

Untersuchungen zur biologischen Aktivität des Zeise-Salzes und seiner Derivate**

Sandra Meieranz, Maria Stefanopoulou, Gerhard Rubner, Kerstin Bensdorf, Dominic Kubutat, William S. Sheldrick und Ronald Gust*

Professor Helmut Schönenberger zum 90. Geburtstag gewidmet

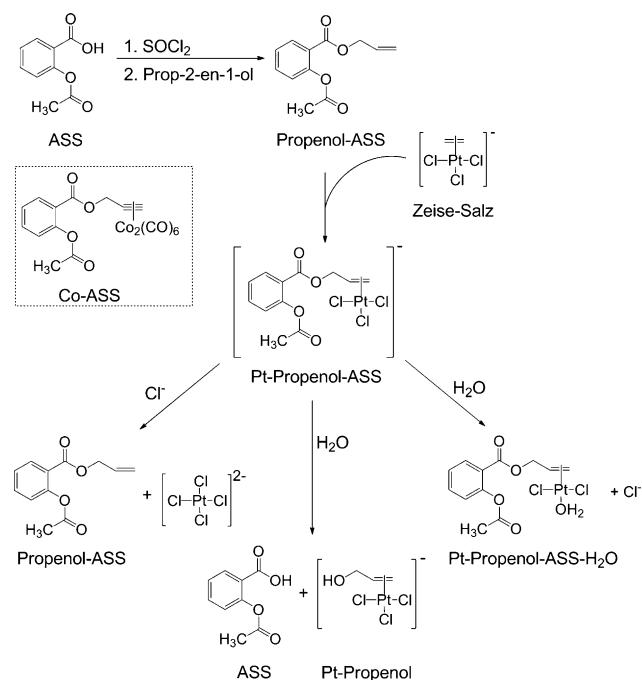
Abstract: Im Rahmen der Entwicklung neuer biologisch aktiver Organometallverbindungen mit Aspirin-Teilstruktur, deren Wirkmechanismus die Hemmung der Cyclooxygenase-(COX)-Enzyme einschließt, wurden auch entsprechende Derivate des Zeise-Salzes synthetisiert. In *In-vitro*-Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass neben den Zeise-Aspirin-Derivaten auch das Zeise-Salz selbst einen sehr potenzen Hemmstoff der COX-Enzyme darstellt. Kaliumtetrachloroplatinat(II) und Cisplatin haben in vergleichbaren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Für die COX-1 konnte mittels LC-ESI-Tandem-Massenspektrometrie nachgewiesen werden, dass das Zeise-Salz mit den Aminosäuren Tyr385 (aktives Zentrum des Enzyms) und Ser516 (Acetylierungsstelle des Aspirins) essenzielle Zentren des Enzyms platiniert, was dessen Funktion stark beeinträchtigt. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das Zeise-Salz selbst pharmakologisch aktiv ist und einen potenzen Enzyminhibitor darstellt.

Der Einzug des Platins in die Welt der medizinischen Chemie entsprang wie vieles dem reinen Zufall. Barnett Rosenberg^[1] untersuchte 1965 *Escherichia coli*-Bakterien im elektrischen Feld und beobachtete ein verändertes Wachstumsverhalten. Die große wissenschaftliche Leistung Rosenbergs war es, nicht das elektrische Feld dafür verantwortlich zu machen, sondern den in Lösung entstehenden Platin-Komplex, der sich im Verlauf des Versuches aus der vermeintlich inerten Platin-Elektrode bildete. Seitdem ist Cisplatin, das bereits seit 1844 als Peyrones-Salz bekannt ist, nicht mehr aus der Tumorthерапie wegzudenken.

Die ständige Weiterentwicklung mit dem Ziel eines erweiterten Wirkspektrums, verringriger Nebenwirkungen und

des Überwindens von Resistenzen brachte weitere Platin-Komplexe hervor, die einen festen Stellenwert in der Medizin besitzen.^[2] All diesen Komplexen ist aber gemein, dass sie ihre Wirkung hauptsächlich über eine Wechselwirkung mit DNA entfalten.

