

# **Untersuchung neuartiger NSAR-Derivate als Tumorthérapeutika mit COX inhibierender Wirkstoffkomponente**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Kerstin Bensdorf  
aus Berlin

2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2007 bis Februar 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am: 13.10.2014

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust danke ich für die Vergabe des interessanten und vielfältigen Themas, für die Freiheit bei der Bearbeitung, für das in mich gesetzte Vertrauen, für die Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises um Prof. Gust für das angenehme Arbeitsklima und ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Im Besonderen danke ich Gerhard Rubner und Wukun Liu für die zur Verfügung gestellten sehr interessanten Substanzen und für die gute Zusammenarbeit.

Ebenfalls gilt mein Dank Heike Scheffler, die immer ein offenes Ohr hatte und durch aufmunternde Worte und großes technisches Wissen eine tolle Unterstützung war.

Bei Anja Dickert möchte ich mich ebenso für die tollen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und das offene Ohr herzlich bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Silke Bergemann für die intensive Zusammenarbeit, die immer währenden aufmunternden Worte, die kreativen Hilfestellungen und für die daraus gewachsene tolle Freundschaft.

Mein Dank gilt auch Frau vom Bauer für ihre Hilfsbereitschaft und Übernahme von vielen organisatorischen Dingen.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Mann, für die immer währende Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

# **Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Mammakarzinom.....	3
1.2 Estrogene .....	4
1.2.1 Bedeutung und Wirkung.....	4
1.2.2 Synthese der Estrogene.....	5
1.2.2.1 Aromatase.....	6
1.2.2.2 Mechanismus der Aromatase-Reaktion.....	7
1.2.2.3 Pathophysiologische Aromatase-Expression.....	8
1.3 Prostaglandine .....	9
1.3.1 Physiologische Bedeutung der Prostaglandine.....	10
1.4 Prostaglandin E <sub>2</sub> .....	11
1.4.1 Physiologische Bedeutung von Prostaglandin E <sub>2</sub> und der EP-Rezeptoren	11
1.4.2 Synthese des Prostaglandin E <sub>2</sub> .....	13
1.4.2.1 Phospholipase A <sub>2</sub> .....	15
1.4.2.2 Cyclooxygenasen.....	15
1.4.2.3 Prostaglandin E <sub>2</sub> -Synthasen.....	19
1.4.3 Bedeutung des Prostaglandin E <sub>2</sub> und der Cyclooxygenase bei malignen Erkrankungen.....	21
1.5 Apoptose.....	23
1.6 Ansatzpunkte neuer Wirkstoffe .....	28
2 Zielsetzung.....	29
3 Darstellung der Arbeit .....	30
3.1 Methoden.....	30
3.1.1 Testsysteme zur Untersuchung auf Cyclooxygenase-Hemmung .....	31
3.1.1.1 Cyclooxygenase-1/-2 Assay .....	31
3.1.1.1.1 Prinzip .....	31
3.1.1.1.2 Durchführung .....	31
3.1.1.1.3 Auswertung .....	32
3.1.1.2 Prostaglandin E <sub>2</sub> Assay.....	33

---

3.1.1.2.1	Prinzip .....	33
3.1.1.2.2	Durchführung .....	34
3.1.1.2.3	Auswertung .....	34
3.1.2	Testsysteme zur Untersuchung auf Apoptoseinduktion .....	34
3.1.2.1	Acridinorange-Färbung .....	34
3.1.2.1.1	Prinzip .....	35
3.1.2.1.2	Durchführung .....	35
3.1.2.1.3	Auswertung .....	35
3.1.2.2	Caspase-3 Assay .....	36
3.1.2.2.1	Prinzip .....	36
3.1.2.2.2	Durchführung .....	36
3.1.2.2.3	Auswertung .....	37
3.1.2.3	Thioredoxin Reduktase Assay .....	37
3.1.2.3.1	Prinzip .....	38
3.1.2.3.2	Durchführung .....	38
3.1.2.3.3	Auswertung .....	38
3.2	Ergebnisse .....	39
3.2.1	Untersuchungen von metallhaltigen Aspirin-Derivaten .....	39
3.2.2	Untersuchungen von Licofelon-Derivaten .....	47
3.2.3	Untersuchungen von goldhaltigen Verbindungen .....	50
4	Diskussion .....	53
4.1	Diskussion der Ergebnisse der metallhaltigen Aspirin-Derivate .....	53
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Licofelon-Derivate .....	55
4.3	Diskussion der Ergebnisse der goldhaltigen Verbindungen .....	56
5	Ausblick .....	58
6	Zusammenfassung .....	60
6.1	Zusammenfassung .....	60
6.2	Summary .....	61
7	Abkürzungsverzeichnis .....	63
8	Literaturquellen .....	67
9	Publikationen .....	88
10	Posterpräsentationen und Vorträge .....	169

# 1 Einleitung

## 1.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit 31,3% der Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau. Jedes Jahr erkranken rund 70.000 Frauen. Schätzungsweise jede achte Frau bekommt im Laufe ihres Lebens einen solchen Tumor [1]. Jährlich sterben in Deutschland rund 17.500 Frauen an diesen Karzinomen. Mittlerweile nimmt das Mammakarzinom mit 17,4% den 1. Platz aller Todesfälle an bösartigen Tumoren, gefolgt von kolorektalen und Bronchialkarzinomen, ein [1].

Seit langem ist bekannt, dass ein Großteil der Mammakarzinome (rund 60%) ein hormonabhängiges Wachstum aufweist. Estrogene, die unter physiologischen Bedingungen die Steuerung von Zellwachstum und Zelldifferenzierungen übernehmen, fördern gleichzeitig durch Aktivierung der Rezeptoren die Entwicklung und das Wachstum der Tumore [2,3,4]. Somit stellen die Estrogenrezeptoren (ER) eine Schlüsselrolle bei der Wachstumsregulierung von Mammatumoren dar [5]. Die Biosynthese der Estrogene (v.a. des  $17\beta$ -Estradiols (E<sub>2</sub>)) erfolgt mit Hilfe der Aromatase (P450 CYP19A1 Enzym), deren Expression in hormonabhängigen Brustkrebszellen erhöht ist und zu deutlich höheren E<sub>2</sub>-Spiegeln führt [6]. Zudem konnte die verstärkte Aromatase-Expression in Zusammenhang mit einer erhöhten COX-2 Expression und einer daraus resultierenden erhöhten PGE<sub>2</sub>-Konzentration gebracht werden [7, Kapitel 1.4.3].

Antitumorwirksame Arzneistoffe, die die estrogenen Effekte auf unterschiedlichste Weisen verhindern sollen, können sowohl ER-Antagonisten und SERM (Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren) als auch Aromatase-Inhibitoren und Substanzen, die den PGE<sub>2</sub>-Spiegel senken, darstellen.

## 1.2 Estrogene

### 1.2.1 Bedeutung und Wirkung

Estrogene gehören wie auch die Gestagene und Androgene zu den Steroidhormonen. Natürlich vorkommende Estrogene mit C18-Grundgerüst sind Estron (E1), 17 $\beta$ -Estradiol (E2) und Estriol (E3). 17 $\beta$ -Estradiol ist hierbei die wirksamste der drei Verbindungen [8].

Sie regulieren zusammen mit den Gestagenen im weiblichen Organismus essentielle biologische v.a. sexualspezifische Prozesse, wie z.B. die Embryonalentwicklung. Hinzu kommen ihre Wirkungen auf Uterus, Zervix, Vagina und Brust und damit auf die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale [9].

Estrogene besitzen aber zusätzlich auch noch eine Reihe sexualunspezifischer Wirkungen, z.B. hemmen sie den Knochenabbau und fördern das Knochenwachstum. Sie besitzen gefäßerweiternde Wirkungen durch Stimulation der Synthese von NO im Gefäßendothel, haben Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, die Blutzuckerwerte, den Melaningehalt der Haut und die Talgdrüsen und wirken somit protektiv. Auch psychotrope Effekte werden ihnen zugeschrieben [9,10].

Estrogene werden vorwiegend in den Eierstöcken, in Follikeln und im Gelbkörper produziert. Ebenfalls kann die Nebennierenrinde sie in geringen Mengen synthetisieren. Während der Schwangerschaft übernimmt die Plazenta die Synthese der Estrogene. Auch die männlichen Hoden produzieren kleine Mengen an Estrogenen, hinzu kommt, dass ein gewisser Teil des Testosterons im Fettgewebe in Estrogene umgewandelt wird [11].

Des Weiteren spielen Estrogene eine große Rolle bei der Zellproliferation, u.a. bei der Entwicklung von Tumoren in der Brust, im Endometrium und in den Ovarien [12].

Ihre Wirkung vermitteln die Estrogene über ihre Estrogenrezeptoren (ER). In den späten 1950iger Jahren konnten Jensen und Jakobson die Existenz eines 17 $\beta$ -Estradiol-bindenden Rezeptors nachweisen. 1986 gelang es Green et al. den ER aus menschlichen MCF7 Brustkrebszellen zu klonen, wobei auch die Primärstruktur bestimmt werden



konnte. Dieser erste ER wird heute als ER $\alpha$  bezeichnet, denn es gelang Kuiper et al. 1996 einen weiteren Estrogenrezeptor (ER $\beta$ ) nachzuweisen [13].

ER $\alpha$  und ER $\beta$  weisen eine unterschiedliche Gewebeverteilung auf. Sie werden nebeneinander in den Geweben des kardiovaskulären Systems, der Ovarien, der Hoden, des ZNS und der Brust exprimiert. Im Uterus und in der Leber ist ausschließlich der ER $\alpha$  lokalisiert, wohingegen der ER $\beta$  allein in Geweben des Darms, der Harnwege und der Prostata nachgewiesen wurde. Durch die unterschiedliche Gewebeverteilung wird dem ER $\alpha$  eine größere Rolle bei den Fortpflanzungsvorgängen zugeschrieben [13, 14].

### 1.2.2 Synthese der Estrogene

Die Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Estrogene stellt das Cholesterol dar. Dieses kann in den Ovarien, den Hoden und in der Leber aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert oder aus der Nahrung aufgenommen werden. Über die Zwischenstufe der Gestagene (C21-Steroide) entstehen die Androgene (C19-Steroide). Anschließend erfolgt die Aromatisierung des Rings A und die Abspaltung der C19-Methyl-Gruppe. Dies wird durch die Aromatase katalysiert [11, 15]. Andere Gewebe nehmen zur Estrogenbiosynthese entweder Cholesterol oder Zwischenstufen der Biosynthese wie z.B. Androgene auf. Diese Vorstufen werden von der Leber, der Nebennierenrinde, den Ovarien und den Hoden sezerniert und über das Blut transportiert.

Die Umwandlung von Cholesterol in Androgene kann über zwei unterschiedliche Biosynthesewege ablaufen. Der eine Weg führt über Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA), der andere über Progesteron zu Androstendion. Abbildung 1.1 gibt hier eine Übersicht und kennzeichnet die verantwortlichen Enzyme. Substrate für die Aromatase können das Androstendion und Testosteron sein.

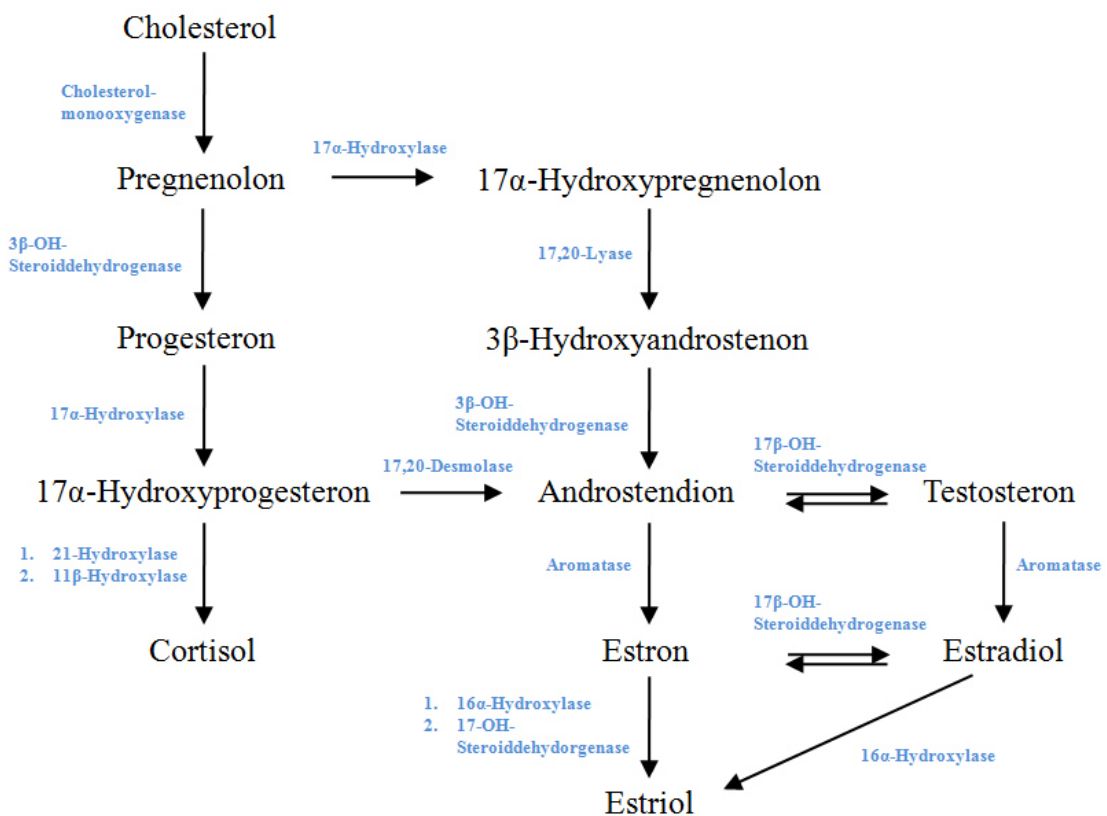


Abb. 1.1: Biosynthese der Estrogene

### 1.2.2.1 Aromatase

Die Aromatase gehört zur Gruppe der Cytochrom P450 (CYP P450) Enzyme. Diese stellen Hämproteine dar, bei denen Häm als prosthetische Gruppe am katalytischen Zentrum gebunden ist. Sie wird innerhalb der P450 Cytochrome den Steroidhydroxylasen zugeordnet, welche eine größere Spezifität für den Steroidmetabolismus zeigen als andere Mitglieder dieser Gruppe [11]. Eine weitere Zuordnung erfolgt über die Genfamilien, die definitionsgemäß innerhalb einer Unterfamilie eine Sequenz-Übereinstimmung von mehr als 55% bei Säugetierspezies fordert. Da die Aromatase aber nur eine 31%ige Sequenzhomologie zu anderen P450 Cytochromen besitzt, stellt die Aromatase das einzige Mitglied der Genfamilie 19 (CYP19) dar [15].

Sie wird im weiblichen Reproduktionstrakt im Ovar in präovulatorischen Follikeln exprimiert und nimmt mit deren Entwicklung zu. Es konnte auch bei Gelbkörpern ein hoher Aromatase-Gehalt nachgewiesen werden, der die signifikante Estrogensynthese in

der Lutealphase erklärt [16]. In der Gravidität wird das CYP-Enzym auch in der Plazenta exprimiert. Aber auch beim Mann wird sie gebildet, hier v.a. im Hoden. Außer in den Gonaden konnte die Aromatase auch im Gehirn, in der Leber, im Fettgewebe und in der Haut identifiziert werden. Hinzu kommen die Osteoblasten, Chondrozyten, das Gefäßendothel und die glatte Muskulatur der Aorta [17]. Die periphere Estrogensynthese findet hauptsächlich im Fettgewebe statt, wobei ein Unterschied in Aromatase-Gehalt und -Lokalisation im Fettdepot für die Estrogensynthese von Bedeutung ist. Ein Zusammenhang zwischen Fettgewebe/Estrogensynthese und Entwicklung von Osteoporose oder Brustkrebs wird u.a. bei der Frau nach der Menopause gesehen [17, 18].

In der Zelle ist die Aromatase vorwiegend in Mitochondrien sowie im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Sie liegt, wie alle bekannten eukaryotischen P450 Cytochrome, Membran-gebunden vor.

#### **1.2.2.2 Mechanismus der Aromatase-Reaktion**

Die Aromatase bildet einen Enzymkomplex mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, welches den Elektronenübergang bei der Substratoxidation vermittelt. Erst dadurch wird die Funktion des Aromatase-Proteins ermöglicht und das CYP19 kann den letzten Schritt in der Estrogensynthese katalysieren [19].

Dieser Übergang von Androgenen zu Estrogenen ist sehr komplex. Bei den ersten beiden Reaktionsschritten handelt es sich um Hydroxylierungs-Reaktionen an der C19-Methylgruppe des Steroidmoleküls, wobei über die 19-Hydroxyverbindung das 19-Oxo-Zwischenprodukt entsteht. Der dritte und letzte Oxidationsschritt ist noch nicht gänzlich geklärt. Man geht von einer Eisen-Peroxid vermittelten Reaktion aus, wobei die C19-Methylgruppe abgespalten wird und es zur Aromatisierung des Steroidrings A kommt. Mit Bildung des C18-Steroidkörpers ist die Estrogensynthese abgeschlossen [11, 19, 20, 21, 22].

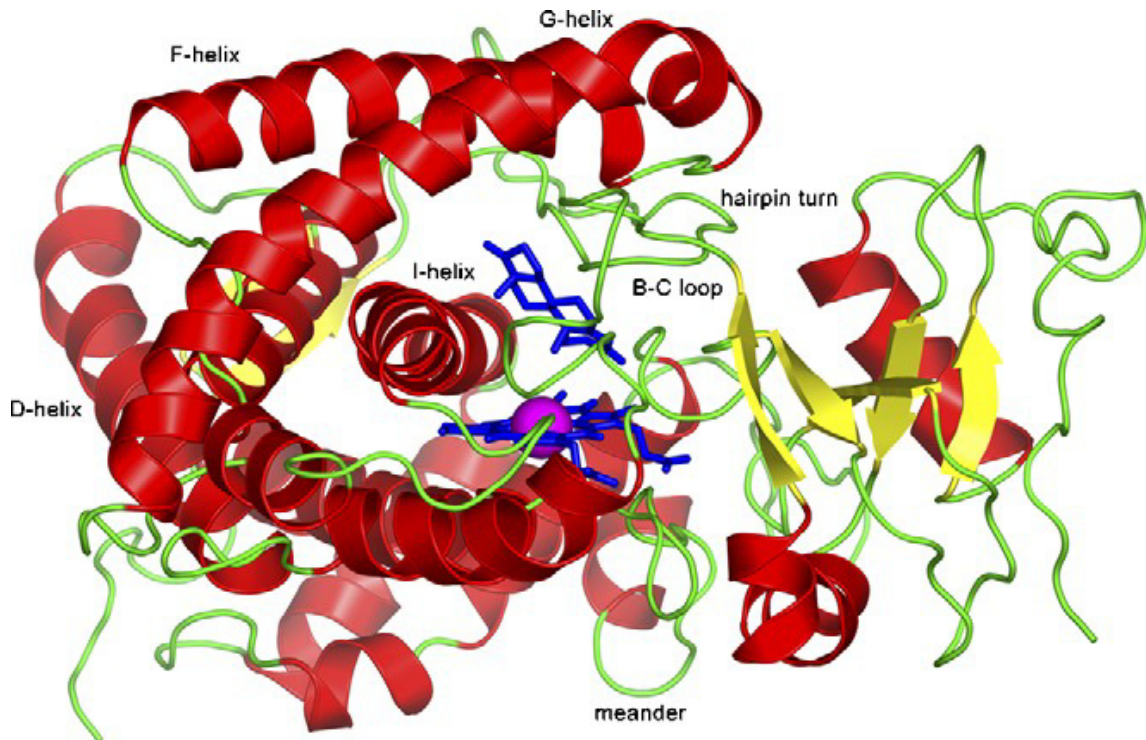


Abb. 1.2: Dreidimensionale Darstellung der Aromatase (aus [20]) Androstendion und Heme (blau), Heme-Eisen (magenta)

### 1.2.2.3 Pathophysiologische Aromatase-Expression

Etwa 60% aller Brustkrebspatientinnen haben ein hormonabhängiges Mammakarzinom, welches neben Progesteronrezeptoren Estrogenrezeptoren enthält und Estrogene für das Tumorwachstum benötigt. Den limitierenden Schritt in der Estrogensynthese stellt, wie oben beschrieben, die Aktivität der Aromatase dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität dieses Enzyms im Karzinomgewebe stark erhöht ist [23, 24], wodurch sich die extrem hohen lokalen und v.a. pathologischen E2-Konzentrationen erklären lassen. Es konnten 50-100fach höhere E2-Spiegel im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe nachgewiesen werden [25, 26, 27].

Ebenfalls spielt die Aromatase auch bei Erkrankungen von Gonaden, Plazenta, Prostata und Nebenniere eine Rolle und ist auch bei der Endometriose [28] zu finden.

Es ist mittlerweile bekannt, dass die Genregulierung des Cytochrom P450-Enzyms in verschiedenen Geweben durch gewebespezifische Promotoren erfolgt. Im normalen Brustgewebe erfolgt die Regulierung der Expression durch den Promotor I.4, welcher durch Zytokine (z.B. IL-6 und TNF $\alpha$ ) und Glucocorticoide reguliert wird. Im malignen

Brustgewebe wird hingegen ein sog. Promoter-Switch beobachtet, wodurch die Kontrolle der Aromatase-Expression und natürlich auch der Estrogensynthese von Promotor I.4 auf die Promotoren I.3 und II übergeht, welche durch cAMP reguliert werden [7, 26, 29]. Ein Faktor, der den cAMP-Spiegel beeinflusst, stellt das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dar. Dieses konnte ebenfalls in höheren Konzentrationen im Tumorgewebe nachgewiesen werden und führt über die Rezeptoren (EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub>) zur Erhöhung des cAMP-Levels [29].

Im Weiteren sollen die Prostaglandine, im Besonderen das Prostaglandin E<sub>2</sub>, ihre physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften und ihr Syntheseweg genauer beschrieben werden, um weitere Einblicke in die Tumorentstehung zu bekommen.

### 1.3 Prostaglandine

Der Name Prostaglandin leitet sich vom englischen „prostate gland“, der Prostata-drüse, ab. Im Jahr 1935 wurden Prostaglandine erstmals aus menschlicher Samenflüssigkeit isoliert und beschrieben [30]. Zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass sie ein Teil des Prostatasekrets sind. Im Laufe der Zeit zeigte sich aber, dass die Prostaglandine an den unterschiedlichsten Stellen im menschlichen Körper ausgeschüttet werden. Bergström und Samuelsson gelang 1962 die Strukturaufklärung von Prostaglandin E<sub>1</sub> und F<sub>1α</sub> (PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>1α</sub>) [31, 32, 33, 34]. Die Prostaglandinforschung wurde immer weiter vorangetrieben. 1971 entdeckte Vane die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch die „Aspirin-ähnlichen Substanzen“, die heute als „Non Steroidal Antiinflammatory Drugs“ (NSAIDs) bezeichnet werden, und beschrieb ihre analgetische, antipyretische und antiinflammatorische Wirkung [35].

Die Prostaglandine zählen zusammen mit den Leukotrienen und den Thromboxanen zur Gruppe der Eicosanoide. Die PG, die aus der essentiellen Fettsäure Arachidonsäure (all-Z-Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure) gebildet werden, werden als Prostaglandine der Serie 2 bezeichnet, da sie 2 Doppelbindungen im Molekül haben [36, 37, 38]. Hierzu gehören Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>).

