

# Schlüssel zum Öffnen photolabiler, metallhaltiger Käfige

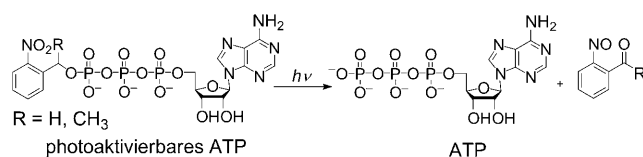
Katie L. Ciesienski und Katherine J. Franz\*

Chelate · Photochemie · Photolyse ·  
Käfigverbindungen · Übergangsmetalle

**P**hotolabile metallhaltige Käfige sind Metallkomplexe, die bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge eine Veränderung der Koordinationsumgebung erfahren. Dabei kann entweder der verkapselnde Ligand allein oder der gesamte Metallkomplex photoresponsiv sein. Die veränderten Koordinationseigenschaften photoresponsiver Komplexe können mehrere Auswirkungen haben: eine Freisetzung des koordinierten Metallions in seine Umgebung, eine veränderte Reaktivität des Metallzentrums oder die Abspaltung eines reaktiven Moleküls, das zuvor durch Bindung an das Metallzentrum passiviert war. Diese photoaktivierbaren Systeme können von Nutzen sein, um die Bioverfügbarkeit von Metallen oder ihren koordinierenden Liganden für das Studium biologischer Reaktionspfade oder für mögliche therapeutische Zwecke zu manipulieren.

## 1. Einleitung

Durch die Steuerung der räumlichen Verteilung und zeitlichen Freisetzung bestimmter biologisch aktiver Moleküle können Forscher untersuchen, wie verschiedene chemische Ereignisse biologische Prozesse vorantreiben. Photoaktivierbare Moleküle – engl. „caged molecules“ – ermöglichen es, Licht als nichtinvasives Mittel zur Auslösung derartiger Ereignisse zu nutzen. Der Begriff „caged“ wurde von Kaplan, Forbush und Hoffman 1978 geprägt, um ihr photoaktiviertes ATP-Molekül zu beschreiben (Schema 1).<sup>[1]</sup> In diesem Sinne bedeutet „caged“, dass die biologische Aktivität eines Moleküls durch kovalente Anknüpfung einer photolabilen Schutzgruppe an eine funktionelle Schlüsselgruppe des Moleküls blockiert wird. Das Molekül wird dabei inaktiviert („caged“), bis die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge die photolabile Komponente derart verändert, dass die funktionelle Gruppe des Moleküls aufgedeckt und so seine biologische Aktivität wiederhergestellt wird. Diese Strategie wurde genutzt, um verschiedene Biomoleküle photoaktivierbar zu machen, darunter Peptide, Proteine, Nucleinsäuren, Effektoren zur Regulierung der Genexpression, sekundäre Botenstoffe und Nucleotid-Cofaktoren.<sup>[2–4]</sup>



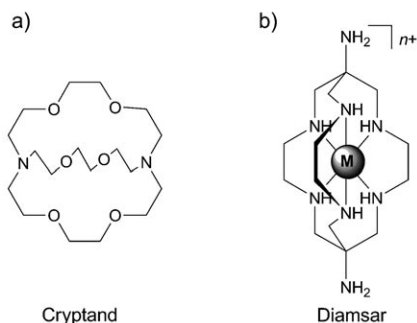
**Schema 1.** Nitrobenzyl-geschütztes Adenosintriphosphat: das erste Beispiel für ein photoaktivierbares Molekül.

Metallionen können tiefgreifende biologische Reaktionen auslösen,<sup>[5]</sup> und es wäre wünschenswert, diese Reaktionen zu steuern – entweder durch Freisetzung von Metallionen oder durch gezielte Veränderung ihrer Reaktivität ähnlich zur lichtinduzierten Freisetzung organischer Moleküle. Um Metallionen photoaktivierbar zu machen, muss man allerdings eine andere Strategie anwenden als die der Anbringung kovalenter Schutzgruppen, wie sie für organische Moleküle genutzt wird. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir verschiedene Methoden zur Herstellung photoaktivierbarer Metallionen, darunter auch Übergangsmetallionen. Wir definieren zwei Arten von Käfigen für Metallionen: „abgeschlossen“ und „aufschließbar“. In diesem Zusammenhang ist ein abgeschlossener Käfig eine klassische Käfigverbindung, in der ein Metallion vollständig in einem dreidimensionalen Hohlraum eines makropolycyclischen Liganden verkapselt ist.<sup>[6]</sup> Aufschließbare Käfige beziehen sich hingegen speziell auf solche Käfige, bei denen sich die Koordinationsumgebung des Metallzentrums bei Lichtbestrahlung ändert.

[\*] Dr. K. L. Ciesienski, Prof. K. J. Franz  
Department of Chemistry, Duke University  
Box 90346, Durham, NC 27708-0346 (USA)  
Fax: (+1) 919-660-1605  
E-Mail: katherine.franz@duke.edu  
Homepage: <http://www.chem.duke.edu/labs/franz/>

## 2. Abgeschlossene Metallkäfige

Die Nützlichkeit abgeschlossener Metallkäfige in der Biologie und Medizin gründet darauf, dass das Metallion sowohl isoliert als auch unreaktiv gegen andere Spezies in seiner Umgebung bleibt; einige Beispiele finden sich in Schema 2. In



**Schema 2.** Beispiele für abgeschlossene Käfige: a) Cryptanden sind Beispiele für vorab gebildete Käfige, die eine Reihe von Kationen einschließen können. b) Diamsar ist ein Beispiel für ein Clathrochelate, das durch Templatsynthese um ein kinetisch inertes Metallion wie  $\text{Co}^{3+}$  herum aufgebaut werden kann, woraufhin das Ion gegen ein anderes, gewünschtes Metallion ausgetauscht werden kann.

diesen Fällen liefert das dreidimensionale Gerüst des Liganden alle Donoratome zur koordinativen Sättigung des Metallzentrums und erzwingt damit größere sterische und elektronische Einschränkungen als entsprechende zweidimensionale Gerüste. Dieser Cryptateffekt verleiht photoaktivierbaren Metallkomplexen beeindruckende thermodynamische und kinetische Stabilität.<sup>[7–9]</sup> Die Synthese vorab gebildeter Liganden, wie Cryptanden (Schema 2a), ist oft aufwändig und nicht ergiebig.<sup>[10]</sup> Dagegen eröffnet die Templatsynthese von Molekülen wie Diamsar (Schema 2b) und anderen Clathrochelaten einen effizienten Zugang zu verkapselnden Liganden.<sup>[11]</sup>

Dank der einfachen Synthese und der Möglichkeit zur Variation des Molekülgerüsts von Clathrochelaten sowie wegen deren kinetischer und thermodynamischer Stabilität finden diese Komplexe sowohl biochemische als auch medizinische Anwendungen. Dazu zählen die Komplexbildung radioaktiver Metallionen für die Radiotherapie und Diagnostik, die Verkapselung paramagnetischer Ionen für die Magnetresonanztomographie, die Koordination von Metallen im

Rahmen der HIV-Therapie sowie Membrantransporter für Metallionen.<sup>[12]</sup> Eine umfassende Bewertung all dieser Anwendungen abgeschlossener Metallkäfige sprengt den Rahmen dieses Kurzaufsatzes; weitere Informationen zu diesem Thema findet der interessierte Leser in Lit. [6], [11] und [12].

## 3. Aufschließbare Metallkäfige

Im Unterschied zu einem abgeschlossenen Metallkäfig lässt sich ein aufschließbarer Käfig öffnen. Hier konzentrieren wir uns auf solche aufschließbaren Käfige, die sich durch Lichtbestrahlung öffnen lassen, wobei sich die Koordinationsumgebung des Metallions verändert. Während der Nutzen abgeschlossener Käfige auf der Unreaktivität des Metallions gegenüber seiner Umgebung beruht, besteht der Nutzen aufschließbarer „Photokäfige“ darin, dass sich ihre Reaktivität gegenüber ihrer Umgebung bei selektiver Stimulation durch Licht geeigneter Wellenlänge ändert.

In den folgenden Abschnitten beschreiben wir zwei Arten von Photokäfigen: Bei Typ-1-Käfigen reagiert Licht mit einer photoaktiven Komponente des Liganden, wodurch sich die Reaktivität am Metallzentrum verändert; bei Typ-2-Käfigen reagiert Licht mit einem photoaktiven Metallzentrum, wodurch sich die Reaktivität eines Liganden verändert, der zuvor an das Metallzentrum koordiniert war. Abbildung 1 zeigt diese Unterscheidung: Licht wird verwendet, um entweder das Metallion oder eine Käfigkomponente zu aktivieren. Die folgenden Beispiele erfüllen diese eng gesetzten Kriterien, die Teil eines viel größeren Gebietes der (bio)anorganischen Photochemie sind.<sup>[13]</sup> Nicht besprochen werden Beispiele wie photoaktive Metallkomplexe, die diffusionsfähige Radikalspezies generieren, die wiederum mit DNA reagieren,<sup>[14]</sup> oder Photosensibilisatoren, die Singulett-Sauerstoff für die photodynamische Therapie erzeugen.<sup>[15,16]</sup>

### 3.1. Typ-1-Käfige: photoaktive Liganden

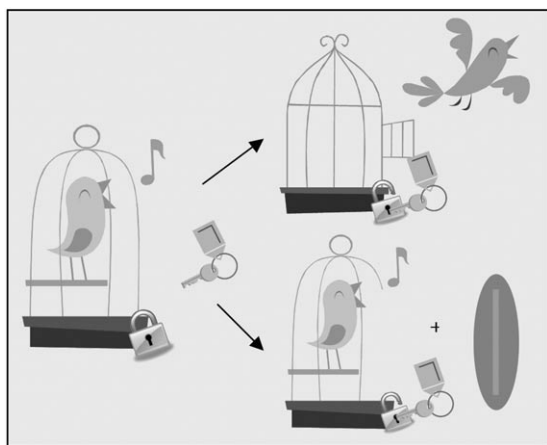
Eine mögliche Anwendung photoaktivierbarer Metallkomplexe besteht darin, sie als Reagentien zur Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Metallionen einzusetzen. Der Einbau einer photoaktivierbaren Substanz in einen Chelatliganden stellt einen Schalter zur Verfügung, mit dem sich die räumliche und zeitliche Freisetzung des koordinierten Metallions steuern lässt. Solche Reagentien können nützlich für



Katie Ciesiński erhielt ihren BSc in Chemie 2004 von der Millersville University und wechselte anschließend zu K. Franz an das Department of Chemistry der Duke University. Katie promovierte 2010 über das Design von Liganden für photoaktivierte Veränderungen der Koordination von d-Block-Übergangsmetallen.