In diesem Zusammenhang wurden auch viele Organometallverbindungen synthetisiert und getestet. Ein hochinteressanter Vertreter dieser Substanzklasse ist der Komplex [Prop-2-inyl-2-acetoxybenzoat]dicobalthexacarbonyl (Co-ASS, Schema 1).^[3,4] Dieses Acetylsalicylsäure-Derivat ist im Zellversuch ähnlich zytotoxisch wie Cisplatin und hemmt daneben die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 deutlich stärker als Acetylsalicylsäure (ASS).



Schema 1. Design und Reaktivität von Kalium[η^2 -(prop-2-enol)-2-acetoxybenzoato]trichloroplatinat(II) (Pt-Propenol-ASS).

[*] Prof. Dr. R. Gust

Institut für Pharmazie, Universität Innsbruck
Innrain 80/82, 6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: ronald.gust@uibk.ac.at

Dr. S. Meieranz, Dr. G. Rubner, Dr. K. Bensdorf
Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin
14195 Berlin (Deutschland)

Dr. M. Stefanopoulou, D. Kubutat, Prof. Dr. W. S. Sheldrick
Lehrstuhl für Analytische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung (Forschergruppe FOR-630) sowie Heike Scheffler für die Durchführung von Experimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410357> zu finden.

Der Einsatz eines zytotoxischen COX-Hemmers eröffnet neue Therapiemöglichkeiten bei Tumoren, von denen bekannt ist, dass eine Überregulation der COX zu pathologischen Veränderungen führt. In den letzten Jahren wurde für verschiedene Mammakarzinome gezeigt, dass COX-2 in deren Gewebe vermehrt exprimiert wird und dass Inhibitoren

dieses Enzyms im Tiermodell das Tumorwachstum und die Tumorprogression hemmen. Eine erhöhte Expression der Cyclooxygenasen in gynäkologischen Tumoren ist zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert,^[5,6] was neben dem Mammakarzinom auch das Prostatakarzinom betrifft.

Im Rahmen der Wirkoptimierung wurde an Co-ASS der Metalcluster modifiziert und der Einfluss auf Zytotoxizität und COX-Hemmung untersucht.^[7–9] Dabei wurde auch das Zeise-Salz (Schema 1), das wie Cisplatin schon sehr lange bekannt ist, als Organometallkomponente eingesetzt. Es wurde 1827 von dem dänischen Apotheker William Christopher Zeise entdeckt und gilt als eine der ersten metallorganischen Verbindungen. Über eine mögliche Verwendung in der Medizin oder als Pharmakophor in Arzneistoffen ist wenig bekannt. Deshalb wurde in Analogie zu Co-ASS Acetylsalicylsäure mit Prop-2-enol verestert und mit Zeise-Salz zu dem anionischen Pt-Propenol-ASS-Komplex umgesetzt (Schema 1; Gegenion K^+).

Vor Beginn der Testung auf pharmakologische Eigenschaften wurde die Stabilität von Pt-Propenol-ASS in Wasser mittels HPLC untersucht. Es ist bekannt, dass durch den starken *trans*-Effekt des Alkens ein Chloridligand gegen H_2O ausgetauscht werden kann.^[10] Ebenso ist es möglich, durch hohe Cl^- -Konzentrationen das Alken vom Platin abzuspalten. Interessanterweise tritt unter den Messbedingungen keine dieser Reaktionen ein. Es erfolgt mit einer Halbwertszeit von 20.2 ± 1.4 min eine Spaltung des Esters resultierend in ASS und Pt-Propenol (Schema 1 und Abbildung 1). Eine Spaltung der Acetoxygruppe wird nicht beobachtet.

Nachdem der Ligand Propenol-ASS im wässrigen Medium stabil ist, spricht alles für eine Beteiligung des Platins an der Esterspaltung. Man kann in Lösung die Bildung eines fünfgliedrigen Chelatringes vom Platin über das Ester-Sauerstoffatom diskutieren, sodass ein sehr starker Elektronen-

zug auf das α -C-Atom der Seitenkette ausgeübt wird, was eine Aktivierung gegenüber nucleophilen Angriffen zur Folge hat. Die Stabilität des Komplexes kann beträchtlich erhöht werden, wenn zwischen Esterfunktion und der „Zeise-Komponente“ eine weitere Methylenegruppe eingefügt wird (\rightarrow Pt-Butenol-ASS). Pt-Butenol-ASS ist unter den Messbedingungen über 24 h stabil.

