

- [11] Ein Einkristall von **1a** wurde, um Zersetzung zu vermeiden, mit Cyanacrylkleber überzogen und auf einem CAD-4-Diffraktometer befestigt; Kristallstrukturdaten: tetragonal, $P4/nbm$ (Nr. 127), $a = b = 10.675(3)$, $c = 23.290(2)$ Å, $V = 2654.0(11)$ Å³, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.863$ g cm⁻³, Mo_{Kα}-Strahlung ($\lambda = 0.71069$ Å), $T = 293$ K, ω -Scan im Bereich $3^\circ < \theta < 26^\circ$. Die Struktur wurde mit der Direkten Methode (SIR 92) gelöst. Verfeinerung: Vollmatrix/Kleinste Fehlerquadrate (SHELX 93). Die Pyrazin-Liganden liegen auf vierzähligen Drehachsen und verbinden die Doppelschichten, aus denen sich die Würfel bilden. Die Kohlenstoffatome sind daher statistisch fehlgeordnet und um 90° um die *c*-Achse versetzt (in Abb. 2 ist nur eine Lage abgebildet). An den PF₆⁻-Ionen, die axial an den quadratischen Flächen koordiniert sind, sind die Fluoratome fehlgeordnet (zwei Modelle mit der Besetzung 0.58 und 0.42; nur die höher besetzte Lage ist abgebildet). Die CH₂Cl₂-Solvansmoleküle sind ebenfalls fehlgeordnet. Die Chloratome liegen auf einer vierzähligen Drehachse und die CH₂-Gruppen sind statistisch verteilt. $R = 0.0751$ für 799 unabhängige beobachtete Reflexe mit [$F_0 > 3\sigma(F_0)$] und korrigierten Absorptionsdaten; anisotrope Verfeinerung für alle Nicht-H-Atome [21].
- [12] Kristallstrukturanalyse von **3**: tetragonal, $I4/mcm$ (Nr. 140), $a = b = 8.026(2)$, $c = 14.203(6)$ Å, $V = 914.9(5)$ Å³, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.417$ g cm⁻³, $R = 0.0621$ für 190 beobachtete Reflexe mit [$F_0 > 2\sigma(F_0)$]. Die Struktur zeigt eine streng lineare polymere Ausbreitung entlang der tetragonalen Achse, die Pyrazin-Liganden sind abwechselnd um 90° verdreht, mit Ag-N-Bindungen von 2.168(14) Å [21].
- [13] Verbindung **1b**: $a = b = 10.725(6)$, $c = 23.481(6)$ Å, $V = 2700.9$ Å³. – Verbindung **1c**: $a = b = 10.794(3)$, $c = 23.566(15)$ Å, $V = 2745.7$ Å³.
- [14] K.-W. Kim, M. G. Kanatzidis, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4878.
- [15] Die Kristalle von **2** sind orthorhombisch, $Fmmm$ (Nr. 69), $a = 15.442(2)$, $b = 15.495(3)$, $c = 15.630(3)$ Å, $V = 3739.8(11)$ Å³, $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.074$ g cm⁻³. Datensammlung im Bereich $3^\circ < \theta < 25^\circ$. Die SbF₆⁻-Ionen befinden sich in zwei speziellen Lagen, in beiden Fällen fehlgeordnet (nur eine Lage ist in Abb. 4 zu sehen). $R = 0.0432$ für 565 unabhängige beobachtete Reflexe mit [$F_0 > \sigma(F_0)$]. Weitere experimentelle Bedingungen wie unter Verbindung **1a** beschrieben [21]. Die Kristalle sind pseudokubisch, aber die Zugehörigkeit zu einer orthorhombischen Kristallklasse wurde anhand der Aufspaltung der ausgewählten Signale des Pulver-Diffraktogramms bestätigt. Dieses zeigt ebenso den homogenen Aufbau der Pulverproben.
- [16] a) B. F. Hoskins, R. Robson, N. V. Y. Scarlett, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2025. b) Ein Gutachter hat darauf hingewiesen, daß Rb[Cd(Ag(CN)₂)₃] isomorph K[Co(Au(CN)₂)₃] ist: S. C. Abrahams, J. L. Bernstein, R. Liminga, E. T. Eisenmann, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 4585.
- [17] T. Soma, H. Yuge, T. Iwamoto, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1746; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1665.
- [18] Nur zwei Beispiele von Komplexen mit Ag⁺-N₆-Chromophoren, beide mit makrocyclischen Liganden, wurden bereits veröffentlicht: a) J. de Mendoza, E. Mesa, J.-C. Rodriguez-Ubis, P. Vazquez, F. Vögtle, P.-M. Windsscheif, K. Rissanen, J.-M. Lehn, D. Lilienbaum, R. Ziessel, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1365; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1331; b) C. Stockheim, K. Wieghardt, B. Nuber, J. Weiss, U. Florke, H.-J. Haupt, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1991**, 1487.
- [19] a) P. W. Carreck, M. Goldstein, E. M. McPartlin, W. D. Unsworth, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 1634; b) J. Darriet, M. S. Haddad, E. N. Duesler, D. N. Hendrickson, *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 2679; c) J. S. Haynes, S. J. Rettig, J. S. Sama, R. C. Thompson, J. Trotter, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 420.
- [20] L. Carlucci, G. Ciani, D. M. Proserpio, A. Sironi, unveröffentlicht.
- [21] Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1EZ, unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.

