

Markierungsfreie Visualisierung von löslichen Metallcarbonylkomplexen in lebenden Zellen mithilfe von Raman-Mikrospektroskopie**

Konrad Meister, Johanna Niesel, Ulrich Schatzschneider,* Nils Metzler-Nolte,*
Diedrich A. Schmidt und Martina Havenith*

Ein wichtiges Forschungsgebiet der medizinischen anorganischen Chemie ist die Suche nach neuen Metallkomplexen für therapeutische Anwendungen, insbesondere gegen Krebs und Infektionskrankheiten. Neben den ausführlich untersuchten Platin- und Ruthenium-Koordinationsverbindungen haben Organometallverbindungen in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit erfahren.^[1–4] Dabei zeigen vor allem auch Metallcarbonylkomplexe interessante Eigenschaften, wie etwa hohe antiproliferative Aktivität gegen Tumorzellen.^[5–6] Von besonderem Interesse im biologischen Kontext ist jedoch ihre Anwendung als feste „Speicherform“ für Kohlenstoffmonoxid. Diese CO freisetzenden Moleküle („CO releasing molecules“; CORMs) sind ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung der biologischen Aktivität des molekularen Botenstoffs Kohlenstoffmonoxid.^[7–12]

Um den biologischen Wirkmechanismus potenzieller Wirkstoffkandidaten aufzuklären, ist es von besonderer Bedeutung, ein detailliertes Bild ihrer intrazellulären Verteilung zu erhalten und zu verstehen, wie sich diese mit der Zeit verändert. Bisher wurden insbesondere Röntgenfluoreszenz(XRF) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) für die Untersuchung der räumlichen Verteilung von Metallkomplexen in Zellen herangezogen.^[13–15] Die AAS ist zwar eine empfindliche Methode, ihre Auflösung ist jedoch sehr begrenzt, sodass nur mit großen Schwierigkeiten zuverlässig zwischen verschiedenen Zellorganellen unterschieden werden kann. Die XRF hingegen erfordert leistungsstarke Röntgenquellen wie Synchrotronstrahlung, die zum einen biologisches Gewebe schädigen und zum anderen nicht routinemäßig zugänglich sind.

Die meisten Studien zur intrazellulären Verteilung von Substanzen nutzen daher die Fluoreszenzmikroskopie.^[16] Zu den Nachteilen dieser Methode gehört, dass das zu untersuchende Molekül mit einem externen Fluoreszenzmarker modifiziert werden muss. Außerdem kann die optische Anregung zu photochemischen Reaktionen und als Konsequenz zur Zersetzung des Chromophors führen. Überdies kann der hinzugefügte Marker die Bioverteilung und die Eigenschaften des zu untersuchenden Moleküls beeinflussen, wie erst kürzlich für Ruthenium-Bipyridyl-Komplexe gezeigt wurde.^[17]

Ein wichtiges Forschungsziel ist es daher, diese Einschränkungen zu überwinden, zum Beispiel durch die Identifizierung von biologisch aktiven Metallkomplexen mit inhärenter Fluoreszenz. Allerdings ist dies bisher nur für eine kleine Zahl an Metall-Ligand-Kombinationen erfolgreich gewesen. Es ist daher erstrebenswert, neue und generell anwendbare Bildgebungsverfahren zu entwickeln, die weder einen externen Marker noch besondere photophysikalische Eigenschaften erfordern, sondern stattdessen die intrinsische spektroskopische Signatur des Moleküls nutzen.

Die Raman-Mikrospektroskopie entwickelt sich zurzeit zu einer sehr leistungsfähigen nichtinvasiven Methode, die es ermöglicht, Zellkompartimente und zelluläre Prozesse zu identifizieren und abzubilden, ohne dass eine aufwendige Probenpräparation oder Markierung erforderlich ist. Seit Puppels et al. erstmals lebende Zellen mit konfokaler Raman-Mikrospektroskopie betrachteten, haben mehrere Gruppen die Leistungsfähigkeit dieser Methode gezeigt.^[18] So konnten ganze Zellen sowie Zellkerne, Chromatin, Mitochondrien oder Lipidvesikel untersucht werden.^[19–21] Neben der Darstellung von Zellorganellen wird Raman-Mikrospektroskopie auch genutzt, um die Aufnahme von Molekülen in Zellen zu untersuchen.^[22–23] Bislang waren solche Untersuchungen allerdings auf Biomoleküle begrenzt, die deuterierte Einheiten als empfindliche und spezifische Marker enthielten.

