

# **Synthese und pharmakologische Testung von NSAR-Zeise-Komplexen**

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

Sandra Meieranz  
aus Ludwigsfelde

2011



Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2009 bis Juli 2011 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: 04.11.2011



Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. Ronald Gust,**

dem ich für die Vergabe des interessanten Themas, den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung und für das in mich gesetzte Vertrauen danken möchte.

Großer Dank gilt ebenfalls der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. William S. Sheldrick (Analytische Chemie, Fakultät für Chemie und Biochemie, Ruhr-Universität Bochum) für die Kooperation, Diskussionsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre während meines Aufenthaltes in Bochum. Yvonne Geldmacher danke ich für die Aufnahme der CD-Spektren und DNA-Schmelzpunkte, Marilena Stefanopoulou für die LC-MS-Untersuchungen und Malte Kokoschka fürs Molecular Modelling.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe für das angenehme und sehr freundschaftliche Arbeitsklima während des gesamten Zeitraumes. Ganz besonders möchte ich Magnus Krüger für seine stete Diskussionsbereitschaft sowohl fachlicher als auch nicht-fachlicher Natur danken. Margarethe Urban danke ich für die Überarbeitung des Abstracts.

Ebenfalls gilt mein Dank den technischen Angestellten insbesondere Maxi Wenzel für synthetische Fragestellungen, Eleonore Christmann-Österreich und Heike Scheffler für Bastelstunden an der HPLC, Silke Bergmann für zelluläre Fragestellungen, Thomas Rudolf für die musikalische Gestaltung und gute Laune im Labor, Jürgen Lindemann für die Aufnahme der MS-Spektren und Bettina Zeisig für die NMR-Analytik. Besonderer Dank gilt auch Frau vom Bauer für ihre Hilfsbereitschaft und Übernahme von vielen organisatorischen Arbeiten.

Weiterhin möchte ich Nora Reitner für das Korrekturlesen und die unermüdliche Kommasetzung der gesamten Arbeit danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie für ihr Vertrauen in mich und die Unterstützung während meines gesamten Bildungsweges bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Partner Tizian Nemeth, der mir während der gesamten Zeit mit seiner Unterstützung die notwendige Kraft gegeben hat.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Metalle im biologischen Alltag	4
1.2	Metallkomplexe in der Medizin	5
1.3	Metallverbindungen als Zytostatika	7
1.3.1	Platinkomplexe	8
1.4	Zeise-Salz	10
1.5	Nichtsteroidale Antirheumatika – NSAR	12
1.5.1	NSAR in der Tumorthherapie	13
1.5.2	NSAR-Metallkomplexe	14
1.6	Zielstellung	14
<b>2</b>	<b>Synthese</b>	<b>16</b>
2.1	Übersicht der synthetisierten Verbindungen	16
2.1.1	Platinkomplexe, deren Liganden eine unselektive COX-Hemmung aufweisen	17
2.1.2	Platinkomplexe, deren Liganden COX-2-Selektivität bzw. -Präferenz aufweisen	19
2.2	Synthesen der Liganden	20
2.2.1	Synthese des Paracetamolpropenylethers	20
2.2.2	Veresterung der sauren NSAR mit den entsprechenden Alkoholen	20
2.2.3	Synthese des Allylsalicylsäureamids	21
2.2.4	Synthese der (E)-2,3-Diarylacrylsäuren	22
2.2.5	Derivatisierung von Celecoxib	27
2.3	Vom Metall zu Zeise-analogen Platinkomplexen	28
2.3.1	Synthese von Tetrachloroplatinat	28
2.3.2	Synthese des Zeise-Salzes	29
2.3.3	Ligandenaustausch an der Olefinkomponente	31
<b>3</b>	<b>Physikalisch-chemische Untersuchungen</b>	<b>35</b>
3.1	Reaktionen von und an Olefin-Platin-Komplexen	35
3.2	Untersuchung der Stabilität von Zeise-analogen Platinkomplexen	35
3.2.1	Untersuchung des Einflusses verschiedener Substituenten	39
3.2.2	Variationen in der funktionellen Gruppe, die der Spaltung unterliegt	40
3.2.3	Sterische Abschirmung der Doppelbindung	42
3.2.4	Strukturelle Veränderungen an der olefinischen Seitenkette	46
3.2.5	Zusammenfassung	47
3.3	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit	49
3.4	Lipophiliebestimmungen	50

<b>4</b>	<b>Hemmung der Cyclooxygenasen</b>	<b>55</b>
4.1	Prostaglandin-H-Synthase	55
4.2	Isoenzyme der Cyclooxygenase	57
4.3	Funktionen der Prostaglandine	59
4.3.1	Physiologische Funktionen	59
4.3.2	Pathophysiologische Funktionen	59
4.4	Testsystem	60
4.4.1	Probleme des Testsystems	61
4.5	<b>Einfluss der Platinkomplexe auf die Enzymaktivität an isolierten Cyclooxygenasen</b>	<b>64</b>
4.5.1	unselektive NSAR-Liganden	65
4.5.2	COX-2-selektive Liganden	69
4.6	<b>Struktur-Wirkungsbeziehung von Platinkomplexen an der COX</b>	<b>70</b>
4.6.1	Einfluss der Abgangsgruppen	70
4.6.2	Ursache der COX-Hemmung	72
4.7	<b>Hemmung der COX im Ganzzellassay</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Zytotoxizität</b>	<b>77</b>
5.1	Testsystem	78
5.2	Ergebnisse	79
<b>6</b>	<b>Zelluläre Aufnahme der NSAR-Zeise-Komplexe</b>	<b>85</b>
6.1	<b>Zellaufnahme</b>	<b>85</b>
6.1.1	Durchführung der Zellaufnahme	86
6.1.2	Ergebnisse	86
6.2	<b>Zellkernaufnahme</b>	<b>89</b>
6.2.1	Durchführung der Zellkernaufnahme	89
6.2.2	Ergebnisse	91
<b>7</b>	<b>DNA-Bindungsstudien</b>	<b>94</b>
7.1	<b>DNA-Bindung an isolierter DNA</b>	<b>95</b>
6.1	CD-spektroskopische Untersuchungen	97
7.2	<b>Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur</b>	<b>100</b>
7.3	<b>Untersuchung der DNA-Bindung in MCF-7-Zellen</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Proteinbindung</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>108</b>
<b>10</b>	<b>Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>Abstract</b>	<b>113</b>

<b>12</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>115</b>
12.1	Materialien	115
12.2	Methoden	117
12.3	Synthesen	135
<b>13</b>	<b>Anhang</b>	<b>156</b>
13.1	Abkürzungen	156
13.2	Lebenslauf	157
13.3	Literaturverzeichnis	158





# 1 Einleitung

## 1.1 Metalle im biologischen Alltag

Metalle spielen bei vielen Prozessen im Pflanzen- und Tierreich eine bedeutende Rolle. Die Mitwirkung bei zahlreichen biologischen Vorgängen geht dabei auf die ionische Form zurück. Man unterscheidet die Mengenelemente, wie  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  von den Spurenelementen  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+/3+}$ ,  $Fe^{2+/3+}$ ,  $Cu^{2+}$  und vielen mehr<sup>[1][2]</sup>. Als stellvertretendes Mengenelement sei hier das Magnesium genannt. Es spielt im pflanzlichen Stoffwechsel eine wichtige Rolle für den Aufbau des Chlorophylls und ermöglicht damit der Pflanze die für sie so wichtige Photosynthese<sup>[3]</sup>. Neben dem Aufbau des Chlorophylls ist das Magnesium an einer Vielzahl von Transportprozessen beteiligt<sup>[4]</sup>. Auch beim Menschen besitzt es eine große Bedeutung. Als Gegenspieler von Calcium, einem weiteren Mengenelement, steuert es die Kontraktion und Relaxation der Muskulatur. Bei einem Mangel an Magnesium kann es daher zu Krämpfen kommen.

Eines der essentiellen Spurenelemente ist das Eisen. Als Zentralatom des Hämoglobins ist es an der Bindung und dem Transport des Sauerstoffs beteiligt. Neben dem Hämoglobin ist es noch in weiteren Biomolekülen wie dem Myoglobin, den Cytochromen, Katalasen und Peroxidasen enthalten<sup>[5]</sup>. Eisen befindet sich im Transferrin im Plasma und wird als Ferritin im Körper gespeichert<sup>[6]</sup>. Ein Mangel des Metallions führt zur Blutarmut. Ebenfalls bedeutend ist das Zink. Es ist Bestandteil vieler Enzyme, von denen die Zinkproteasen die größte Gruppe bilden<sup>[7]</sup>. Weitere Zink-haltige Enzyme finden sich in den Klassen der RNA- und DNA-Polymerasen, Carboanhydrasen, alkalischen Phosphatasen und Alkoholdehydrogenasen<sup>[8]</sup>. Das Vorkommen und die Funktionen der Metalle bzw. Metallionen sollen hier nicht abschließend betrachtet werden, sondern es soll lediglich auf die essentielle Bedeutung hingewiesen werden. Neben den natürlichen Funktionen, die Metalle bzw. die ionische Form der Metalle in biologischen Systemen vermitteln, werden sie auch seit vielen Jahrhunderten zur Therapie verschiedenster Erkrankungen eingesetzt.

## 1.2 Metallkomplexe in der Medizin

Erste Berichte über die Anwendung von Metallen gehen auf die Ägypter zurück. Bereits 3000 v.Chr. benutzten sie Kupfer zur Desinfektion von Wasser. Auch bekannt ist die Anwendung von Gold als Heilmittel in China und den arabischen Ländern vor mehr als 3500 Jahren. Ca. 1500 v.Chr. verwendeten die Ägypter Eisenverbindungen zur Wunddesinfektion. Zeitgleich erkannte man auch die wundheilende Förderung von Zink<sup>[9]</sup>. Berichte über Quecksilber gehen bis in die Antike zurück. Medizinisch große Bedeutung erlangte Quecksilber aber erst im 16. Jahrhundert, als es zur Behandlung der Syphilis in Europa eingesetzt wurde. Zunächst erfolgte die Anwendung lediglich äußerlich. Paracelsus setzte die Quecksilberverbindung als erster innerlich zur Behandlung der Syphilis ein und erkannte dabei die diuretische Wirkung der Metallverbindung. Der wissenschaftliche Nachweis erfolgte allerdings erst Ende des 19., Anfang des 20. Jahrhunderts<sup>[10]</sup>. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts fanden Antimonverbindungen Einzug in die Therapie der Leishmaniose. Die Tuberkulose therapierte man dagegen mit der Goldverbindung  $K[Au(CN)_2]$ .

In der heutigen Zeit sind ebenfalls einige Metallverbindungen als Therapeutika in der Medizin zu finden. Bei der Therapie der Schlafkrankheit steht als Arzneistoff das Melarsoprol (Abb. 1.1 links) zur Verfügung. Dabei handelt es sich um einen Arsen-haltigen Komplex, der durch Reaktion des Arsens mit den Thiolgruppen von Enzymen im ZNS zu deren Inaktivierung führt. Desweiteren wird zur Behandlung der Leishmaniose das Stibogluconat-Natrium (Abb. 1.1 rechts) eingesetzt. Das im Komplex gebundene dreiwertige Antimon wirkt über die Blockade von enzymatischen Sulfhydrylgruppen<sup>[11]</sup>.

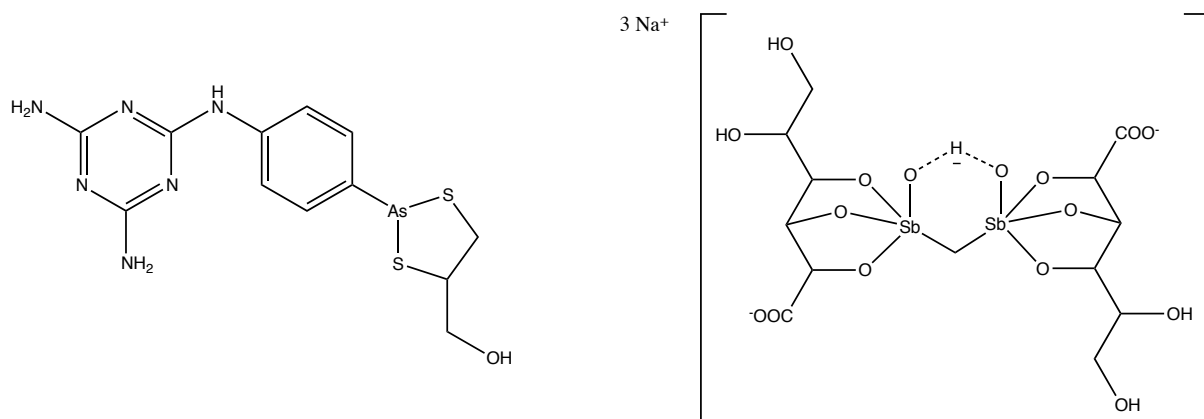


Abb. 1.1 Melarsoprol (links) und Stibogluconat-Natrium (rechts)

Eine weitere Gruppe von metallhaltigen Pharmaka stellen die Kontrastmittel und Radiopharmaka dar. Dabei wird in der Magnetresonanztomographie die paramagnetische Eigenschaft der verwendeten Metalle ausgenutzt und für die Kontrastverstärkung benutzt<sup>[12]</sup>.

Handelsname	magnetisches Ion	Darstellung von
Magnevist	Gd	Perfusion, Extrazellularraum
Teslascan	Mn	Leber, Myocard, Pancreas
Resovist	Fe	Leber

Tabelle 1.1 Übersicht der verwendeten Metall bei der MRT

Bei den Radiopharmaka werden radioaktive Elemente verwendet, durch deren  $\gamma$ -Strahlung die Verteilung im Körper verfolgt und dadurch Stoffwechselprozesse überwacht werden können. Zum Einsatz kommen dabei kurzlebige  $\gamma$ -Strahler und Positronenstrahler. Die genutzten Verfahren nennt man Szintigraphie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Die Tabellen 1.1 und 1.2 geben jeweils einen Überblick über die verwendeten Metalle<sup>[12]</sup>.

Isotope	Strahlung	Halbwertszeit
Technetium 99	$\gamma$	6h
Indium 111	$\gamma$	3d
Thallium 201	$\gamma$	3d
Gallium 67	$\gamma$	3d

Tabelle 1.2 Übersicht der verwendeten metallhaltigen Radiopharmaka

Goldkomplexe wie das Auranofin (Ridaura<sup>®</sup>) und die Aurothioglucose (Aureotan<sup>®</sup>) sind Basistherapeutika bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis (siehe Abb. 1.2). Auf Grund ihrer schweren unerwünschten Nebenwirkungen spielen sie allerdings heute nur noch eine untergeordnete Rolle und sind daher Mittel 2. Wahl<sup>[13]</sup>. Aktuelle Forschungs-schwerpunkte beschäftigen sich mit der Aktivität von Goldkomplexen bei Malaria<sup>[14]</sup> und Krebs<sup>[15]</sup>.

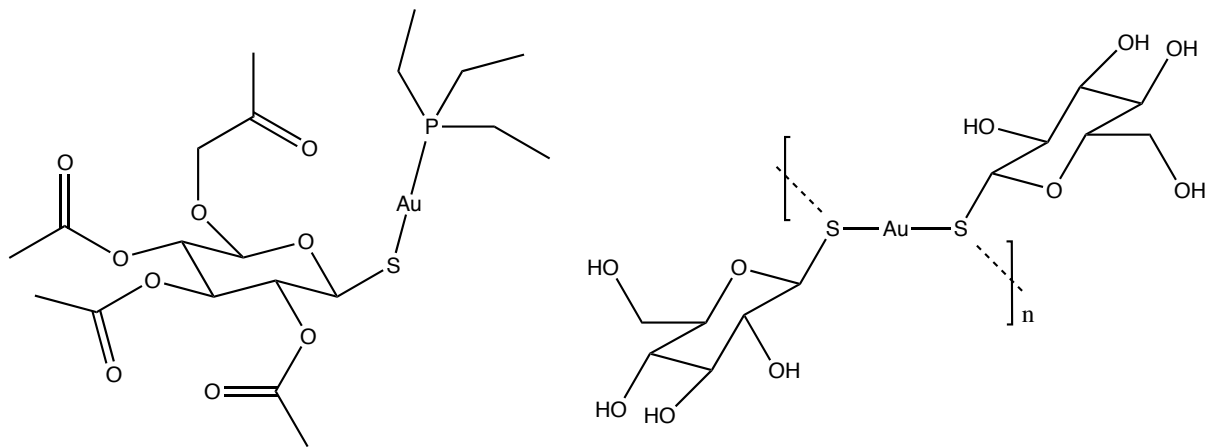


Abb. 1.2 rechst Auranofin; links Aurothioglucose

Auch im Bereich der Psychopharmaka werden Metalle in der Therapie eingesetzt. Lithium ist das verwendete Metall und wird in Form von Salzen zur Behandlung von manischen Depressionen verwendet<sup>[16]</sup>. Als letztes sei das Nitroprussid-Natrium erwähnt. Dabei handelt es sich um einen Eisenkomplex, der als Notfallmedikament, intravenös verabreicht, bei Bluthochdruckkrisen zum Einsatz kommt.

### 1.3 Metallverbindungen als Zytostatika

Das wohl größte Einsatzgebiet von Metallkomplexen liegt im Bereich der Krebsbehandlung. Die Suche nach neuen Wirkstoffen hat in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl verschiedener Metallkomplexe hervorgebracht. Einige der neuen Komplexe zeigen stark antiproliferative Wirkungen und befinden sich bereits in klinischen Studien. Eine Vielzahl von Metallen wird dabei beforscht. Titan, Rhodium, Iridium, Gold sind nur einige der Metalle, die mit zahlreichen verschiedenen Liganden in aktuelle Forschungsarbeiten eingebunden sind. Stellvertretend für die aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Bioorganometallverbindungen soll hier kurz das Eisen angesprochen werden. Ein schon lange bekannter Komplex ist das Ferrocen, bei dem das Eisen zwischen 2 Cyclopentadienringen komplexiert ist. Komplexe, bei denen die  $\pi$ -Liganden parallel zum Metall angeordnet sind, werden auch als Sandwichkomplexe bezeichnet. Das Ferrocen selbst zeigt keine Aktivität an Tumorzellen<sup>[17]</sup>. Die Oxidation des Eisens von  $2^+$  auf  $3^+$  führt zu den Ferrocenium-Komplexen (Abb. 1.3), die neben einer guten Wasserlöslichkeit auch die gewünschte Aktivität an Tumorzellen zeigen<sup>[18]</sup>. Als Mechanismus für die zytotoxischen Wirkungen wird dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert, die an der DNA zu Basenmodifikationen sowie zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen. Damit hat das

Redoxverhalten dieser Komplexe enormen Einfluss auf die Aktivität an Tumorzellen<sup>[19]</sup>. Die Verbindung von Ferrocen mit Tamoxifen zum Ferrocifen (Abb. 1.3) brachte eine neue Klasse an Eisenkomplexen mit Antitumorwirkung hervor<sup>[20]</sup>. Ein dualer Mechanismus für diesen Komplex scheint wahrscheinlich. Neben den Effekten des Ferrocens kann die Tamoxifenkomponente zusätzlich über den ER $\alpha$ -Rezeptor estrogene Wirkungen antagonisieren<sup>[21]</sup>.

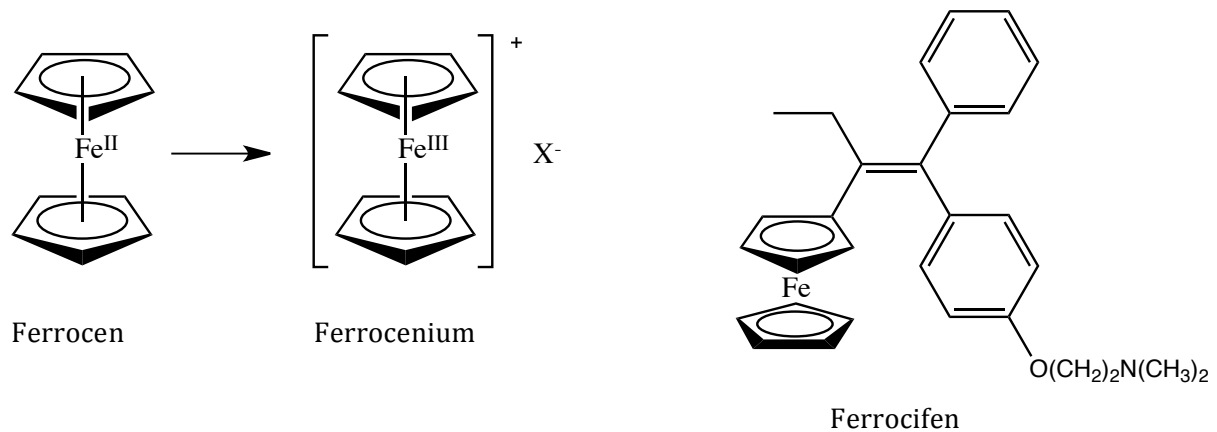


Abb. 1.3 Eisenkomplexe mit antiproliferativen Effekten

### 1.3.1 Platinkomplexe

Seit Jahren fest etabliert in der Behandlung zahlreicher Krebsarten sind dagegen nur Platinkomplexe. In über 50% werden sie als Chemotherapeutika bei einer Reihe von soliden Tumoren mit beachtlicher Erfolgsquote eingesetzt. Den guten Erfolgen stehen die Dosis-limitierenden Nebenwirkungen und zunehmenden Resistenzentwicklungen entgegen<sup>[22]</sup>. Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin sind die einzigen metallhaltigen Zytostatika, die in Europa im klinischen Alltag zum Einsatz kommen. An den Platinkomplexen wird deutlich sichtbar, wie durch Variation der Liganden bzw. Abgangsgruppen Einfluss auf die Reaktionskinetik genommen werden kann. Resultat sind verringerte Nebenwirkungen, eine zurückgedrängte Resistenzentwicklung und ein verbreitertes Wirkspektrum.

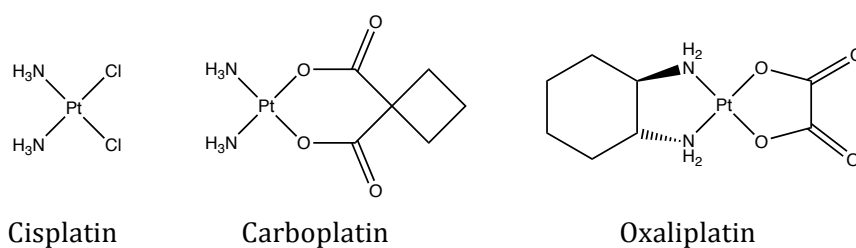


Abb. 1.4 Übersicht von Platinkomplexen, die in Europa in der Therapie solider Tumoren eingesetzt werden

Der Einzug des Cisplatin in die Welt der medizinischen Chemie resultierte, wie so oft bei großen Entdeckungen, aus einem reinen Zufall. Barnett Rosenberg untersuchte 1965 das Verhalten von *Escherichia coli*-Bakterien im elektrischen Feld und beobachtete ein verändertes Wachstumsverhalten<sup>[23]</sup>. Dabei erkannte er, dass nicht das elektrische Feld für das abnorme Wachstumsverhalten verantwortlich war, sondern der in Lösung entstandene Diammintetrachloroplatin(IV)-Komplex, der sich aus der Platinelektrode und der Elektrolytlösung bildete. Die Erkenntnis der Antitumoraktivität von Diammindichloroplatin(II) = Cisplatin und die folgende synthetische Herstellung führten 1979 zur Zulassung als Chemotherapeutikum bei der Behandlung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sowie bei Eierstock- und Hodenkrebs. Nachteile des Cisplatin lagen unter anderem in der schlechten Wasserlöslichkeit, die durch die Ausbildung von Kolumnarstrukturen erklärt werden kann. Nebenwirkungen sind Oto- und Neurotoxizität, Übelkeit, Erbrechen und Nephrotoxizität, wobei letztere als Dosis-limitierender Faktor zu nennen ist.