Platinierungsmechanismen für Reaktionen von Cisplatin mit GG-Einzelstrang- und -Doppelstrang-Decanucleotiden **

Kevin J. Barnham, Susan J. Berners-Price, Tom A. Frenkel, Urban Frey und Peter J. Sadler*

Das Antitumormittel Cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], verhindert Replikation und Transkription durch die Bildung von Pt-DNA-Addukten, meist Quervernetzungen zwischen dem gleichen Strang angehörigen Guanin-Guanin (GG)- oder Adenin-Guanin (AG)-Einheiten^[1, 2]. Deshalb ist es wichtig, zu verstehen, welche Mechanismen bei der DNA-Platinierung wirksam sind und wie die Adduktbildung die Struktur der Doppelhelix verändert. Als geschwindigkeitsbestimmender Reaktionsschritt gilt die Hydrolyse von Cisplatin, gefolgt von einzähniger Komplexierung des Platins durch N7 entweder von 3'- oder 5'-G. Der Ringschluß unter Bildung des GG-Pt-Chelates beendet die Reaktion. Ein direkter Nachweis des bei diesem Mechanismus intermediär auftretenden Aquaplatin-Komplexes ist jedoch außerordentlich schwierig. Bancroft et al.^[3] versuchten ihn mit ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektroskopie zu erbringen, scheiterten aber selbst mit ¹⁹⁵Pt angereicherten Proben und hohen Konzentrationen an DNA-Oligomeren (ca. 14–32 mM). Sie konnten allerdings die intermediäre einzähnige Komplexierung beobachten und in einer unabhängigen Studie zur Wechselwirkung des Aqua-chloro-Komplexes mit DNA die Geschwindigkeitskonstante der Ringschlußreaktion bestimmen. Kürzlich benutzten Chottard et al.^[4, 5] eine HPLC-Trapping-Methode, um die Geschwindigkeitskonstante des Angriffs von Diaqua-Cisplatin (Cl ersetzt durch H₂O) auf GG-Oligonucleotide und die der nachfolgenden Ringschlußreaktion zu bestimmen. Wir zeigen nun, daß die wichtigsten während der Platinierungsreaktion von GG-Oligonucleotiden in Einzel- und Doppelstrang-DNA mit ¹⁵N angereichertem Cisplatin vorkommenden Spezies alle gleichzeitig mit ¹H, ¹⁵N-NMR-Spektroskopie beobachtet werden können. Wir konnten erstmalig die Lebensdauer des nur in mikromolaren Mengen vorhandenen Aqua-chloro-Zwischenproduktes messen und Unterschiede der Platinierungsmechanismen für Einzel- und Doppelstrang-DNA feststellen. Sowohl die ¹H- als auch die ¹⁵N-Resonanzsignale reagieren auf die von Cisplatin verursachte Helixdenaturierung. Die Methode ist generell auf eine Reihe von DNA-Substraten und Ammin- und Aminplatin-

* Prof. Dr. P. J. Sadler, Dr. K. J. Barnham

Department of Chemistry, Birkbeck College, University of London

Gordon House and Christopher Ingold Laboratories

29 Gordon Square, GB-London WC1H 0PP (Großbritannien)

Telefax: Int. +171/380-7464

E-mail: ubca424@ccs.bbk.ac.uk

Dr. S. J. Berners-Price

Faculty of Science and Technology

Griffith University

Nathan, Brisbane 4111 (Australien)

Dr. T. A. Frenkel

Biomedical NMR Centre

National Institute for Medical Research

The Ridgeway, Mill Hill, GB-London NW7 1AA (Großbritannien)

Dr. U. Frey

Institut de Chimie Minerale et Analytique

University of Lausanne, BCH

CH-1015 Lausanne (Schweiz)

** Diese Arbeit wurde gefördert vom Medical Research Council, vom Australian NH & MRC (R. Douglas Wright Award für S.J.B.-P.), vom British Council, von der Association for International Cancer Research und von EG-HCM-(CHRX-CT92-0016)- und COST-(D1-0002-92)-Programmen. Den Mitgliedern dieser Gremien danken wir auch für die stimulierenden Diskussionen. Für ihre Hilfe bei der deutschen Übersetzung danken wir Heike Schmitt und Sabine Best.