Hier stellen wir eine Raman-mikrospektroskopische Untersuchung zur Aufnahme und Verteilung des neuartigen CORM [Mn(tpm)(CO)₃]Cl (tpm = Tris(1-pyrazolyl)methan) in Zellen vor, das eine photoinduzierbare Zytotoxizität gegen Krebszellen aufweist.^[11] Metallcarbonylkomplexe wie [Mn(tpm)(CO)₃]Cl zeigen intensive C≡O-Streckschwingungen zwischen 1800 und 2200 cm⁻¹. In diesem Spektralbereich sind Schwingungsbanden, die auf andere Zellkomponenten zurückzuführen sind, von vernachlässigbarer Intensität. Wir zeigen hier, dass die C≡O-Streckschwingung von [Mn(tpm)(CO)₃]Cl ein idealer Marker für die Visualisierung des Komplexes in lebenden Krebszellen ist.

[*] K. Meister, Dr. D. A. Schmidt, Prof. Dr. M. Havenith
Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)
E-Mail: martina.havenith@rub.de
J. Niesel, Dr. U. Schatzschneider, Prof. Dr. N. Metzler-Nolte
Lehrstuhl für Anorganische Chemie I, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)
E-Mail: ulrich.schatzschneider@rub.de
nils.metzler-nolte@rub.de

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG im Rahmen der Forschergruppe „Biologische Funktion von Organometallverbindungen“ (FOR 630) und dem Research Department „Interfacial System Chemistry“ der RUB unterstützt. Die Arbeiten wurden ermöglicht durch die Beschaffung des Raman-Mikroskops im Rahmen des Projekts 05KS7PC2 durch das BMBF. J.N. dankt der RUB Research School für ein Doktorandenstipendium. Wir danken E. Bründermann und A. Halang für ihre wertvollen Beiträge.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000097> zu finden.

Während die spektroskopische Signatur von Metallcarbonylkomplexen bereits in bioanalytischen Techniken wie dem Metalcarbonyl-Immunassay (CMIA) genutzt wird, ist ihr Einsatz im Zusammenhang mit zellulärer Bildgebung bis auf eine infrarotmikroskopische Untersuchung von Osmium-Carbonyl-Clustern in getrockneten Zellen bislang nicht untersucht worden.^[24–25]

Die IR- und Raman-Spektren von festem $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ weisen intensive Banden für zwei $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingungen bei 1944 und 2050 cm^{-1} auf, wie sie bei lokaler C_{3v} -Symmetrie zu erwarten sind (Abbildungen S1, S2A). Die Unterschiede in den relativen Intensitäten können durch die unterschiedlichen Auswahlregeln für die IR- und Raman-Spektroskopie erklärt werden. In einer 2 mm wässrigen Lösung von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ dominiert die O-H -Streckschwingung des Wassers bei 3400 cm^{-1} das Spektrum, ein Signal der $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingung kann aber eindeutig identifiziert werden. Dabei kommt es aufgrund der wässrigen Umgebung zu einer Signalverschiebung von 1944 nach 1963 cm^{-1} . Weitere Banden der Mangantricarbonyl-Verbindung erscheinen im Bereich zwischen 600 und 1800 cm^{-1} . Diese Signale werden jedoch durch überlagernde Banden von Zellbestandteilen überdeckt.

Abbildung 1 A zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer HT29-Zelle, die 3 h mit einer 2 mm wässrigen Lösung von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ inkubiert wurde. Die Zelle hat eine charakteristische Größe von $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$. In Abbildung 1 B

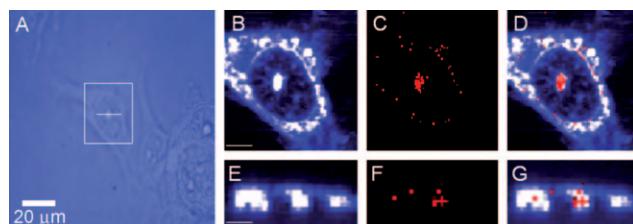


Abbildung 1. A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer HT29-Darmkrebszelle, die 3 h mit einer 2 mm $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ -Lösung inkubiert wurde. B,C) Raman-Intensitätskarten der C-H - und $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingung, Integrationsbereiche waren $2800\text{--}3050(\pm 2)\text{ cm}^{-1}$ für (B) und $1945\text{--}1965(\pm 2)\text{ cm}^{-1}$ für (C). D) Falschfarben-Raman-Bild aus den Teilstücken (B) und (C). E–G) Raman-Intensitätskarten für die vertikale Messung in der x,z -Ebene. Die weißen Balken in der optischen Aufnahme zeigen die Scannbereiche. Der Maßstabsbalken für die Raman-Bilder ist $6\text{ }\mu\text{m}$ lang.