### 1.3.1 Physiologische Bedeutung der Prostaglandine

Prostaglandine werden in nahezu allen Zelltypen des menschlichen Körpers gebildet und fungieren als autokrine sowie parakrine Lipidmediatoren. Sie wirken über ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, teils durch Aktivierung der Adenylatzyklase und daraus resultierendem cAMP-Anstieg, teils durch IP<sub>3</sub>-vermitteltem Ca<sup>2+</sup>-Anstieg. Ihre Funktionen sind je nach Art und Gewebe sehr verschieden und oftmals gegensätzlich. Die Wirkungen reichen z.B. von Vasokonstriktion (PGH<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>) über Vasodilatation (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), über Stimulation (TxA<sub>2</sub>) bzw. Inhibition der Blutplättchenaggregation (PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) bis hin zur Immunsuppression bzw. -modulation [39]. Einen Überblick über Vorkommen und Funktionen der Prostaglandine gibt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Prostaglandine: Vorkommen, Wirkung und ihre Rezeptoren [39]

Prostaglandin	Vorkommen	Funktion	Rezeptoren
Prostaglandin D <sub>2</sub>	Mastzellen, Gehirn, Lunge, Lymphozyten, Eosinophilen	inhibiert die Blutplättchenaggregation, Vasodilatation, Bronchokonstriktion	DP1, DP2
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Gehirn, Niere, glatter Muskulatur von Blutgefäßen, Thrombozyten	Bronchodilatation, Vasodilatation, Verringerung der Magensaftsekretion	EP1, EP2, EP3, EP4
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	Uterus, Lunge, glatter Muskulatur von Blutgefäßen, Auge	Bronchokonstriktion, Uteruskontraktion	FPα, FPβ
Prostaglandin I <sub>2</sub>	Endothel, Niere, Thrombozyten, Gehirn	inhibiert die Blutplättchenaggregation, Vasodilatation, Verringerung der Magensaftsekretion	IP
Thromboxan A <sub>2</sub>	Thrombozyten, glatter Muskulatur von Blutgefäßen, Makrophagen, Niere	Blutplättchenaggregation, Vaso- und Bronchokonstriktion	TPα, TPβ

Neben ihren vielfältigen physiologischen Eigenschaften zeigen Prostaglandine auch eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. bei der Entstehung von Entzündungen, Schmerzen und Fieber. Die wichtigsten proinflammatorischen Prostaglandine sind in diesem Zusammenhang das PGE<sub>2</sub> und das Prostacyclin.

## **1.4 Prostaglandin E<sub>2</sub>**

### **1.4.1 Physiologische Bedeutung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und der EP-Rezeptoren**

Das Prostaglandin E<sub>2</sub> nimmt eine sehr wichtige Rolle ein, da es im menschlichen Organismus in fast allen Geweben gebildet wird und dort eine Vielzahl an biologischen Funktionen ausübt [40]. Dazu gehören z.B. die Steigerung der lokalen Perfusion in der Niere und Förderung der Freisetzung von Renin. PGE<sub>2</sub> fördert die Vasodilatation und die Schleimproduktion im Magen, aktiviert sensorische Nervenendigungen, hemmt die Säuresekretion im Magen und die Lipolyse. Hinzu kommen zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems, da es proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Auch pathophysiologische Zusammenhänge mit PGE<sub>2</sub> konnten nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> an der Entstehung akuter und neuropathischer Schmerzen, Fieber, rheumatoider Arthritis, Osteoporose, entzündlichen Darmerkrankungen (Cholitis ulcerosa), Morbus Alzheimer sowie an verschiedenen Tumorerkrankungen beteiligt ist [41-48]. Hinzu kommt, dass PGE<sub>2</sub> das Tumorwachstum und die Angiogenese stimuliert, die Apoptose inhibiert und immunsuppressiv wirkt [48]. Daher sollen im Nachfolgenden das PGE<sub>2</sub>, die beteiligten Enzyme des Syntheseweges, sowie ihre Beeinflussung etwas ausführlicher erläutert werden.

PGE<sub>2</sub> vermittelt seine Wirkungen über die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptoren EP<sub>1-4</sub>. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ [49]. Sie besitzen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, sieben Transmembranregionen sowie eine intrazelluläre C-terminale Domäne. Die Signalübertragung erfolgt über G-Proteine (Guanin-Nucleotide-bindendes Protein), die mittels sekundärer Botenstoffe das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres umwandeln (siehe Abb. 1.3).

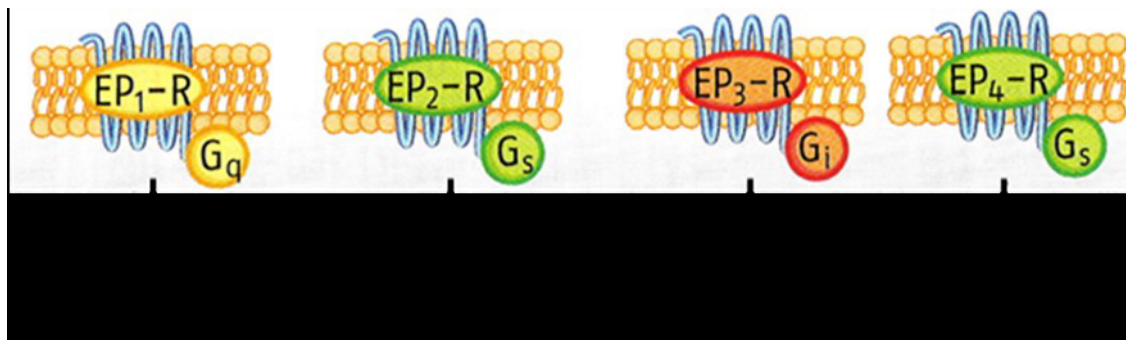


Abbildung 1.3: Die Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptor (EP) Signaltransduktionswege. Die vier EP-Subtypen (EP<sub>1-4</sub>) koppeln mit unterschiedlichen G-Proteinen und verwenden unterschiedliche second messenger Signalwege. EP<sub>1</sub> ist gekoppelt mit G<sub>q/p</sub>; nach Ligandenbindung nimmt die intrazelluläre Calciummenge zu. EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> sind gekoppelt an G<sub>s</sub>-Proteine und induzieren die Expression von cAMP, welches zur Genregulation führt. Die EP<sub>3</sub>-splice-Varianten sind v.a. an G<sub>i</sub>-Proteine gekoppelt und hemmen die cAMP Freisetzung (aus Mutschler Arzneimittelwirkungen 2013) [50, 51, 52]

Die Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht über die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren und einige ihrer rezeptorvermittelten Effekte. Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor weist zusätzlich noch viele splice-Varianten auf, wodurch auch eine Vielzahl an Signaltransduktionskaskaden möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die splice-Varianten Liganden mit nahezu identischer Affinität binden [50, 51].

Tabelle 1.2: Übersicht der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptoren und ihrer spezifischen Liganden (nach Mutschler Arzneimittelwirkungen 2013)

Rezeptor	Liganden	Beispiele für rezeptorvermittelte Effekte
EP <sub>1</sub>	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGD <sub>2</sub>	Kontraktion von Bronchien und des Gastrointestinaltrakts
EP <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	Relaxation von Bronchien, Gastrointestinaltrakt und Gefäßen
EP <sub>3</sub>	PGE <sub>2</sub>	Hemmung der Magensäuresekretion, verstärkte Uteruskontraktion in der Schwangerschaft
EP <sub>4</sub>	PGE <sub>2</sub>	Steigerung der Schleimsekretion im Magen, Offenhalten des Ductus arteriosus Botalli



### 1.4.2 Synthese des Prostaglandin E<sub>2</sub>

Die Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> wird durch drei enzymatische Reaktionen reguliert. Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) stellt im ersten Schritt die Arachidonsäure (AA) bereit. Die Cyclooxygenase bildet das instabile PGH<sub>2</sub> und im letzten Schritt erfolgt durch die spezifischen Prostaglandin E-Synthasen die Bildung des PGE<sub>2</sub>.

Arachidonsäure wird primär mit der Nahrung aufgenommen und in die Zellmembran eingebaut, so dass die freie Konzentration im Zytoplasma sehr gering ist [53]. Die Freisetzung in das Zytoplasma erfolgt dann durch Hydrolyse der Esterbindung durch PLA<sub>2</sub>-Enzyme [54].

Die freigesetzte Arachidonsäure wird im nächsten Schritt durch die bifunktionalen Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) zum Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgesetzt. Dieses kann im Anschluss durch die gewebespezifischen Synthasen in die Prostanoiden PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> überführt werden [55] (Abb. 1.4).

Im Anschluss an die Biosynthese erfolgt die Freisetzung der Prostanoiden aus der Zelle. Ein spezifischer Prostaglandin-Transporter (PGT) konnte identifiziert werden. Hinzu kommen die Möglichkeit einer passiven Diffusion und der Transport über das Multidrug-Resistenz-Protein MRP4 [56, 57].

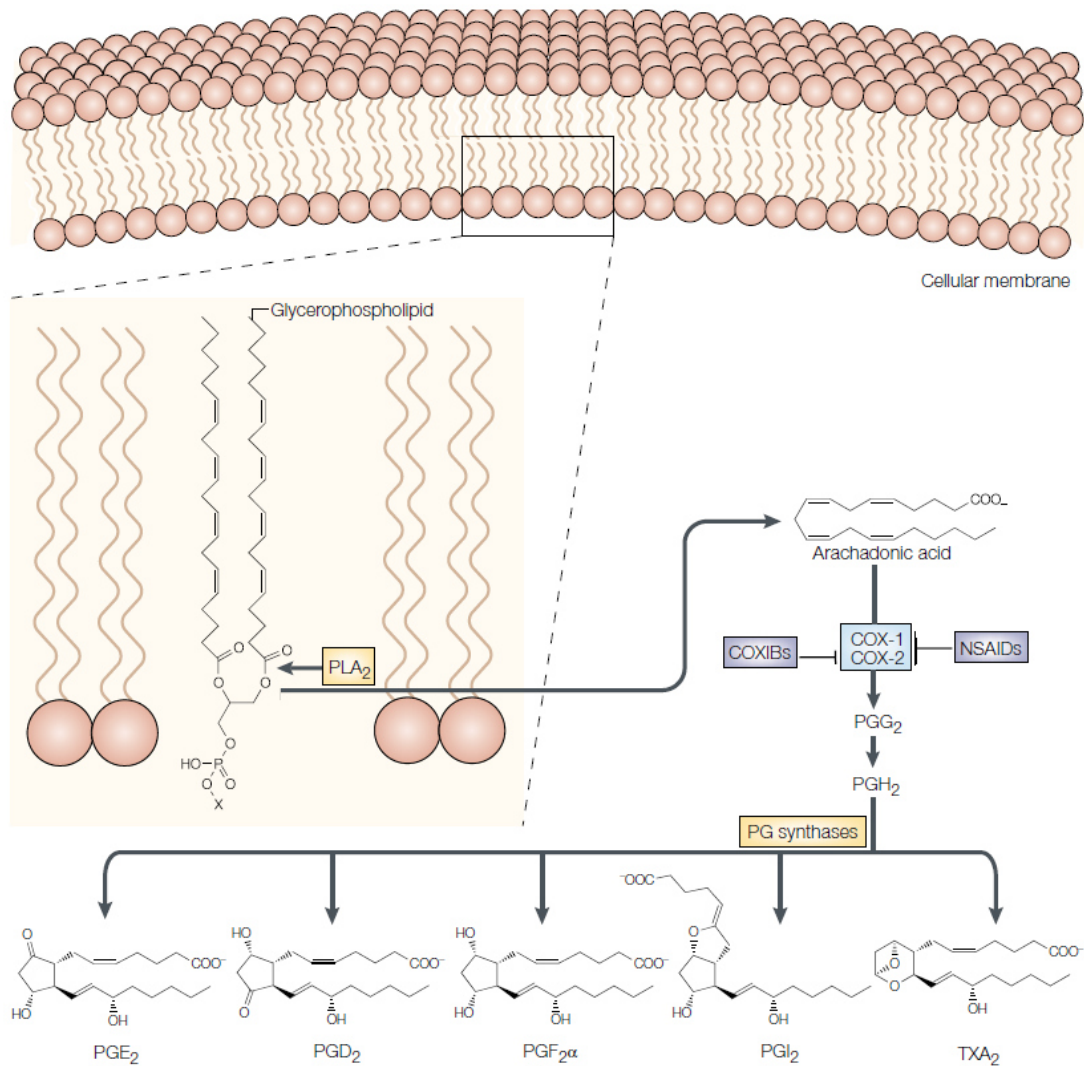


Abbildung 1.4: Biosynthese der Prostanoid

Durch Phospholipasen (PLA<sub>2</sub>) wird die Arachidonsäure aus Glycerophospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 katalysieren die Synthese der Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), welches anschließend durch die gewebespezifischen PG-Synthasen zu Prostaglandinen (PG), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt wird. (aus [58])

### 1.4.2.1 Phospholipase A<sub>2</sub>

Die „Superfamilie“ der Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme besteht zurzeit aus 16 Hauptgruppen und setzt sich aus 6 klar definierten Enzymfamilien zusammen [59]:

- Die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)
- Die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)
- Die Calcium-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)
- Die Lysosomale Phospholipase A<sub>2</sub> (LPLA<sub>2</sub>)
- Die Plättchen-aktivierender Faktor-Acyldrolase (PFA-AH)
- Die Adipose Phospholipase A<sub>2</sub> (adPLA)

Allgemein gilt, dass die meisten heute bekannten PLA<sub>2</sub>-Enzyme zur Arachidonsäure-Freisetzung befähigt sind, aber nur die zytosolische PLA<sub>2α</sub> (cPLA<sub>2α</sub>) hoch selektiv für AA ist. Sie wird in fast allen Zellen exprimiert und stellt ein Schlüsselenzym für die Eicosanoidsynthese dar [60, 61].

Durch die Vielzahl an PLA<sub>2</sub>-Enzymen wird ihnen auch eine Beteiligung an unterschiedlichsten Mechanismen, wie Entzündung, Zelltod, Zellwachstum, Zellsignalübertragung und Membranhomöostase zugeschrieben [59, 62].

### 1.4.2.2 Cyclooxygenasen

Der zweite Schritt in der Prostaglandin-Synthese wird durch die Cyclooxygenase (COX oder Prostaglandin Endoperoxid Synthase) eingeleitet. Als Membranprotein katalysiert sie die Umwandlung der aus Membranphospholipiden freigesetzten Arachidonsäure in zyklische Endoperoxide. Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation zum instabilen Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) mit dem für Prostaglandine typischen Cyclopentanring [63]. Die anschließende Peroxidase-Reaktion (POX) führt dann zum Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Ausgehend vom PGH<sub>2</sub> (t<sub>1/2</sub>=90-100s) werden je nach Zelltyp und deren enzymatischer Ausstattung die weiteren Prostaglandine gebildet.

Schon 1971 vermuteten Flower und Vane die Existenz von mehr als einer Cyclooxygenase. 1991 konnten D. L. Simmons et al. dann nachweisen, dass die Cyclooxygenase in zwei Isoformen (COX-1, COX-2) existiert [62, 64].

Die Proteine sind zu 60% identisch, bewirken dieselben Reaktionen und haben ähnliche Affinität für ihr Substrat Arachidonsäure. Sie unterscheiden sich aber deutlich in ihren Expressionsmustern und in ihren Substrat- und Inhibitorspezifitäten [65, 66, 67].

Die COX-1 wird häufig als „housekeeping“-Enzym bezeichnet, da sie konstitutiv in den meisten Zellen exprimiert wird und an physiologischen Funktionen, wie der Hämostase, der Regulation der Nierendurchblutung und der Protektion der Magen-Darm-Schleimhaut beteiligt ist.

Die COX-2 wird in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert, die Bildung wird durch inflammatorische Reize induziert. Die Promotorregion des COX-2-Gens enthält dazu eine Reihe von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie den nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und CREB (cAMP response element-binding protein). Die Expression kann durch proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF), Mitogene und Endotoxine (LPS, Phorbolster) innerhalb weniger Stunden hervorgerufen werden [66, 68]. Daher galt die COX-2 als das Isoenzym, das für die Prostaglandinsynthese während pathophysiologischer Prozesse, wie Entzündungen, Schmerzen, Fieber und Tumorentstehungen verantwortlich ist [61, 69]. Mittlerweile ist aber bekannt, dass die COX-2 auch in verschiedenen Geweben, wie Niere, ZNS und Uterus, konstitutiv exprimiert wird und ebenfalls physiologische Funktionen übernimmt [70, 71, 72].

Die Cyclooxygenasen sind in der luminalen Oberfläche des endoplasmatischen Reticulums und der inneren und äußeren Kernmembran lokalisiert [73]. Beide Isoenzyme liegen als Homodimere vor. Das COX-Monomer besteht aus drei Domänen: eine N-terminale epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Domäne, die für die Einlagerung in den Lipid-Bilayer wichtig ist, eine Membran-Bindungsdomäne und eine große C-terminale katalytische Domäne, die eine Häm-Bindestelle und die katalytischen Zentren der COX- und der POX-Reaktion an sich gegenüberliegenden Stellen enthält [61, 67, 74, 75, 76].

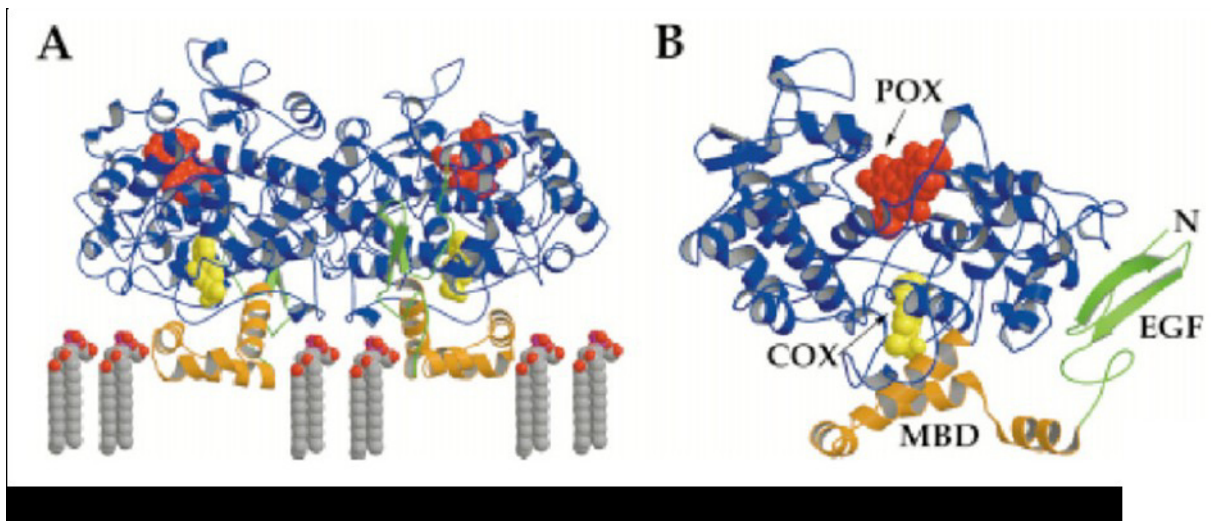


Abbildung 1.5: A: COX-Homodimer, B: COX- Monomer  
 MBD: Membranbindungsdomäne (orange), EGF: N-terminale EGF-ähnliche Domäne (grün), Katalytische Domäne (COX- und POX-Zentrum) (blau), Häm-Bindestelle liegt in der Nähe des POX-Zentrums (rot) (aus [67])

Sowohl die COX-1 als auch die COX-2 enthalten einen hydrophoben Kanal, der in der Membran-Bindungsdomäne beginnt und bis tief in die katalytische Domäne hineinreicht. Dieser Kanal ermöglicht den Eintritt der Arachidonsäure bzw. der Inhibitoren in das COX-aktive Zentrum [67, 74, 75]. Hier liegt auch der Unterschied der beiden COX-Enzyme. Im COX-aktiven Zentrum führt ein Austausch der Aminosäure an Position 523 von Isoleucin (COX-1) zu Valin (COX-2) zu einer größeren Seitentasche. Dies wird für die Synthese neuer selektiver COX-2 Inhibitoren ausgenutzt, denn die hydrophobe Seitentasche erlaubt die Anlagerung von Sulfonamidgruppen bzw. -analoge und somit eine erhöhte Substratspezifität.

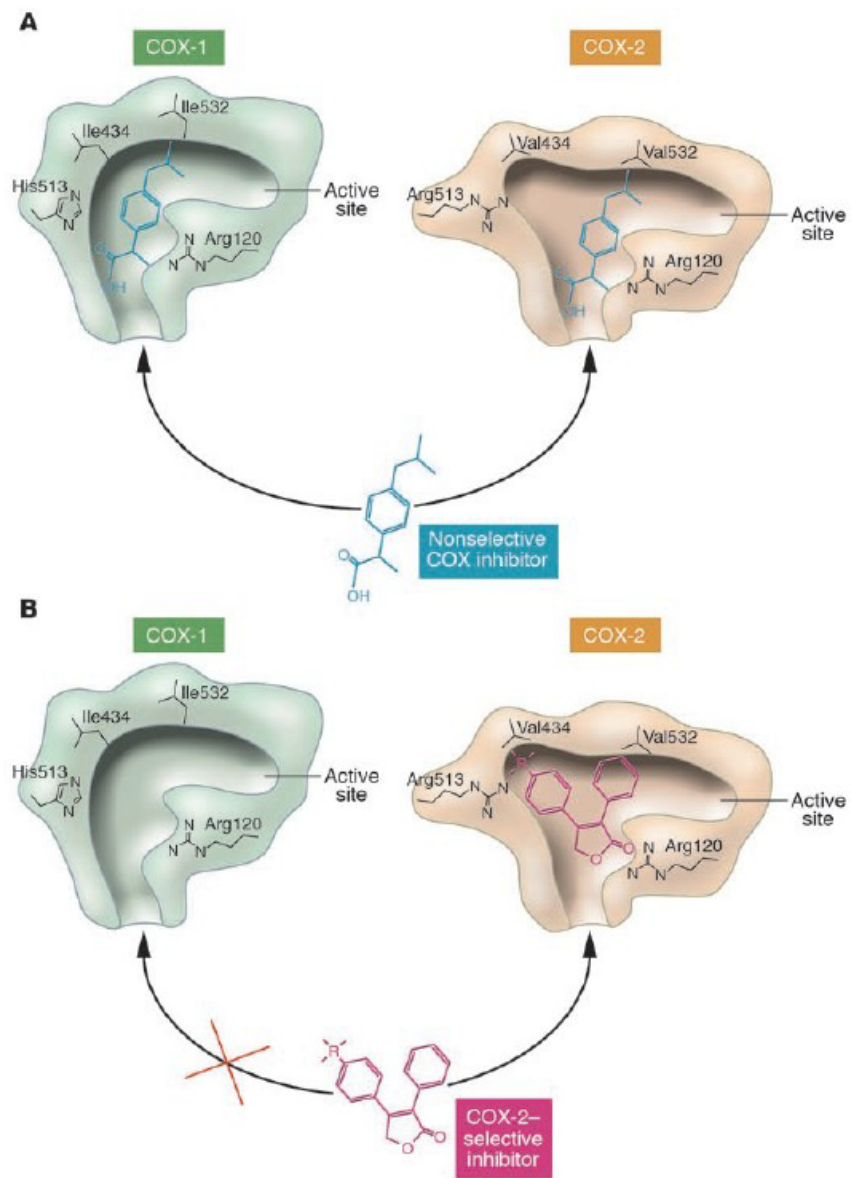


Abbildung 1.6: Unterschied im aktiven Zentrum der COX-1 und COX-2  
 A: Bindung eines NSAR (Bsp. Ibuprofen)  
 B: Bindung eines selektiven COX-2 Inhibitors (z.B. Rofecoxib)  
 (aus [77])

### 1.4.2.3 Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthasen

Im Jahr 1999 beschrieben Jakobsson et al. als Erste die Umwandlung von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> durch die rekombinante humane „microsomal-glutathione-transferase-1-like-1 (MDST1-L1), die heute als mikrosomale Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthase (mPGES-1) bezeichnet wird. Sie gehört zur MAPEG-Superfamilie (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) [78]. Kurze Zeit später konnte eine zytosolische PGE<sub>2</sub>-Synthase nachgewiesen werden, die in Gegenwart von Glutathion die Umsetzung von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> katalysiert. Sie wird als cPGES bezeichnet [79].

2002 wurde dann noch eine weitere Membran-assoziierte Synthase (mPGES-2) entdeckt, die kein Glutathion als Kofaktor benötigt [80].