Der Austausch von 2 Chlorgruppen gegen einen Cyclobutan-1,1-dicarboxylat-Liganden führte zum Carboplatin, einem Komplex mit erhöhter Wasserlöslichkeit. Durch die räumliche Anordnung des Cyclobutanringes über der Platinebene wird die Ausbildung der Kolumnarstruktur unterbunden und die Solvatisierung erleichtert. Auch die Reaktionskinetik ist im Vergleich zum Cisplatin deutlich verringert. Ebenfalls verlangsamt ist die Reaktion mit Nucleophilen. Dadurch wird der Komplex weniger durch Proteine und schwefelhaltige Aminosäuren inaktiviert, jedoch erfolgt auch die Bindung an die DNA wesentlich langsamer, woraus höhere therapeutische Dosen resultieren<sup>[24]</sup>. Klinisch gesehen ist Carboplatin wesentlich besser verträglich als Cisplatin. Bei normaler Dosierung tritt keine Nephrotoxizität auf, ebenso geringer vorhanden sind Ototoxizität, Neurotoxizität, Übelkeit und Erbrechen. Nachteilig ist die oft bestehende Kreuzresistenz von Cisplatin und Carboplatin.

Beim Oxaliplatin wurden 2 Chlorabgangsgruppen gegen Oxalat ausgetauscht. Durch diesen Liganden wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Nucleophilen im Vergleich zum Cisplatin nicht verändert. Dadurch ist die schnelle Inaktivierung durch Reaktion mit Nucleophilen erneut gegeben. Mehr Einfluss hat hier die Variation der beiden Neutralliganden. Diese wurden durch ein 1,2-Diaminocyclohexan ersetzt (Abb.1.4). Vergleicht man die entstehenden DNA-Platin-Addukte von Cisplatin und Oxaliplatin, so lassen sich kaum Unterschiede finden. Dennoch zeigt Oxaliplatin ein verändertes Wirkspektrum. Als Beispiel sei hier das metastasierende Kolonkarzinom genannt<sup>[25]</sup>. Dieser Tumor ist oft nicht mit Cisplatin und Carboplatin behandelbar, da in vielen Fällen eine Primärresistenz gegen die beiden Zytostatika besteht. Die Therapie mit Oxaliplatin hingegen scheint dem zugrunde liegenden Resistenzmechanismus nicht zu unterliegen und zeigt bei der Behandlung gute Erfolge. Als Ursache wird die Umgehung des MMR-Reparatursystems gesehen. Durch die räumlich große 1,2-Diaminocyclohexangruppe können die DNA-Oxaliplatin-Addukte offensichtlich nur schwer

bzw. gar nicht über den MMR-Weg erkannt und beseitigt werden<sup>[26]</sup>. Betrachtet man die Nebenwirkungen so sind Nephrotoxizität und Myelosuppression wenig bis gar nicht vorhanden. Dosis-limitierend tritt die sensorische Neuropathie in Erscheinung.

#### 1.4 Zeise-Salz

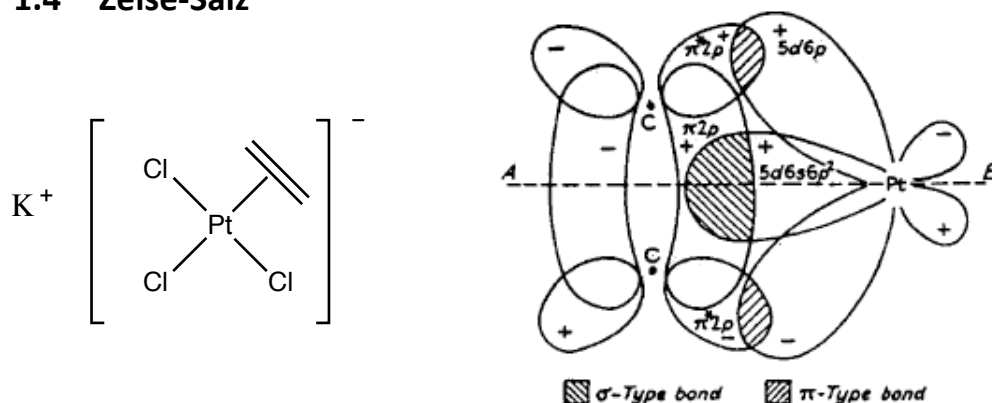


Abb. 1.5 Strukturformel des Zeise-Salzes links und die Orbitale<sup>[27]</sup> rechts dargestellt

Im Gegensatz zu den schon etablierten Platinkomplexen konnte das Zeise-Salz (Abb. 1.5) bisher noch keinen Einzug ins Gebiet der medizinischen Chemie finden. Obwohl es sich dabei um eine der ersten Organometallverbindungen handelt, ist über dessen pharmakologische Eigenschaften nur sehr wenig bekannt. Der Namensgeber und Entdecker des Salzes, William Christopher Zeise, berichtete über seine Beobachtungen bei der Reaktion von Kaliumtetrachloroplatinat mit Ethanol erstmals 1825 in einem dänischen Journal<sup>[28]</sup>. 1831 wurde eine deutsche Übersetzung in Poggendorfs Annalen der Physik<sup>[28][29]</sup> veröffentlicht. Zunächst löste Zeise das Kaliumtetrachloroplatinat in der sechsfachen Menge Ethanol und reduzierte das Volumen unter leichtem Erhitzen auf ein Sechstel. Das Ergebnis war eine braune Lösung, die ein schwarzes Pulver enthielt. Beim Verdampfen des restlichen Lösungsmittels blieb ein brauner Rückstand, der nun neben dem schwarzen Pulver auch gelbe Partikel aufwies. Bei starkem Erhitzen des Rückstandes beobachtete er die Freisetzung von gasförmiger HCl und einem weiteren Gas mit entzündlichen Eigenschaften. Bei Wiederholung der Reaktion unter Zusatz von Kaliumchlorid gelang es ihm, lange gelbe Nadeln zu isolieren. Wie für Chemiker der damaligen Zeit durchaus üblich, überprüfte Zeise neben der elementaren Zusammensetzung auch den Geschmack seiner Verbindung und beschreibt ihn als metallisch, adstringierend und langlebig. Die Aufklärung der Zusammensetzung und Struktur des Zeise-Salzes dauerte noch viele Jahre. Zeise selbst vermutete aufgrund seiner durchgeführten Elementaranalyse, ausgehend vom wasserfreien Salz, folgende Zusammensetzung<sup>[28]</sup>:  $2 \text{PtCl}_2 + 4 \text{H}_2\text{C} + \text{KCl}_2$ . Damit entfachte er eine kontroverse Diskussion mit dem Chemiker Justus Liebig. Der Elementar-Analytik Liebigs nach enthielt die



Verbindung Sauerstoff. Daraufhin deklarierte er die publizierte Zusammensetzung von Zeise als falsch<sup>[30]</sup>. Die Abwesenheit des Sauerstoffs konnte erst 1861 nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang es das entweichende entzündliche Gas als Ethen zu identifizieren, indem es in Bromwasser eingeleitet wurde und zu 1,2-Dibromethan reagierte<sup>[28][31]</sup>. Karl Birnbaum war der Erste, der das Zeise-Salz direkt aus Platin(II)chlorid und Ethylen herstellte und weitere Olefine, wie Propen und 1-Penten zur Komplexbildung verwendete. Ausgehend von seinen Untersuchungen postulierte er ein tetravalentes Platin, welches zu beiden C-Atomen des Ethens gleichermaßen gebunden ist und als weitere Liganden 2 Chloratome besitzt<sup>[28][32]</sup>. Es dauerte weitere 85 Jahre bis die Bindung von Alkenliganden an Metalle verstanden wurde. In der Zwischenzeit fiel der Focus mehr und mehr auf andere Metalle und das Zeise-Salz geriet ein wenig in Vergessenheit. Erst 1951 gelang es die Bindung von  $\pi$ -Liganden an Metallen mit Hilfe des Dewar-Chatt-Duncanson-Modells<sup>[28][33]</sup> ausreichend zu erklären (Abb 1.5 links). Die Aufnahme der ersten Kristallstruktur vom Zeise-Salz gelang 1954.

In folgenden Arbeiten wurden Platin-Komplexe synthetisiert, in denen die Liganden aus ungesättigten Alkoholen<sup>[34]</sup> und Ammoniumsalzen<sup>[35]</sup> bestehen. Dabei wird deutlich, dass für die Stabilität sowohl die Elektronendichte der Liganden als auch sterische Gegebenheiten einen maßgeblichen Einfluss haben. So führen elektronenziehende Substituenten zu einer kleineren Stabilitätskonstante. Zur weiteren Charakterisierung des Zeise-Salzes folgten Untersuchungen zur Reaktivität<sup>[36]</sup>. Dadurch ist heute bekannt, dass vom Ethenliganden ein starker Transeffekt ( $10^{11}$  verglichen mit  $H_2O$ ) ausgeübt wird. Die Ermittlung der Halbwertszeit bei der Hydrolyse des trans-ständigen Chlorliganden wurde mit  $5 \times 10^{-5}s$  in wässriger Lösung bei  $25^\circ C$  ermittelt<sup>[37][38]</sup>. Das Ethen selbst kann in stark basischen Medien leicht nucleophil addiert werden und reagiert dabei vom  $\eta^2$ -Olefin zum  $\sigma$ -Alkylliganden<sup>[39]</sup>.

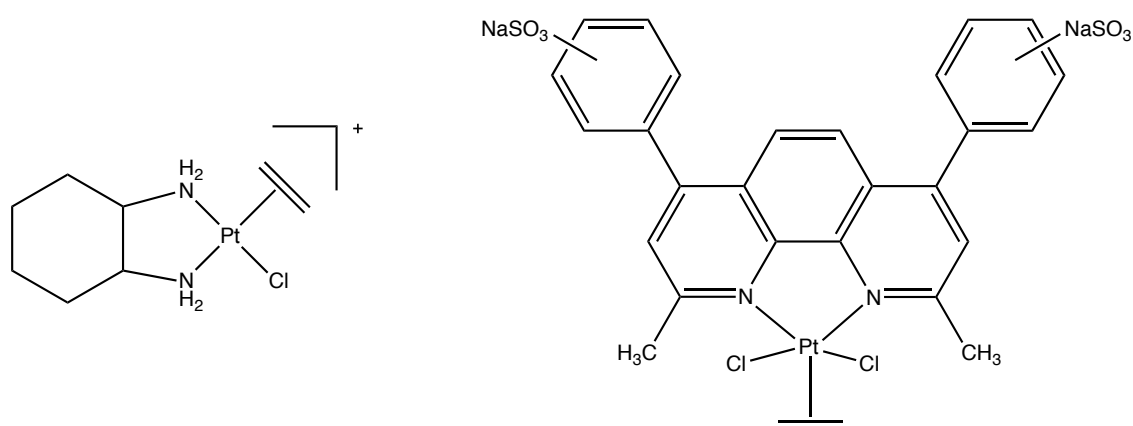


Abb. 1.6 Platin-Olefin-Komplexe mit antiproliferativen Eigenschaften, links ein Oxaliplatin-Analogon; rechts ein pentakoordinierter Platin-Olefin-Komplex

Neuere Forschungsschwerpunkte versuchen, Platin-Olefin-Komplexe mit antiproliferativen Wirkungen zu synthetisieren. Dabei wird das Zeise-Salz (Abb. 1.5 links) als Ausgangssubstanz für die Synthese von kationischen Komplexen verwendet. Zum einen wurde ein Oxaliplatin-Prodrug synthetisiert, das sehr gute wasserlösliche Eigenschaften besitzt und nach Verlust des Olefins zu identischen Hydrolyseprodukten wie im Falle des Oxaliplatins führt<sup>[40]</sup>.

Zum anderen wurde ein pentakoordinierter Platin-Olefin-Komplex hergestellt, der als Carrierliganden ein Phenanthrolinderivat besitzt (Abb. 1.6). Auch diese Verbindung ist als Prodrug anzusehen, die ihre antiproliferativen Effekte erst nach Abgabe des Olefins entfaltet<sup>[41]</sup>. Eine Antitumoraktivität des Zeise-Salzes allein ist bisher nicht bekannt.

## 1.5 Nichtsteroidale Antirheumatika – NSAR

Der Einsatz nichtsteroidaler Antirheumatika in der Medizin ist vor allem aus der Schmerzbehandlung bekannt. Salicylathaltige Pflanzenteile wurden schon im Altertum zur Behandlung von Entzündungen und Schmerzen verwendet. Die moderne Geschichte dieser Substanzklasse beginnt mit der synthetischen Herstellung der Salicylsäure 1859 durch Hermann Kolbe<sup>[42]</sup>. In den folgenden Jahren wurden weitere Stoffe mit analgetischen Effekten gefunden. Ergebnis ist eine sehr heterogene Stoffklasse, die sich wie folgt einteilen lässt.

Stoffklasse	COX-1 selektiv	unselektiv	COX-2 Präferenz	COX-2 selektiv
Salicylsäure-derivate		Salicylsäure		
	Acetylsalicylsäure (niedrig dosiert)	Acetylsalicylsäure (hoch dosiert)	APHS	
Arylessig- und propionsäuren		Indometacin		
		Ibuprofen		
		Diclofenac		
		Naproxen		
Oxicame		Piroxicam	Meloxicam	
		Tenoxicam		
Anthranilsäure-derivate		Mefenaminsäure		
		Flufenaminsäure		
Pyrazolderivate		Metamizol		
		Phenazon		
		Propyphenazon		
Anilinderivate		Paracetamol		
Carbocyclen und Heterocyclen mit vicinaler Aryl-Substitution				Celecoxib
				Rofecoxib

Tabelle 1.3 Einteilung der NSAR in Stoffklassen mit ihren jeweiligen pharmakologischen Targets<sup>[43]</sup>

Die NSAR vermitteln ihre pharmakologischen Effekte durch die Hemmung der Cyclooxygenase. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine katalysiert. Diese sind als Schmerz- und Entzündungsmediatoren bekannt. Die Erkenntnis, dass die Hemmung der COX-1 stark verknüpft ist mit den gastrointestinalen Nebenwirkungen führte zu der Modellvorstellung der „guten“ COX-1, verantwortlich für physiologische Vorgänge, und der „bösen“ COX-2, verantwortlich für pathophysiologische Prozesse. Die daraus resultierende Suche nach COX-2-Inhibitoren führte zu den Verbindungen Celecoxib, Rofecoxib und Valdecoxib. Die erhoffte Abwesenheit von Nebenwirkungen konnte damit allerdings nicht erreicht werden. Das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse während der Therapie führte zur baldigen Marktrücknahme von Rofe- und Valdecoxib.

### 1.5.1 NSAR in der Tumortherapie

Neuere Untersuchungen befassen sich mit dem Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von NSAR (unselektiv/selektiv) und der Prävention und Therapie von Krebserkrankungen<sup>[44]</sup>. Die Beobachtung, dass Langzeitnutzer von Acetylsalicylsäure (ASS) und anderen NSAR ein geringeres Risiko besitzen an einem Kolonkarzinom zu erkranken<sup>[45]</sup>, haben die Untersuchungen in den letzten Jahren deutlich forciert. Nicht nur das Risiko zu erkranken sondern auch die Mortalität kann bei diesem Tumor durch den Einsatz von NSAR um 50% reduziert werden<sup>[46]</sup>. Der genaue Mechanismus bei der Beeinflussung des Tumorgeschehens ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Die körpereigene Synthese von Prostaglandinen und die Kontrolle des Zellwachstums sind 2 Faktoren, die eng miteinander verbunden sind. Transformierte Zellen zeigen höhere Prostaglandinspiegel als unveränderte Zellen und durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren kann die Prostaglandinsynthese der Zelle gesteigert werden<sup>[44]</sup>. Eine zentrale Rolle in der Karzinogenese scheint dabei das PGE<sub>2</sub> einzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass es die Gentranskription stimuliert sowie Wachstum und Metastase von Tumoren fördert<sup>[44]</sup>. Damit einher geht die Beobachtung, dass in vielen Tumorzellen die Cyclooxygenase überexprimiert wird. Vor allem die COX-2 ist in vielen Fällen stark hochreguliert. Beim Kolonkarzinom kann dies in 85% der Fälle beobachtet werden. Mit der Überexpression der COX-2 konnte in den Tumorzellen eine erhöhte Invasion und Angiogenese sowie die Ausschaltung von Apoptosemechanismen beobachtet werden<sup>[47]</sup>. Ebenfalls bekannt ist die Hochregulation der Aromatase in Gegenwart von erhöhten PGE<sub>2</sub>-Spiegeln. So konnte eine synergistische Antitumorwirkung von Exemestam, einem Aromatasehemmer, in Kombination mit dem COX-2-selektiven Celecoxib an Ratten gezeigt werden.

### 1.5.2 NSAR-Metallkomplexe

Die Komplexierung von NSAR an Metalle kann zu einer neuen Gruppe von Multitargetwirkstoffen führen. Erste Verbindung im Arbeitskreis Gust war das Co-ASS (Abb.1.7).

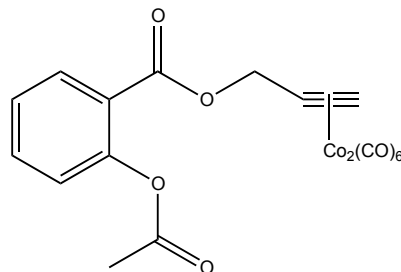


Abb. 1.7 Strukturformel des Co-ASS

Die neue Verbindung hat die Eigenschaften der Muttersubstanz Acetylsalicylsäure behalten und konnte durch die Komplexierung am Metall neue Eigenschaften dazugewinnen. Die Hemmung der COX konnte gegenüber der reinen Acetylsalicylsäure noch verstärkt werden. Neu sind zytotoxische Effekte, die an Brustkrebszelllinien ermittelt wurden. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in der erhöhten Caspase-3 Aktivität und damit gesteigerten Apoptose liegen. Darüber hinaus konnte an Zebrafischen gezeigt werden, dass nach Behandlung mit dem Co-ASS die Gefäßneubildung in den Fischen deutlich gestört war<sup>[48]</sup>. Wie schon beim Ferrocifen vorgestellt, kann auch hier ein dualer Mechanismus diskutiert werden (Kapitel 1.3). Die Komplexierung bereits etablierter Arzneistoffe an Metalle kann das Wirkspektrum deutlich erweitern und einzelne pharmakologische Effekte verstärken. Dieses Konzept soll in dieser Arbeit weiter verfolgt werden.

## 1.6 Zielstellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollen nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) an Zeise-Salze gekoppelt werden, mit dem Ziel Platinkomplexe zu erhalten, die eine Selektivität für die Isoformen der Cyclooxygenase (COX-1 oder COX-2) aufweisen. Dabei soll die Selektivität durch den Einsatz spezifisch wirkender NSAR erhalten werden. In Anlehnung an die schon bekannte Struktur des Co-ASS werden analoge Verbindungen mit Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac und Indometacin mit Platin als metallischem Zentrum synthetisiert, um COX-1-Präferenz zu erreichen. Durch Variation des organischen Liganden hin zu bekannten COX-2-Hemmern am Platin soll untersucht werden, ob auch die daraus resultierenden Zeise-analogen Komplexe die

gewünschte COX-2-Selektivität aufweisen können. Dazu wird der Einfluss auf die Enzymaktivität zum einen an den isolierten Isoenzymen COX-1 und COX-2 ermittelt, zum anderen in biologischen Untersuchungen der Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung in einem zellulären PGE<sub>2</sub>-Assay geprüft. Mit Hilfe von LC-MS soll geklärt werden, wie die NSAR-Zeise-Salze mit den Enzymen wechselwirken (Acetylierung von Ser 530 wie bei Acetylsalicylsäure oder Metallierung anderer essentieller Aminosäuren). Des Weiteren soll die Zytotoxizität der synthetisierten Platinkomplexe an unterschiedlichen humanen Krebszelllinien untersucht werden. Wie für viele Platinkomplexe beschrieben, wird die Zytotoxizität über die Bindung an die DNA als Hauptstruktur vermutet. Daher sollen auch in dieser Arbeit DNA-Bindungsstudien durchgeführt werden. Ebenfalls wichtig, um Informationen über die Reaktivität der Komplexe zu erhalten, sind Untersuchungen zur Proteinbindung, Zell- und Zellkernaufnahme sollen helfen, die erhaltenen Ergebnisse zu interpretieren.

## 2 Synthese

### 2.1 Übersicht der synthetisierten Verbindungen

Wie einleitend bereits erwähnt, sollen in dieser Arbeit bekannte Inhibitoren von sowohl COX-1 als auch COX-2 strukturell variiert werden. Durch Einführung einer olefinischen Seitenkette an COX-Inhibitoren wird anschließend die Komplexierung von Platin an die Doppelbindung ermöglicht. Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit synthetisierten Komplexe ist, das in Abb. 2.1 dargestellte Prop-ASS-Zeise. Die komplexierte Platinspezies  $\text{PtCl}_3$  ist in allen Verbindungen identisch. Variationen erfolgten ausschließlich an den Liganden. Dazu wurden zum einen monomere NSAR-Liganden synthetisiert, die eine olefinische Seitenkette mit Variation in der Kettenlänge aber jeweils endständiger Doppelbindung besitzen. Zum anderen wurden Liganden synthetisiert, die die Doppelbindung cis-ständig innerhalb der aliphatischen Seitenkette enthalten. In diesem Fall erfolgte die Verknüpfung beidseitig mit dem gleichen NSAR (NSAR-Homodimere).

