappa^2 S, N_M$ -Vorläuferkomplex, der nach 1 Woche nur noch in geringen Mengen vorhanden ist. Die in der pH-Verteilung nach 3 Wochen dominierende tridentate $\kappa^3 S, N_M, N_G$ -Spezies erreicht nach 1 Woche ein Maximum und zerfällt dann kontinuierlich zu den beiden sich parallel bildenden $\kappa^2 S, N_M, N_G$ - $alametH$ und $achis(ala)_2H$ -Spaltprodukten, die nach über 1000 h als thermodynamisch stabile Endprodukte zu finden sind.

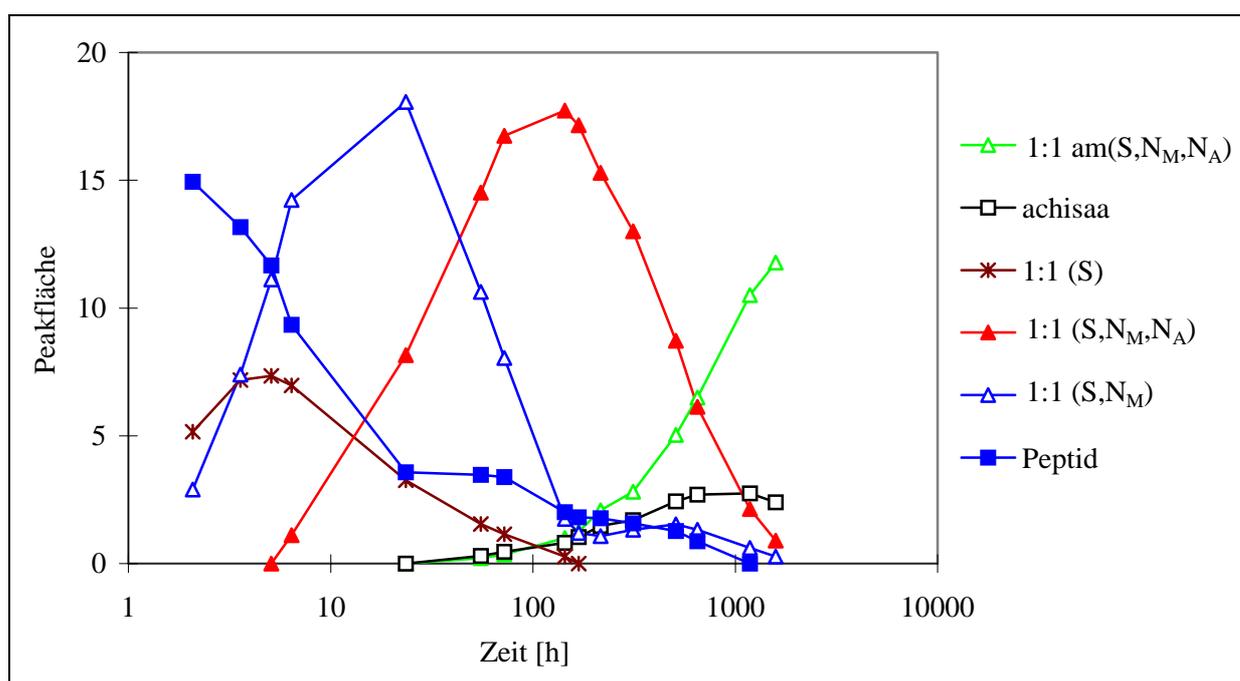


Abb. 7.20: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3metH$ (1:1); $pH = 2,80$

Eine kinetische Untersuchung bei $pH = 8,46$ zeigt im Vergleich zum Säuren in den ersten 150 Stunden einen ähnlichen Verlauf. Nachher bleibt wie erwartet eine Spaltung des Peptides aus.

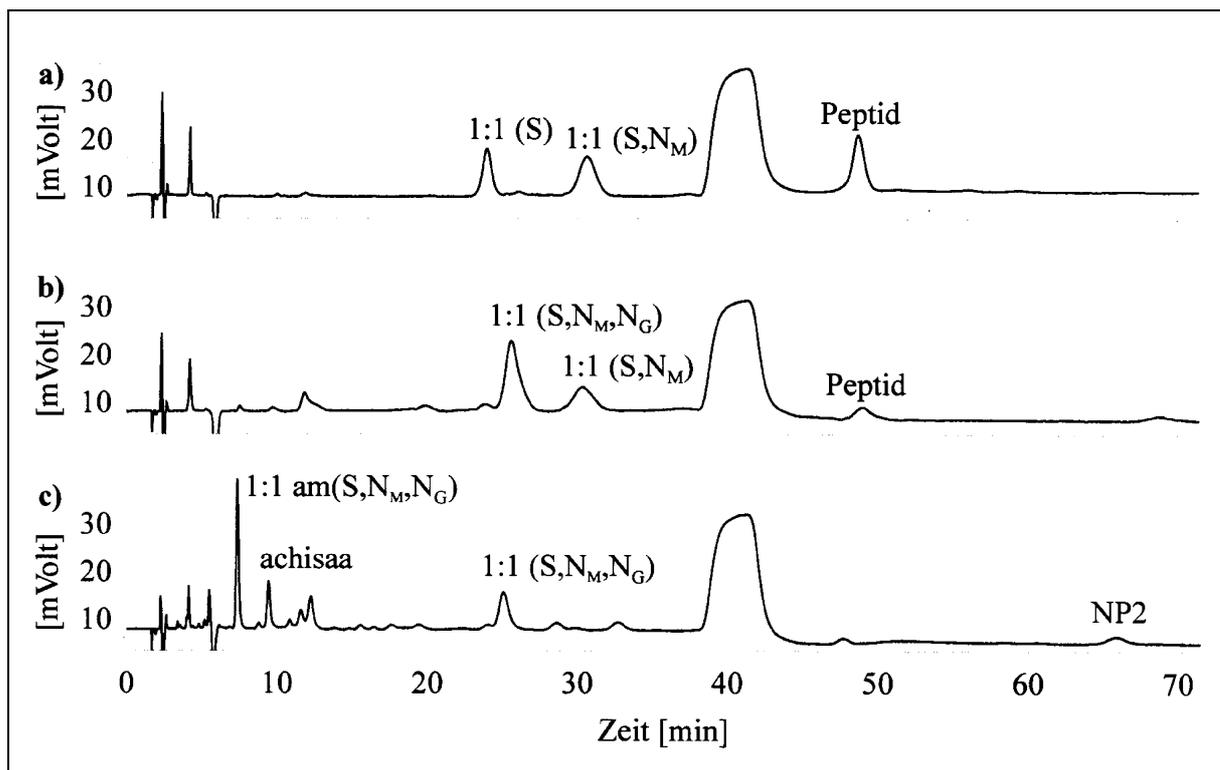


Abb. 7.21: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3methH$ 18 - 22% MeOH; 0,124% HFB; 20°C; $t =$ Reaktionszeit
t = 5,08 h b) $t = 72,17 h$ c) $t = 650 h$

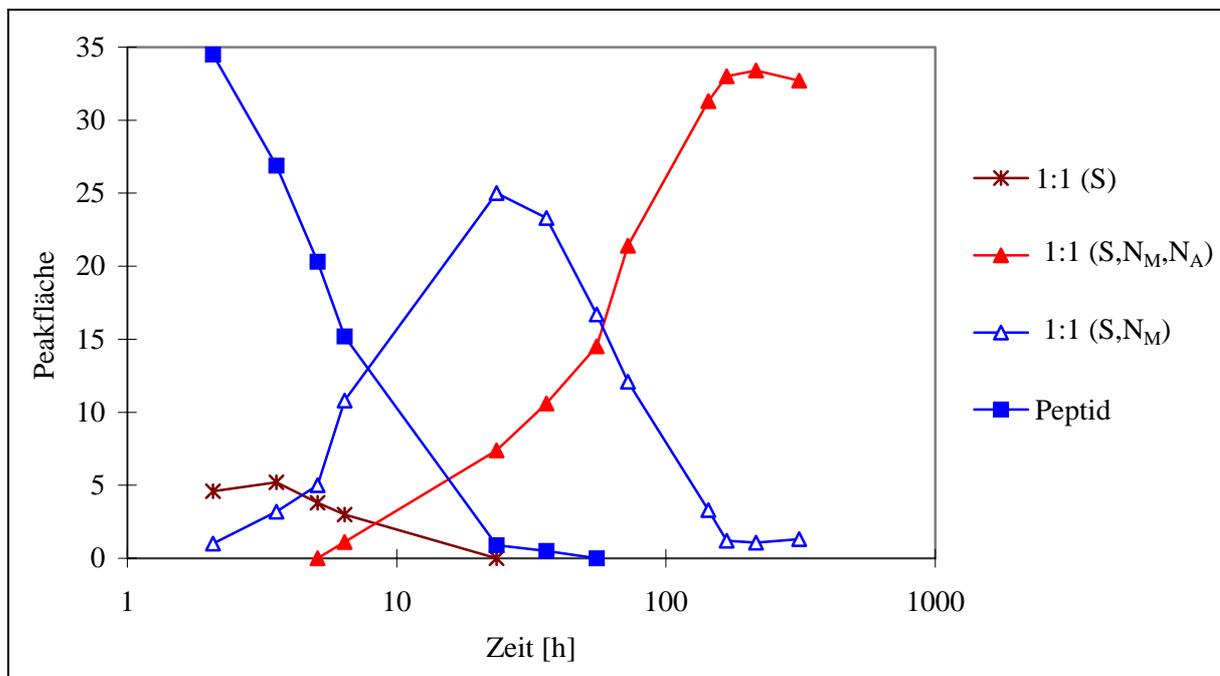


Abb. 7.22: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3methH$ (1:1); pH = 8,46

7.4 Charakterisierung der Komplexe

7.4.1 Das System *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymethH

Die Umsetzungen von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit dem N-terminal ungeschütztem Tripeptid hisglymethH ergeben eine Vielzahl von Produkten, von denen die 3 Hauptprodukte chromatographisch getrennt und charakterisiert wurden. Das aufgrund seiner tetradentaten Koordination zuerst eluierende κ^4S,N_M,N_G,N_H -Hauptprodukt aus der Reaktion von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit hisglymethH ist thermodynamisch sehr stabil und lässt sich durch semi-präparative Trennung darstellen. Sowohl das FAB-MS, als auch HPLC/ESI-MS Untersuchungen dieses Produktes zeigen einen M⁺ Peak bei m/z = 538 und bestätigen die 1:1 Stöchiometrie des Komplexes (Abb. 7.26). Im ¹H-NMR-Spektrum zeigt ein Tieffeldshift der δ -Protonen der Thioethergruppe um +0,4 ppm die Koordination am Schwefelatom.

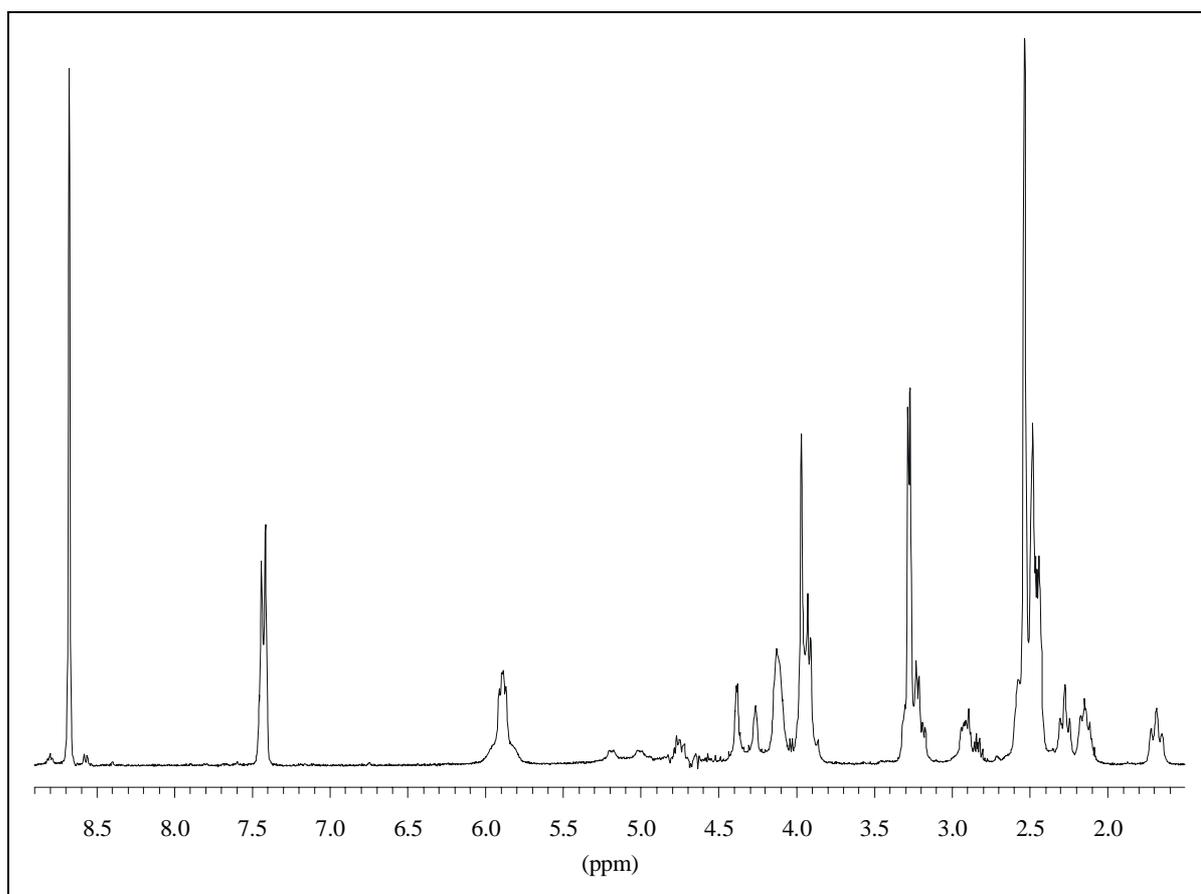


Abb. 7.23: ¹H-NMR-Spektrum von [Pt hisglymethH- κ^4S,N_M,N_G,N_H] (400 MHz)

Der Imidazolring ist unkoordiniert, da die H2 und H5 Protonen gegenüber denen des freien Peptides nicht verschoben und im 80 MHz-¹H-NMR-Spektrum keine ³J(¹⁹⁵Pt-¹H)-Kopplungskonstanten zu beobachten sind. Durch die Koordination an der Aminogruppe des Histidins und an der Amidgruppe des Glycins verschieben sich die α-Protonen jeweils um –0,27 ppm zu höherem Feld. Die vierte Koordinationsstelle des Platins ist die Amidgruppe des Methionins. Hierbei shiften die α-Protonen zu höherem Feld und spalten sich durch die Bildung zweier Diastereomere in zwei Signale auf. Das ¹⁹⁵Pt-NMR bestätigt mit einer chemischen Verschiebung von –3097 ppm die N₃S-Umgebung des Platins. Dieser ist im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem von KLEINE für den κ⁴S,N_M,N_G,N_H-glyglymetH Komplex angegebenen Wert vergleichbar [90].

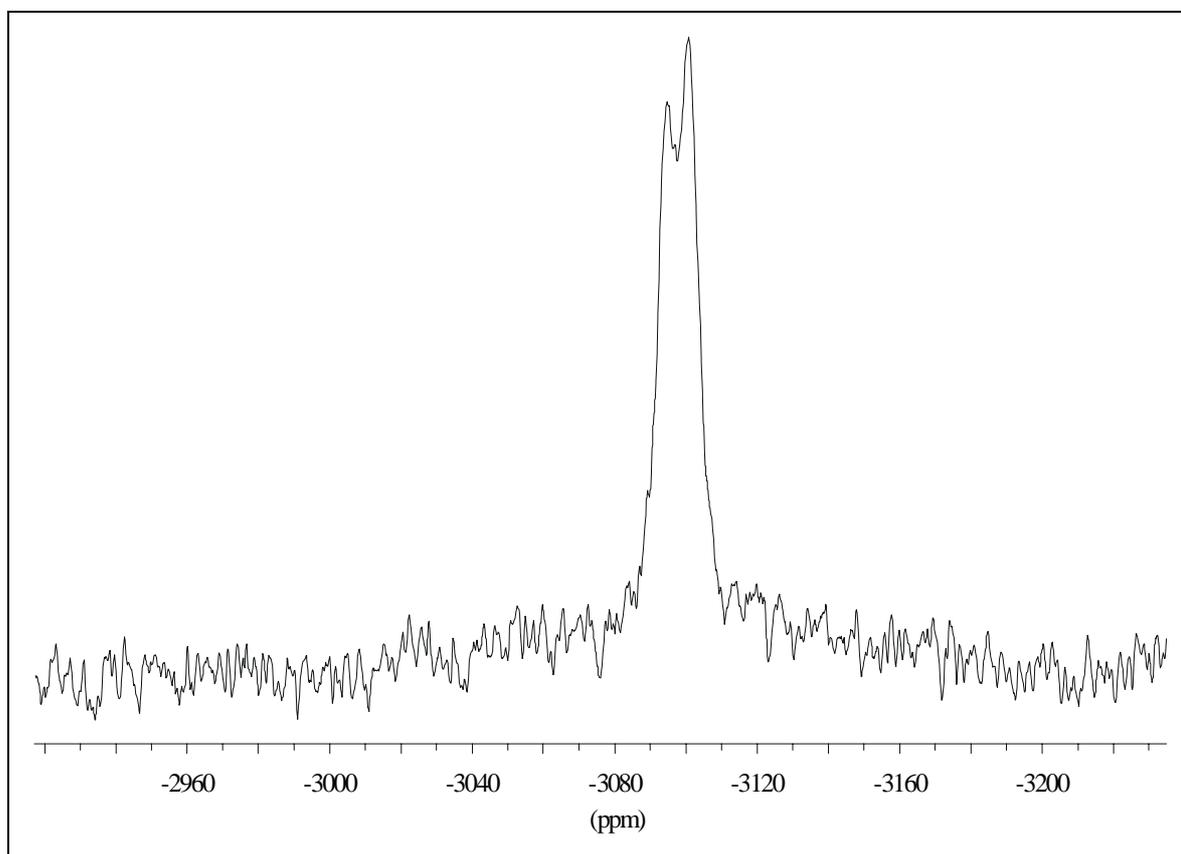


Abb. 7.24: ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektrum von [Pt hisglymetH-κ⁴S,N_M,N_G,N_H] (400 MHz)

Auch die beiden in Abb. 7.25 dargestellten UV-Spektren der beiden Komplexe verdeutlichen den gleichen Koordinationsmodus, der auch schon von SIEBERT bei seiner Umsetzung von K₂PtCl₄ mit glyglymetH vermutet wurde. Die große Stabilität dieser Produkte zeigte sich auch

bei der Umsetzung mit 9-Ethylguanin bei einer Temperatur von 70° C, denn die tetradentate Koordination verhindert jegliche Reaktion.

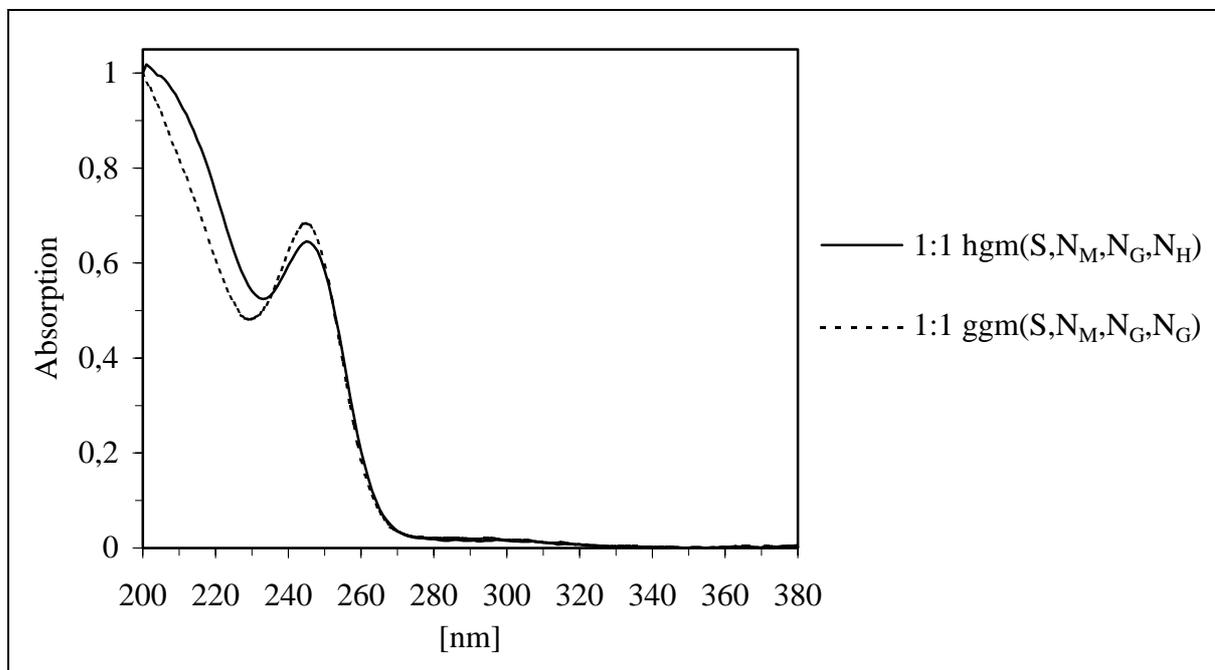


Abb. 7.25: UV-Spektren zweier tetradentat koordinierter Produkte

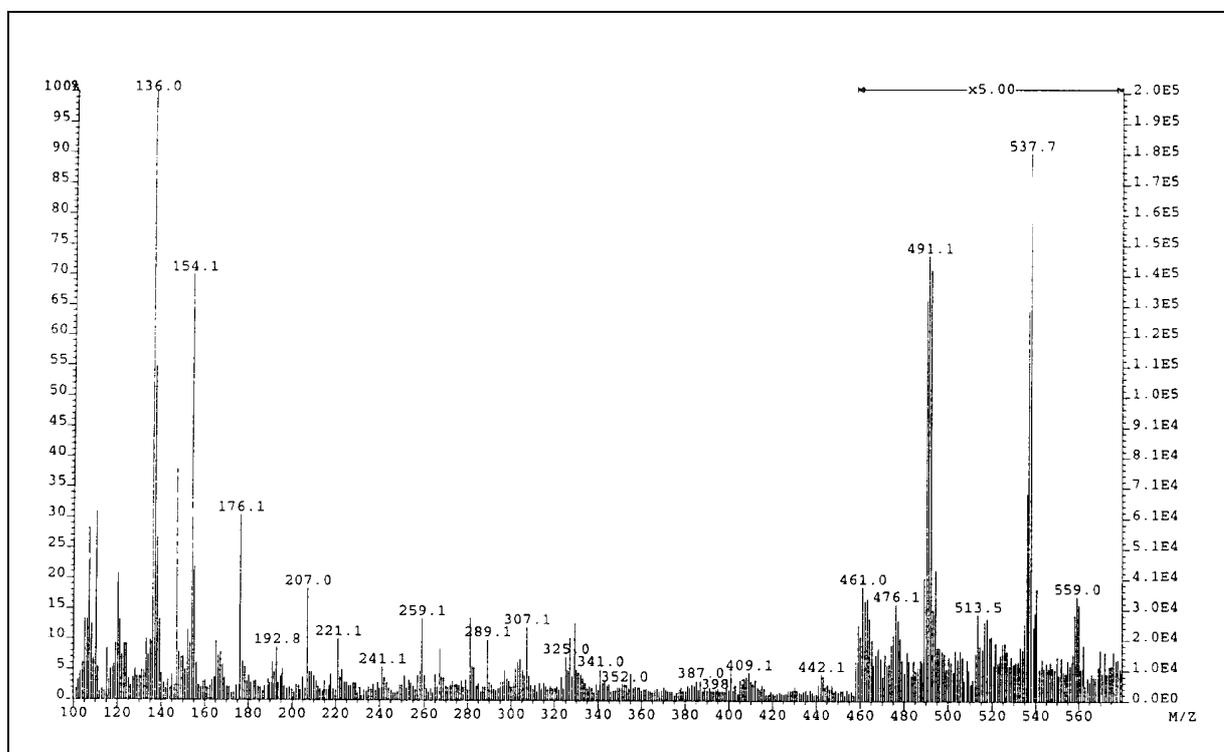


Abb. 7.26: FAB-MS-Spektrum von [Pt hisglymetH-κ⁴S,N_M,N_G,N_H]

Im Säuren ab pH < 3 dominiert nach 21 Tagen der tridentate $\kappa^3S,N3,N_H$ -Komplex die pH-Verteilung und ließ sich chromatographisch in hoher Reinheit trennen. Die 1:1 Stöchiometrie dieser Spezies konnte bei HPLC/ESI-MS Messungen mit einer Molekülmasse von $m/z = 554$ und nur einer Fragmentierung durch die Abspaltung der COOH-Gruppe bestätigt werden.