#### **mPGES-1**

Die mPGES-1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 15kDa und benötigt Glutathion (GSH) für ihre enzymatischen Aktivitäten. Zum Teil liegt sie kolokalisiert mit der COX-2 vor. Ihre Expression findet im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran statt [81]. Unter basalen Bedingungen wird die mPGES-1 in den meisten Geweben nur schwach oder gar nicht exprimiert. Ausnahmen stellen die Hoden, die Prostata, der Uterus, die Milchdrüsen und die Harnblase dar [78]. Die Proteinsynthese kann genauso wie bei der COX-2 durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  oder durch Endotoxine, wie LPS in verschiedenen Zellen und Geweben im Menschen hervorgerufen werden [78, 81]. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte mPGES-1 Expression meist durch eine ebenfalls deutlich erhöhte COX-2 Expression begleitet wird, wodurch die PGE<sub>2</sub>-Menge stark ansteigt.

Durch Transfektionsstudien und knockdown-Experimente mit mPGES-1, COX-1 und COX-2 zeigte sich, dass die PGE<sub>2</sub>-Synthese durch mPGES-1 überwiegend über den COX-2 vermittelten Reaktionsweg erfolgt. Die COX-2 und die mPGES-1 liegen beide in der perinuklearen Membran vor, so dass eine effiziente Weiterleitung des instabilen PGH<sub>2</sub> stattfinden kann [81, 82]. Liegt aber eine sehr hohe Arachidonsäure-Konzentration vor, ist eine COX-1/mPGES-1 vermittelte PGE<sub>2</sub>-Bildung ebenfalls möglich [50]. Schon im Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass die mPGES-1 auch eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt [81, 82] wie z.B. bei Brustkrebs [83], bei

Pankreastumoren [84], bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen [85, 86] und bei kolorektal Karzinomen [87].

### **cPGES**

Die cPGES ist ein 23kDa großes Protein und benötigt genauso wie die mPGES-1 Glutathion als Kofaktor. Sie wird konstitutiv in vielen Geweben und Zellen exprimiert und liegt im Zytosol vor. Eine Beeinflussung der Expression durch proinflammatorische Zytokine konnte nicht nachgewiesen werden [79]. Sie trägt überwiegend zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei. Die Lokalisation der cPGES im Zytosol hat zur Folge, dass sie v.a. von COX-1 gebildetes PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> umsetzt, da die COX-1 im Endoplasmatischen Retikulum vorliegt und die COX-2 in der perinuklearen Membran [88].

Bisher ist noch kein Zusammenhang zwischen cPGES und einer Tumorentwicklung bekannt geworden.

### **mPGES-2**

Die mPGES-2 ist ein 41kDa großes Protein und ist mit dem Golgi-Apparat assoziiert. Als zweite membrangebundene Synthase benötigt sie kein Glutathion für ihre enzymatische Aktivität. Sie wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert, v.a. im Gehirn, in Muskeln, in den Nieren und in der Leber [89]. Die mPGES-2 kann sowohl COX-1- als auch COX-2-gekoppelt PGE<sub>2</sub> produzieren [90]. Eine Induktion der mPGES-2-Expression konnte bei Gewebeschäden und Entzündungsprozessen nicht nachgewiesen werden.

In den Zusammenhang mit der Tumorentstehung konnte die mPGES-2 noch nicht gebracht werden.



### **1.4.3 Bedeutung des Prostaglandin E<sub>2</sub> und der Cyclooxygenase bei malignen Erkrankungen**

Rudolf Virchow vermutete bereits 1863 einen Zusammenhang zwischen Entzündungen und leukozytenreichen Infiltraten in malignen Tumoren [91]. Dvorak verglich 1986 die inflammatorischen Prozesse in Tumoren mit denen einer gestörten Wundheilung [92]. Aber bis heute ist die Rolle der Entzündung für die Entstehung und das Wachstum von Karzinomen nicht vollständig geklärt.

In malignen soliden Tumoren sowie in vielen Präkanzerosen konnte eine verstärkte Expression der COX-2 und ein daraus resultierender erhöhter PGE<sub>2</sub>-Spiegel festgestellt werden, wie z.B. in kolorektalen Karzinomen [93], in Adenokarzinomen der Lunge [94] und der Prostata [95], in Brust- [96, 97] und Cervixtumoren [98]. Diese Überexpression wird in Zusammenhang mit der Karzinogenese, der Apoptoseresistenz [97], der Tumorinvasion [99], der Angiogenese [100, 101], dem Metastasierungspotential [102] sowie der Proliferation und der Differenzierung der Tumorzellen gebracht. Hinzu kommt die Prognose einer schlechteren Überlebensrate bei COX-2-positiven kolorektalen Karzinomen [103], Bronchialkarzinomen [104], Ovarialkarzinomen [105] und beim Mammakarzinom [106].

Zu den Wirkmechanismen, über welche die COX-2 bzw. das PGE<sub>2</sub> die Malignität von Tumoren beeinflussen kann, existieren eine Vielzahl an Theorien. In verschiedenen Studien konnte jedoch die Verbindung zwischen PGE<sub>2</sub> und der Aggressivität und der Progression zweifelsfrei bestätigt werden. Dies konnte einerseits auf der Basis von Untersuchungen von Therapien mit COX-Hemmern und andererseits in Zellkulturversuchen und im Tiermodell nachgewiesen werden [107].

Nachfolgend werden einige Mechanismen dargestellt, die die Rolle der Cyclooxygenase und des PGE<sub>2</sub> bei der Tumorentwicklung veranschaulichen:

- Inhibition der Apoptose

PGE<sub>2</sub> steigert die Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie z.B. Bcl-2 [108] und verringert die Aktivität der proapoptotischen Caspase-3 [109, 110].

- Angiogenese

Eine Überexpression von COX-2 bzw. die vermehrte Bildung von PGE<sub>2</sub> kann direkt zur Stimulation der Synthese des Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF) führen, dem stärksten bekannten proangiogenetischen Faktor [101, 111].

- Invasivität

Eine Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMP), die als degradierende Enzyme bei der Metastasierung eine Rolle spielen, führt zu einer Steigerung der Invasivität [112].

- Steigerung der Proliferation

PGE<sub>2</sub> führt in hormonabhängigen Mammakarzinomen zu einer erhöhten Expression der Estrogen-bildenden Aromatase [95], wodurch eine gesteigerte Proliferation nachgewiesen werden konnte.

- Immunsuppression

Das Wachstum von Tumoren führt häufig zu einer Immunsuppression. Über die Freisetzung des Wachstumsfaktors CSF (Colony Stimulating Factor) können Tumorzellen die PGE<sub>2</sub>-Synthese in Monozyten und Makrophagen stimulieren. Das so gebildete PGE<sub>2</sub> hemmt die Produktion von Zytokinen (z.B. TNF), die Proliferation von T- und B-Zellen und die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen. Hinzu kommen eine verstärkte Interleukin-10-Synthese (IL-10) und eine Synthesehemmung des Tumornekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [113, 114].

- Bildung von Mutagenen durch COX-2

Es konnte nachgewiesen werden, dass die COX-2 Prokarzinogene zu DNA-bindenden Karzinogenen aktivieren kann [115, 116, 117]. Die Peroxidase-Reaktion der COX-2 ist im Gegensatz zur Cyclooxygenase-Reaktion relativ unspezifisch und daher können auch andere Substanzen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Aflatoxine, halogenierte Pestizide, aromatische Amine und Phenole in ihre karzinogene Form umgesetzt werden [115].

Prokarzinogene, wie z.B. Benzo[a]pyren, können ihrerseits aber auch zu verstärkten COX-2 Expressionen führen [118].

Schaut man sich diese vielfältigen Einflüsse der COX-2 bzw. des PGE<sub>2</sub> in Zusammenhang mit der Tumorentwicklung und -progression an, wird deutlich, warum die gezielte Hemmung der COX einen therapeutischen Ansatz bietet. Eine der ersten Beobachtungen war, dass unter NSAR-Langzeitgabe das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken um 40-50% gesenkt werden konnte [119]. Durch Einsatz von selektiven COX-2 Inhibitoren (z.B. Celecoxib) versprach man sich zusätzlich eine Abnahme der gastrointestinalen Nebenwirkungen. Studien zeigten vielversprechende Ergebnisse bei der Größenreduktion der Tumore, einer verminderten Migration und Adhäsion maligner Zellen [120]. Seit dem Jahr 2004 stehen die COX-2 Hemmer aber im Zusammenhang mit einem erhöhten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und Herzinfarkten. Man vermutet, dass dies mit einer verminderten Produktion von antithrombotischem Prostacyclin und der unveränderten Produktion von Thromboxan A<sub>2</sub> zusammenhängt, da dies auch durch die COX-2 Hemmung verursacht wird [121].

Daher spielen alternative Angriffspunkte zur Reduktion von PGE<sub>2</sub>-Spiegeln eine große Rolle, wie z.B. die Hemmung der PGE-Synthasen und die direkte Hemmung der EP-Rezeptoren.

## 1.5 Apoptose

Es gibt verschiedene Arten des Zelltodes, die durch unterschiedliche morphologische und biochemische Charakteristika unterscheidbar sind [122]. Die am häufigsten auftretende und am besten definierte Zelltodart stellt dabei die Apoptose, der sogenannte „programmierte Zelltod“, dar. 1972 konnten Kerr et al. zeigen, dass diese Form des Zelltods eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung und Gewebeorganisation, sowie bei der Regulation der Immunantwort und der Eliminierung autoreaktiver Immunzellen spielt [123]. Eine gestörte oder fehlende Apoptose kann zu autoimmunvermittelten Erkrankungen führen und an der Entstehung von malignen Tumoren beteiligt sein [124]. Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, kann eine gestörte Apoptose auch durch die vermehrte Bildung von PGE<sub>2</sub> hervorgerufen werden.

Apoptotische Zellen zeigen charakteristische morphologische und physiologische Veränderungen. U.a. kommt es zu einer starken Abnahme des Zellvolumens (Pyknose), wodurch die Zellen den Kontakt zu ihren Nachbarn verlieren. Die folgende Phase, die sogenannte Zeiose, ist charakterisiert durch das Auflösen der Kernmembran, sowie die Kondensierung und anschließende Fragmentierung des Chromatins. In der Schlussphase werden die Zellorganellen in kleine intakte Vesikel (apoptotische Körperchen) eingeschlossen und freigesetzt. Diese Vesikel werden dann von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut, wodurch es zu keiner Entzündungsreaktion in der Zellumgebung kommt (s. Abb. 1.7).

Die Nekrose hingegen stellt einen passiven Vorgang dar, bei dem die Zelle durch chemische oder physikalische Reize irreparabel geschädigt wird. Zu Beginn schwillt die Zelle an und das osmotische Gleichgewicht geht verloren. Dadurch zerreißt die Zellmembran und die intrazellulären Bestandteile werden freigesetzt. Folge ist eine entzündliche Umgebungsreaktion (Inflammation) [125] (s. Abb. 1.7).

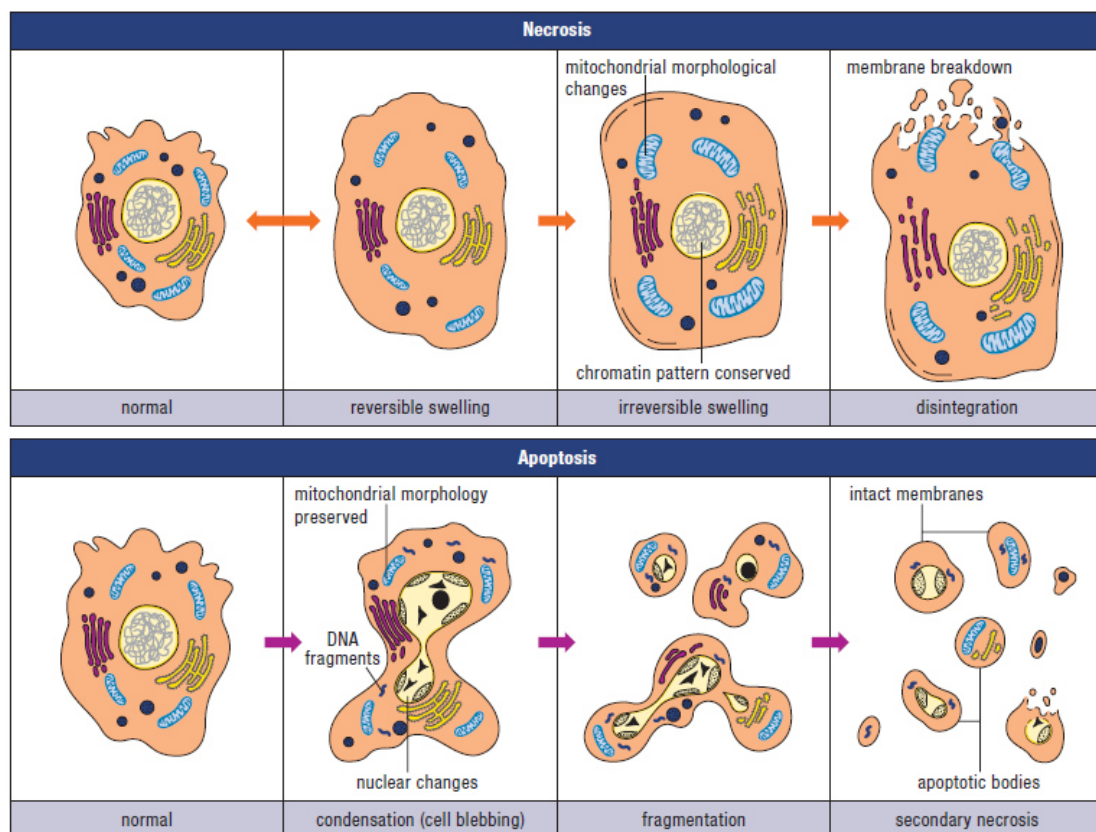


Abbildung 1.7: Morphologische Veränderungen während des apoptotischen und nekrotischen Zelltods (aus Boehringer Mannheim: Apoptosis and Cell Proliferation 2<sup>nd</sup> edition; 1998)

Verantwortlich für die meisten charakteristischen apoptotischen Veränderungen ist die Gruppe der Caspasen. Caspasen (cysteiny-l-aspartate specific protease) sind Proteasen, die im aktiven Zentrum ein Cystein enthalten und Peptidbindungen C-terminal nach Asparaginsäureresten spalten. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Apoptose-Kaskade und liegen in der Zelle als Procaspasen vor. Sie sind damit essentiell für die korrekte Entwicklung von Lebewesen, aber auch für die Antwort einer Zelle auf starke Beschädigung.

Es sind zwei Hauptwege für die Aktivierung der Caspasen bekannt. Sie können sowohl durch membranständige Rezeptoren (extrinsischer) als auch über einen mitochondrial vermittelten (intrinsischer) Weg aktiviert werden (s. Abb. 1.8). Hierbei können je nach Apoptoseweg unterschiedliche Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) aktiviert werden, die aber die gleichen Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) aktivieren. Somit besitzen beide Apoptosewege eine gemeinsame Endstrecke.

Die Effektorcaspasen spalten nach ihrer Aktivierung Strukturproteine bzw. aktivieren andere Schlüsselenzyme (s. Abb. 1.8). Caspase-3 spaltet z.B. Fodrin, ein Aktin-bindendes Strukturprotein, wodurch es zur Abrundung der Zelle kommt [126]. Ebenfalls spaltet sie die beiden in die DNA-Reparaturvorgänge involvierten Enzyme PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) [127] und aktiviert durch Spaltung des entsprechenden Inhibitors (ICAD) die Caspase-abhängige DNase CAD. Diese ist für die DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen verantwortlich. Somit stellt die Caspase-3 die wichtigste Effektorcaspase dar und bietet darüber hinaus die Möglichkeit der quantitativen Aktivitäts-Bestimmung in einem Assay.

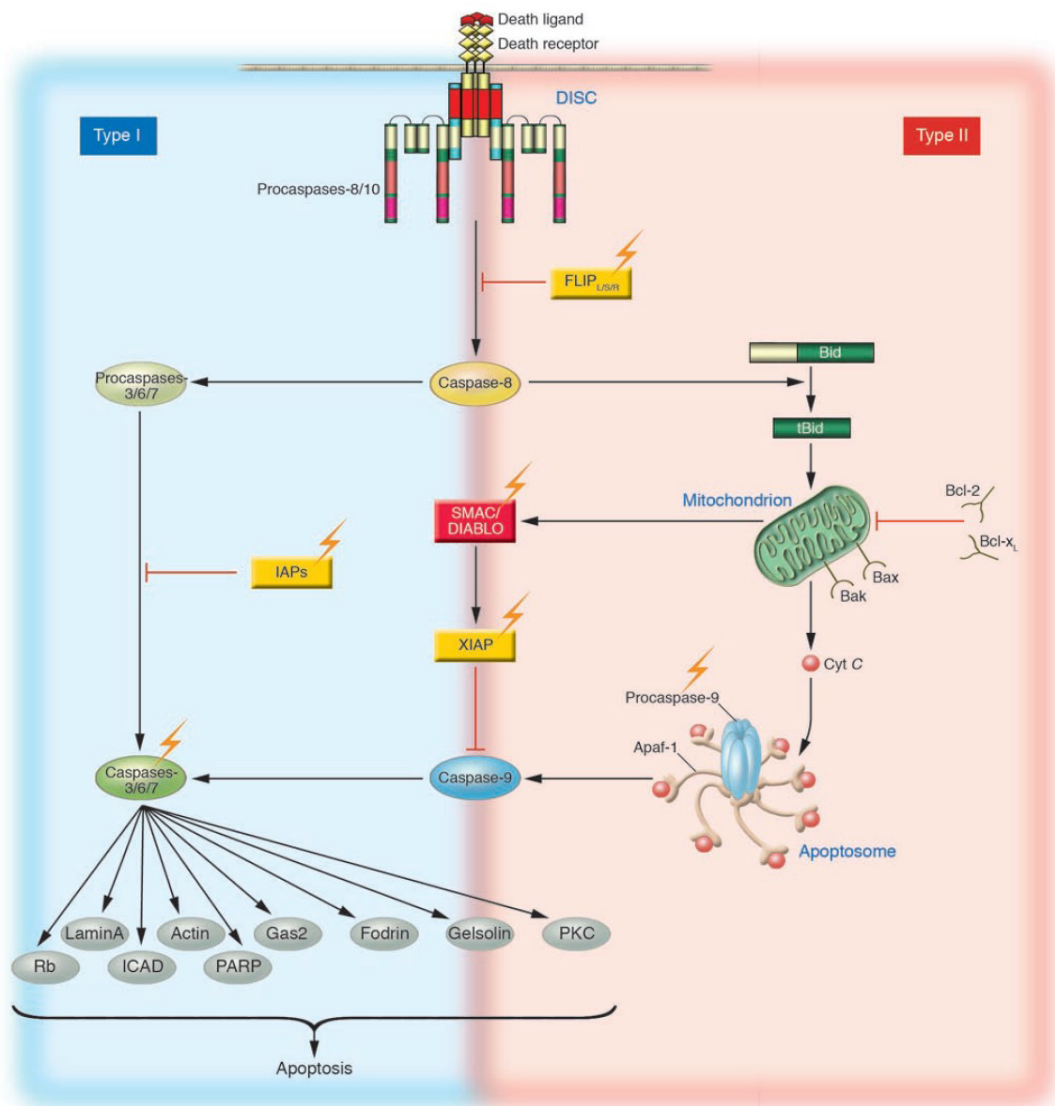


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges  
 Extrinsischer Weg (blau), Intrinsischer Weg (rosa) (aus [128])

Ebenfalls von Interesse ist die Apoptoseinduktion durch die Hemmung der Thioredoxin Reduktase (TrxR). Die Thioredoxin Reduktase gehört zur Gruppe der NADPH-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen, die im aktiven Zentrum ein Selenocystein beinhalten. Sie reduziert Disulfidbindungen, die für die Faltung von Proteinen, Protein/Protein-Interaktionen und DNA/Protein-Interaktionen, wie z.B. bei der Ausbildung von Zinkfingerstrukturen, wichtig sind (s. Abb. 1.9) [129, 130, 131, 132].

Es ist mittlerweile bekannt, dass Gold-Verbindungen (Auranofin und andere Au(I/III)-Verbindungen) die Thioredoxin Reduktase hemmen (s. Abb. 1.10) [133] und es dadurch zur Auslösung der Apoptose kommt.

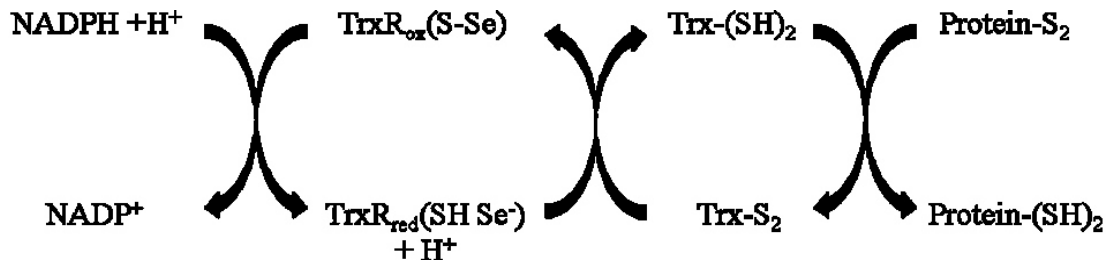


Abb. 1.9: Thioredoxin / Thioredoxin Reduktase-System (aus [133])

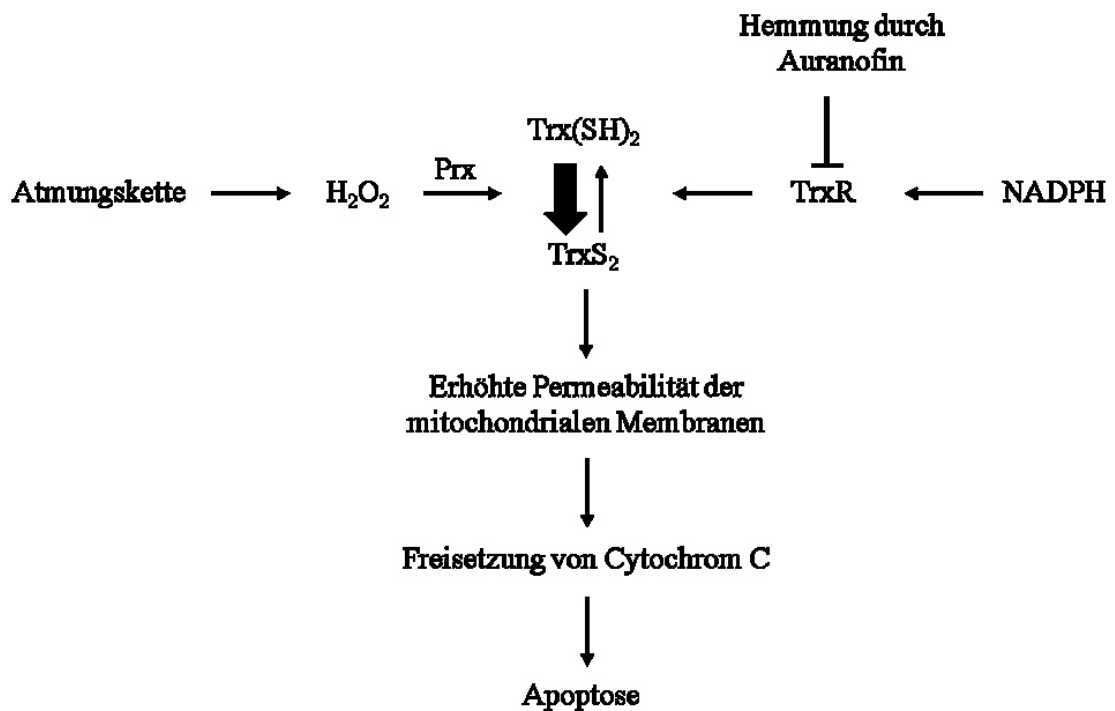


Abb. 1.10: Eine schematische Darstellung der Wirkung von Auranofin, Prx: Thioredoxin Peroxidase, Trx(SH)<sub>2</sub>: reduziertes Thioredoxin, TrxS<sub>2</sub>: oxidiertes Thioredoxin (aus [133])

### 1.6 Ansatzpunkte neuer Wirkstoffe

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es bei der Therapie von malignen hormonabhängigen Brusttumoren eine Vielzahl an vielversprechenden Targets gibt.