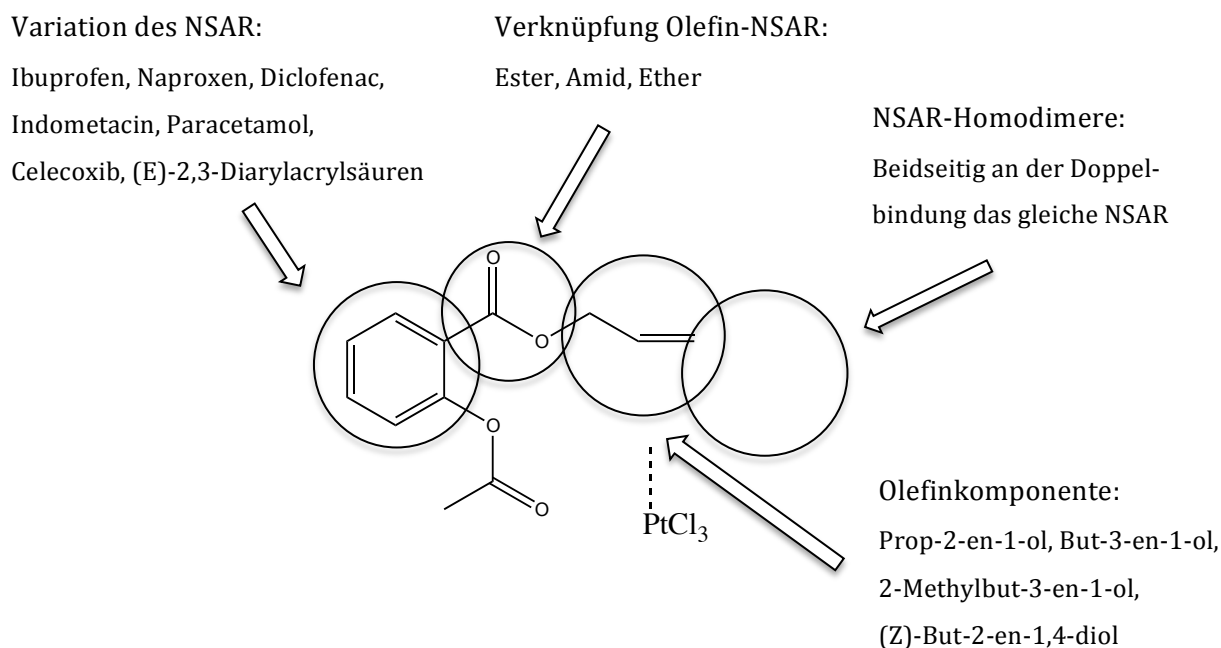
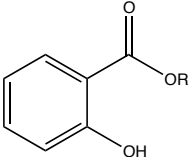
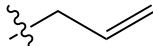
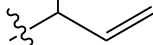
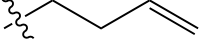
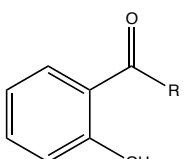
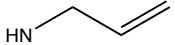
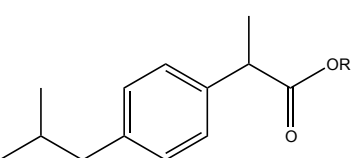
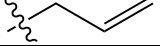
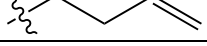
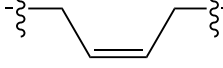
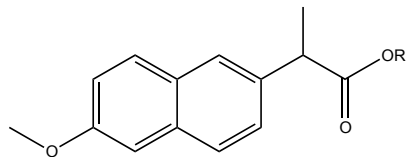
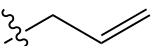
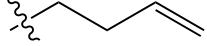
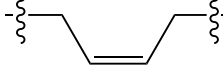


Abb. 2.1 Variationen der NSAR-Liganden ausgehend von Prop-ASS-Zeise

Eine genaue Übersicht der synthetisierten Verbindungen geben die Tabellen 2.1 und 2.2.

### 2.1.1 Platinkomplexe, deren Liganden eine unselektive COX-Hemmung aufweisen

Zunächst wurden nichtsteroidale Antirheumatika aus der Klasse der unselektiven NSAR an ihrer Carbonsäure mit den in Abb. 2.1 dargestellten Alkoholen (Olefinkomponente) verestert. Beim Paracetamol, welches keine Säurefunktion aufweist, erfolgte die Derivatisierung mit dem Alkohol durch Etherbildung. Ebenfalls wurde bei der Salicylsäure, neben der schon beschriebenen Veresterung, zusätzlich noch die Einführung der olefinischen Seitenkette über die Bildung eines Amids realisiert. Die anschließende Komplexierung des Platins zur gewünschten Endstruktur ist unter 2.3.3 beschrieben.

unselektive NSAR	Strukturformel	R	Kurzbezeichnung der Pt-Komplexe
Salicylsäure			Prop-Salicyl-Zeise
			isoBut-Salicyl-Zeise
			But-Salicyl-Zeise
			Prop-Salicylamid-Zeise
Ibuprofen			Prop-Ibu-Zeise
			But-Ibu-Zeise
			Di-Ibu-Zeise
Naproxen			Prop-Napro-Zeise
			But-Napro-Zeise
			Di-Napro-Zeise

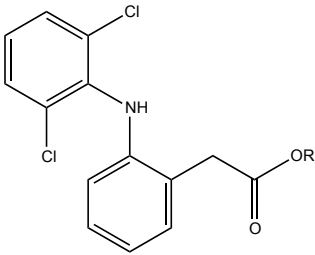
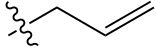
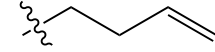
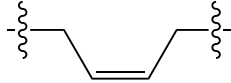
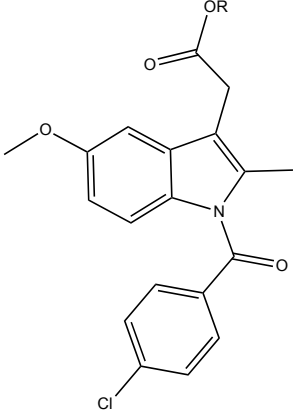
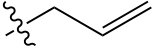
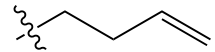
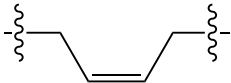
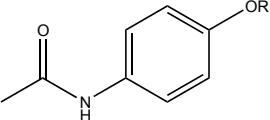
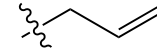
Diclofenac			Prop-Diclo-Zeise
			But-Diclo-Zeise
			Di-Diclo-Zeise
Indometacin			Prop-Indo-Zeise
			But-Indo-Zeise
			Di-Indo-Zeise
Paracetamol			Prop-Para-Zeise

Tabelle 2.1 Darstellung der synthetisierten Liganden ausgehend von unselektiven COX Inhibitoren



### 2.1.2 Platinkomplexe, deren Liganden COX-2-Selektivität bzw. -Präferenz aufweisen

Neben den unselektiven NSAR-Liganden sollen auch Liganden verwendet werden, die eine COX-2-Präferenz bzw. -Selektivität aufweisen. Dabei fiel die Wahl zum einen auf das Celecoxib, welches als bekannter COX-2 Hemmer auch als Arzneimittel erhältlich ist. Zum anderen wurden 2 Verbindungen nachgekocht, die durch die Arbeitsgruppe Knaus<sup>[49]</sup> als COX-2-Hemmer publiziert wurden. In analoger Weise zu den unselektiven NSAR sollten die Verbindungen mit 1-Butenol verestert werden. Dafür wurde die Methylgruppe des Celecoxib zur Säure aufoxidiert.

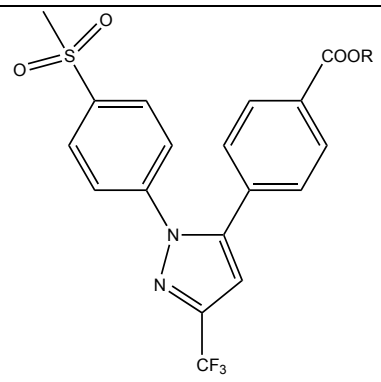
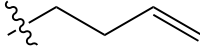
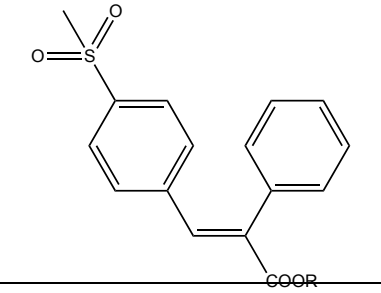
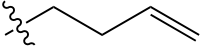
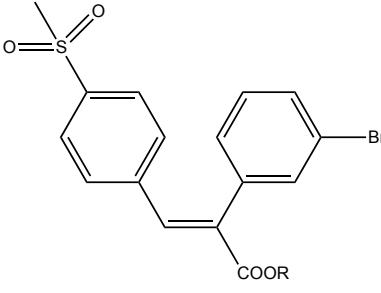
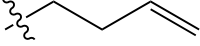
COX-2 Inhibitor	Strukturformel	R	Kurzbezeichnung der Pt-Komplexe
Celecoxib			But-Cele-Zeise
(E)-3-(4-Methansulfonylphenyl)-2-phenylacrylsäure (Phenacrylsäure)			But-Phenacryl-Zeise
(E)-2-(3-Bromophenyl)-3-(4-methansulfonylphenyl)acrylsäure (Br-Phenacrylsäure)			But-Br-Phenacryl-Zeise

Tabelle 2.2 Darstellung der synthetisierten Liganden ausgehend von COX-2 Inhibitoren

## 2.2 Synthesen der Liganden

### 2.2.1 Synthese des Paracetamolpropenylethers

Zunächst wird eine Natriumethanolatlösung hergestellt, in der das Paracetamol gelöst wird. Danach wird Allylbromid zugegeben. Um die Reaktivität zu steigern, erfolgt die Zugabe einer Spatelspitze Kaliumiodid. Der Ansatz wird 5h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird der Ethanol abdestilliert und der Destillationsrückstand in 5%ige NaOH gegossen. Das Produkt wird mit Ether ausgeschüttelt.

Bei der beschriebenen Reaktion handelt es sich um eine Williamson-Ethersynthese, die in diesem Fall wahrscheinlich nach dem  $S_N1$ -Mechanismus verläuft. Der 2-stufige Prozess beginnt mit der Deprotonierung des Paracetamols zum Phenolat durch die starke Base Ethanolat. Das entstandene Phenolat ist das Reagenz, welches nun nucleophil mit dem Halogenalken nach dem  $S_N1$ -Mechanismus reagieren kann. Dabei verlässt zunächst Bromid als Abgangsgruppe vom Allylbromid das Molekül und hinterlässt ein mesomeriestabilisiertes Carbeniumion am Allyl-C-Atom. Dieses kann nun durch das entstandene Phenolat nucleophil angegriffen werden.

### 2.2.2 Veresterung der sauren NSAR mit den entsprechenden Alkoholen

Das entsprechende NSAR, siehe Tab. 2.1, wurde in absolutem Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert. Dann erfolgte die Zugabe des Alkohols, wobei die Säure leicht überschüssig vorliegen sollte. Nach Zusatz einer katalytischen Menge 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und Zutropfen einer Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (DCC) in Dichlormethan wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstehende N,N-Dicyclohexylharnstoff (DCH), der als weißer Niederschlag auf dem Dichlormethan schwimmt, wird durch Abfiltrieren aus dem Ansatz entfernt. Dabei reagiert zunächst die Säure mit dem DCC. Es entsteht durch Wasserentzug ein Säureanhydrid und der in Dichlormethan unlösliche N,N-Dicyclohexylharnstoff. Das entstandene Säureanhydrid reagiert nun mit dem Katalysator 4-Dimethylaminopyridin zu einer N-Acylpyridiniumspezies, die leicht vom eingesetzten Alkohol nucleophil angegriffen werden kann. Gleichzeitig erfolgt dabei die Regeneration von Katalysator und Säure, die nun wieder für die Reaktion mit dem im Überschuss vorliegenden DCC zur Verfügung stehen<sup>[50]</sup> (Abb. 2.2). Vorteile dieser Methode liegen zum einen in den sehr schonenden Bedingungen, unter denen die Reaktion stattfinden kann, und zum anderen in den sehr guten Ausbeuten.

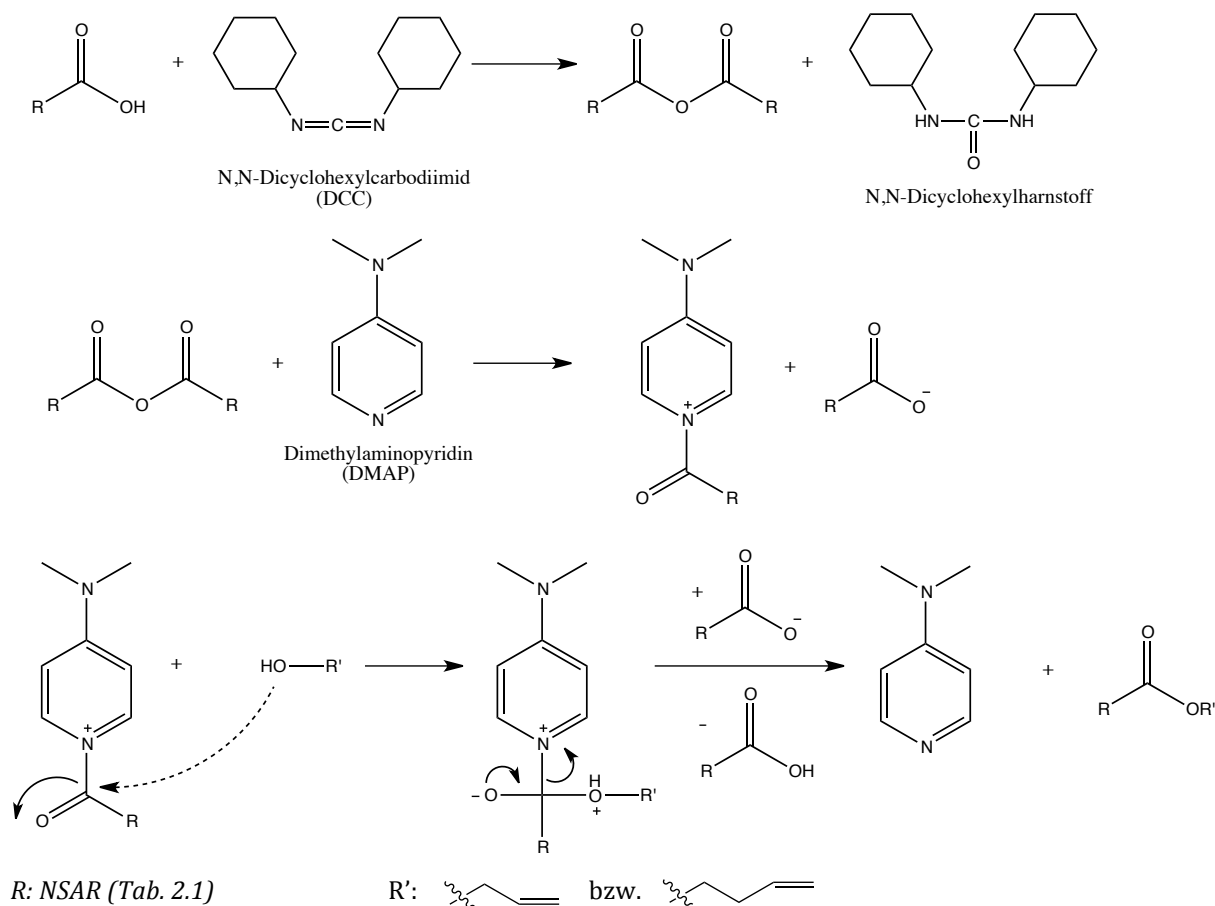


Abb. 2.2 Reaktionsschema für die Esterbildung mit DCC

### 2.2.3 Synthese des Allylsalicylsäureamids

Das Allylsalicylsäureamid wurde durch Reaktion von Salicylsäurechlorid und Allylamin erhalten. Dazu musste zunächst die Salicylsäure mit Hilfe von Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt werden. Auf Grund der hohen Reaktivität wurde auf eine Aufarbeitung verzichtet und die Verbindung sofort weiter umgesetzt. Dazu wird das Allylamin in abs. THF vorgelegt und das Säurechlorid langsam zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird dem Ansatz Triethylamin hinzugefügt, um die entstehende Salzsäure abzufangen. Das Triethylaminhydrochlorid ist in THF nicht löslich und fällt sofort als weißer Niederschlag aus. Nach 3h Rühren bei Raumtemperatur ist die Reaktion vollständig beendet. Anschließend wurde das Triethylaminhydrochlorid durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel abrotiert. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte das gewünschte Amid analysenrein erhalten werden.

## 2.2.4 Synthese der (E)-2,3-Diarylacrylsäuren

Die Synthese der (E)-Acrylsäuren ist von der Durchführung her eine sehr einfache Ein-Topf-Synthese, bei der alle Edukte in Acetanhydrid gelöst werden, Triethylamin hinzugegeben und das Ganze 16h gekocht wird. Nach Abkühlen wird der Ansatz mit Diethylether und Wasser versetzt und mit NaOH ausgeschüttelt. Die vereinigten Wasserphasen werden mit HCl angesäuert, wobei die gewünschte Acrylsäure ausfällt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung erhält man das gewünschte Produkt. Es handelt es sich dabei um die Perkin-Reaktion, bei der aromatische Aldehyde mit Säureanhydriden zur Reaktion gebracht und als Produkte  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäuren erhalten werden<sup>[51][52]</sup>.

Zunächst reagiert die eingesetzte Phenyllessigsäure mit Acetanhydrid zum gemischten Säureanhydrid. Dadurch verstärkt sich die CH-Acidität am benzylichen C-Atom, wodurch eine Deprotonierung an dieser Stelle leicht ermöglicht wird (Abb. 2.3.).

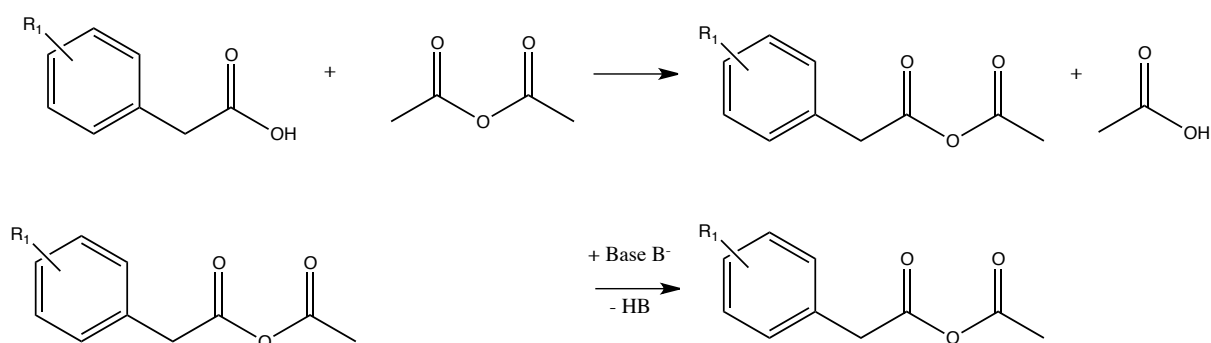


Abb. 2.3 erster Reaktionsschritt der Perkin-Reaktion: Synthese des gemischten Säureanhydrids.

Das so entstehende Carbanion kann nun nucleophil am Carbonyl-C-Atom des Benzaldehyds angreifen. Durch intramolekulare Wasserabspaltung entsteht ein Acrylsäureanhydrid, welches bei Zugabe von Wasser gespalten wird und das gewünschte Acrylsäurederivat frei gibt (Abb. 2.4). Neben der gewünschten E-Form kann auch die Z-Form entstehen. Die Aufreinigung erfolgt dann säulenchromatographisch.

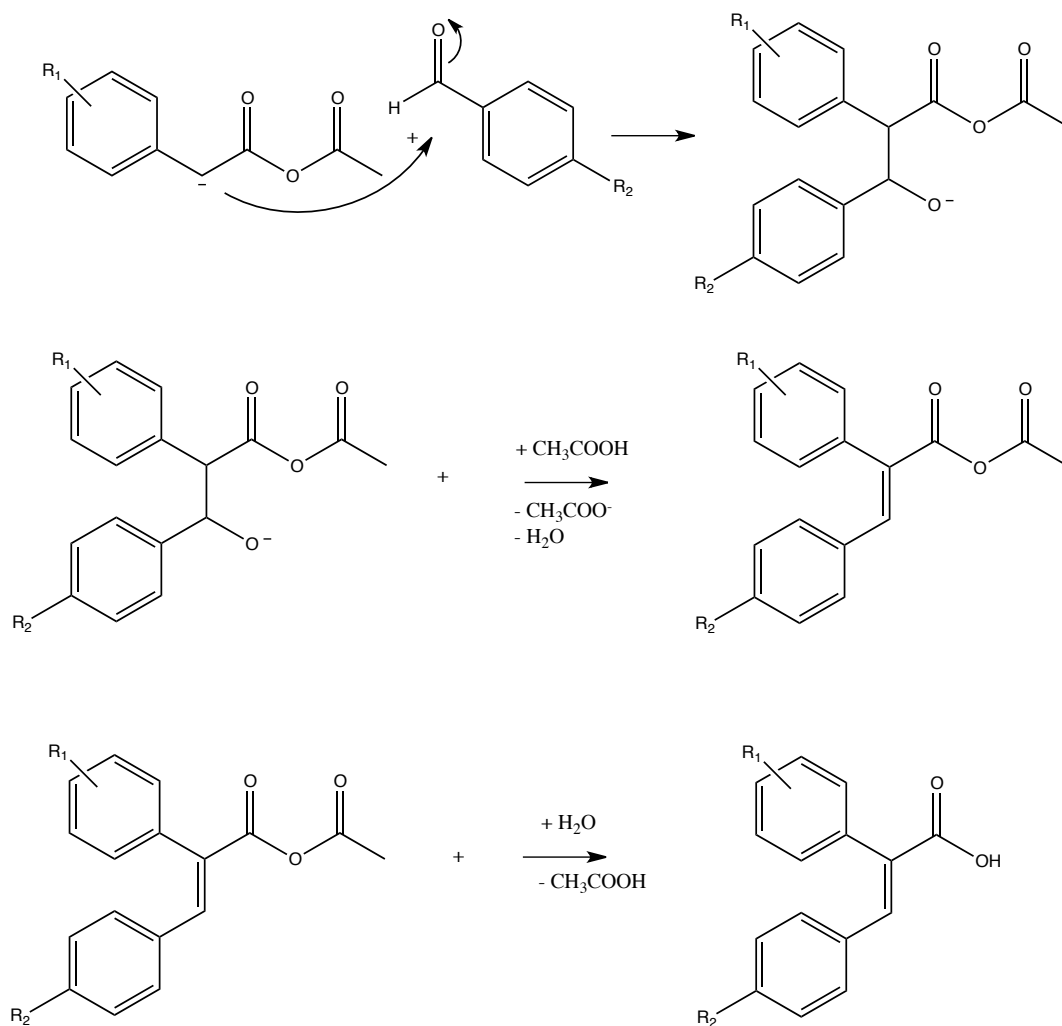


Abb. 2.4 zweiter Reaktionsschritt der Perkin-Reaktion: Synthese des Acrylsäurederivates

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(E)-3-(4-Methansulfonylphenyl)-2-phenylacrylsäure	-S(O) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H
(E)-2-(3-Bromophenyl)-3-(4-methan-sulfonylphenyl)acrylsäure	-S(O) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-Br

Um zu beweisen, dass nach Aufreinigung nur die gewünschte E-Form erhalten wurde, ist von der 3-(4-Methansulfonylphenyl)-2-phenylacrylsäure nach Veresterung mit 1-Butenol eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt worden. Wie Abb. 2.5 zeigt, handelt es sich dabei eindeutig um die E-Form.