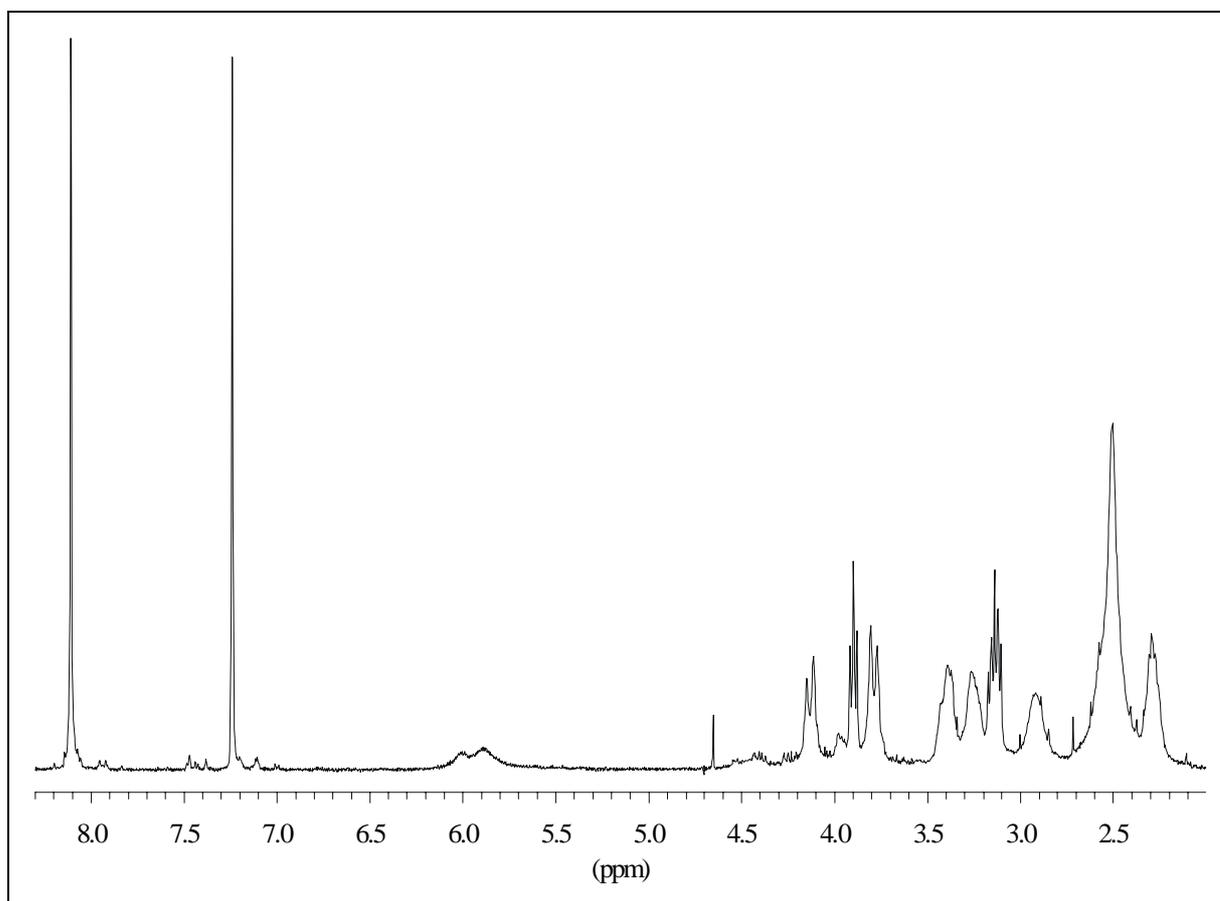


Abb. 7.27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $[\{\text{Pt}(\text{NH}_3)\}\text{hisglymetH-}\kappa^3\text{S,N3,N}_H]$ (400 MHz)

Die Schwefelkoordination ist aus dem δ -met Tieffeldshift von +0,37 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ersichtlich. Eine deutliche Hochfeldverschiebung sowohl der Imidazolprotonen H2 als auch H5 und die im 80 MHz-NMR-Spektrum vorhandenen $^{3/4}\text{J}(^{195}\text{Pt-}^1\text{H})$ -Kopplungskonstanten von 17 Hz für H2 und 9 Hz für H5 weisen eindeutig eine N3-Koordination nach. Die dritte Koordinationsstelle ist die Aminogruppe des Histidins. Hier verschieben sich die α -Protonen um -0,51 ppm gegenüber dem unkoordiniertem Peptid. Auch das ^{195}Pt -Spektrum mit einem Verschiebungswert von -3144 ppm verdeutlicht die N₃S-Umgebung des Platins. Die α -met-Resonanz liegt unter dem Wassersignal und kann nur durch die Crosspeaks im $^1\text{H}^1\text{H-COSY}$ -Spektrum identifiziert werden.

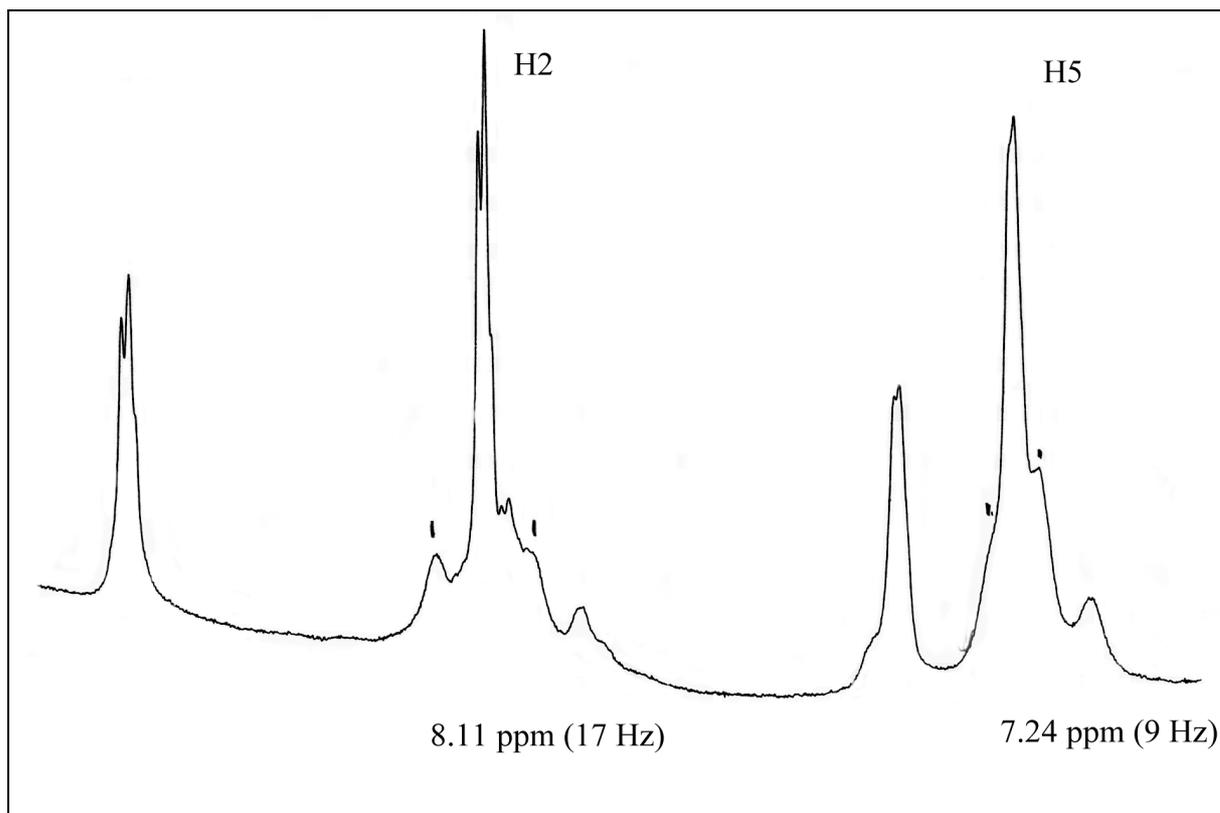


Abb. 7.28: ¹H-NMR-Spektrum von [Pt(NH₃)₃] hisglymetH-κ³S,N₃,N_H] (100 MHz) (Ausschnitt)

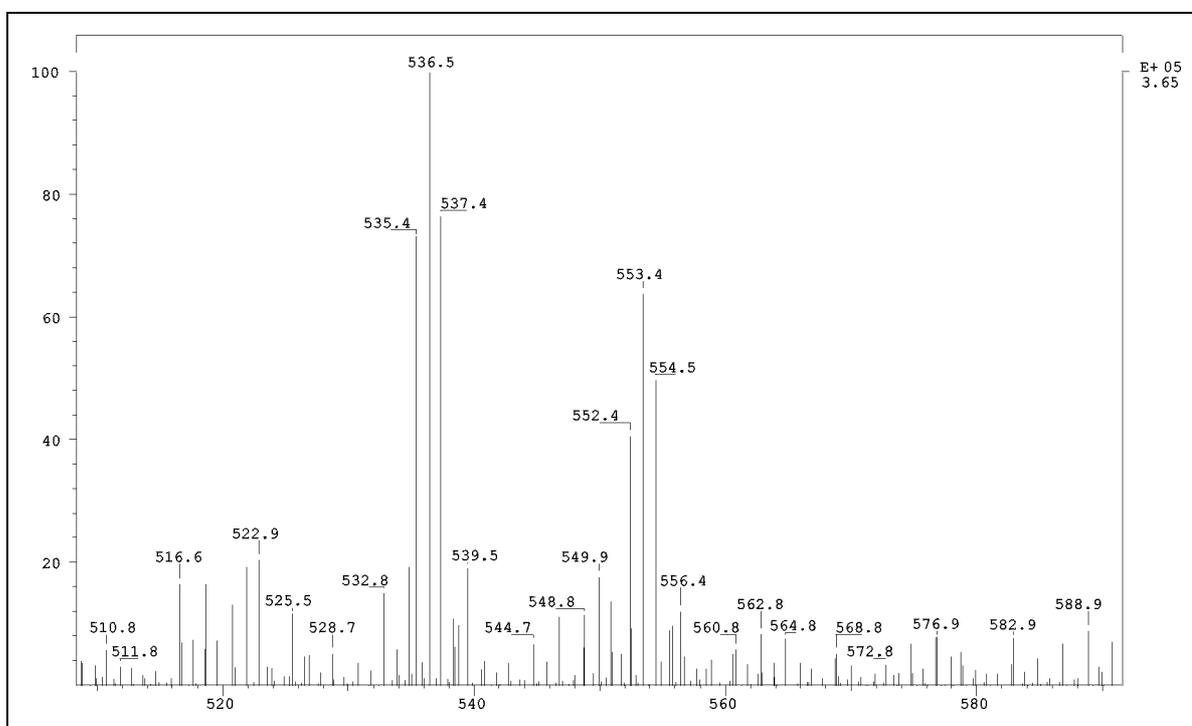


Abb. 7.29: HPLC-ESI-MS-Spektrum von [Pt(NH₃)₃] hisglymetH-κ³S,N₃,N_H]

Im Basischen bildet sich zusätzlich zum tetradentaten auch das Nebenprodukt NP2. Die chromatographisch abgetrennte Fraktion enthält wegen der ähnlichen Retentionszeiten auch das $\kappa^3S,N3,N_H$ -Produkt und konnte nicht vollständig charakterisiert werden. Aus dem Molekülionenpeak von $m/z = 554$ einer HPLC/ESI-MS Untersuchung ergibt sich die 1:1 Stöchiometrie dieses Komplexes. Die δ -CH₃-Protonen sind mit 2,38 ppm zu tiefem Feld geshiftet und liefern den Beweis für die Schwefelkoordination. Das aufgenommene UV-Spektrum zeigt eine geringe Ähnlichkeit mit den tridentat κ^3S,N_M,N_G -koordinierten Komplexen in Abb. 7.41. Die N₃S-Umgebung am Platin zeigt der Verschiebungswert von -3144 ppm. Dies ist in Übereinstimmung mit dem von APPLETON für [Pt(NH₃)₂(metH- κ^2S,N_{met})]²⁺ angegebenen Wert von -3145 ppm [86].

Der in den chromatographischen Untersuchungen als Vorläufer beschriebene κ^2S,N_M -Komplex wird im [PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymeth-System mit einer ¹H-NMR-Kinetik bewiesen. Die in Abb. 7.30 dargestellten UV-Spektren der beiden Komplexe mit dem gleichen Koordinationsmodus, aber verschiedenen Peptiden zeigten den typisch kontinuierlich fallendem Verlauf für κ^2S,N_M -Komplexe, der auch schon von WOLTERS beschrieben wurde.

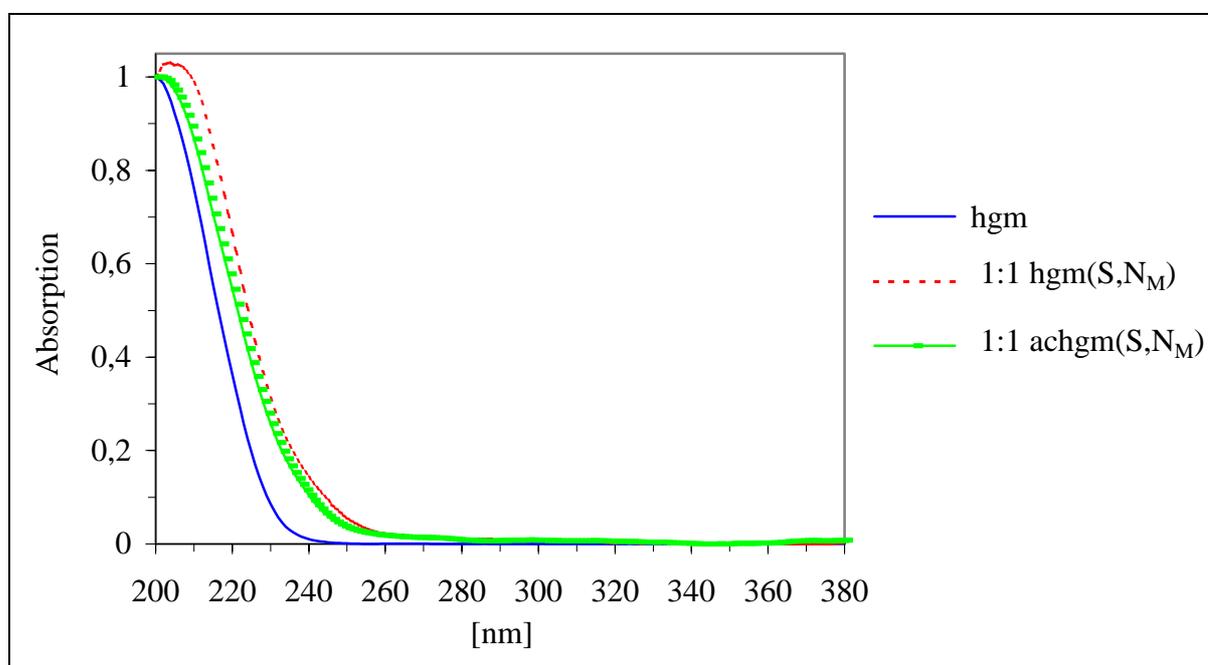


Abb. 7.30: UV-Spektren κ^2S,N_M koordinierter Produkte im Vergleich mit dem Peptid

Die 2:1 Stöchiometrie des in allen 1:1 Reaktionsansätzen im Sauren vorhandenen 1κ²N_H,N3:2κ²S,N_M-Komplexes konnte durch HPLC/ESI-MS Messungen bestätigt werden. Der M⁺ Peak bei m/z = 800 und die Übereinstimmung des berechneten mit dem beobachtetem Isotopenpattern des Moleküliions veranschaulicht die Abb. 7.31.

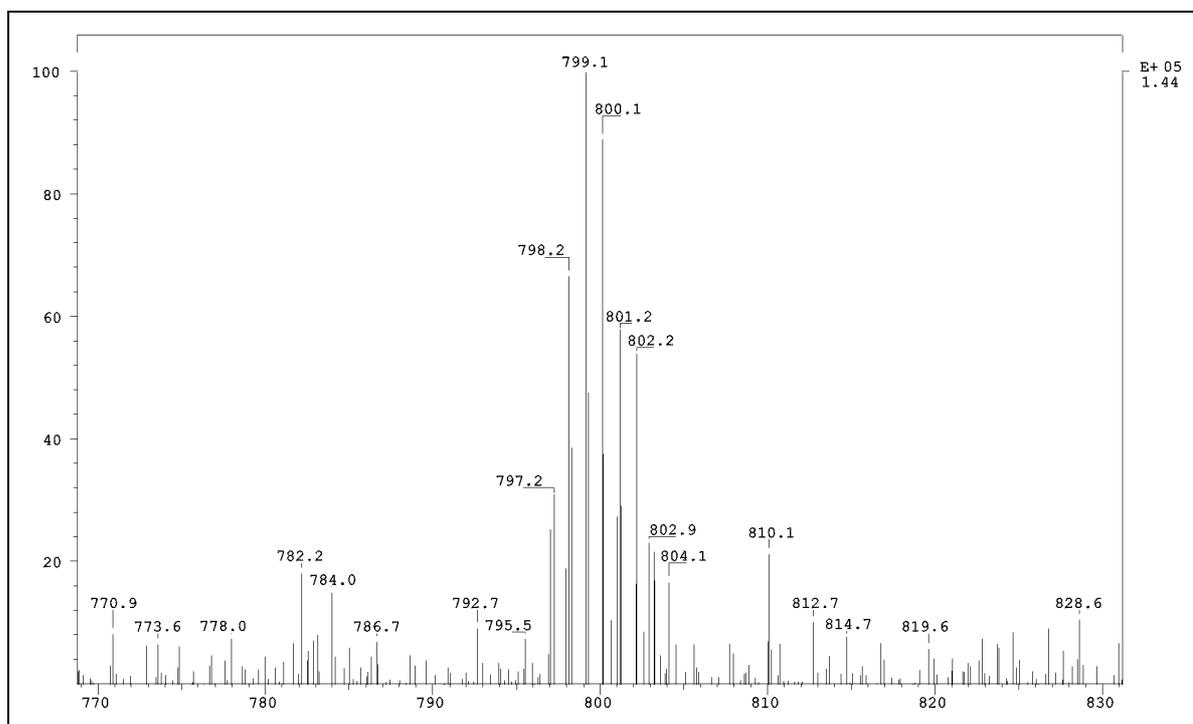


Abb. 7.31: Isotopenpattern des [Pt₂ hisglymethH-1 κ²N_H,N3:2 κ²S,N_M]³⁺-Molekülionenpeaks

Außerdem bildet sich in 2:1 Ansätzen überwiegend diese 2:1 Spezies (s. Kap. 7.1.2), die auch schon von WOLTERS im System [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ und hisglymethH gefunden wurde. Im ¹H-NMR-Spektrum ist ein Shift der α-his- um -0,45 ppm und der δ-met-Protonen um -0,38 ppm zu tiefem Feld zu beobachten. Die Protonen der δ-CH₃-Gruppe bei 2,54 ppm sind der Beweis für eine Schwefelkoordination. Für das H5 Proton lässt sich bei geringer Feldstärke (80 MHz) eine ⁴J-Kopplung von 10 Hz beobachten, was einer N3-Koordination entspricht. Das aufgenommene UV-Spektrum dieser 2:1 Spezies hat Ähnlichkeit mit dem des tetradentatkoordiniertem κ⁴S,N_M,N_G,N_H-Komplex. In Tab. 7.2 sind die chemischen Verschiebungswerte und in Abb. 7.32 die zugehörigen Strukturen der charakterisierten *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymethH Produkte gezeigt.

Tab. 7.2: Chemische Verschiebungen der *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymetH Komplexe

Signalzuordnung	κ^4S, N_M, N_G, N_H	κ^3S, N_3, N_H	$1\kappa^2N_H, N_3: 2\kappa^2S, N_M$
H2 ³ J(¹ H- ¹⁹⁵ Pt)	8.70(s)	8.11(s) 17 Hz	7.96(s) 20 Hz
H5 ³ J(¹ H- ¹⁹⁵ Pt)	7.43(d)	7.24(s) 9 Hz	7.13(s) 10 Hz
α_{his}	4.13(m)	3.90(t)	3.95(m)
β_{his}	3.28(m)	3.39, 3.26(m)	3.74, 3.60(m)
α_{met}	4.39, 4.27(t)	4.68(m)	4.30(m)
β_{met}	2.47(m), 2.15(t), 2.27(t), 1.68(t)	2.50, 2.30(m)	2.45, 2.25(m)
γ_{met}	2.92(q), 2.51(t)	3.14, 2.92(m)	3.06, 2.84(m)
δ_{met}	2.53(d)	2.50(s)	2.54(d)
α_{gly}	3.94(m)	4.13, 3.79(d)	4.26, 4.08(d)
¹⁹⁵ Pt	-3097	-3144	
pH*-Wert	1.9	1.6	1.9

Tab. 7.3: Massenspektrometrische Daten (ESI-MS) der *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymetH Komplexe

Signalzuordnung	κ^4S, N_M, N_G, N_H <i>m/z (rel. Anteil)</i>	κ^3S, N_3, N_H <i>m/z (rel. Anteil)</i>	$1\kappa^2N_H, N_3: 2\kappa^2S, N_M$ <i>m/z (rel. Anteil)</i>
[1:1] ⁺	538 (1)	554 (1)	800 (1)
[1:1-NH ₃] ⁺		536 (1,2)	

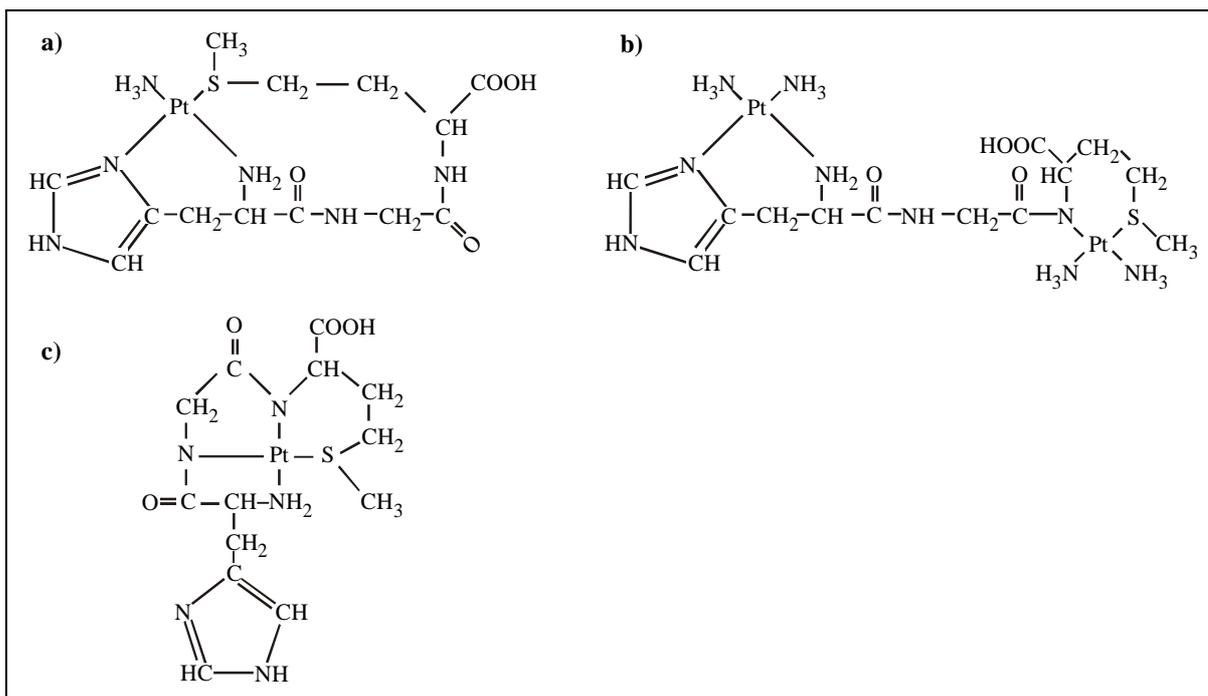


Abb. 7.32: Strukturen von
 a) $[Pt(NH_3) \text{ hisglymetH-}\kappa^3 S, N_3, N_H]^{2+}$
 b) $[Pt_2 \text{ hisglymetH-}1 \kappa^2 N_H, N_3 : 2 \kappa^2 S, N_M]^{3+}$
 c) $[Pt \text{ hisglymetH-}\kappa^4 S, N_M, N_G, N_H]$

7.4.2 Das System $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / achisglymethH

Im $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / achisglymethH-System gelang es 4 Produkte semi-präparativ zu trennen. Das im Sauren und Basischen dominierende Produkt besitzt eine tridentate κ^3S, N_M, N_G – Koordination, da die δ -CH₃-Gruppe um +0,43 ppm zu tieferem und das α -met-Proton um –0,40 ppm zu höherem Feld geshiftet ist.

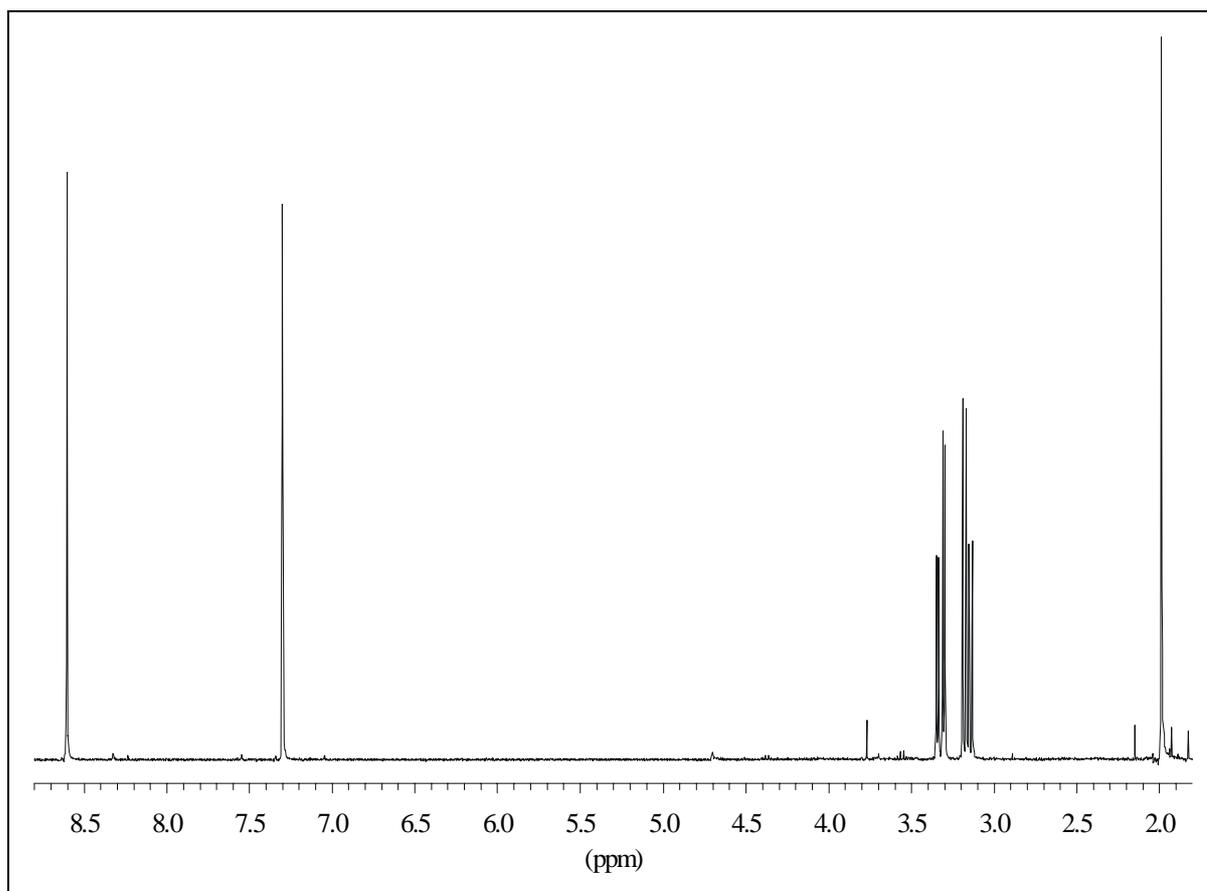


Abb. 7.33: 1H -NMR-Spektrum von achisH (400 MHz)

Die massenspektrometrische Untersuchung dieses Komplexes bestätigt die 1:1 Stöchiometrie mit einer vorhandenen NH_3 -Gruppe am Platin mit $m/z = 600$. Die tridentate Koordination wird zudem durch das in Abb. 7.41 dargestellte UV-Spektrum gestützt, das im Vergleich zum tridentaten achis(ala)₃methH-Produkt einen ähnlichen Verlauf aufweist. Der κ^3S, N_M, N_G – Komplex spaltet sich nach einer Woche an der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Histidin und Glycin. Es entsteht der weiterhin tridentat koordinierte κ^3S, N_M, N_G – glymethH Komplex und die geschützte Aminosäure achisH. Das in Abb. 7.33 dargestellte 1H -NMR-

Spektrum der chromatographisch abgetrennten Fraktion zeigt die unkoordinierte Aminosäure *glycylmethionin* ohne den *glycylmethionin*-Rest. Wie aus Abb. 7.34 ersichtlich ist fehlt dagegen im ¹H-NMR-Spektrum von κ^3S,N_M,N_G -*glycylmethionin* der Histidinteil.