Die Wirkung der Estrogene kann einerseits durch die Hemmung ihrer Rezeptoren blockiert werden, andererseits kann aber auch auf deren Biosynthese Einfluss genommen werden. Dies kann durch die Hemmung der Aromatase direkt, oder indirekt durch Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese (COX, mPGES-1) und der PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren erfolgen (s. Abb. 1.11).

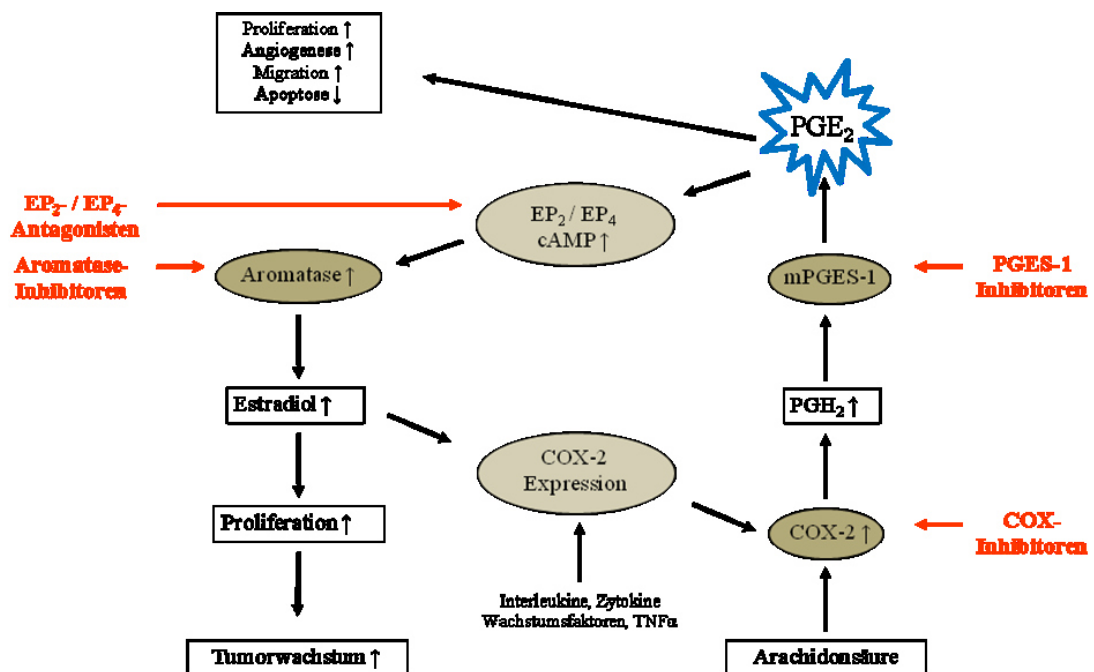


Abb. 1.11: Ansatzpunkte neuer Wirkstoffe



## 2 Zielsetzung

Das Interesse der Arbeitsgruppe von Prof. Gust liegt in der Synthese neuer spezifisch wirksamer Tumorthapeutika, die einen Einfluss auf die Estrogenbildung und -wirkung in hormonabhängigen Brusttumoren haben. In diesem Zusammenhang sind auch wie oben beschrieben COX-hemmende Verbindungen zu nennen, die durch Hemmung der Estrogenbiosynthese einen Einfluss auf das Tumorwachstum zeigen können, u.a. NSAR-Metallkomplexe, Licofelon-Derivate und goldhaltige 4,5-Diarylimidazole.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese neuen Verbindungen mit geeigneten Testsystemen auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht werden.

## 3 Darstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten geeignete Assays zur Testung und Erstellung möglicher Strukturwirkungsbeziehungen innerhalb der einzelnen Substanzklassen etabliert werden. Die Synthesen und Charakterisierungen der einzelnen Verbindungen wurden im Rahmen anderer Promotionsarbeiten durchgeführt.

### 3.1 Methoden

Die etablierten Testsysteme können zwar erste Hinweise zur Wirkung neu synthetisierter Substanzen geben, u.a. bei der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen, aber jedes für sich besitzt Vor- und Nachteile, die bedacht werden müssen.

Für alle hier beschriebenen Testsysteme gilt, dass man sich im Vorfeld immer grundsätzlich Gedanken über die Löslichkeit und Stabilität der einzelnen zu untersuchenden Verbindungen im wässrigen Milieu machen sollte.

Bei den enzymbasierten Assays spielen auch die zur Stabilisierung der Enzymlösungen eingesetzten Substanzen eine wichtige Rolle, wie z.B. Diethyldithiocarbamat (DDC) im COX Assay, welches einen Oxidationsschutz während der Lagerung des Enzyms darstellt [134, 135, 136]. Für DDC ist eine Metall-komplexierende Wirkung bekannt [137].

In den zellbasierten Systemen ist auf der einen Seite die Auswahl der zu testenden Tumorzellen von Bedeutung (MDA-MB-231- und MCF7-Brustkrebszelllinien, HT29-Kolonkarzinomzelllinie), da jede von ihnen eine unterschiedliche Ausstattung an Enzymen aufweist. Andererseits sollte man bedenken, dass eine Wirkung erst durch das Wechselwirken Zelle/Substanz zu erwarten ist und die Substanz erst einmal in die Zelle gelangen muss. Hinzu kommen auch noch weitere Zellbestandteile mit denen die Substanzen interagieren können.

Es ist aber festzustellen, dass die einzelnen Testsysteme für einen ersten Überblick über die Wirkung der Verbindungen gut funktionieren. Die Ergebnisse der einzelnen Substanzen sind aber nur innerhalb eines Testsystems miteinander vergleichbar und

man sollte stets eine Standardsubstanz zur Kontrolle mitführen. Denn gerade die enzymbasierten Testsysteme sind anfällig gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. Außentemperatur im Labor.

### **3.1.1 Testsysteme zur Untersuchung auf Cyclooxygenase-Hemmung**

Die Cyclooxygenasen sind wichtige Enzyme der Prostaglandin-Biosynthese [s. Kap. 1.4.2]. COX-1 und COX-2 unterscheiden sich im Wesentlichen in der Aminosäuresequenz ihrer Bindungstaschen, wodurch die Synthese von COX-2 selektiven Inhibitoren möglich ist.

#### **3.1.1.1 Cyclooxygenase-1/-2 Assay**

Um eine erste Aussage über die COX-hemmenden Wirkungen neu synthetisierter Verbindungen treffen zu können, wurde der „COX Inhibitor Screening Assay Kit“ der Firma Cayman Chemicals verwendet. Eine mögliche COX-1 bzw. COX-2 Selektivität kann mit diesem Assay eindeutig aufgezeigt werden.

##### **3.1.1.1.1 Prinzip**

Die einzelnen Cyclooxygenasen COX-1 bzw. COX-2 werden in diesem Assay mit den zu untersuchenden Derivaten inkubiert. Durch anschließende Zugabe von Arachidonsäure wird Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) gebildet. Da PGH<sub>2</sub> zu instabil ist um es zu quantifizieren, wird es durch Reduktion mit Zinn(II)-chlorid in das stabilere PGF<sub>2α</sub> umgesetzt und dieses mit Hilfe eines EIA (Enzym-Immunoassay) quantifiziert.

##### **3.1.1.1.2 Durchführung**

Die Enzyme werden mit den Substanzen 10min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgt die Arachidonsäurezugabe. Nach weiteren 2min wird die Enzymreaktion mit Hilfe von 1M HCl abgestoppt und durch Zugabe von SnCl<sub>2</sub>-Lösung wird das instabile PGH<sub>2</sub> zu PGF<sub>2α</sub> reduziert. Positiv- und Negativkontrollen werden nach Vorschrift hergestellt.

Im Anschluss werden die Proben mit dem EIA-Puffer verdünnt und der EIA nach Vorschrift durchgeführt. Die Absorptionzunahmen werden bei 415nm gemessen.

## 3.1.1.1.3 Auswertung

Die Auswertung wird an Hand folgender Formeln durchgeführt:

Formeln:  $B_{0(Korr)} = \text{Mittelwert } B_0 - \text{Mittelwert NSB}$

$$\%B/B_0 = \frac{S - NSB}{B_{0(Korr)}}$$

**B<sub>0</sub>** Absorptionenwerte der Maximum Binding (maximale Menge an Tracer, welcher der Antikörper in Abwesenheit eines anderen Analyten binden kann).

**NSB** Absorptionenwerte der Non-Specific Binding (auch beim Fehlen eines spezifischen Antikörpers, können kleine Mengen Tracer an den Untergrund binden und Absorptionen hervorrufen).

**S** Absorptionenwerte der Substanzen

Der korrigierte B<sub>0</sub>-Wert wird aus dem Mittelwert der B<sub>0</sub>-Werte subtrahiert mit dem Mittelwert der NSB-Werte berechnet. Mit diesem korrigierten Wert können nun die %B/B<sub>0</sub>-Werte der Standardverdünnungsreihe und der Substanzen berechnet werden.

Stellt man die Werte des Standards graphisch dar, erhält man beim Auftragen von den %B/B<sub>0</sub>-Werten gegen die Konzentration in logarithmischer Skalierung einen sigmoiden Kurvenverlauf, mit deren Hilfe man die Konzentration der noch aktiven COX in den Substanzproben berechnen kann (s. Abb. 3.1).

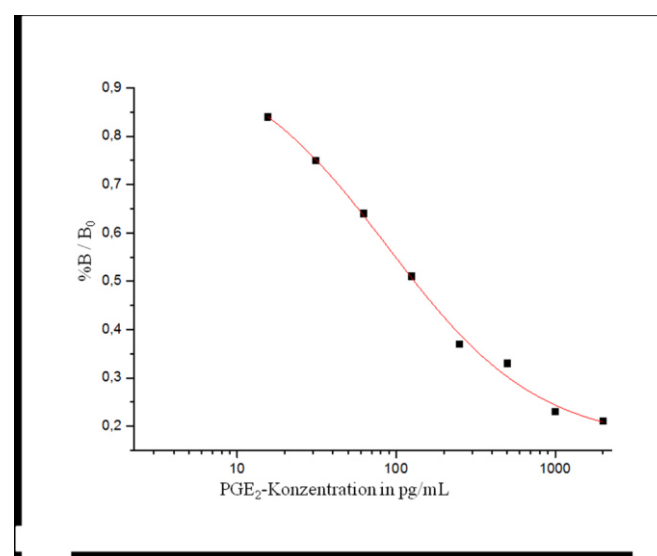


Abb.3.1: Sigmoide Kalibrierkurve vom PGE<sub>2</sub>-Standard

Ergebnisse werden in Kapitel 3.2.1-3.2.3 beschrieben und wurden zusätzlich in folgenden Publikationen niedergelegt:

- Oehler C., **Bensdorf K.**, Gust R., Imming P. (2009): Chamavioline-Antiedematous, but not a constituent of matricaria recutita. *Phytochem. Lett.* 2(4): 171-175
- Scholz M., **Bensdorf K.**, Gust R., Hey-Hawkins E. (2009): Asborin: The carbaborane analogue of Aspirin. *ChemMedChem* 4(5): 746-748

### 3.1.1.2 Prostaglandin E<sub>2</sub> Assay

Im nächsten Schritt wurden die Substanzen, die eine Hemmung im COX Assay zeigten, in einem zellbasierten Assay untersucht. Die Quantifizierung des von den Zellen gebildeten PGE<sub>2</sub> erfolgt hierbei mit Hilfe des „Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Kit-Monoclonal“ der Firma Cayman.

Bei Verbindungen, die im COX Assay hemmende Wirkungen auf die COX zeigen, besteht die Möglichkeit, dass sie im PGE<sub>2</sub> Assay keine bzw. keine nennenswerten Inhibitionen aufweisen. Dies kann einerseits an der Löslichkeit und der Stabilität der Derivate liegen, andererseits aber auch an der Aufnahme in die Zelle. Ebenfalls kommen Interaktionen mit anderen Zellbestandteilen in Frage, wodurch die Konzentrationen der Substanzen verringert werden. Weiterhin ist auch noch an die zytotoxischen Effekte der zu untersuchenden Verbindungen zu denken, da abgestorbene Zellen kein PGE<sub>2</sub> synthetisieren können. Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse aus dem COX Assay nicht komplett auf den zellbasierten Assay übertragbar, sondern können nur als ein weiterer Hinweis gesehen werden.

#### 3.1.1.2.1 Prinzip

MDA-MB-231 Brustkrebszellen werden für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen (Testkonzentration 10µM) inkubiert. Nach dieser Zeit wird durch Arachidonsäure-Zugabe die PGE<sub>2</sub>-Produktion angeregt. Die so ins Medium abgegebene PGE<sub>2</sub>-Menge wird mittels EIA quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt analog des COX Assays.

### 3.1.1.2.2 Durchführung

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgen alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierungen der verwendeten Zellen (MDA-MB-231) erfolgen in einer Wasserdampfatmosfera bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank. Gesunde und gut proliferierende MDA-MB-231 Zellen werden in einer Dichte von 56.500 Zellen/mL in 3 klare 24-Lochplatten (620µL/Loch) pipettiert. Nach 3 Tagen erfolgt die Substanzzugabe. Hierbei wird das alte Medium gegen substanzhaltiges Medium ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wird Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 1µM hinzugegeben. Nach weiteren 60 Minuten wird die Reaktion gestoppt, indem man das PGE<sub>2</sub>-haltige Medium in Eppendorfgefäße pipettiert. Die so gewonnenen Proben und die Platten können nun bis zur Durchführung des Assays bei -20°C gelagert werden.

Zur Quantifizierung des PGE<sub>2</sub> werden die Proben mit dem im Kit mitgelieferten EIA-Puffer verdünnt und der EIA nach Vorschrift durchgeführt. Die Absorptionzunahmen werden bei 415nm gemessen.

### 3.1.1.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt analog des COX Assays [s. Kap. 3.1.1.1.3].

Ergebnisse werden in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

## **3.1.2 Testsysteme zur Untersuchung auf Apoptoseinduktion**

Die Apoptose ist für die normale Entwicklung und Funktion des Organismus unerlässlich [s. Kap. 1.5]. Sie erfüllt dabei eine Vielzahl von Aufgaben. Bei der Entwicklung neuer Tumorthapeutika ist der Nachweis der Apoptose ein wichtiger Parameter für die Wirksamkeit der Substanzen. Sie kann durch verschiedenste Methoden nachgewiesen werden.

### **3.1.2.1 Acridinorange-Färbung**

Bei der Untersuchung auf Apoptoseinduktion bietet die visuelle Betrachtung der Zellen mit Hilfe der Acridinorange-Färbung den Vorteil einer einfachen Unterscheidung der

beiden Zelltod-Vorgänge [s. Kap. 1.5]. Der Umgang mit den Zellen benötigt zwar etwas Übung, sowohl bei der Handhabung und Aussaat der Zellen als auch bei der Auswahl der Testsubstanz-Konzentrationen und der Inkubationszeit.

Weiterführende Aussagen sind mit dieser Methode aber nicht möglich.

#### 3.1.2.1.1 Prinzip

Die Brustkrebszellen MDA-MB-231 und MCF7 werden hierfür für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Verbindungen (Testkonzentration  $10\mu\text{M}$ ) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellen mit dem Farbstoff Acridinorange angefärbt. Die Untersuchung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop.

#### 3.1.2.1.2 Durchführung

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgen alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierungen der verwendeten Zellen (MCF7 und MDA-MB-231) erfolgen in einer Wasserdampf-atmosphäre bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  in einem Brutschrank. Gesunde und gut proliferierende Zellen werden in einer Dichte von  $7.500 \text{ Zellen/mL}$  in klare 24-Lochplatten ( $620\mu\text{L/Loch}$ ) pipettiert. Nach 72 Stunden wird frisches substanzhaltiges (Testkonzentration z. B.  $10 \mu\text{M}$ ) Medium ( $620\mu\text{L/Loch}$ ) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24, 48, 72, 96 Stunden wird das Medium entfernt und die Zellen mit einer 1%igen Glutaraldehyd-Lösung fixiert (20-30min). Nach dem Entfernen dieser Lösung werden die Wells je mit  $200\mu\text{L}$  unsterilem PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von  $200\mu\text{L}$  einer Acridinorange/PBS-Lösung ( $2\mu\text{g/mL}$ ) für 2 Minuten und erneutes Waschen mit  $200\mu\text{L}$  unsterilem PBS. Anschließend werden die Bilder mit Hilfe des Zeiss Axiovert 40 CFL ( $\lambda_{\text{ex}} 470/40\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} 525/50\text{nm}$ ) aufgenommen.

#### 3.1.2.1.3 Auswertung

Vor der Zugabe der Substanzlösungen werden die Zellen in den 24-Lochplatten im Phasenkontrastmikroskop untersucht. In jedem Loch wird ein Bereich ausgewählt, in dem die Zellen im Monolayer wachsen, dieser wird markiert und fotografiert ( $t_0$ ). Nach erfolgter Substanzzugabe und anschließendem Färben wird fluoreszenzmikroskopisch untersucht und fotografiert.

Ergebnisse werden in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

### 3.1.2.2 Caspase-3 Assay

Eine Quantifizierung der Apoptoseinduktionen kann mit Hilfe des Caspase-3 Assays durchgeführt werden. Dieser Assay kann zwar die im Vorfeld nachgewiesene Apoptose-induzierende Aktivität der Substanzen bestätigen und quantifizieren, lässt aber keinen Rückschluss auf die Induktionen zu [s. Kap. 1.5]. Zu beachten ist, dass nicht bei allen von uns verwendeten Zelllinien die Apoptose über den „Caspase-3 Weg“ geht. Die bei uns zum Einsatz kommende Brustkrebszelllinie MCF7 exprimiert keine Caspase-3 und kann daher nicht herangezogen werden [138].

#### 3.1.2.2.1 Prinzip

Die Caspase-3 stellt wie oben beschrieben eine Effektorcaspase dar [s. Kap. 1.5]. Sie katalysiert während der Apoptose u.a. die Spaltung einer Aminosäuresequenz (DEVD), welche innerhalb des DNA-Reparatur-Enzyms PARP-1 enthalten ist. Im Assay-Kit liegt an dieser Sequenz ein Fluoreszenzfarbstoff (7-Amino-4-methylcumarin, AMC) gebunden vor, welcher durch die Caspase-3 freigesetzt wird. Dieser kann quantitativ mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers bestimmt werden.

#### 3.1.2.2.2 Durchführung

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgen alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierungen der verwendeten Zellen (MDA-MB-231, HT29) erfolgen in einer Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank. Gesunde und gut proliferierende Zellen werden in einer Dichte von 500.000 Zellen/mL in eine schwarze und eine klare 96-Lochplatte (100µL/Loch) pipettiert. Nach 24 Stunden wird frisches substanzhaltiges (Testkonzentration 10µM) Medium (100µL/Loch) hinzugefügt und nach weiteren 24 Stunden erfolgt die Caspase-3 Aktivitätsbestimmung.

Hierzu wird das Medium entfernt und die Zellen in der schwarzen Platte mit 50µL/Loch PLB-Lösung lysiert (30min; 500rpm; RT). Im Anschluss werden pro Loch 50µL Ac-DEVD-AMC-Lösung pipettiert und die Platte für 2 Stunden bei 37°C moderat geschüttelt. Die quantitative Bestimmung erfolgt anschließend durch eine Fluoreszenzmessung bei  $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$  380 nm/460 nm.



Die klare Platte wird zur Zellzahlbestimmung mit einer 1%igen Glutardialdehyd-Lösung behandelt und anschließend einer Kristallviolett-Färbung unterzogen. Die Zellzahlbestimmung erfolgt hierbei indirekt über die photometrische Quantifizierung (590nm) des gebundenen Farbstoffes. Dies ist notwendig um falsche Ergebnisse aufgrund verminderter Zelldichten auszuschließen.

### 3.1.2.2.3 Auswertung

Die Auswertung des Caspase-3 Assays erfolgt über die Berechnung der RFU-Mittelwerte. Der Substanzeinfluss (T) wird auf die Lösungsmittelkontrolle (C) bezogen (T/C [%]).

$$\text{Formel: } \quad \mathbf{T/C [\%]} \quad = \quad \frac{\mathbf{T} \cdot \mathbf{100}}{\mathbf{C}}$$

C      Mittelwert der RFU-Werte der Lösungsmittelkontrolle

T      Mittelwert der RFU-Werte der Proben

Die Auswertung der Kristallviolett-Färbung erfolgt über die Berechnung der Absorptionsmittelwerte. Der Substanzeinfluss (T) wird auf die Lösungsmittelkontrolle (C) bezogen (T/C [%]).

$$\text{Formel: } \quad \mathbf{T/C [\%]} \quad = \quad \frac{\mathbf{T} \cdot \mathbf{100}}{\mathbf{C}}$$

C      Mittelwert der Absorptionen der Lösungsmittelkontrolle bei Testende

T      Mittelwert der Absorptionen der Proben bei Testende

Ergebnisse werden in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

### 3.1.2.3 Thioredoxin Reduktase Assay

Eine vermutete Apoptoseinduktion im Zusammenhang mit der Thioredoxin Reduktase kann in einem enzymbasierten TrxR Assay einfach und schnell quantifiziert werden. Aber auch hier ist zu beachten, dass eine Übertragung der Ergebnisse auf einen zellbasierten Assay nicht ohne weiteres möglich ist. Auch hier spielen weitere Einflüsse, wie Aufnahme in die Zelle, Interaktionen mit anderen Zellbestandteilen usw. eine Rolle.

### 3.1.2.3.1 Prinzip

In diesem enzymbasierten Assay nach Holmgren und Bjornstedt wird Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB), [139]) mittels NADPH von der TrxR zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB<sup>2-</sup>) umgesetzt ( $\epsilon_{412\text{nm}} = 13,6\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die Absorptionzunahmen bei 412nm gemessen. Hemmende Substanzeinflüsse werden durch eine geringere Absorptionzunahme deutlich.

### 3.1.2.3.2 Durchführung

In eine 96 Lochplatte werden je Vertiefung 25 $\mu\text{L}$  der Enzymlösung pipettiert. Hinzu werden 25 $\mu\text{L}$  Substanzlösung pro Loch gegeben und für 75 Minuten in einem Plattenschüttler bei 37°C moderat geschüttelt. Anschließend werden pro Vertiefung 225 $\mu\text{L}$  Reaktionslösung gegeben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe der DTNB-Lösung. Die Bildung des TNB<sup>2-</sup> und die dadurch hervorgerufenen Absorptionzunahmen werden mit Hilfe eines Plattenreaders bei 412nm in Intervallen von 10 Sekunden über 6 Minuten gemessen.

Lösungen:	1mL Reaktionslösung:	0,50 mL	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7
		0,08 mL	100 mM EDTA pH 7,5
		0,02 mL	BSA 0,05%
		0,10 mL	20 mM NADPH
		0,30 mL	H <sub>2</sub> O
	Enzymlösung:	Einstellung der Enzymkonzentration auf 2U/mL	
	DTNB-Lösung:	20mM Lösung in Ethanol	

### 3.1.2.3.3 Auswertung

Gemessen werden die Absorptionzunahmen bei 412nm. Die TrxR-Aktivität wird auf den NADPH-Verbrauch bezogen. Da aber pro NADPH zwei TNB<sup>2-</sup> entstehen, muss die Absorptionsänderung durch 2 geteilt werden. Der Anstieg der TNB<sup>2-</sup> Konzentrationen folgt dabei einem linearen Trend ( $R^2 = 0,99$ ).