Katherine Franz erhielt ihren Bachelor-Titel vom Wellesley College und promovierte anschließend am MIT unter der Anleitung von S. J. Lippard. Ihr Postdoktorat verbrachte sie bei B. Imperiali am MIT, bevor sie 2003 an die Duke University wechselte, wo sie Associate Professor für Chemie ist. Dort entwirft sie aktivierbare Chelatliganden zur Manipulation und Bestimmung der Konzentration, Reaktivität und Verteilung von Metallionen in biologischen Systemen.

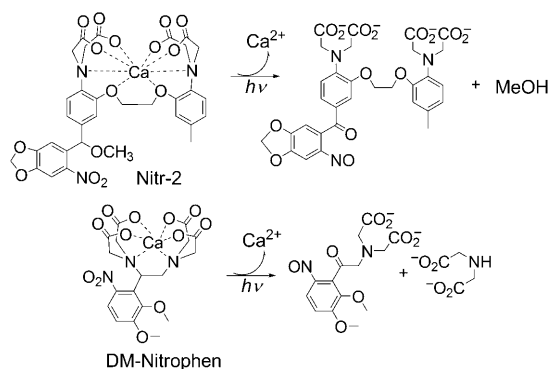


**Abbildung 1.** Cartoon-Zeichnung aufschließbarer metallhaltiger Käfige: Der Vogel repräsentiert ein Metallion und der Schlüssel das Licht. Aufschließen des Käfigs kann entweder zur Freisetzung und damit Aktivierung des Metallions (oben, Typ 1) oder zur Abspaltung und Aktivierung eines Teils des Käfigs führen (unten, Typ 2).

das Studium zellulärer Prozesse bei der Aufnahme, Verteilung, Speicherung, Verwendung und Lokalisation von Metallionen sein.

### 3.1.1. Calcium

Calciumkäfige sind die bekanntesten Typ-1-Käfige. Hier bildet ein photolabiler, hoch affiner Ligand einen Chelatkomplex mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, um diese der biologischen Umgebung zu entziehen. Sie werden wieder bioverfügbar gemacht, sobald das Ligandrückgrat eine photochemische Veränderung erfährt, die durch UV-Bestrahlung verursacht wird und Produkte mit einer verringerten Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erzeugt. In den späten 1980er Jahren wurden unabhängig von zwei Forschungsgruppen die ersten Calciumkäfige entwickelt.<sup>[17–19]</sup> Diese Käfige (Schema 3) wurden wegen ihrer Anwendbarkeit auf biologische Systeme kommerzialisiert. Beide Komplexe nutzen die gleichen photochemischen Nitrobenzylreaktionen, wenngleich ihre Photoprodukte recht verschieden sind. Bei einer Photolyse von Nitr-2 wird Methanol freigesetzt, und es bildet sich ein Nitroso-Photoprodukt. Dessen benzyliche Carbonylgruppe in *para*-Stellung

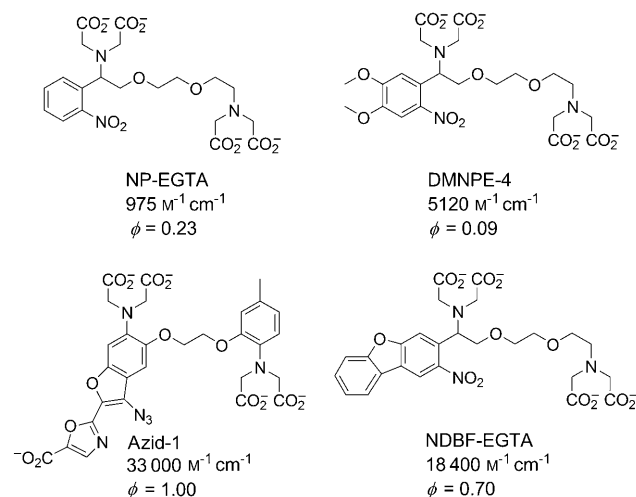


**Schema 3.** Die photoaktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexe Nitr-2 und DM-Nitrophen und ihre Aktivierung durch Licht zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

zum konjugierten N-Atom verringert die Calciumaffinität von  $K_d = 160 \text{ nM}$  auf ca.  $8 \mu\text{M}$  ( $K_d$  = Dissoziationskonstante).<sup>[19]</sup> Wird DM-Nitrophen UV-Strahlung ausgesetzt, wird das Ligandrückgrat gespalten, wodurch sich die Bindungsaffinität von  $K_d = 5 \text{ nM}$  auf  $3 \text{ mM}$  nach Photolyse ändert.<sup>[20]</sup> Diese drastische Veränderung bedeutet, dass Licht verwendet werden kann, um Zeitpunkt, Ort und Amplitude der Calciumfreisetzung zu steuern.

Die meisten Calciumkäfige nutzen eine 2-Nitrophenylgruppe als photolabile Komponente. Diese Gruppe, als Schutzgruppe in der organischen Synthese verwendet, ist nach wie vor bestimmend im Bereich photolabiler Käfige. Ihre Popularität rührt zum Teil von ihrer Verträglichkeit mit einer Vielzahl funktioneller Gruppen her, darunter Amide, Amine, Carboxylate, Hydroxygruppen und Phosphate.<sup>[21,22]</sup> Darüber hinaus gibt es bereits eine Reihe von Derivaten, die kommerziell erhältlich oder relativ leicht synthetisierbar sind. Andere photolabile Gruppen, die intramolekulare Photoreaktionen eingehen, die zur Bindungsspaltung führen, finden ebenfalls zunehmend Verwendung. Ein aktueller Übersichtsartikel diskutiert die Strukturen, Mechanismen und Eigenschaften einiger geläufiger photolabiler Schutzgruppen, darunter Nitrobenzyl-, Cumarin- und Hydroxyphenacyl-Derivate.<sup>[23]</sup>

Die Nitrophenylverbindungen können mit Nah-UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 350 \text{ nm}$  photolysiert werden; dieser Wert liegt innerhalb des UVA-Bereichs ( $\lambda = 315\text{--}400 \text{ nm}$ ). Anders als UVB ( $\lambda = 280\text{--}315 \text{ nm}$ ) und UVC ( $\lambda = 100\text{--}280 \text{ nm}$ ) wird UVA nicht von DNA absorbiert und verursacht daher keine direkten DNA-Schäden. Je nach Intensität der Lichtquelle, Dauer der Exposition und Zelltyp kann UVA-Licht die DNA und andere Zellkomponenten jedoch indirekt durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies schädigen.<sup>[24,25]</sup> Leichte Toxizität kann daher eine ernsthafte Einschränkung dieser Verbindungen sein; damit ist es wesentlich, dass ihre Photolyse so effizient wie möglich ist. Einige fortgeschrittene Käfigliganden für Calcium, die zur Verbesserung der Photolyse-Effizienz entworfen wurden, sind in Schema 4 gezeigt.



**Schema 4.** Vergleich fortgeschrittener Liganden, die als Käfige für Calcium verwendet wurden, zusammen mit ihren Extinktionskoeffizienten bei  $350 \text{ nm}$  und den Quantenausbeuten der Photolyse ( $\phi$ ) in Gegenwart von Calcium unter Sättigungsbedingungen.

Zwei ausschlaggebende Eigenschaften der photolabilen Gruppe sind ihre Quantenausbeute und ihr Extinktionskoeffizient bei der Bestrahlungswellenlänge. Kann eine photolabile Verbindung Licht effizient absorbieren, benötigt man kürzere Expositionszeiten und kann so Zellschäden verringern. Eine Strategie zur Verbesserung der Quantenausbeute dieser Verbindungen besteht darin, ihre Extinktionskoeffizienten bei  $\lambda = 350$  nm zu vergrößern. Bei Käfigliganden für Calcium gelang dies durch Einbau von Methoxysubstituenten an den 4- und 5-Positionen der *ortho*-Nitrophenylgruppe. Das Anbringen von Methoxygruppen an NP-EGTA zur Bildung von DMNPE-4 erhöht den Extinktionskoeffizienten von 975 auf  $5120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Schema 4).<sup>[26]</sup> Allerdings geht diese Erhöhung nicht mit einer Zunahme der Quantenausbeute einher: diese verringert sich von 0.23 bei NP-EGTA auf 0.09 bei DMNPE-4.<sup>[26]</sup> Interessanterweise war DMNPE-4 erst der zweite Käfig für Calcium, der dazu in der Lage ist, eine effiziente Zwei-Photonen-Photoaktivierung einzugehen. Der erste derartige Käfig war Azid-1 (Schema 4), ein Mitglied der Nitr-Familie und ein Derivat von Fura-2, einer Calcium-Fluoreszenzsonde. Die Fluoreszenzeigenschaften von Azid-1 resultierten in einem Extinktionskoeffizienten von  $33000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und ermöglichen seine Photolyse mit einer beeindruckenden Quantenausbeute von eins bei der Bildung des Photoprodukts Amidoxim.<sup>[27]</sup> Ähnlich erhöht der Einbau eines Nitrotribenzofuran-Chromophors in das EGTA-Ligandgerüst den Extinktionskoeffizienten auf  $18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , wie bei NDBF-EGTA. Dieser Wert ist deutlich höher als der Extinktionskoeffizient von NP-EGTA ( $975 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>[28]</sup> NDBF-EGTA hat ebenfalls eine sehr hohe Quantenausbeute der Photolyse (0.70) und ist in der Lage zur Zwei-Photonen-Photoaktivierung.<sup>[28]</sup>