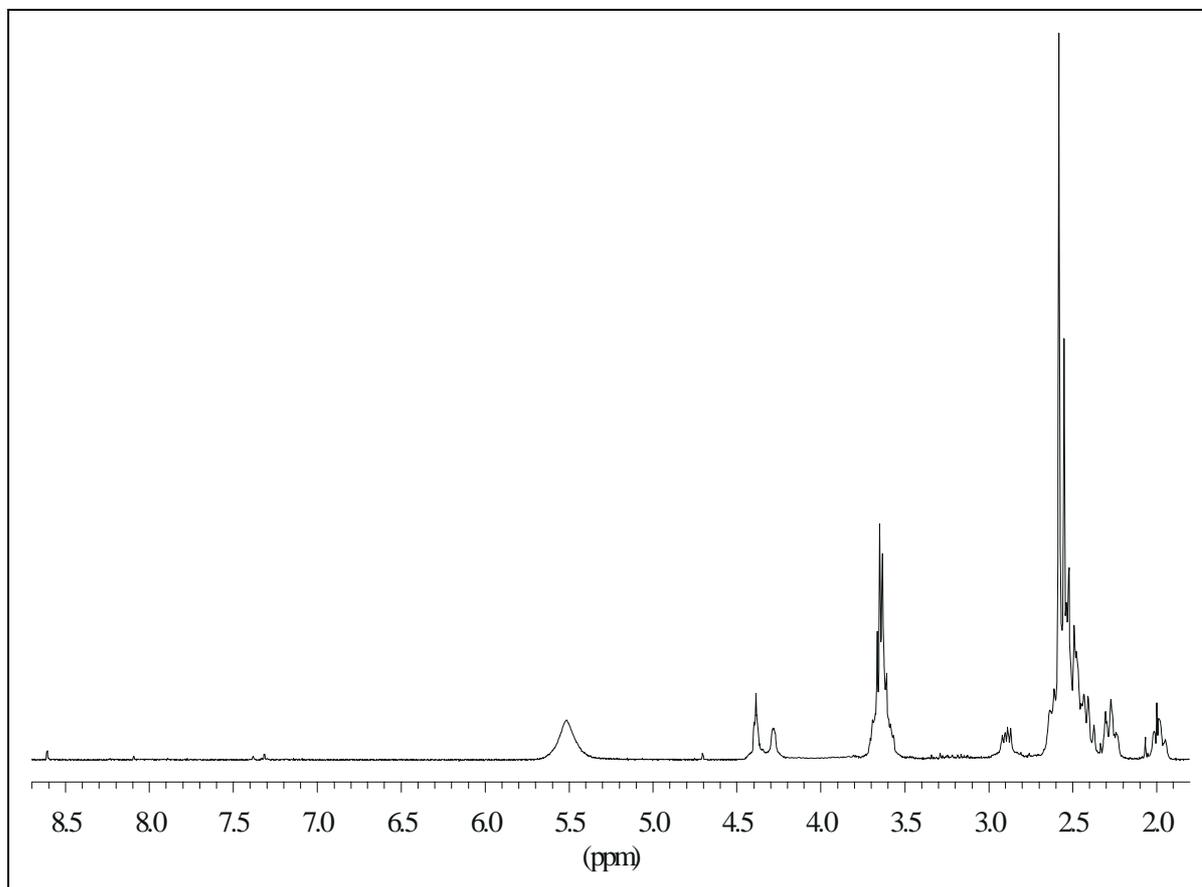


Abb. 7.34: ¹H-NMR-Spektrum von $[Pt(NH_3)glycylmethionin-\kappa^3S,N_M,N_G]^+$ (400 MHz)

Das δ -CH₃-Signal der Thioethergruppe im κ^3S,N_M,N_G -*glycylmethionin* Komplex ist durch die beiden unterschiedlichen Konformationen am Schwefel in zwei Singulets bei 2,55 und 2,58 ppm aufgespalten [165]. Die zwei durch die Schwefeldiastereomere hervorgerufenen Resonanzlagen der α -met-Protonen bei 4,28 und 4,37 ppm bestätigen die Amidkoordination am Methionin. Die Entstehung eines breiten Multipletts der α -CH₂-gly-Protonen und der Hochfeldshift um +0,36 ppm erklären die Koordination der Aminogruppe des Glycins. Anhand des ¹⁹⁵Pt-Spektrums lässt sich die N₃S-Umgebung dieses Komplexes mit einer chemischen Verschiebung von -3163 ppm eindeutig nachweisen. Auch hier konnte das ESI-MS-Spektrum die monomolekulare Stöchiometrie mit $m/z = 420$ bestätigen.

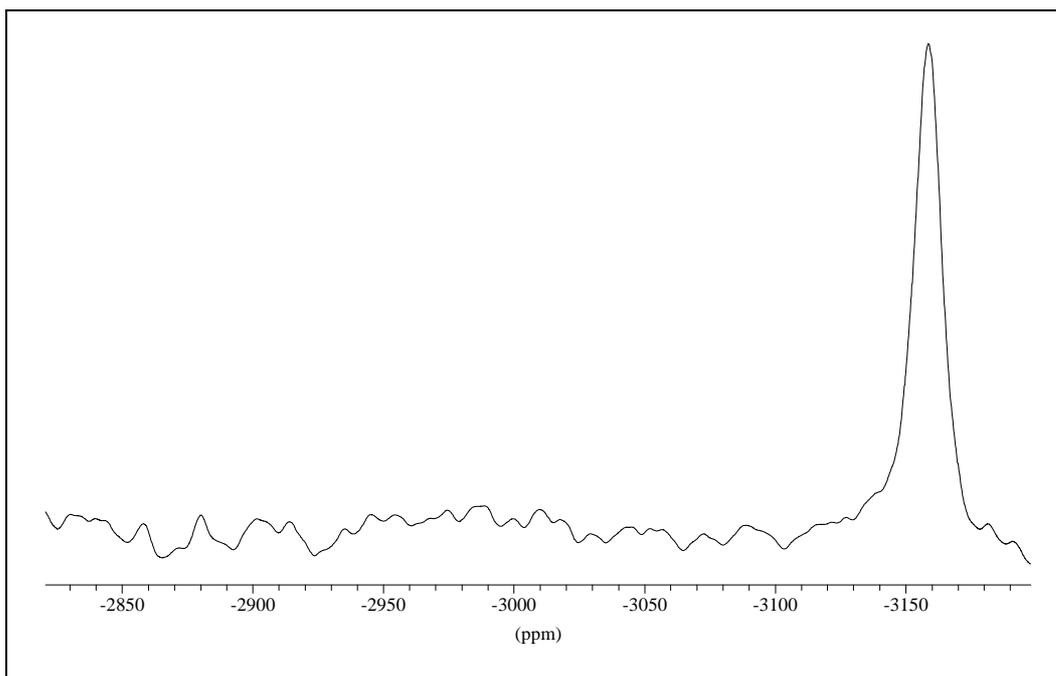


Abb. 7.35: ^{195}Pt -NMR-Spektrum von $[\{Pt(NH_3)\} glymetH-\kappa^3S, N_M, N_G]^+$ (400 MHz)

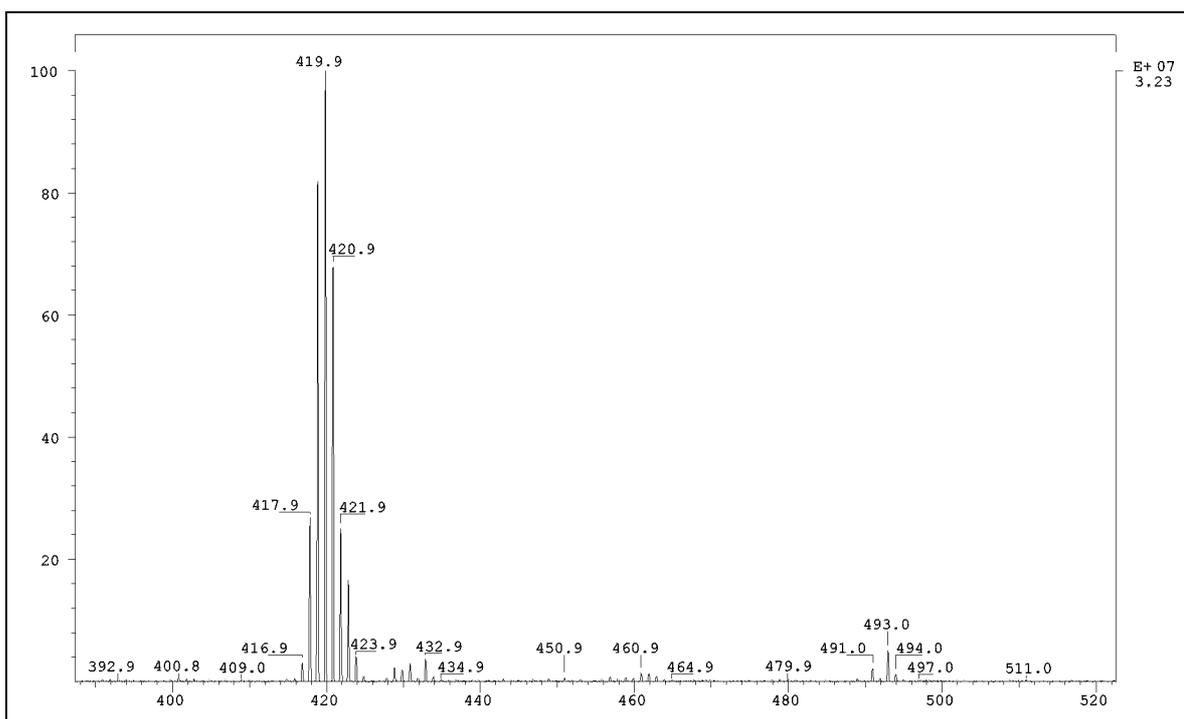


Abb. 7.36: ESI-MS-Spektrum von $[\{Pt(NH_3)\} glymetH-\kappa^3S, N_M, N_G]^+$

Der aus einem semi-präparativen Ansatz dargestellte ^{15}N -markierte Komplex beweist die noch vorhandene Position der $^{15}NH_3$ -Gruppe trans zum Amidstickstoff des Methionins mit einem Verschiebungswert von -64 ppm. Bei $pH < 4$ wird der $\kappa^2S, N3$ -Makrochelate gebildet.

Das 80 MHz-Spektrum charakterisiert die Platinbindung an N3 eindeutig durch eine $^4J(^{195}\text{Pt}-^1\text{H})$ -Kopplungskonstante von 9 Hz für das H5-Imidazolsignal. Die δ -CH₃-Gruppe weist erwartungsgemäß einen Tieffeldshift um +0,2 ppm auf.

Der M⁺ Peak dieser Verbindung liegt bei $m/z = 617$.

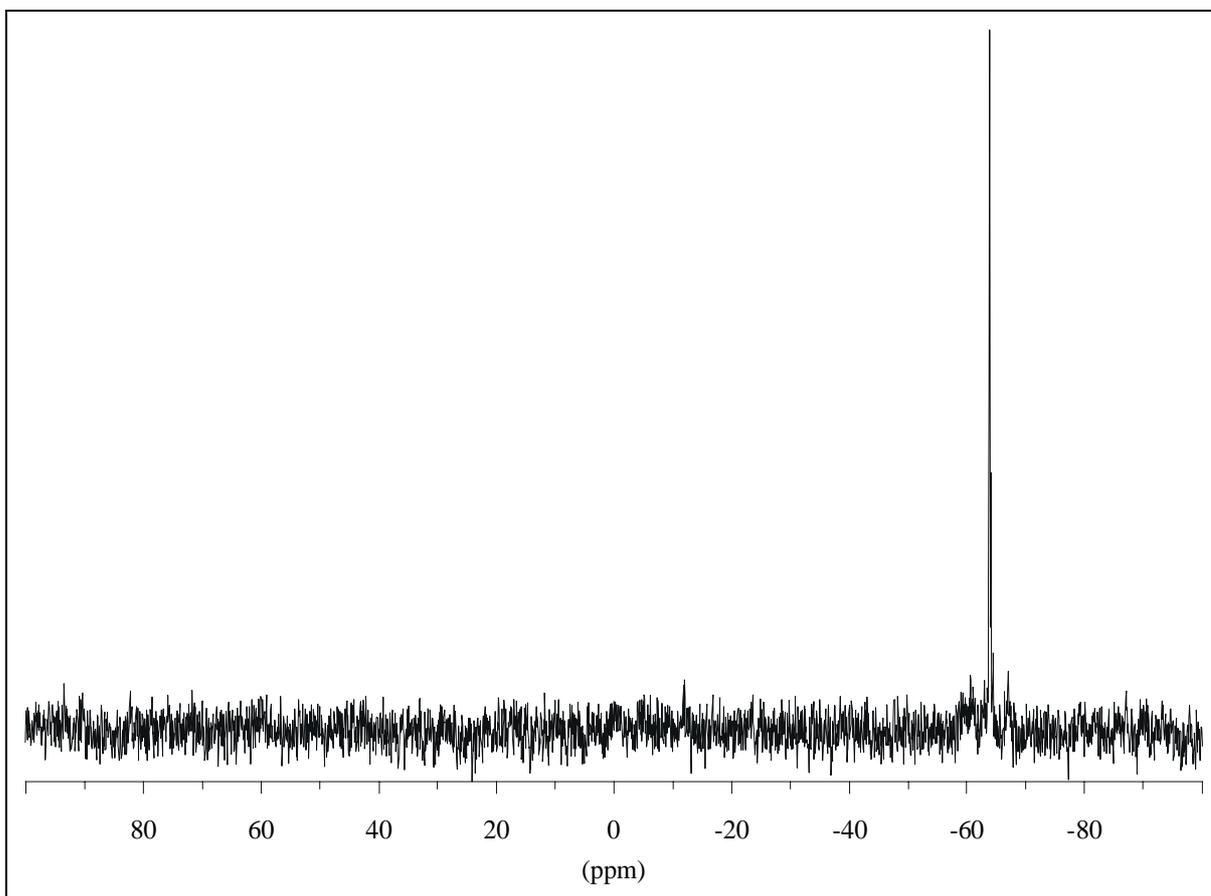


Abb. 7.37: ^{15}N -NMR-Spektrum von $[\{\text{Pt}(\text{NH}_3)\} \text{glymetH}-\kappa^3\text{S}, \text{N}_M, \text{N}_G]^+$ (400 MHz)

Um die beiden Vorläuferprodukte κS und $\kappa^2\text{S}, \text{N}_M$ nachzuweisen, wurde eine ^1H -NMR-Kinetik bei $\text{pH} = 2,0$ und einer Temperatur von 25°C in 1:1 Stöchiometrie angesetzt. Durch die höhere Konzentration der NMR-Lösung wird die Reaktion gegenüber der 12 fach verdünnten analytischen Lösung der chromatographischen Untersuchung beschleunigt. Innerhalb von 15 min bildet sich der monodentat koordinierte κS -Komplex mit einer δ -CH₃-Resonanz von 2,43 ppm. Die α -met-Protonen verschieben sich während der Koordination nicht. Nach einer Reaktionszeit von 6 h ist in Abb. 7.38 sowohl ein weiteres δ -met-Signal bei 2,54 ppm, als auch die um $-0,45$ ppm hochfeldverschobene α -met-Gruppe des $\kappa^2\text{S}, \text{N}_M$ -Vorläuferkomplexes sichtbar. Dieser Hochfeldshift ist typisch für einen $\kappa^2\text{S}, \text{N}_M$ -Chelat und wurde auch schon von

APPLETON et al. beobachtet [150]. Aus der zeitabhängigen NMR-Untersuchung ist ersichtlich, dass die häufig berichtete Bildung des κ^2S,O -Vorläufers und der damit verbundenen Tieffeldshift der α -met-Signale bis 5,6 ppm in diesem Fall nicht beobachtet wird [166]. Die chemische Verschiebungswerte der vier chromatographisch getrennten Produkte und deren Strukturen sind in den nachfolgenden Abbildungen zu sehen.

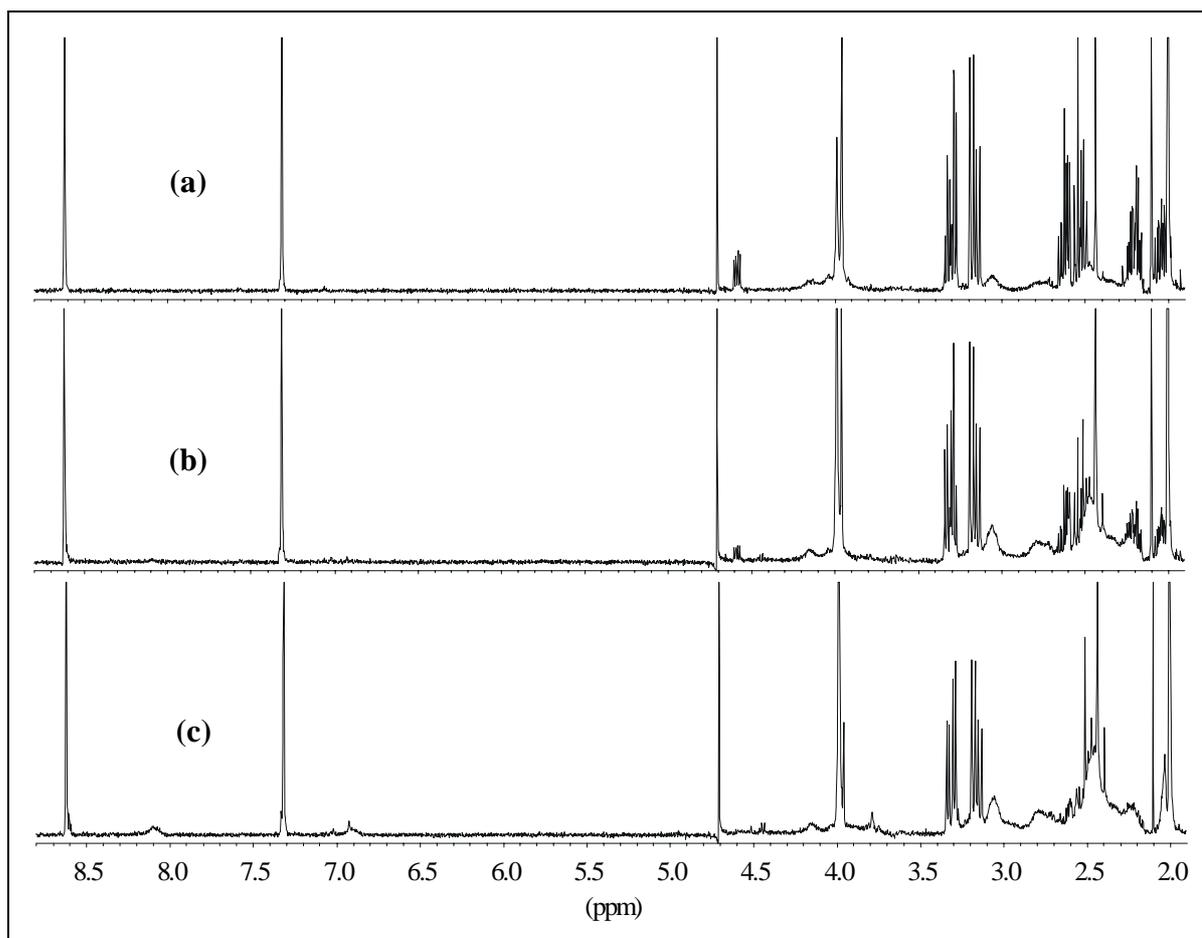


Abb. 7.38: ¹H-NMR-Kinetik eines 10mM 1:1 [PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymetH Ansatzes

pH = 2,0 ; T = 25° C

(a) t = 0,25 h

(b) t = 2 h

(c) t = 6 h

Tab. 7.4: Chemische Verschiebungen der *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymetH Produkte

Signalzuordnung	achisH	κ^3S, N_M, N_G	(gm) κ^3S, N_M, N_G	$\kappa^2S, N3$
H2 $^3J(^1H-^{195}Pt)$	8.60(s)	8.61(s)		8.09(s) 18 Hz
H5 $^3J(^1H-^{195}Pt)$	7.30(s)	7.34(s)		7.38(s) 9 Hz
α_{his}	4.71(m)	4.68(t)		4.68(m)
β_{his}	3.32, 3.16(dd)	3.23(m)		3.23(m)
α_{met}		4.18(m)	4.39, 4.28(t)	4.68(m)
β_{met}		2.67-2.25(m)	2.51, 2.41, 2.27, 1.98(t)	2.25, 2.00(m)
γ_{met}		3.13, 2.61(m)	2.89, 2.61(m)	2.66(m)
δ_{met}		2.56(d)	2.55, 2.58(s)	2.33(d)
α_{gly}		4.00(m)	3.64(d)	4.14(d), 3.93(d)
ac	1.99(s)	1.98(s)		2.07(s)
^{15}N			-64	
^{195}Pt			-3163	
pH*-Wert	2.5	1.8	2.5	1.7

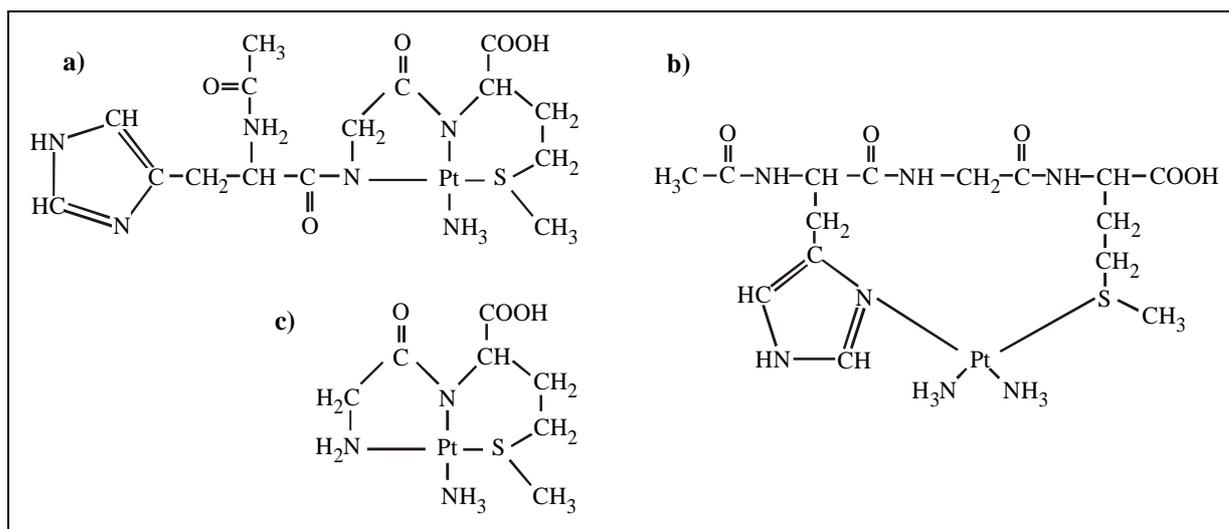


Abb. 7.39: Strukturen von
 a) $[\{Pt(NH_3)\} \text{ achisglymetH-}\kappa^3S, N_M, N_G]^+$
 b) $[\{Pt(NH_3)_2\} \text{ achisglymetH-}\kappa^2S, N3]^{2+}$
 c) $[\{Pt(NH_3)\} \text{ glymetH-}\kappa^3S, N_M, N_G]^+$

7.4.3 Das System $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3metH$

Das System $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3metH$ ähnelt dem $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achisglymetH$ -System. Auch hier bildet sich fast über den gesamten pH-Bereich als Hauptprodukt der tridentat koordinierte κ^3S,N_M,N_G -Komplex. Die α -met-Protonen sind um $-0,45$ ppm zu hohem Feld verschoben und die δ -CH₃-Gruppe bei 2,56 ppm bestätigt die Schwefelkoordination.