Ergebnisse werden in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Untersuchungen von metallhaltigen Aspirin-Derivaten

- K1** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Bergemann S., Gust R. (2011): Synthesis, characterization and biological evaluation of copper and silver complexes based on acetylsalicylic acid. *Arch. Pharm.* 344 (10): 684-688
- K2** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Bergemann S., Ott I., Gust R. (2010): [Cyclopentadienyl]metallcarbonyl complexes of acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (11): 5157-5163
- K3** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Kircher B., Bergemann S., Ott I., Gust R. (2010): Synthesis and biological activities of transition metal complexes based on acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *J. Med. Chem.* 53 (19): 6889-6898
- K4** Ott I., Kircher B., Bagowski C. P., Vlecken D. H. W., Ott E. B., Will J., **Bensdorf K.**, Sheldrick W. S., Gust R. (2009): Modulation of the Biological Properties of Aspirin by Formation of a Bioorganometallic Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (6):1160-1163

Die Leitstruktur dieser Substanzklasse stellt das Co-ASS, ein Acetylsalicylsäure-Derivat, dar. Diese Verbindung zeigt im COX Assay an isolierten Enzymen eine stärker ausgeprägte Hemmung der COX-Isoenzyme als Aspirin (s. Tab. 3.1), wobei die COX-1 Selektivität von ASS in der Konzentration von 10 $\mu$ M verloren geht und sie beide Enzyme gleichermaßen hemmt. Ebenfalls von Interesse ist die wachstumshemmende Wirkung dieser Verbindung an Tumorzellen [140-144].

Weiterführende Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung zeigten, dass der Austausch der Acetoxybenzoyl-Teilstruktur durch andere Nichtsteroidale Antirheumatika zu einer Wirkungsabschwächung führt [142].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Bedeutung des Metall-Clusters und der Alkin-Cobaltbindung auf ihre biologischen Effekte untersucht werden, wobei die Aspirin-Teilstruktur erhalten bleiben sollte. Diese Verbindungen wurden im Arbeitskreis durch

Herrn Gerhard Rubner im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert und auf ihre Zytotoxizität untersucht (s. Abb. 3.2-3.4).

Co-ASS zeigt, wie oben beschrieben, im Gegenteil zu Aspirin eine deutliche zytotoxische Wirkung. Wir konnten zeigen, dass dies u.a. durch Induktion der Apoptose über die Aktivierung der Caspase-3 hervorgerufen wird. Auf dieser Grundlage wurden die Verbindungen Prop-ASS-Co<sub>4</sub>, Di-ASS-Co<sub>4</sub>, Prop-ASS-Ru<sub>3</sub> und Di-ASS-Ru<sub>3</sub> ebenfalls auf ihre möglichen apoptotischen Effekte untersucht. Die einfachste Option bietet die Acridinorange-Färbung, denn visuell lassen sich nekrotische Zellen sehr deutlich von apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop unterscheiden. In diesem Fall wurden MCF7- und MDA-MB-231-Zellen im Monolayer 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert und visuell untersucht (s. Abb. 3.5). Im Anschluss wurden die gefundenen Apoptoseinduktionen mittels Caspase-3 Assay quantifiziert (s. Abb. 3.6).

Da die Leitstruktur deutlich stärker die COX hemmt als ASS (s. Tab. 3.1), wurden die Komplexe zuerst an isolierten Enzymen im COX Assay getestet. Zeigten sie einen Effekt auf die Cyclooxygenase wurde der Einfluss auf die COX und somit auf das PGE<sub>2</sub> im zellbasierten PGE<sub>2</sub> Assay untersucht (s. Tab.3.1).

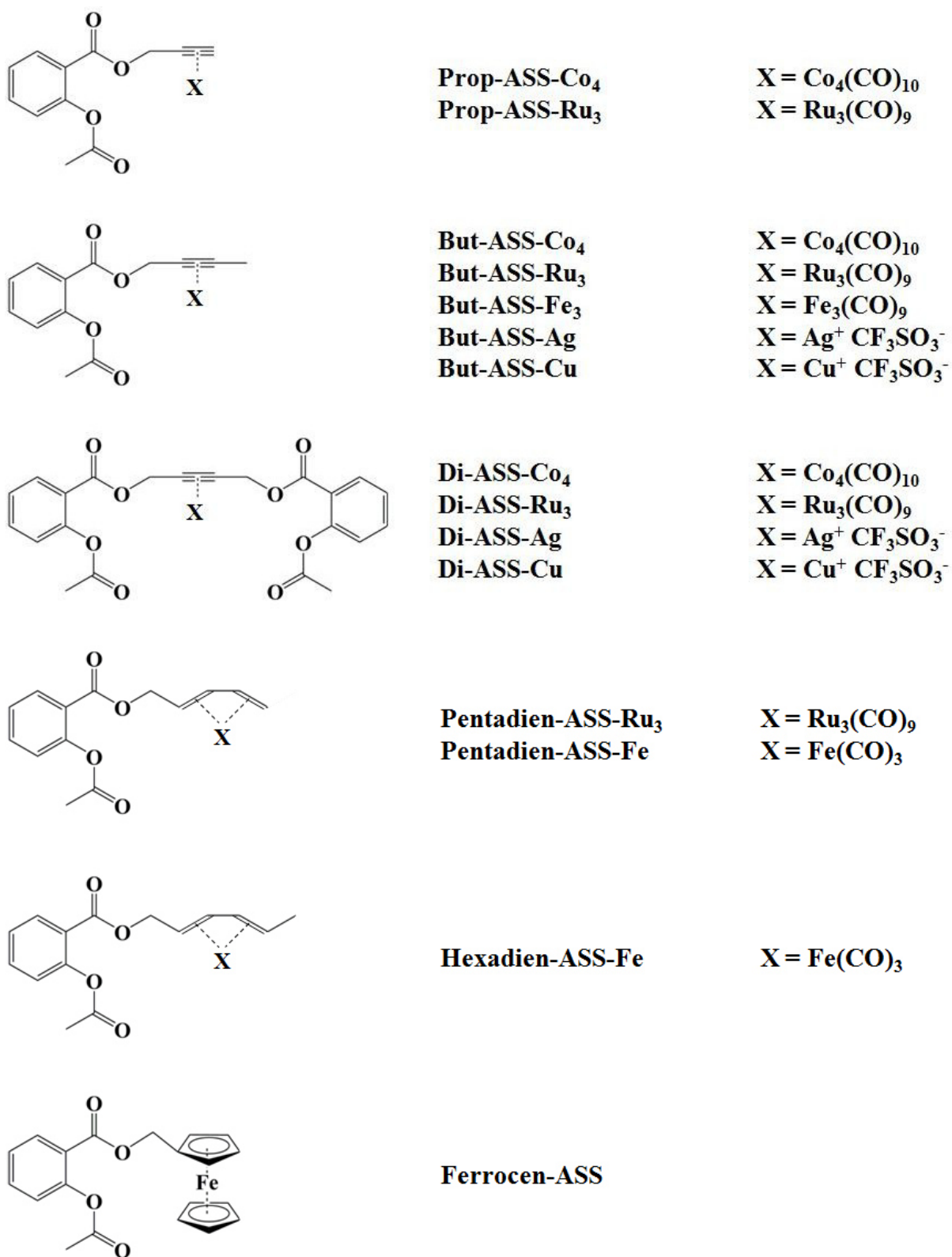


Abb. 3.2: metallhaltige ASS-Derivate

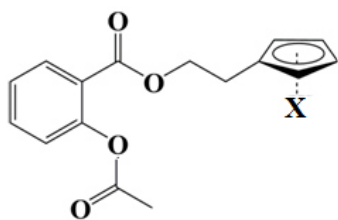
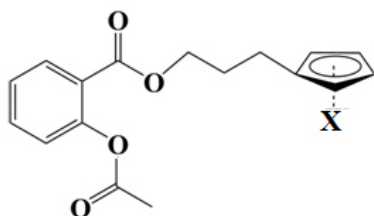
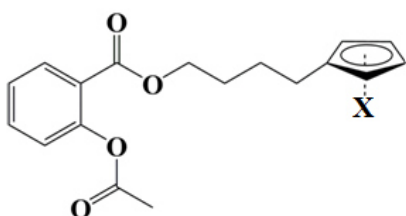
**Et-Cp-ASS-Tl****X = Tl****Prop-Cp-ASS-Tl****X = Tl****Prop-Cp-ASS-Mo****X = Mo(CO)<sub>3</sub>****Prop-Cp-ASS-Mo-I****X = Mo-I(CO)<sub>3</sub>****Prop-Cp-ASS-Mn****X = Mn(CO)<sub>3</sub>****Prop-Cp-ASS-Co****X = Co(CO)<sub>2</sub>****Prop-Cp-ASS-Rh****X = Rh(CO)<sub>2</sub>****But-Cp-ASS-Tl****X = Tl**

Abb. 3.3: metallhaltige Cp-ASS-Derivate

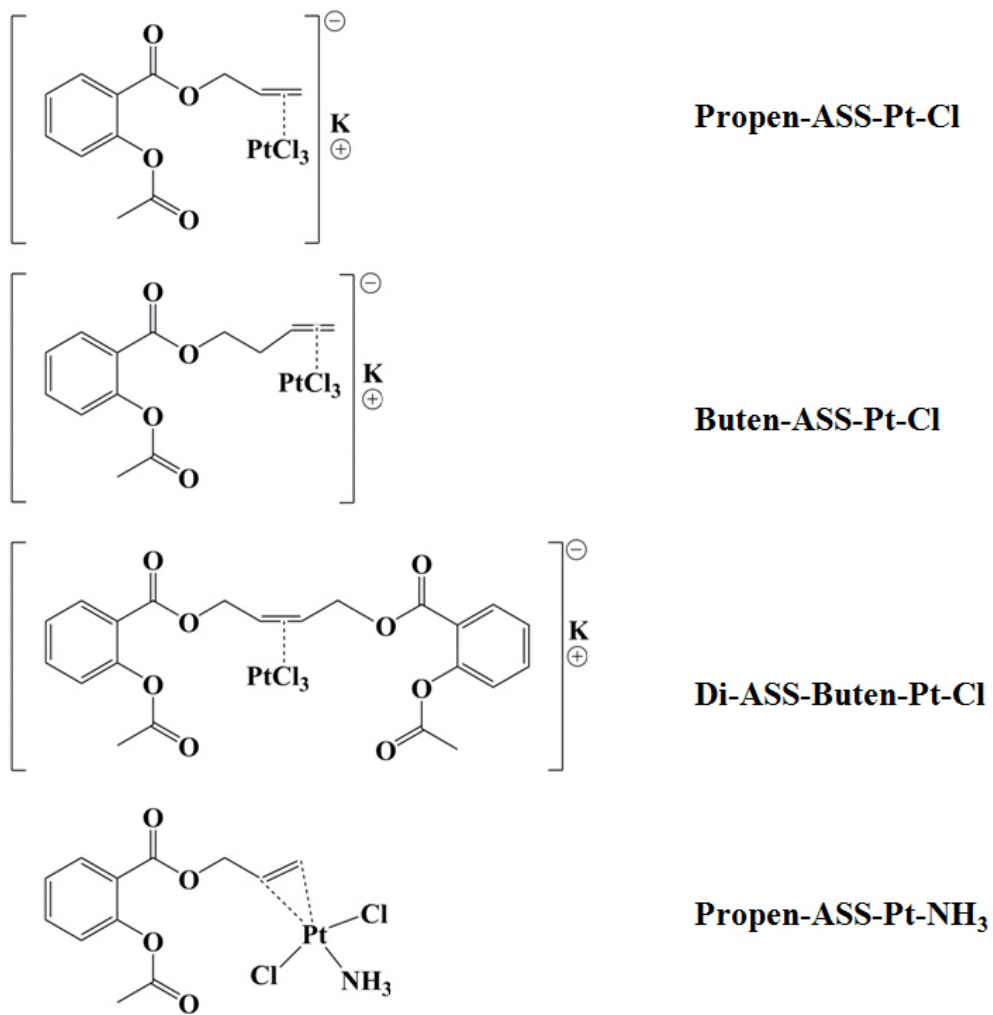


Abb. 3.4: platinhaltige ASS-Derivate

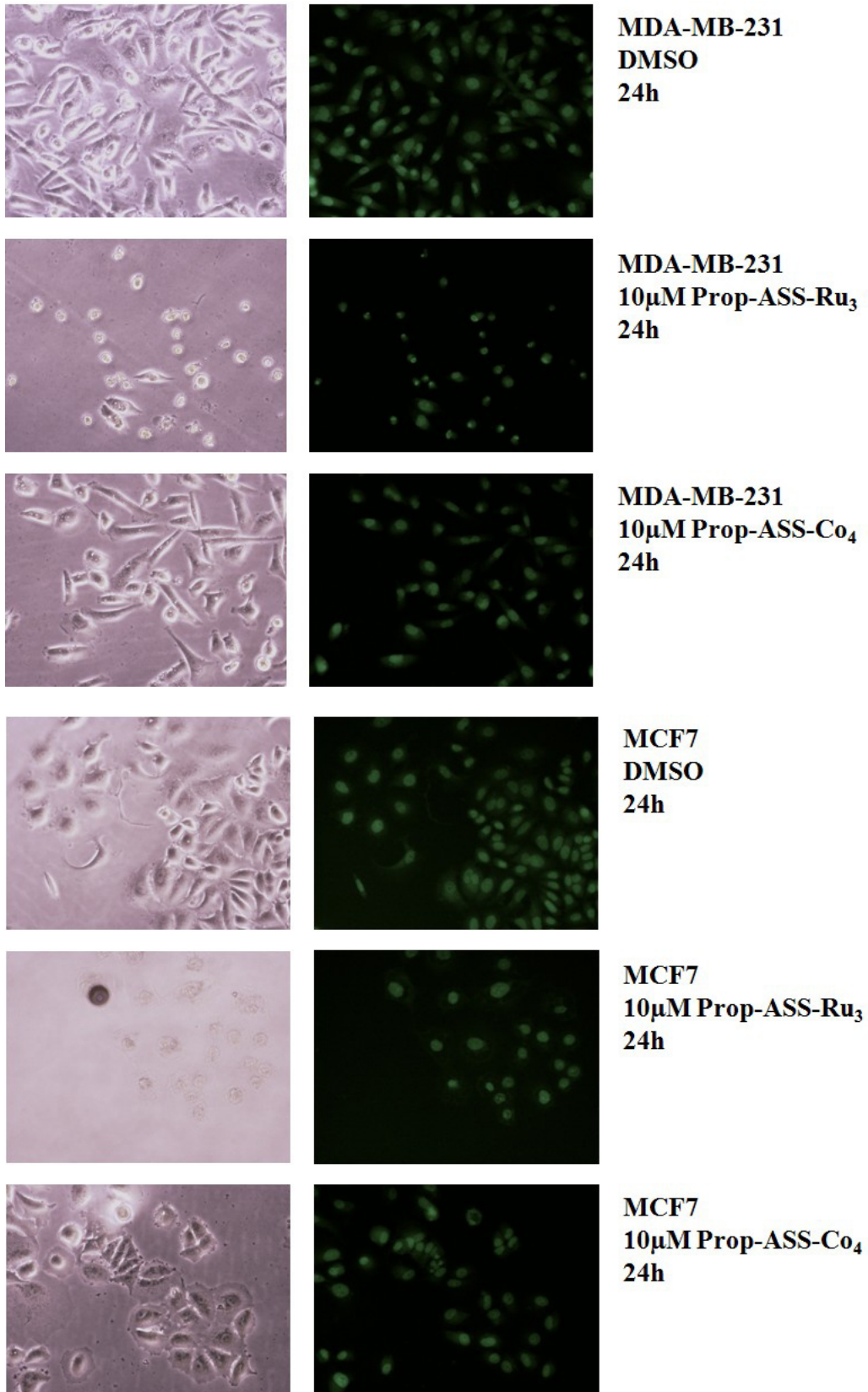


Abb. 3.5: MDA-MB-231- und MCF7-Zellen mit Acridinorange gefärbt (links: Phasenkontrast-Mikroskopie, rechts: Fluoreszenzmikroskopie, 20fache Vergrößerung)



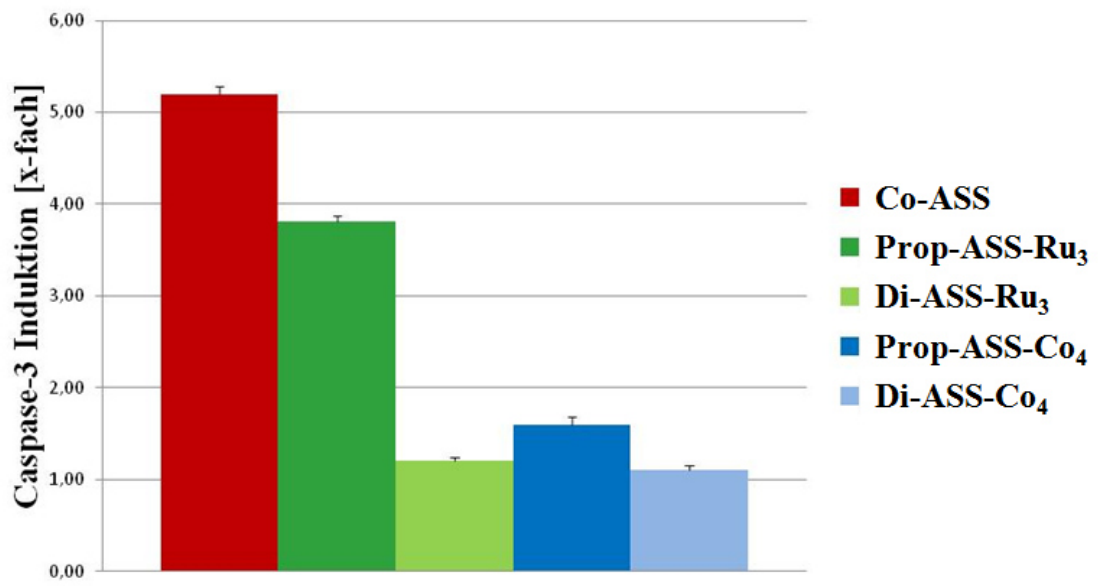


Abb. 3.6: Caspase-3 Aktivitätserhöhung gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (Testkonzentration 10 $\mu$ M)

Tabelle 3.1: Prozentuale Hemmung der COX an isolierten Enzymen und im Zelltest  
 $\alpha$  = nicht getestet

Verbindungen	COX-1(%) 10 $\mu$ M	COX-1(%) 1 $\mu$ M	COX-2(%) 10 $\mu$ M	PGE <sub>2</sub> (%) 10 $\mu$ M
ASS	29,2 $\pm$ 2,0		1,0 $\pm$ 0,1	0
Co-ASS	68,0 $\pm$ 5,4		63,0 $\pm$ 5,0	40,0 $\pm$ 5,0
Prop-ASS-Co <sub>4</sub>	38,8 $\pm$ 1,9		39,9 $\pm$ 1,6	6,7 $\pm$ 0,1
But-ASS-Co <sub>4</sub>	20,3 $\pm$ 1,9		22,0 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 0,3
Di-ASS-Co <sub>4</sub>	22,0 $\pm$ 4,3		22,4 $\pm$ 5,5	0
Prop-ASS-Ru <sub>3</sub>	42,7 $\pm$ 0,9		33,0 $\pm$ 1,2	$\alpha$
But-ASS-Ru <sub>3</sub>	35,1 $\pm$ 1,1		13,8 $\pm$ 2,3	0
Di-ASS-Ru <sub>3</sub>	67,3 $\pm$ 9,4		23,6 $\pm$ 1,8	29,5 $\pm$ 1,8
Pentadien-ASS-Ru <sub>3</sub>	87,7 $\pm$ 1,6		56,3 $\pm$ 10,7	$\alpha$
Pentadien-ASS-Fe	33,7 $\pm$ 3,3		5,2 $\pm$ 0,4	28,5 $\pm$ 1,7
Hexadien-ASS-Fe	16,1 $\pm$ 1,3		0	24,6 $\pm$ 4,2
But-ASS-Fe <sub>3</sub>	11,5 $\pm$ 1,3		2,5 $\pm$ 0,1	21,9 $\pm$ 1,5
Ferrocen-ASS	25,5 $\pm$ 1,3		0	0
Et-Cp-ASS-Tl	19,3 $\pm$ 1,0		14,5 $\pm$ 0,5	26,5 $\pm$ 8,0
Prop-Cp-ASS-Tl	27,6 $\pm$ 0,7		42,3 $\pm$ 2,4	35,6 $\pm$ 5,0
But-Cp-ASS-Tl	17,2 $\pm$ 1,2		12,3 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 1,0
Prop-Cp-ASS-Mo	27,0 $\pm$ 2,3		24,0 $\pm$ 3,1	3,8 $\pm$ 0,4
Prop-Cp-ASS-Mo-I	11,7 $\pm$ 0,5		26,0 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,2
Prop-Cp-ASS-Mn	25,4 $\pm$ 2,1		6,6 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1
Prop-Cp-ASS-Co	29,3 $\pm$ 2,7		19,0 $\pm$ 3,8	11,3 $\pm$ 0,8
Prop-Cp-ASS-Rh	57,3 $\pm$ 1,4		30,7 $\pm$ 3,7	55,1 $\pm$ 4,4
But-ASS-Ag	11,0 $\pm$ 1,2		27,0 $\pm$ 1,5	$\alpha$
Di-ASS-But-Ag	36,6 $\pm$ 4,5		18,8 $\pm$ 1,0	$\alpha$
But-ASS-Cu	31,7 $\pm$ 2,8		10,4 $\pm$ 0,8	$\alpha$
Di-ASS-But-Cu	28,7 $\pm$ 3,7		15,8 $\pm$ 2,2	$\alpha$
Propen-ASS-Pt-Cl	100	69,7 $\pm$ 1,2	39,1 $\pm$ 1,7	$\alpha$
Buten-ASS-Pt-Cl	100	72,1 $\pm$ 2,3	33,6 $\pm$ 2,4	$\alpha$
Di-ASS-Buten-Pt-Cl	100	83,8 $\pm$ 3,1	82,4 $\pm$ 2,5	$\alpha$
Propen-ASS-Pt-NH <sub>3</sub>	100	52,2 $\pm$ 4,7	62,5 $\pm$ 11,0	$\alpha$

### 3.2.2 Untersuchungen von Licofelon-Derivaten

- K5** Liu W., Zhou J., Liu Y., Liu H., **Bensdorf K.**, Guo C., Gust R. (2011): Licofelone-nitric oxide donors as anticancer agents. Arch. Pharm. 344 (8): 487-493
- K6** Liu W., Zhou J., Zhang H., Qian H., Yin J., **Bensdorf K.**, Gust R. (2011): Synthesis and biological evaluation of licofelone derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents. Letters in Drug Design & Discovery 8(10): 911-917
- K7** Liu W., Zhou J., **Bensdorf K.**, Zhang H., Liu H., Wang Y., Qian H., Zhang Y., Wellner A., Rubner G., Huang W., Gui C., Gust R. (2011): Investigations on cytotoxicity and anti-inflammatory potency of licofelone derivatives. Eur. J. Med. Chem. 46 (3): 907-913

Licofelone hemmt sowohl 5-LOX, COX-1 und COX-2, als auch die microsomale Prostaglandin E2 Synthase-1 [145-148] und zeigt apoptoseinduzierende Wirkungen an Prostata- und HCA-7 Kolonkrebszellen [149, 150]. Somit stellt sie eine interessante Leitstruktur für die Entwicklung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. Dies ist gerade im Zusammenhang mit hormonabhängigem Brustkrebs von hoher Bedeutung.

Die von Herrn Wukun Liu im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisierten Derivate wurden an Position C5 variiert, wobei die Carboxymethylgruppe gegen einen Acetyl-Rest ausgetauscht wurde, der mit lipophilen Gruppen (Alkylgruppen oder Chlor), Formiat-, Acetat-, Propionat-, Methoxy- oder einem 1,2,4-Triazol-Rest substituiert ist (s. Abb. 3.7).

Ebenfalls von Interesse war die Synthese von Licofelone-Derivaten mit einer möglichen NO-Abgangsgruppe. Denn es ist bekannt, dass NO-NSAR (NO-ASS, NO-Indomethacin) eine deutlich wachstumshemmende Wirkung an Krebszellen, wie z.B. an Dickdarm-, Prostata-, Pankreas- und Brustkrebszellen, aufweisen [151-153]. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen 9a-9c synthetisiert, welche ebenso an Position C5 variiert wurden.