ist die rekonstruierte Raman-Intensitätskarte der C-H -Streckschwingung der Zelle bei 2800 bis 3050 cm^{-1} gezeigt. Die Form der Zelle sowie der Kern, die Kernmembran und das umgebende Zytoplasma sind deutlich zu erkennen. In Abbildung 1C ist die rekonstruierte Raman-Intensitätskarte für die Maxima im Bereich der $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingung dargestellt. Dabei zeigt sich eine kreisförmige Ansammlung um den Kern, und insbesondere eine Anreicherung im Zentrum des Kerns ist klar ersichtlich. Abbildung 1D ist eine Überlagerung der Abbildungen 1B und 1C. Wie man sieht, ist der Komplex nach einer Inkubationszeit von 3 h in die Zelle eingedrungen und hat sich in der Kernmembran sowie dem Nucleolus angereichert. Um sicherzustellen, dass sich der

Komplex im Inneren der Zelle befindet und nicht lediglich an der Zelloberfläche ausgefallen ist, wurde ein Scan in x,z -Richtung durchgeführt (Abbildung 1E–G). Diese Aufnahmen zeigen, dass der Komplex tatsächlich in die Zelle eingedrungen ist und sich überwiegend in der Kernmembran und dem Nucleolus befindet.

Abbildung 2 vergleicht das gemittelte Raman-Spektrum einer Zelle in den Bereichen, in denen die Carbonylbanden von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ innerhalb der Zelle ihre maximale

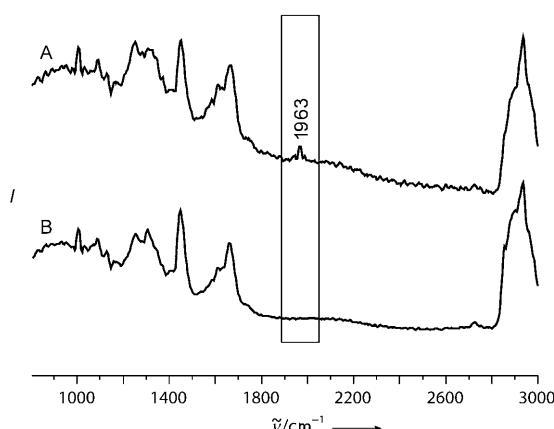


Abbildung 2. A) Gemitteltes Spektrum der Zelle an Positionen, an denen maximale Intensitäten für die $\text{C}\equiv\text{O}$ -Schwingungsbanden von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ innerhalb der Zelle beobachtet wurden. B) Gemitteltes Raman-Spektrum aus dem Zytoplasma, in dem kein Komplex nachgewiesen wurde.

Intensität erreichen, mit einem gemittelten Raman-Spektrum aus dem Zytoplasma, in dem praktisch kein Metallkomplex $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ gefunden wurde. In beiden Spektren sind typische Raman-Signale vorhanden, die auf Zellbestandteile zurückzuführen sind. Deutlich zu erkennen sind die C-H -Streckschwingung bei 2900 cm^{-1} , die Amid-I-Bande bei 1655 cm^{-1} , C-H - und CH_2 -Deformationsschwingungen um 1450 cm^{-1} sowie die Ringschwingung von Phenylalanin bei 1002 cm^{-1} . Ein deutlicher Unterschied zwischen den Spektren tritt im Bereich zwischen 1900 und 2100 cm^{-1} auf. In Abbildung 2A ist ein Signal bei 1963 cm^{-1} zu erkennen, das der $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingung von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ in wässriger Umgebung zuzuordnen ist. In Abbildung 2B ist dieses Signal nicht vorhanden, da dieses Spektrum in einem Bereich der Zelle aufgenommen wurde, in dem sich keine Metallkomplexe befinden.

Zusammenfassend konnten erstmals die Aufnahme eines stabilen wasserlöslichen Organometallkomplexes durch lebende Zellen und seine intrazelluläre Lokalisierung mithilfe von konfokaler 3D-Raman-Mikrospektroskopie charakterisiert werden. Dabei diente eine $\text{C}\equiv\text{O}$ -Streckschwingung von $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ als intrinsischer spektroskopischer Marker, der die markierungsfreie Identifizierung und Lokalisierung des Komplexes innerhalb einer Zelle ermöglicht. Organometallkomplexe und ihre biochemischen und zytotoxischen Eigenschaften spielen auf dem Gebiet der medizinischen Chemie und der Antitumor-Chemotherapie eine grundlegende Rolle. Für den untersuchten Komplex $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ konnte eine hohe Stabilität in wässriger Umgebung nachgewiesen werden.