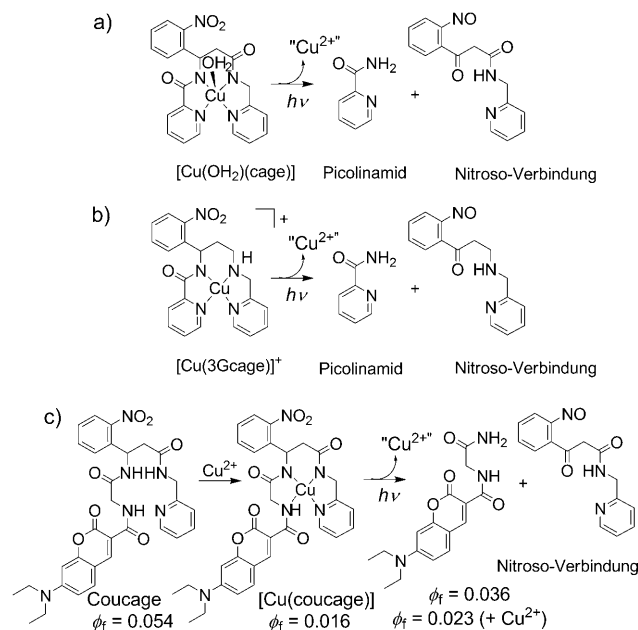
Calciumkäfige wurden erfolgreich bei vielfältigen physiologischen Experimenten eingesetzt und waren nützlich für das Studium der Rolle von Calcium in biologischen Prozessen.<sup>[20]</sup> Diese Strategie wurde auch für  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  angewendet.<sup>[29–31]</sup> Dagegen gibt es nur wenige Beispiele aus dem Bereich biologisch relevanter d-Block-Metalle. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über bekannte photoaktivierbare Übergangsmetall- und d-Block-Metallverbindungen und ihre Anwendungen.

### 3.1.2. d-Block-Metallkäfige

Bei der Entwicklung eines Käfigliganden für Übergangsmetallionen sind die Präferenzen der Donoratome, die Größe der Chelatringe und die Geometrie des Komplexes zu bedenken. Die Bindungsaffinität lässt sich durch Wahl der Donoratome gemäß dem Prinzip der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB-Prinzip) und durch Optimierung der Zahl und Größe der Chelatringe relativ zur Kationen-größe einstellen. Zusätzlich kann die Bindungsgeometrie dabei helfen, die Selektivität für bestimmte Metallionen zu optimieren, da Übergangsmetallionen in der Zahl ihrer Valenz-d-Elektronen und damit in der Präferenz für eine bestimmte Bindungsgeometrie variieren. Erforderlich ist nicht zuletzt auch eine sorgfältige Abwägung des Einflusses all dieser Parameter auf die Photolyse-Effizienz und gewünschte Reaktivität vor und nach der Photolyse.

### 3.1.3. Kupfer

Im Bestreben, das Konzept photoaktivierbarer Metallkomplexe über Calcium hinaus auf biologisch relevante Übergangsmetalle auszudehnen, entwickelten wir einen photoaktivierbaren Kupferkomplex  $[\text{Cu}(\text{OH}_2)(\text{cage})]$ .<sup>[32]</sup> Unser Käfigligand  $\text{H}_2\text{cage}$  trägt eine Nitrophenylgruppe an einem vierzähligen Liganden mit zwei Amid- und zwei Pyridyl-N-Atomen.  $\text{H}_2\text{cage}$  bindet  $\text{Cu}^{2+}$  mit einem effektiven  $K_d$ -Wert von 16 pM bei pH 7.4.<sup>[32]</sup> Bestrahlung mit 350-nm-UV-Licht spaltet das Ligandrückgrat binnen vier Minuten unter Freisetzung zweizähliger Photoprodukte mit niedrigerer Affinität für  $\text{Cu}^{2+}$  (Schema 5 a). Die hohe Photolyse-Effizienz



Schema 5. Kupferkäfige.

von  $\text{H}_2\text{cage}$  (0.73) verringert sich auf 0.32 bei Koordination an  $\text{Cu}^{2+}$ , was darauf schließen lässt, dass Kupfer die Photolyse beeinträchtigt, aber nicht verhindert.<sup>[32]</sup> Unter Lichtausschluss inhibierte  $[\text{Cu}(\text{OH}_2)(\text{cage})]$  die Bildung von Hydroxylradikalen in einem In-vitro-Assay; bei einer Photoaktivierung erhöhte sich die Kupfer-katalysierte Hydroxylradikalbildung dagegen um 160%.<sup>[32]</sup> Dieser photoaktive Kupferkomplex ist das erste Beispiel für die Verwendung von Licht zur Veränderung der Verfügbarkeit und Reaktivität eines biologisch relevanten Übergangsmetalls.

Ein Nachteil von  $\text{H}_2\text{cage}$  ist, dass sein  $K_d$ -Wert von 16 pM für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen nicht genügt, um eine Konkurrenz mit Kupfer bindenden Proteinen zu verhindern. Zur Lösung dieses Problems entwickelten wir eine Reihe von Chelatoren der zweiten Generation, um die Auswirkungen einer Veränderung des Ligandrückgrats von  $\text{H}_2\text{cage}$  auf die  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsaffinität und die Photolyse-Effizienz besser zu verstehen. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie entwarfen wir einen Kupferkäfig der dritten Generation – 3Gcage – mit einem effektiven  $K_d$ -Wert von 0.18 pM für  $\text{Cu}^{2+}$  bei pH 7.4.<sup>[33]</sup>

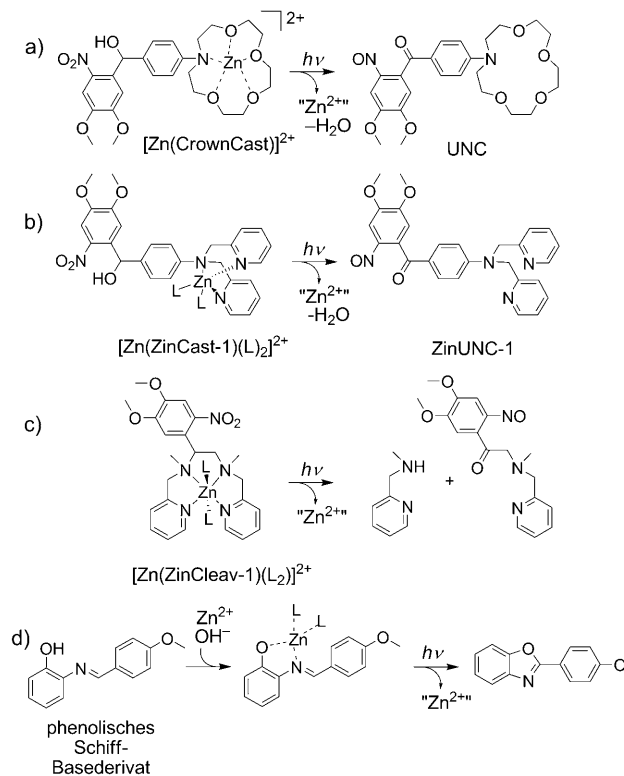
dieser verbesserte Wert ist bemerkenswert und sollte ausreichen, um  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Gegenwart endogener, Kupfer bindender Proteine sequestriert zu halten. Wie H<sub>2</sub>cage koordiniert 3Gcage an  $\text{Cu}^{2+}$  in einer vierzähligen Bindungsstelle, bis die Aktivierung mit UV-Licht das Ligandrückgrat spaltet und so zweizählige Photoprodukte mit einer verringerten  $\text{Cu}^{2+}$ -Affinität freisetzt (Schema 5b). Im Dunkeln inhibiert 3Gcage die Bildung von Hydroxylradikalen, wogegen eine UV-Exposition die Hydroxylradikalbildung um mehr als 300 % erhöht.  $[\text{Cu}(\text{3Gcage})]^+$  könnte nützlich für den Transport von Metallionen zur Untersuchung von Metall-Lokalisationspfaden oder zur Induktion von oxidativem Stress im Rahmen einer Chemotherapie sein, allerdings wurde seine Anwendung in zellulären Systemen bisher noch nicht validiert.