Die Licofelon-Derivate zeigten im Vorfeld wachstumshemmende Effekte. Um einen eventuellen Zusammenhang dieser Effekte mit der Hemmung der COX aufzuzeigen, wurden die Verbindungen im COX Assay in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt.

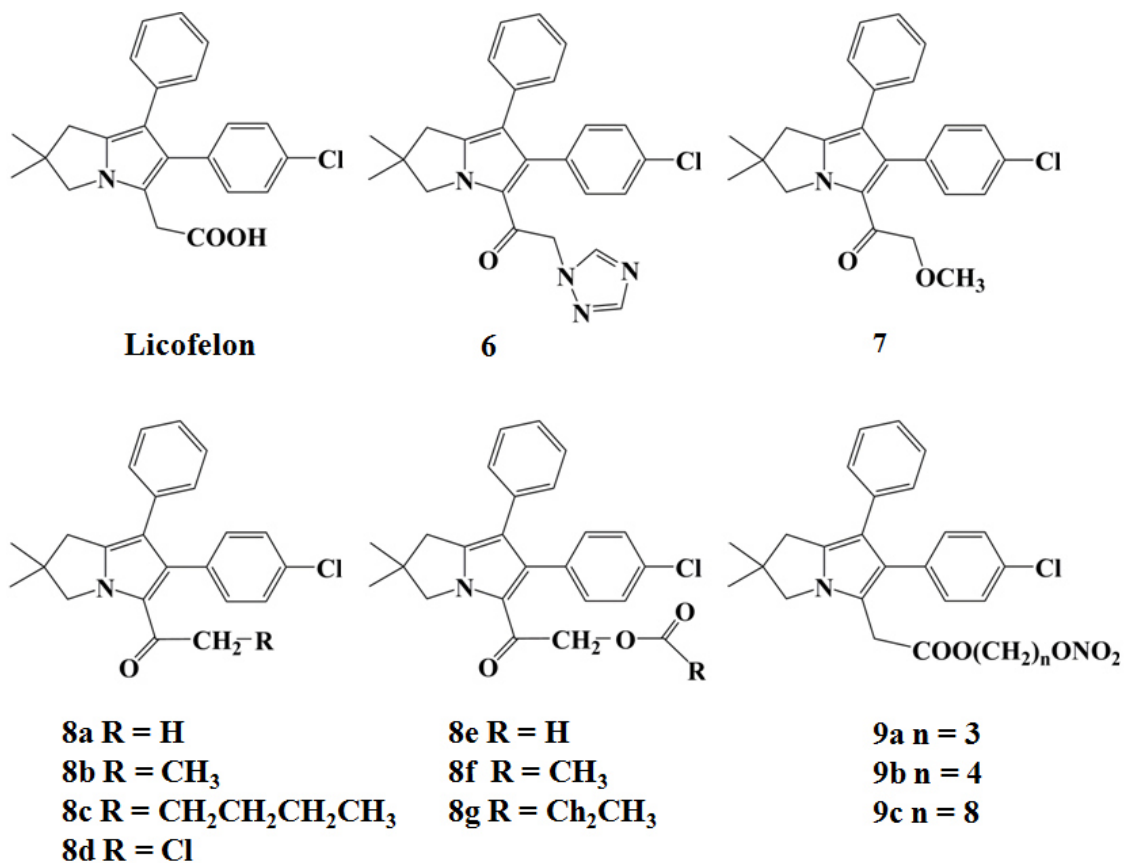


Abb. 3.7: Licofelon-Derivate

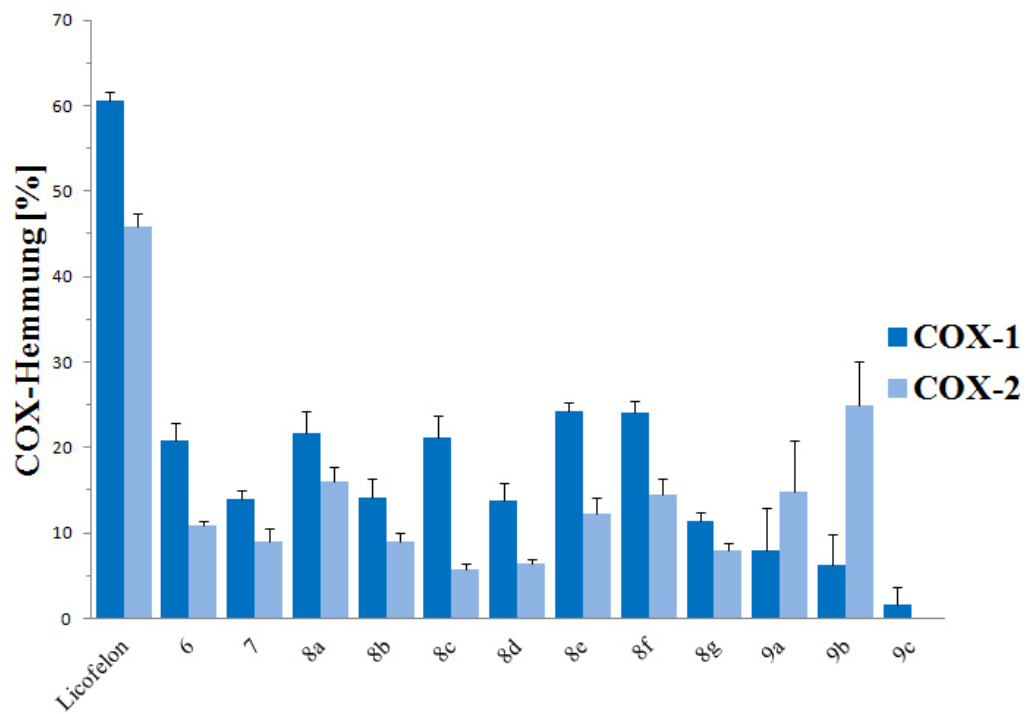


Abb. 3.8: Prozentuale Hemmung der COX an isolierten Enzymen (Testkonzentration 10µM)

### 3.2.3 Untersuchungen von goldhaltigen Verbindungen

- K8** Liu W., **Bensdorf K.**, Proetto M., Hagenbach A., Abram U., Gust R. (2012): Synthesis, characterization, and in vitro studies on bis[1,3-diethyl-4,5-diarylimidazol-2-ylidene]gold(I/III) complexes. *J. Med. Chem.* 55 (8): 3713-372
- K9** Liu W., **Bensdorf K.**, Proetto M., Abram U., Hagenbach A., Gust R. (2011): NHC gold halide complexes derived from 4, 5-diarylimidazoles: synthesis, structural analysis, and pharmacological investigations as potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* 54 (24): 8605-8615

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben sind goldhaltige Verbindungen bekannt dafür, dass sie die Thioredoxin Reduktase inaktivieren können, indem sie mit dem Se-Zentrum des Enzyms kovalente Bindungen eingehen [133]. Dies führt zur Apoptoseinduktion.

Die goldhaltigen NHC-Verbindungen (neutrale N-heterozyklische Carbenkomplexe, s. Abb. 3.9) 1-14 von Herrn Wukun Liu zeigten im Vorfeld deutliche Einflüsse auf das Wachstum von Krebszellen. Daher lag die Frage nahe, ob diese Derivate ihre Effekte im Zusammenhang mit der Thioredoxin Reduktase zeigen (s. Tab. 3.2).

Für weiterführende Struktur-Wirkungsbeziehungen der NHC-Verbindungen wurden bei den Komplexen 15-27 das Halogenid ausgetauscht. Hierfür wurden die Verbindungen 7 (4-F), 4 (4-MeO) und 9 (4-OH) ausgewählt und das Bromid durch ein zweites NHC, ein 2',3',4',6'-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-thiolat und ein Triphenylphosphin ersetzt (s. Abb. 3.9). Auch sie wurden auf ihre TrxR-Hemmung getestet (s. Tab. 3.2).

Ebenfalls von Interesse waren mögliche Einflüsse auf die Cyclooxygenasen, da in voran gegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass Triarylimidazole COX-hemmende Wirkungen besitzen [154]. Exemplarisch wurden die Verbindungen 1 (Ligand), 7 und 20 im COX Assay (Testkonzentration 10 $\mu$ M) untersucht.

Der Ligand und die Substanz 20 sind sowohl an der COX-1 als auch an der COX-2 wirkungslos. Die Verbindung 7 zeigt bei dieser Konzentration an der COX-2 ebenfalls keine Wirkung, hemmt aber die COX-1 zu 100%.

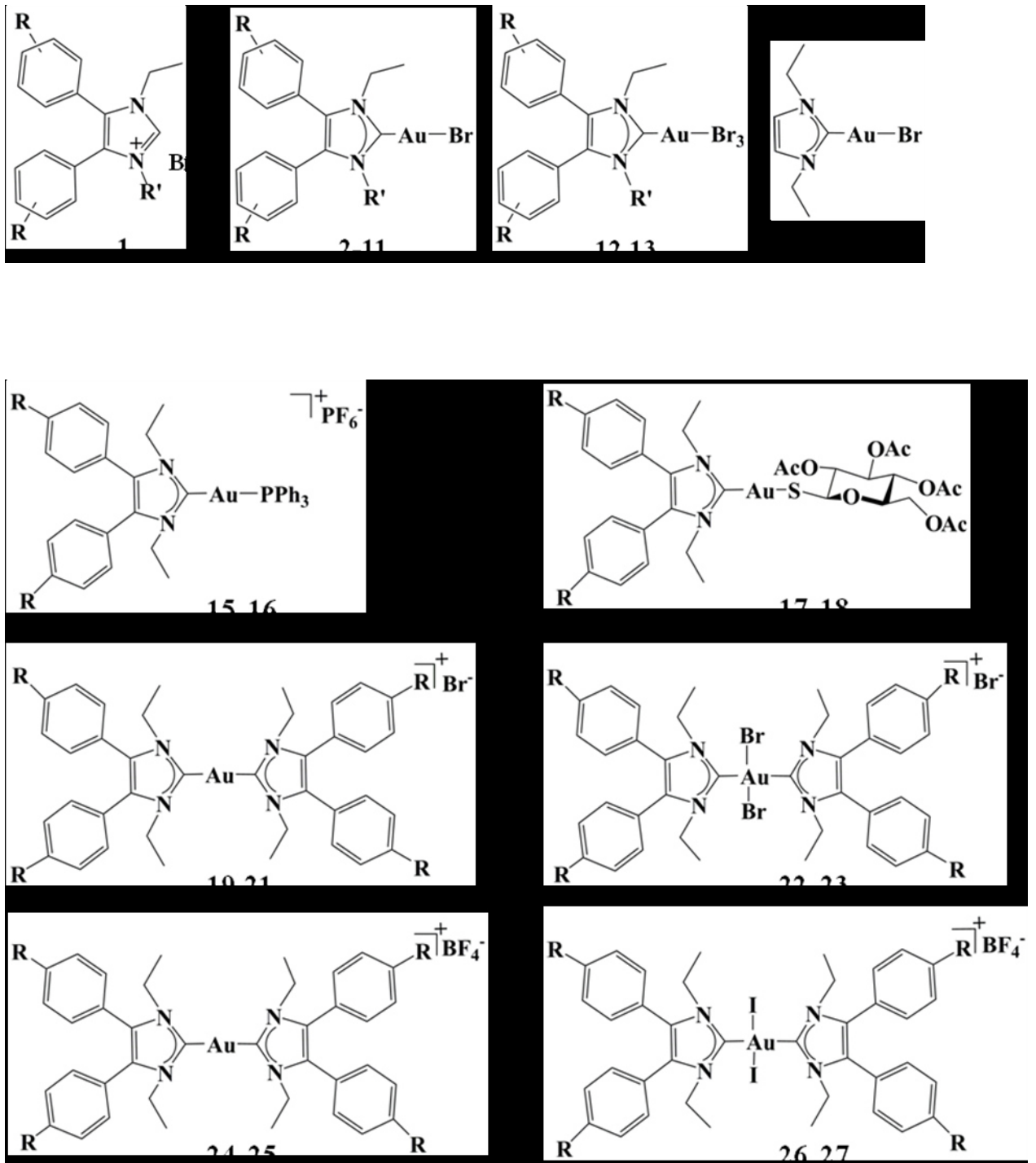


Abb. 3.9: NHC-Verbindungen

Tabelle 3.2: Hemmung der Thioredoxin Reduktase

Verbindungen	R	R'	IC <sub>50</sub> [nM]
1	4-F	Et	>50 000
2	2-MeO	Et	597,5 ± 89,6
3	3-MeO	Et	668,3 ± 38,1
4	4-MeO	Et	1 505,5 ± 27,3
5	2-F	Et	703,9 ± 61,5
6	3-F	Et	1 202,0 ± 110,3
7	4-F	Et	815,4 ± 74,1
8	H	Et	1 036,1 ± 40,4
9	4-OH	Et	4 371,3 ± 322,2
10	4-MeO	PhCH <sub>2</sub>	802,7 ± 68,1
11	4-F	PhCH <sub>2</sub>	374,4 ± 9,0
12	4-MeO	Et	621,6 ± 51,3
13	4-F	Et	903,6 ± 1,1
14			379,8 ± 105,1
15	4-MeO		700,1 ± 40,2
16	4-F		424,3 ± 50,4
17	4-MeO		784,1 ± 155,2
18	4-F		527,7 ± 33,5
19	4-MeO		>10 000
20	4-F		>10 000
21	4-OH		>10 000
22	4-MeO		4 028,7 ± 374,1
23	4-F		5 163,0 ± 104,1
24	4-MeO		3430,6 ± 249,2
25	4-F		6786,2 ± 616,5
26	4-MeO		2 521,5 ± 84,3
27	4-F		2 388,3 ± 96,1
Auranofin			18,6 ± 7,2
Et <sub>3</sub> PAuCl			25,8 ± 13,0



## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse der metallhaltigen Aspirin-Derivate

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, weist die Ausgangsverbindung Co-ASS eine deutliche wachstumshemmende Wirkung auf, die ähnliche  $IC_{50}$ -Werte wie Cisplatin besitzt. Aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen von Gerhard Rubner wird ersichtlich, dass die Voraussetzung für die Hemmung des Zellwachstums ein Alkin-Ligand ist.

Die am stärksten wachstumshemmenden Komplexe Prop-ASS-Co<sub>4</sub> und Prop-ASS-Ru<sub>3</sub> zeigen bei der mikroskopischen Untersuchung mit Hilfe der Acridinorange-Färbung morphologische Veränderungen (Abnahme des Zellvolumens, apoptotische Körperchen, usw.), die auf die Induktion der Apoptose hinweisen. Die Ruthenium-Verbindung erzielt hierbei eine stärkere Wirkung als die Cobalt-Verbindung (s. Abb. 3.3) [K3].

Dies lässt sich durch einen Caspase-3 Assay bestätigen. Co-ASS zeigt nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine 5,19fach höhere Caspase-3 Aktivität in den wirkstoffhaltigen Zellen als in unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ist auf den Metall-Cluster zurückzuführen, da ASS und der Ligand in dieser Konzentration und der verwendeten Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Caspase-3 haben. Prop-ASS-Ru<sub>3</sub> weist eine 3,81fache und Prop-ASS-Co<sub>4</sub> eine 1,60fache Aktivitätserhöhung auf. Die Einführung einer zweiten ASS-Teilstruktur führt zu einer Verringerung der Caspase-3 Aktivität (s. Abb. 3.6) [K3].

ASS gehört zu der Wirkstoffklasse der NSAIDs, deren pharmakologische Wirksamkeit auf der Inhibition der COX basiert. Daher wurden die metallorganischen ASS-Verbindungen auf ihre COX-hemmenden Wirkungen untersucht. Die Stammverbindung Co-ASS zeigt eine deutlich stärkere Hemmung als ASS (s. Tab. 3.1) und beeinflusst beide Isoenzyme etwa gleich stark [142].

In einer Konzentration von 10  $\mu$ M hemmt Co-ASS die COX-1 um 68% und die COX-2 um 63%, ASS hingegen inhibiert die COX-1 nur um 29% und besitzt an der COX-2 keine Wirkung. Die Liganden weisen in dieser Konzentration keine COX-hemmenden

Wirkungen auf. An der COX-2 sind alle Metall-Komplexe, bis auf die eisenhaltigen Verbindungen, wirksamer als ASS [**K3**].

Die fehlenden Wirkungen aller Liganden an beiden Isoenzymen macht die Relevanz des Metallclusters für die COX-Hemmung ersichtlich. Dabei ist die Art des Clusters anscheinend wichtiger als die Anzahl der CO-Liganden, denn die [Alkin]Co<sub>4</sub>(CO)<sub>10</sub> und [Alkin]Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>9</sub> sind zwar noch stärker wirksam als ASS, aber schwächer als Co-ASS. Nur Di-ASS-Ru<sub>3</sub> ist an der COX-1 (Hemmung von 67%) genauso wirksam wie Co-ASS. Pentadien-ASS-Ru<sub>3</sub> erweist sich als die wirksamste dieser neuen Verbindungen. Sie hemmt die COX-1 um 87,7% und die COX-2 um 56,3%. Wird der Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>9</sub>-Cluster gegen Fe(CO)<sub>3</sub> ausgetauscht, verringert sich die Wirkung drastisch (s. Tab. 3.1). Dies gilt auch, wenn Ferrocen als Metalleinheit verwendet wird [**K3**].

Die Prop-Cp-ASS-Metall Komplexe besitzen an der COX-1 eine ähnliche Wirkung wie ASS, nur Prop-Cp-ASS-Mo-I zeigt mit 12% eine schwächere und Prop-Cp-ASS-Rh mit 57,3% eine stärkere Inhibition. Auch diese Derivate hemmen die COX-2 stärker als ASS. Bei Prop-Cp-ASS-Tl (42,3%) und Prop-Cp-ASS-Mo-I (26,0%) ist die Hemmung der COX-2 sogar ausgeprägter als die der COX-1. Eine Verlängerung der Kettenlänge (But-Cp-ASS-Komplex) verringert die Inhibition an beiden Isoenzymen genauso wie eine Reduktion der Kettenlängen (Et-Cp-ASS-Komplex) [**K2**].

Bei den silberhaltigen ASS-Verbindungen kann mit But-ASS-Ag im Gegensatz zu Di-ASS-But-Ag eine etwas stärkere Aktivität an der COX-2 erzielt werden. Die beiden Kupferverbindungen zeigen eine etwa gleich starke Wirkung an beiden Isoenzymen. [**K1**].

Die Daten aus dem zellbasierten PGE<sub>2</sub> Assay müssen vorsichtig interpretiert werden, da die Verbindungen teilweise in einer Konzentration von 10µM schon nach 24 Stunden wachstumshemmende Wirkungen aufweisen bzw. zum Zelltod führen. Co-ASS hemmt in diesem zellbasierten Assay in einer Konzentration von 10µM die PGE<sub>2</sub>-Bildung um 40%, ASS hingegen gar nicht. Die Verbindungen Di-ASS-Ru<sub>3</sub>, Pentadien-ASS-Fe und Hexadien-ASS-Fe verringern die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen um 25-30% (s. Tab. 3.1) [**K3**].

Bei den Cp-ASS-Tl-Verbindungen zeigt sich wie schon im COX Assay ein Einfluss der Kettenlänge: der Ethyl-Komplex inhibiert um 26,5%, der Propyl-Komplex um 35,6% und der Butyl-Komplex nur um 12,5%. Ein Austausch des Thalliums gegen Molybdän,

Molybdän-Iod, Mangan und Cobalt schwächt die Wirksamkeit ab, nur der Austausch gegen Rhodium verstärkt die Wirkungen deutlich [K2].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die COX-inhibierenden Effekte der metallhaltigen ASS-Komplexe nicht mit den Daten der Zytotoxizitätsuntersuchungen korrelieren. Die COX-Hemmung scheint bei der Wirkung dieser Substanzen eine untergeordnete Rolle zu spielen [K1, K2, K3].

Bei den Zeise-ASS Verbindungen scheinen die zytotoxischen Eigenschaften von geringerer Bedeutung zu sein, nur Di-ASS-Buten-Pt-Cl ( $IC_{50}$  von  $15\mu\text{M}$ ) und das neutral geladene Propen-ASS-Pt-NH<sub>3</sub> ( $IC_{50}$  von  $11\mu\text{M}$ ) weisen signifikante Wirkungen an MCF7-Zellen auf. Das Interessante aber an diesen Substanzen sind ihre COX-hemmenden Wirkungen. Die Liganden und Kaliumtetrachloroplatinat inhibieren bei einer Testkonzentration von  $10\mu\text{M}$  weder die COX-1 noch die COX-2. Im Gegensatz dazu hemmen die Zeise-Verbindungen die COX-1 zu 100% und die COX-2 zu 34-82%. Selbst bei einer Testkonzentration von  $1\mu\text{M}$  liegen die Hemmungen der COX-1 noch zwischen 52% und 84%.

Die Aspirin-Teilstruktur scheint in diesem Fall nebensächlich zu sein, da das Kaliumtrichloridoethylenplatinat ebenfalls deutlich die COX-1 hemmt. Daher kann man zu dem Schluss kommen, dass die Hemmungen im Charakter der Alken-Platinbindungen liegen müssen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse der Licofelon-Derivate

Die Licofelon-Derivate zeigten im Vorfeld wachstumshemmende Effekte. Um zu untersuchen, ob diese mit der Cyclooxygenase-Hemmung korrelieren, wurden die Verbindungen in einem COX Assay (Testkonzentration  $10\mu\text{M}$ ) auf ihre Wirkungen untersucht (s. Abb. 3.8).

Licofelon hemmt bei dieser Konzentration die COX-1 um 60,6% und die COX-2 um 45,8%. Der Abbildung 3.8 kann man entnehmen, dass die Derivate 6, 7, 8a-8g deutlich verringerte Wirkungen auf die Cyclooxygenasen (COX-1: 11-24%, COX-2: 9-16%) aufweisen. Aber die Daten machen auch hier deutlich, dass die Einflüsse auf das COX-1 Isoenzym größer sind, als auf das COX-2 Isoenzym, was auf eine vergleichbare Selektivität wie von Licofelon schließen lässt [K7].

Die NO-Derivate 9a-9c bewirken ebenfalls eine deutliche Wachstumshemmung an Tumorzellen. Mögliche Cyclooxygenase-hemmende Wirkungen können auch hier in Betracht gezogen werden. Im COX Assay zeigen sie aber ebenso wie die anderen Verbindungen schwächere Hemmungen der COX-Isoenzyme als Licofelon. An der COX-1 liegen die Hemmungen gerade mal bei 1,6-8,0%. An der COX-2 wirken die Verbindungen 9a und 9b (Hemmung von 14,8% und 25,0%) deutlich stärker, 9c hingegen erweist sich als wirkungslos. Es ist aber zu beachten, dass die Substanzen (9a und 9b) eine COX-2 Selektivität im Gegensatz zu Licofelon aufweisen [K5].

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Liedtke et al. überein, die ebenfalls eine Abnahme der COX-Hemmung nach Modifikation an Position 5 nachweisen konnten [148]. Jedoch ist bei allen Derivaten keine Korrelation zwischen der COX-Hemmung und der Wachstumshemmung von Brustkrebszellen zu erkennen [K5, K6, K7].

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse der goldhaltigen Verbindungen

Von Auranofin und anderen goldhaltigen Verbindungen ist bekannt, dass sie durch Hemmung des Enzyms Thioredoxin Reduktase Apoptose induzieren können [133]. Da die NHC-Verbindungen deutlich wachstumshemmende Wirkungen besitzen, wurden sie auf ihre Effekte an der TrxR getestet.

Die Verbindungen 1-8 und 10-14 haben alle gewisse TrxR-inhibierende Effekte ( $IC_{50}$ -Werte von 374-1505nM, s. Tab. 3.2). Nur die Verbindung 9, welche eine geringere Löslichkeit in dem Assay-Puffer aufweist, bewirkt eine geringere Inhibition ( $IC_{50}$ -Wert 4371nM). Damit zeigen sie ähnliche Effekte wie Benzimidazol-2-yliden-Gold-Komplexe [155]. Sie sind aber Auranofin ( $IC_{50}$  von 18,6nM) und  $Et_3PAuCl$  ( $IC_{50}$  von 25,8nM) deutlich unterlegen [K9].

Eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung kann an Hand der Daten aus Tabelle 3.2 nicht abgeleitet werden und eine Korrelation mit den Werten der Wachstumshemmung fehlt. Da aber der goldfreie Ligand keinen Einfluss auf die TrxR aufweist, kann man die Aussage treffen, dass die Wirkungen nur im Zusammenhang mit einem Goldzentrum zustande kommen. Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass die Verbindungen noch weitere Zielkompartimente aufweisen [K9].

Auch die goldhaltigen Verbindungen 15-27 hemmten in vorhergehenden Untersuchungen das Wachstum von Tumorzellen und wurden im Anschluss daran auf eine mögliche TrxR-Hemmung untersucht. Die Tabelle 3.2 macht deutlich, dass die bivalenten Verbindungen 19-27 ( $IC_{50}$ -Werte  $>2000nM$ ) schwächer in ihren TrxR-Hemmungen sind als die monovalenten Vertreter. Nur die Triphenylphosphin-Verbindungen (15  $IC_{50}$ -Wert 700nM, 16  $IC_{50}$ -Wert 424nM) und die Glucopyranosyl-1-thiolat-Derivate (17  $IC_{50}$ -Wert 784nM, 18  $IC_{50}$ -Wert 528nM) zeigen deutlich verstärkte Wirkungen, aber auch sie sind immer noch deutlich schwächer wirksam als Auranofin und  $Et_3PAuCl$  (s. Tab. 3.2) [K8].

Auch bei diesen Verbindungen findet man keine Korrelation zwischen der Zytotoxizität und der TrxR-Hemmung [K8].

In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Triarylimidazol-Derivate COX-inhibierende Wirkungen aufweisen [154]. Ebenfalls ist bekannt, dass Auranofin eine COX- und 12-LOX-hemmende Wirkung besitzt [156]. Aus diesem Grund wurden die Verbindung 7, ihr goldfreier Ligand 1 und der bivalente Komplex 20 an isolierten Enzymen im COX Assay in einer Konzentration von  $10\mu M$  getestet. Als Kontrollsubstanz wurde ASS mitgeführt. Der Ligand und der bivalente Komplex hemmen weder die COX-1 noch die COX-2. Der monovalente Komplex Verbindung 7 inhibiert hingegen selektiv die COX-1 (100%) [K8, K9].

Dies könnte zwar die Wachstumshemmung der Brustkrebszelllinie MCF7 erklären, da diese v.a. COX-1 exprimiert und gegenüber NSAID empfindlich reagiert [157]. Aber es erklärt nicht die Wirkung an den MDA-MB-231 Brustkrebszellen, welche vorwiegend COX-2 bilden [157]. Daher können wir auch die COX-Hemmung als mögliche Wirkweise ausschließen. Die selektive COX-1 Hemmung der Substanz 7 hat aber einen neuen Ansatz für weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen geliefert.

## 5 Ausblick

Die metallhaltigen Aspirin-Derivate weisen z.T. stärkere Cyclooxygenase-Hemmungen als ASS auf. Dieser Wirkungsmechanismus sollte weiter untersucht werden, um zu ermitteln, welche Interaktionen mit den Enzymen im Vergleich zu Co-ASS und ASS vorliegen. Durch die wachstumshemmenden Eigenschaften dieser Verbindungen können weitere Targets nicht ausgeschlossen werden.

Die Zeise-ASS-Verbindungen stellen durch ihre starken COX-Hemmungen und COX-1 Selektivitäten eine neue Leitstruktur für die Entwicklung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. Die Klärung des Wirkmechanismus der COX-Hemmung steht bei diesen Verbindungen als nächstes im Blickpunkt, genauso wie die Suche nach geeigneten Liganden, welche eine COX-2 Selektivität besitzen. Ebenfalls sollte der Einfluss der PGE<sub>2</sub>-senkenden Wirkung im zellbasierten Assay untersucht werden. Hinzu kommen sicher noch weitere Targets, denn die Zeise-Komplexe weisen eine starke Reaktivität gegenüber Proteinen auf. Weiterführende Untersuchungen sind in diesem Zusammenhang unerlässlich.

Die Licofelon-Derivate besitzen wachstumshemmende Eigenschaften und üben schwächere Hemmungen auf die COX aus als Licofelon selbst, welche aber nicht miteinander korrelieren. Es bieten sich an dieser Stelle die Untersuchung auf eine PGE<sub>2</sub>-reduzierende Wirkung im Zelltest und eine Testung auf mPGES-1-Hemmung an [158, 159], da von Licofelon bekannt ist, dass es auch an dieser Stelle in die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Biosynthese eingreift.

In dieser Studie konnte die Wirkungsweise der goldhaltigen NHC-Verbindungen nicht geklärt werden, da keine Korrelation zwischen den zytotoxischen Effekten an Krebszellen und der TrxR-Hemmung gefunden werden konnte. Testungen auf mögliche DNA-Schädigungen, Hemmung weiterer Enzyme und auch zusätzliche Untersuchungen der Substanz 7 auf ihre PGE<sub>2</sub>-senkende Wirkung sind für die Abklärung ihres Wirkmechanismus erforderlich.

Von Interesse für alle untersuchten Substanzen, die einen Effekt auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese zeigen, wären Untersuchungen ihrer Einflüsse auf die Aromatase-Expression und darüber hinaus auf den zellulären Estradiolspiegel. Dies kann mittels Western Blot

---

Analysen (Aromatase) oder in speziellen Estradiol-Bestimmungsassays (z.B. der Firma Cayman Chemicals) weiterführend untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

In Deutschland wird das Mammakarzinom jährlich rund 70000 Mal diagnostiziert [1]. Rund 60% dieser Tumore weisen ein hormonabhängiges Wachstum auf [3, 4]. Die Estrogen-Biosynthese erfolgt mit Hilfe der Aromatase, die in hormonabhängigen Tumorzellen stark erhöht vorliegt [6, 11, 15, 26, 27, 28]. In diesen Zusammenhang konnte eine erhöhte COX-2 Expression und eine daraus resultierende erhöhte PGE<sub>2</sub>-Konzentration gebracht werden [7], die zu einer verstärkten Aromatase Expression führt [27, 29].

Daher liegt das Augenmerk der Arbeitsgruppe von Professor Gust auf der Synthese neuer antitumoraktiver Wirkstoffe, die einen Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-Biosynthese zeigen, wie ASS-Metall-Verbindungen [**K1-K4**], Licofelon-Derivate [**K5-K7**] und goldhaltige NHC-Komplexe, die vom 4,5-Diarylimidazol abgeleitet sind [**K8, K9**]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Substanzen mit geeigneten Testsystemen untersucht werden. Für die Untersuchung auf eine mögliche COX-Hemmung wurden ein enzym- und zellbasierter Assay etabliert. Die Testung auf Apoptoseinduktion wurde visuell mit der Acridinorange-Färbung durchgeführt und in einem Caspase-3 Assay quantifiziert. Die Testung auf eine TrxR- Hemmung erfolgte enzymbasiert.

Co-ASS wurde 1997 von Jung et al. synthetisiert und eingehend auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht. Es setzt sich aus einem metallorganischem Cluster und einer organischen ASS-Teilstruktur zusammen und zeigt zytotoxische Effekte an Tumorzellen und hemmt die COX-1 und -2 stärker als Aspirin. Unsere Studien zeigten, dass Co-ASS eine ideale Einheit aus ASS und der [Alkin]Co<sub>2</sub>CO<sub>6</sub>-Einheit darstellt. Sowohl höhere CO-Cluster von Ruthenium und Cobalt als auch der Austausch des Cobalts gegen Eisen bringen keine weitere Wirkungssteigerung im Zusammenhang mit der Hemmung des Zellwachstums und der COX-Inhibition. Auch die Cyclopentadien-Metall- und die Silber- und Kupfer-Derivate sind in ihren Wirkungen unterlegen.

Erwähnenswert ist aber, dass alle Verbindungen eine signifikant stärkere COX-2 Hemmung und deutlichere zytotoxische Effekte an Tumorzellen zeigen als ASS. Die



Zeise-ASS Derivate zeigen eine deutliche COX-1 Selektivität und stellen somit eine neue Leitstruktur dar.

Licofelon inhibiert u.a. 5-LOX, COX-1 und COX-2, sowie die mPGES-1 [145-148]. Die untersuchten Derivate wurden alle an C5-Position variiert und zeigen zytotoxische Effekte. Sie weisen verglichen mit Licofelon geringere Hemmungen der COX-1 und COX-2 auf. Eine Korrelation zwischen der zytotoxischen Wirkung und der COX-Hemmung kann bei diesen Varianten nicht nachgewiesen werden.

Die NHC-Derivate 1-27 weisen alle zytotoxische Effekte an Tumorzellen auf und wurden daher auf ihre TrxR-hemmenden Wirkungen untersucht. Es konnte hierbei keine Korrelation zwischen den Wirkungen nachgewiesen werden. Der monovalente Komplex 7, der Ligand 1 und das bivalente Derivat 20 wurden auf ihre COX-hemmenden Eigenschaften untersucht. 1 und 20 sind wirkungslos an beiden Enzymen. 7 weist an der COX-2 ebenfalls keine Hemmung auf, zeigt aber eine 100%ige Inhibition an der COX-1.

## 6.2 Summary

In Germany, breast cancer is diagnosed about 70.000 times per year [1]. About 60% of these tumors are growing under the influence of hormones [3, 4], which are synthesized by aromatase, an enzyme that is present in hormone-dependent breast cancer cells in significantly elevated concentrations [6, 11, 15, 26, 27, 28]. This is related to a higher expression of COX-2 resulting in a high level of PGE<sub>2</sub> [7] which in turn induces an increased expression of aromatase [27, 29].

Therefore, Professor Gust's working group is focusing its attention on the development of new antitumor active drugs influencing synthesis of PGE<sub>2</sub> such as ASS-metal-combinations [**K1-K4**], Licofelone derivatives [**K5-K7**] and gold-halide-complexes derived from 4,5-diarylimidazoles [**K8, K9**]. The aim of the present work is the biological analysis of these compounds using qualified test methods. In order to investigate possible COX-inhibition effects, enzyme- and cell-based assays have been established. Apoptosis induction was visually analysed using acridine orange staining and then quantified in a caspase-3 assay. The testing on thioredoxin reductase inhibition was performed with an enzyme-based TrxR assay.

In 1997, Co-ASS was synthesized by Jung et al. and extensively studied with regard to its biological properties. It consists of a metal-organic cluster and the organic component aspirin. Co-ASS inhibits tumor cell growth and inactivates cyclooxygenase stronger than aspirin. Our studies revealed that Co-ASS represents the ideal combination of aspirin and an [alkyne] $\text{Co}_2\text{CO}_6$  moiety. Higher CO-clusters of ruthenium and cobalt as well as the replacement of cobalt by iron did not result in a further increase of anti-tumor cell growth-activity or COX-inhibition. Cyclopentadiene metal complexes and silver and copper complexes, too, showed weaker effects than Co-ASS. Worth mentioning is the fact that all new compounds demonstrated significantly stronger effects against COX-2 and more pronounced tumor cell growth inhibitory effects as compared with those obtained with aspirin. Zeise-ASS derivatives possess a significant COX-1 selectivity and thus represent a promising new class of compounds for the development of antitumor drugs.

Licofelone is inhibiting 5-LOX, COX-1 and COX-2 as well as mPGES-1 [145-148]. In this study, we investigated Licofelone-derivatives with various substituents in position C5. Cytotoxic effects were found although these substances inhibited COX-1 and COX-2 not as effective as Licofelone. For these compounds, no correlation between cytotoxic effects and COX-inhibition could be detected.

Au-NHC 1-27 are cytotoxic against tumor cells and were therefore tested for TrxR inhibiting properties. No correlation with cytotoxic effects could be demonstrated. Monovalent complex 7, ligand 1 and bivalent derivative 20 were additionally tested for COX-inhibiting properties. 1 and 20 had no effect on neither COX enzyme. In contrast, 7 was inactive on COX-2, but caused a 100% inhibition of COX-1.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ASS	Acetylsalicylsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
cAMP	Cyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CAD	Caspase-abhängige DNase
Caspase	Cysteinyl-aspartate specific protease
COX-1 / -2	Cyclooxygenase-1 / -2
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
CSF	Colony Stimulating Factor
DAG	Diacylglycerol
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DP	Prostaglandin D Rezeptor
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -Estradiol
E3	Estriol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EP	Prostaglandin E Rezeptor
ER	Endoplasmatischen Reticulums

---

ER $\alpha$ / ER $\beta$	Estrogenrezeptor $\alpha$ / $\beta$
FP	Prostaglandin F Rezeptor
G <sub>i</sub> -Proteine	Cyclasen-inhibierende Proteine
G <sub>q</sub> -Proteine	Phosphalipase-C-aktivierende Proteine
G <sub>s</sub> -Proteine	Cyclasen-stimulierende Proteine
GSH	Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IP	Prostacyclin Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
5-LOX	Arachidonat-5-Lipoxygenase
MAPEG	Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
MMP	Matrixmetalloproteasen
MRP4	Multidrug-Resistenz-Proteine 4
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NF-IL6	nukleärer Faktor- Interleukin 6
NO	Stickstoffmonoxid

---

NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
mPGES-1 / -2	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase-1 / -2
cPGES	zytosolische Prostaglandin E-Synthase
PGT	Prostaglandin-Transporter
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
cPLA <sub>2α</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2α</sub>
iPLA <sub>2</sub>	Calcium-unabhängige Phospholipase A <sub>2</sub>
sPLA <sub>2</sub>	sekretorische Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
POX	Peroxidase
RFU	relative Fluoreszenz Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
SERMs	Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren
Tab.	Tabelle

---

TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP	Thromboxan Rezeptor
Trx	Thioredoxin
Trx(SH) <sub>2</sub>	reduziertes Thioredoxin
TrxS <sub>2</sub>	oxidiertes Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan
VEGF	Vaskular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentralnervensystem

## 8 Literaturquellen

- [1] Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008  
8. Ausgabe
- [2] Riede U., Werner M. und Freudenberg N., (2009): Basiswissen: Allgemeine und Spezielle Pathologie, Kapitel 65: Die Brustdrüse  
Springer-Verlag: 522-531
- [3] Jensen E. V., Jacobson H. I., Walf A. A., Frye C. A (2010): Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches.  
Physiol. Behav. 99 (2): 151-162
- [4] MacGregor J. I., Jordan V. C. (1998): Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action.  
Pharmacol. Rev. 50 (2): 151-196
- [5] Quarmby V. E., Korach K. S. (1984): The influence of 17 $\beta$ -estradiol on patters of cell division in the uterus.  
Endocrinology 114: 694-702
- [6] Brodie A. M. H., Lu Q., Long B. J., Fulton A., Chen T., Macpherson N., DeJong P.C., Blankenstein M. A., Nortier J. W. R., Slee P. H. T. J., van de Ven J., van Gorp J. M. H. H., Elbers J. R. J., Schipper M. E. I., Blijham G. H., Thijssen J. H. (2001): Aromatase and COX-2 expression in human breast cancer.  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 79: 41-47
- [7] Prosperi J. R., Robertson F. M. (2006): Cyclooxygenase-2 directly regulates gene expression of P450 Cyp19 aromatase promoter regions pII, pI.3 and pI.7 and estradiol production in human breast tumor cells.  
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 81: 55-70
- [8] Terasaka S., Aita Y., Inoue A., Hayashi S., Nisihigaki M., Aoyagi K., Sasaki H., Wada-Kiyama Y., Sakuma Y., Akaba S., Tanaka J., Sone H., Yonemoto J., Tanji M., Kiyama R. (2004): Using a customized DNA microarray for expression

- profiling of estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals.
- Environ. health perspect. 112 (7): 773-781
- [9] Muramatsu M., Inoue S. (2000): Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions?
- Biochem. Biophys. Res. Commun. 270 (1): 1-10
- [10] Watanabe T., Inoue S., Ogawa S., Ishii Y., Hiroi H., Ikeda K., Orimo A., Muramatsu M. (1997): Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ .
- Biochem. Biophys. Res. Commun. 236: 140-145
- [11] Simpson E. R., Mahendroo M. S., Means G. D., Kilgore M. W., Hinshelwood M. M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C. R., Michael M. D., Mendelson C. R., Bulun S. E. (1994): Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.
- Endoc. Rev. 15 (3): 342-355
- [12] Leclercq G. (2002): Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer.
- J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 80: 259-272
- [13] Dahlman-Wright K., Cavailles V., Fuqua S. A., Jordan V. C., Katzenellenbogen J. A., Korach K. S., Maggi A., Muramatsu M., Parker M. G., Gustafsson J.-A. (2006): International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors.
- Pharmacol. Rev. 58 (4): 773-781
- [14] Gustafsson J. A. (1999): Estrogen receptor  $\beta$  – a new dimension in estrogen mechanism of action.
- J. Endocrinol. 163 (3): 379-383
- [15] Hasler J. A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevilla J., Holla V., Helvig C., Falck J. R., Farrell G., Kaminsky L. S., Spivack S. D., Boiter E., Beaune P. (1999): Human cytochromes P450.



- Molecular Aspects of Medicine 20: 1-137
- [16] Richards J. S. (1994): Hormonal control of gene expression in the ovary.  
Endocr. Rev. 15 (6): 725-751
- [17] Simpson E. R. (2000): Role of aromatase in sex steroid action.  
J. Mol. Endocrinol. 25 (2): 149-156
- [18] Santen R. J., Brodie H., Simpson E. R., Siiteri P. K., Brodie A. (2009): History of aromatase: Saga of important biological mediator and therapeutic target.  
Endocr. Rev. 30 (4): 343-375
- [19] Conley A., Hinshelwood M. (2001): Mammalian aromatases.  
Reproduction 121 (5): 685-695
- [20] Karkola S., Höltje H., Wähälä K. (2007): A three-dimensional model of CYP19 aromatase for structure-based drug design.  
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 105: 63-70
- [21] Sohl C. D., Guengerich F. P. (2010): Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome p450 19A1.  
J. Biol. Chem. 285 (23): 17734-17743
- [22] Hackett J. C., Brueggemeier R. W., Hadad C. M. (2005): The final catalytic step of cytochrome p450 aromatase: a density functional theory study.  
J. Am. Chem. Soc. 127(14): 5224-5237
- [23] Sasano H., Frost A. R., Saitoh R., Harada N., Poutanen M., Vihko R., Bulun S. E., Silverberg S. G., Nagura H. (1996): Aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 81 (11): 4042-4046
- [24] Song D., Liu G., Luu-The V., Zhao D., Wang L. Zhang H., Xueling G., Li S., Désy L., Labrie F., Pelletier G. (2006): Expression of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study.

- J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 101: 136-144
- [25] Purohit A., Reed M. J. (2002): Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal woman.  
Steroids 67 (12): 979-983
- [26] Díaz-Cruz E. S., Shapiro C. L., Brueggemeier R. W. (2006): Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 (5): 2563-2570
- [27] Simpson E. R. (2003): Sources of estrogen and their importance.  
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 86: 225-230
- [28] Bulun S. E., Zeitoun K. M., Takayama K., Simpson E., Sasano H. (2000): Aromatase as a therapeutic target in endometriosis.  
Trends Endocrinol. Metab. 11 (1): 22-27
- [29] Richards J. A., Brueggemeier (2003): Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 (6): 2810-2816
- [30] von Euler U. (1935): Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets.  
Wien Klin. Wochenschr. 14 Nr. 33: 1182-1183
- [31] Bergström S., Samuelsson B. (1962): Isolation of prostaglandin E<sub>1</sub> from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors 11.  
J. Biol. Chem. 237: 3005-3006
- [32] Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B., Sjövall J. (1962): The structure of prostaglandin E, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>.  
Acta Chem. Scand. 16: 501-528
- [33] Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B., Sjövall J. (1963): Prostaglandins and related factors 15. The structures of prostaglandin E<sub>1</sub>, F<sub>1α</sub> and F<sub>1β</sub>.

- J. Biol. Chem. 238: 3555-3564
- [34] Bergström S., Danielsson H., Klenberg D., Samuelsson B. (1964): The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins.  
J. Biol. Chem. 239: PC 4006-4008
- [35] Vane J. R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.  
Nat. New Biol. 231 (25): 232-235
- [36] Bergström S., Danielsson H., Samuelsson B. (1964): The enzymatic formation of prostaglandin E<sub>2</sub> from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32.  
Biochim. Biophys. Acta 90: 207-210
- [37] Calder P. C. (2001): Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity.  
Lipids 36(9): 1007-1024
- [38] Smith W. L., Marnett L.J., DeWitt D. L. (1991): Prostaglandin and thromboxane biosynthesis.  
Pharmacol. Ther. 49 (3): 153-179
- [39] Smith W. L., Marnett L. J. (1991): Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis.  
Biochim. Biophys. Acta 1083 (1): 1-17
- [40] Murakami M., Nakatani Y., Tanioka T., Kudo I. (2002): Prostaglandin E synthase.  
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69: 383-399
- [41] Ma W., Quirion R. (2008): Does COX2-dependent PGE<sub>2</sub> play a role in neuropathic pain?  
Neurosci. Lett. 437 (3):165-169
- [42] Blatteis C. M., Li S., Li Z., Feleder C., Perlik V. (2005): Cytokines, PGE<sub>2</sub> and endotoxic fever: a re-assessment.  
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 76: 1-18

- [43] Gheorghe K. R., Thurlings R. M., Westman M., Boumans M. J., Malmström V., Trollmo C., Korotkova M., Jakobsson P., Tak P. (2011): Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression.  
PLoS One 6 (1): e16378
- [44] Machwate M., Harada S., Leu C. T., Seedor G., Labelle M., Gallant M., Hutchins S., Lachance N., Sawyer n., Slipetz D., Metters k. M., Rodan S. B., Young R., Rodan G. A (2001): Prostaglandin receptor EP<sub>4</sub> mediates the bone anabolic effects of PGE<sub>2</sub>.  
Mol. Pharmacol. 60 (1): 36-41
- [45] Minamizaki T., Yoshiko Y., Kozai K., Aubin J. E., Maeda N. (2009): EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E<sub>2</sub> on bone formation in rat calvaria cell cultures.  
Bone 44 (6): 1177-1185
- [46] Dey I., Lejeune M., Chadee K. (2006): Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor distribution and function in gastrointestinal tract.  
Br. J. Pharmacol. 149 (6): 611-623
- [47] Hoshino T., Namba T., Takehara M., Nakaya T., Sugimoto Y., Araki W., Narumiya S., Suzuki T., Mizushima T. (2009): Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the production amyloid- $\beta$ -peptides through internalization of the EP<sub>4</sub> receptor.  
J. Biol. Chem. 284(27): 18493-18502
- [48] Samuelsson B., Morgenstern R., Jakobsson P. J. (2007): Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target.  
Pharmacol. Rev. 59 (3): 207-224
- [49] Fredriksson R., Lagerström M. C., Lundin L.-G., Schiöth H. B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.  
Mol. Pharmacol. 63(6): 1256-1272

- [50] Ushikubi F., Hirata M., Narumiya S. (1995): Molecular biology of prostanoid receptors; an overview.  
J. Lipid Mediat. Cell Signal. 12: 343-359
- [51] Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F. (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.  
Physiol. Rev. 79 (4): 1193-1226
- [52] Sugimoto Y., Narumiya S. (2007): Prostaglandin E receptors.  
J. Biol. Chem. 282 (16): 11613-11617
- [53] Zhou L., Nilsson A. (2001): Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues.  
J. Lipid Res. 42(10): 1521-1542
- [54] Funk C. D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.  
Science 294(5548): 1871-1875
- [55] Warner T. D., Mitchell J. A. (2004): Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic.  
FASEB J. 18(7).790-804
- [56] Schuster V. L. (2002): Prostaglandin transport.  
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69: 633-647
- [57] Reid G., Wielinga P., Zelcer N., van der Heijden I., Kuil A., de Haas M., Wijnholds J., Borst P. (2003): The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 100(16): 9244-9249
- [58] Gupta R. A., DuBois R. N. (2001): Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2.  
Nat. Rev. Cancer 1: 11-21

- [59] Dennis E. A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. (2011): Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention.  
Chem. Rev. 111(10): 6130-6185
- [60] Leslie C. C. (2004): Regulation of the specific release of arachidonic acid phospholipase A<sub>2</sub>.  
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 70(4): 373-376
- [61] Murakami M., Kudo I. (2004): Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E<sub>2</sub>-biosynthetic pathway.  
Prog. Lipid Res. 43 (1): 3-35
- [62] Flower R. J., Vane J.R. (1972): Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol).  
Nature 240: 410-411
- [63] Hamberg M., Samuelsson B. (1974): Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets.  
Proc. Natl. Acad. Sci USA 71 (9): 3400-3404
- [64] Xie W., Chipman J. G., Robertson D. I., Erikson R. L. Simmons D. L. (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (7): 2692-2696
- [65] Otto J. C., Smith W. L. (1995): Prostaglandin endoperoxide Synthase-1 and -2.  
J. Lipid Mediat. Cell Signal. 12: 139-156
- [66] Huff R. G., Bayram E., Tan H., Knutson S. T., Knaggs M. H., Richon A. B., Santago II P., Fetrow J. S. (2005): Chemical and structural diversity in cyclooxygenase protein active sites.  
Chem. Biodivers. 2 (11): 1533-1552
- [67] Blobaum A. L., Mannett L. J. (2007): Structural and Functional basis of cyclooxygenase inhibition.