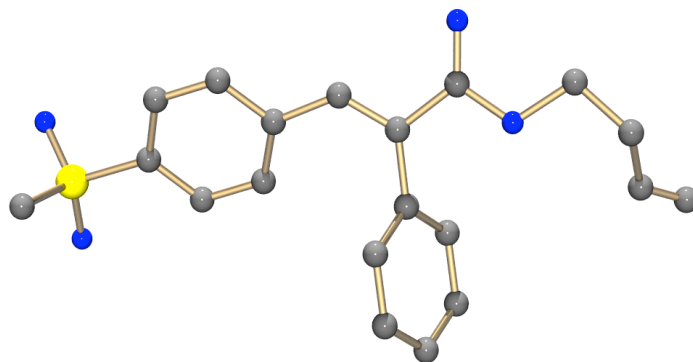


Abb. 2.5 Kristallstruktur von *(E)*-But-3-enyl 3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylat

Für die Strukturaufklärung von *(E)*-But-3-enyl-2-(3-bromophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat wurden NMR-spektroskopische Methoden genutzt. Zunächst war die Zuordnung der aromatischen Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum notwendig. Wie sich hier im Spektrum schon als Verunreinigung andeutet, findet in Lösung eine Konfigurationsänderung statt. Bei längeren Standzeiten und erneuter Aufnahme eines NMR-Spektrums liegt dann sowohl die *E*- als auch *Z*-Form vor.

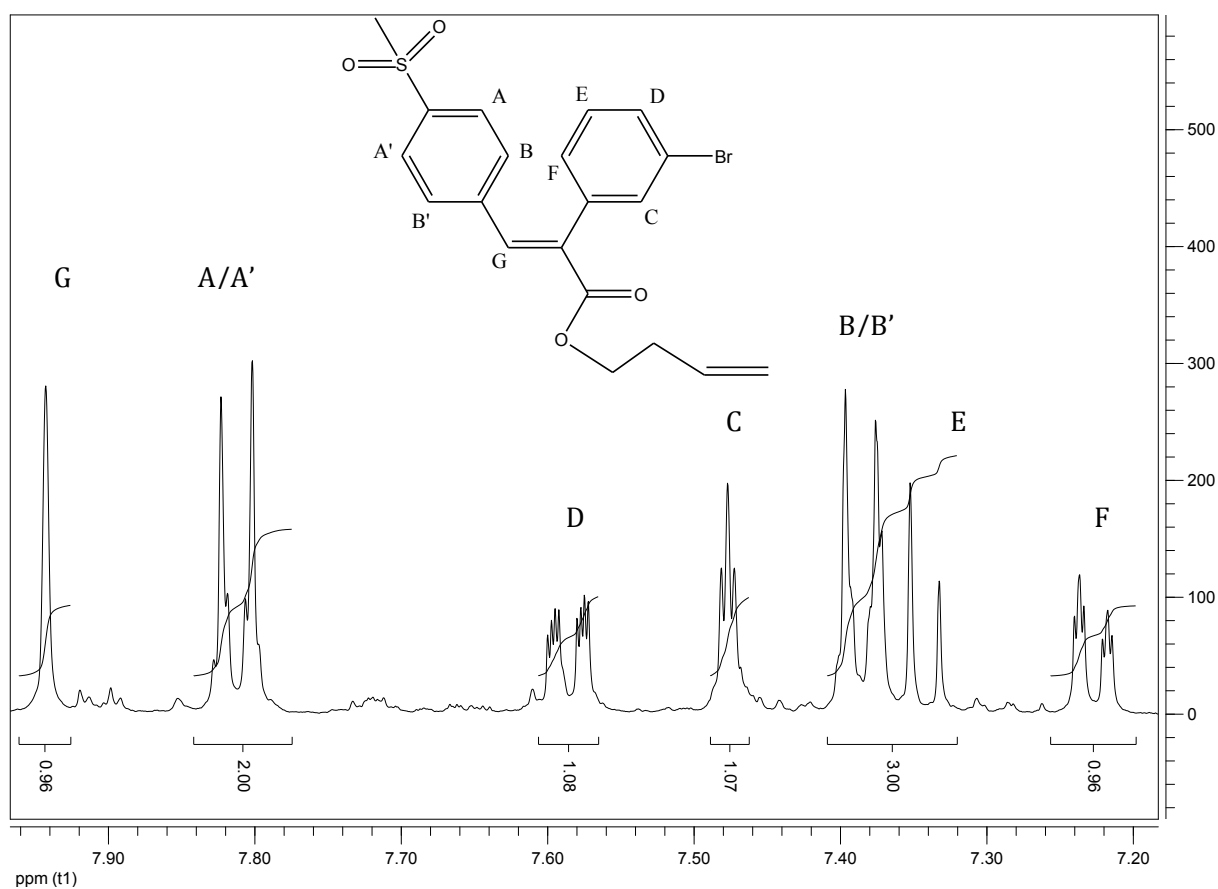


Abb. 2.6 aromatische Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von *(E)*-But-3-enyl-2-(3-bromophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat

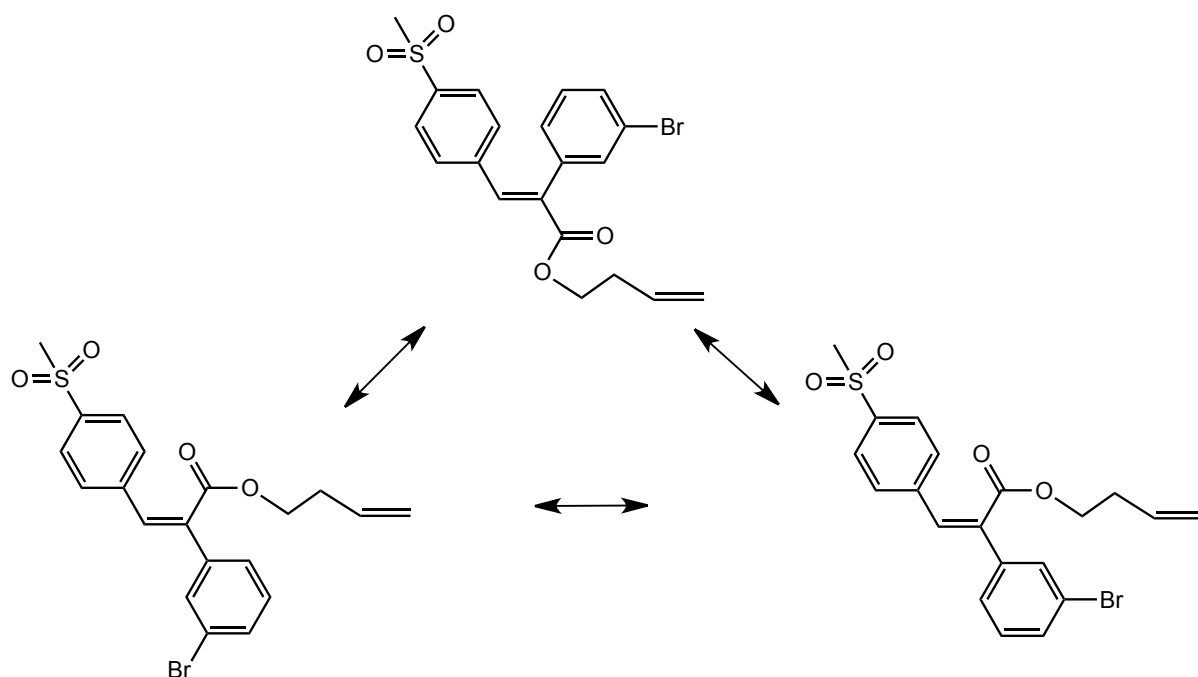


Abb. 2.7 mögliche E- bzw. Z-Konfigurationen von But-3-enyl-2-(3-bromophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat

Um die Konfiguration in Bezug auf die Doppelbindung zu klären, wurden NOE-Spektren aufgenommen. Durch den Kern-Overhauser-Effekt erfolgt dabei ein Sättigungstransfer auf der Frequenz des eingestrahlten Protons und führt zur Signalverstärkung im Abstand von 3 Å bei Protonen die einer Wechselwirkung unterliegen. Durch Abziehen des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums vom NOE-Spektrum ergibt sich das NOE-Differenzspektrum, welches nur noch die Signalverstärkungen enthält.

Zur Klärung der Struktur wurden mehrere NOE-Differenzspektren genutzt. Als Erstes wurde auf die Frequenz des Protons G (siehe Abb. 2.6) bei 7,93ppm eingestrahlt. Zu sehen ist dabei eine eindeutige Wechselwirkung mit den Protonen B und B' und keine Interaktion mit Protonen des bromierten Benzenrings. Um sicher zu gehen, dass die nicht zu sehende Interaktion aus einem zu großem Abstand der Protonen resultiert, wurde dieser berechnet. Abb. 2.9 zeigt dafür Strukturen im Energieminimum mit den berechneten Å-Abständen der grün markierten Protonen. Die Berechnungen zeigen, dass bei der gewünschten E-Stellung der Abstand der Protonen zu groß wäre, um sie mittels NOE-Differenzspektrometrie nachzuweisen. Würde allerdings die unerwünschte Z-Konformation vorliegen, wären Signale durch den Kern-Overhauser-Effekt möglich. So deuten in diesem Fall die fehlenden Signale auf die E-Konformation hin.

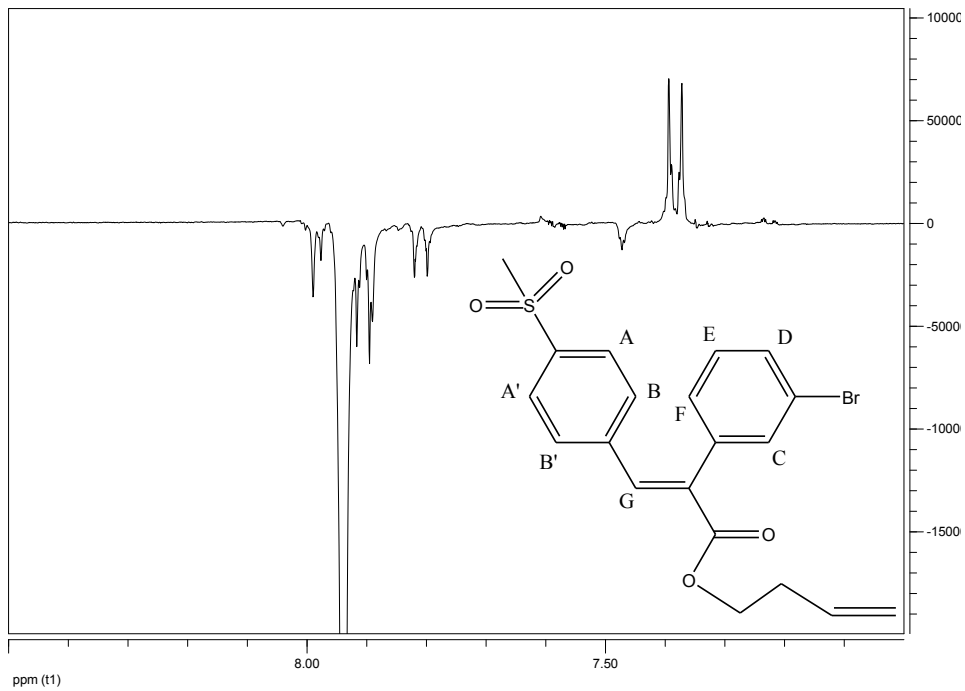


Abb. 2.8 NOE-Differenzspektrum von *(E)*-But-3-enyl-2-(3-bromophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat; Einstrahlung bei 7,93ppm

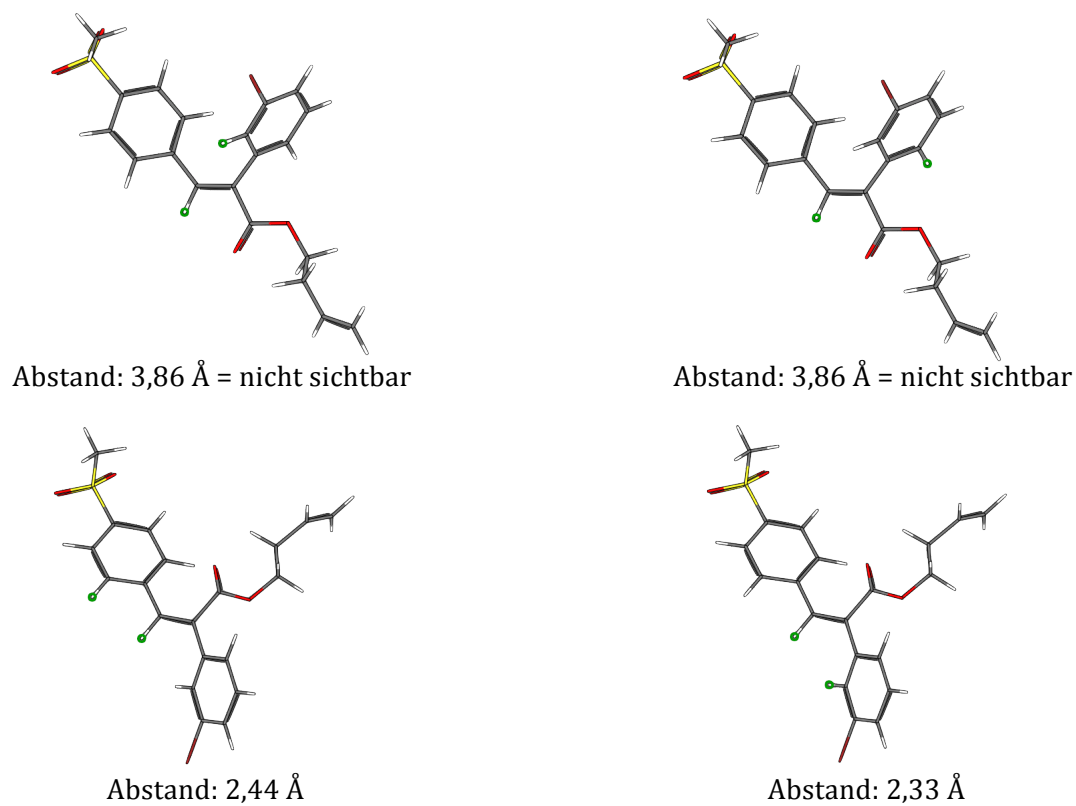


Abb. 2.9 gemodelte Strukturen von *(E)*-But-3-enyl-2-(3-bromophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat mit den berechneten Å-Abständen in Bezug auf die jeweils grün markierten Protonen



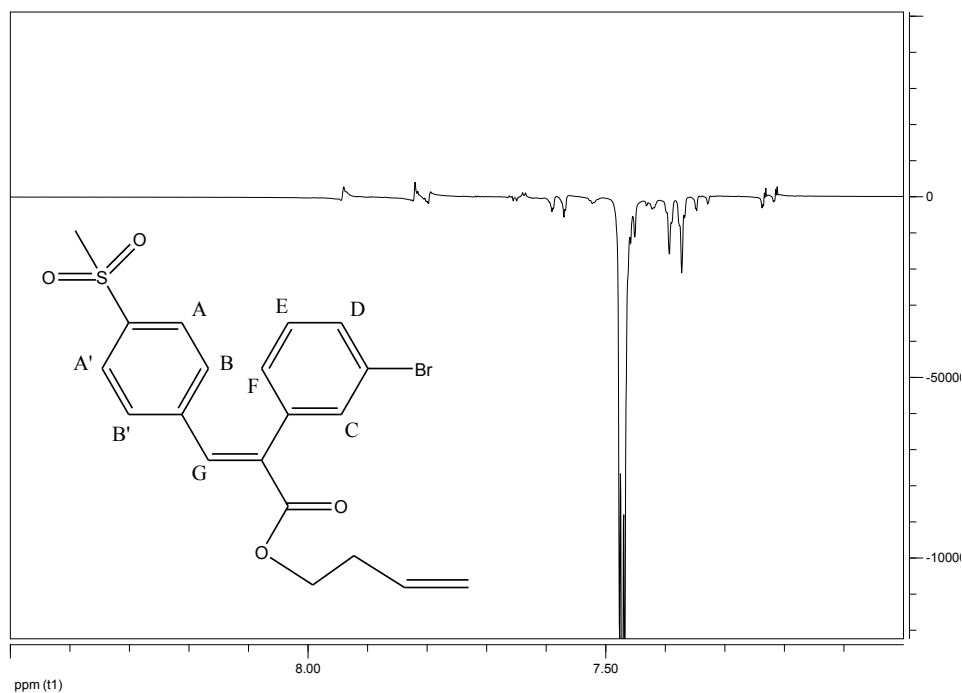


Abb. 2.10 NOE-Differenzspektrum von *(E)*-But-3-enyl-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylat; Einstrahlung bei 7,48ppm

Im Umkehrschluss erfolgte nun die Einstrahlung auf Proton C. Die Auswertung der Spektren deutet auch hier auf eine fehlende Interaktion zu Proton G. Dennoch können die NOE-Differenzspektren an dieser Stelle nur Hinweise auf die gewünschte *E*-Konfiguration geben, aber nicht den abschließenden Beweis erbringen.

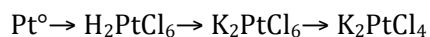
### 2.2.5 Derivatisierung von Celecoxib

Das Celecoxib wurde aus käuflich erworbenen Celebrex-Kapseln extrahiert. Dazu wurden zunächst die Kapseln geöffnet und das Pulver gesammelt. Da Celecoxib sehr gut in Aceton löslich ist, wurde das Pulver mit dem Lösungsmittel übergossen und ca. 5min gerührt. Danach ist durch Filtration der unlösliche Rückstand abgetrennt und durch Entfernen des Lösungsmittels das Celecoxib NMR-rein erhalten worden.

Um das Celecoxib in einen Ester umzuwandeln, wurde zuerst die Methylgruppe am Benzenring mit Kaliumpermanganat zur Carboxylgruppe oxidiert. Die anschließende Veresterung der entstandenen Säuregruppe mit dem entsprechenden Alkohol (Tab. 2.2) wurde wie unter 2.2.1. beschrieben durchgeführt werden.

## 2.3 Vom Metall zu Zeise-analogen Platinkomplexen

### 2.3.1 Synthese von Tetrachloroplatinat



Für die Herstellung von Tetrachloroplatinat wurde eine Platinmünze (99,99% Feinplatin) verwendet. Zunächst wird diese mit Aceton entfettet und anschließend in Königswasser bei 50-60°C aufgelöst. Der Lösungsvorgang dauert mehrere Tage. Dabei wird täglich 2x das Königswasser auf der Münze gewechselt. Das mit Platin gesättigte Königswasser wird in eine tarierte Kristallisierschale gegeben und dort bei 80-90°C abgedampft. Ist die Münze vollständig gelöst und das Königswasser verdampft, wird der Rückstand nochmals mit konz. HCl versetzt und diese erneut abgedampft. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis keine nitrosen Gase mehr entstehen. Nun wird der trockene Rückstand in Aqua bidest. aufgenommen, wodurch sich die Hexachloroplatinsäure bildet. Durch Zugabe von Kaliumchlorid erfolgt die Überführung in das Salz Kaliumhexachloroplatinat<sup>[53]</sup>. Durch Zugabe von Ethanol wurde Kaliumhexachloroplatinat als gelber Feststoff isoliert. Nach Absaugen des Niederschlages und anschließendem Waschen mit Ethanol und Ether kann nun die Reduktion des Kaliumhexachloroplatinats zum Kaliumtetrachloroplatinat erfolgen. Dafür wird Hydrazin als Reduktionsmittel verwendet. Das Hexachloroplatinat wird zunächst in H<sub>2</sub>O suspendiert und Hydrazin dazugegeben. Der ganze Ansatz wird unter Rühren bei 65°C über mehrere Stunden erhitzt. Wenn keine Stickstoffentwicklung mehr zu sehen ist und der Ansatz sich rot gefärbt hat, wird über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Ist am nächsten Morgen ein gelber Niederschlag erkennbar, war die Umsetzung mit Hydrazin nicht vollständig. Dann muss der Ansatz erneut erwärmt und Hydrazin langsam in kleinen Portionen zugegeben werden, bis auf der Oberfläche der Lösung elementares Platin entsteht. Es wird kurz auf 90°C erhitzt, um überschüssiges Hydrazin zu entfernen. Anschließend wird die abgekühlte Lösung in eine tarierte Kristallisierschale filtriert. Nun wird mehrere Tage gewartet bis das Wasser abgedampft ist. Als Resultat erhält man rote lange Nadeln, deren Identität und Reinheit über Raman-Spektroskopie geklärt werden können (Abb 2.11).

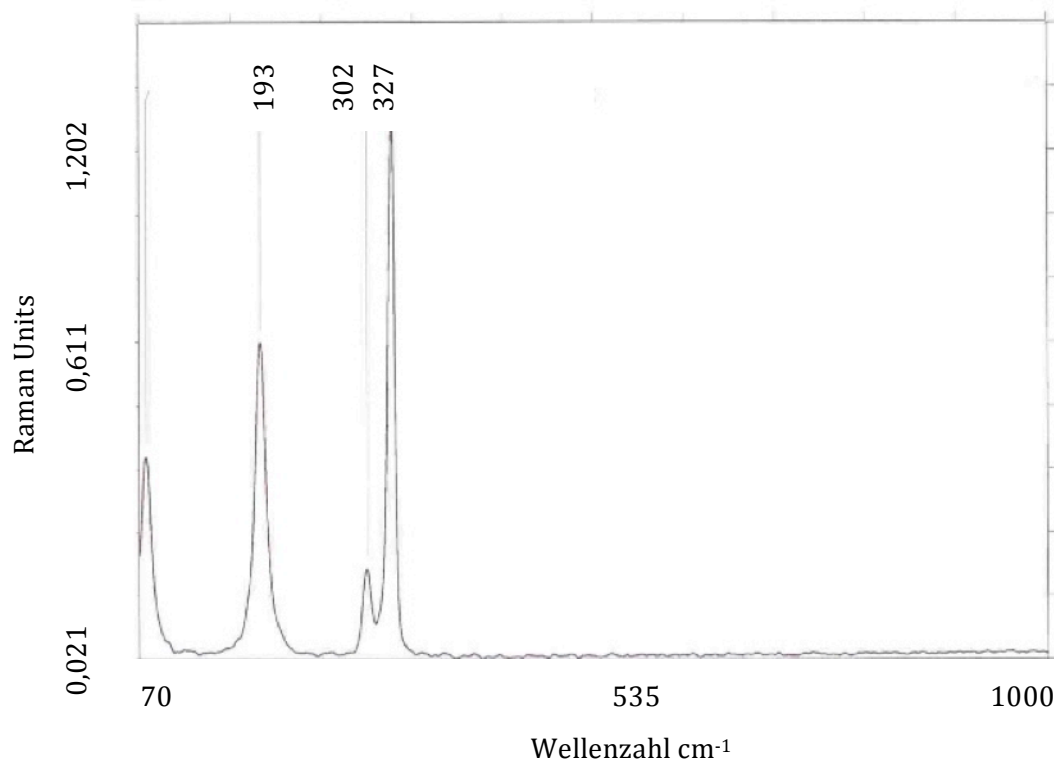


Abb. 2.11 Raman-Spektrum von Kaliumtetrachloroplatinat(II)

Dabei bestimmt die Anzahl der Atome die Schwingungsmöglichkeiten eines Moleküls. Geht man hier von dem Anion  $\text{PtCl}_4^{2-}$  aus, so ergeben sich, unter Berücksichtigung der 3 Freiheitsgrade eines jeden Atoms und den Bewegungen, die zur Rotation oder Bewegung durch den Raum führen, 9 Schwingungsmöglichkeiten. Diese kann man unterteilen in 5 Normalschwingungen und 4 entartete Schwingungen.