Komplexe anwendbar und verspricht neue Einsichten in die Faktoren, welche die Pt-DNA Wechselwirkung beeinflussen.

Wir untersuchten die Platinierung des Desoxydecanucleotides I und die des Doppelstranges III aus den komplementären Desoxydecanucleotiden I und II mit ^{15}N -markiertem Cisplati-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5'-d(A C A T G G T A C A)									
3'-d(T G T A C C A T G T)									

I II Duplex aus I + II = III

20 19 18 17 16 15 14 13 12 11

tin, *cis*-[PtCl₂($^{15}\text{NH}_3$)₂] 1 um die ^1H - und ^{15}N -Resonanzsignale der Pt-NH₃-Gruppen durch ^1H { ^{15}N }-NMR-Techniken mit inverser Detektion zu ermitteln^[6]. Wendet man zusätzlich noch Feldgradientenpulse an^[7], so können die lediglich in mikromolekularen Mengen vorkommenden Zwischenprodukte beobachtet und Signale unterschieden werden, deren chemische Verschiebungen sehr nahe an der des Resonanzsignals der Wasserprotonen liegen.

Die Reaktion von 1 mit Einzelstrang-DNA I (Molverhältnis ca. 1:1, 1.3 mM, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.1, 90% H₂O/10% D₂O, 310 K) wurde mit einer Serie von ^{15}N -editierten ^1H -NMR-Spektren verfolgt. Zugeordnet wurden die Signale mit der chemischen Verschiebung der ^{15}N -Kerne aus den 2D [^1H , ^{15}N]-Spektren. Die letzteren belegen die *trans*-Stellung des Liganden (X) zur Ammingruppe des Platinkomplexes: X = O, $\delta = -95$ bis -75 ; X = N oder Cl, $\delta = -70$ bis -50 ^[8].

Während der ersten Minuten wurden die Resonanzen des Hydrolyseproduktes 2 (Signal 2a: ^{15}N *trans* zu Cl und Signal 2b: ^{15}N *trans* zu O) beobachtet^[9] (Abb. 1). Sie erreichten ihre maximale Intensität nach etwa 40 min und wurden danach weniger intensiv. Nach 5 h waren sie nicht mehr sichtbar (d.h. sie rührten von <1% aller Amminplatin-Komplexe her). Das Hydrolyseprodukt 2 war mit dieser Methode klar zu beobachten, selbst in Konzentrationen von etwa 10 μM .

Das Paar der Signale der Verbindung 3 (3a: $\delta = 4.45/-65.8$ und 3b: $\delta = 4.11/-68.7$) erschien ebenfalls während der ersten 30 min (Abb. 1). Die Signale erreichten ihre maximale Intensität nach etwa 4.5 h und verloren danach an Intensität. Die chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Resonanzen ähneln denen des 5'-Guanosinmonophosphat(GMP)-Komplexes^[10] *cis*-[PtCl(GMP-N7)(NH₃)₂]⁺^[6, 11] mit einzähniger Koordination. Daher ordnen wir diese Signale einem Komplex zu, dessen Nukleotideinheit einzähnig über N7-G an Pt gebunden ist, und zwar entweder über 3'- oder 5'-G des Oligonucleotides I (G(5) bzw. G(6)).

Kurze Zeit später wurde ein weiteres Zwischenprodukt 4 anhand seiner Resonanzen (4a: $\delta = 4.40/-65.9$; 4b überlappend mit dem Signal 3b und einem ^{195}Pt -Satelliten des Signals 1) beobachtet (Abb. 1). Aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebung dieser Resonanzen sowie der Ähnlichkeit in der Zeitabhängigkeit ihrer Konzentrationen können den Zwischenprodukten 3 und 4 einzähnig über N7-G(5) und N7-G(6) an Platin koordinierte Einzelstränge zugeordnet werden, d.h. die Komplexe *cis*-[PtCl(I-N7-G)(NH₃)₂] 5 mit zweizähniger Koordination weiterreagieren. Signale, die 5 zugeordnet werden können (5a: $\delta = 4.55/-68.4$; 5b: $\delta = 4.62/-66.6$), erschienen erstmals nach etwa 90 min und wurden bis zum Ende der Reaktion (20 h) immer intensiver. Es ist zu beachten, daß das Resonanzsignal von 5b sehr nahe am Resonanzsignal von Wasser liegt, und daß wir^[11, 12] in Nukleotid-Komplexen von Pt^{II}-Ammin-Komplexen eine solch starke Entschirmung ausschließlich für stark über-