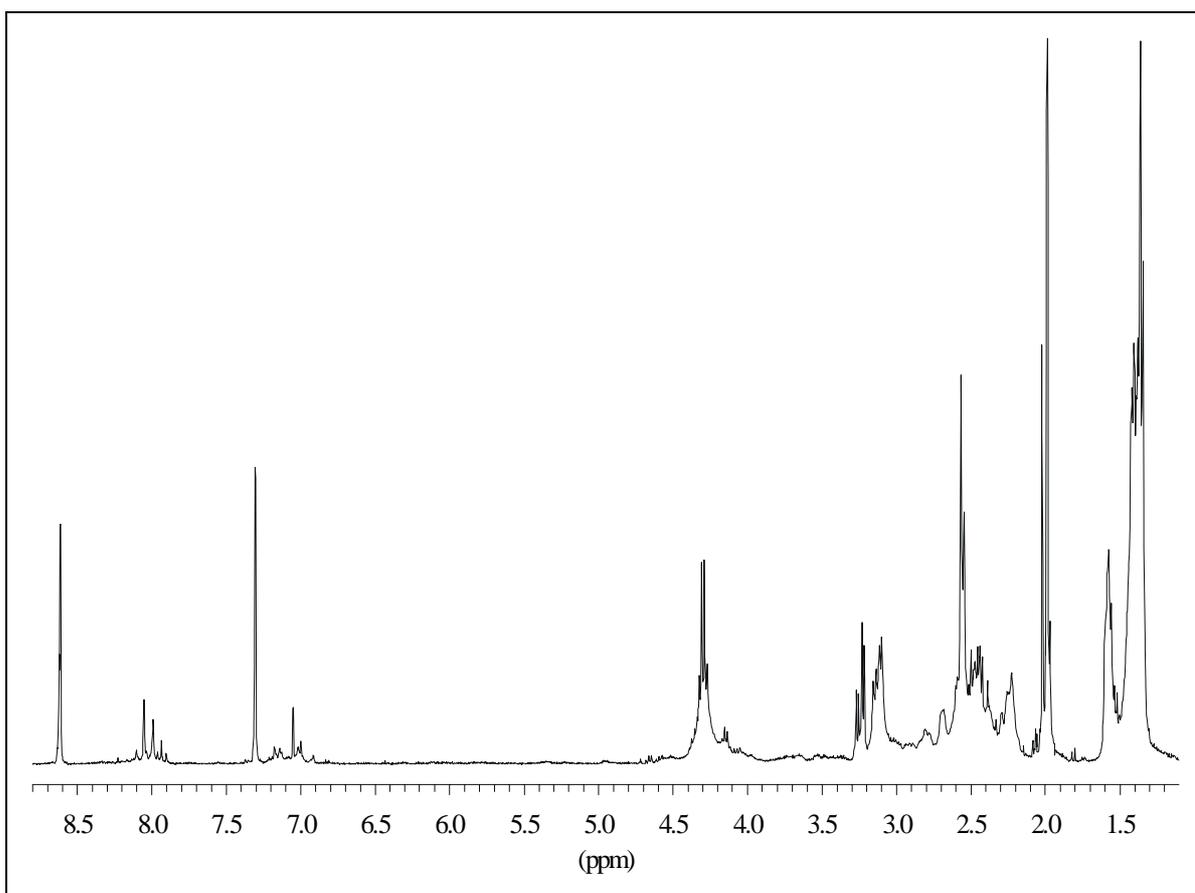


Abb. 7.40: 1H -NMR-Spektrum von $[Pt(NH_3)achis(ala)_3metH-\kappa^3S,N_M,N_A]$ (400 MHz)

Der Imidazolring des Histidins liegt unkoordiniert vor und das Massenspektrum der Verbindung beweist die 1:1 Stöchiometrie durch den Molekülionenpeak bei $m/z = 753$. Der Komplex ergibt im ^{195}Pt -Spektrum eine Verschiebung von -3091 ppm für eine N_3S -Umgebung des Platins.

Der in Abb. 7.41 gezeigte UV-Spektrenvergleich mit den anderen Peptidkomplexen verdeutlicht den κ^3S,N_M,N_G -Koordinationsmodus.

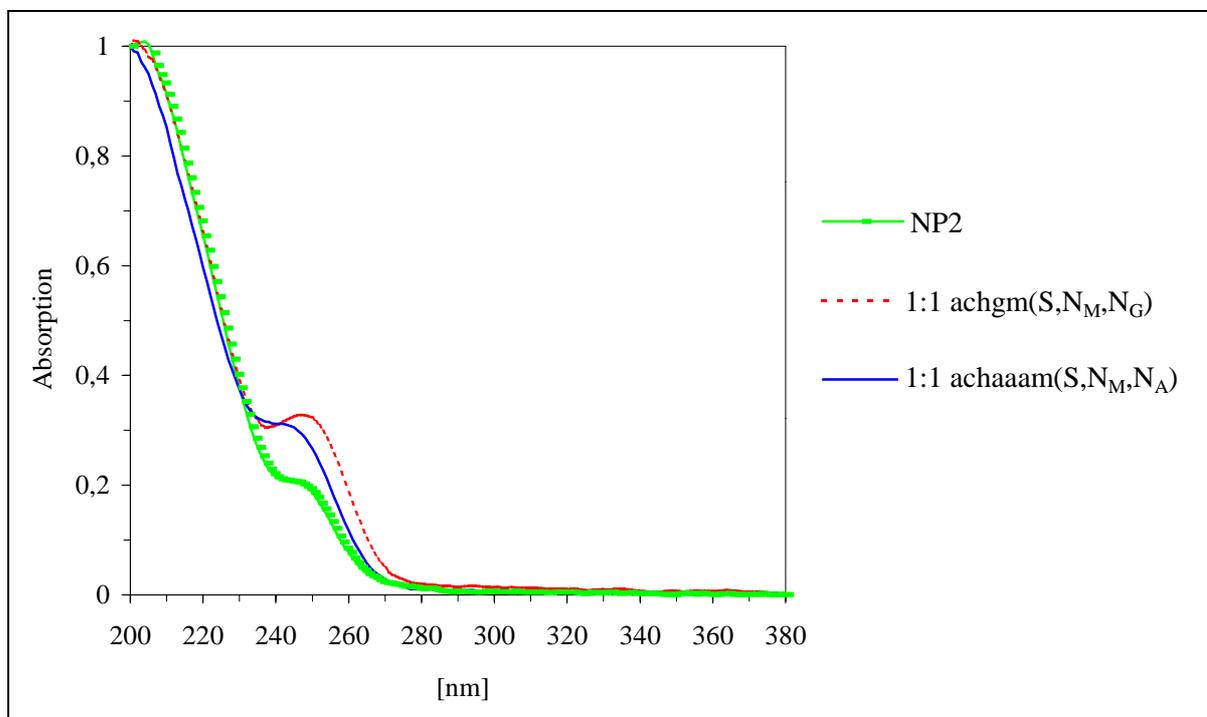


Abb. 7.41: UV-Spektren $\kappa^3S,N_M,N_{G/A}$ koordinierter Produkte im Vergleich

Auch in diesem System findet eine Peptidspaltung ab $\text{pH} < 5$ zu dem weiterhin tridentat koordinierte κ^3S,N_M,N_G -alametH und das unkoordinierte achis(ala)₂H statt und bestätigt den in der Diskussion erläuterten Mechanismus der Peptidspaltung.

Das in Abb. 7.42 dargestellte ¹H-NMR-Spektrum zeigt das Fehlen der Histidinprotonen und durch die Integralverhältnisse lässt sich die Beteiligung nur einer Alaningruppe in dem κ^3S,N_M,N_G -alametH-Komplex nachweisen. Das Spektrum ähnelt dem des κ^3S,N_M,N_G -glymetH-Produkt sehr, da auch hier die α -met-Resonanz hochfeldverschoben und aufgrund der Diastereomerenbildung aufgespalten ist. Ein Hochfeldshift von $-0,52$ ppm der α -ala-Signale bestätigt die Koordination der Aminogruppe. Erwartungsgemäß ist die δ -CH₃-Gruppe zu tieferem Feld verschoben.

Den Einfluss des Koordinationsmodus auf das UV-Spektrum von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / Peptid-Komplexen zeigt die Abb. 7.43. Die tridentate κ^3S,N_M,N_G -alametH-Spezies ist bei einem identischem Verlauf nur durch die zusätzliche Methylgruppe im Alanin leicht nach oben verschoben.

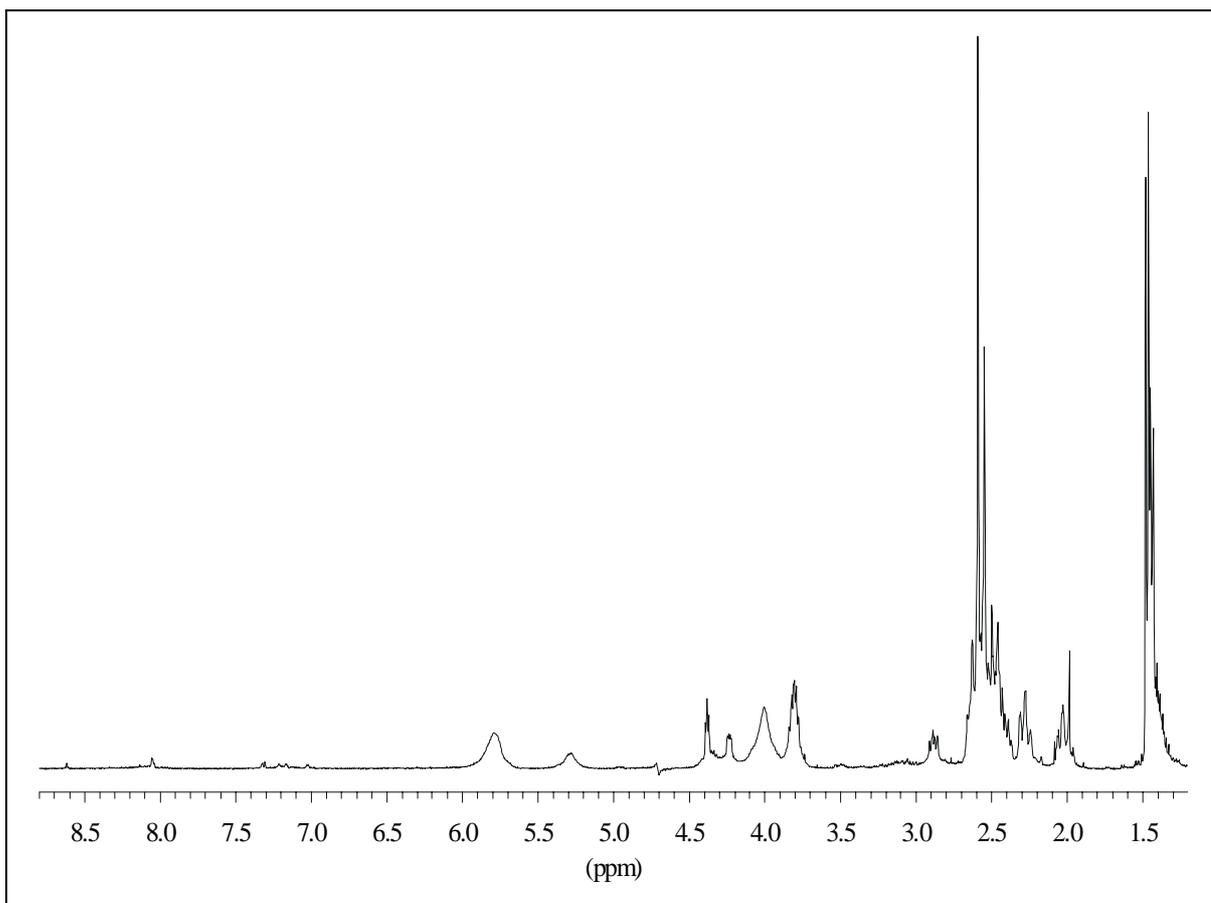


Abb. 7.42: ¹H-NMR-Spektrum von $[\{Pt(NH_3)\} \text{alame}H-\kappa^3 S, N_M, N_A]^+$ (400 MHz)

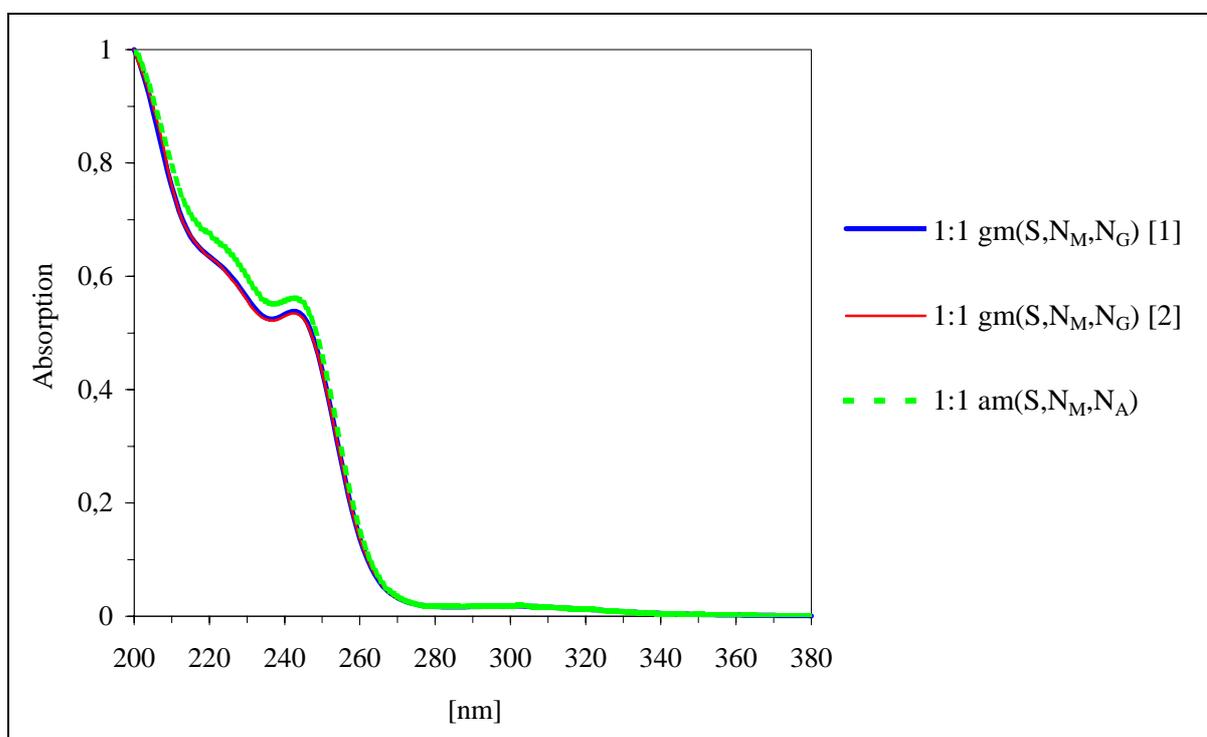


Abb. 7.43: UV-Spektren der tridentat koordinierten Produkte

Das UV-Spektrum des κ^3S,N_M,N_G -Spaltproduktes aus dem *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / achisglymetH-System liegt genau über dem von KLEINE charakterisiertem Produkt aus dem des [PtCl₂(NH₃)₂] / glymetH-System.

Das ¹⁹⁵Pt-Spektrum bestätigt mit einer Verschiebung von -3196 ppm die N₃S-Umgebung am Platin.

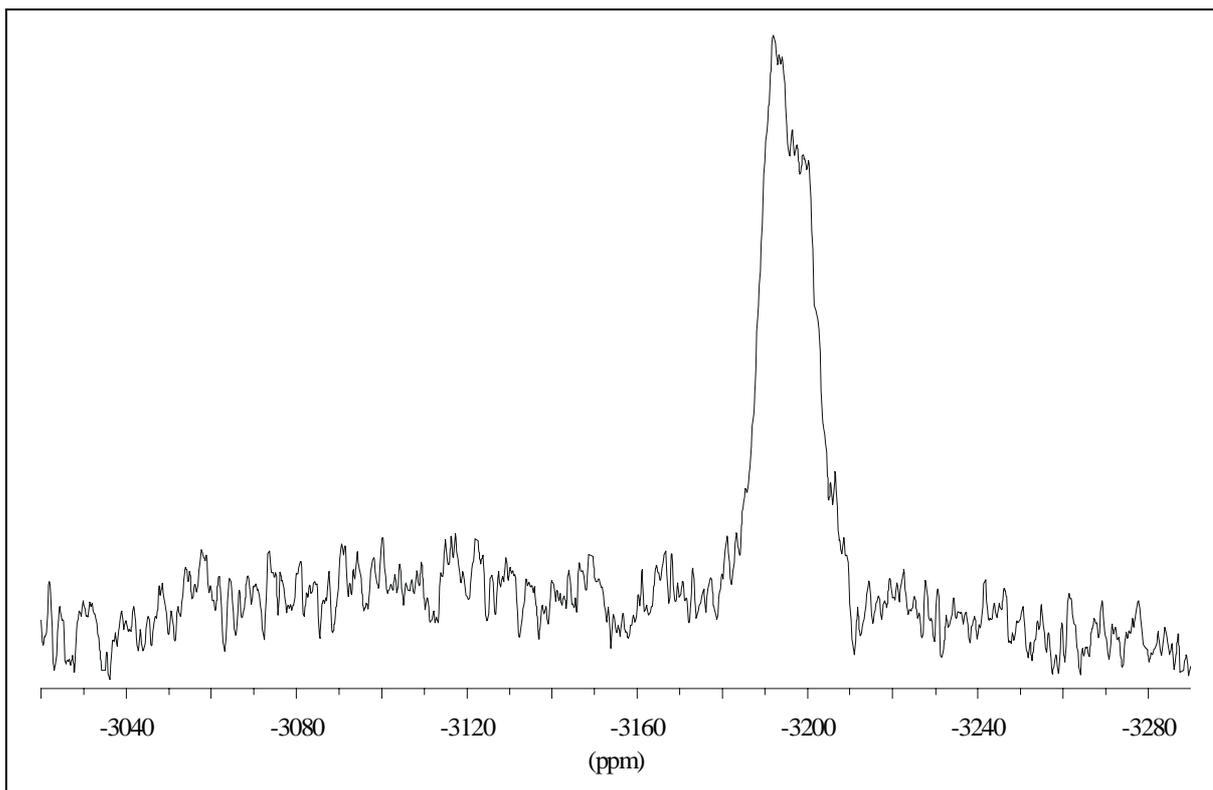


Abb. 7.44: ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektrum von [*alame*H- κ^3S,N_M,N_A]⁺ (400 MHz)

Die „sanfte“ massenspektrometrische Untersuchung durch das Elektrosprayverfahren (ESI) gewährleistet die Beobachtung intakter Molekülonen, wie es für Pd(II)-Komplexe mit methioninhaltigen Tetrapeptiden gezeigt wurde [167].

Der Basispeak im ESI-Massenspektrum bei $m/z = 433$ identifiziert die 1:1 Stöchiometrie des Produktes mit einer am Platin noch verbliebenen NH₃-Gruppe.

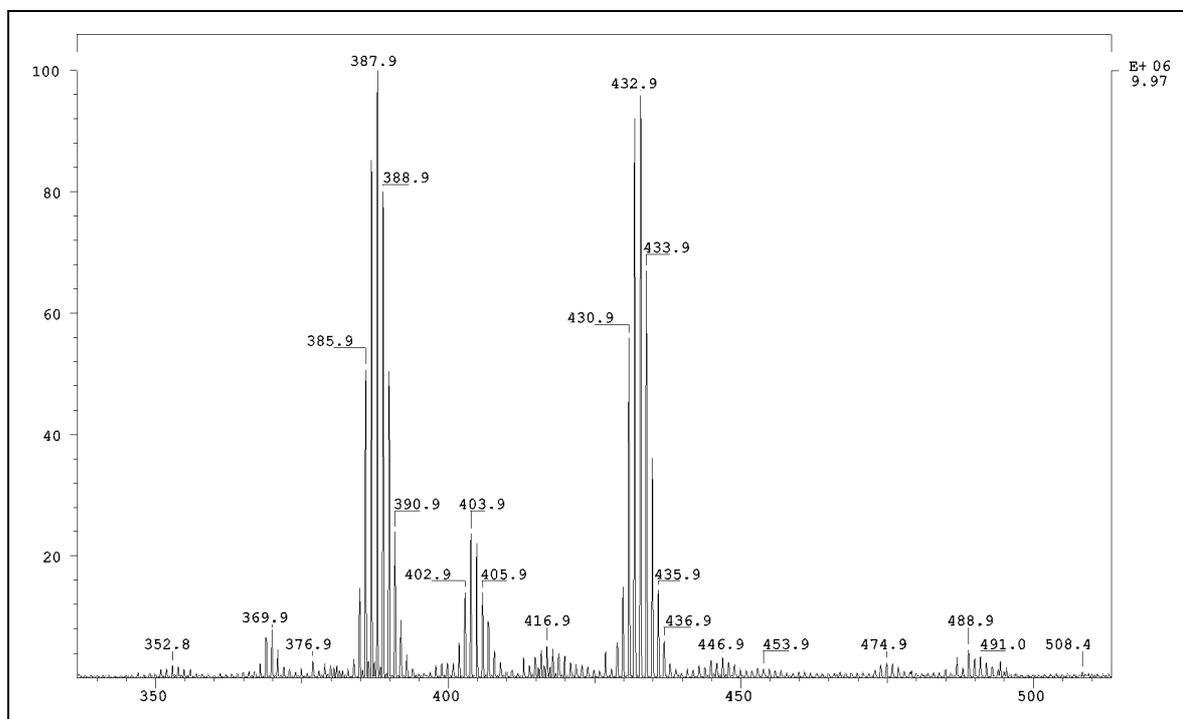


Abb. 7.45: ESI-MS-Spektrum von $\{[Pt(NH_3)] \text{ alametH-}\kappa^3 S, N_M, N_A\}^+$

Die Strukturen der beiden charakterisierten Komplexe, sowie die NMR-spektroskopischen Daten sind in den nachfolgenden Abbildungen zu sehen.

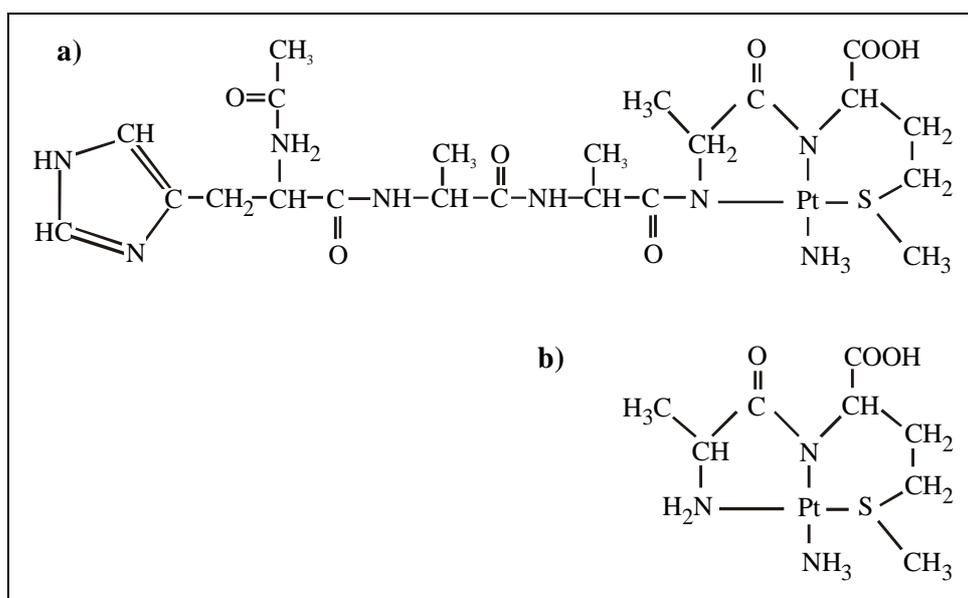


Abb. 7.46: Strukturen von a) $\{[Pt(NH_3)] \text{ achis(ala)}_3\text{metH-}\kappa^3 S, N_M, N_A\}^+$

b) $\{[Pt(NH_3)] \text{ alametH-}\kappa^3 S, N_M, N_A\}^+$

Tab. 7.5: Chemische Verschiebungen der *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / *achis(ala)*₃*metH* Produkte

Signalzuordnung	κ^3S, N_M, N_A	(am) κ^3S, N_M, N_A	achis(ala)₂H
H2	8.61(s)		8.60(s)
H5	7.30(s)		7.30(s)
α_{his}	4.65(q)		4.65(m)
β_{his}	3.24, 3.12(dd)		3.23, 3.15(dd)
α_{met}	4.14(q)	4.38(t), 4.24(q)	
β_{met}	2.23-2.43(m)	2.48, 2.40, 2.27, 2.03(m)	
γ_{met}	2.81, 2.69(m)	2.89, 2.69(q)	
δ_{met}	2.55, 2.57(s)	2.56, 2.58(s)	
α_{ala}	4.30(m)	3.80(m)	4.33(m)
β_{ala}	1.57, 1.36(m)	1.45(m)	1.40(m)
ac	1.99(s)		1.99(s)
¹⁹⁵ Pt	-3091	-3196	
pH*-Wert	1.6	2.1	1.9

7.5 Diskussion

Die Charakterisierung der Reaktionsprodukte von $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit den Peptiden hisglymetH, achisglymetH und achis(ala)₃metH ist im nachhinein eindeutig. Diese gelang jedoch erst durch die Untersuchung der kürzeren nur methioninhaltigen Peptide glymetH und glyglymetH von KLEINE, der die Bildung der tridentaten κ^3S, N_M, N_G -glymetH-Spezies beobachten konnte. Die pH-abhängige Verteilungskurve verdeutlicht die Dominanz des Produktes über den gesamten pH-Bereich, das auch schon von FREEMAN et al. als Chloridkomplex kristallisiert wurde [89].

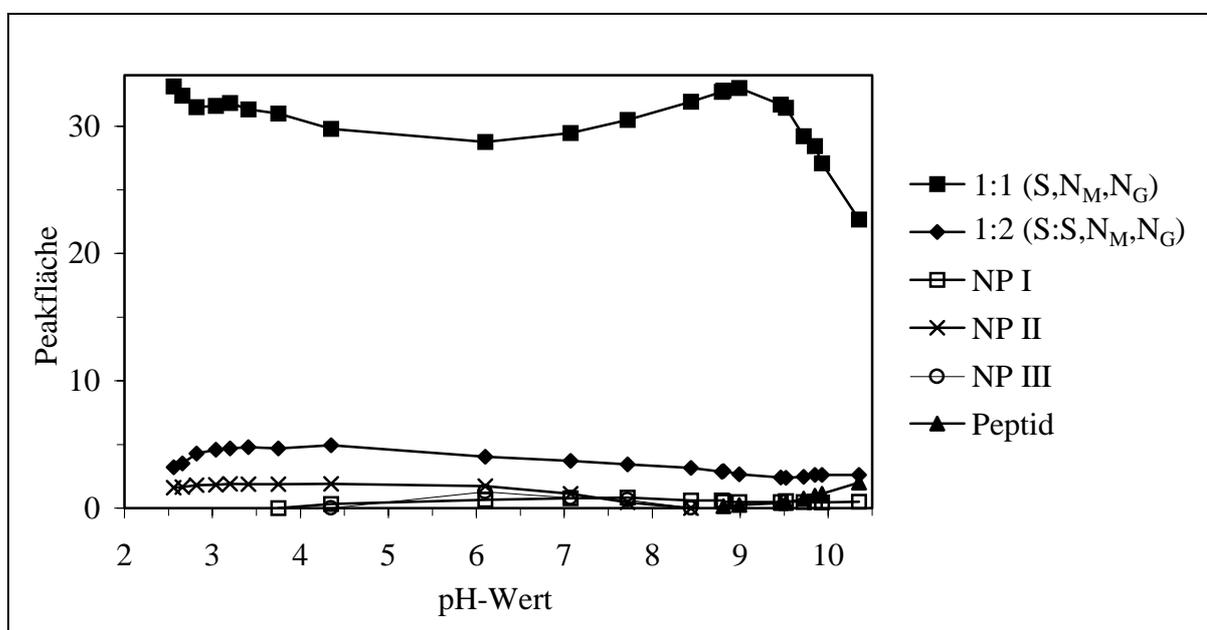


Abb. 7.47: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / glymetH (1:1)

Ein Vergleich der Reaktion der beiden N-terminal ungeschützten Peptide hisglymetH und glyglymetH zeigt das Entstehen der thermodynamisch äußerst stabilen tetradentaten Koordination im Neutralen mit einer maximalen Produktkonzentration im basischen pH-Bereich. Das tridentate κ^3S, N_M, N_G -Hauptprodukt ist in der glyglymetH pH-Verteilung genau wie bei den Peptiden achisglymetH und achis(ala)₃metH im Sauren zu finden. Bei der Betrachtung der zeitabhängigen Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit glyglymetH bei pH = 3,0 fällt der identische Reaktionsverlauf im Vergleich zu den beiden N-

terminal geschützten Peptiden auf. Zuerst bildet sich der monodentat schwefelkoordinierte κ -S-Vorläufer, der dann zum κ^2S, N_M -Komplex und weiter zum tridentaten κ^3S, N_M, N_G -Produkt reagiert. Der vorgeschlagene Mechanismus für die folgende cisplatininduzierte Hydrolyse methioninhaltiger Peptide, die erst nach einer Reaktionszeit von 100 h einsetzt, ist in Abb. 7.50 dargestellt.