Um die Bedeutung der „Zeise-Komponente“ im Vergleich zum $\{Co_2(CO)_8\}$ -Cluster auf die pharmakologischen Eigenschaften näher zu untersuchen, wurden Pt-Propenol-ASS und Pt-Butenol-ASS zuerst auf COX-1/2-Hemmung untersucht. Beide Komplexe zeigten eine 10-fach stärkere COX-Hemmung als Co-ASS. In einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ hemmten sie die Aktivität der COX-1 um 100%, die der COX-2 um ca. 35%. Selbst bei einer Testkonzentration von $1 \mu\text{M}$ liegen die Hemmungen der COX-1 noch bei ca. 70% (Tabelle 1).

Tabelle 1: COX-Hemmung an isolierter COX-1 (ovine) und COX-2 (human rekombinant).

	COX-1-Hemmung [%]		COX-2-Hemmung [%]
	bei $10 \mu\text{M}$	bei $1 \mu\text{M}$	bei $10 \mu\text{M}$
ASS	29 \pm 2.0		0
Co-ASS	68.0 \pm 5.4		63.0 \pm 5.0
Pt-Propenol-ASS	100	69.7 \pm 1.2	39.1 \pm 1.7
Pt-Butenol-ASS	100	72.1 \pm 2.3	33.6 \pm 2.4
Propenol-ASS	0		13.3 \pm 2.4
Pt-Propenol	80.7 \pm 14.2		0
$K_2[PtCl_4]$	18.5 \pm 4.5		0
Zeise-Salz	100	35.8 \pm 2.7	13.5 \pm 0.9
Cisplatin	0		29.2 \pm 2.0

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Komplexe unter den Messbedingungen zersetzt werden, wurden auch Pt-Propenol, Propenol-ASS und $[PtCl_4]^{2-}$ als mögliche Spaltprodukte des Pt-Propenol-ASS untersucht.

Der freie Ligand Propenol-ASS und $K_2[PtCl_4]$ zeigen in der höchsten getesteten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ nur eine geringe COX-Hemmung (Tabelle 1). Dagegen ist Pt-Propenol an der COX-1 mit einer Hemmung von 80.7% sehr aktiv. Da in dieser Konzentration ASS die COX-1 nur zu 29% hemmt, wurde davon ausgegangen, dass die „Zeise-Komponente“ dafür verantwortlich ist. Tatsächlich zeigt sogar das Zeise-Salz, im Gegensatz zu Cisplatin und $K_2[PtCl_4]$, in diesem Assay eine ausgezeichnete Hemmung. In einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wird die COX-1 zu 100% und die COX-2 zu 13.5% inaktiviert; bei $1 \mu\text{M}$ wird die Aktivität der COX-1 um 35.8% gehemmt.

Um den Mechanismus der COX-Hemmung näher zu untersuchen, wurde COX-1 zusammen mit dem Zeise-Salz inkubiert und anschließend einem enzymatischen Verdau mit Trypsin unterzogen. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden mittels LC-ESI-Tandem-Massenspektrometrie^[11–13] analysiert. Interessanterweise wiesen vier Fragmente Platinierungsstellen auf (siehe Tabelle 2): Ser516 (oder His513), Glu347 (oder Glu346), Cys512 und His513 sowie Tyr385 (oder His386). In Klammern sind potenzielle alternative Koordinationsstellen angegeben.