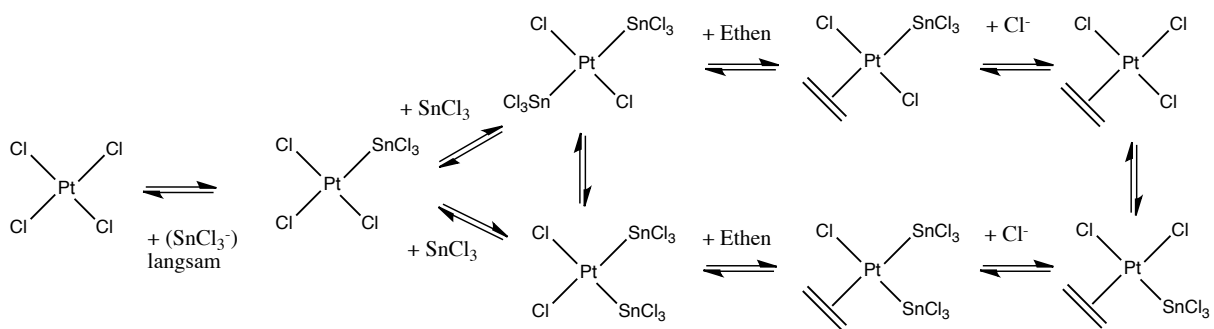
Bei den Raman-aktiven Schwingungen handelt es sich um eine symmetrische und eine unsymmetrische Valenzschwingung, die bei  $302\text{cm}^{-1}$  und  $327\text{cm}^{-1}$  zu sehen sind. Das Signal bei  $193\text{cm}^{-1}$  lässt sich einer Deformationsschwingung in der Ebene zuordnen <sup>[54][55]</sup>.

### 2.3.2 Synthese des Zeise-Salzes

In einer durch ein-stündiges Durchleiten von Argon hergestellten sauerstofffreien Salzsäure wird Kaliumtetrachloroplatinat gelöst. Sollten gelbe Kristalle von Hexachloroplatinat oder elementares Platin ausfallen, muss die Lösung noch einmal filtriert werden. Als Katalysator dient Zinn(II)chlorid<sup>[56]</sup>. Nun wird für 2-3h Ethen durch die Lösung geleitet. Für die Gaseinleitung wird ein poröser Glassintereinsatz verwendet, um eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Gas und Lösung zu gewährleisten. Das Zinn(II)chlorid reagiert in HCl-

saurer Lösung zunächst zum  $\text{SnCl}_3^-$ -Ion, welches als Ligand am Platin gegen Austausch eines Chloroliganden koordiniert. Während der Reaktion kann eine langsame Farbänderung von rot nach zitronengelb beobachtet werden. Dabei erfolgt der Austausch eines Chlorliganden gegen Ethen. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit einem Kristall Zeise-Salz angeimpft und für 45min ins Tiefkühlfach gestellt. Die Nadeln werden abgesaugt und über Kaliumhydroxid im Exsikkator getrocknet. Durch weiteres Einengen der Mutterlauge kann die Ausbeute deutlich erhöht werden<sup>[57]</sup>.

Das Zeise-Salz dient als Ausgangsverbindung aller in dieser Arbeit synthetisierten Platinkomplexe.



2.12 Reaktionsschema für die Reaktion von Ethen mit Kaliumtetrachloroplatinat in Anwesenheit von Zinn(II)chlorid in HCl-saurer wässriger Lösung

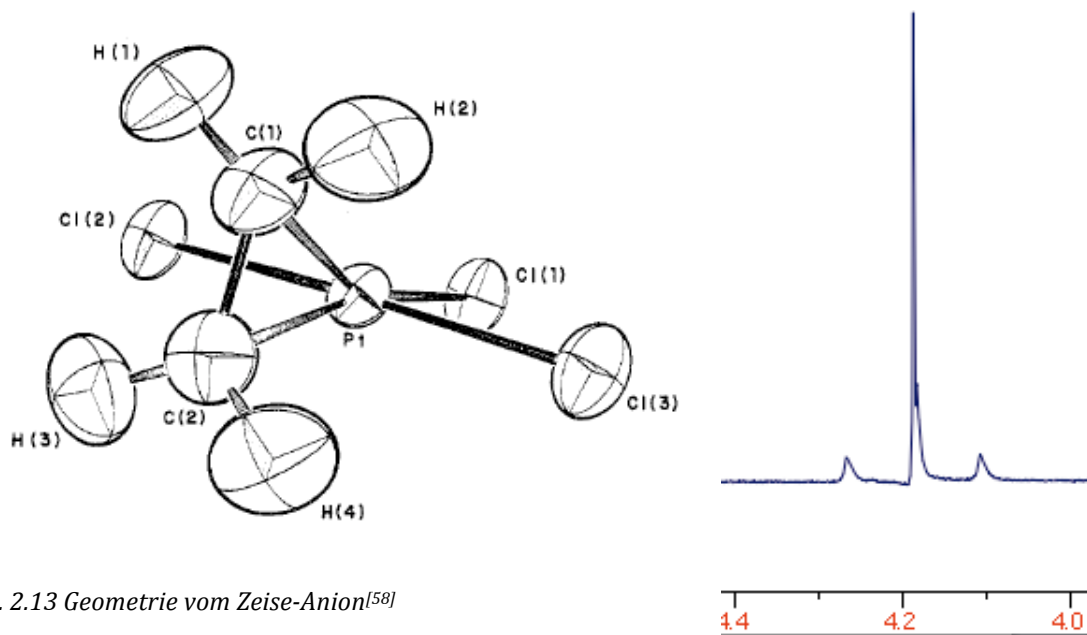


Abb. 2.13 Geometrie vom Zeise-Anion<sup>[58]</sup>

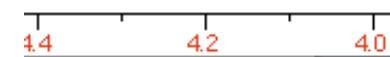


Abb. 2.14  $^1\text{H-NMR}$  vom Zeise-Salz

Die Bindung des Ethenliganden am Platin besteht aus 2 verschiedenen Teilen. Zum einen überlappt ein besetztes  $\pi$ -Orbital des Ethens mit einem unbesetzten Orbital des Platins. Dieser Teil wird als  $\sigma$ -Donatorbindung bezeichnet und ist allein nicht ausreichend um das Ethen dauerhaft binden zu können. Daher gibt es als zweiten Teil, die  $\pi$ -Akzeptorbindung, bei der ein besetztes d-Orbitals vom Platin mit einem unbesetztem  $\pi^*$ -Orbital vom Ethen überlappt. Um die so beschriebenen Bindungsverhältnisse zugewährleisten, muss das Ethen vertikal zum Platin angeordnet sein. Der C=C Bindungsabstand vergrößert sich nach Komplexierung am Platin von 130-135ppm auf 140-147ppm.<sup>[59]</sup>

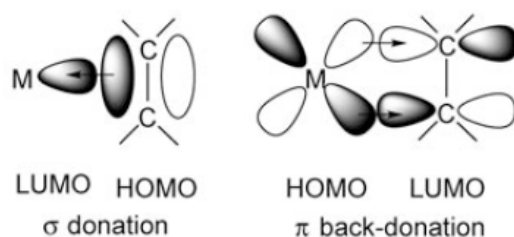


Abb. 2.15 Bindung von Alkenen an Metallen nach dem Dewar-Chatt-Duncanson-Modell<sup>[60]</sup>

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Zeise-Salzes (Abb. 2.14) wird charakterisiert durch ein Singulett bei 4,187ppm. Es resultiert aus dem Ethenliganden, welcher um die Platinbindungsachse rotiert. Die für die Rotation benötigte Energie wird aus der Auflösung der  $\pi$ -Rückbindung gewonnen, so dass die Rotation um die noch bestehende  $\sigma$ -Bindung erfolgt<sup>[61]</sup>. Die Kopplungskonstante  $J_{\text{Pt-H}}$  beträgt im oben abgebildeten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum 64 Hz (Abb. 2.14).

### 2.3.3 Ligandenaustausch an der Olefinkomponente

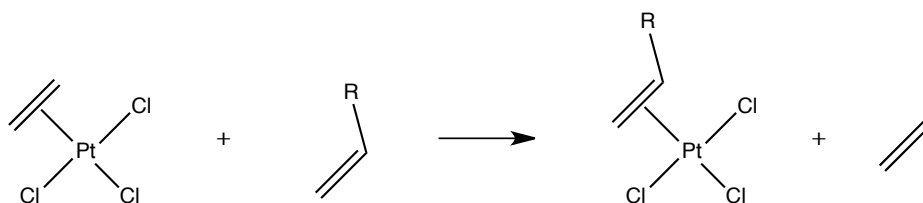


Abb. 2.16 Komplexierung des Platins an die in Tab. 1.1 und 1.2 synthetisierten Olefine ausgehend vom Zeise-Salz

Bei dem Zeise-Salz handelt es sich um einen quadratisch planaren Platinkomplex, der 3 Chloroliganden und einen Ethenliganden besitzt. Wenn man dem Platin nun eine andere Olefinkomponente anbietet, so ist das Platin in der Lage den Ethenliganden unter Beibehaltung seiner Bindungsverhältnisse auszutauschen. Die für den Austausch verwendeten Olefinkomponenten sind in Tab. 2.1 bzw. 2.2 dargestellt. Der Vorteil des Ethens bei dem Ligandenaustausch liegt in seinem gasförmigen Aggregatzustand, so dass unmittelbar nach Ligandenaustausch das Ethen der Reaktion entzogen und die Rückreaktion damit vollständig unterbunden wird. Durch Erhöhung der Temperatur auf 50°C wird sowohl der Ligandenaustausch als auch das Entweichen des Ethens aus dem Reaktionsansatz noch beschleunigt. Die Reaktion wird in absolutem Ethanol unter O<sub>2</sub>-freien Bedingungen durchgeführt. Der Ansatz muss mindestens 3h bei 50°C rühren. Danach kann durch Einengen des Volumens auf ca. 3ml und anschließender Zugabe von Diethylether das gewünschte Produkt isoliert werden.

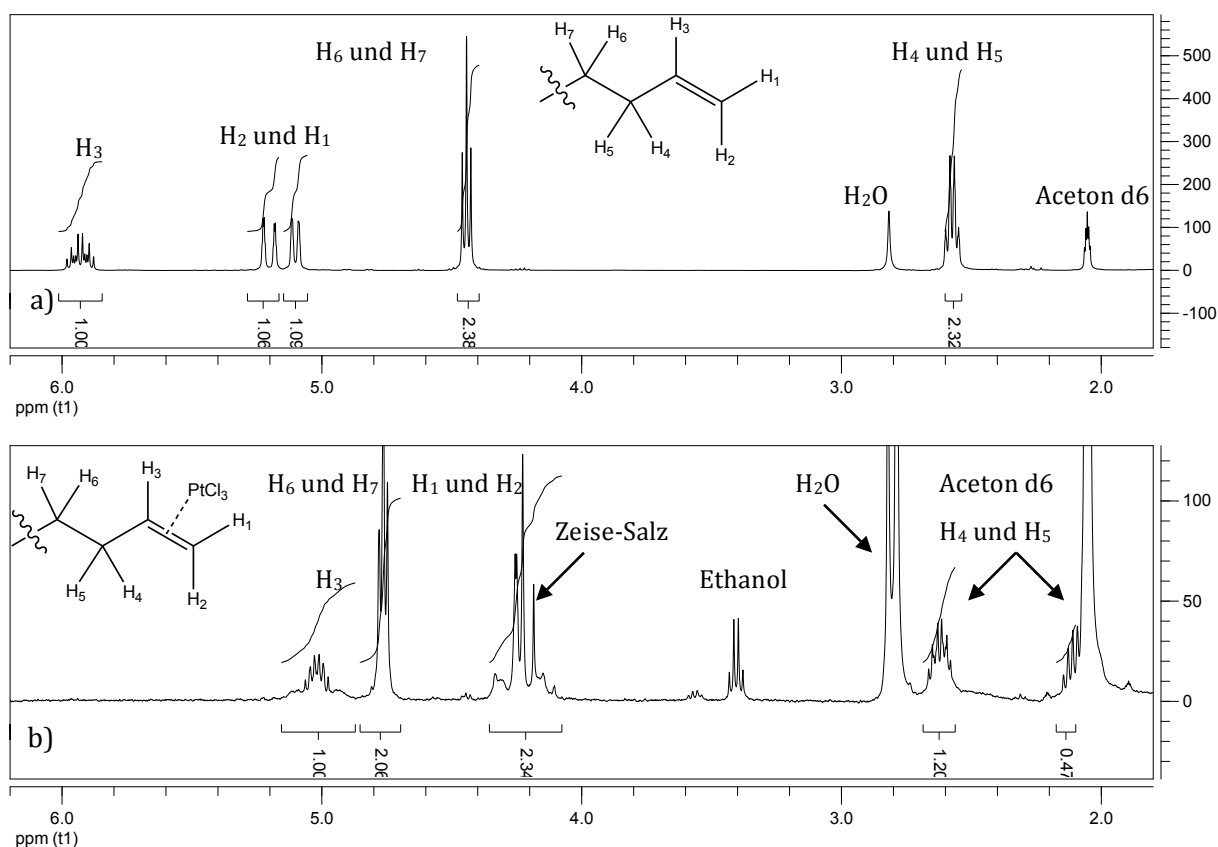


Abb. 2.17 a) Protonen der aliphatischen Seitenkette am Beispiel von But-Salicyl-Zeise vor Komplexierung an Platin  
 b) Protonen der aliphatischen Seitenkette am Beispiel von But-Salicyl-Zeise nach Komplexierung an Platin

Ob der Ligandenaustausch erfolgreich war, wird durch NMR-Spektroskopie überprüft. Abb. 2.17a zeigt die Protonen der aliphatischen Seitenkette des Liganden But-Salicyl, während Abb. 2.17b die Protonen der aliphatischen Seitenkette nach Komplexierung am Platin darstellt (siehe

Tab 2.1). Vor der Komplexierung zeigt H<sub>3</sub> ein Multipllett bei 5,93ppm. H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub> zeigen bei 5,08-5,23ppm ihre Signale. Dabei kann für H<sub>1</sub> eine Kopplungskonstante von 10Hz gemessen und folglich der cis-Kopplung mit H<sub>3</sub> zugeordnet werden. Die Kopplungskonstante des Signals von H<sub>2</sub> beträgt 17Hz und bestätigt damit die Literaturwerte der <sup>3</sup>J-trans-Kopplung<sup>[62]</sup>. Die geminale Kopplung ist so klein, dass eine weitere Aufspaltung der Signale nicht sichtbar ist. Bei H<sub>4</sub>-H<sub>7</sub> (H<sub>4</sub> und H<sub>5</sub> Multipllett bei 2,57ppm; H<sub>6</sub> und H<sub>7</sub> Tripllett 4,44ppm) handelt es sich um enantiotopie Protonen, die in der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie nicht unterschieden werden können und daher nur mit den benachbarten Protonen Kopplungen zeigen. Durch die Komplexierung mit Platin wird H<sub>3</sub> zu 5,03ppm ins Hochfeld verschoben. Grund dafür ist die Schwächung des Doppelbindungscharakters und die Neuorientierung des Protons außerhalb des Anisotropie-Kegels. Nach Komplexierung des Platins verändert sich die Stellung des Protons und gelangt dabei in den Bereich höherer Abschirmung. Resultat ist ein ins Hochfeld verschobenes Signal bei 5,03ppm. Daraus ergibt sich ebenfalls die Hochfeldverschiebung von H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub> zu 4,26ppm. Eine leichte Tieffeldverschiebung zu 4,76ppm ist bei H<sub>6</sub> und H<sub>7</sub> zu beobachten, die durch die Komplexierung am Platin mehr entschirmt werden. Überraschenderweise zeigen H<sub>4</sub> und H<sub>5</sub> nach Komplexierung eine Aufspaltung in 2 Signale, wobei eines der Signale vom Lösungsmittel leicht überdeckt wird. Gut zu sehen ist in Abb. 2.17b auch noch vorhandenes Zeise-Salz bei 4,19ppm, welches als Edukt eingesetzt wurde. Durch erneutes Umsetzen mit dem Liganden wurde auch das restliche Zeise-Salz zur gewünschten Zielverbindung umgesetzt.

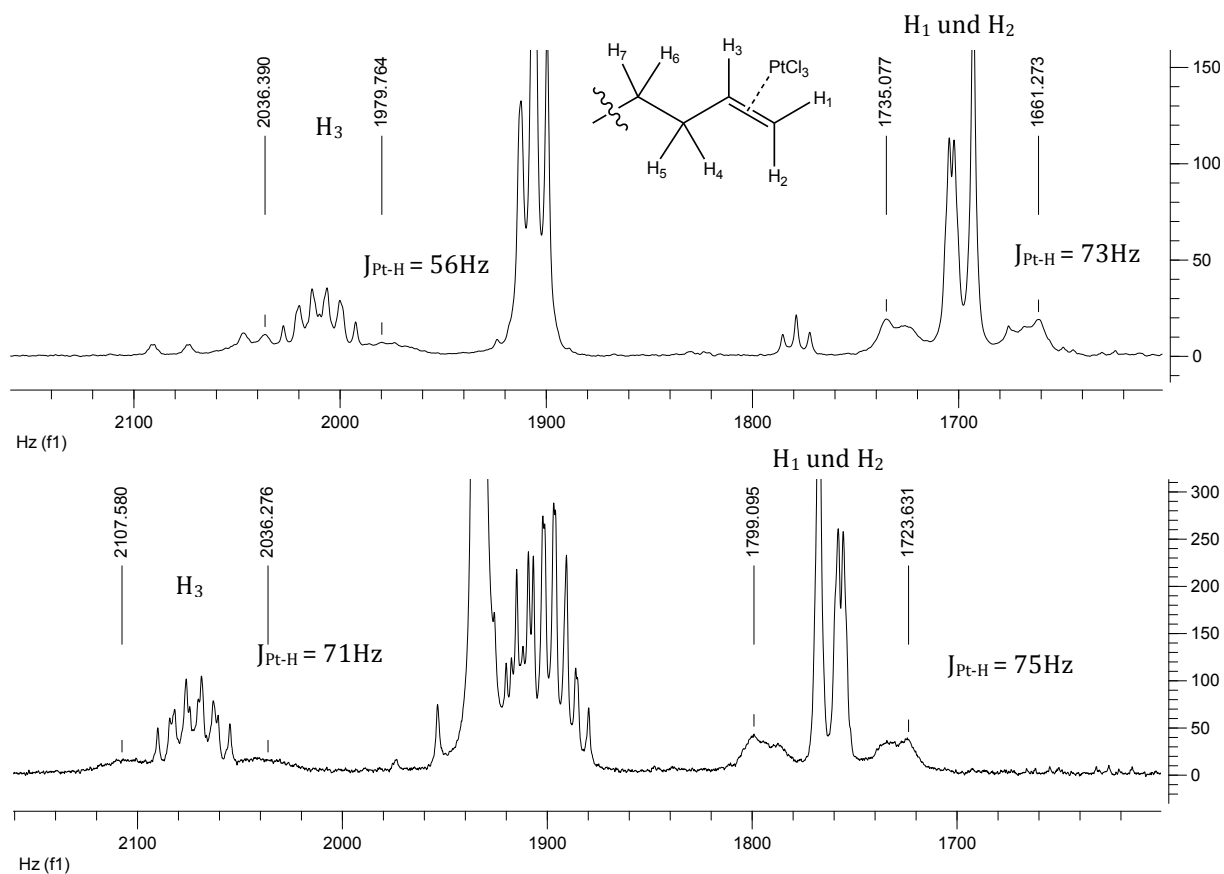


Abb. 2.18 Kopplungskonstanten der Platinsatelliten; oben in Aceton und unten in MeOD aufgenommen

Beim Zeise-Salz ist bekannt, dass das Platin von beiden C-Atomen des Ethens äquidistant entfernt sitzt. Die ermittelte Kopplungskonstante  $J_{\text{Pt-H}}$  beträgt 64Hz, gemessen aus dem NMR-Spektrum aus Abb. 2.14. Das obere NMR-Spektrum in Abb. 2.18 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von  $H_1$ - $H_3$  aufgenommen in Aceton  $d_6$  vom But-Salicyl-Zeise-Komplex. Dabei deuten sich bei  $H_3$  Platinsatelliten an, die eine genaue Messung allerdings schwierig gestalten. Ebenso uneindeutig ist die Interpretation des Signals von  $H_1$  und  $H_2$ . Die symmetrische Verteilung der breiten Signale neben  $H_1$  und  $H_2$  könnten auf eine Kopplung zwischen Platin und Protonen hindeuten, genauso gut kann aber auch eine Verunreinigung des Komplexes die Ursache der Signale sein. Dazu wurde erneut ein NMR-Spektrum aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde MeOD verwendet um dadurch Signalverschiebungen zu erhalten, die die vorhandenen Platinsatelliten besser darstellen. Das Ergebnis ist in Abb. 2.18 unten dargestellt. Hier sind die Platinsatelliten an allen beteiligten Protonen gut zu erkennen. Für  $H_1$  ergibt sich eine  $J_{\text{Pt-H}}$  von 71Hz und für  $H_2$  und  $H_3$  eine  $J_{\text{Pt-H}}$  von 75Hz. Da sowohl bei  $H_1$  als auch bei  $H_2$  und  $H_3$  die Kopplungskonstanten nahezu gleich ausfallen, könnte man schlussfolgern, dass das Platin noch immer mittig zwischen den olefinischen C=C-Atomen sitzt. Im Vergleich zum Zeise-Salz ( $J_{\text{Pt-H}}$  64Hz), liegen die Kopplungskonstanten beim But-Salicyl-Zeise-Komplex deutlich höher.



## 3 Physikalisch-chemische Untersuchungen

### 3.1 Reaktionen von und an Olefin-Platin-Komplexen

Das Zeise-Salz wurde von 1827 von William Christopher Zeise durch Refluxieren von Kaliumtetrachloroplatinat in Ethanol erhalten<sup>[63]</sup> und gilt als die erste metallorganische Verbindung. Ausgehend vom diesem Salz wurden weitere Platin-Olefin-Komplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht. Ein Patent von 1965 beschreibt die Herstellung von symmetrischen und unsymmetrischen Ethern, deren Ausgangsprodukte olefinische Alkohole sind. Durch Zusatz katalytischer Mengen Kaliumtetrachloroplatinat entsteht in situ ein Olefin-Platinkomplex, der bei höheren Temperaturen mit einem Alkohol zum Ether reagieren kann<sup>[64]</sup>. Untersuchungen am Butenylalkohol-Platinkomplex zeigen die Elimination der endständigen Alkoholgruppe nach vorausgegangener Protonierung. Resultat ist ein Butadien-Platin-Komplex<sup>[65]</sup>. Ebenfalls untersucht wurde die Oxidation von Olefinen zu Carbonylverbindungen unter Einfluß von Palladium und Platin. Die Reaktion verläuft dabei über die Entstehung von Olefin-Metallkomplexen<sup>[66]</sup>. Auch die Reaktivität vom Zeise-Salz gegenüber Nucleophilen wurde bereits eingehend untersucht. So kann das am Platin gebundene Ethen im stark basischen Milieu unter Verlust der Doppelbindung nucleophile Additionen eingehen<sup>[67]</sup>. Ebenfalls beschrieben sind nucleophile Angriffe an Zeise-Komplexen, die einen Allylester als Olefinkomponente besitzen<sup>[68]</sup>. Der nucleophile Angriff erfolgt am allylischen C-Atom. Es erfolgt die Substitution durch das Nucleophil und die Freisetzung der Säurekomponente des Esters.