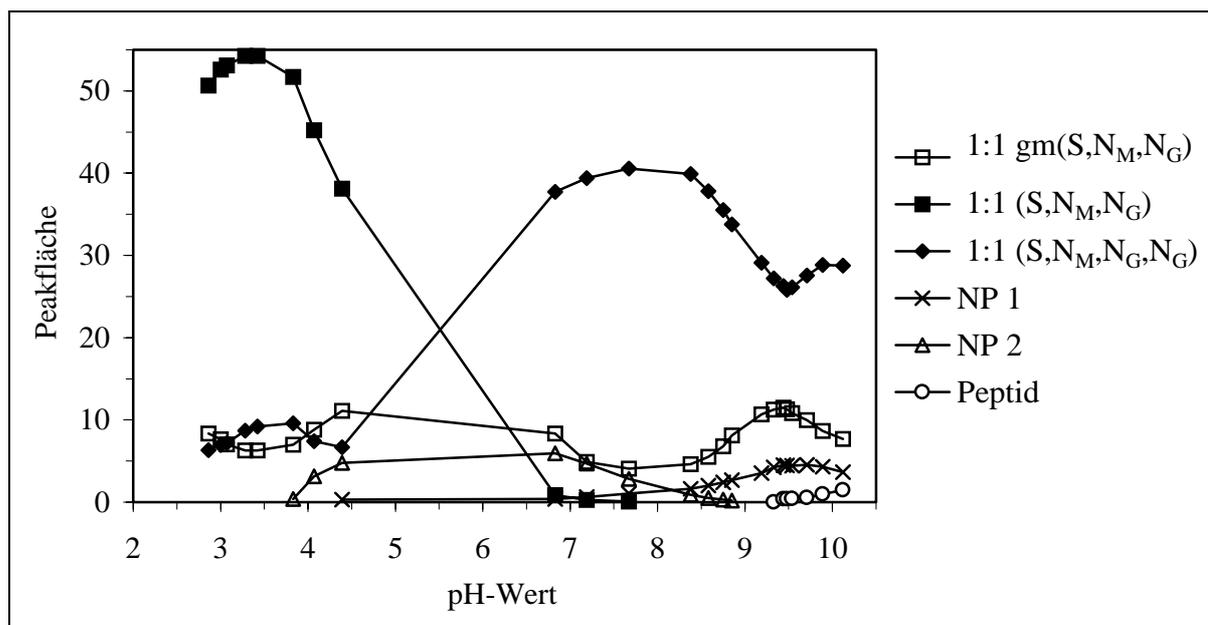


Abb. 7.48: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / glyglymethH (1:1)

Das Auftreten von Spaltprodukten im glyglymethH-System bei pH-Werten größer als 5, konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden nicht bestätigt werden. Ein von KOSTIC et al. aufgestellter Reaktionsmechanismus der hydrolytischen Peptidspaltung im Sauren stimmt nicht mit dem hier vorliegendem überein [53]. Das kann an den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen z.B. der höheren Konzentration (80 – 170 mM), der höheren Temperatur (60° C) und an dem verwendeten Metallfragment ($PtCl_4^{2-}$ oder $Pt(en)^{2+}$) liegen. Bei KOSTIC entsteht aus einer monodentaten Thioetherkoordination von Platin oder Palladium am Methionin, ein sechsgliedriger Übergangszustand. Hierbei fungiert ein am Metallzentrum vorhandener OH_2 -Ligand als Nukleophil oder gute Abgangsgruppe. Das Schema des von KOSTIC vermuteten Reaktionsmechanismus ist in Abb.3.13 gezeigt. Der Unterschied zu dem in Abb. 7.50 vorgeschlagenen Mechanismus liegt in der Bildung des sehr stabilen tridentaten

$\kappa^3\text{S},\text{N}_\text{M},\text{N}_\text{G}$ -Komplexes, der für die charakteristische Abspaltung von glymetH oder alametH verantwortlich ist. Durch den trans-Einfluß des Schwefels wird die stärker polarisierte Bindung gespalten. Zukünftige Untersuchungen anhand der Peptide glyglymetglyH und acglymetH werden zeigen müssen, welche Form der Peptidspaltung für Cisplatin bevorzugt ist.

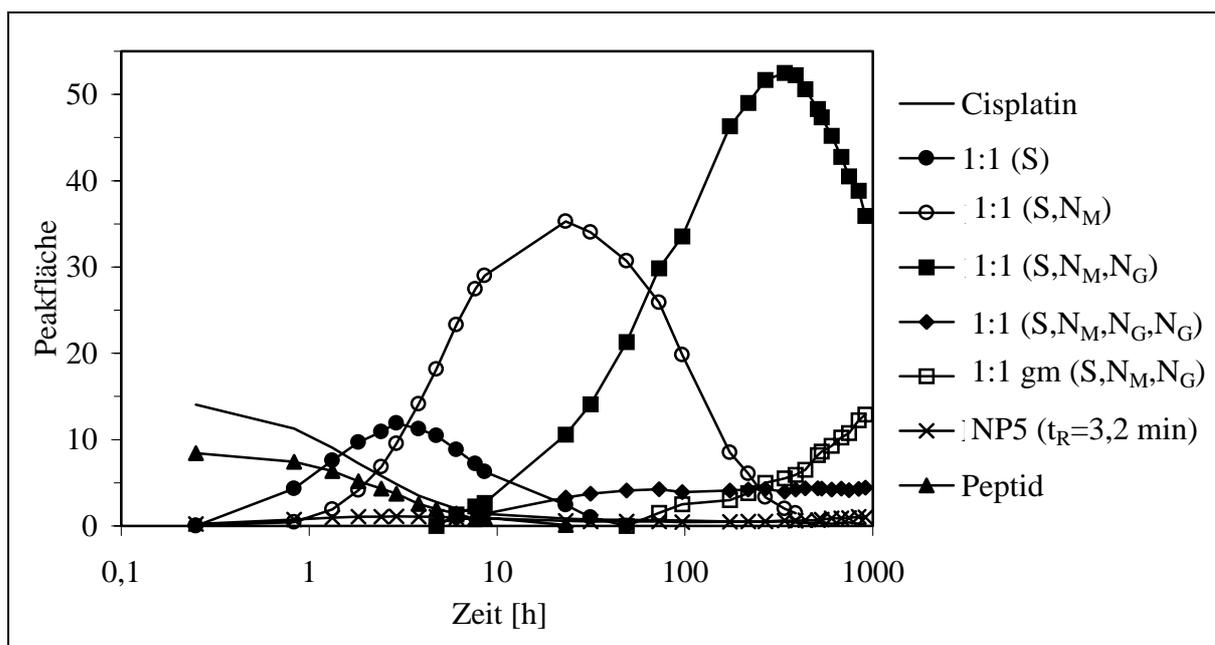


Abb. 7.49: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ / glyglymetH (1:1); pH = 3,00

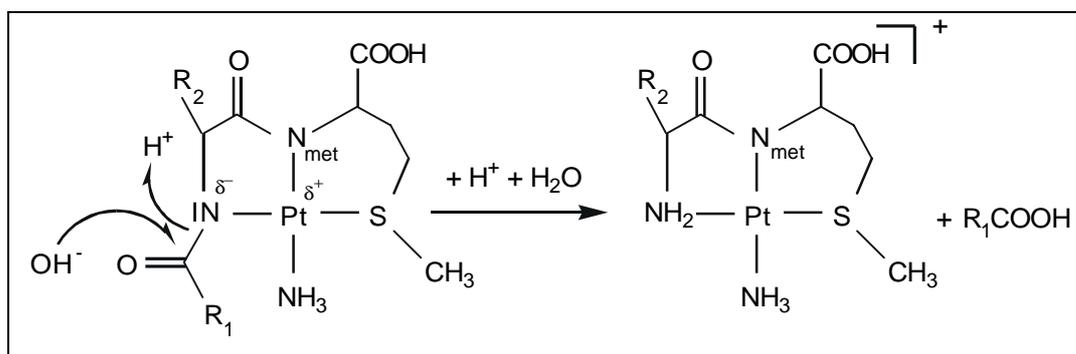


Abb. 7.50: Mechanismus der cisplatininduzierten Hydrolyse methioninhaltiger Peptide

- a) für achis(ala)₃metH: $R_1 = \text{achis(ala)}_2\text{H}$ und $R_2 = \text{CH}_3$
 b) für achisglymetH: $R_1 = \text{achis}$ und $R_2 = \text{H}$
 c) für glyglymetH: $R_1 = \text{gly}$ und $R_2 = \text{H}$

Der allgemeine Reaktionsweg methionin- und histidinhaltiger Peptide ist in Abb. 7.51 zu sehen. Zuerst koordiniert das Cisplatin am Thioetherschwefel des Methionins unter Abgabe eines Chlorides. Das zweite noch vorhandene Cl-Atom kann durch Hydrolyse gegen eine OH₂-Gruppe ausgetauscht werden. Der daraufhin gebildete sechsgliedrige κ^2S, N_M -Chelat ist ein Vorläufer für den tridentat κ^3S, N_M, N_G -koordinierten Komplex. Dieser kann dann im Falle des hisglymethH zum thermodynamisch stabilen tetradentaten κ^4S, N_M, N_G, N_H weiterreagieren oder wie bei den Peptiden achisglymethH oder achis(ala)₃metH bei pH < 5 zu einer hydrolytischen Peptidspaltung führen. Der trans-Effekt des Schwefels und der damit verbundene NH₃-Verlust am Platin führt zur Entstehung der tridentat koordinierten Produkte [87]. Die Bildung des $\kappa^2S, N3$ -Imidazol koordiniertem Makrochelats ist nur bei den beiden Tripeptiden zu beobachten. Der tridentate $\kappa^3S, N3, N_H$ -Komplex bildet sich nur im *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / hisglymethH-System. In sämtlichen untersuchten Reaktionen mit *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] lässt sich im Gegensatz zum [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ nur eine Imidazolbeteiligung bei Neben- und Zwischenprodukten nachweisen.

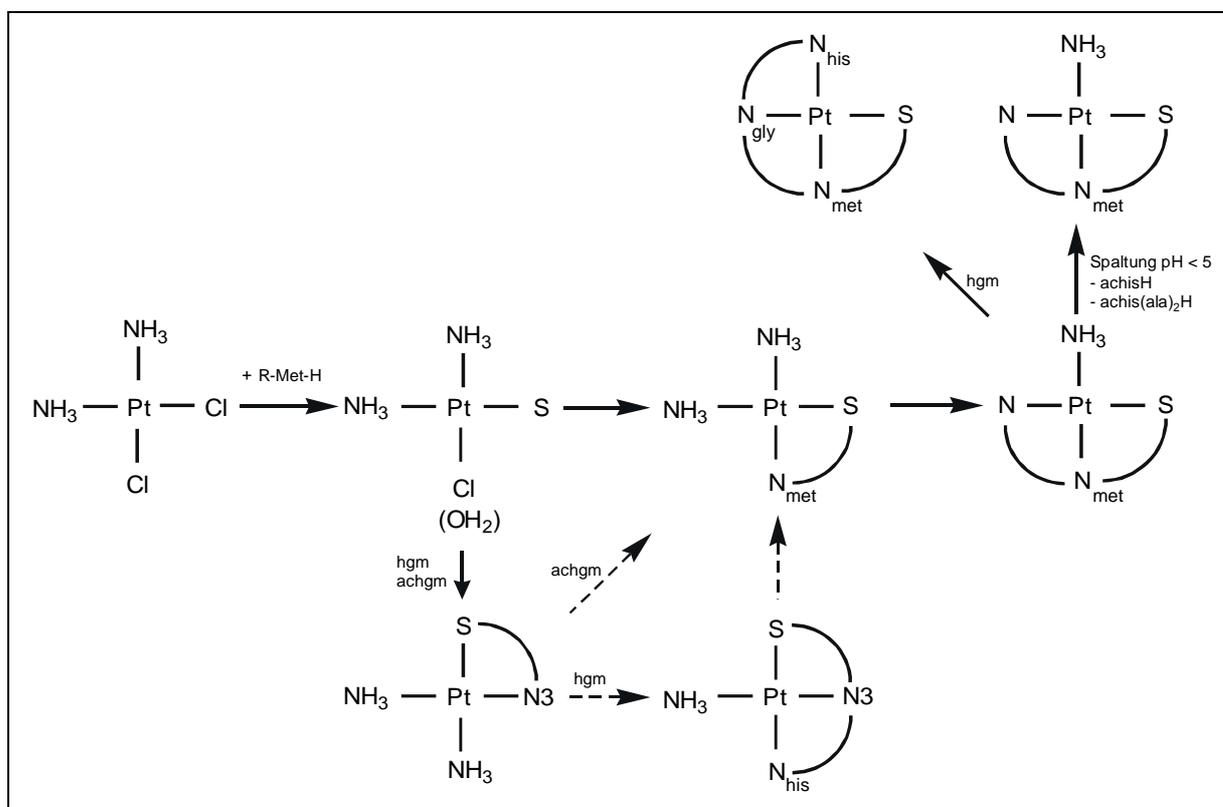


Abb. 7.51: Reaktionsweg von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit histidin- und methioninhaltenen Peptiden (R = hisgly; achisgly; achis(ala)₂)

Dieser in Abb. 7.51 beschriebene Reaktionsweg weist Ähnlichkeiten mit dem von SADLER und HEUDI für Methionin beschriebenen auf [65, 87]. In beiden Fällen reagiert *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] zunächst zum κS koordiniertem Produkt, um dann den $\kappa^2 S, N_M$ -Chelat zu bilden. Eine tridentate Koordination ist bei einer Reaktion mit der Aminosäure nicht möglich. Die von SADLER beschriebenen Zwischenprodukte mit Cl-Beteiligung konnten in einer zeitabhängigen Produktverteilung mit Fällung des Chlorides nach 24 h nicht nachgewiesen werden.

8 Reaktionsvergleich zwischen $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$

Ein Vergleich der Modellverbindung $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit dem Cytostatikum $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ in den pH-Produktverteilungen und den zeitabhängigen Produktbildungen mit den Peptiden hisglymeth, achis(ala)_{1/2}meth und achis(ala)₃meth lässt die Unterschiede der beiden Metallfragmente erkennen. Die pH-abhängigen Produktverteilungen in den Abb. 6.30 und 7.2 der beiden Platinverbindungen mit dem Tripeptid hisglymeth zeigen einen sehr unterschiedlichen Verlauf. Im Säuren bildet sich mit $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ der $\kappa^3\text{S},\text{N}3,\text{N}_{\text{H}}-$, der 2:1 $1\kappa^2\text{N}_{\text{H}},\text{N}3:2\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{M}}-$ und der tetradentate $\kappa^4\text{S},\text{N}_{\text{M}},\text{N}_{\text{G}},\text{N}_{\text{H}}-$ -Komplex (t = 3 Wochen), wogegen bei der Reaktion mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ nur die $\kappa^2\text{S},\text{N}1$ -Spezies als Hauptprodukt (t = 4 Wochen) zu beobachten ist. Während im neutralen pH-Bereich im $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ -System nur das vermutlich $\kappa^2\text{S},\text{N}3$ -imidazolkoordinierte Produkt zu finden ist, entsteht mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ sowohl die $\kappa^2\text{S},\text{N}1$ -, als auch die $\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{M}}-$ Spezies. Bei pH > 9,5 dominiert im $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -System das $\kappa^2\text{N},\text{N}3$ -Produkt, wogegen mit $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ die tetradentate $\kappa^4\text{S},\text{N}_{\text{M}},\text{N}_{\text{G}},\text{N}_{\text{H}}-$ Spezies überwiegt. Die Unterschiede in der Produktbildung sind auf die bei $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ durch den trans-Effekt des Schwefels bedingten Verlust der NH_3 -Gruppe zurückzuführen. Hierdurch und aufgrund der ungeschützten Aminogruppe in hisglymeth dominieren in der mit $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ erstellten pH-Produktverteilung die tri-, tetra- oder auch binuklear koordinierten Komplexe gegenüber dem $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -System. Die kinetischen Untersuchungen im Säuren aus Abb. 6.32 und 7.3 zeigen einen vergleichbaren Kurvenverlauf für das sechsgliedrige $\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{M}}$ -Chelat, jedoch überwiegt in der mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ erstellten das $\kappa^2\text{S},\text{N}1$ -Produkt nach 4 Wochen. In der $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ -Kinetik sind zu diesem Zeitpunkt dagegen nur noch die tetradentate und die 2:1 Spezies detektierbar. Einen interessanten Vergleich des Reaktionsverhaltens bieten die beiden kinetischen Untersuchungen der Metallfragmente mit den ähnlichen N-geschützten Peptiden achisglymeth und achis(gly)₂meth bei pH = 2,8 (Abb. 8.1 und 8.2). Im $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ / achis(gly)₂meth-System bildet sich nach kurzer Zeit der $\kappa^2\text{S},\text{O}$ -Vorläufer, aus dem dann das $\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{M}}$ -Produkt entsteht und sogar nach 1000 h noch vorherrschend ist. Nach einer Reaktionszeit von 100 h bilden sich parallel in deutlich geringeren Konzentrationen die beiden imidazolkoordinierten $\kappa^2\text{S},\text{N}1$ - und $\kappa^2\text{S},\text{N}3$ -Komplexe. Die zeitabhängige

Produktverteilung des $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ mit achisglymethH zeigt dagegen einige Produkte mehr. Zu Beginn entsteht der monodentate κS -Vorläufer, aus dem sich mit einem Maximum

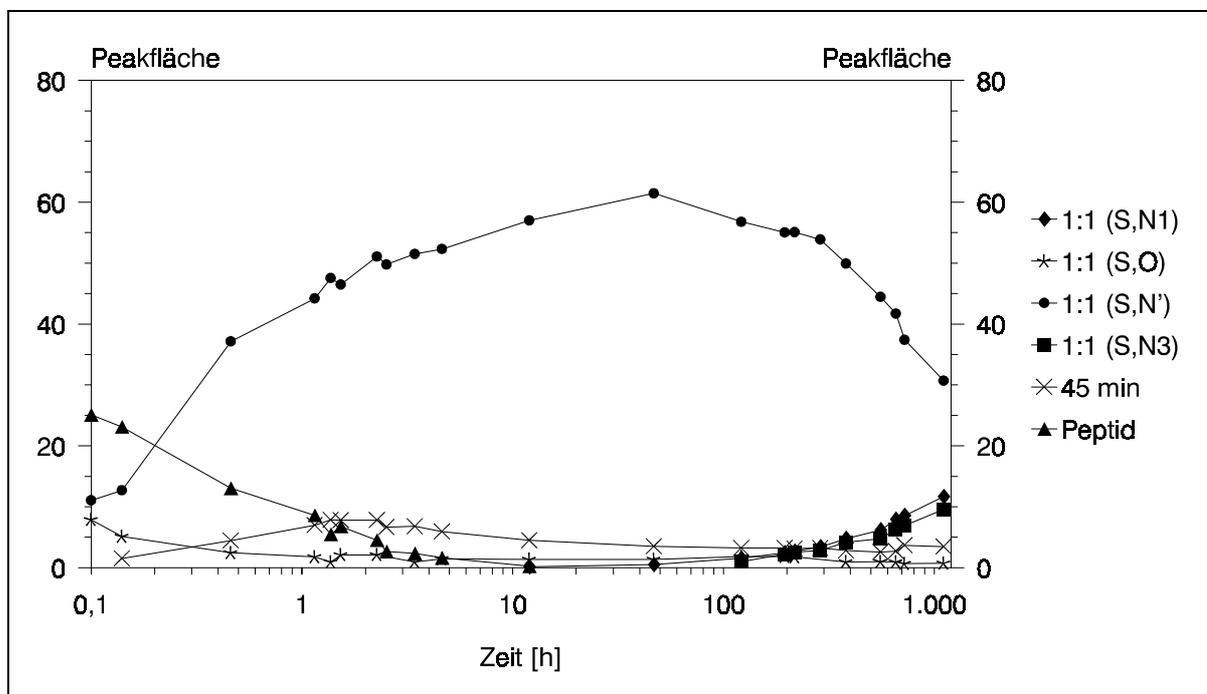


Abb. 8.1: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $achis(gly)_2methH$ (1:1); $pH = 2,70$

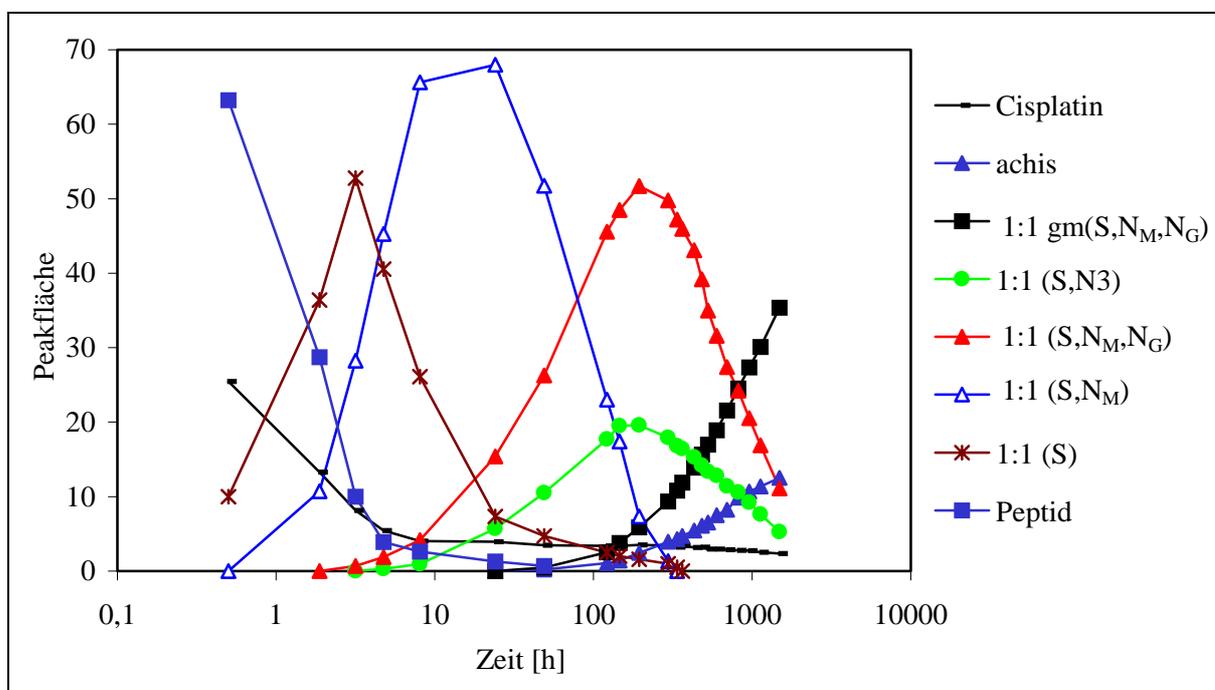


Abb. 8.2: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achisglymethH$ (1:1); $pH = 2,83$

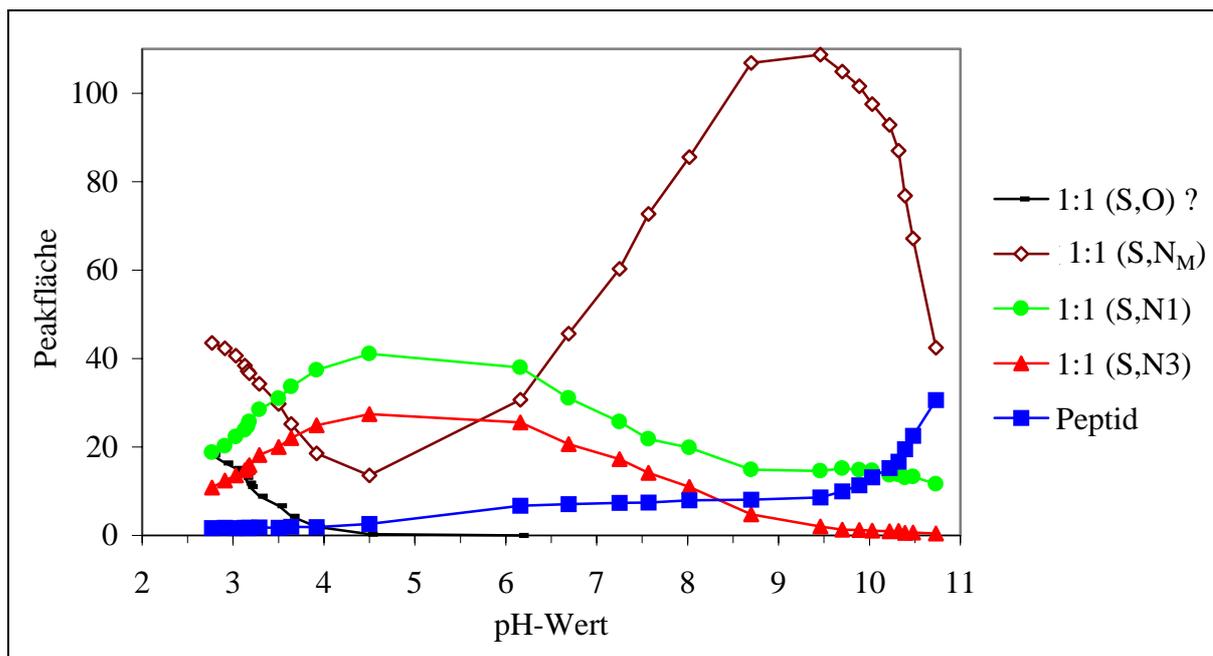


Abb. 8.3: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ / $achis(ala)_3methH$ (1:1); $t = 4$ Wochen