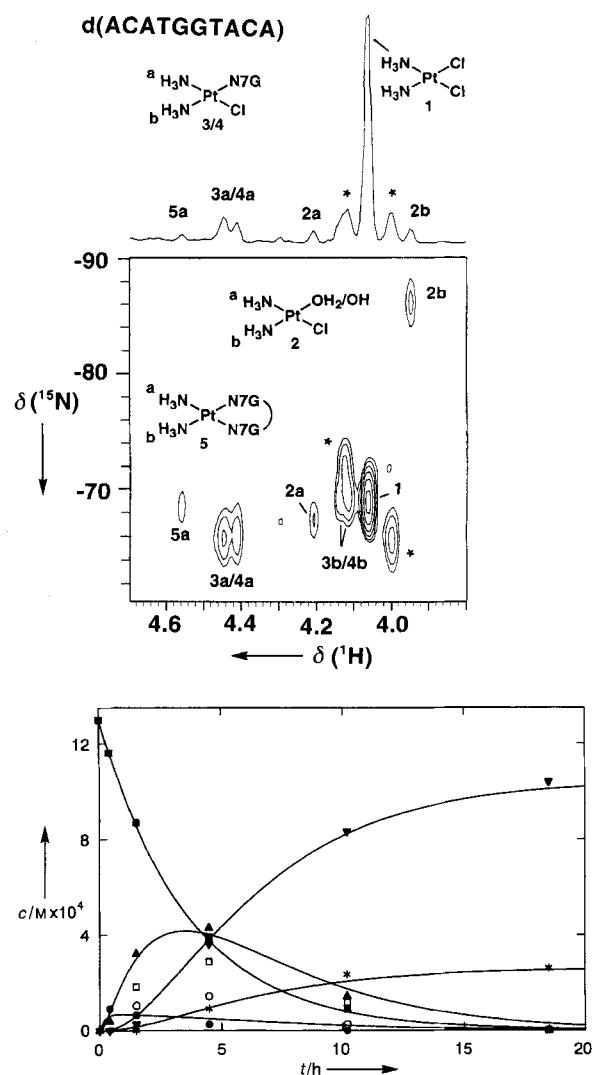
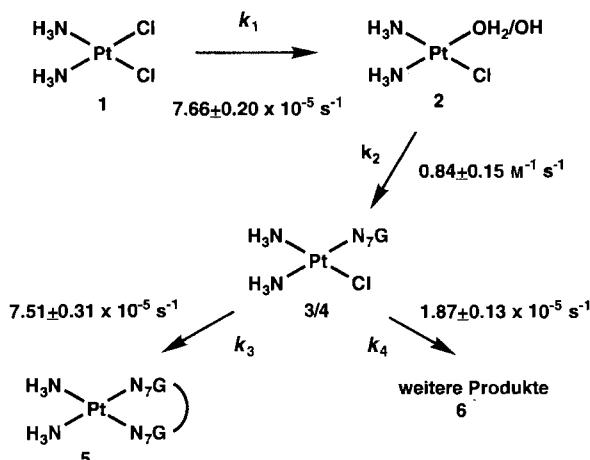


Abb. 1. Platinierung von einsträngigem d(ACATGGTACA) I mit *cis*-[PtCl₂($^{15}\text{NH}_3$)₂] 1 bei 310 K. Oben: 500-MHz 2D-[^1H , ^{15}N]-HSQC Spektrum nach 1.5 h Reaktionszeit (Akkumulationszeit 21 min), das die NH₃-Resonanzen zugeordnet zu den Strukturen 1–5 zeigt. Signal 5b (NH₃ *trans* zu N7-G(5), das durch die Wasserunterdrückung verdeckt ist (Tiefenfrequenzfilter, Varian Software)) wurde in einem ^{15}N -gekoppelten Spektrum bei $\delta = 4.62/-66.6$ beobachtet. Ein breites Signal für weitere Addukte (6) erschien nach 4 h (s. Text). Unten: Zeitabhängigkeit der relativen Konzentrationen der Spezies 1–6 (basiert auf den Integralen der Pt-NH₃-Signale. *cis*-Platin 1 (■), Aqua-chloro-Zwischenprodukt 2 (□), Pt-G-Zwischenprodukt mit einzähniger Koordination 3 oder 4 (○ und ▲), Summe von 3 + 4 (▲), GG-Chelat 5 (▼) und 6 (nicht zugeordnet) (*)). Die Kurven sind die beste Anpassung der Geschwindigkeitskonstante (siehe Schema 1) an die Daten (der Fehlerbereich entspricht einer Standardabweichung).

Wasserstoffbrücken an terminale 5'-Phosphatreste gebundene Pt-NH₃-Gruppen gefunden haben.