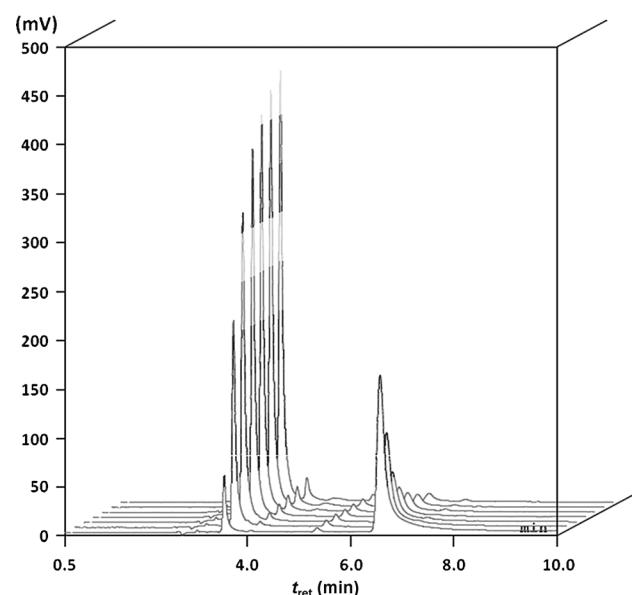


Abbildung 1: 3D-Auftragung mehrerer HPLC-Chromatogramme der Zersetzung von Pt-Propenol-ASS in Gegenwart von Wasser bei 37°C beginnend bei Zeitpunkt 0 (vorne) bis 90 min (hinten) im Zeitabstand von 15 min. $t_{\text{ret}}(\text{ASS}) = 3.56$ min; $t_{\text{ret}}(\text{Pt-Propenol-ASS}) = 6.45$ min.

Tabelle 2: Platinierung (@) der COX-1 durch das Zeise-Salz bestimmt durch ESI-Tandem-Massen-spektrometrie.

Peptidsequenz	Aminosäuren	z ^[a]	SEQQUEST-Parameter Xcorr ^[d]	ΔCn ^[d]	Ionen ^[b,c]
C.HPNS@IFGESMIEMGAPSLK.G	S516/H513,	3	4.31	0.25	28/76
V.IEE@YVQQQLSGYFLQLK.F	E347/E346	3	3.76	0.52	24/60
L.EKC@H@PNSIFGESMIEMGAPSLK.G	C512, H513	3	5.87	0.17	33/88
E.FNQLY@HWHPMLPDSFR.V	Y385/H386	3	3.67	0.31	20/60

[a] Ladung. [b] Beobachtete/mögliche b⁺- und y⁺-Ionen. [c] @ repräsentiert die folgenden Platinfragmente in den Peptidionen; in Klammern sind die relevanten Bindungsstellen angegeben: {(C₂H₄)Pt}²⁺ (S516), {PtCl₃}⁺ (E347), {PtCl₂} (C512, H513 und Y385). [d] Xcorr ist der „cross correlation score“ und ΔCn der „delta correlation value“ in Bezug auf die platinierende Peptidsequenz mit dem nächstbesten Xcorr-Wert.

nationspositionen in der gleichen Sequenz mit ΔCn ≤ 0.10 im Vergleich zur erstgenannten Stelle mit dem höchsten Xcorr-Wert angegeben.

Von größter Bedeutung ist der Befund, dass auch das aktive Zentrum der COX-1, die Aminosäure Tyr385, platiniert wird (Abbildung 2). Man findet hier das {PtCl₂}-Frag-

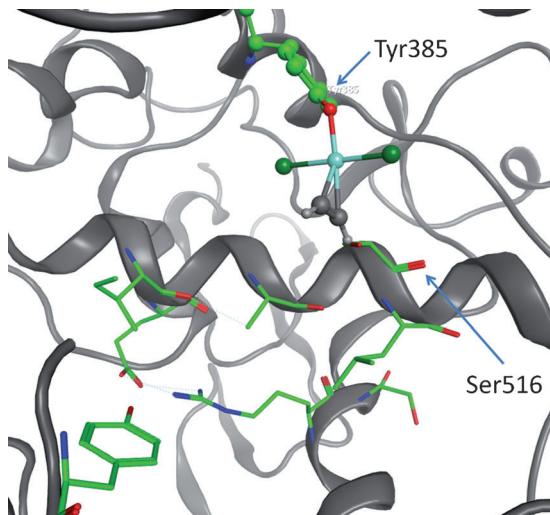


Abbildung 2. Platinierung von essenziellen Aminosäuren (Tyr385) im aktiven Zentrum der COX-1 durch Zeise-Salz.

ment. Da K₂PtCl₄ zu keiner COX-Hemmung führt, ist es sehr wahrscheinlich, dass in einem ersten Schritt Zeise-Salz bindet und dann anschließend das Alken bei der MS-Fragmentierung abgespalten wird. Als weitere Aminosäure in der Bindungstasche trägt Ser516 (essenzielle Acetylierungsstelle von Aspirin) das (η^2 -Ethyl)-platin(II)-Fragment. Es ist anzunehmen, dass das Zeise-Salz nach hydrolytischer Abspaltung einer Chlorid-Abgangsgruppe an die OH-Gruppe der Aminosäure bindet.