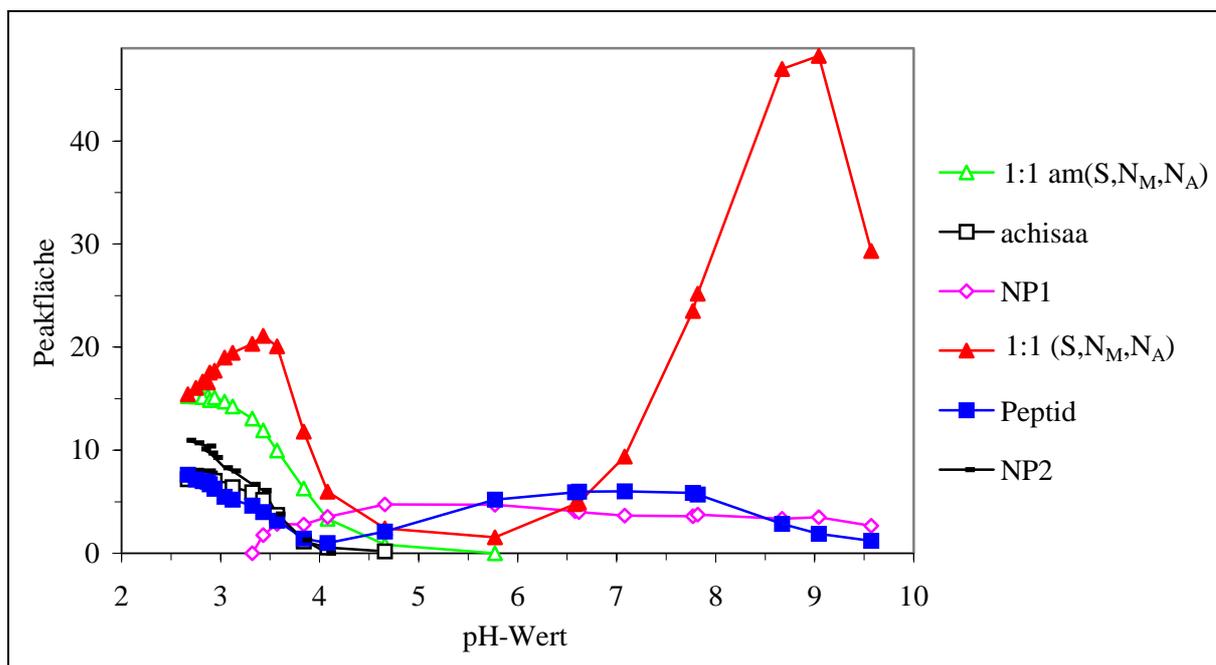


Abb. 8.4: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ / $achis(ala)_3methH$ (1:1); $t = 3$ Wochen

bei 24 h der $\kappa^2\text{S},\text{N}_M$ -Chelat bildet und aufgrund des NH_3 -Verlusts am Cisplatin in den tridentaten $\kappa^3\text{S},\text{N}_M,\text{N}_G$ -Komplex übergeht. Sobald diese Spezies ihr Maximum nach einer Woche durchläuft, spaltet sie sich in die beiden $\kappa^2\text{S},\text{N}_M,\text{N}_G$ -glymethH und achisH Endprodukte. Das parallel zur $\kappa^3\text{S},\text{N}_M,\text{N}_G$ -Spezies verlaufende $\kappa^2\text{S},\text{N}_3$ -Produkt ist nur als Zwischenprodukt detektierbar. Diese beiden Kinetiken zeigen die große Bedeutung des trans-Effektes für die Weiterreaktion zur tridentaten Spezies und die im achis(ala)₃metH-System ebenfalls vorhandene Spaltung der Peptidbindung bei $\text{pH} < 5$. Die pH-abhängigen Produktverteilungskurven in Abb. 8.3 und 8.4 der Platinverbindungen mit dem Pentapeptid achis(ala)₃metH weisen daraufhin, dass vermutlich nur eine $\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{Imidazol}}$ -Produkt bei Cisplatin gebildet wird, wogegen bei der Reaktion mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ beide $\kappa^2\text{S},\text{N}_1$ und $\kappa^2\text{S},\text{N}_3$ -Spezies als Hauptprodukte vorliegen. Die Kurvenverläufe der $\kappa^2\text{S},\text{N}_M$ - in der $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und der $\kappa^3\text{S},\text{N}_M,\text{N}_G$ -Spezies in der $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ -Kinetik sind nahezu identisch. Ein wesentlicher Unterschied stellt allerdings die ab $\text{pH} < 5$ mit $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ stattfindende Spaltung des Tripeptides dar.

Die Ergebnisse verdeutlichen die in Abb. 8.5 gezeigten unterschiedlichen Reaktionswege von $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ und $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ gegenüber den geschützten Peptiden achis(gly)_{1/2}metH und achis(ala)₃metH. Im $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ -Reaktionsweg sind die $\kappa^2\text{S},\text{N}_{\text{Imidazol}}$ -Produkte nur übergangsweise vorhanden, hingegen stellen sie mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ die thermodynamisch stabilen Endprodukte dar. Die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung methioninhaltiger Peptide nach der tridentaten Koordination ist nur mit $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ zu beobachten.

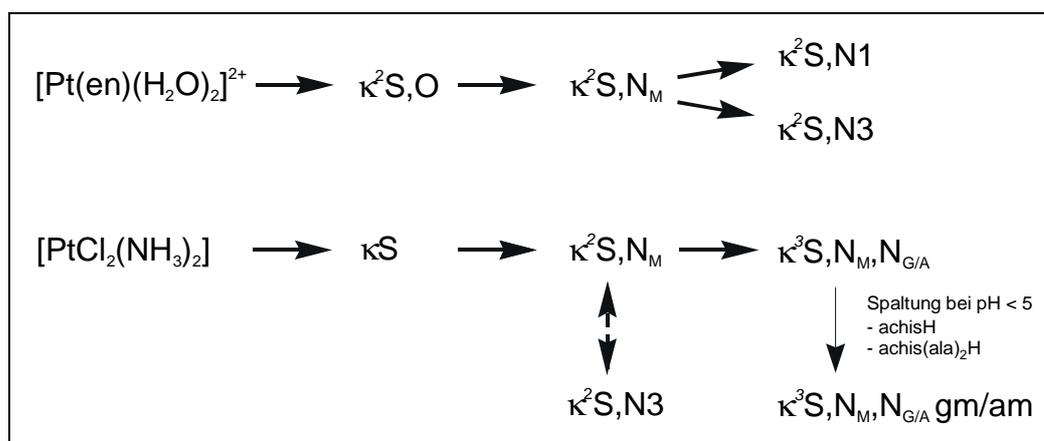


Abb. 8.5: Reaktionswege von $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ und $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit achis(gly)_{1/2}metH und achis(ala)₃metH

9 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die intramolekulare Konkurrenz von Histidin- und Methioninseitenketten um das Pt(II)-Atom in Abhängigkeit der Peptidkettenlänge im pH-Bereich von 3 bis 11 systematisch untersucht. Zur Erfassung möglicher Koordinationsstellen und zur Klärung der intramolekularen Migration wurde das monodentat bindende $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ mit den Peptiden $\text{achis}(\text{ala})_{2/3}\text{metNHPH}$ umgesetzt. Die Reaktionsprodukte aus den Untersuchungen mit dem chelatbildenden $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -Metallfragment und den Peptiden $\text{achis}(\text{ala})_{2/3}\text{metNHPH}$, $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metH}$ und $\text{acmet}(\text{ala})_3\text{metH}$ wurden charakterisiert und mit denen aus den Umsetzungen des Chemotherapeutikums $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ mit den Tri- und Pentapeptiden hisglymetH , achisglymetH und $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metH}$ verglichen.

Zum einen konnte durch Anfertigen von chromatographisch bestimmten pH-abhängigen Produktverteilungskurven ($t = 3$ Wochen; $T = 40^\circ \text{C}$) Aussagen über entstehende thermodynamisch stabile Produkte getroffen werden. Zum anderen konnte die Verfolgung des zeitabhängigen Reaktionsverlaufes bei ausgewählten pH-Werten zu Aufklärungen über den Reaktionsmechanismus führen. Zur Auftrennung der komplexen Platin-Peptid Reaktionsgemische wurde die *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie mit den Perfluorcarbonsäuren TFA, PFP und HFB verwendet. Durch Variation des Ionenpaarreagenzes, der Methanolkonzentration und der Säulentemperatur konnten sämtliche Trennprobleme für die quantitative Auswertung gut gelöst werden. Die Charakterisierung der semi-präparativ getrennten Reaktionsprodukte erfolgte durch Massenspektrometrie (FAB, ESI), NMR-Spektroskopie (^1H , ^{195}Pt , ^{15}N) und UV-Spektroskopie.

Das Koordinationsverhalten des monodentat bindenden $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ mit dem Pentapeptid $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metNHPH}$ ist im Vergleich zu den von FRÖHLING und WOLTERS untersuchten Peptiden hismetH , hisglymetH und achisglymetH sehr ähnlich. Bei pH-Werten um 3 wird fast ausschließlich das κS -Produkt gebildet. Am Schnittpunkt der Produktkurve des im physiologischen pH-Bereich dominierenden $\kappa\text{-N1}$ -Komplexes mit der des κS -Produktes bei $\text{pH} = 5,6$ liegt die binukleare $1\kappa\text{S}:2\kappa\text{N1}$ -Spezies mit maximaler Peakfläche vor. Die in Abb. 9.2 gezeigte zeitabhängige Produktverteilung verdeutlicht die Migration vom Schwefel zum thermodynamisch bevorzugten N1 Imidazolstickstoff über den 2:1 Übergangskomplex.

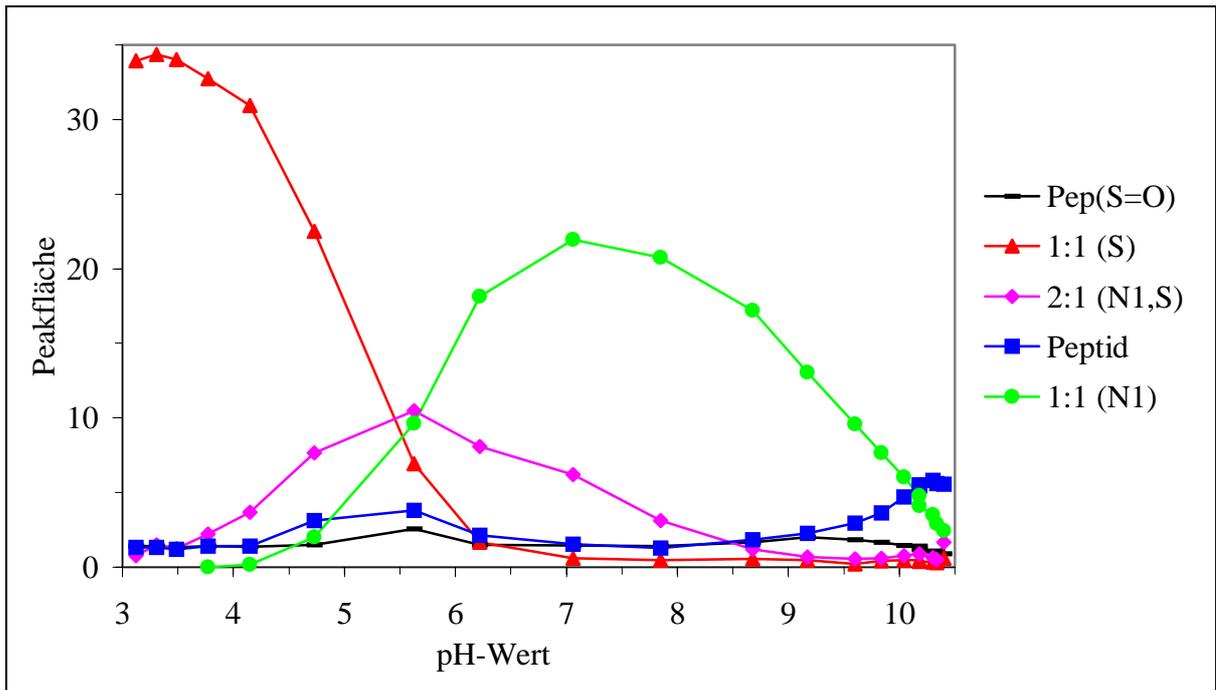


Abb. 9.1: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+} / achis(ala)_3metNHPH (1:1)$

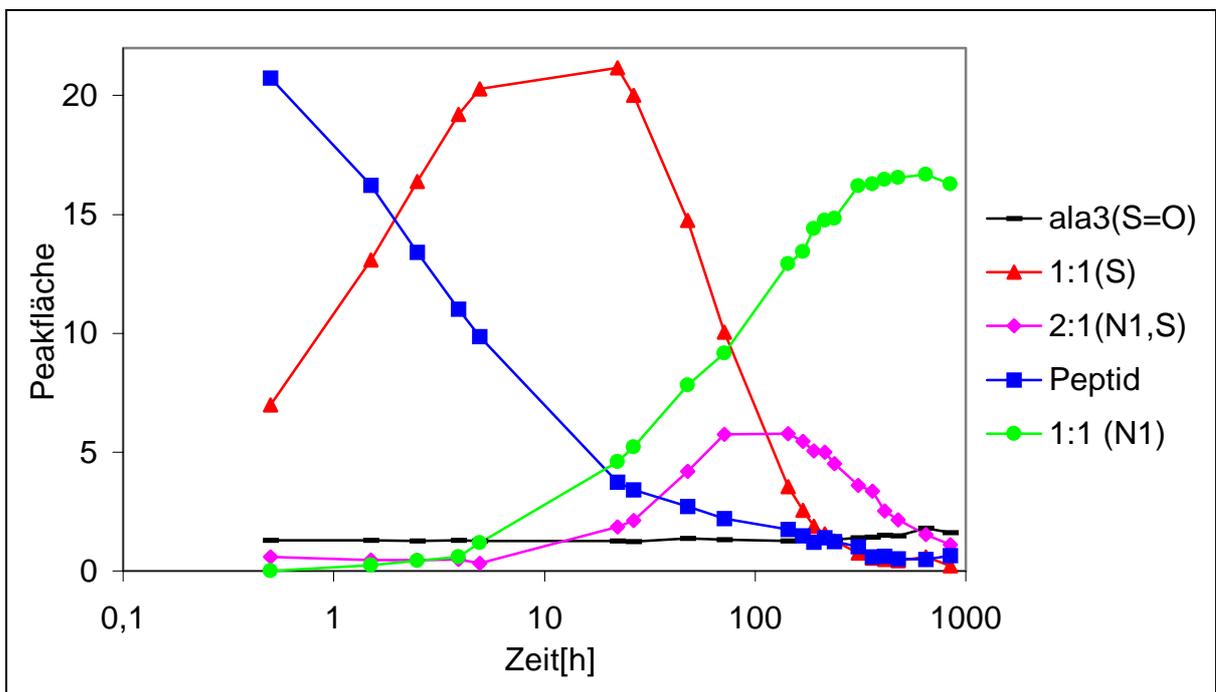


Abb. 9.2: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(dien)(H_2O)]^{2+} / achis(ala)_3metNHPH (1:1); pH = 8,0$

Im Reaktionsweg zum Imidazol N1 findet zuerst eine schnell Schwefelkoordination statt (Schritt a in Abb. 9.3), die von einer langsamen direkten intramolekularen Migration (Schritt b) zur Histidinseitenkette gefolgt ist. Alternativ kann die Koordination eines zweiten $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ -Fragmentes (Schritt c) über den 2:1 $\mu\text{-N1,S}$ Komplex, mit darauffolgender Spaltung (Schritt d) der instabileren Pt-S Bindung zum κN1 Endprodukt führen. Überraschend ist die eindeutig favorisierte Bildung des N1 gegenüber dem Imidazol N3 Stickstoff.

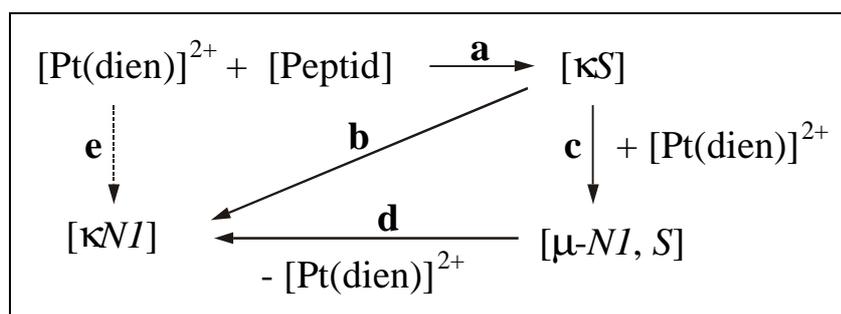


Abb. 9.3: Reaktionsweg der Bildung des Imidazol κN1 -koordiniertem $[\text{Pt}(\text{dien})]^{2+}$ Komplexes

Das Reaktionsverhalten der untersuchten histidin- und methioninhaltigen Peptide mit $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ zeigt die Bildung von nur drei Hauptprodukten. In allen drei Systemen bildet sich zuerst der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplex und anschließend die beiden $\kappa^2\text{-S,N1}$ - und $\kappa^2\text{-S,N3}$ -Spezies. Die zeitabhängigen Produktverteilungen der Peptide achis(ala)₂metNHPh und achis(ala)₃metNHPh besitzen im sauren pH-Bereich einen identischen Verlauf. Dagegen bildet sich mit dem C-terminal ungeschütztem achis(ala)₃metH das $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Produkt deutlich langsamer und durchläuft nach 24 h sein Maximum im Gegensatz zu 2 h bei den geschützten Peptiden. Daraus folgend ist in der pH-Verteilung in Abb. 9.4 der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat als Hauptprodukt zu finden, wogegen die beiden anderen zusätzlich C-geschützten Peptide nur die $\kappa^2\text{-S,N}_{\text{Imidazol}}$ -Makrochelate bilden. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten muss in Verbindung mit der sterisch anspruchsvollen NH-Phenyl Schutzgruppe stehen, die vor allem die Bildung des $\kappa^2\text{-S,O}$ -Vorläufers verhindert und zum anderen durch räumliche Anordnung zu einer bevorzugten Bildung der $\kappa^2\text{-S,N}_{\text{Imidazol}}$ -Komplexe führt. Kraftfeldberechnungen konnten die in wässriger Lösung vorliegende α -Helix-Konformation des Pentapeptides bestätigen. Hierbei zeigen sich kleinere S,N_{Imidazol}-Abstände gegenüber dem S,N_M-Abstand und liefern so eine Begründung für die Bevorzugung.

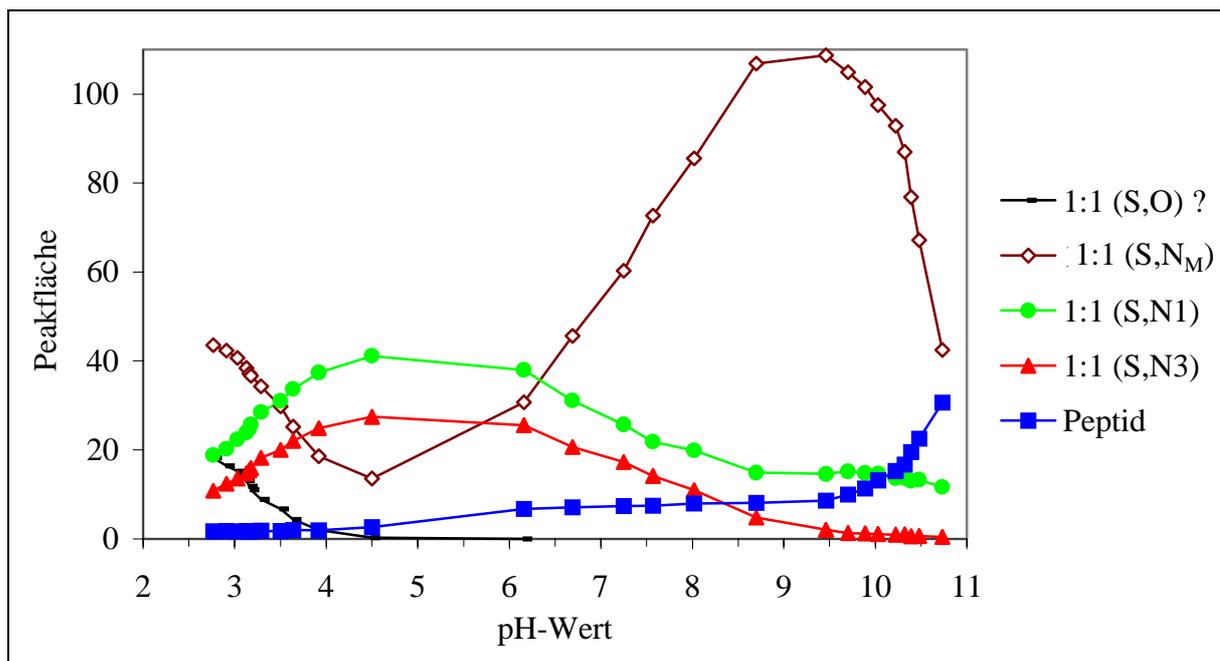


Abb. 9.4: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / achis(ala)_3methH$ (1:1)

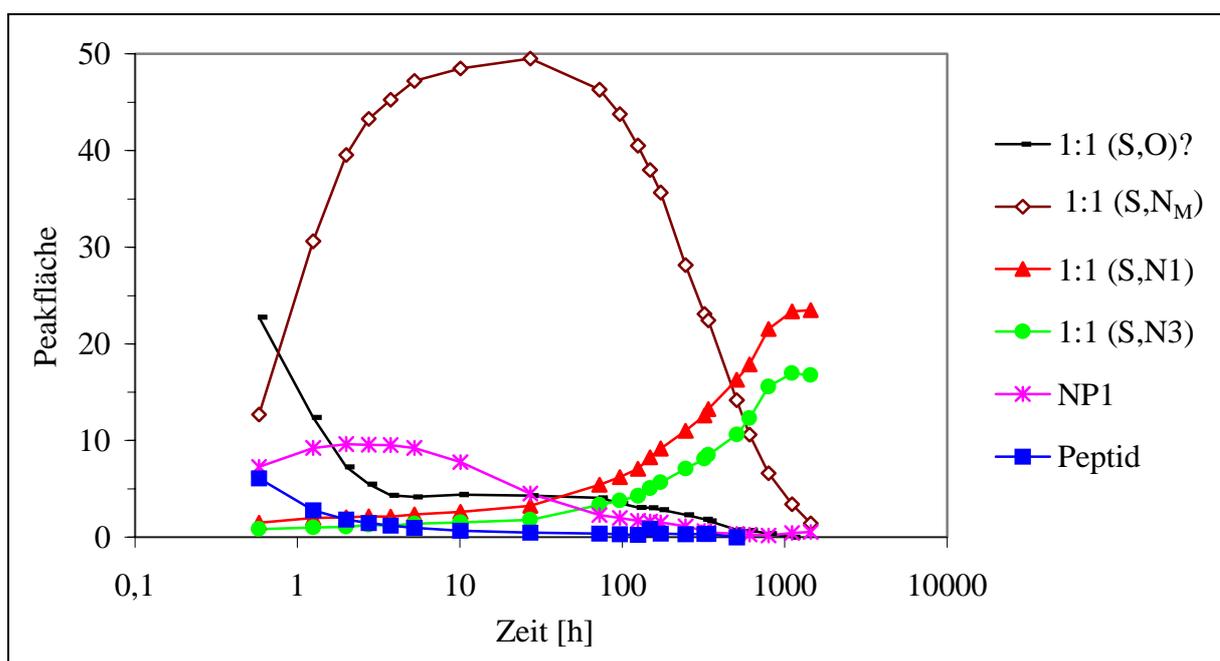


Abb. 9.5: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+} / achis(ala)_3methH$ (1:1); pH = 4,00

Die Ergebnisse des $acmet(ala)_3methH$ -Systems bestätigen zum einen die hohe Stabilität der Pt-S Bindung in saurer Lösung mit der Bildung des κ^2-S,S' -Komplexes und verdeutlichen zum anderen die kinetische Bevorzugung des weichen Schwefels gegenüber dem harten Stickstoff

im basischen pH-Bereich. Dort liegt nach einer Reaktionszeit von einer Woche der auf C-terminaler Seite entstandene sechsgliedrige κ^2 -S,N_M-Chelat als Hauptprodukt vor, der sich aufgrund des möglichen κ^2 -S,O-Vorläufers bevorzugt auf dieser Seite bildet.

In den Reaktionen von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit den schwefelhaltigen Peptiden führt der wegen des trans-Effektes des Schwefels begünstigte NH₃-Verlust zu einer größeren Produktanzahl. Im hisglymetH-System entsteht deshalb und aufgrund der N-terminal ungeschützten Aminogruppe über den gesamten pH-Bereich die tetradentate κ^4 S,N_M,N_G,N_H-Spezies. Im Sauren bei pH < 3 bilden sich als Hauptprodukte der tridentatkoordinierte κ^3 S,N₃,N_H-Komplex und auch das 1 κ^2 N_H,N₃:2 κ^2 S,N_M-Produkt mit einer 2:1 Stöchiometrie.