Nach 4 h Reaktionszeit wurde ein neues breites Pt-NH₃-Resonanzsignal ($\delta = 4.52/-65.1$) sichtbar. Die zeitabhängige Konzentrationszunahme der zu diesem Signal gehörenden Spezies (6) ist in Abbildung 1 unten dargestellt. Nach Vergleich der Signalintegrale macht 5 80% der am Ende der Reaktion vorhandenen Pt-NH₃-Spezies aus und Addukt 6 die restlichen ca. 20%. Da Signal 6 bei der Reaktion von 1 mit Duplex-DNA nicht beobachtet wurde (siehe unten), kann es einem durch beide Strände vernetzten Komplex, z.B. durch N1-G, welches in Duplexen nicht zugänglich ist, zugeordnet werden.

Die kinetische Analyse der Daten als eine Serie von Folgereaktionen erster und zweiter Ordnung ergab die in Schema 1 gezeigten Geschwindigkeitskonstanten^[13].



Schema 1.

Die Halbwertszeit von 2.51 h für den ersten Hydrolyseschritt stimmt mit Werten für die Hydrolyse von Cisplatin^[14] und mit dem Wert von Bancroft et al.^[3], der für das Verschwinden von Cisplatin während dessen Reaktion mit doppelsträngiger Hühner-Erythrozyt-DNA unter ähnlichen Bedingungen ¹⁹⁵Pt-NMR-spektroskopisch gemessen wurde (1.9 h), überein, und die Halbwertszeit des Aqua-Zwischenprodukts von 0.14 h (unter den genannten experimentellen Bedingungen) liegt nahe dem von Bancroft et al. geschätzten Wert von 0.1 h^[3]. Die Zwischenprodukte (3 und 4) sind während der Reaktion in einem Verhältnis von etwa 2:1 vorhanden. Die überwiegende Spezies könnte das 5'-G(G(5))-Addukt 3 sein, da die von *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ gebildeten 3'-G-Addukte ca. zehnmal schneller Ringschlußreaktionen eingehen als die 5'-G-Addukte. In unseren Experimenten wurde eine Halbwertszeit von 2.6 h für die Umwandlung der Addukte mit einzähniger Koordination in solche mit zweizähniger Koordination ermittelt. Dieser Wert ähnelt dem für die Reaktion mit einsträngiger Hühner-Erythrozyt-DNA ermittelten Halbwertszeit (2.1 h) und ist in Übereinstimmung mit einem auch hier Hydrolyse-kontrollierten Reaktionsschritt.

Der platinierter Duplex *cis*-[Pt(III)-N7-G(5),N7-G(6))(NH₃)₂] 7 wurde durch Reaktion einer Lösung von platiniertem I, das im Gleichgewicht mit nicht komple-

xiertem I stand, mit II gleicher Konzentration erhalten. Das ¹⁵N-editierte ¹H-NMR-Spektrum (283 K) enthält zwei scharfe Resonanzsignale bei $\delta = 4.48$ und 4.26, die den Protonen des Addukts 7 mit zweizähniger Koordination zugeordnet werden können, und ein weiteres nicht aufgelöstes Resonanzsignal bei $\delta = 4.6$ von anderen Pt-NH₃-Spezies. Platinierter Duplex wurde auch durch direkte Reaktion von I mit III bei 293 K erhalten (die Temperatur wurde erhöht, um sicherzustellen, daß die DNA doppelsträngig vorliegt). Die Reaktion war langsam, was in Übereinstimmung damit steht, daß die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist. Nur etwa 60% des Cisplats reagierten während der ersten 24 h, und in diesem Zeitraum wurden sowohl Signale für 2, N7-G(5)- und N7-G(6)-Addukte mit einzähniger Koordination, zumindest ein anderes Zwischenprodukt, als auch Signale für die Produkte 7 und 8 beobachtet, die im folgenden beschrieben werden. Eine kinetische Analyse steht noch aus. Das nach beendeter Reaktion von I mit III^[15] erhaltene ¹⁵N-editierte ¹H-NMR-Spektrum ist in Abbildung 2 gezeigt. Die chemischen Verschiebungen des Signalpaars von 7, dem Addukt mit zweizähniger Koordination, sowie ihre Temperaturabhängigkeit sind identisch mit jenen des Produkts, das durch Reaktion von II mit dem platinierten Einzelstrang I erhalten wurde (Daten nicht gezeigt). Zwischen 298 und 303 K verschwinden die Signale für 7, und bei Temperaturen > 303 K erscheinen zwei neue Signale (7'a und 7'b), die ähnliche Verschiebungen wie die des Einzelstrang-GG-Chelatkomplexes 5 zeigen. Diese (reversible) Temperaturabhängigkeit kann der Denaturierung der platinierten Doppelhelix mit einem T_m -Wert von ungefähr 300 K zugeschrieben wer-