- J. Med. Chem. 50 (7): 1425-1441
- [68] Jones D. A., Carlton D. P., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Prescott S. M. (1993): Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.  
J. Biol. Chem. 268 (12): 9049-9054
- [69] Khan M. N. A., Lee Y. S. (2009): Cyclooxygenase inhibitors: scope of their use and development in cancer chemotherapy.  
Med. Res. Rev. 31 (2): 161-201
- [70] Yang T. (2003): Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla.  
Acta Physiol. Scand. 177 (4): 417-421
- [71] Chen J., Marsh T., Zhang J. S., Graham S. H. (1995): Expression of cyclooxygenase 2 in rat brain following kainate treatment.  
Neuroreport 6 (2): 245-248
- [72] Khan K. N. M., Stanfield K. M., Dannenberg A., Seshan S. V., Baergen R. N., Baron D. A., Soslow R. A. (2001): Cyclooxygenase-2 expression in the developing human kidney.  
Pediatr. Dev. pathol. 4(5): 461-466
- [73] Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M. (2000): Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.  
Annu. Rev. Biochem. 69: 145-182
- [75] Picot D., Loll P. J., Garavito R. M. (1994): The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub>- synthase-1.  
Nature 367 (6460): 243-249
- [76] Simmons D.L., Botting R. M., Hla T. (2004): Cyclooxygenase isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.  
Pharmacol. Rev. 56 (3): 387-437

- [77] Grosser T., Fries S., FitzGerald G. A. (2006): Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities.  
J. Clin. Invest. 116 (1): 4-15
- [78] Jakobsson P.-J., Thorén S., Morgenstern R., Samuelsson B. (1999): Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (13): 7220-7225
- [79] Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M., Kudo I. (2000): Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis.  
J. Biol. Chem. 275 (42): 32775-32782
- [80] Tanikawa N., Ohmiya Y., Ohkubo H., Hashimoto K., Kangawa K., Kojima M., Ito S., Watanabe K. (2002): Identification and characterization of novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4): 884-889
- [81] Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh S., Kudo I. (2000): Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2.  
J. Biol. Chem. 275 (42): 32775-32792
- [82] Kamei D., Murakami M., Nakatani Y., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I. (2003): Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis.  
J. Biol. Chem. 278 (21): 19396-19405
- [83] Mehrotra S., Morimiya A., Agarwal B., Konger R., Badve S. (2006): Microsomal prostaglandin E<sub>2</sub>-synthase-1 in breast cancer: a potential target for therapy.  
J. Pathol. 208 (3): 356-363



- [84] Hasan S., Satake M., Dawson D. W., Funahashi H., Angst E., Go V. L. W., Reber H. A., Hines O. J., Eibl G. (2008): Expression analysis of prostaglandin E<sub>2</sub> production pathway in human pancreatic cancers.  
*Pancreas* 37 (2): 121-127
- [85] Yoshimatsu K., Altorki N. K., Golijanin D., Zhang F., Jakobsson P.-J., Dannenberg A. J., Subbaramaiah K. (2001): Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer.  
*Clin. Cancer Res.* 7: 2669-2674
- [86] Wang H.-W., Hsueh C.-T., Lin C.-F. J., Chou T.-Y., Hsu W.-H., Wang L.-S., Wu Y.-C. (2006): Clinical implications of microsomal prostaglandin E synthase-1 overexpression in human non-small-cell lung cancer.  
*Ann. Surg. Oncol.* 13 (9): 1224-1234
- [87] Yoshimatsu K., Golijanin D., Paty P. B., Soslow R. A., Jakobsson P.-J., DeLellis R. A., Subbaramaiah K., Dannenberg A. J. (2001): Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer.  
*Clin. Cancer Res* 7 (12): 3971-3976
- [88] Murakami M., Kudo I. (2006): Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer.  
*Curr. Pharm. Des.* 12(8): 943-954
- [89] Watanabe K., Kurihara K., Suzuki T. (1999): Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1439 (3): 406-414
- [90] Muarkami M., Nakashima K., Kamei D., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Ohmiya Y., Watanabe K., Kudo I. (2003): Cellular prostaglandin E<sub>2</sub> production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2.  
*J. Biol. Chem.* 278 (39): 37937-37947

- [91] Balkwill F., Mantovani A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow?  
Lancet 357: 539-545
- [92] Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.  
N. Engl. J. Med. 315 (26): 1650-1659
- [93] Sano H., Kawahito Y., Wilder R. L., Hashiramoto A., Mukai S., Asai K., Kimura S., Kato H., Kondo M., Hla T. (1995): Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer.  
Cancer Res. 55 (17): 3785-3789
- [94] Hida T., Yatabe Y., Achiwa H., Muramatsu H., Kozaki K., Nakamura S., Ogawa M., Mitsudomi T., Sugiura T., Takahashi T. (1998): Increased expression of Cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas.  
Cancer Res. 58 (17): 3761-3764
- [95] Richards J. A., Petrel T. A., Brueggemeier R. W. (2002): Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells.  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 80 (2): 203-212
- [96] Zhao Y., Agarwal V. R., Mendelson C. R., Simpson E. R. (1996): Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE<sub>2</sub> via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene.  
Endocrinology 137(12): 5739-5742
- [97] Sales K. J., Katz A. A., Davis M., Hinz S., Soeters R. P., Hofmeyr M. D., Millar R. P., Jabbour H. N. (2001): Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (5): 2243-2249
- [98] Gupta S., Srivastava M., Ahmad N., Bostwick D. G., Mukhtar H. (2000): Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma.

- Prostate 42(1): 73-78
- [99] Tsujii M., DuBois R. N. (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2.  
Cell 83 (3): 493-501
- [100] Uefuji K., Ichikura T., Mochizuki H. (2000): Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer.  
Clin. Cancer Res. 6: 135-138
- [101] Queiroga F. L., Pires I., Parente M., Gregório H., Lopes C. S. (2011): COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer.  
Vet. J. 189 (1): 77-82
- [102] Kang J.-H., Song K.-H., Jeong K.-C., Kim S., Choi C., Lee C. H., Oh S.H. (2011): Involvement of COX-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells.  
BMC Cancer 11: 334
- [103] Masunaga R., Kohno H., Dhar D. K., Ohno S., Shibakita M., Kinugasa S., Yoshimura H., Tachibana M., Kubota H., Nagasue N. (2000): Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients .  
Clin. Cancer Res. 6 (10): 4064-4068
- [104] Khuri F. R., Wu H., Lee J. J., Kemp B. L., Lotan R., Lippmann S. M., Feng L., Hong W. K., Xn X.-C. (2001): Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer.  
Clin. Cancer Res. 7 (4): 861-867
- [105] Denkert C., Köbel M., Pest S., Koch I., Berger S., Schwabe M., Siegert A., Reles A., Klosterhalfen B., Hauptmann S. (2002): Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma.  
Am. J. Pathol. 160 (3): 893-903

- [106] Denkert C., Winzer K. J., Müller B. M., Weichert W., Pest S., Köbel M., Kristiansen G., Reles A., Siegert A., Guski H., Hauptmann S. (2003): Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma.  
Cancer 97 (12): 2978-2987
- [107] Kawamori T., Uchiya N., Sugimura T., Wakabayashi K. (2003): Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E<sub>2</sub> administration.  
Carcinogenesis 24 (5): 985-990
- [108] Sheng H., Shao J., Morrow J. D., Beauchamp R. D., DuBois R. N. (1998): Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E<sub>2</sub> in human colon cancer cells.  
Cancer Res. 58 (2): 362-366
- [109] Zhao L., Chen Z., Wang J., Yang L., Zhao Q., Wang J., Qi Q., Mu R., You Q.-D., Guo Q.-L. (2010): Synergistic effect of 5-fluorouracil and the flavanoid oroxylin A on HepG2 human hepatocellular carcinoma and on H<sub>22</sub> transplanted mice.  
Cancer Chemother. Pharmacol. 65 (3): 481-489
- [110] McGinty A., Chang Y.-W. E., Sorokin A., Bokemeyer D., Dunn M. J. (2000): Cyclooxygenase-2 expression inhibits trophic withdrawal apoptosis in nerve growth factor-differentiated PC12 cell.  
J. Biol. Chem. 275 (16): 12095-12101
- [111] Zhang X.-H., Huang D.-P., Guo G.-L., Chen G.-R., Zhang H.-H., Wan L., Chen S.-Y. (2008): Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer.  
BMC Cancer 8 (4): 1-8
- [112] Nelson A. R., Fingleton B., Rothenberg M. L., Matrisian L. M. (2000): Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications.  
J. Clin. Oncol. 18 (5): 1135-1149

- [113] Ménétrier-Caux C., Bain C., Favrot M. C., Blay J. Y. (1999): Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E<sub>2</sub> production by monocytes.  
Br. J. Cancer 79 (1): 119-130
- [114] Kambayashi T., Alexander H. R., Fong M., Strassmann G. (1995): Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10.  
J. Immunol. 154: 3383-3390
- [115] Levy G. N. (1997): Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer.  
FASEB J. 11 (4): 234-247
- [116] Eling T. E., Thompson D. C., Foureman G. L. Curtis J. F., Hughes M. F. (1990): Prostaglandin H Synthase and xenobiotic oxidation.  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 1-45
- [117] Wiese F. W., Thompson P. A., Kadlubar F. F. (2001) Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2 .  
Carcinogenesis 22: 5-10
- [118] Kelley D. J., Mestre J R., Subbaramaiah K., Sacks P. G., Schantz S. P., Tanabe T., Inoue H., Ramonetti J. T., Dannenberg A. J. (1997): Benzo[a]pyrene up-regulates Cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells.  
Carcinogenesis 18 (4): 795-799
- [119] DuBois R. N., Smalley W. E. (1996): Cyclooxygenase, NAIDs, and colorectal cancer.  
J. Gastroenterol. 31 (6): 898-906
- [120] Rozic J. G., Chakraborty C., Lala P. K. (2001): Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis.

- Int. J. Cancer 93 (4): 497-506
- [121] Cheng Y., Austin S. C., Rocca B., Koller B. H., Coffman T. M., Grosser T., Lawson J. A., FitzGerald G. A (2002): Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>.  
Science 296 (5567): 539-541
- [122] Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.  
Cell Death Differ. 16 (1): 3-11
- [123] Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.  
Br. J. Cancer 26 (4): 239-257
- [124] Carson D.A., Ribeiro J.M. (1993): Apoptosis and disease.  
Lancet 341 (8855): 1251-1254
- [125] Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis.  
Int. Rev. Cytol. 68: 251-306
- [126] Slee E. A., Adrian C., Martin S. J. (2001): Executioner Caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.  
J. Biol. Chem. 276 (10): 7320-7326
- [127] Cohen G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis.  
Biochem. J. 326: 1-16
- [128] Lavrik I. N., Golks A., Krammer P. H. (2005): Caspases: pharmacological manipulation of cell death.  
J. Clin. Invest. 115 (10): 2665-2672

- [129] Prast-Nielson S., Cebula M., Pader I., Arnér E. S. J. (2010): Noble metal targeting of thioredoxin reductase – covalent complexes with thioredoxin and thioredoxin-related protein of 14 kDa triggered by cisplatin.  
Free Radic. Biol. Med. 49 (11):1765-1778
- [130] Wang P-F., Veine D. M., Ahn S. H., Williams C. H., Jr. (1996): A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization.  
Biochemistry. 35 (15): 4812-4819
- [131] Zhong L., Arner E. S., Holmgren A. (2000): Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine- selenocysteine sequence.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (11): 5854-5859
- [132] Lee S. R., Kim J. R., Kwon K. S., Yoon H. W., Levine R. L., Ginsburg A., Rhee S. G. (1999): Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver.  
J. Biol. Chem. 274 (8): 4722-2734
- [133] Barnard P. J., Berners-Price S. J. (2007): Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds.  
Coord. Chem. Rev. 251: 1889-1902
- [134] MacDonald I. D., Graff G., Andersson L.A., Dunford H.B. (1989): Optical spectra and kinetics of reactions of prostaglandin H synthase: effects of the substrates 13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid, arachidonic acid, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine, and phenol and of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin, indomethacin, phenylbutazone, and bromfenac.  
Arch. Biochem. and Biophys. 272 (1): 194-202
- [135] Marnett L.J., Wlodawer P., Samuelsson B. (1975): Co-oxygenation of organic substrates by the prostaglandin synthetase of sheep vesicular gland.  
J. Biol. Chem. 250 (21): 8510-8517

- [136] Hsuanyu Y., Dunford H.B. (1990): Reactions of prostaglandin H synthase in the presence of the stabilizing agents diethyldithiocarbamate and glycerol.  
*Biochem. Cell Biol.* 68 (6): 965-672
- [137] Jewett S. L., Rocklin A. M. (1996): Two applications using N,N'-diethyldithiocarbamate as a stain for copper in native polyacrylamide gels of superoxide dismutase.  
*Anal. Biochem.* 237 (1): 65-69
- [138] Jaenicke R.U. (2009): MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3.  
*Breast Cancer Res. Treat.* 117: 219-221
- [139] Riddles P. W., Blakeley R. L., Zerner B. (1979): Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) – a reexamination.  
*Anal. Biochem.* 94 (1): 75-81
- [140] Schmidt K., Jung M., Keilitz R., Schnurr B., Gust R. (2000): Acetylenehexacarbonyldicobalt complexes, a novel class of antitumor drugs.  
*Inorganica Chimica Acta* 306: 6-16
- [141] Ott I., Kircher B., Gust R. (2004): Investigations on the effects of cobalt-alkyne complexes on leukemia and lymphoma cells: cytotoxicity and cellular uptake.  
*J. Inorg. Biochem.* 98 (3): 485-489
- [142] Ott I., Schmidt K., Kircher B., Schumacher P., Wiglenda T., Gust R. (2005): Antitumor-active cobalt-alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid: studies on the mode of drug action.  
*J. Med. Chem.* 48 (2): 622-629
- [143] Ott I., Gust R. (2005): Stability, protein binding and thiol interaction studies on [2-acetoxy-(2-propynyl)benzoate]hexacarbonyldicobalt.  
*Biometals* 18 (2): 171-177
- [144] Ott I., Abraham A., Schumacher P., Shorafa H., Gastl G., Gust R., Kircher B. (2006): Synergistic and additive antiproliferative effects on human leukemia cell



lines induced by combining acetylenehexacarbonyldicobalt complexes with the tyrosine kinase inhibitor imatinib.

J. Inorg. Biochem. 100 (11): 1903-1906

- [145] Laufer S. A., Augustin J., Dannhardt G., Kiefert W. (1994): (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase.

J. Med. Chem. 37 (12): 1894-1897

- [146] Ulbrich H., Fiebich B., Dannhardt G. (2002): Cyclooxygenase-1/-2 (COX-1/COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitors of the 6,7-diaryl-2,3-1H-dihydropyrrolizine type.

Eur. J. Med. Chem. 37 (12): 953-959

- [147] Koeberle A., Siemoneit U., Bühring U., Northoff H., Laufer S., Albrecht W., Werz O. (2008): Licofelone suppresses prostaglandin E<sub>2</sub> formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 326 (3):975-982

- [148] Liedtke A. J., Keck P. R. W. E. F., Lehmann F., Koeberle A., Werz O., Laufer S. A. (2009): Arylpyrrolizines as inhibitors of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (m-PGES-1) or as dual inhibitors of mPGES-1 and 5-lipoxygenase (5-LOX).

J. Med. Chem. 52 (15): 4968-4972

- [149] Narayanan N. K., Nargi D., Attur M., Abramson S. B., Narayanan B. A. (2007): Anticancer effects of licofelone (ML-3000) in prostate cancer cells.

Anticancer Res. 27 (4B): 2393-2402

- [150] Tavolari S., Bonafè M., Marini M., Ferreri C., Bartolini G., Brighenti E., Manara S., Tomasi V., Laufer S., Guarnieri T. (2008): Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade.

Carcinogenesis 29 (2): 371-380

- [151] Rigas B., Williams J. L. (2008): NO-donating NSAIDs and cancer: an overview with a note on whether NO is required for their action.  
Nitric Oxide 19 (2): 199-204
- [152] Yeh R.K., Chen J., Williams J. L., Baluch M., Hundley T.R., Rosenbaum R. E., Kalala S., Traganos F., Benardini F., del Soldato P., Kashfi K., Rigas B. (2004): NO-donating nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) inhibit colon cancer cell growth more potently than traditional NSAIDs: a general pharmacological property?  
Biochem. Pharmacol. 67 (12): 2197-2205
- [153] Kashfi K., Ryan Y., Qiao L. L., Williams J. L., Chen J., del Soldato P., Traganos F., Rigas B. (2002): Nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of various cultured human cancer cells: evidence of a tissue type-independent effect.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 303 (3): 1273-1282
- [154] Wiglenda T., Ott I., Kircher B., Schumacher P., Schuster D., Langer T., Gust R. (2005): Synthesis and pharmacological evaluation of 1H-imidazoles as ligands for the estrogen receptor and cytotoxic inhibitors of the cyclooxygenase.  
J. Med. Chem. 48 (20): 6516-6521
- [155] Rubbiani R., Kitanovic I., Alborzinia H., Can S., Kitanovic A., Onambele L. A., Stefanopoulou M., Geldmacher Y., Sheldrick W. S., Wolber G., Prokop A., Wöfl S., Ott I. (2010): Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties.  
J. Med. Chem. 53: 8608-8618
- [156] Ott I. (2009): On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs.  
Coord. Chem. Rev. 253: 1670-1681
- [157] Liu X.-H., Rose D. P. (1996): Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines.  
Cancer Res. 56(22): 5125-5127

- [158] Fabian J. (2008): Determination of prostaglandin E<sub>2</sub> by on-line-solid phase extraction-liquid chromatography with ultraviolet detection for microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 inhibitor screening.  
J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 875 (2): 557-561
- [159] Koeberle A., Siemoneit U., Böhning U., Northoff H., Laufer S., Albrecht W., Werz O. (2008): Licofelone suppresses prostaglandin E<sub>2</sub> formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 326 (3): 975-982

## 9 Publikationen

- K1** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Bergemann S., Gust R. (2011): Synthesis, characterisation and biological evaluation of copper and silver complexes based on acetylsalicylic acid. *Arch. Pharm.* 344 (10): 684-688  
<http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201000382>
- K2** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Bergemann S., Ott I., Gust R. (2010): [Cyclopentadienyl]metallocarbonyl complexes of acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (11): 5157-5163  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.028>
- K3** Rubner G., **Bensdorf K.**, Wellner A., Kircher B., Bergemann S., Ott I., Gust R. (2010): Synthesis and biological activities of transition metal complexes based on acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *J. Med. Chem.* 53 (19): 6889-6898  
<http://dx.doi.org/10.1021/jm101019j>
- K4** Ott I., Kircher B., Bagowski C. P., Vlecken D. H. W., Ott E. B., Will J., **Bensdorf K.**, Sheldrick W. S., Gust R. (2009): Modulation of the Biological Properties of Aspirin by Formation of a Bioorganometallic Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (6):1160-1163  
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200803347>
- K5** Liu W., Zhou J., Liu Y., Liu H., **Bensdorf K.**, Guo C., Gust R. (2011): Licofelone-nitric oxide donors as anticancer agents. *Arch. Pharm.* 344 (8): 487-493  
<http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201000397>
- K6** Liu W., Zhou J., Zhang H., Qian H., Yin J., **Bensdorf K.**, Gust R. (2011): Synthesis and biological evaluation of licofelone derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents. *Letters in Drug Design & Discovery* 8 (10): 911-917  
<http://dx.doi.org/10.2174/157018011797655223>

- K7** Liu W., Zhou J., **Bensdorf K.**, Zhang H., Liu H., Wang Y., Qian H., Zhang Y., Wellner A., Rubner G., Huang W., Gui C., Gust R. (2011): Investigations on cytotoxicity and anti-inflammatory potency of licofelone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (3): 907-913

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.002>

- K8** Liu W., **Bensdorf K.**, Proetto M., Hagenbach A., Abram U., Gust R. (2012): Synthesis, characterization, and in vitro studies on bis[1,3-diethyl-4,5-diarylimidazol-2-ylidene]gold(I/III) complexes. *J. Med. Chem.* 55 (8): 3713-3724

<http://dx.doi.org/10.1021/jm3000196>

- K9** Liu W., **Bensdorf K.**, Proetto M., Abram U., Hagenbach A., Gust R. (2011): NHC gold halide complexes derived from 4, 5-diarylimidazoles: synthesis, structural analysis, and pharmacological investigations as potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* 54 (24): 8605-8615

<http://dx.doi.org/10.1021/jm201156x>

Liu W., **Bensdorf K.**, Hagenbach A., Abram U., Niu B., Mariappan A., Gust R. (2011): Synthesis and biological studies of silver N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-diarylimidazole. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2): 5927-5934

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.002>

Liu W., Zhou J., Qi F., **Bensdorf K.**, Li Z., Zhang H., Qian W., Huang W., Cai X., Cao P., Wellner A., Gust R. (2011): Synthesis and biological activities of 2-amino-thiazole-5-carboxylic acid phenylamide derivatives. *Arch. Pharm.* 344 (7): 451-458

<http://dx.doi.org/10.1002.ardp.201000281>

Oehler C., **Bensdorf K.**, Gust R., Imming P. (2009): Chamavioline-Antiedematous, but not a constituent of *matricaria recutita*. *Phytochemistry Letters* 2 (4): 171-175

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2009.05.005>

Scholz M., **Bensdorf K.**, Gust R., Hey-Hawkins E. (2009): Asborin: The carbaborane analogue of Aspirin. *Chem. Med. Chem.* 4 (5): 746-748

<http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200900072>

## 10 Posterpräsentationen und Vorträge

Bensdorf K., Ott I., Gust R. (2008): **Poster und Vortrag** auf der 6. DPhG-Landesgruppen Tagung Berlin-Brandenburg „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ Berlin

Biologische Untersuchung von NSAR-Metall-Derivaten

Bensdorf K., Ott I., Wellner A., Gust R. (2008): **Poster** auf dem 18th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Seefeld, Austria

Investigation on the mode of action of NSAID metal derivatives in human tumor cells

Bensdorf K., Ott I., Wellner A., Gust R. (2008): **Poster** auf der DPhG-Jahrestagung, Bonn

Studies on the mode of action of NSAID metal derivatives in hormone (in-) dependent cancer cells

Bensdorf K., Rubner G., Gust R. (2009): **Poster** Frontiers of Medical Chemistry: Drugs of the Future. Barcelona, Spain

Biological investigation of NSAID metal derivatives

Bensdorf K., Rubner G., Gust R. (2010): **Poster** auf der 7. Tagung DPhG-Landesgruppen-Tagung Berlin-Brandenburg „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ Berlin

NSAR-Metall-Derivate und ihre biologischen Effekte in humanen Tumorzellen