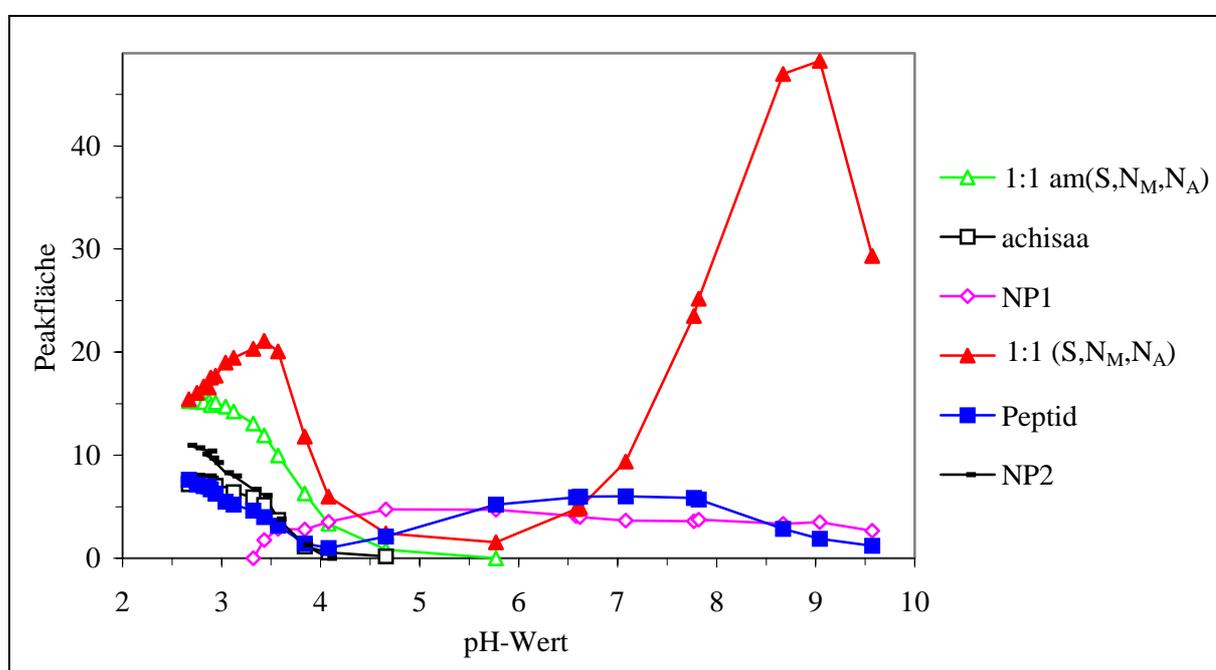


Abb. 9.6: pH-abhängige Produktverteilung des Systems *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] / *achis(ala)*₃*methH* (1:1)

Die Produktverteilungskurven aus den Reaktionen von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] mit *achisglymetH* und *achis(ala)*₃*methH* zeigen beide ab pH < 4 und ab pH > 7,5 das κ^3 S,N_M,N_{G/A} als Hauptprodukt. Im Bereich zwischen diesen pH-Werten bilden sich mehrere Produkte, die vermutlich κ^2 -S,N_{imidazol}-Koordinationen aufweisen. Im Sauren bei pH < 4 entstehen in beiden Systemen die tridentaten Spaltprodukte κ^3 S,N_M,N_{G/A} und *achisH* oder *achis(ala)*₂H.

Der Verlauf der Reaktionskinetik in Abb. 9.7 verdeutlicht die zuerst stattfindende Koordination des *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] am Schwefel des Methionins. Darauf bildet sich der

sechsgliedrige $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelatring, der einen Vorläufer des $\kappa^3\text{S,N}_M,\text{N}_A$ -Produktes darstellt. Die cisplatininduzierte Hydrolyse des tridentaten Komplexes beginnt nach einer Reaktionszeit von etwa 100 h und der zugehörige Mechanismus ist in Abb. 9.8 dargestellt. Sie ist nicht mit den von KOSTIC in Kapitel 3.6 erläuterten Mechanismen erklärbar. Durch die Bildung einer sehr stabilen $\kappa^3\text{S,N}_M,\text{N}_{G/A}$ -Koordination, findet als Folge des trans-Einflusses eine Polarisierung und nachfolgend die Spaltung der Peptidbindung bei $\text{pH} < 5$ statt.

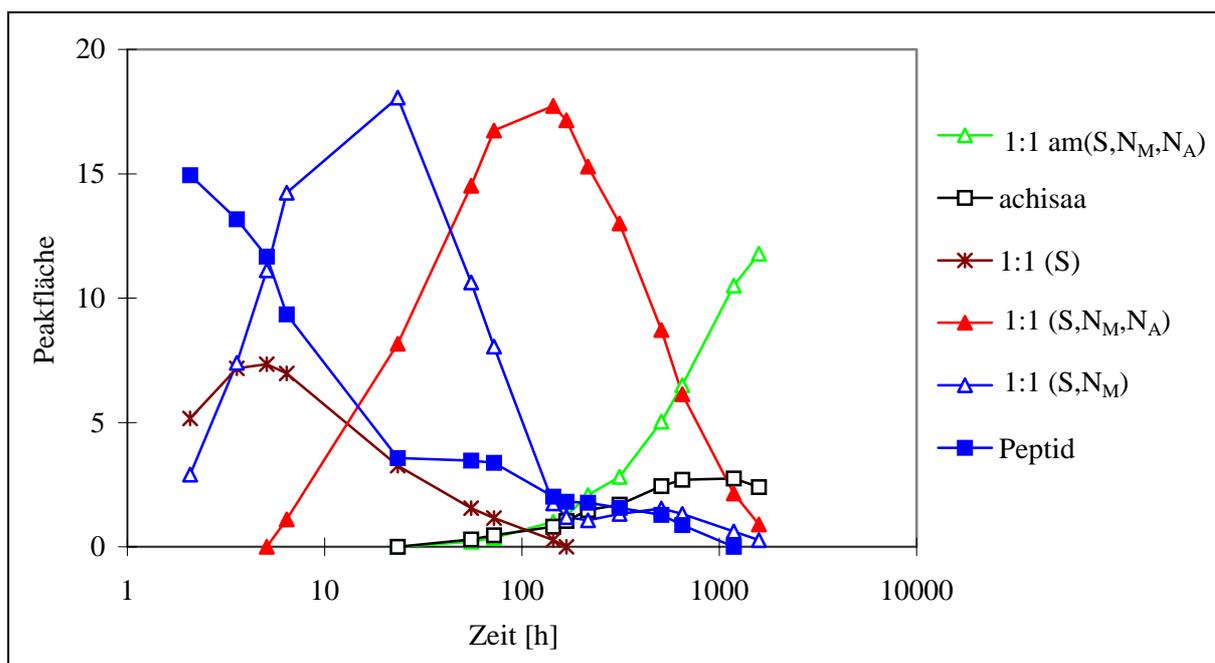


Abb. 9.7: Zeitabhängige Produktverteilung des Systems $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ / $\text{achis}(\text{ala})_3\text{methH}$ (1:1); $\text{pH} = 2,80$

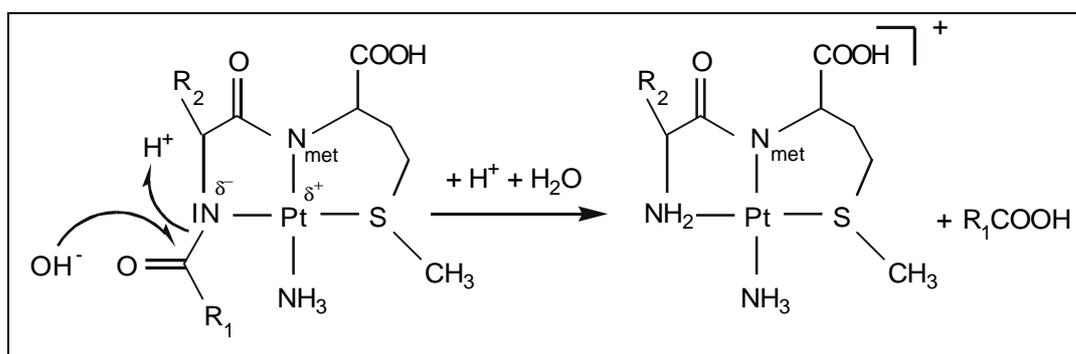


Abb. 9.8: Mechanismus der cisplatininduzierten Hydrolyse methioninhaltiger Peptide

- a) für $\text{achis}(\text{ala})_3\text{methH}$: $R_1 = \text{achis}(\text{ala})_2$ und $R_2 = \text{CH}_3$
 b) für achisglymethH : $R_1 = \text{achisH}$ und $R_2 = \text{H}$
 c) für glyglymethH : $R_1 = \text{glyH}$ und $R_2 = \text{H}$

Zusammenfassend können somit folgende allgemeinen Ergebnisse gewonnen werden:

- 1.) Die bei Di- und Tripeptiden für $\text{Pt}(\text{dien})^{2+}$ zu beobachtende Migration von S zu N1 ist auch bei der Trennung der funktionellen Gruppen durch 3 Alanineinheiten im $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metNHPH}$ möglich.
- 2.) Die Bildung von thermodynamisch stabilen $\kappa^2\text{-S,N1}$ und $\kappa^2\text{-S,N3}$ -Makrochelaten mit $\text{Pt}(\text{en})^{2+}$ erfolgt im ganzen pH-Bereich $3 \leq \text{pH} \leq 10$ wesentlich schneller für die C-geschützten Peptide $\text{achis}(\text{ala})_{2/3}\text{metNHPH}$, als für hisglymetH oder achisglymetH . Hauptursache dafür ist die beschleunigte direkte Bildung des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Vorläufers, der bei den nicht C-geschützten Peptiden erst langsam aus einem $\kappa^2\text{-S,O}$ -Komplex entsteht.
- 3.) Bei den Reaktionen des Chemotherapeutikums $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ mit methionin- und histidinhaltigen Peptiden bilden sich keine thermodynamisch stabilen $\kappa^2\text{-S,N}_{\text{Imidazol}}$ -Makrochelate als Endprodukte, wie sie mit der Modellverbindung $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ beobachtbar sind.
- 4.) Der in Abb. 9.9 dargestellte allgemeine Reaktionsweg von Cisplatin mit methioninhaltigen Peptiden konnte nachgewiesen werden. Hierbei entsteht zu Beginn rasch der monodentate $\kappa\text{-S}$ -Vorläufer, der dann das sechsgliedrige $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat bildet und zum tridentaten $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G/A}$ -Komplex weiterreagiert. Dieser und der bei der Reaktion mit dem ungeschütztem Peptid hisglymetH als Endprodukt entstehende $\kappa^4\text{-S,N}_M\text{,N}_G\text{,N}_H$ -Komplex reagieren nicht mit dem N7-Stickstoff des 9-Ethylguanins und führen somit zur Inhibierung des Cisplatins.

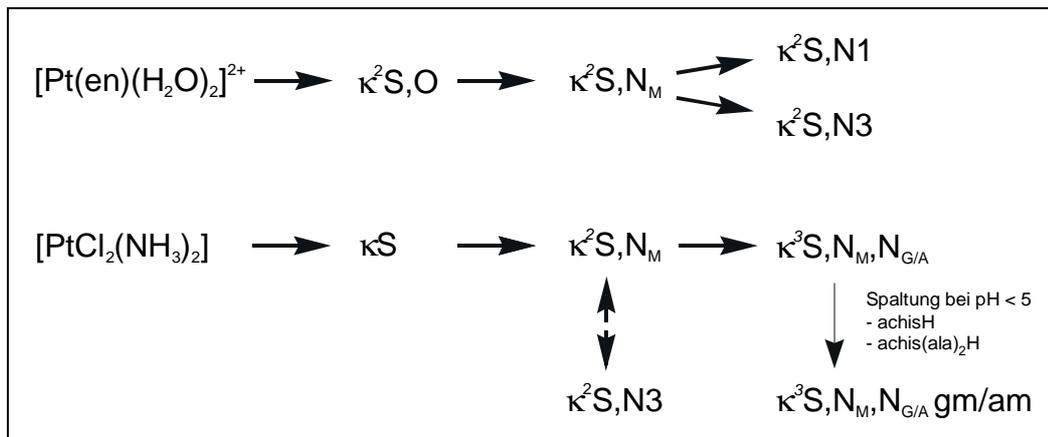


Abb. 9.9: Reaktionswege von $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ und $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit $\text{achis}(\text{gly})_{1/2}\text{metH}$ und $\text{achis}(\text{ala})_3\text{metH}$

- 5.) Die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen durch Cisplatin nach 100 h ab $\text{pH} < 5$ konnte für Peptide des Typs achis-(X)-metH gezeigt werden. Sie verläuft jedoch anders, als die bisher von KOSTIC in der Literatur postulierten Mechanismen für die saure ($\text{pH} \approx 2$) Spaltung von Peptiden durch PtCl_4^{2-} oder $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$.

10 Experimenteller Teil

10.1 Darstellung der Ausgangsverbindungen

10.1.1 Darstellung von [PtI(dien)]I

[PtI(dien)]I wurde nach der Literaturvorschrift von WATT und CUDE über die Zwischenstufe $\text{PtI}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ synthetisiert [168].

1) Darstellung von $\text{PtI}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Zu einer Lösung von 2,5 g (6,02 mmol) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ in 40 ml H_2O werden unter Rühren bei einer Temperatur von 90 °C 3,0 g (18 mmol) KI zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3,5 Stunden wird der ausgefallene schwarze Niederschlag mit einer D3-Fritte abgenutscht. Der erhaltene Niederschlag wird mehrmals mit kaltem H_2O und anschließend mit Methanol gewaschen und im Trockenschrank bei 80° C getrocknet.

Ausbeute: 2,6 g = 5,57 mmol = 92 % der Theorie

2) Darstellung von [PtI(dien)]I

Eine Lösung von 0,54 ml (4,8 mmol) Diethylentriamin (98 %, technisch) in 2 ml H_2O wird unter Rühren langsam in kleinen Portionen zu einer Suspension von 2,5 g (5,35 mmol) $\text{PtI}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 2,0 ml H_2O getropft. Nach einer Stunde wird das zähflüssige Gemisch langsam zur Trockene eingedampft und der verbleibende Rückstand mit ca. 100 ml H_2O bei 90° C extrahiert. Der unlösliche schwarze Rückstand wird abfiltriert und die gelbe Lösung wird im Eisbad gekühlt, worauf hellgelbe Kristalle abgenutscht werden können. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis keine Kristalle mehr ausfallen. Danach wird die Mutterlauge einige Male langsam im Vakuum eingeeengt, und abgekühlt bis sich keine gelbbraunen Kristalle mehr bilden. Die vereinigten Produktfraktionen werden mehrmals mit wenig kaltem H_2O gewaschen und anschließend bei 60° C im Trockenschrank getrocknet.

Die MIR- und FIR-Spektren zeigten eine gute Übereinstimmung mit denen der Literatur [125].

Ausbeute: 2,10 g = 3,8 mmol = 76 % der Theorie

10.1.2 Darstellung von $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$

Die Darstellung von $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ wurde nach HENEGHAN und BAILAR sowie BASOLO et al. durchgeführt [147].

Eine Lösung von 2,5 g (6,02 mmol) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ in 25 ml H_2O wird durch ein Eisbad auf ungefähr 5 °C abgekühlt, so dass gerade noch kein $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ ausfällt. Unter Rühren werden Portionsweise 300 µl einer Lösung bestehend aus 1 ml Ethylendiamin (98 %, technisch) und 2 ml H_2O zugegeben. Vor jeder erneuten Zugabe wird der ausgefallene zitronengelbe Niederschlag über eine D3-Fritte abgenutscht. Solange der Niederschlag seine zitronengelbe Farbe behält werden alle erhaltenen Fraktionen vereinigt und mit wenig eiskaltem H_2O , absolutem Methanol sowie getrocknetem Diethylether gewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Die Farbe des Niederschlages verändert sich nach etlichen Ethylendiaminzugaben zum Ockergelb. Die nachfolgende Fraktionen werden verworfen, weil im IR-Spektrum Verunreinigungen mit $[\text{Pt}(\text{en})_2][\text{PtCl}_4]$ nachzuweisen sind. Die Reinheit der zitronengelben Fraktion wurde mittels MIR- und FIR-Spektren durch Literaturvergleich bestätigt [169, 170].

Ausbeute: 1,52 g = 4,66 mmol = 77 %

10.1.3 Darstellung von cis -[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂]

Die Darstellung von cis -[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂] erfolgte nach der Literaturvorschrift von BOREHAM, BROOMHEAD und FAIRLIE [63].

1) Darstellung von [PtI₂(¹⁵NH₃)]

Zu einer Lösung von 1,7 g (4,09 mmol) K₂[PtCl₄] in 17 ml H₂O werden 30 ml einer gesättigten KI (2,82 g \equiv 17 mmol)-Lösung gegeben. Nach Erhitzen im Wasserbad für 5 min fällt dunkelbraunes K₂PtI₄ aus. Zu dieser Lösung wird 0,48 g (8,8 mmol) ¹⁵NH₄Cl in 8,7 ml 1M-KOH zugegeben und über einen Zeitraum von 30 min gerührt, bis sich dunkelgelbes [PtI₂(¹⁵NH₃)] bildet. Dieser Niederschlag wird mit einer D3-Fritte abgenutscht und mit heißem H₂O, Ethanol und Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 1,25 g = 2,6 mmol = 63 % der Theorie

2) Darstellung von cis -[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂]

1,25 g (2,6 mmol) [PtI₂(¹⁵NH₃)] werden in 15 ml H₂O mit 0,88 g (5,2 mmol) AgNO₃ versetzt und unter Lichtausschluss ca. 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der AgI- Niederschlag wird bei 4° C abzentrifugiert und die darrüberstehende Lösung vorsichtig abpepittiert. Die erhaltene klare Lösung wird nach der Zugabe von 0,41 g (5,5 mmol) KCl für 15 min im Wasserbad erhitzt und der entstehende gelbe Niederschlag nach Kühlung mit einem Eisbad über eine D3-Fritte abgenutscht. Das cis -[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂] wird mit wenig kaltem H₂O, Ethanol und Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Reinheit wird aus dem Vergleich der MIR- und FIR-Spektren des ¹⁵N-markiertem und nicht markiertem Cisplatins bestätigt.

Ausbeute: 0,65 g = 2,15 mmol = 82 % der Theorie

10.2 Darstellung der Aqua-Komplexe

- 1) 4 mM [Pt(dien)(H₂O)](NO₃)₂-Stammlösung für analytische Reaktionslösungen
552 mg (1 mmol) [PtI(dien)]I werden in 10 ml H₂O mit 333 mg (1,96 mmol) AgNO₃ versetzt und unter Lichtausschluss ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der AgI-Niederschlag wird bei 4 °C abzentrifugiert und die darrüberstehende Lösung vorsichtig abpipettiert. Der Niederschlag wird dreimal mit H₂O im Zentrifugenröhrchen gewaschen, um eine stöchiometrische Ausbeute zu erreichen. Die erhaltene klare Lösung wird mit H₂O auf 250 ml aufgefüllt.
- 2) 80 mM [Pt(dien)(D₂O)](NO₃)₂-Stammlösung für Mikro-Ansätze
220,8 mg (0,4 mmol) [PtI(dien)]I werden in einem Zentrifugenröhrchen in D₂O suspendiert, mit 133,2 mg (0,78 mmol) AgNO₃ versetzt und über Nacht gerührt. Der AgI-Niederschlag wird auch hier bei 4 °C abzentrifugiert und die darrüberstehende klare Lösung wird abpipettiert.
- 3) 15 mM [Pt(dien)(H₂O)](NO₃)₂-Stammlösung für semi-präparative Trennungen
Die Herstellung erfolgt in Analogie zu 1, jedoch werden 829,6 mg (1,5 mmol) und 496,9 mg (2,92 mmol) AgNO₃ benötigt, um 100 ml der 15 mM Stammlösung zu erhalten.
- 4) 4 mM [Pt(en)(H₂O)₂](NO₃)₂-Stammlösung für analytische Reaktionslösungen
Für 250 ml Stammlösung werden 326,1 mg (1 mmol) [PtCl₂(en)] und 331,3 mg (1,95 mmol) eingewogen und in 10 ml H₂O suspendiert. Die weitere Vorgehensweise ergibt sich aus 1.
- 5) 80 mM [Pt(en)(D₂O)₂](NO₃)₂-Stammlösung für Mikro-Ansätze
Die Herstellung dieser Lösung erfolgt in Analogie zu 2, mit der Ausnahme, dass 130,4 mg (0,4 mmol) [PtCl₂(en)] und 133,2 mg (0,78 mmol) AgNO₃ eingesetzt werden.
- 6) 15 mM [Pt(en)(H₂O)₂](NO₃)₂-Stammlösung für semi-präparative Trennungen
In Analogie zu 1 werden 489,2 mg (1,5 mmol) [PtCl₂(en)] und 496,9 mg (2,92 mmol) AgNO₃ für 100 ml Stammlösung verwendet.

10.3 Darstellung der Reaktionslösungen

10.3.1 Reaktionslösungen für die Chromatographie

Die Darstellung der analytischen Reaktionslösungen für die pH-abhängigen Untersuchungen und der Vergleichslösungen (0:2, 2:0, 1:1, 2:1) erfolgte volumetrisch. Es wurden je eingesetztem Äquivalent jeweils 2 ml 4mM-Platin- bzw. 4mM-Peptid-Stammlösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in einen 10 ml Messkolben überführt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden die erforderlichen Äquivalente an 0,1 M NaOH oder 0,1 M HNO₃ zupipettiert (-1 Ä entspricht 80 µl HNO₃ und +1Ä entspricht 80 µl NaOH). Der Messkolben wird mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt, so dass sich für 1 Äquivalent Platin- oder Peptidlösung eine Gesamtkonzentration von 0,8 mM ergibt. Die 0,8 mM Cisplatin-Reaktionslösungen wurden durch Einwaage von *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] und dem Peptid und anschließendem Lösen in bidestilliertem Wasser dargestellt. Die hergestellten Lösungen für die pH-abhängigen Versuchsreihen werden 3 Wochen im Trockenschrank bei 40°C getempert. Um über diesen langen Zeitraum eine Veränderung des pH-Werts durch CO₂ Eintrag in die Lösungen zu vermeiden, wurden diese direkt nach dem Ansetzen in gut abdichtende Schraubdeckelgläschen überführt. Unmittelbar nach der angegebenen Zeit wurden diese Lösungen chromatographiert und ihre pH-Werte gemessen. Hierzu wurde eine handelsübliche Glaselektrode, die mit NBS-Puffern bei pH = 7,00 und pH = 4,008 kalibriert wurde, verwendet. Die Ansätze für die kinetischen Untersuchungen werden über die gesamte Zeitspanne bei 40° C getempert.

10.3.2 Reaktionslösungen für die semi-präparative Ansätze

Für die semi-präparativen Lösungen wurden 20 ml der 15 mM Platinstammlösung vorgelegt und die entsprechenden Mengen Peptid zugegeben. Die Lösung wurde stets auf 50 ml aufgefüllt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Cisplatin wurden bei diesen Ansätzen 100 ml mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 0,1 M HNO₃ bzw. 0,1 M NaOH. Die hergestellten Lösungen wurden bei 40° C für 3 Wochen

inkubiert. Danach wurden die Reaktionslösungen bis auf ein Volumen von ungefähr 3 ml eingengt, zentrifugiert und anschließend mit H₂O auf 7 ml aufgefüllt. Mit dem geeigneten Eluenten wurden jeweils 0,7 ml Portionen des semi-präparativen Ansatzes mit Hilfe der RPIP-Chromatographie getrennt.

Das während einer semi-präparativen Trennung anfallende Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei 45°C abgezogen. Der erhaltene zähflüssige Rückstand wird im Ölpumpenvakuum weiter getrocknet und anschließend mit getrocknetem Diethylether verrieben. Nachdem der Diethylether abgezogen wurde, wird dieser Vorgang solange wiederholt, bis ein pulverförmiges Produkt erhalten wird.

10.3.3 Mikroansätze

Die Mikroansätze (0,7 ml) wurden unter Verwendung der 80 mM Platin- und Peptid-Stammlösungen und den erforderlichen Äquivalenten an 1 M DNO₃ oder 1 M NaOD dargestellt und anschließend bei 40 °C im Trockenschrank für 3 Wochen inkubiert. Aufgrund der geringen Löslichkeit wurden die Mikroansätze mit Cisplatin als 10 mM-Reaktionslösungen hergestellt. Als Standard für die NMR-Messungen wurde TSP hinzugegeben. Die pH-Werte der D₂O-Lösungen wurden direkt in dem 5 mm NMR-Röhrchen mit einer Hamilton Spintrode (Schaftlänge 180 mm) gemessen. Um Produktveränderungen zwischen den einzelnen NMR-Messungen zu vermeiden, wurden die Proben eingefroren gelagert. Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden die NMR-Lösungen einrotiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

10.4 Chromatographisches System

10.4.1 Chromatographische Bedingungen

Der Fluss der mobilen Phase wurde mit 1 ml·min⁻¹ bei allen Messungen konstant gehalten. Die Detektorwellenlänge betrug 220 nm und der pH-Wert des Eluenten lag immer bei pH = 2,1 ± 0,1, bedingt durch die Konzentration des IPRs von 9,52 mM. Die computergesteuerte

Datenaufnahme erfolgte unter Verwendung der Eurochrom Integration Package (Version 1.5) incl. 20 Bit AD-Wandler der Firma Knauer mit einer Datensammelrate von 1 Hz. Das Detektorsignal wurde mit 1V/AU abgegriffen.

Das Volumen der Probenschleife betrug bei allen analytischen Messungen 20 μ l und bei den semi-präparativen 2 ml. Die Herstellung der Eluenten erfolgte durch Mischung der jeweiligen Volumenteile an organischem Modifier und bidestilliertem Wasser. Der Anteil des Ionenpaarreagenzes, welches zuletzt zugesetzt wurde, ist dabei vernachlässigt. Vor der Verwendung wurden die Eluenten ca. 10 min im Ultraschallbad entgast.

Die Trennsäule wurden jeden Tag vor Gebrauch mit 15 ml Wasser vorgespült und dann mindestens 30 min lang der gewünschte Eluent durch die Säule gepumpt, bis die Grundlinie stabil war. Nach jeder Säulenbenutzung wurde mit 15 ml Wasser und 60 ml Methanol das Ionenpaarreagenz von der Säule gespült.

10.4.2 Chromatographische Säulen

Für die chromatographischen Untersuchungen wurden die analytische Trennsäulen selbst gepackt. Hierzu wurden Edelstahl-Leerrohre mit einem Innendurchmesser von $d_c = 4$ mm und einer Länge von 250 mm mit Nucleosil 100-C₁₈ (endcapped, $d_p = 5$ mm) der Firma Machery & Nagel mit einer modifizierten Viskositätsmethode gepackt [171]. Die Füllapparatur bestand aus einer gasbetriebenen Verstärkerpumpe (Haskel Engineering & Supply Co, Modell MCP-110) und ein Füllrohr mit 4 mm Adapter. Präparative Säulen wurden von Herrn Dr. Scheidt vom Lehrstuhl für Organische Chemie II der Ruhr-Universität-Bochum mit Nucleosil 100-C₁₈ Material (endcapped) mit einem Teilchendurchmesser von 10 μm gepackt.

Die verwendeten Säulen wurden sofort nach der Herstellung mit zwei für die RP-Chromatographie entwickelten Testgemischen überprüft [127, 172]. Die nachfolgende Tabelle enthält die Zusammensetzung der Testgemische und Testeluenten.

Tab. 10.1: Zusammensetzung der Testgemische und Testeluenten

	Testgemisch 1	Testgemisch 2
Komponenten	Uracil	Aceton
	Acetophenon	Phenol
	Benzol	p-Kresol
	Toluol	2.5-Xylenol
		Phenetol
Lösungsmittel des Testgemisches	60 % (v) CH ₃ OH 40 % (v) H ₂ O	80 % (v) CH ₃ OH 20 % (v) H ₂ O
Zusammensetzung des Testeluenten	66 % (v) CH ₃ OH 34 % (v) H ₂ O	63 % (v) CH ₃ OH 37 % (v) H ₂ O

Der Fluss betrug dabei $F = 0,7$ ml/min und die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Als Ergebnis der Säulentests konnten für die Säulen bei symmetrischer Peakform Bödenzahlen von 40000 m^{-1} bis 60000 m^{-1} ermittelt werden.