Fluoreszenzsonden für  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>[34]</sup>  $\text{Zn}^{2+}$ ,<sup>[35,36]</sup> und  $\text{Cu}^{2+}$ ,<sup>[37,38]</sup> finden breite Anwendung zur Untersuchung der Verteilung von Metallionen. Eine übliche Strategie besteht darin, eine Sonde derart zu entwerfen, dass die Koordination an ein bestimmtes Metallion die Fluoreszenzintensität der Sonde erhöht und diese damit „angeschaltet“ wird (Turn-on-Sonde). Die Entwicklung eines solchen Sondentyps für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen ist anspruchsvoll, da diese paramagnetisch sind und die Fluoreszenz der Sonde löschen. Viele  $\text{Cu}^{2+}$ -Sonden haben daher einen „Turn-off“-Mechanismus, sind damit aber auch ungenauer und unempfindlicher. Wir haben einen neuen Typ von Turn-on-Sonde entwickelt – Coucage –, in dem eine photoaktive Nitrophenylgruppe in das Rückgrat eines Cumarinmarkierten vierzähligen Liganden eingebaut ist.<sup>[39]</sup> Die Koordination von  $\text{Cu}^{2+}$  verringert die Fluoreszenz, bis eine UV-Bestrahlung das Ligandrückgrat spaltet, so die kupfer-induzierte Fluoreszenzlöschung aufhebt und damit eine Turn-on-Reaktion ermöglicht (Schema 5c). Coucage zeigt eine selektive Fluoreszenzantwort auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen gegenüber anderen biologisch relevanten Metallionen. Experimente an lebenden MCF-7-Zellen ergaben, dass Coucage zur Detektion von Veränderungen intrazellulärer  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bei Zugabe hochkonzentrierter exogener  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen verwendet werden kann; Coucage könnte damit nützlich für die Visualisierung der zellulären Verteilung von labilem Kupfer sein, um Einblicke in die Mechanismen der Kupferlokalisierung zu erhalten.<sup>[39]</sup> Da die Sonde jedoch unter UV-Bestrahlung zerstört wird, ermöglicht diese Strategie keine Verfolgung der Fluktuationen zellulärer  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Echtzeit. Die Sonde gibt daher nur die Positionen an, wo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zur Chelatisierung verfügbar waren. Diese Methode könnte sich dazu eignen, endogene Taschen von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu untersuchen, sofern der Ligand verbessert werden kann, um seine Kupferbindungsaffinität zu erhöhen und seine Löscheffizienz vor der Photoaktivierung zu verbessern.

### 3.1.4. Zink

Burdette et al. entwickelten photoaktivierbare Zinkkomplexe für die Untersuchung der  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen-Signalgebung.<sup>[40–42]</sup> Diese Komplexe können z.B. dabei helfen, Diskrepanzen bezüglich der Relevanz von synaptischem Zink bei der Neurotransmission aufzuklären. Eine aktuelle Methode zur Freisetzung von  $\text{Zn}^{2+}$  in ein biologisches System ist die exogene Applikation in Form eines  $\text{Zn}^{2+}$ -Salzes. Bei dieser

Methode besteht allerdings die Gefahr, dass das System mit  $\text{Zn}^{2+}$  in biologisch irrelevanten Konzentrationen „überschwemmt“ wird und so eine Antwort ausgelöst wird, die unter biologisch sinnvoller Konzentrationen nicht auftritt. Einer der ersten photoaktiven Käfige zur Chelatisierung von  $\text{Zn}^{2+}$  war CrownCast (Schema 6a).<sup>[40]</sup> CrownCast trägt einen



**Schema 6.** Zinkkäfige. L = koordinierendes Lösungsmittel oder nicht identifizierte Hilfsliganden.

Kronenetherrezeptor und hat photochemische Eigenschaften, die denen des Nitr-2-Calciumkäfigs von Adams und Tsien ähneln.<sup>[21]</sup> Bei der Photolyse bildet sich ein Nitrosobenzophenon (UNC) mit schlechterer Metallbindung. Diese Verringerung der Bindungsaffinität resultiert aus der Donierung des freien Elektronenpaares am Anilin-N-Atom zum O-Atom der Carbonylgruppe des Benzophenons. Der Ligand kann  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  binden. Die höchste Bindungsaffinität wurde für  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet, die niedrigste für  $\text{Zn}^{2+}$ , mit Dissoziationskonstanten von 14 bzw. 161  $\mu\text{M}$ .<sup>[40]</sup>

Der fortgeschrittene Chelator ZinCast-1 (Schema 6b) bindet  $\text{Zn}^{2+}$  in seiner dreizähligen Bindungstasche mit  $K_d = 14.3 \mu\text{M}$ .<sup>[41]</sup> Bei UV-Bestrahlung folgt ZinCast-1 demselben photochemischen Mechanismus wie CrownCast. Die Bildung eines Ketons an der Benzylposition resultiert in verringerter Elektronendichte am Anilin-N-Atom und damit einer Schwächung der Zn-N-Bindung. Nach Bestrahlung hat das Photoprodukt eine  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindungsaffinität von 5.5 mM.<sup>[41]</sup> Wie gezeigt wurde, bindet ZinCast-1  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit einer Bindungsaffinität von 4.5  $\mu\text{M}$  vor der Photolyse und 1.6  $\mu\text{M}$  danach, ein Zeichen für eine sehr geringe Änderung der Bindungsstärke.<sup>[41]</sup>

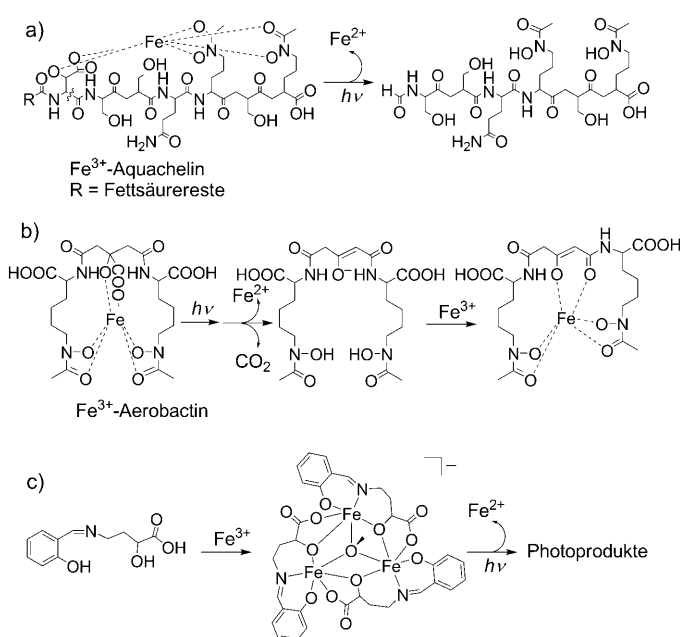
Anders als bei den zwei vorigen  $\text{Zn}^{2+}$ -Chelatoren resultiert die niedrigere Bindungsaffinität nach der Photolyse im Fall von ZinClev-1 (Schema 6c) aus der Spaltung des Ligandrückgrats. Von den drei Chelatoren hat ZinClev-1 die höchste  $\text{Zn}^{2+}$ -Affinität mit  $K_d = 0.23 \text{ } \mu\text{M}$ .<sup>[42]</sup> Schätzungen zufolge haben die Photolyseprodukte  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindungsaffinitäten  $> 150 \text{ } \mu\text{M}$  für die 1:1-Metall-Ligand-Komplexe und im millimolaren Bereich für die 2:1-Komplexe.<sup>[42]</sup> Zudem wird ZinClev-1 am effizientesten photolysiert: seine Quantenausbeute beträgt 0.024<sup>[42]</sup>, die von ZinCast-1 und CrownCast hingegen nur 0.007<sup>[41]</sup> bzw. 0.005.<sup>[40]</sup>

Zhang und Chen entwickelten ein anderes Käfiggerüst, in dem ein phenolisches Schiff-Basederivat zur Metallionbindung genutzt wird. Wird dieses Molekül in einem organischen Lösungsmittel in Gegenwart äquimolarer Mengen an Base gelöst, beträgt die  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindungsaktivität schätzungsweise  $2.93 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 0.34 \text{ mM}$ ).<sup>[43]</sup> Bei Bestrahlung mit 365-nm-UV-Licht bildet sich ein 2-Arylbenzoxazol mit verringerter  $\text{Zn}^{2+}$ -Affinität (Schema 6d). Dieses System unterscheidet sich von den vorigen, da ein zweizähniges Chelat unter Bestrahlung cyclisiert, sodass keine Metallbindung mehr möglich ist. Dieses phenolische Schiff-Basederivat bindet auch andere zweiwertige Metallionen, wie  $\text{Fe}^{2+}$  ( $1.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $6.28 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2.73 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) und  $\text{Hg}^{2+}$  ( $2.23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[43]</sup> Die Reaktivität dieser Metallionen in vitro und in vivo vor und nach der Photolyse bleibt aber noch zu bestimmen.

### 3.1.5. Eisen

Beispiele für natürliche aufschließbare Käfige umfassen einige Siderophorklassen, die hoch affine  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelatoren sind und von Bakterien für deren Eisenversorgung produziert werden.<sup>[44–46]</sup> Butler et al. untersuchten die photochemischen Eigenschaften mariner Siderophore, bekannt als Aquacheline, um einen Einblick in die Biochemie von Eisen in den oberen Meeresschichten zu erhalten.<sup>[47]</sup> Aquacheline tragen verschiedene Fettsäurereste an einer peptidischen Kopfgruppe, die an  $\text{Fe}^{3+}$  über zwei Hydroxamatgruppen und eine  $\beta$ -Hydroxyaspartatgruppe unter Bildung eines 1:1- $\text{Fe}^{3+}$ -Aquachelin-Komplexes koordiniert.<sup>[48]</sup> Unter UVA-Licht wird  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert und das Siderophorrückgrat an der  $\beta$ -Hydroxycarboxylatposition gespalten (Schema 7a).<sup>[47]</sup> Im Ergebnis sinkt die  $\text{Fe}^{3+}$ -Bindungsaffinität von  $10^{12.2} \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 0.63 \text{ } \mu\text{M}$ ) vor der Photolyse auf  $10^{11.5} \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 3.16 \text{ } \mu\text{M}$ ) danach.<sup>[47]</sup> Diese Befunde zeigen nicht nur, dass Siderophore den bakteriellen Eisentransport vermitteln, sondern auch, dass die photolytischen Eigenschaften der Siderophore die Bioverfügbarkeit von Eisen beeinflussen könnten.