### 3.2 Untersuchung der Stabilität von Zeise-analogen Platinkomplexen

Da zu den synthetisierten Verbindungen, insbesondere auch zur Leitstruktur des Prop-ASS-Zeise, keine ausreichende Datenlage zur Stabilität in wässrigen Medien existiert, wurden Untersuchungen dazu durchgeführt.

Eine wichtige Rolle spielt die Stabilität vor allem beim Zytotoxizitätstest zur zeit- und konzentrationsabhängigen Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes. Dort sind die Komplexe für 6 Tage dem Zellmedium ausgesetzt. Eine ausreichende Stabilität über diesen Zeitraum wäre daher wünschenswert.

Um die Stabilität in wässrigen Medien zu untersuchen, wurde überwiegend die HPLC genutzt und für weiterführende Untersuchungen mit anderen analytischen Methoden, wie zum Beispiel der hochauflösenden Masse, ergänzt. Die genauen Bedingungen sowie verwendeten Geräte sind im experimentellen Teil zu finden.

Als stationäre Phase diente eine RP-Phase mit C<sub>18</sub>-Säulenmaterial von der Firma Knauer.

Als Fließmittel wurde ein Acetonitril/0,1% TFA Gemisch verwendet, welches in seiner Zusammensetzung in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanz variierte.

Durch den Zusatz der Trifluoressigsäure liegt in der wässrigen Phase ein pH von 2 vor und soll eine nahezu vollständige Protonierung eventuell vorhandener freier Silanolgruppen an der stationären Phase bedingen, um kovalente Bindungen zwischen Platinkomplex und Säulenmaterial zu vermeiden. Da die Platinkomplexe teilweise eine recht hohe Lipophilie aufweisen (Kapitel 3.4, Tabelle 3.6), wurde als organischer Bestandteil der mobilen Phase das Acetonitril gewählt, welches eine hohe Elutionskraft an RP-18- Phasen aufweist.

Als erstes wurde die Leitstruktur Prop-ASS-Zeise untersucht. Diese wurde zunächst in Methanol gelöst und mit dem gleichen Volumenanteil H<sub>2</sub>O versetzt. Von Acetonitril als Lösungsmittel für den Analyten wurde abgesehen, um bei langen Standzeiten mögliche Reaktionen mit dem Platinkomplex zu vermeiden<sup>[69][70]</sup>. Alle 15min erfolgte die Injektion in die HPLC. Dabei ist die Probe über den gesamten Zeitraum bei 37°C aufbewahrt worden, um die Inkubation im Brutschrank beim Zytotoxizitätstest hinsichtlich der Temperaturbedingungen zu imitieren. Zu beobachten war dabei eine Flächenabnahme des Peaks vom Platinkomplex bei 3,56min und Entstehung bzw. Flächenzunahme eines neuen Peaks bei 6,45min, der als Acetylsalicylsäure identifiziert werden konnte (Abb. 3.2). Die Gesamtfläche aller Peaks blieb dabei über den beobachteten Zeitraum konstant. Formal scheint also eine Esterspaltung abzulaufen, die innerhalb kürzester Zeit zur vollständigen Spaltung des Komplexes führt (Abb. 3.1).

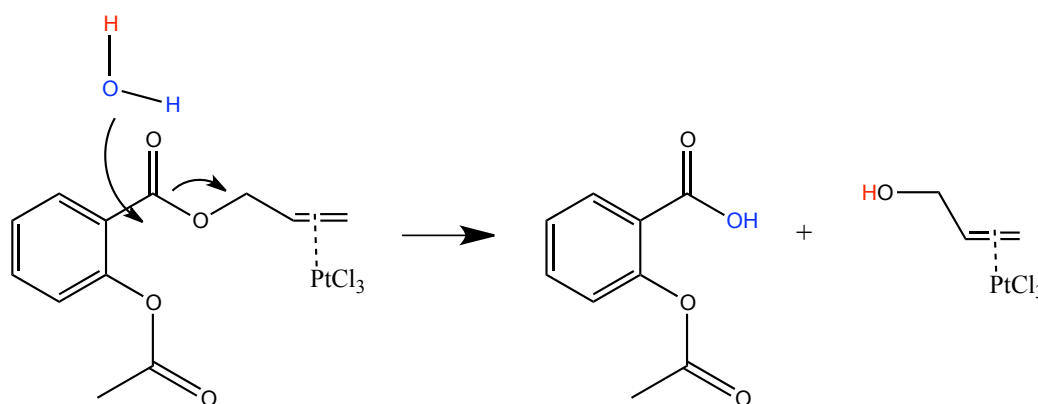


Abb. 3.1 Esterhydrolyse von Prop-ASS-Zeise

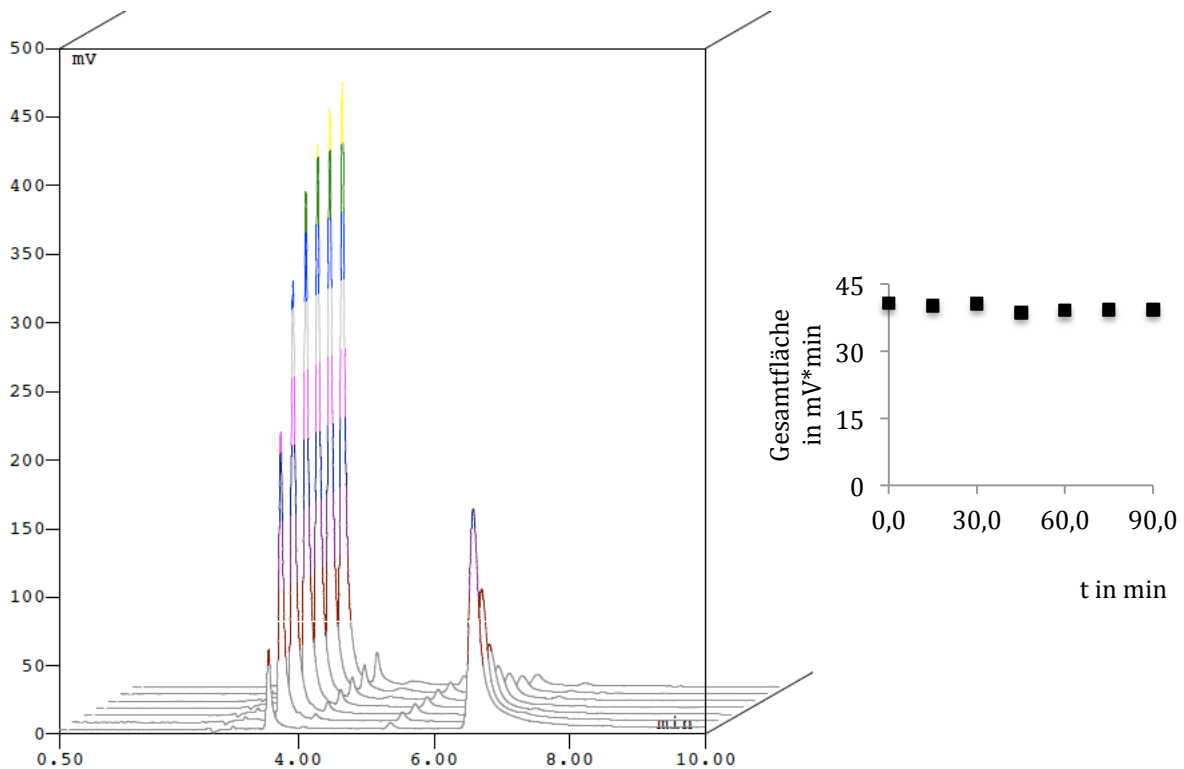


Abb. 3.2 3D-Plot mehrerer HPLC-Chromatogramme der Zersetzung von Prop-ASS-Zeise in Gegenwart von Wasser; beginnend bei Zeitpunkt 0 vorne bis 90min hinten im Zeitabstand von 15min, rechts die Darstellung der Gesamtfläche aus der Addition der beiden Peakflächen

Bei Stabilitätsuntersuchungen des Liganden konnte in einem Zeitraum von 24h unter gleichen Bedingungen keine Spaltung des Esters festgestellt werden. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass das Platin eine entscheidende Rolle bei der Zersetzung spielt.

Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob allein die Anwesenheit des Metalls Einfluss auf die Spaltung nimmt oder ob das Platin gebunden vorliegen muss.

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

Als erstes wurde zu einer Lösung des Liganden Zeise-Salz zugegeben und nach 24h die Wiederfindung bestimmt. Das Ganze wurde unter identischen Bedingungen wiederholt, nur statt Zeise-Salz wurde der Ligand mit Kaliumtetrachloroplatinat inkubiert. Als nächstes wurde 4-Hydroxypropylbenzoat, ein Ester mit gesättigter Seitenkette, genommen und ebenfalls mit Zeise-Salz und Kaliumtetrachloroplatinat inkubiert. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte auch hier nach 24h.

Dabei ließ sich feststellen, dass sowohl Kaliumtetrachloroplatinat als auch Zeise-Salz zur 100%igen Spaltung des olefinischen Esters innerhalb der 24h führten. Eine genauere

Beobachtung der Spaltung in kürzeren Zeitabständen zeigte eine wesentlich schnellere Spaltung mit dem Zusatz des Zeise-Salzes ( $t_{1/2}$  45,9min) als mit dem Kaliumtetrachloroplatinat ( $t_{1/2}$  118,5min). Während die Spaltung mit dem Zeise-Salz sofort erfolgte, ist beim Kaliumtetrachloroplatinat ein verzögerter Beginn mit relativ geringen Flächenänderungen des Liganden in den ersten 40 min zu beobachten. Erst danach scheint die Geschwindigkeit der Spaltung zuzunehmen.

Daraus könnte sich schlussfolgern lassen, dass der Spaltung eine Komplexierung des Platins an die Doppelbindung vorausgehen muss. Beim Zeise-Salz kann die Komplexbildung viel schneller und wahrscheinlich auch quantitativer ablaufen, was die schnellere Spaltung des Liganden erklären könnte. Das Kaliumtetrachloroplatinat hingegen braucht viel mehr Zeit, um an die Doppelbindung zu koordinieren. Dies würde den verzögerten Beginn der Zersetzung erklären. Fehlt die Doppelbindung, wie im Falle des 4-Hydroxypropylbenzoat, lässt sich keine Spaltung innerhalb von 24h detektieren.

Aus den bisher durchgeführten Ergebnissen scheint die Anwesenheit der Doppelbindung und die Komplexierung des Platins an das Olefin der entscheidende Faktor der Instabilität zu sein.

Um die Spaltung weiter aufzuklären wurden strukturelle Veränderungen am Liganden vorgenommen (Abb. 3.3).

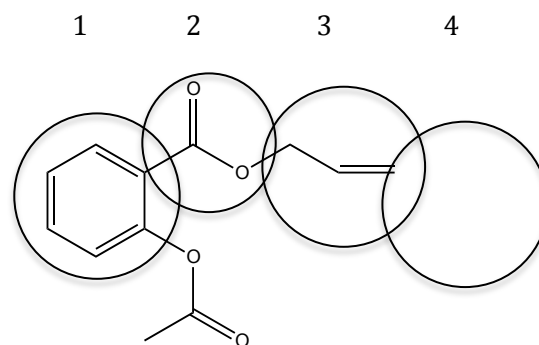


Abb. 3.3 Strukturänderungen zur Aufklärung der Stabilität von NSAR-Zeise Komplexen

- 1) Variationen des aromatischen Substituenten
- 2) Variationen in der funktionellen Gruppe, die der Spaltung unterliegt
- 3) sterische Abschirmung der Doppelbindung
- 4) Variationen an der olefinischen Seitenkette

Für die Variationen 2 und 4 wurden Salicylsäure-Zeise Verbindungen synthetisiert, die in dieser Arbeit als Modellsubstanzen für die Stabilitätsuntersuchungen dienen sollen. Der Vorteil der Salicylsäure gegenüber der Acetylsalicylsäure liegt in der besseren Wasserlöslichkeit, so dass die Peakflächen des Platinkomplexes und der durch Spaltung entstandener Säure nicht durch Überschreiten der Sättigungslöslichkeit beeinflusst werden.

## 3.2.1 Untersuchung des Einflusses verschiedener Substituenten

Kurzbezeichnung	Halbwertszeit in min
Prop-ASS-Zeise	20,2 ± 1,4
Prop-Salicyl-Zeise	17,0 ± 2,7
Prop-Ibu-Zeise	30,1 ± 1,8
Prop-Napro-Zeise	23,9 ± 1,5
Prop-Diclo-Zeise	20,3 ± 5,7
Prop-Indo-Zeise	30,2 ± 0,9

Tabelle 3.1 Übersicht der Halbwertszeiten von verschiedenen aromatischen Substituenten

Als Substituenten mit aromatischen Systemen wurden verschiedene NSAR verwendet, die im Kapitel 2.1 in Tab. 2.1 dargestellt sind. Die Platinkomplexe wurden erst in Methanol gelöst und dann mit 50% (V/V) Wasser versetzt, um insgesamt eine 1mM Lösung des Komplexes zu erhalten. Für die Ermittlung der Halbwertszeiten wurde die Flächenabnahme über die Zeit beobachtet. Durch Logarithmieren der Fläche erhält man einen linearen Kurvenverlauf, der auf eine Kinetik 1. Ordnung schließen lässt. Tabelle 3.1 zeigt die ermittelten Halbwertszeiten der verschiedenen NSAR-Zeise-Komplexe. Bei den Komplexen Prop-Diclo-Zeise und Prop-Indo-Zeise ist der lineare Zusammenhang nicht ganz gegeben ( $R^2 < 0,99$ , Abb. 3.4 am Bsp. von Prop-Indo-Zeise). Ein Grund dafür könnten Ausfällungen durch Überschreiten der Sättigungslöslichkeit sein. Um das zu untersuchen wurde von Prop-Indo-Zeise erneut eine 1mM Lösung hergestellt. Als Lösungsmittel wurde wieder Methanol verwendet aber diesmal statt 50% (V/V) eine kleinere Menge an H<sub>2</sub>O (10mM) zugegeben.

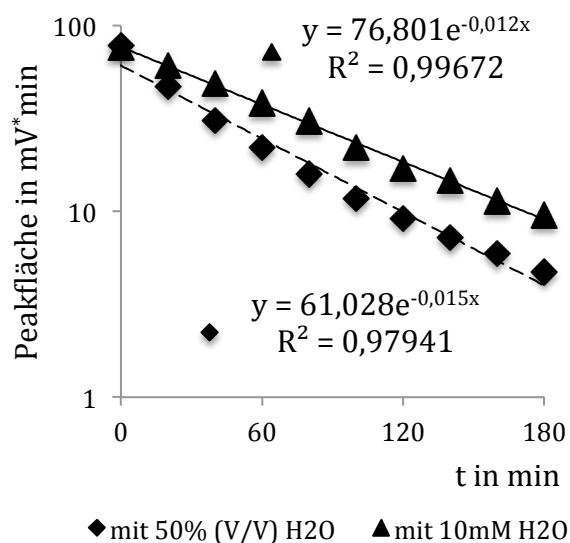


Abb. 3.4 Einfluss des Wassergehaltes bei der Spaltung von Prop-Indo-Zeise

Der lineare Zusammenhang der Messwerte konnte erhöht werden und bestätigt damit Löslichkeitsprobleme bei zu hohem Wassergehalt. Für die Berechnung der Halbwertszeit in Tabelle 3.1 wurde aber die ermittelte Kurve mit 50% (V/V) H<sub>2</sub>O verwendet, um die Ergebnisse untereinander besser vergleichen zu können. Die Anwesenheit von nur 10mM H<sub>2</sub>O führt zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von 30,2min auf 58,6min. Tabelle 3.1 zeigt, dass die aromatischen Substituenten an der aliphatischen Propenyl-Seitenkette, kaum Einfluss auf die Esterspaltung haben. Die Unterschiede in den ermittelten Halbwertszeiten der verschiedenen Komplexe sind viel zu klein, um Aussagen über entscheidende Strukturmerkmale treffen zu können. In allen Fällen konnte keine ausreichende Stabilität erreicht werden, die für weitere pharmakologische Untersuchungen wichtig wäre.

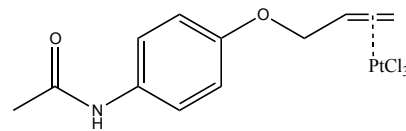
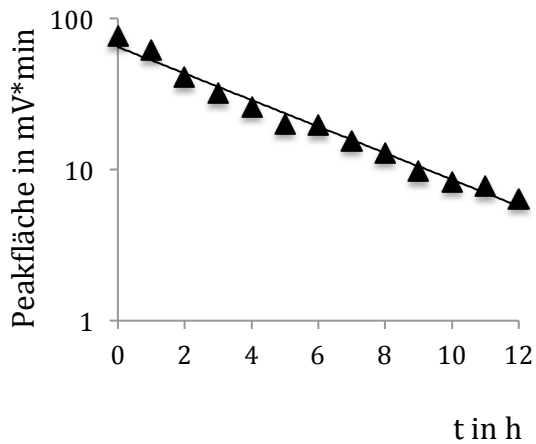
### 3.2.2 Variationen in der funktionellen Gruppe, die der Spaltung unterliegt

Bisher handelte es sich bei den untersuchten Komplexen immer um Ester, die innerhalb kürzester Zeit einer Spaltung unterlagen. Es ist bekannt, dass diese durch geeignete saure oder basische Bedingungen sehr leicht gespalten werden können und stellen daher z.B. beliebte funktionelle Gruppen in der Schutzgruppenchemie dar. An dieser Stelle sollen andere funktionelle Gruppen hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht werden. Zum einen wurde im Falle des Paracetamols die aliphatisch ungesättigte Seitenkette über Etherbildung eingeführt und damit die Carbonylfunktion vollständig entfernt. Zum anderen erfolgte am Beispiel der Salicylsäure die Verknüpfung mit der olefinischen Seitenkette über ein Amid. Dadurch ist die Carbonylfunktion weniger aktiviert und schwerer nucleophil anzugreifen.

#### 3.2.2.1 Spaltung von Prop-Para-Zeise

Allylether werden oft als Schutzgruppe für Alkohole in der Synthese benutzt. Dabei wird die Stabilität im schwach sauren Milieu ausgenutzt und die selektive Spaltung anderer Schutzgruppen ermöglicht. Die Freisetzung des Alkohols kann meistens durch reduktive Spaltung<sup>[71][72]</sup> erfolgen. Ziel der Etherbildung hier ist die Einführung einer funktionellen Gruppe die im Vergleich zum Ester nicht so leicht durch Nucleophile gespalten werden kann. Dafür wurde ein gemischter Ether synthetisiert, der auf der einen Seite das Paracetamol und auf der anderen Seite die schon bekannte Propenylkette aufweist. Durch die Komplexierung des Platins erhoffte man sich einen stabilen Prop-Para-Zeise-Komplex, der keiner Spaltung durch H<sub>2</sub>O unterliegt. Abb. 3.5 zeigt die Spaltung des Prop-Para-Zeise-Komplexes mit einer Halbwertszeit von  $2,6\text{h} \pm 0,3\text{h}$ . Damit zeigt er zwar eine wesentlich langsamere Spaltung im Vergleich zu den

bisher untersuchten Estern aber leider nicht die erhoffte Stabilität um weitere pharmakologische Untersuchungen durchzuführen. Wie auch schon bei den Esterverbindungen, scheint die Spaltung einer Kinetik 1. Ordnung zu folgen. Als Spaltungsprodukte wurden das Paracetamol und Allylalkohol-Zeise-Komplex detektiert. Bleibt die Frage nach dem Grund der Spaltung.

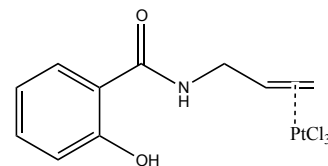
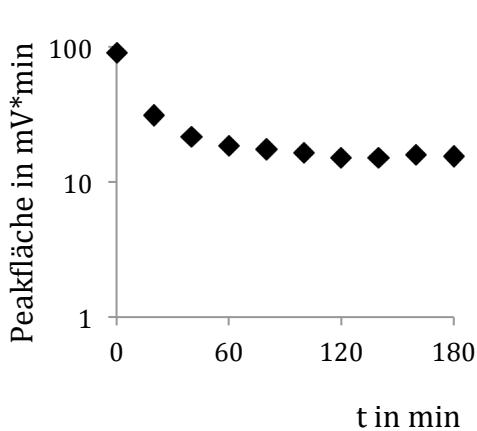


Prop-Para-Zeise

Abb. 3.5 Zersetzung von Prop-Para-Zeise

### 3.2.2.2 Spaltung von Prop-Salicylamid-Zeise

Auch Amide stellen stabilere funktionelle Gruppen im Vergleich zu den Estern dar. Abb. 3.6 zeigt die Zersetzung von Prop-Salicylamid-Zeise. Die Halbwertszeit beträgt  $12,1 \text{ min} \pm 3,9 \text{ min}$ . Auffällig ist dabei der Kurvenverlauf, der hier nach Logarithmieren der y-Achse nicht wie erwartet einen linearen Verlauf annimmt. Das kann auf eine veränderte Reaktionsordnung oder auf einen völlig anderen Verlauf der Spaltung hindeuten.



Prop-Salicylamid-Zeise

Abb. 3.6 Zersetzung von Prop-Salicylamid-Zeise

Würde die Amidspaltung analog der Esterhydrolyse (Abb. 3.1) an der funktionellen Gruppe erfolgen, so müssten als Spaltprodukte die Salicylsäure und der Allylamin-Zeise-Komplex entstehen. Im HPLC-Chromatogramm konnte die Flächenabnahme des Platinkomplexes bei 7,55min und die Flächenzunahme eines neu entstandenen Peaks bei 4,13min beobachtet werden. Allerdings konnte der neu entstandene Peak nicht als Salicylsäure identifiziert werden. Alternativ wäre ein nucleophiler Angriff am  $\alpha$ -C-Atom der Seitenkette denkbar. Die daraus resultierenden Spaltprodukte wären dann Salicylamid und der Propenol-Zeise Komplex. Aber auch die Retentionszeit von Salicylamid ist nicht identisch mit der des neu entstandenen Peaks. Der abflachende Kurvenverlauf in Abb. 3.6 könnte durch die Einstellung eines Gleichgewichtes erklärt werden. Untersuchungen mit der hochauflösenden Masse zeigen neben dem Platinkomplex nur die Molmasse des Liganden. Daraus lässt sich ableiten, dass hier der Ligand nicht gespalten wird, sondern die Bindung zum Platin verliert. Der Nachweis mit HPLC ist problematisch, da sich Ligand und Platinkomplex identisch auf der Säule verhalten und es nicht gelungen ist, beide Spezies voneinander zu trennen. Um diesen Sachverhalt genauer zu klären, könnten LC-MS -Untersuchungen durchgeführt werden. Darüber kann zum einen die Identität des neu entstehenden Peaks geklärt werden und zum anderen würde man gut die gleichzeitige Anwesenheit von Ligand und Platinkomplex erkennen.