Das Totvolumen der analytischen Trennsäulen wurde durch Auswertung von Dispersionspeaks von Wasser und Methanol mit einem Eluenten aus 66 % MeOH/ 34 % H₂O

bestimmt. Außerdem erfolgte die Bestimmung durch Injektion von 20 µl einer 10 mM Lösung von NaNO₃ in H₂O unter Verwendung eines Eluentengemisches aus 50 % MeOH und 50 % 0,1 M Phosphatpuffer in H₂O (v/v). Dieser Puffer wurde aus gleichen Volumina 0,1 M NaH₂PO₄ und 0,1 M Na₂HPO₄ Lösungen hergestellt.

Die Totvolumenbestimmung erfolgte jeweils bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm und einem Fluss der mobilen Phase von 0,7 ml·min⁻¹.

Die Werte für das gemittelte Totvolumen der verwendeten Säulen liegen bei 2,26 ± 0,1 ml.

10.4.3 Verwendete Chromatographen

Für die analytischen Trennungen standen drei Hochleistungs-Flüssigchromatographen zur Verfügung.

- 1) Der erster Chromatograph setzt sich aus einer HPLC-Gradientenpumpe vom Typ LiChroGraph L-6200 und einem LiChroGraph UV/VIS-Detektor L-4250 der Firma Merck zusammen. Die Detektorzelle hat einen optischen Lichtweg von 5 mm. Das Injektionssystem besteht aus einem 6-Wege Injektionsventil der Firma Rheodyne (Modell 7125) in Verbindung mit einer 20 µl Probenschleife. Mit dieser Anlage wurden die in der Arbeit dargestellten UV-Spektren bei gestopptem Eluentenfluss aufgenommen.
- 2) Als zweiter Chromatograph wurde eine LaChrom Anlage der Firma Merck eingesetzt, bestehend aus einer ternären HPLC-Gradientenpumpe L-7100, einem UV-Detektor L-7400 und einem Säulenthermostaten L-7360. Das Injektionssystem besteht aus einem 6-Wege Injektionsventil der Firma Rheodyne (Modell 7125) in Verbindung mit einer 20 µl Probenschleife.
- 3) Der dritte Chromatograph besteht aus einer Knauer HPLC-Pumpe vom Typ 64, einem Knauer Injektionsventil A0258 mit 20 µl Dosierschleife und einem Merck L-4000A UV-Detektor, der mit dergleichen Detektorzelle ausgestattet ist.

Für die semi-präparativen Trennungen wurde in Apparatur 3 ein präparativer Pumpenkopf, eine Detektorzelle mit 2 mm Lichtweg, und eine 2 ml Probenschleife verwendet. Die semi-präparativen Säulen bestehen aus Edelstahlrohren mit einer Länge von $L_c = 25$ cm und einem Innendurchmesser von $d_c = 20$ mm sowie Reduzierschraubungen mit integrierten Edelstahlfritten.

10.5 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der 400 MHz FT-NMR-Spektren wurde an einem DRX 400 Spektrometer der Firma Bruker bei $\nu = 400,13$ MHz von Herrn Gartmann und Herrn Barchan von der SC-Abteilung der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. 80 MHz-Spektren wurden an einem Bruker WP 80 FT-NMR Spektrometer aufgenommen. Mit einem WP 100 FT-NMR Spektrometer wurden die 100 MHz Spektren gemessen. Als Lösungsmittel diente in allen Fällen D_2O , dem als Frequenzstandard Natrium-3-(trimethylsilyl)propionat- D_4 (TSP) [$\delta = 0,0$] zugesetzt wurde. Alle Messungen wurden in 5 mm Probenröhrchen bei Raumtemperatur ($25^\circ C$) durchgeführt. ^{195}Pt -Spektren nahmen Herr Gartmann und Herr Barchan mit einem DRX-400 Spektrometer bei $\nu = 85,74$ MHz und einer spektralen Breite von 129 kHz auf. Als externer Frequenzstandard für diese Messungen diente eine an $K_2[PtCl_4]$ gesättigte 1 M NaCl-Lösung mit $\delta = -1628$. Die ^{15}N -Spektren wurden ebenfalls am DRX-400 Spektrometer bei $\nu = 40,55$ MHz und einer spektralen Breite von 4 kHz mit einem 1M $^{15}NH_4Cl$ Standard aufgenommen. Für die Bearbeitung und Auswertung der Spektren wurde das Programm Win-NMR 6.0 von Bruker benutzt.

10.6 Massenspektrometrie

Die FAB-Massenspektren wurden von Herrn Dr. Müller von der SC-Abteilung der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum an einem VG Autospec Massenspektrometer der Firma Fisons unter Verwendung von 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix aufgenommen. ESI-MS und HPLC/ESI-MS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Nigge am Institut für

Spektroskopie und Angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund angefertigt. Hierfür standen ein doppelt-fokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 und ein Ionenfallen-MS (Ion Trap) der Firma Finnigan MAT zur Verfügung.

10.7 IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der FTIR-Spektren der dargestellten Ausgangsverbindungen erfolgte mit dem MIR-Spektrometer 1760 X und dem FIR-Spektrometer 1700 X der Firma Perkin-Elmer als KBr- bzw. CsI-Pressling. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms Spectrum for Windows V 1.5 von Perkin-Elmer.

10.8 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden mit einem CD-Spektrometer J-715 der Firma Jasco, am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen an der Ruhr-Universität Bochum, aufgenommen. Die Messungen wurden bei 20°C mit Küvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt, nachdem die Probenkammer 20 min mit N₂ gespült wurde.

10.9 Sonstiges

Die Peptide Ac-Met-(Ala)₃-Met-OH, H-His-Gly-Met-OH, Ac-His-Gly-Met-OH und Ac-His-(Ala)₃-Met-OH wurden von Herrn Dr. Kalbacher am Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum der Universität Tübingen synthetisiert. Die beiden Peptide Ac-His-(Ala)₂-Met-NH-Ph und Ac-His-(Ala)₃-Met-NH-Ph wurden von Herrn Hulsbergen an der Universität in Leiden hergestellt. Das K₂[PtCl₄] stammt aus einer Spende der Firma Degussa und das verwendete Cisplatin wurde von der Firma Chempur erworben. Das für die Chromatographie

benötigte Wasser wurde mit einer Bidestillationsanlage der Firma Köttermann aufgereinigt. Für die Inkubation der Reaktionslösungen wurde ein Brutschrank T6120 von Heraeus genutzt. Die Kraftfeldberechnungen erfolgten sowohl mit dem Programm HyperChem Version 5.01, als auch mit dem Programm MACROMODEL.

Die in dieser Arbeit angegebenen pH-Werte sind für den Isotopeneffekt des Deuteriums unkorrigiert und müssen für Vergleiche um +0,41 pH-Einheiten erhöht werden [173].

11 Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, 1995, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- [2] Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*, 1999, **111**, 1610-1630
- [3] J. Reedijk, *Chimia*, 1997, **51**, 21 -23
- [4] P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure & Appl. Chem.*, 1998, **80(4)**, 863-871
- [5] M. Peyrone, *Liebigs Ann. Chem.*, 1844, **51**, 1
- [6] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698
- [7] B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385
- [8] E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2451-2466
- [9] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467-2498
- [10] J. Reedijk, *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.*, 1996, 801-806
- [11] M. C. Christian, *Seminars in Oncology*, 1992, **19**, 720-733
- [12] R. B. Weiss, M. C. Christian, *Drugs*, 1993, **46**, 306-377
- [13] B. Kutscher, J.-P. Wulf, E. Günther, 1995, *Bioforum*, **11**, 458-463
- [14] A. Pasini, F. Zunino, *Angew. Chem.*, 1987, **99**, 632-641
- [15] Y. Chen, Z. Guo, J. A. Parkinson, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. , Dalton Trans.*, 1998, 3577-3585
- [16] Y. Chen, J. A. Parkinson, Z. Guo, T. Brown, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*, 1999, **111(13/14)**, 2192-2196
- [17] K. Lemma, J. Berglund, N. Farrell, L. I. Elding, *JBIC*, 2000, **5**, 300-306
- [18] R. M. Orr, C. F. O'Neil, M. C. Nicolson, C. F. J. Barnard, B. A. Murrer, C. M. Giandomenico, F. K. Vollano, R. Harrap, *Br. J. Cancer*, 1994, **70**, 415
- [19] Y. Chen, M. J. Heeg, P. G. Braunschweiger, W. Xie, P. G. Wang, *Angew. Chem.*, 1999, **111**, 1882-1884
- [20] N. A. Kratochwil, J. A. Parkinson, P. J. Bednarski, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*, 1999, **111**, 1566-1569
- [21] N. A. Kratochwil, Z. Guo, P. del Socorro Murdoch, J. A. Parkinson, P. J. Bednarski, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8253-8254

- [22] N. Farrell, *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 1989, Chapters 2 and 3
- [23] U. Bierbach, N. Farrell, *JBIC*, 1998, **3**, 570-580
- [24] U. Bierbach, Y. Qu, T. W. Hambley, J. Peroutka, H. L. Nguyen, M. Doedee, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 3535-3542
- [25] V. Brabec, K. Nepelchowa, J. Kasparkova, N. Farrell, *JBIC*, 2000, **5**, 364-368
- [26] J. Reedijk in: S. B. Howell (Ed.), *Platinum and Other Metall Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, 1991, Plenum Press, New York
- [27] J.-M. Teuben, M. R. i Zubiri, J. Reedijk, *J. Chem. Soc. , Dalton Trans.*, 2000, 369-372
- [28] F. Legendre, V. Bas, J. Kozelka, J.-C. Chottard, *Chem. Eur. J.*, 2000, **6**, 2002-2010
- [29] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry*, 1985, **22**, 707-713
- [30] A. M. J. Fichtinger-Schepman, A. T. van Oosterom, P. H. M Lohman, F. Berends, *Cancer Research*, 1987, **47**, 3000-3004
- [31] A. Eastman, *Pharmac. Ther.*, 1987, **34**, 155
- [32] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Nature*, 1995, **377**, 649
- [33] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12309
- [34] D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, A.H.-J. Wang, *Biochemistry*, 1995, **34**, 12912
- [35] A. Gelasco, S. J. Lippard, *Biochemistry*, 1998, **37**, 9230
- [36] S. U. Dunham, C. J. Turner, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5395
- [37] D. B. Zamble, S. J. Lippard in: B. Lippert (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, 1999, Wiley VCH, Weinheim
- [38] C. S. Chow, J. P. Whitehead, S. J. Lippard, *Biochemistry*, 1994, **33**, 15124-15130
- [39] U.-M. Ohndorf, M. A. Rould, Q. He, C. O. Pabo, S. J. Lippard, *Nature*, 1999, **399**, 708-712
- [40] M. Crul, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, M. Maliepaard, *Cancer Treatment Reviews*, 1997, **23**, 341-366
- [41] C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta, S. A. Slyter, *Anal. Biochem.*, 1983, **130**, 203
- [42] J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499-2510

- [43] J. Reedijk, J. M. Teuben in: B. Lippert (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, 1999, Wiley VCH, Weinheim
- [44] B. L. Bodenner, P. C. Dedon, P. C. Keng, R. F. Borch, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 2745
- [45] R. F. Borch, M. E. Pleasants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 6611
- [46] B. L. Bodenner, P. C. Dedon, P. C. Keng, R. F. Borch, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 2751
- [47] K. J. Barnham, M. I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 721-722
- [48] K. J. Barnham, M. I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1065-1072
- [49] J. E. Melvik, E. O. Petterson, *Inorganica Chimica Acta*, 1987, **137**, 115-118
- [50] K. C. M. Campbell, R. P. Meech, L. P. Rybak, L. F. Hughes, *Hearing Research*, 1999, **138**, 13-28
- [51] R. Kröning, A. K. Lichtenstein, G. T. Nagami, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, **45**, 43-49
- [52] J. D. Bell, R. E. Norman, P. J. Sadler, *J. Inorg. Biochem.*, 1985, **31**, 241
- [53] R. E. Norman, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 3583-3587
- [54] I. M. Ismail, P. J. Sadler in: S. J. Lippard(Ed.), *Platinum, Gold and Other Metal Chemotherapeutic Agents*, ACS Symposium Series 209, 1983, American Chemical Society, Washington D. C.
- [55] R. N. Bose, S. Moghaddas, E. L. Weaver, E. H. Cox, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 5878
- [56] F. D. Rochon, R. Melanson, A. Morneau, *Magn. Reson. Chem.*, 1992, **30**, 697
- [57] A. F. M. Siebert, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 1995
- [58] M. C. Lim, R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1976, **38**, 1911
- [59] R. F. Coley, D. S. Martin Jr., *Inorg. Chim. Acta*, 1973, **7**, 573
- [60] C. J. Abraham, K. J. Gerard, D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1993, **209**, 119
- [61] P. J. Bednarski, B. Trümbach, *Trans. Metal Chem.*, 1994, **19**, 513
- [62] S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chimica Acta*, 1991, **187**, 125-132
- [63] C. J. Boreham, J. A. Broomhead, D. P. Fairlie, *Aust. J. Chem.*, 1981, **34**, 659-664
- [64] R. B. Martin in: S. J. Lippard(Ed.), *Platinum, Gold and Other Metal Chemotherapeutic Agents*, ACS Symposium Series 209, 1983, American Chemical Society, Washington D. C.

- [65] O. Heudi, A. Cailleux, P. Allain, *J. of Inorg. Biochem.*, 1998, **71**, 61-69
- [66] R. N. Bose, S. K. Ghosh, S. Moghaddas, *J. of Inorg. Biochem.*, 1997, **65**, 199-205
- [67] S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chimica Acta*, 1990, **173**, 53-60
- [68] F. Legendre, V. Bas, J. Kozelka, J.-C. Chottard, *Chem. Eur. J.*, 2000, **6**, 2002-2010
- [69] M. Iwamoto, S. Mukundan Jr., L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6238
- [70] A. F. M. Siebert, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 385-393
- [71] C. D. W. Fröhling, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 1997
- [72] C. D. W. Fröhling, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 4411-4420
- [73] D. Wolters, Dissertation, Ruhr-Universität-Bochum, 1998
- [74] D. Wolters, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 1121-1129
- [75] M. Hahn, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1997
- [76] G. Kubella, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1998
- [77] T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph, *Aust. J. Chem.*, 1986, **39**, 1347-1362
- [78] T. G. Appleton, J. R. Hall, P. D. Prenzler, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 815-819
- [79] T. G. Appleton, J. R. Hall, D. W. Neale, C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 3985-3990
- [80] T. G. Appleton, J. R. Hall, T. W. Hambley, P. D. Prenzler, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 3562-3569
- [81] T. G. Appleton, J. R. Hall, P. D. Prenzler, F. B. Ross in: S. B. Howell (Ed.), *Platinum and Other Metall Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, 1991, Plenum Press, New York
- [82] T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **166**, 313-359
- [83] T. G. Appleton, F. B. Ross, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **252**, 79-89
- [84] P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190-192**, 171-184
- [85] M. Beltrán, G. B. Onoa, E. Pedroso, V. Moreno, A. Grandas, *JBIC*, 1999, **4**, 701-707
- [86] M. El-Khateeb, T. G. Appleton, L. R. Gahan, B. G. Charles, S. J. Berner-Price, A.-M. Bolton, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 13-21
- [87] R. E. Norman, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 877-888
- [88] P. del Socorro Murdoch, J. D. Ranford, P. J. Sadler, S. J. Berners-Price, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2249-2255

- [89] C. Wilson, M. L. Scudder, T. W. Hambley, H. C. Freeman, *Acta Cryst.*, 1992, **C48**, 1012-1015
- [90] M. Kleine, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 2000
- [91] E. L. M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 1880-1888
- [92] S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1397-1398
- [93] J.-M. Teuben, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 3979-3980
- [94] S. S. G. E. van Boom, B. W. Chen, J. M. Teuben, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1450-1455
- [95] J. M. Teuben, J. Reedijk, *JBIC, Chem.*, 2000, **5**, 463-468
- [96] P. del Socorro Murdoch, Z. Guo, J. A. Parkinson, P. J. Sadler, *JBIC*, 1999, **4**, 32-38
- [97] D. Wolters, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1995
- [98] C. D. W. Fröhling, W. S. Sheldrick, *Chem. Comm.*, 1997, 1737-1738
- [99] M. Hahn, D. Wolters, W. S. Sheldrick, F. B. Hulsbergen, J. Reedijk, *JBIC*, 1999, **4**, 412-420
- [100] W. C. Cole, W. Wolf, *Chem. Biol. Interact.*, 1980, **30**, 223
- [101] A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler, *J. of Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721-14730
- [102] M. C. Cox, K. J. Barnham, T. A. Frenkiel, J. D. Hoeschele, A. B. Mason, Q.-Y. He, R. C. Woodworth, P. J. Sadler, *JBIC*, 1999, **4**, 621-631
- [103] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozlowski, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 141-146
- [104] S. J. Berner-Price, T. A. Renkiel, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1992, 2137-2139
- [105] K. J. Barnham, M. I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1995, 3721-3726
- [106] K. J. Barnham, Z. Guo, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2867-2876
- [107] A. Zenker, M. Galanski, T. L. Bereuter, B. K. Keppler, W. Lindner, *JBIC*, 2000, **5**, 498-504
- [108] A. Zenker, M. Galanski, T. L. Bereuter, B. K. Keppler, W. Lindner, *J. of Chromatographia B*, 2000, **745**, 211-219

- [109] L. R. Croft, *Handbook of Protein Sequence Analysis*, 2nd edn., 1980, Wiley, Chichester
- [110] T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 51-58
- [111] S. U. Milinkovic, T. N. Parac, M. I. Djuran, N. M. Kostic, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2771-2776
- [112] T. Parac, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 2141-2144
- [113] L. Zhu, L. Qin, T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 5218-5224
- [114] T. N. Parac, G. M. Ullmann, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3127-3135
- [115] T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 5946-5951
- [116] M. I. Djuran, S. U. Milinkovic, *Monatshefte für Chemie*, 1999, **130**, 613-622
- [117] M. I. Djuran, S. U. Milinkovic, *Polyhedron*, 1999, **18**, 3611-3616
- [118] I. E. Burgeson, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 4299
- [119] L. Zhu, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3994-4001
- [120] L. Zhu, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, **115**, 4566-4570
- [121] L. Zhu, N. M. Kostic, *Inorg. Chim. Acta*, 1994, **217**, 21-28
- [122] E. N. Korneeva, M. V. Ovchinnikov, N. M. Kostic, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **243**, 9-13
- [123] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N. M. Kostic, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2653-2658
- [124] X. Chen, L. Zhu, X. You, N. M. Kostic, *JBIC*, 1998, **3**, 1-8
- [125] A. Kahmann, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 1994
- [126] W. S. Hancock (Ed.), *CRC Handbook of HPLC Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 1, 7. ed., 1990, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor
- [127] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*, 7. Aufl., 1992, Salle Sauerländer, Frankfurt, Aarau
- [128] W. R. Melander, C. Horvath in M. T. W. Hearn (Ed.), *Ion-Pair Chromatography*, Chromatographic science series, Vol. 31, 1985, Marcel Dekker, New York, Basel
- [129] B. A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, **18**, 525.
- [130] B. A. Bidlingmeyer, S. N. Deming, W. P. Price Jr, B. Sachok, M. Petrusek, *J. Chromatogr.*, 1979, **186**, 419.
- [131] J. L. van der Veer, H. van den Elst, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1987, **26**, 1536
- [132] J. Arpalahti, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **138**, 171

- [133] M. El-Khateeb, T. G. Appleton, B. G. Charles, L. R. Gagan, *J. of Pharamc. Sciences*, 1999, **88**, 319-326
- [134] W. A. J. de Waal, F. J. M. J. Maessen, J. C. Kraak, *Journal of Chromatography*, 1987, **407**, 253-272
- [135] O. Heudi, A. Cailleux, P. Allain, *Chromatographia*, 1997, **44**, 19-24
- [136] A. F. M. Siebert, C. D. W. Fröhling, W. S. Sheldrick, *Journal of Chromatographia A.*, 1997, **761**, 115-127
- [137] G. Párraga, S. J. Horvath, A. Eisen, W. E. Taylor, L. Hood, E. T. Young, R. E. Klevit, *Science*, 1988, **241**, 1489
- [138] J. P. Schneider, J. W. Kelly, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 2169
- [139] M. R. Ghadiri, M. A. Case, *Angew. Chem.*, 1993, **105(11)**, 1963
- [140] M. R. Ghadiri, C. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1630
- [141] F. H. Arnold, B. L. Haymore, *Science*, 1991, **252**, 1796
- [142] A. Chakrabartty, J. Schellman, R. L. Baldwin, *Nature*, 1991, **351**, 586
- [143] J. M. Scholtz, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1992, **21**, 95
- [144] A. Chakrabartty, T. Kortemme, R. L. Baldwin, *Protein Science*, 1994, **3**, 843
- [145] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry*, 1969, **8(10)**, 4108
- [146] G. Winkler, P. Briza, C. Kunz, *J. Chromatogr.*, 1986, **361**, 191
- [147] L. F. Heneghan, J. C. Bailar Jr., *J. Am Chem. Soc.*, 1953, **75**, 1840
- [148] Z. Li, S. C. Rutan, S. Dong, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 124
- [149] U. Belluco, R. Ettore, F. Basolo, R. G. Pearson, A. Turco, *Inorg. Chem.*, 1966, **5**, 591
- [150] T. G. Appleton, F. J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 4410-4419
- [151] M. F. Mogilevkina, M. V. Sekacheva, I. M. Cheremisina, E. A. Galtsova, *Russ. J. Inorg. Chem.*, 1976, **21**, 77
- [152] J. B. Ghaim, D. P. Greiner, D. F. Meares, R. B. Gennis, *Biochemistry* 1995, **34**, 11311
- [153] M. M. Muir, M. E. Cadiz, A. Baez, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **151**, 209
- [154] Y. Chen, Z. Guo, P. del Socorro Murdoch, E. Zang, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 1503
- [155] T. Rau, R. Alsfasser, A. Zahl, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 4223-4230

- [156] M. Schnölzer, W. D. Lehmann, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1997, **169/170**, 263-271
- [157] G. Lamprecht, F. Pichlmayer, E. R. Schmid, *Chromatographia*, 1998, **47(5/6)**, 271-277
- [158] T. Huff, E. Hannappel, *Analytica Chimica Acta*, 1997, **352**, 249-255
- [159] K. Morand, G. Talbo, M. Mann, *Rapid Commun. in Mass Spectrometry*, 1993, **7**, 738-743
- [160] A. Pasini, M. Moroni, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 1093-1097
- [161] N. Hadjiliadis, N. Ferderigos, J.-L. Butour, H. Marzarguil, G. Gasmi, J.-P. Laussac, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 5057-5064
- [162] R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Lock, B. Rosenberg, *J. of the American Chem. Soc.*, 1977, **99(3)**, 777-781
- [163] B. Lippert, C. J. L. Lock, B. Rosenberg, M. Zvagulis, *Inorg. Chem.*, 1978, **17(11)**, 2971-2975
- [164] T. G. Appleton, J. W. Conner, J. R. Hall, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 130
- [165] B. Decock-Le Reverend, H. Kozlowski, *J. Chim. Phys.*, 1985, **82(9)**, 883-890
- [166] T. Grochowski, K. Samochoka, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1992, 1145
- [167] X. Luo, W. Huang, Y. Mei, S. Zhou, L. Zhu, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1474-1480
- [168] G. W. Watt, W. A. Cude, *Inorg. Chem.*, 1968, **7**, 335
- [169] R. W. Berg, K. Rasmussen, *Spectrochim. Acta*, 1973, **29A**, 319
- [170] D. B. Powell, N. Sheppard, *Spectrochim. Acta*, 1961, **17**, 68
- [171] Machery & Nagel GmbH & Co KG, Düren, HPLC Katalog, 1993
- [172] H.-J. Götze, W. S. Sheldrick, A. F. M. Siebert, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1993, **346**, 634
- [173] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.*, 1968, **40**, 700

Dank

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich Marco Kleine für die durchgeführten Korrekturlesungen, die ständige Hilfsbereitschaft und die während der Vertiefungs- und Diplomarbeitszeit erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die freundschaftliche Atmosphäre im HPLC-Bereich und die gemeinsam chromatographierend erlebten Sonnenuntergänge möchte ich mich bei Petra Berendes, Dirk Wolters und Christian Fröhling bedanken.

Außerdem danke ich Wolf Wirth für seine während des gesamten Chemiestudiums, ob vor Klausuren oder in Praktika, gute Zusammenarbeit.

Bei Walter Nigge möchte ich mich für die Aufnahme der zahlreicher ESI-Massenspektren und die Diskussionsbereitschaft über zugehörige Fragen bedanken.

Die immer Neuigkeiten enthaltenden Gesprächsrunden im Teeraum und die allgemein freundschaftliche Atmosphäre an unserem Lehrstuhl werde ich bestimmt zukünftig vermissen.

Ganz besonders gilt mein Dank meiner Frau Christiane. Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung haben mir das Erstellen dieser Arbeit erleichtert.

Meinen Eltern danke ich für den familiäre Rückhalt.

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Markus Hahn
Geburtsdatum: 05.11.1971
Geburtsort: Dortmund
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

08/1978 - 07/1982 | Besuch der Grundschule in Niedersprockhövel
08/1982 - 06/1991 | Besuch des Gymnasiums im Schulzentrum Holthausen
in Hattingen

Grundwehrdienst

07/1991 - 06/1992 | Ableistung des Wehrdienstes in Wuppertal und Unna

Studium

10/1992 - 11/1997 | Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
04/1995 | Diplom-Vorprüfung
04/1997 - 11/1997 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Analytische Chemie,
Thema der Arbeit: „Flüssigchromatographische und NMR-
spektroskopische Untersuchungen von $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ mit
Glycylhistidin“, Betreuer: Prof. W. S. Sheldrick
11/1997 | Diplom-Hauptprüfung
02/1998 - 10/2000 | Promotion am Lehrstuhl für Analytische Chemie, Thema der
Arbeit: „Chromatographische, NMR-spektroskopische und
massenspektrometrische Untersuchungen der Reaktionen von
histidin- und methioninhaltigen Peptiden mit
 $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ und $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$
Betreuer: Prof. W. S. Sheldrick