Interessanterweise zeigt Cisplatin, das auch über die Hydrolyse der Pt-Cl-Bindungen aktiviert wird und so an die DNA oder Proteine bindet, keine Aktivität in den COX-Assays.

Wissend um diesen vergleichbaren Hydrolysemechanismus wurden Pt-Propenol-ASS, Pt-Butenol-ASS und das Zeise-Salz auf wachstumshemmende Effekte an den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 untersucht (Ta-

belle 3). Dabei erwiesen sich das Zeise-Salz und Pt-Propenol-ASS als inaktiv ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$), während Pt-Butenol-ASS schwach wirksam war ($IC_{50}(\text{MCF-7}) = 30.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$; $IC_{50}(\text{MDA-MB 231}) = 46.7 \pm 2.2 \mu\text{M}$). Nachdem es sich um anionische Komplexe handelt, stellt sich die Frage, ob diese schwache Aktivität aus einer verminderten Aufnahme in die Tumorzellen und/oder einer unzureichenden DNA-Bindung resultiert.

Tabelle 3: IC_{50} -Werte [μM] aus Zytotoxizitätsuntersuchung an Mammakarzinom-Zellen.

Komplex	MCF-7	MDA-MB 231
Cisplatin	2.0 ± 0.3	3.3 ± 0.5
Zeise-Salz	> 50	> 50
Pt-Propenol-ASS	> 50	> 50
Pt-Butenol-ASS	30.1 ± 1.5	46.7 ± 2.2

Die grundsätzliche Möglichkeit der DNA-Platinierung konnte an Lachssperma-DNA nachgewiesen werden. Das Zeise-Salz und Pt-Butenol-ASS binden deutlich schneller an die DNA als Cisplatin, mit einem deutlich niedrigeren Nucleosid/Substanz-Verhältnis (Abbildung 3). In zellulären Sys-

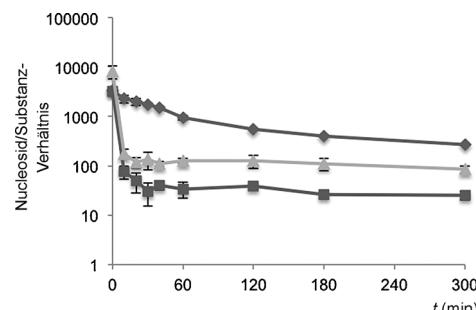


Abbildung 3. Bindung an isolierte Lachssperma-DNA (◆ Cisplatin; ▲ Zeise-Salz; ■ Pt-Butenol-ASS).

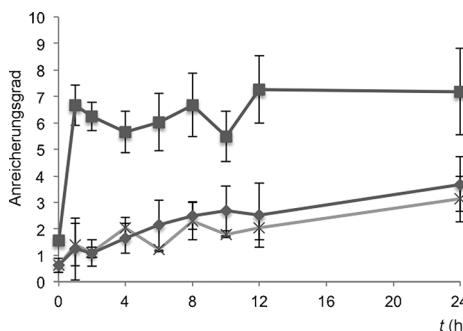
temen müssen die Komplexe zuerst die Zellmembran überwinden, um Wirkung zu entfalten. Inkubiert man MCF-7-Zellen über 24 h mit den Komplexen, so findet man für Cisplatin und das Zeise-Salz eine nahezu identische Aufnahmekinetik (Abbildung 4). Auch die nach 2 h gemessenen Werte für Zellkernaufnahme und zelluläre DNA-Bindung sind identisch (Tabelle 4). Pt-Butenol-ASS wird durch seinen hydrophoberen Charakter 4- bis 5-fach stärker in den Zellen bzw. in den Kernen angereichert. Die im Vergleich zu Cisplatin deutlich niedrigeren bzw. fehlenden proliferationshemmenden Effekte könnten an einer weniger effektiven Bildung von Intrastrangverknüpfungen liegen. Für diese Beurteilung sind aber weiterführende Untersuchungen nötig.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Zeise-Salz und analoge Kalium(η^2 -al-