(tpm)(CO)₃]Cl konnte gezeigt werden, dass er sich überwiegend in der Kernmembran und im Nucleolus anreichert. Aufgrund der bekannten photoinduzierbaren Zytotoxizität von [Mn(tpm)(CO)₃]Cl als CORM könnten diese Ergebnisse neue Einsichten über den Wirkungsort und Wirkmechanismus dieser Verbindungsklasse liefern.

Darüber hinaus wurde das Potenzial der Raman-Mikrospektroskopie als Bildgebungsverfahren demonstriert. Die Kupplung von Organometallkomplexen an verschiedene Biokonjugate öffnet den Zugang zu einer Vielfalt von interessanten Verbindungen.^[12,26–27] Auf der Grundlage der vorliegende Studie können neue Erkenntnisse gewonnen werden über die Wirkstoffaufnahme und den intrazellulären Wirkort von potenziellen metallorganischen Wirkstoffkandidaten sowie von Molekülen wie Peptiden, die mit solchen Verbindungen markiert sind.

Eingegangen am 7. Januar 2010
Online veröffentlicht am 26. März 2010

Stichwörter: Bioorganometallchemie · Infrarotmikroskopie · Medizinische Organometallchemie · Metallcarbonylkomplexe · Bildgebungsverfahren

-
- [1] G. Jaouen, *Bioorganometallics*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
 - [2] C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391–401.
 - [3] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. Keppler, *Dalton Trans.* **2008**, 183–194.
 - [4] A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1890–1899.
 - [5] I. Ott, B. Kircher, C. P. Bagowski, D. H. W. Vlecken, E. B. Ott, J. Will, K. Bensdorf, W. S. Sheldrick, R. Gust, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1180; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1160.
 - [6] D. Schlawe, A. Majdalani, J. Velcicky, E. Hessler, T. Wieder, A. Prokop, H. G. Schmalz, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1763–1766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1731–1734.
 - [7] T. R. Johnson, B. E. Mann, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3850–3858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3722–3729.
 - [8] R. Motterlini, B. E. Mann, R. Foresti, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2005**, *14*, 1305–1318.
 - [9] J. Boczkowski, J. J. Poderoso, R. Motterlini, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 614–621.
 - [10] B. E. Mann, R. Motterlini, *Chem. Commun.* **2007**, 4197–4208.
 - [11] J. Niesel, A. Pinto, H. W. P. N'Dongo, K. Merz, I. Ott, R. Gust, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, 1798–1800.
 - [12] H. Pfeiffer, A. Rojas, J. Niesel, U. Schatzschneider, *Dalton Trans.* **2009**, 4292–4298.
 - [13] J. B. Waern, H. H. Harris, B. Lai, Z. Cai, M. M. Harding, C. T. Dillon, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 443–452.
 - [14] R. A. Alderden, H. R. Mellor, S. Modok, M. D. Hall, S. R. Sutton, M. G. Newville, R. Callaghan, T. W. Hambley, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13400–13401.
 - [15] S. I. Kirin, I. Ott, R. Gust, W. Mier, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 969–973; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 955–959.
 - [16] F. Noor, A. Wustholz, R. Kinscherf, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2481–2485; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2429–2432.
 - [17] C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8738–8739.
 - [18] G. J. Puppels, F. F. M. De Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin, *Nature* **1990**, *347*, 301–303.
 - [19] N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, E. Volokhina, G. Vrensen, J. Greve, C. Otto, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3968–3981.
 - [20] C. Matthäus, T. Cherenko, J. A. Newmark, C. M. Warner, M. Diem, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 668–673.
 - [21] C. Krafft, T. Knetschke, R. H. W. Funk, R. Salzer, *Vib. Spectrosc.* **2005**, *38*, 85–93.
 - [22] C. Matthäus, A. Kale, T. Cherenko, V. Torchilin, M. Diem, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 287–293.
 - [23] H. J. van Manen, Y. M. Kraan, D. Roos, C. Otto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10159–10164.
 - [24] A. Varenne, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1995**, *186*, 195–204.
 - [25] K. V. Kong, W. Chew, L. H. K. Lim, W. Y. Fan, W. K. Leong, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1370–1374.
 - [26] N. Metzler-Nolte, *Chimia* **2007**, *61*, 736–741.
 - [27] F. Noor, R. Kinscherf, G. Bonaterra, S. Walczak, S. Wölfel, N. Metzler-Nolte, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 493–502.