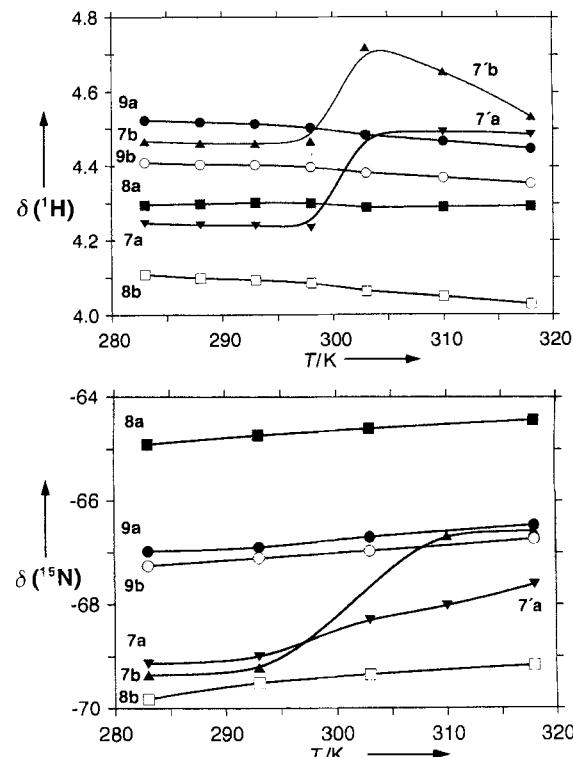
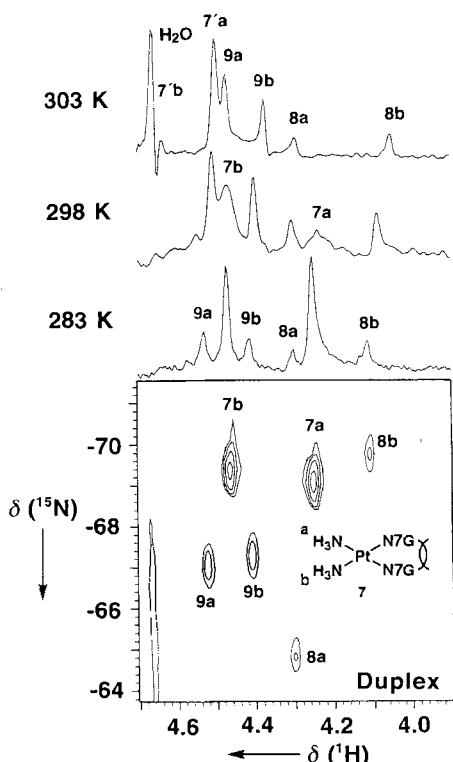


Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der ¹H- und ¹⁵N-NMR-Verschiebungen der platinierten Doppelhelix, die durch die Reaktion von *cis*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂] I gleicher Konzentration mit d(ACATGGTACA)-d(TGTACCATGT) III (5 d bei 297 K) erhalten wurde. Links: 600-MHz-2D-[¹H,¹⁵N]-HSQC Spektrum bei 283 K, das die Signale für *cis*-[Pt(III)-N7-G(5),N7-G(6))(NH₃)₂] und Spezies 8 und 9 (nicht zugeordnet, siehe Text) zeigt. 1D-¹H{¹⁵N}-editierte Spektren mit Pt-NH₃-Resonanzen bei verschiedenen Temperaturen sind ebenfalls gezeigt. Rechts: Temperaturabhängigkeit der ¹H- und ¹⁵N-NMR-Verschiebungen der platinierten Doppelhelix. Zwischen 298 und 303 K verschwindet das Resonanzsignal für 7 nach und nach und bei Temperaturen > 303 K erscheinen zwei neue Signale (7'a und 7'b), die ähnliche chemische Verschiebungen wie die des einsträngigen GG-Chelats 5 haben. Wie für den platinierten Einzelstrang wird das Signal 7'b, verdeckt durch die Wasserresonanz, nur im ¹⁵N-gekoppelten Spektrum gesehen. Das Verhalten dieses Signals bei hoher Temperatur ist besonders beachtenswert.

den^[16], der, wie erwartet, ca. 10 K tiefer liegt als für die unplatierte Doppelhelix^[17].