### 3.2.3 Sterische Abschirmung der Doppelbindung

Bisher enthielten alle untersuchten Komplexe eine endständige Doppelbindung mit einem Abstand von 3 C-Atomen zur funktionellen Gruppe (Ester, Amid bzw. Ether). Der Abstand soll weiter beibehalten werden, aber an beiden Seiten der Doppelbindung eine Verknüpfung mit einem NSAR über eine Esterfunktion stattfinden (Abb. 3.7 Strukturformel). Daraus resultieren Liganden, die an der Doppelbindung eine Spiegelebene besitzen. Die Einhaltung des 3 C-Atom-Abstandes zwischen Platinzentrum und Estergruppe würde eine beidseitige Spaltung innerhalb kürzester Zeit erwarten lassen. Überraschenderweise zeigt der Di-Salicylsäure-Zeise-Komplex eine deutlich verlangsamte Spaltung im Vergleich zu Prop-Salicyl-Zeise. Die Halbwertszeit liegt mit  $4,7\text{h} \pm 1\text{h}$  deutlich über der Halbwertszeit des monomeren Prop-Salicyl-Zeise (17min). Zunächst scheint eine Seite gespalten zu werden. Folge ist die Flächenabnahme des Di-Salicyl-Zeise-Komplexes bei 21,54min (Abb. 3.7) die Flächenzunahme der Säure bei 4,53min (NSAR) und die Flächenzunahme eines neuen Peaks bei 10,32min, dessen Identität die alkoholische Struktur cis-But-OH-Salicyl-Zeise sein könnte (Abb. 3.8). Eine weitere Spaltung des alkoholischen Platinkomplexes hin zu Säure und cis-Buten-1,4-diol-Zeise Komplex konnte innerhalb von 72h nicht beobachtet werden (Abb. 3.9) Betrachtet man die Enzwicklung der



Gesamtfläche aller Peaks, so lässt sich eine leicht Abnahme feststellen. Gründe könnten in einem veränderten Responsefaktor der entstehenden Spaltprodukte liegen.

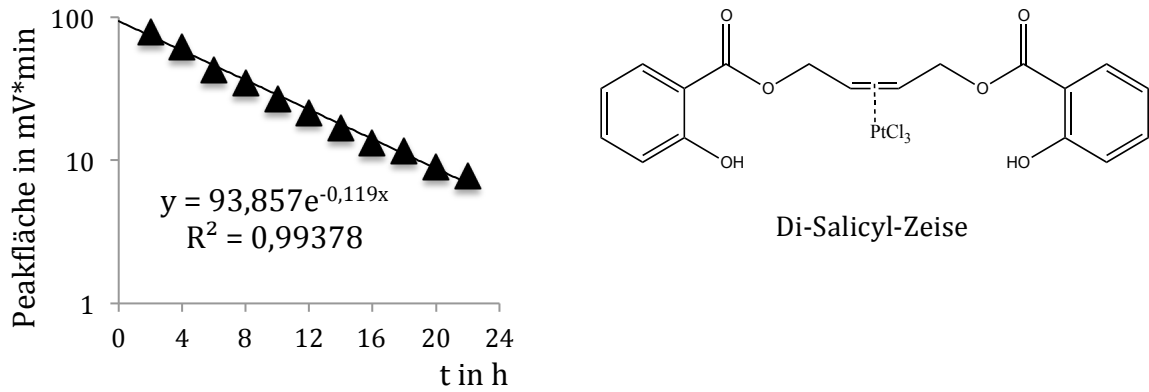


Abb. 3.7 Zersetzung von Di-Salicyl-Zeise

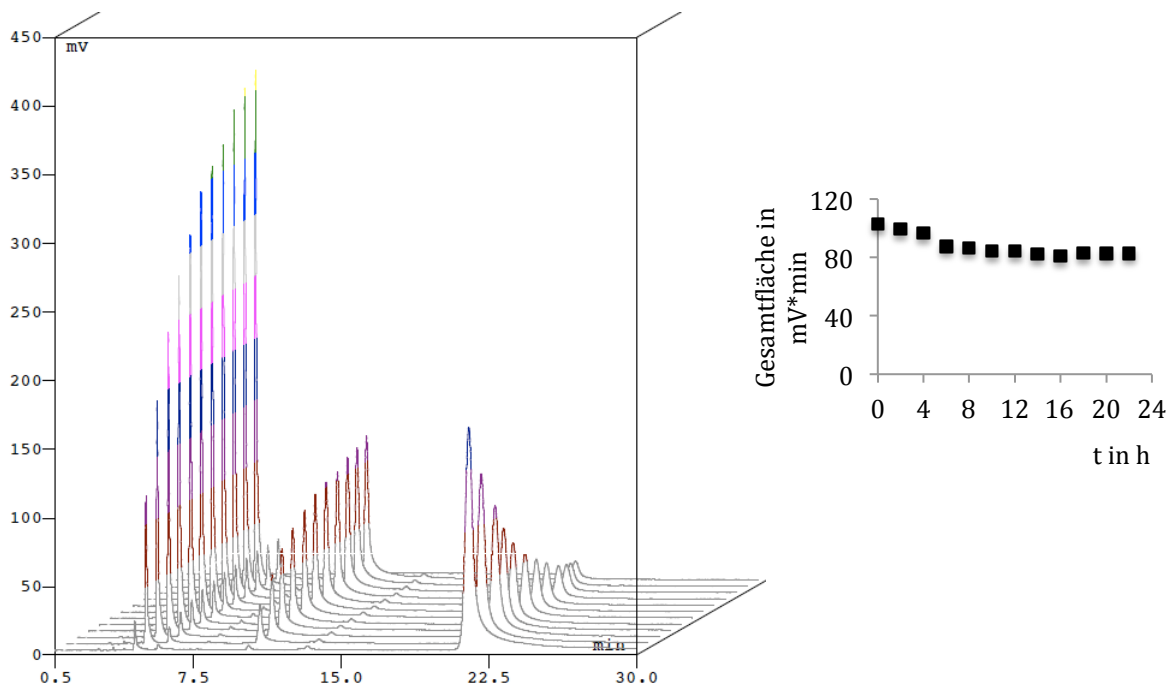


Abb. 3.8 3D-Plot mehrerer HPLC-Chromatogramme der Zersetzung von Di-Salicyl-Zeise in Gegenwart von Wasser; beginnend bei Zeitpunkt 0 vorne bis 22h hinten im Zeitabstand von 2h; rechts die Darstellung der Gesamtfläche aus der Addition der beiden Peakflächen

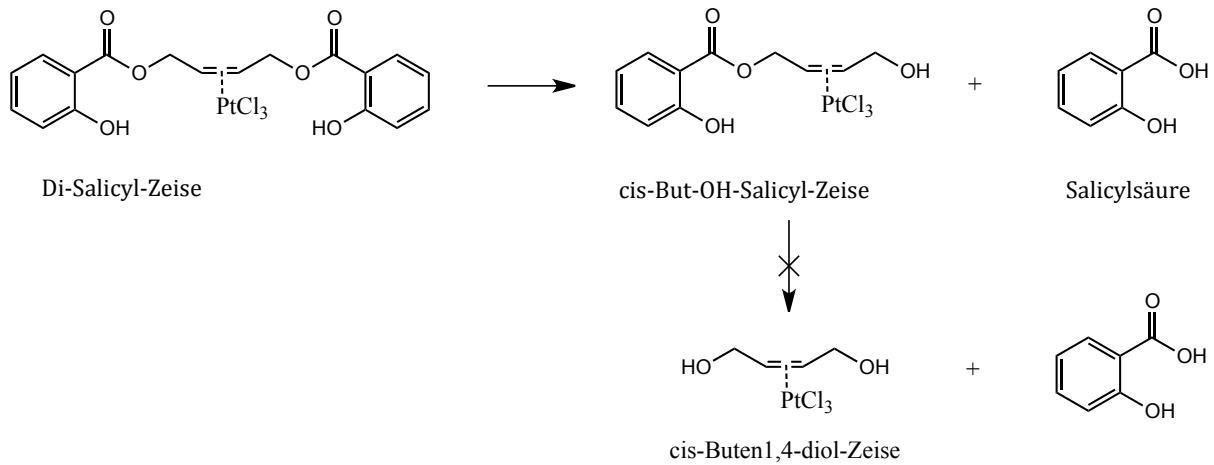


Abb. 3.9 Zersetzung von Di-Salicyl-Zeise

Um die Identität der resultierenden Spaltprodukte abzusichern, wurde als weiteres analytisches Verfahren die hochauflösende Masse hinzugezogen.

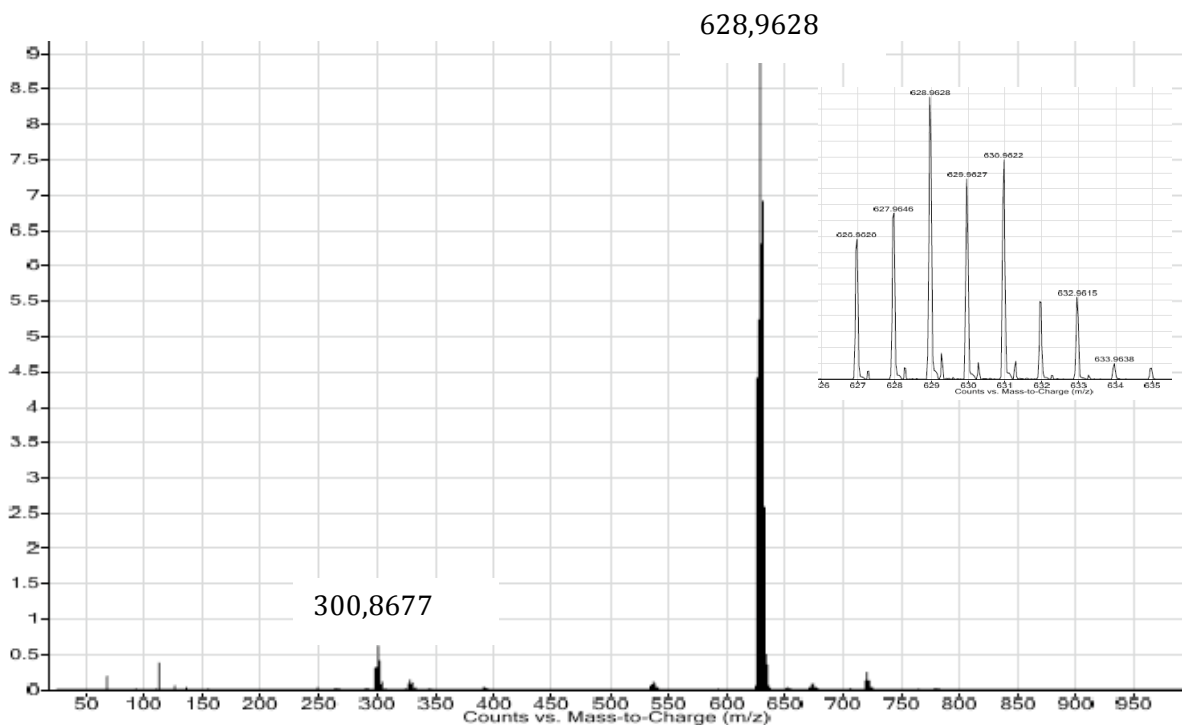


Abb. 3.10 (-)-ESI-TOF von Di-Salicyl-Zeise

Abb. 3.10 zeigt das ESI-TOF von Di-Salicyl-Zeise. Bei der Elektrospray-Ionisationsmethode handelt es sich um ein sehr schonendes Ionisationsverfahren. Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringen Fragmentierung des Analyten und ermöglicht somit die Ermittlung von Molekülmassen. Mit einer Molmasse vom 628,9628 handelt es sich dabei um den gewünschten Di-

Salicyl-Zeise-Komplex, der hier im negativen Scan als einfach geladenes Anion erfasst wurde. Die Vergrößerung des Molpeaks zeigt die Isotopenverteilung von Platin. Der ebenfalls sichtbare Molpeak bei 300,8677 scheint eine Fragmentierung aus dem Di-Salicyl-Zeise-Komplex zu sein. Je nach Variation der angelegten Spannung kann die Intensität dieses Peaks vergrößert oder verkleinert werden. Das hier abgebildete Massenspektrum wurde bei einer Spannung von 70kV aufgenommen, um die Fragmentierung sehr gering zu halten. Der Molpeak des erhaltenen Fragments zeigt ebenfalls die Isotopenverteilung von Platin und kann dem Molekül  $\text{PtCl}_3^-$  zugeordnet werden. In die Lösung des Di-Salicyl-Zeise-Komplexes erfolgte nun die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$ . Um eine ausreichende Menge an Spaltprodukten zu erhalten, wurde der Ansatz 2h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das daraus entstehende Massenspektrum ist in Abb. 3.11 dargestellt.

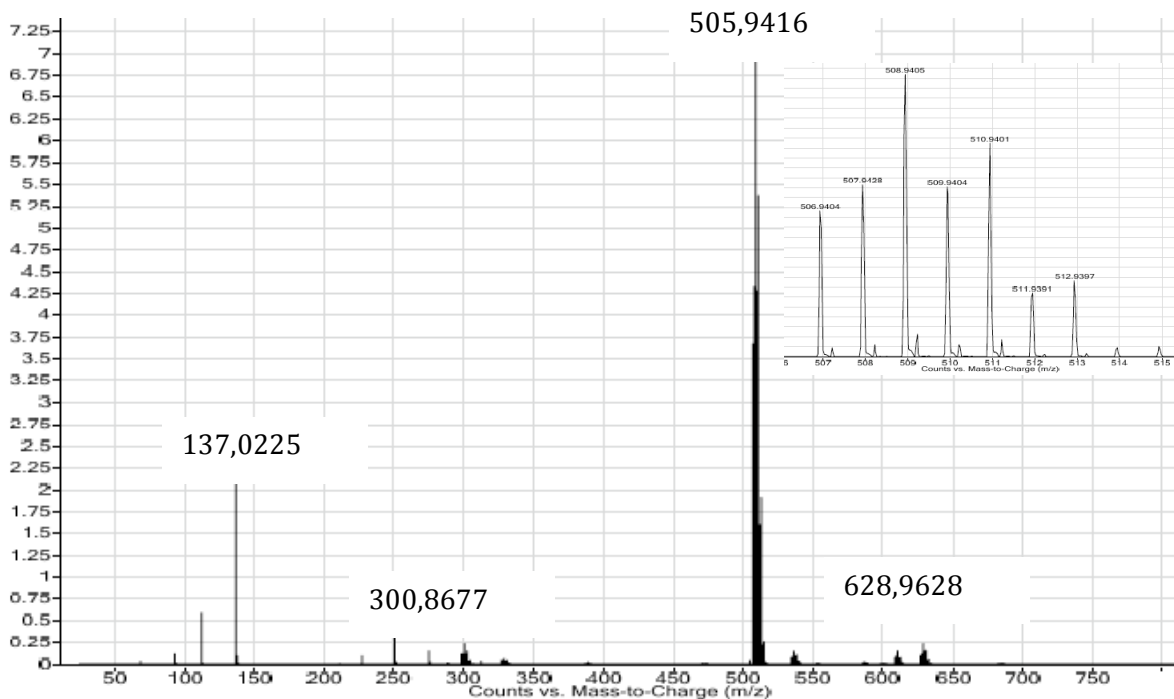


Abb. 3.11 (-)-ESI-TOF von Di-Salicyl-Zeise 2h nach  $\text{H}_2\text{O}$ -Zugabe

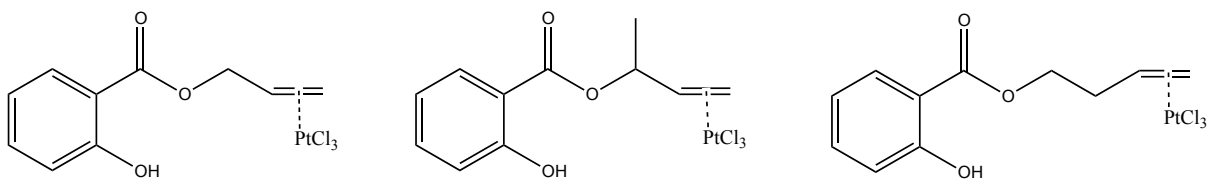
Dabei fällt zuerst auf, dass der Molpeak von Di-Salicyl-Zeise deutlich abgenommen hat. Unverändert bleibt das Fragmentierungsprodukt  $\text{PtCl}_3^-$ . Neu hinzugekommen sind die Molpeaks 137,0225 und 505,9416. Die Molmasse 137,0225 zeigt keinerlei Isotopenverteilung und entspricht der Molmasse von Salicylsäure. Die Masse 505,9416 zeigt die schon gewohnte Platinisotopenverteilung und kann dem cis-But-OH-Salicyl-Zeise-Komplex zugeordnet werden.

Obwohl wie unter 3.2.1 beschrieben kein Einfluss des aromatischen Substituenten festgestellt werden konnte, wurde dennoch eine kleine Auswahl von NSAR-Dimeren hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht. Dabei konnte der geringe Einfluß des verwendeten NSAR auf die Stabilität des Platinkomplexes bestätigt werden (Tabelle 3.2). Erfreulicherweise zeigen alle untersuchten NSAR-Dimer-Zeise-Komplexe eine deutlich erhöhte Stabilität und können in weiteren pharmakologische Testungen untersucht werden.

Kurzbezeichnung	Halbwertszeit in h
Di-ASS-Zeise	$7,3 \pm 0,6$
Di-Salicyl-Zeise	$4,7 \pm 1,0$
Di-Napro-Zeise	$4,7 \pm 0,5$
Di-Indo-Zeise	$5,7 \pm 0,4$

Tabelle 3.2 Übersicht der Halbwertszeiten von NSAR-Dimeren Pt-Komplexen

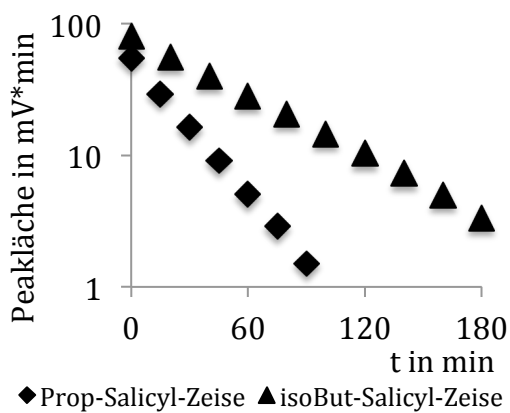
### 3.2.4 Strukturelle Veränderungen an der olefinischen Seitenkette



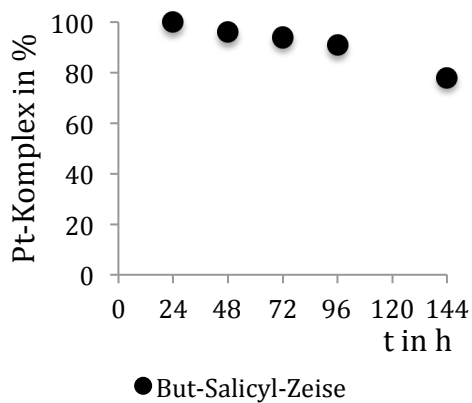
Prop-Salicyl-Zeise

isoBut-Salicyl-Zeise

But-Salicyl-Zeise



◆ Prop-Salicyl-Zeise ▲ isoBut-Salicyl-Zeise



● But-Salicyl-Zeise

Abb. 3.12 strukturelle Veränderungen an der Seitenkette und die dazugehörige Zersetzung; links Variation am  $\alpha$ -C-Atom der Seitenkette; rechts Kettenverlängerung um eine  $\text{CH}_2$ -Einheit

Um eine höhere Stabilität der Platinkomplexe zu erreichen, sollte durch einen Substituenten in unmittelbarer Nähe der Estergruppierung die Elektronendichte am Carbonyl-C-Atom erhöhen werden. Neben dem +I-Effekt kann auch eine sterische Hinderung des nucleophilen Angriffs diskutiert werden. Resultat der Einführung der Methylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom beim isoBut-Salicyl-Zeise ist eine Erhöhung der Halbwertszeit von  $20,2\text{min} \pm 1,2\text{min}$  auf  $40,3\text{min} \pm 3,7\text{min}$ . Die Einführung einer weiteren Methylgruppe könnte die Stabilität vielleicht weiter verbessern. Dazu ist der entsprechende Ligand synthetisiert worden. Jedoch war es nicht möglich, an diese Verbindung das Platin zu komplexieren. Offenbar ist durch Einführung einer weiteren Methylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom der Zugang zur Doppelbindung sterisch erschwert und bietet zu wenig Platz für die räumlich sehr anspruchsvolle  $\text{PtCl}_3$ -Gruppe. Daher muss diese Frage an der Stelle leider unbeantwortet bleiben.

Die stabilste Verbindung stellt der But-Salicyl-Zeise-Komplex dar. Nach einer Inkubationszeit von 144h bei  $37^\circ\text{C}$  waren noch 78% ungespalten. Damit scheint der Abstand des Platinzentrums zur funktionellen Gruppe die wichtigste Rolle zu spielen. Tabelle 3.3 zeigt die Wiederfindung der untersuchten But-NSAR-Zeise-Komplexe nach 6 Tagen.

Pt-Komplex	ungespaltener Anteil in % nach 144h
But-Salicyl-Zeise	$80 \pm 4$
But-Ibu-Zeise	$63 \pm 4$
But-Napro-Zeise	$83,4 \pm 3$
But-Diclo-Zeise	$85,5 \pm 5$
But-Indo-Zeise	$88,5 \pm 1$
But-Cele-Zeise	$79 \pm 10$
But-Phenacryl-Zeise	$84,5 \pm 1$
But-Br-Phenacryl-Zeise	$87,5 \pm 7$

Tabelle 3.3 Wiederfindung von But-NSAR-Zeise Komplexen nach 144h

### 3.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Verbindungen mit einer Propenylseitenkette einer Spaltung durch Wasser unterliegen. Dabei konnte auch durch die Variation der funktionellen Gruppe keine ausreichende Stabilität erreicht werden. Die Verlängerung der Seitenkette um lediglich eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe führt zu stabileren Komplexen, die eine weitere pharmakologische Untersuchung erlauben.

Aus den hier erhaltenen Ergebnissen (zu hohe Reaktionsgeschwindigkeiten und Spaltung eines Ethers) lässt sich vermuten, dass die Hydrolyse der Platinkomplexe nicht wie in Abb. 3.1

dargestellt abläuft. Wahrscheinlicher ist ein Angriff des Nucleophils am Allyl-C-Atom der Seitenkette. Durch den Elektronenzug von der funktionellen Gruppe auf der einen Seite und dem Platinzentrum auf der anderen Seite wird dort ein Elektronenmangel erzeugt. Der Elektronenunterschuss könnte durch eine intramolekulare Reaktion vom Platin mit dem Sauerstoff unter Bildung eines Chelatrings weiter verstärkt werden (Abb. 3.13). Durch den Angriff des Nucleophils  $\text{H}_2\text{O}$  erfolgt die Spaltung der funktionellen Gruppe zu Säure und Alkohol im Falle eines Esters und zu zwei Alkoholen im Falle eines Ethers.