Zu einer zweiten Klasse photoreaktiver Siderophore, die strukturell ähnlich zu den Aquachelinen sind, zählt Aerobactin.<sup>[49–51]</sup> Aerobactin enthält eine  $\alpha$ -Hydroxysäure in Form von Zitronensäure.<sup>[49–51]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass  $\text{Fe}^{3+}$  über zwei Hydroxamatgruppen und die Hydroxycarbonsäure koordiniert wird.<sup>[52,53]</sup> UV-Einstrahlung in die LMCT-Bande resultiert in der Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  und der Freisetzung von  $\text{CO}_2$  (Schema 7b). Anders als Aquachelin hat photolysiertes Aerobactin eine ähnliche  $\text{Fe}^{3+}$ -Affinität wie sein nicht photolysiertes Gegenstück und fördert die Eisenaufnahme.<sup>[52]</sup> Da

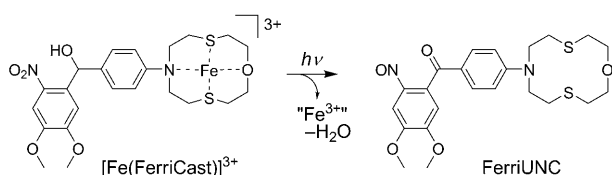


**Schema 7.** Photolabile Siderophorkomplexe (a, b) und ein photolabiler Siderophormodellkomplex (c).

die Bindungsaffinität nicht von der Photolyse beeinflusst wird, bleiben deren Auswirkungen auf die biologische Funktion noch zu klären.

Angeregt von photoresponsiven marinen Siderophoren synthetisierten Baldwin et al. eine Serie von Chelaten mit gemischten Donoren; diese Chelate enthalten eine lichtempfindliche  $\alpha$ -Hydroxysäure sowie Phenol- und Imin-Donorgruppen.<sup>[54]</sup> Schema 7c zeigt einen dieser Liganden. Die Liganden binden  $\text{Fe}^{3+}$  mit hoher Affinität in Methanollösung; dabei entstehen dreikernige Cluster, in denen jeder Ligand zwei Eisenzentren überspannt, wobei die Alkoxy-O-Atome der Hydroxysäurefunktionen die Eisenzentren verbrücken (Schema 7c). Eine überdachende Methoxygruppe vervollständigt die Struktur. Die  $\alpha$ -Hydroxysäurefunktion ist nicht selbst lichtempfindlich; vielmehr erzeugt die Koordination an  $\text{Fe}^{3+}$  eine LMCT-Bande, die empfindlich für Sonnenlicht ist. Die Photoprodukte sind noch nicht vollständig identifiziert, auf jeden Fall wird aber  $\text{Fe}^{2+}$  bei der Photolyse freigesetzt. Diese erste Studie demonstriert, dass sich die Kinetik der  $\text{Fe}^{2+}$ -Freisetzung einstellen lässt, indem funktionelle Hilfsgruppen an Chelatstrukturen, die  $\alpha$ -Hydroxysäuren als lichtempfindliche Einheiten enthalten, moduliert werden.<sup>[54]</sup>

Photoaktivierbare Eisenkomplexe können von Nutzen sein, um Einblicke in die Eisenhomöostase und die Rolle von Eisen bei pathologischen Vorgängen zu erlangen. Burdett et al. entwickelten Ferricast,<sup>[55]</sup> eine lichtempfindliche makrocyclische Verbindung, die  $\text{Fe}^{3+}$  in organischen Lösungsmitteln bindet. Auf ähnliche Weise wie die von derselben Forschungsgruppe entwickelten Zinkkäfige der ersten Generation wird Ferricast bei UV-Bestrahlung in das schwächer bindende FerriUNC umgewandelt (Schema 8). Die Quantenausbeute beträgt 0.01 für den Liganden und 0.04 für den Metallkomplex.<sup>[55]</sup> Sowohl 1:1- als auch 2:1-Ferricast- $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe treten in organischer Lösung auf.<sup>[55]</sup> Allerdings



**Schema 8.** Der Eisenkäfig FerriCast bildet 1:1- wie auch 2:1-Ligand-Metall-Komplexe.

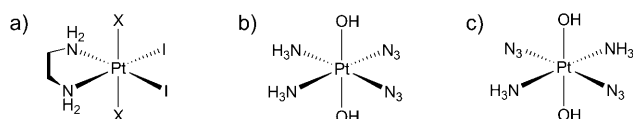
zersetzen sich die FerriCast-Komplexe in wässriger Lösung, was ihren Nutzen unter biologischen Bedingungen einschränkt.

### 3.1.6. Platin

Die Aktivität von Cisplatin gegen Krebs ist seit der Entdeckung des biologischen Effektes dieses Komplexes in den 1960ern gut untersucht wurden.<sup>[56]</sup> Der Erfolg von Cisplatin war der Grund für die Synthese tausender Analoga. Die klinische Wirkung vieler dieser Substanzen ist jedoch eingeschränkt, da sie sowohl auf gesundes als auch auf krankes Gewebe toxisch wirken. Zu den Nachteilen zählen Dosislimitierungen wegen schwerer Nebeneffekte ebenso wie intrinsische und erworbene Resistenz gegen den Wirkstoff. Dies macht einen anderen Ansatz für das Design von Platinwirkstoffen erforderlich. In diesem Abschnitt werden wir photoaktive Wirkstoffe vorstellen, die Platin in der Zelle orts- und zeitspezifisch abgeben können, was die Einschränkungen der aktuellen Wirkstoffe mildern könnte.

Photoaktive Wirkstoffe finden Anwendung in der photodynamischen Therapie (PDT), wo ein photosensibilisierender Wirkstoff und Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff genutzt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass zytotoxische Spezies auf den Ort des Tumors eingeschränkt sind und somit kein gesundes Gewebe angreifen können. PDT hat sich als erfolgreich bei der Behandlung zahlreicher Krebsarten erwiesen. Ein Nachteil ist aber, dass Sauerstoff für den zytotoxischen Mechanismus benötigt wird und viele Tumoren hypoxisch sind.<sup>[57]</sup> Ein Vorteil der in diesem Abschnitt vorgestellten Kandidaten für die Phototherapie ist, dass sie keinen Sauerstoff für ihre zytotoxische Wirkung erfordern.

Das erste photoaktivierbare Platinwirkstoff-ähnliche Molekül war der  $Pt^{4+}$ -Komplex  $[PtCl_2I_2(en)]$  von Bednarski et al. (Schema 9a).<sup>[58]</sup>  $Pt^{4+}$ -Komplexe sind inerte bezüglich einer Ligandensubstitution als ihre  $Pt^{2+}$ -Gegenstücke und müssen daher vor der Reaktion mit DNA durch extrazelluläre und/oder intrazelluläre Agentien zu ihrer aktiven  $Pt^{2+}$ -Form reduziert werden.<sup>[59,60]</sup> Kann man die Rate der Reduk-



**Schema 9.** Photoaktive  $Pt^{4+}$ -Verbindungen: a)  $trans,cis-[PtX_2I_2(en)]$  ( $X = Cl^-$  oder  $OAc^-$ ); b)  $cis,trans,cis-[Pt(N_3)_2(OH)_2(NH_3)_2]$ ; c)  $trans,trans,trans-[Pt(N_3)_2(OH)_2(NH_3)_2]$ .

tion von  $Pt^{4+}$  zu  $Pt^{2+}$  am Tumor oder darum herum relativ zur Rate in gesundem Gewebe erhöhen, sollte sich die Effizienz des Wirkstoffs maximieren lassen.  $[PtCl_2I_2(en)]$  lässt sich mit sichtbarem Licht reduzieren. Die Photoprodukte wurden nicht charakterisiert, es wurde aber gezeigt, dass der resultierende Komplex an DNA bindet. Der unphotolysierte Komplex war jedoch ebenso in der Lage, an DNA zu binden, und es gab keinen Unterschied in der Zytotoxizität bei Zellen unter Lichtausschluss und belichteten Zellen. Die mangelnde Stabilität dieses ersten Komplexes wurde auf sein stark positives Reduktionspotential von  $75\text{ mV}^{-1}$  zurückgeführt.<sup>[58]</sup>

Weiterentwickelte Komplexe wurden mit dem Ziel einer erhöhten Stabilität im Dunkeln entworfen. Einer davon,  $trans,cis-[Pt(OAc)_2I_2(en)]$  ( $X = OAc^-$ ; Schema 9a), hat ein Reduktionspotential von  $-65\text{ mV}^{-1}$ .<sup>[61]</sup> Allerdings war der Unterschied in der Zytotoxizität zwischen unbelichteten und belichteten Zellen weniger ausgeprägt als erwartet. Es wurde geschlussfolgert, dass Diiodoplatin(IV)-Komplexe in vivo leicht von biologischen Thiolen zu ihren toxischen  $Pt^{2+}$ -Gegenstücken reduziert werden und damit ungeeignet als photolabile Wirkstoffe sind. Zwar mögen diese Verbindungen nicht wie gewünscht funktioniert haben, zeigten aber doch die Möglichkeit auf, einen toxischen Platinkomplex mit Licht freizusetzen. Durch Einstrahlung in die LMCT-Bande des Komplexes wurde eine reduktive Eliminierung bewirkt.<sup>[62,63]</sup> Die Iodid-Abgangsgruppe wird zu einem Radikal oxidiert, und es entsteht  $Pt^{3+}$ . Diese Platinspezies wird entweder mit dem Iodidradikalanion rekombinieren oder die Oxidation einer anderen Iodidgruppe unter Bildung eines  $Pt^{2+}$ -Komplexes initiieren. Diese Verbindungsklasse unterscheidet sich von den vorher besprochenen Photokäfigen insofern, als die lichtempfindliche Komponente des Käfigs das Metallzentrum ist und nicht eine photolabile Komponente des Liganden. Damit können sie als Typ-2-Photokäfige eingeordnet werden.