Zwei weitere stabile Addukte (**8** und **9**, Abb. 2) wurden bei der Reaktion von **I** mit **III** erhalten. Diese wurden bei der Zugabe von **II** zu dem platinierten Einzelstrang **I** nicht beobachtet und auch von der Denaturierung der Doppelhelix nicht beeinflußt. Es scheint deshalb wahrscheinlich, daß sie durch eine Pt-Komplexierung an den terminalen G(12)- und G(19)-Einheiten des komplementären Stranges **II** verursacht werden. Die ¹⁵N-chemischen Verschiebungen für **8** und **9** (Abb. 2) liegen im Bereich für Pt-NH₃ *trans* zu entweder N oder Cl, und es ist deshalb auf dieser Basis nicht möglich, zwischen Addukten mit einzähniger und zweizähniger Koordination zu unterscheiden. Eine Quervernetzung zwischen zwei verschiedenen Strängen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die starke Tieffeldverschiebung des Pt-NH₃-Resonanzsignals 5b des platinierten Einzelstrang-GG-Adduktes **5** ist erstaunlich. Solch eine Verschiebung wurde bei der platinierten GG-Doppelhelix **7** erst bei ihrer Denaturierung beobachtet (Signal 7b'). Der Verlust dieser Tieffeldverschiebung bei hohen Temperaturen (Abb. 2, rechts) ist ein Indiz dafür, daß platinierete GG-Einzelstrang-Addukte eine Sekundärstruktur haben, die durch Erwärmung zerstört wird. Dies könnte wichtige funktionelle Konsequenzen für platinierete DNA haben. Zur Klärung der Fragen, ob eine ähnliche Schleifenstruktur vorliegt wie jene, die für *cis*-[Pt(NH₃)₂{d-TCTCGGTCTC-N7(5),N7(6)}] vorgeschlagen wurde^[18], oder ob starke Wechselwirkungen mit den terminalen Basen oder Wasserstoffbindungen zur Pt-NH₃-Einheit^[11] eine Ringstromverschiebung verursachen, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß ¹H, ¹⁵N korrelierte NMR-Spektroskopie für Studien der Platinierungsmechanismen von DNA bei niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden kann, da sich alle wichtigen Zwischenprodukte beobachten lassen. Das hydrolysierte Cisplatin hat bei 310 K in Reaktionen von Cisplatin mit einsträngigem GG-Desoxydecanucleotid eine Halbwertszeit von nur 8 min. Ein Pt-N7-G-Zwischenprodukt mit einzähniger Koordination dominiert in einem Verhältnis von 2:1 über das andere, was entweder mit einem schnelleren 3'- oder 5'-G Angriff an GG und/oder einem schnelleren Ringschluß erklärt werden kann. Weitere Experimente mit dem Aquachloro-Komplex sollen das Problem ergänzend zu den bekannten HPLC-Experimenten^[4] angehen. Wie erwartet, scheinen sowohl die erste Bindung von Cisplatin an GG als auch der Ringschluß durch die Hydrolysegeschwindigkeit der Pt-Cl-Einheit bestimmt zu sein. Die NH₃-Resonanzsignale sind sehr empfindlich gegenüber Denaturierung der platiniereten Doppelhelix und deuten auf eine Sekundärstruktur des platiniereten Einzelstranges hin. Diese Methode sollte auf eine große Zahl von Oligonucleotiden anwendbar sein und auch zu einem besseren Verständnis des Pt-Angriffs an bestimmte DNA-Sequenzen führen, was sich als hilfreich beim Design von neuen Therapeutika erweisen könnte.

Experimentelles

cis-[PtCl₂(¹⁵NH₃)₂] wurde wie beschrieben hergestellt [19] und aus wässriger KCl-Lösung umkristallisiert. Die ¹H(¹⁵N)-NMR-Spektren wurden entweder mit einem Varian-UNITY-plus-500- oder einem UNITY-plus-600-Spektrometer aufgenommen, die mit Modulen für gepulzte Gradientenfelder ausgerüstet waren. Chemische Verschiebungen der Protonensignale wurden auf TSP (Me₃Si(CD₃)₂CO₂Na, intern) bezogen, der Standard für ¹⁵N-Spektren war 1.5 M NH₄Cl in 1 M HCl (extern). Sowohl die 1D-¹⁵N-edierten-¹H-NMR-Spektren wie auch die 2D-[¹H, ¹⁵N]-HSQC-Spektren (optimiert auf J(N,H) = 72 Hz) wurden mit der von Stonehouse et al. [7] beschriebenen Pulssequenz aufgenommen. In dieser Sequenz werden die Auswahl der Kohärenzen und die Unterdrückung des Wassersignals durch Gradientenpulse erreicht, und die Magnetisierung der Wasserprotonen wird vor Beginn der

Akkumulation in die Position des thermischen Gleichgewichts (+z-Achse) gebracht. Die ¹⁵N-Spins wurden während der Akkumulation des FID durch Anregung mit der GARP-1-Sequenz mit einer Feldstärke von 1 kHz entkoppelt.