Tabelle 4: DNA-Bindung an isolierter DNA; Zell- und Zellkernaufnahme sowie DNA-Bindung in MCF-7-Zellen nach 2 h.

Komplex	Bindung an isolierter DNA ^[a]	Aufnahme in MCF-7-Zellen ^[b]	Kernaufnahme in MCF-7-Zellen ^[b]	DNA-Bindung in MCF-7-Zellen ^[a]
Cisplatin	6.0 ± 0.3	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.55 ± 0.52
Zeise-Salz	25.6 ± 0.5	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.47 ± 0.09
Pt-Butenol-ASS	31.2 ± 9.6	0.46 ± 0.09	0.50 ± 0.29	0.51 ± 0.07

[a] nmol Pt pro mg DNA ± sdv. [b] nmol Pt pro mg Protein ± sdv.

**Abbildung 4:** Zellaufnahme-Untersuchung an MCF-7-Zellen (◆ Cisplatin; × Zeise-Salz; ■ Pt-Butenol-ASS).

ken)trichloroplatinat(II)-Komplexe biologisch aktiv sind. Sie stellen unter anderem Hemmstoffe der Cyclooxygenasen dar und können weiter optimiert werden. Nachdem bereits vor über 40 Jahren die Antitumorwirkung von Cisplatin gezeigt werden konnte, ist jetzt auch für die älteste bekannte Organometallverbindung, das Zeise-Salz, ein pharmakologischer Effekt nachgewiesen worden. Inwieweit eine Optimierung zu einem Tumorthapeutikum führen kann, bleibt ab-

zuwarten. Jedoch kann auch an die Entwicklung von nicht-toxischen Cyclooxygenase-Hemmstoffen gedacht werden.

Eingegangen am 22. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 21. Januar 2015

Stichwörter: COX-Hemmung · Stabilität · Zeise-Salz · Zelluläre Verteilung · Zytotoxizität

- [1] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [2] I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 117–126.
- [3] I. Ott, K. Schmidt, B. Kircher, P. Schumacher, T. Wiglenda, R. Gust, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 622–629.
- [4] I. Ott, B. Kircher, C. P. Bagowski, D. H. W. Vlecken, E. B. Ott, K. Bensdorf, W. S. Sheldrick, R. Gust, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1160–1163; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1180–1184.
- [5] G. Kristiansen, C. Denkert, K. Schluens, E. Dahl, C. Pilarsky, S. Hauptmann, *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1215–1221.
- [6] C. Denkert, K. J. Winzer, B. M. Mueller, W. Weichert, S. Pest, M. Koebel, G. Kristiansen, A. Reles, A. Siegert, H. Guski, S. Hauptmann, *Cancer* **2003**, *97*, 2978–2987.
- [7] G. Rubner, K. Bensdorf, A. Wellner, S. Bergemann, R. Gust, *Arch. Pharm.* **2011**, *344*, 684–688.
- [8] G. Rubner, K. Bensdorf, A. Wellner, B. Kirchner, S. Bergemann, I. Ott, R. Gust, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6889–6898.
- [9] G. Rubner, K. Bensdorf, A. Wellner, S. Bergemann, I. Ott, R. Gust, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5157–5163.
- [10] J. R. Joy, M. Orchin, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1960**, *305*, 236–240.
- [11] D. A. Wolters, M. P. Washburn, Y. R. Yates, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683–5690.
- [12] J. Will, W. S. Sheldrick, D. Wolters, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 421–434.
- [13] D. L. Tab, J. K. Eng, J. R. Yates in *Proteome Research: Mass Spectrometry* (Hrsg.: P. James), Springer, Heidelberg, **2001**, S. 125–142.