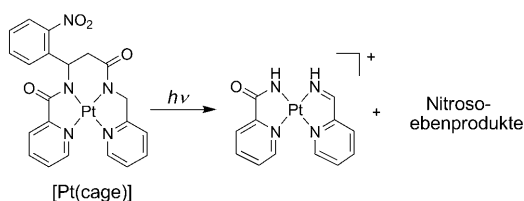
Zur Entwicklung von  $Pt^{4+}$ -Komplexen mit erhöhter Stabilität in Gegenwart zellulärer Reduktionsmittel ersetzten Sadler et al. die Iodidgruppen durch Azide, da Azidoplatin-komplexe bekanntermaßen photoreduktive Eliminierungen eingehen.<sup>[63]</sup> Bei Bestrahlung mit 365-nm-UVA-Licht werden die  $Pt^{4+}$ -Komplexe aus Schema 9b,c zu  $Pt^{2+}$ -Spezies photoreduziert. Der Mechanismus der Photoreduktion ähnelt dem oben beschriebenen, außer dass sich die Azidradikale schnell zu molekularem Stickstoff zersetzen und so die Reoxidation des Platinzentrums verhindert wird.<sup>[62]</sup>

$Cis,trans,cis-[Pt(N_3)_2(OH)_2(NH_3)_2]$  (Schema 9b) ist wasserlöslich, stabil in Gegenwart von Glutathion und wird zu einem Komplex photolysiert, der an DNA und 5'-GMP bindet. Der photolysierte Komplex inhibiert zudem das Wachstum humaner Blasenkrebszellen ebenso wie das Cisplatin-resistenter Zellen, wogegen das Wachstum von Zellen, die mit dem Komplex behandelt und unter Lichtausschluss aufbewahrt werden, kaum beeinflusst wird.<sup>[65]</sup> Veränderung der  $NH_3$ -Liganden hat wenig Auswirkungen auf die Stabilität dieser Komplexe; dementsprechend wurden Derivate mit verschiedenen Aminen synthetisiert und charakterisiert.<sup>[66]</sup>

Seit einiger Zeit weiß man, dass sich der Antikrebsmechanismus von  $trans-Pt^{2+}$  von demjenigen der  $cis-Pt^{2+}$ -Komplexe unterscheidet,<sup>[67-69]</sup> und auch die photoaktiven  $trans-Pt^{4+}$ -Komplexe scheinen andere Antikrebseigenschaften als

die *cis*-Isomere aufzuweisen. So ist das all-*trans*-Isomer *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>[70]</sup> (Schema 9c) wasserlöslicher als die all-*cis*-Variante. Des Weiteren ist die LMCT-Bande des all-*trans*-Isomers zu größeren Wellenlängen mit einem größeren Extinktionskoeffizienten verschoben. Dieses Isomer ist stabil unter Lichtausschluss in Gegenwart von Glutathion und wirkt nicht toxisch auf humane Krebszellen. Nach Lichtbestrahlung bindet das all-*trans*-Isomer an 5'-GMP und ist genauso zytotoxisch wie Cisplatin, wenngleich es nach einem anderen Toxizitätsmechanismus wirkt. Derivate dieses Komplexes wurden gründlich studiert;<sup>[66]</sup> eines davon, das statt NH<sub>3</sub> einen Pyridinliganden enthält, ist 90-mal zytotoxischer als Cisplatin.<sup>[71]</sup>

Als Alternative zu photoaktiven Pt<sup>4+</sup>-Verbindungen führten wir kürzlich einen photoaktivierbaren Pt<sup>2+</sup>-Komplex – [Pt(cage)] – ein, in dem das Pt<sup>2+</sup>-Ion vom photoaktiven Liganden H<sub>2</sub>cage über zwei Amid- und zwei Pyridyl-N-Atome koordiniert wird.<sup>[72]</sup> Der intakte Komplex ist unreaktiv gegenüber Ligandenaustauschreaktionen, bis eine Aktivierung durch UV-Licht ( $\lambda = 350$  nm) einen Platinokomplex ergibt, der seine Liganden leichter austauscht (Schema 10).



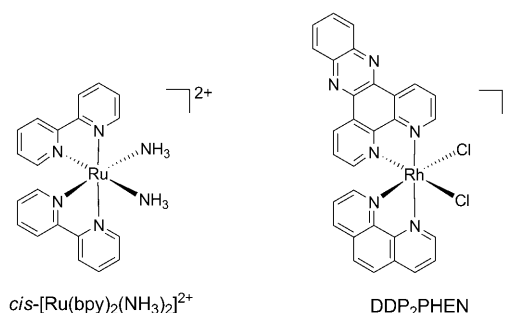
Schema 10. Photolyse von [Pt(cage)].

Wenn humane MCF-7-Brustkarzinomzellen mit bis zu 200  $\mu$ M [Pt(cage)] unter Lichtausschluss behandelt wurden, waren 20% oder weniger Zellen nach 96-stündiger Behandlung abgestorben. Die Zytotoxizität erhöhte sich durch 2-minütige Bestrahlung jedoch um 65% und kam so dem Wert für Cisplatin nahe.

### 3.1.7. Ruthenium und Rhodium

Ru<sup>2+</sup>-Komplexe wie *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> und *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> sind bekanntermaßen zytotoxisch, da sie an DNA binden;<sup>[73–76]</sup> allerdings beschränkt sich ihre toxische Wirkung, ebenso wie die von Cisplatin, nicht auf Krebszellen. Daher entwickelten Singh und Turro den photolabilen, oktaedrischen Ru<sup>2+</sup>-Komplex *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Schema 11).<sup>[77]</sup> Ähnlich wie bei den oben vorgestellten Pt<sup>4+</sup>-Verbindungen wirkt das Metallzentrum als lichtempfindliche Käfigkomponente. Bestrahlung des Komplexes in Wasser führt zum Verlust der NH<sub>3</sub>-Liganden und der Bildung von *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Der photolysierte Komplex bindet an 9-Methyl- und 1-Ethylguanin sowie an einzel- und doppelsträngige DNA. Keine DNA-Bindung wurde hingegen unter Lichtausschluss beobachtet.

Analog entwickelten Loganathan und Morrison oktaedrische Rh<sup>3+</sup>-Komplexe wie DDP<sub>2</sub>PHEN (Schema 11).<sup>[78]</sup> Diese Komplexe sind im Dunkeln thermodynamisch stabil, aber hydrolyseanfällig bei UV-Bestrahlung; die dabei gebil-



Schema 11. Ruthenium- und Rhodiumkäfige.

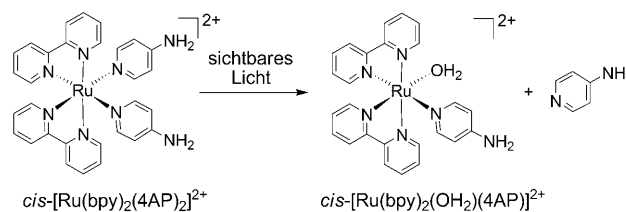
deten Spezies binden leicht an DNA. DPP<sub>2</sub>PHEN erwies sich als toxisch für Krebszellen und inaktivierte das Alphavirus Sindbis (SINV) in Zellen in vivo nach Bestrahlung.<sup>[79]</sup>

## 3.2. Typ-2-Käfige: photoaktive Metalle

Im zweiten aufschließbaren Käfigtyp wirkt das Metallzentrum als Photoschutzgruppe für ein biologisch aktives Molekül. Das Konzept dahinter ist, dass Bestrahlung die Koordinationsumgebung des Metallzentrums verändert und dadurch ein biologisch aktives Molekül freigesetzt wird. Ein wesentlicher Unterschied zu Typ-1-Käfigen ist, dass hier die Bioaktivität des freigesetzten Liganden im Mittelpunkt steht und nicht Veränderungen am Metallzentrum.

### 3.2.1. Ruthenium

Etchenique et al. erkannten, dass der [Ru<sup>2+</sup>(bpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Kern lichtempfindlich ist, und koordinierten Amin-haltige Neurochemikalien an die freien Positionen des oktaedrisch koordinierten Ru<sup>2+</sup>-Zentrums, um die Moleküle nicht mehr verfügbar für ihre normale biologische Funktion zu machen.<sup>[80,81]</sup> Bei Einstrahlung in die MLCT-Bande des [Ru<sup>2+</sup>(bpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Kerns zersetzt sich der [Ru(bpy)<sub>2</sub>(X)<sub>2</sub>]-Komplex (X = Neurochemikalie) unter Freisetzung von [Ru(bpy)<sub>2</sub>(X)]<sup>+</sup> und einem Äquivalent der Neurochemikalie (Schema 12). Ruthenium wurde verwendet, um verschiedene Amin-haltige Neurotransmitter wie 4-Aminopyridin (4AP), Serotonin, Butylamin, Tryptamin und Tyramin zu inaktivieren.<sup>[80]</sup> Die Verbindung mit X = 4AP zeigte eine Wirkung in einem biologischen System, wenn [Ru(bpy)<sub>2</sub>(4AP)<sub>2</sub>] mit sichtbarem Licht bei  $\lambda > 480$  nm bestrahlt wurde; dabei wurde ein Äquivalent 4AP freigesetzt, das die Aktivierung eines Blut-