Eingegangen am 24. März 1995 [Z 7832]

Stichworte: Antitumormittel · DNA · NMR-Spektroskopie · Nucleotide · Platinverbindungen

- [1] S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 1153–1181.
- [2] J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198–200*, 873–881.
- [3] D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860–6871.
- [4] F. Gonnet, J. Kozelka, J.-C. Chottard, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1494; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1483–1485.
- [5] J. C. Chottard, *Proc. EUROBIC II*, Florence, Italy, Aug 30–Sept 3, **1994**, Abs. p 84.
- [6] S. J. Berners-Price, T. A. Frenkel, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 2137–2139.
- [7] J. Stonehouse, G. L. Shaw, J. Keeler, E. D. Laue, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *107*, 174–184.
- [8] T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4685–4693.
- [9] S. J. Berners-Price, T. A. Frenkel, U. Frey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 789–791. Auch geringe Phosphatkoordination ist möglich.
- [10] Die Ladungen der Nucleotide werden in den Formeln ignoriert.
- [11] S. J. Berners-Price, U. Frey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8649–8659: δ = 4.38/–66.4 N *trans* to Cl; δ = 4.09/–69.1 N *trans* to NH₃.
- [12] S. J. Berners-Price, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5842–5846.
- [13] Die entsprechenden Differentialgleichungen wurden numerisch integriert, und die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit nichtlinearer Optimierung bestimmt. Die angegebenen Fehler entsprechen einer Standardabweichung. Um eine gute Angleichung der Daten für Komplex **2** zu erreichen, war es notwendig, vorauszusetzen, daß **I** in geringem Überschuß (20%) gegenüber **1** im Ansatz vorhanden war; etwa 20% **I** schien im Gleichgewichtszustand unreaktiert vorhanden zu sein. Wir konnten ein Modell ausschließen, bei dem jedes Zwischenprodukt nur je ein Produkt ergibt (z.B. **3** reagiert zu **5**, und **4** reagiert zu **6**), weil es sich nicht an die Daten angleichen ließ. Eine umfassendere kinetische Analyse verlangt eine detailliertere Auswertung der Fehler, die beim Messen von Konzentrationen durch Signalintensität auftreten (Probleme durch Überlappung und Nähe zum Lösungsmittelsignal), und die Identifikation der unbekannten Produkte.
- [14] S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *161*, 131–137.
- [15] Durch Mischen von **I** und **II** in gleicher Konzentration (1.5 mM, 20 mM Phosphat-Puffer, pH 6.82). Sieben der zehn Iminoprotonen-Resonanzen wurden bei 278 K beobachtet: vier in der Region δ = 13.4 bis 13.6 (A-T-Basenpaare) und drei in der Region δ = 12.5 bis 12.7 (G-C-Basenpaare), übereinstimmend mit einem Austauschen des terminalen A-T-Basenpaares und einem schnellen Wasseraustausch entweder des C(9)-G(12)- oder des C(2)-G(19)-Basenpaares. Ein G-C- und ein A-T-Resonanzsignal begannen eine Austauschlinienverbreiterung bei 293 K und zeigten schnellen Austausch mit Wasser bei 303 K, wenig unterhalb der Austauschtemperatur der restlichen G-C- und A-T-Einheiten (303–310 K).
- [16] Das ¹H-NMR Spektrum von **III**-Pt (gebildet entweder durch direkte Platinierung von **III**, oder Zugabe von **II** zu **I**-Pt) unterstreicht die Zuordnung von **7** als *cis*-[Pt(**III**-N7-G(5),N7-G(6))(NH₃)₂] und auch die Denaturierung der platiniereten Doppelhelix bei 300 K. Ein bei 283 K scharfes Signal (δ = 8.62) begann sich ab 293 K zu verbreitern und verschwand bei 303 K. Bei Temperaturen über 313 K wurde ein neues breites Resonanzsignal bei δ = 8.96 beobachtet, das bei 328 K schärfer wurde. Diese chemische Verschiebung ähnelt der eines breiten Resonanzsignals für **I**-Pt (δ = 8.98) bei 310 K, das einem der G-H-Protonen des Adduktes **5** mit zweizähniger Koordination zugeordnet werden kann, und das Signal verhält sich ähnlich wie die von ein- und doppelsträngigen GG-Chelatkomplexen von d(TCTGGTCTC): J. H. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, C. A. G. Hasnoot, J. Reedijk, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *2*, 1137.
- [17] C. J. van Garderen, H. van den Elst, J. H. van Boom, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4123–4125. Temperaturniedrigungen von 9–27° sind typisch.
- [18] T. P. Kline, L. G. Marzilli, D. Live, G. Zon, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7057–7068.
- [19] S. J. S. Kerrison, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 861–864.