Schema 12. Photolyse von [Ru(bpy)<sub>2</sub>(X)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

egelneurons durch Blockieren seines  $K^+$ -Ionenkanals förderte.<sup>[81]</sup>

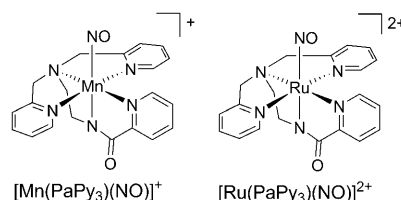
In  $[Ru(bpy)_2(PPh_3)(X)]$  wurde einer der bpy-Liganden durch Triphenylphosphan,  $PPh_3$ , ersetzt. Durch Einführung nur eines Äquivalents einer Amin-haltigen Neurochemikalie erhöhte sich die Quantenausbeute der Photolyse von 0.03 für  $[Ru(bpy)_2(X)_2]$  auf 0.21 für  $[Ru(bpy)_2(PPh_3)(X)]$ .<sup>[82]</sup> Im Fall von  $X = \gamma$ -Aminobuttersäure (GABA; der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn) aktivierte eine Lichtbestrahlung bei  $\lambda = 450$  nm GABA-Ionenkanäle in Froshoozyten.<sup>[82]</sup> Im Dunkeln verursachte der Komplex keine Zellveränderungen. Das System, in dem nicht abspaltbare Gruppen fünf der sechs Koordinationsstellen besetzen, wurde zur Inaktivierung von Aminosäuren wie Glutamat verwendet.<sup>[83]</sup> In diesem Fall wurden einer der bpy-Liganden und die  $PPh_3$ -Gruppe durch einen dreizahnigen Chelator – Tris(pyrazolyl)amin – ersetzt. Unseres Wissens wurden Aminosäurehaltige Rutheniumkäfige noch nicht in vivo getestet.

Man kennt eine Reihe photoaktivierbarer Moleküle, die Neurochemikalien in ähnlicher Weise passivieren wie das photoaktivierbare ATP-Molekül von Kaplan, Forbush und Hoffman. Wie viele der Beispiele in diesem Kurzaufsatz benötigen diese Strategien jedoch UV-Licht mit einer Wellenlänge von ca. 300 nm, um eine kovalente  $\sigma$ -Bindung zu brechen, was wiederum die Zelle schädigen kann. Ein Vorteil der genannten Rutheniumsysteme ist daher ihre Photoreaktivität mit Licht höherer Wellenlängen.

### 3.2.2. Metallkomplexe für Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist ein Signalmolekül, das mit verschiedenen physiologischen Reaktionen in Zusammenhang gebracht wird, darunter Blutdruckregulation, Neurotransmission, Immunantwort und Apoptose.<sup>[84]</sup> Metallkomplexe mit Metall-Nitrosyl(M-NO)-Bindung wurden angewendet, um therapeutisch wirksames NO freizusetzen oder die Rolle von NO in biologischen Reaktionspfaden zu untersuchen. Der erste metallhaltige, NO freisetzende Wirkstoff –  $Na_2[Fe(NO)(CN)_5]$  – ist klinisch nützlich für die Verringerung von Bluthochdruck, bringt aber auch Nachteile mit sich, da der Verlust seiner Hilfsliganden zu einer Cyanidtoxizität führt.<sup>[85,86]</sup> Dementsprechend wurde viel Forschungsarbeit in die Entwicklung neuer, stabilerer Metallkomplexe investiert, um den Verlust der Hilfsliganden zu verhindern und die NO-Abgabe steuern zu können. Die bekannte Lichtempfindlichkeit vieler M-NO-Verbindungen macht Licht zu einem idealen Auslöser für die räumlich und zeitlich spezifische NO-Freisetzung.

Mascharak et al. entwickelten oktaedrische Metallkomplexe mit  $PaPy_3H$  (*N,N*-Bis(2-carboxamid; ein fünfzahniger Ligand) und NO. Sowohl die Ruthenium-<sup>[87]</sup> als auch die Mangankomplexe<sup>[88]</sup> (Schema 13) erwiesen sich als stabil bei physiologischen pH-Werten und lassen sich durch Licht unter NO-Freisetzung aktivieren. Trotz der Tatsache, dass das Rutheniumanalogon mit UV-Licht und das Mangananalogon mit sichtbarem Licht ( $\lambda = 500$ –650 nm) aktiviert wird, sind beide von Bedeutung für die Aktivierung löslicher Guanylat-Cyclase in vivo, lösen einen konzentrationsabhängigen Anstieg von cGMP in vaskulären Zellen der glatten Muskulatur



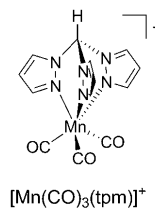
Schema 13. Photoaktivierte, NO freisetzende Verbindungen.

aus und bewirken eine Gefäßrelaxation in einem Rattenthoraxring.<sup>[89]</sup>

Die Variation der Liganden führte zu Rotverschiebungen der Wellenlängen für die Photoaktivierung. Die Koordination eines Farbstoffs an das Metallzentrum verändert nicht nur die photochemischen Eigenschaften des Metallkomplexes, sondern gibt auch die Möglichkeit, die zelluläre Verteilung zu verfolgen. Ford et al. führten Chromophore wie AFchromophore,<sup>[90]</sup> Fluorescein<sup>[91,92]</sup> und Protoporphyrin IX<sup>[93]</sup> in Metallkomplexe ein, um die Lichtabsorption zu erhöhen und die NO-Freisetzung bei größeren Wellenlängen zu verbessern. Die NO-Freisetzung ist nicht sehr effizient, diese Komplexe haben aber einen Zwei-Photonen-Querschnitt, der eine Abgabe von NO bei Zwei-Photonen-Anregung mit Femtosekunden-gepulstem 810-nm-Licht ermöglicht.<sup>[94]</sup>

### 3.2.3. Metallkomplexe für Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid ist ein weiteres wichtiges Signalmolekül mit möglicher Bedeutung für einige der gleichen Reaktionspfade wie NO ebenso wie bei anderen physiologischen Prozessen.<sup>[95]</sup> Wie die gesteuerte Freisetzung von NO kann auch die von CO genutzt werden, um die Rolle von CO in verschiedenen biologischen Reaktionspfaden zu studieren oder CO als Wirkstoff zu verabreichen. Die Entwicklung CO freisetzender Moleküle (CORMS) ist dementsprechend zu einem aktiv bearbeiteten Forschungsgebiet geworden.<sup>[96,97]</sup> Während die meisten CORMS ihr Kohlenmonoxid infolge von Hydrolyse oder Ligandenaustausch freisetzen, haben Schatzschneider et al. photolabile CORMS zur Steuerung der Freisetzung von CO in hohen Konzentrationen eingeführt.<sup>[14,98,99]</sup> Der oktaedrische Mangankomplex  $[Mn(CO)_3(tpm)]^+$  (Schema 14) gibt bei Aktivierung mit 365-nm-Licht zwei Äquivalente CO an Myoglobin ab.<sup>[99]</sup> Der Komplex ist in vivo unter Lichtausschluss untoxisch für humane Darmkrebszellen, zeigt bei Licht aber eine photoinitierte Zytotoxizität.<sup>[99]</sup> Ein Vorteil dieser CO-haltigen Moleküle ist, dass Raman-Mikrospektroskopie verwendet werden kann, um die



Schema 14. Photoaktivierte, CO freisetzende Verbindung.

Aufnahme dieser Moleküle in die Zelle und ihre dortige Verteilung zu visualisieren.<sup>[100]</sup>

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Photolabile Metallkäfige können für die Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Metallen oder der an sie koordinierenden Liganden verwendet werden, entweder zum Studium biologischer Reaktionspfade oder im Rahmen einer Therapie. Die Bandbreite biologischer Anwendungen für photolabile Übergangsmetallkäfige ist besonders vielversprechend. Dieses Forschungsgebiet wird sich weiter ausdehnen, womit die Frage nach der Lichttoxizität drängender werden wird. Zukünftige Arbeiten werden sich deshalb darauf konzentrieren müssen, die Aktivierungswellenlängen zu erhöhen und dabei die Photolyse-Effizienz zu erhalten. Wir werden mit Interesse verfolgen, wie man diese Verbindungen in den nächsten Jahren für das Studium der Metall-Lokalisation und die Entdeckung neuer Anwendungen für photoaktivierbare Komplexe in Biologie und Medizin weiterentwickeln wird.

#### 5. Abkürzungen

4AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
bpy	2,2'-Bipyridin
CO	Kohlenmonoxid
CORM	Kohlenmonoxid freisetzendes Molekül
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
en	Ethylendiamin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
HSAB	harte und weiche Säuren und Basen
LMCT	Ligand-Metall-Charge-Transfer
MLCT	Metall-Ligand-Charge-Transfer
NO	Stickstoffmonoxid
PDT	photodynamische Therapie
phen	Phenanthrolin
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphan
tpm	Tris(pyrazolyl)methan
UV	Ultraviolett
UVA	315–400 nm
UVB	280–315 nm
UVC	100–280 nm

Wir danken der Sloan Foundation, der Camille and Henry Dreyfus Foundation, der National Science Foundation und der Duke University für die Unterstützung verschiedener Aspekte unserer Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet.

Eingegangen am 28. April 2010

Online veröffentlicht am 17. Dezember 2010

Übersetzt von Dr. Jens Ackermann, Weinheim

- [1] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [2] A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47–53.
- [3] H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.
- [4] D. M. Rothman, M. D. Shults, B. Imperiali, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 502–510.
- [5] K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4921–4960.
- [6] Y. Z. Voloshin, N. A. Kostromina, R. Kramer, *Clathrochelates: Synthesis Structure and Properties*, Elsevier, Amsterdam, **2002**.
- [7] H. J. Buschmann, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *134*, 225–228.
- [8] E. Kauffmann, J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1099–1111.
- [9] D. H. Busch, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 847–860.
- [10] B. Sarkar, P. Mukhopadhyay, P. K. Bharadwaj, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 1–13.
- [11] A. M. Sargeson, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *151*, 89–114.
- [12] Y. Z. Voloshin, O. A. Varzatskii, Y. N. Bubnov, *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 577–605.
- [13] G. Stochel, Z. Stasicka, M. Brindell, W. Macyk, K. Szacilowski, *Bioinorganic Photochemistry*, Wiley-Blackwell, Chichester, **2009**.
- [14] U. Schatzschneider, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 1451–1467.
- [15] J. P. Celli, B. Q. Spring, I. Rizvi, C. L. Evans, K. S. Samkoe, S. Verma, B. W. Pogue, T. Hasan, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795–2838.
- [16] N. J. Farrer, P. J. Sadler, *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 669–674.
- [17] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Grynkiewicz, A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3212–3220.
- [18] J. H. Kaplan, G. C. R. Ellis-Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6571–6575.
- [19] R. Y. Tsien, R. S. Zucker, *Biophys. J.* **1986**, *50*, 843–853.
- [20] G. C. R. Ellis-Davies, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1603–1613.
- [21] S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784.
- [22] J. A. McCray, D. R. Trentham, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 239–270.
- [23] H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.
- [24] C. A. Koch-Paiz, S. A. Amundson, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, A. J. Fornace, *Mutat. Res.* **2004**, *549*, 65–78.
- [25] S. Kozmin, G. Slezak, A. Reynaud-Angelin, C. Elie, Y. de Rycke, S. Boiteux, E. Sage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13538–13543.
- [26] G. C. R. Ellis-Davies, R. J. Barsotti, *Cell Calcium* **2006**, *39*, 75–83.
- [27] S. R. Adams, V. Lev-Ram, R. Y. Tsien, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 867–878.
- [28] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [29] E. Grell, R. Warmuth, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 373–379.
- [30] T. Kishimoto, T.-T. Liu, Y. Ninomiya, H. Takagi, T. Yoshioka, G. C. R. Ellis-Davies, Y. Miyashita, H. Kasai, *J. Physiol.* **2001**, *533*, 627–637.
- [31] P. Plaza, I. Leray, P. Chagnenet-Barret, M. M. Martin, B. Valeur, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 668–674.
- [32] K. L. Ciesienski, K. L. Haas, M. G. Dickens, Y. T. Tesema, K. J. Franz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12246–12247.
- [33] K. L. Ciesienski, K. J. Franz, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9538–9546.
- [34] R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1990**, *6*, 715–760.
- [35] K. Kikuchi, K. Komatsu, T. Nagano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 182–191.
- [36] E. M. Nolan, S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 193–203.

- [37] E. W. Miller, L. Zeng, D. W. Domaille, C. J. Chang, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 824–827.
- [38] L. C. Yang, R. McRae, M. M. Henary, R. Patel, B. Lai, S. Vogt, C. J. Fahrni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11179–11184.
- [39] K. L. Ciesienki, L. M. Hyman, S. Derisavifard, K. J. Franz, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6808–6810.
- [40] D. P. Kennedy, C. Gwizdala, S. C. Burdette, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2587–2590.
- [41] C. Gwizdala, D. P. Kennedy, S. C. Burdette, *Chem. Commun.* **2009**, 6967–6969.
- [42] H. M. D. Bandara, D. P. Kennedy, E. Akin, C. D. Incarvito, S. C. Burdette, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 8445–8455.
- [43] X. Zhang, Y. Chen, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1993–1995.
- [44] J. Granger, N. M. Price, *Limnol. Oceanogr.* **1999**, *44*, 541–555.
- [45] C. G. Trick, *Curr. Microbiol.* **1989**, *18*, 375–378.
- [46] S. W. Wilhelm, C. G. Trick, *Limnol. Oceanogr.* **1994**, *39*, 1979–1984.
- [47] K. Barbeau, E. L. Rue, K. W. Bruland, A. Butler, *Nature* **2001**, *413*, 409–413.
- [48] J. S. Martinez, G. P. Zhang, P. D. Holt, H. T. Jung, C. J. Carrano, M. G. Haygood, A. Butler, *Science* **2000**, *287*, 1245–1247.
- [49] M. G. Haygood, P. D. Holt, A. Butler, *Limnol. Oceanogr.* **1993**, *38*, 1091–1097.
- [50] S. J. H. Hickford, F. C. Kupper, G. P. Zhang, C. J. Carrano, J. W. Blunt, A. Butler, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1897–1899.
- [51] Y. Ito, A. Butler, *Limnol. Oceanogr.* **2005**, *50*, 1918–1923.
- [52] F. C. Kupper, C. J. Carrano, J. U. Kuhn, A. Butler, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 6028–6033.
- [53] J. D. Martin, Y. Ito, V. V. Homann, M. G. Haygood, A. Butler, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 633–641.
- [54] H. Sayre, K. Milos, M. J. Goldcamp, C. A. Schroll, J. A. Krause, M. J. Baldwin, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4433–4439.
- [55] D. P. Kennedy, C. D. Incarvito, S. C. Burdette, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 916–923.
- [56] B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [57] A. L. Harris, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 38–47.
- [58] N. A. Kratochwil, P. J. Bednarski, H. Mrozek, A. Vogler, J. K. Nagle, *Anti-Cancer Drug Des.* **1996**, *11*, 155–171.
- [59] M. D. Hall, T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49–67.
- [60] E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451–2466.
- [61] N. A. Kratochwil, P. J. Bednarski, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 279–285.
- [62] P. J. Bednarski, F. S. Mackay, P. J. Sadler, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 75–93.
- [63] A. Vogler, A. Kern, J. Huttermann, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 554–555; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 524–525.
- [64] P. Müller, B. Schroder, J. A. Parkinson, N. A. Kratochwil, R. A. Coxall, A. Parkin, S. Parsons, P. J. Sadler, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 349–353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 335–339.
- [65] P. J. Bednarski, R. Grünert, M. Zielzki, A. Wellner, F. S. Mackay, P. J. Sadler, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 61–67.
- [66] N. J. Farrer, J. A. Woods, V. P. Munk, F. S. Mackay, P. J. Sadler, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 413–421.
- [67] U. Bierbach, Y. Qu, T. W. Hambley, J. Peroutka, H. L. Nguyen, M. Doedee, N. Farrell, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 3535–3542.
- [68] M. Leng, D. Locker, M. J. Giraud-Panis, A. Schwartz, F. P. Intini, G. Natile, C. Pisano, A. Boccarelli, D. Giordano, M. Coluccia, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1525–1535.
- [69] G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216*, 383–410.
- [70] F. S. Mackay, J. A. Woods, H. Moseley, J. Ferguson, A. Dawson, S. Parsons, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3155–3161.
- [71] F. S. Mackay, J. A. Woods, P. Heringova, J. Kasparkova, A. M. Pizarro, S. A. Moggach, S. Parsons, V. Brabec, P. J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20743–20748.
- [72] K. L. Ciesienki, L. M. Hyman, D. T. Yang, K. L. Haas, M. G. Dickens, R. J. Holbrook, K. J. Franz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2224–2228.
- [73] J. K. Barton, E. Lolis, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 708–709.
- [74] N. Grover, N. Gupta, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3390–3393.
- [75] N. Grover, T. W. Welch, T. A. Fairley, M. Cory, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 3544–3548.
- [76] M. Zhao, M. J. Clarke, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 325–340.
- [77] T. N. Singh, C. Turro, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7260–7262.
- [78] D. Loganathan, H. Morrison, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, *8*, 478–486.
- [79] E. L. Menon, R. Perera, M. Navarro, R. J. Kuhn, H. Morrison, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5373–5381.
- [80] L. Zayat, M. Salierno, R. Etchenique, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1728–1731.
- [81] L. Zayat, C. Calero, P. Albores, L. Baraldo, R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882–883.
- [82] L. Zayat, M. G. Noval, J. Campi, C. I. Calero, D. J. Calvo, R. Etchenique, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2035–2038.
- [83] M. Salierno, C. Fameli, R. Etchenique, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 1125–1128.
- [84] L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego, **2000**.
- [85] J. A. Friederich, J. F. Butterworth, *Anesth. Analg.* **1995**, *81*, 152–162.
- [86] C. Napoli, L. J. Ignarro, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 97–123.
- [87] A. K. Patra, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7363–7365.
- [88] K. Ghosh, A. A. Eroy-Reveles, B. Avila, T. R. Holman, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2988–2997.
- [89] M. Madhani, A. K. Patra, T. W. Miller, A. A. Eroy-Reveles, A. J. Hobbs, J. M. Fukuto, P. K. Mascharak, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7325–7330.
- [90] S. R. Wecksler, A. Mikhailovsky, D. Korystov, F. Buller, R. Kannan, L. S. Tan, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 395–402.
- [91] S. R. Wecksler, J. Hutchinson, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1192–1200.
- [92] S. R. Wecksler, A. Mikhailovsky, D. Korystov, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3831–3837.
- [93] S. Wecksler, A. Mikhailovsky, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13566–13567.
- [94] M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 238–244.
- [95] S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 583–650.
- [96] R. Alberto, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1651–1660.
- [97] R. Foresti, M. Bani-Hani, R. Motterlini, *Intensive Care Med.* **2008**, *34*, 649–658.
- [98] P. C. Kunz, W. Huber, A. Rojas, U. Schatzschneider, B. Spingler, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 5358–5366.
- [99] J. Niesel, A. Pinto, H. W. P. N'Dongo, K. Merz, I. Ott, R. Gust, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, 1798–1800.
- [100] K. Meister, J. Niesel, U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, D. A. Schmidt, M. Havenith, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3382–3384; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3310–3312.