Bei in der Literatur beschriebenen Additionsreaktionen am Olefin ist eine Wanderung des Platinzentrums entlang der  $\text{C}=\text{C}$ -Bindung zu beobachten. Dabei kann je nach Beschaffenheit des olefinischen Liganden die Reaktion ein Markovnikov- oder anti-Markovnikov-Produkt liefern<sup>[73]</sup>. Die Umwandlung des  $\eta^2$ -Olefin zum  $\eta^1$ -Olefin am Platin könnte ebenfalls diskutiert werden. Bei Orientierung zum terminalen C-Atom, würde ein 5-gliedriger Chelatligand am Platin entstehen.

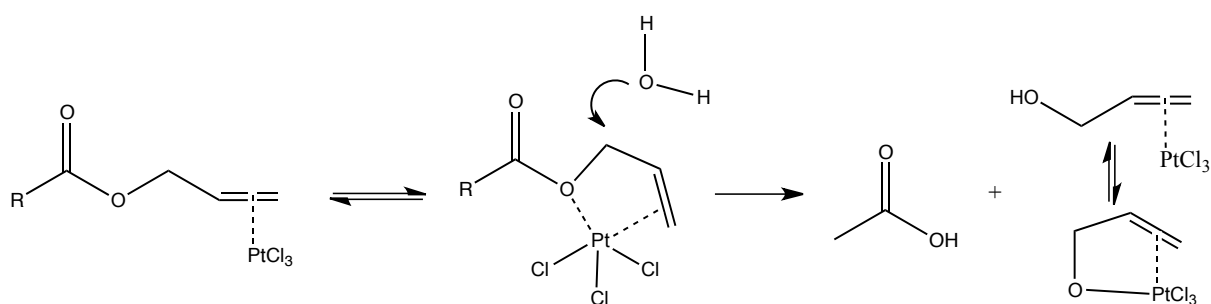


Abb. 3.13 nucleophilen Angriff am  $\alpha$ -C-Atom der Seitenkette von Prop-NSAR-Zeise-Komplexen

Weitere Hinweise auf die Anwesenheit eines in Lösung gebildeten Chelatrings gibt die Untersuchung der dimeren NSAR-Zeise-Komplexe (Kapitel 3.2.3; Abb. 3.9). Das Ausbleiben der weiteren Spaltung von cis-But-OH-Salicyl-Zeise-Komplex könnte mit dem in Abb. 3.13 dargestellten Mechanismus erklärt werden. Zunächst erfolgt die Chelatbildung zum Sauerstoffatom der Estergruppierung auf der einen Seite. Dadurch ist das  $\alpha$ -C-Atom der Seitenkette auf dieser Seite aktiviert und es erfolgt die Spaltung durch nucleophilen Angriff von  $\text{H}_2\text{O}$ . Nach der Spaltung bleibt der Chelatring bestehen. Auf der anderen Seite bleibt der starke Elektronenzug durch fehlende Ringbildung aus und unterliegt keiner Spaltung. Durch die gezielte Einführung einer alkoholischen Seitenkette, die in der Lage ist einen 5-gliedrigen Chelatring auszubilden, würde sich die Möglichkeit ergeben, stabile Zeise-Komplexe zu synthetisieren.

Die Verlängerung der Seitenkette um eine  $\text{CH}_2$ -Einheit führt wahrscheinlich zur erschwerten Chelatbildung. Resultat ist ein stark reduzierter Elektronenzug auf das  $\alpha$ -C-Atom der

Seitenkette. Der Angriff des Nucleophils kann nicht mehr erfolgen und ausreichend stabile Platinkomplexe werden erhalten.

### 3.3 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Die Sättigungslöslichkeit  $c_s$  ist definiert als die maximale Masse eines Stoffes, die bei einer bestimmten Temperatur von einem bestimmten Lösungsmittel aufgenommen werden kann<sup>[74]</sup>. Oberhalb der Sättigungslöslichkeit bildet der Feststoff einen Bodensatz, der mit dem gelösten Stoff im Gleichgewicht steht. Bei der hier durchgeführten Bestimmung wurde eine Temperatur von 37°C gewählt, da die Inkubation der Substanzen bei Ermittlung von Protein- und DNA-Bindung, Zell- und Zellkernaufnahme sowie Zytotoxizität bei dieser Temperatur erfolgte. Als Lösungsmittel wurde PBS verwendet. Der Gehalt an gelöster Substanz wurde mittels AAS quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgte mit der jeweiligen Substanz. Tabelle 3.4 zeigt die aus den Messungen berechneten Sättigungslöslichkeiten.

Pt-Komplex	Sättigungslöslichkeit g/l	Konzentration mM
But-ASS-Zeise	>126,50	>220,08
But-Salicyl-Zeise	9042,00	16970,72
Di-Salicyl-Zeise	0,42	0,63
But-Napro-Zeise	8,60	13,76
Di-Napro-Zeise	0,70	0,83
But-Ibu-Zeise	49,10	81,71
Di-Ibu-Zeise	0,15	0,18
But-Indo-Zeise	9,58	12,73
Di-Indo-Zeise	0,03	0,03
But-Diclo-Zeise	131,40	190,21
Di-Diclo-Zeise	0,58	0,59
But-Phenacryl-Zeise	1,44	2,07
But-Br-Phenacryl-Zeise	0,13	0,17
But-Cele-Zeise	1,40	1,74

Tabelle 3.4 Sättigungslöslichkeiten in PBS für Zeise-analoge Platinkomplexe

Damit die Platinkomplexe eine pharmakologische Wirkung auslösen können, ist es wichtig, dass sie in gelöster Form an ihren Wirkort gelangen.

Die ermittelten Werte zeigen deutlich eine Verschlechterung der Löslichkeit vom jeweiligen monomeren Platinkomplex zum entsprechenden dimeren Komplex. Dennoch ist die Löslichkeit ausreichend für weitere Untersuchungen. Die im Zytotoxizitätstest höchste verwendete Konzentration beträgt  $50\mu\text{M}$  und kann für alle Komplexe in Tabelle 3.4 realisiert werden. Eine Veränderung der Löslichkeit durch Reaktion mit Zellbestandteilen kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

### 3.4 Lipophiliebestimmungen

Die Lipophilie ist ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung von pharmakologischen Eigenschaften einer Verbindung. Sie spielt eine große Rolle bei der Permeation von lipophilen Zellmembranen und der anschließenden Verteilung im hydrophilen Zytosol. Um neu entwickelte Arzneistoffe hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit abschätzen zu können, wurden verschiedene Modelle entwickelt. Zum einen gibt es das Biopharmaceutics Classification System (BCS), welches Löslichkeit und Permeation als Parameter nutzt und eine Einteilung in 4 Klassen schafft (Abb. 3.14). Dabei stellt Klasse I die erwünschten Idealbedingungen dar. In Klasse II muss versucht werden, die Löslichkeit mit chemischen Veränderungen oder technologischen Methoden zu erhöhen. Verbindungen, die der Klasse IV zugeordnet werden, sind nur sehr schwer verwendbar.

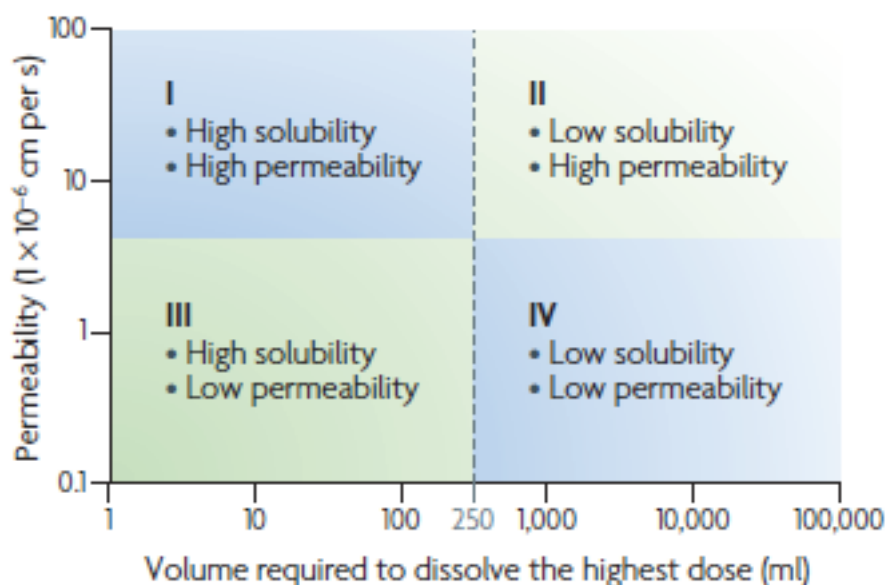


Abb. 3.14 Einteilung der Substanzen in die 4 Kategorien nach BCS<sup>[75]</sup>



Zum anderen gibt es die sogenannte Rule of five, die vom Chemiker Lipinski aufgestellt wurde<sup>[76]</sup>. Darin wird postuliert, dass für eine gute orale Bioverfügbarkeit ein LogP von maximal 5, eine Molmasse kleiner 500g/mol, nicht mehr als 5 Donatoren und nicht mehr als 10 Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen von Vorteil sind.

Für die Untersuchung der Bioverfügbarkeit ist zu diesem Zeitpunkt zu wenig über die synthetisierten Komplexe bekannt. Daher soll an dieser Stelle lediglich die Lipophilie der Komplexe durch Bestimmung des LogP-Wertes abgeschätzt werden. Beim LogP-Wert handelt es sich um den logarithmierten Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Er kann durch Ausschütteln der zu untersuchenden Substanz zwischen den beiden Phasen und anschließender Konzentrationsbestimmung ermittelt werden.

Die hier durchgeführte Bestimmung erfolgte mit der HPLC. Dabei wurde nicht direkt die Verteilung zwischen Octanol/Wasser, sondern zwischen stationärer und mobiler Phase bestimmt, deren messbare Größe die Retentionszeit ist. Dafür wurden zunächst ausgewählte Substanzen, deren LogP-Werte aus der Literatur<sup>[77]</sup> bekannt sind, vermessen und daraus eine Kalibriergerade erstellt (Tabelle 3.5). Als hydrophilster Standard wurde Acetophenon mit einem LogP von 1,58 verwendet. Lipophilster Standard war Octylbenzen mit einem LogP von 6,30.

Standard-substanzen	logP	t <sub>R</sub> in min
Acetophenon	1,58	4,60
Anisol	2,11	5,10
Toluol	2,77	31,78
Naphtalen	3,17	7,84
Biphenyl	3,63	6,12
Hexylbenzen	5,24	6,95
Octylbenzen	6,30	17,40

Tabelle 3.5 Übersicht verwendeter Standard-substanzen zur LogP-Bestimmung

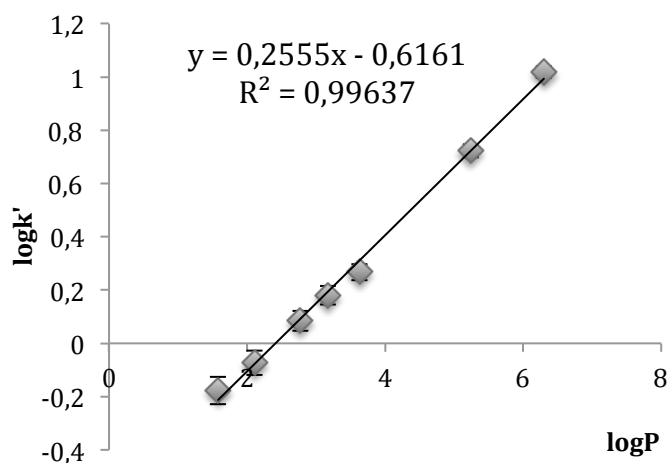


Abb. 3.15 Kalibrierung LogP-Bestimmung

Wie zu erwarten war, weisen die dimeren Platinkomplexe eine größere Lipophilie im Vergleich zu ihren monomeren Komplexen auf (Tabelle 3.6). Der dimere Indometacin-Platinkomplex und der dimere Diclofenac-Platinkomplex stellen die lipophilsten Komplexe dar und würden der Forderung von Lipinsky mit einem  $\log P < 5$  nicht nachkommen.

NSAR-Monomere	logP( $\pm$ sdv)	NSAR-Dimere	logP( $\pm$ sdv)
But-Salicyl-Zeise	2,95( $\pm$ 0,022)	Di-Salicyl-Zeise	3,79( $\pm$ 0,009)
But-Ibu-Zeise	4,46( $\pm$ 0,043)	Di-Ibu-Zeise	4,49( $\pm$ 0,004)
But-Napro-Zeise	3,39( $\pm$ 0,009)	Di-Napro-Zeise	4,69( $\pm$ 0,008)
But-Indo-Zeise	3,91( $\pm$ 0,034)	Di-Indo-Zeise	5,50( $\pm$ 0,006)
But-Diclo-Zeise	3,96( $\pm$ 0,045)	Di-Diclo-Zeise	5,98( $\pm$ 0,025)
But-Phenacryl-Zeise	2,12( $\pm$ 0,029)		
But-Cele-Zeise	2,56( $\pm$ 0,026)		
But-Br-Phenacryl-Zeise	2,17 ( $\pm$ 0,082)		

Tabelle 3.6 ermittelte LogP-Werte von NSAR-Zeise-Komplexen

Allerdings müssen die hier ermittelten LogP-Werte kritisch betrachtet werden. Bei den verwendeten Standardsubstanzen handelt es sich ausnahmslos um neutral geladene Stoffe, deren Trennverhalten nur durch Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase erfolgt. Die hier untersuchten Platinkomplexe sind einfach negativ geladene Anionen, bei denen neben Verteilung auch elektrostatische Wechselwirkungen oder Ionenpaarbildung Einfluss auf die Retentionszeit nehmen können. Austauschprozesse der Chloroliganden gegen Aqualiganden während des HPLC-Laufes können eine Ladungsänderung bedingen, die je nach Anzahl der ausgetauschten Liganden über neutrale bis hin zu zweifach positiv geladene Spezies verläuft. Welcher Ladungszustand bei der Trennung auf der Säule vorliegt, kann nicht genau bestimmt werden. Um zu sehen, ob das Trennverhalten der Platinkomplexe ähnlich dem der Standardsubstanzen ist, wurden die monomeren Platinkomplexe bei einer anderen Fließmittelzusammensetzung erneut vermessen.

Dabei zeigt sich der Trend, dass mit zunehmender Elutionskraft des Fließmittels der ermittelte LogP abnimmt (Tabelle 3.7). Ursache könnte, wie schon oben erwähnt, der vorhandene Ladungszustand der Platinkomplexe sein.

NSAR-Monomere	Acetonitril/TFA 0,1%		
	60/40	70/30	80/20
But-Salicyl-Zeise	3,07	3,32	3,25
But-Diclo-Zeise	4,38	4,24	4,03
But-Napro-Zeise	3,92	3,58	3,36
But-Ibu-Zeise	4,77	4,43	4,18
But-Indo-Zeise	4,35	3,98	3,62
But-Phenacryl-Zeise	3,03	2,54	2,09
But-Cele-Zeise	3,25	2,74	2,16
But-Br-Phenacryl-Zeise	3,34	2,95	2,52

Tabelle 3.7 Einfluss der Fließmittelzusammensetzung auf den LogP-Wert

Um weitere Hinweise auf den Ladungszustand der gemessenen Platinkomplexe zu erhalten, wurde der 0,1%igen TFA 100mM NaCl zugesetzt. Ziel ist es, während des HPLC-Laufes den Ionendruck von Chlorid auf die Platinkomplexe zu erhöhen und damit den Trichloroplatinkomplex zu detektieren. Zu erwarten wäre dabei eine deutlich veränderte Verweildauer auf der Säule und daraus resultierende unterschiedliche Retentionszeiten.

NSAR-Monomere	Acetonitril/TFA 0,1%		
	60/40	70/30	80/20
But-Salicyl-Zeise	2,36	1,32	0,48
But-Diclo-Zeise	4,45	2,58	1,82
But-Napro-Zeise	3,54	1,99	1,13
But-Ibu-Zeise	4,67	2,73	2,16
But-Indo-Zeise	4,29	2,40	1,63
But-Phenacryl-Zeise	2,22	1,13	0,32
But-Cele-Zeise	2,90	1,35	0,40
But-Br-Phenacryl-Zeise	2,88	1,43	0,42

Tabelle 3.8 Einfluss von 100mM NaCl in der wässrigen Phase des Fließmittels bei unterschiedlichen Fließmittelzusammensetzungen

Die ermittelten LogP-Werte der Trichlorokomplexe liegen unterhalb des Standards Acetophenon. Um auch hydrophilere Komplexe zu erfassen, wurde Benzamid mit einem LogP von 0,64 als Standard hinzugefügt. Bei veränderter Fließmittelzusammensetzung variiert der LogP-Wert der Platinkomplexe durch den Zusatz des Natriumchlorids viel stärker, als ohne Zusatz.

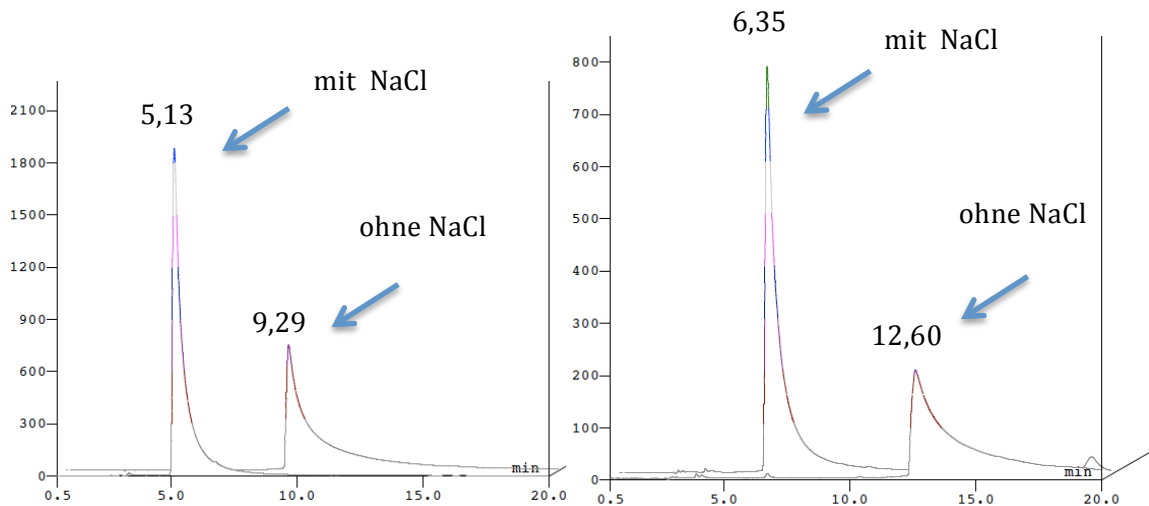


Abb. 3.16 Einfluss von NaCl auf die Retentionszeiten von But-Napro-Zeise (links) und But-Indo-Zeise (rechts)

Abb. 3.16 zeigt den Overlay von 2 HPLC-Läufen einmal mit Zusatz von NaCl und einmal ohne Zusatz von NaCl bei einer Fließmittelzusammensetzung von 70/30 Acetonitril/0,1%TFA. Dabei handelt es sich exemplarisch einmal um den But-Napro-Zeise-Komplex (links dargestellt) und rechts um den But-Indo-Zeise-Komplex. In beiden Fällen zeigt sich eine deutlich verkürzte Retentionszeit.

Da die variierenden LogP-Werte sowohl mit als auch ohne NaCl auf geladene Spezies hindeuten, würden bei dem Lauf mit NaCl die einfach negativ geladenen Trichloro- Platinkomplexe vermutet werden. Weitere Vermutungen lassen dann auf die Anwesenheit von positiv geladenen Platinkomplexen bei dem Lauf ohne NaCl schließen. Die höheren Retentionszeiten bei NaCl-freier mobiler Phase kann man durch Bildung von Ionenpaaren mit Trifluoracetat-Ionen erklären. Durch das nach außen neutral geladene Ionenpaar ähnelt das Trennverhalten des Platinkomplexes eher dem der Standardsubstanzen und zeigt dadurch auch bei Variation der Fließmittelzusammensetzung geringere Unterschiede bei den ermittelten LogP-Werten.

Eine weitere Möglichkeit die kleineren Retentionszeiten unter Zusatz von NaCl zu erklären, wären Aussalzeffekte durch Veränderung der Ionenstärke der mobilen Phase<sup>[78]</sup>. Um dies auszuschließen könnte der NaCl-Zusatz durch ein beliebiges anderes Salz ersetzt werden. Treten dann ebenfalls Veränderungen in der Retentionszeit auf, so wäre die Ursache nicht der diskutierte Ligandenaustausch.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Bestimmung des LogP-Wertes nach dieser Methode keine absoluten Werte liefert. Sie ist aber durchaus geeignet, die hier gemessenen Komplexe untereinander zu vergleichen.

## 4 Hemmung der Cyclooxygenasen

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse dargestellt und diskutiert werden, die bei der Testung der Platinkomplexe sowohl an isolierten Cyclooxygenasen als auch im Ganzzellassay erhalten wurden.

### 4.1 Prostaglandin-H-Synthase

Bei der Cyclooxygenase handelt es sich um ein Enzym, dessen Aufgabe die Synthese der Prostaglandine aus der Arachidonsäure ist. Um diese Funktion ausüben zu können, bildet das Enzym Dimere und besitzt 2 aktive Zentren. Davon ist ein Zentrum für die Cyclooxygenase-Reaktion verantwortlich, das andere übernimmt die Aufgabe der Peroxidase-Reaktion. Beide Zentren befinden sich in dem gleichen dimeren Proteinmolekül, sind aber dort räumlich voneinander getrennt<sup>[79]</sup>. Abb. 4.1 zeigt die Proteinstruktur einer monomeren Einheit der COX-1 mit farblicher Darstellung der einzelnen Domänen. Sie lässt sich in drei große Domänen einteilen. Am N-terminalen Ende des Enzymes befindet sich eine Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren, gefolgt von der Membrandomäne und den beiden aktiven Zentren mit COX- und Peroxidase-Aktivität am C-terminalen Ende<sup>[80]</sup>.

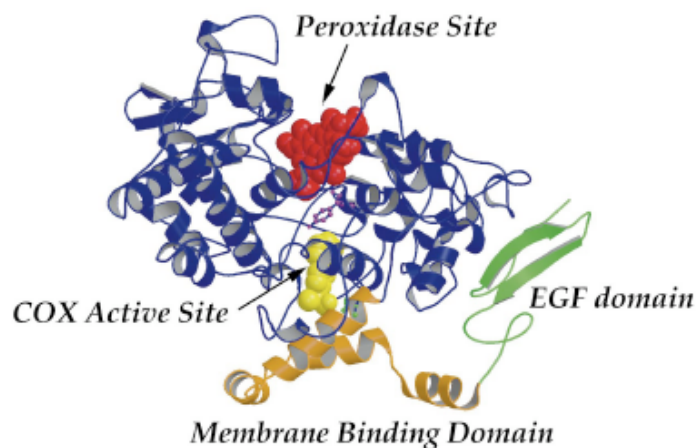


Abb. 4.1 Proteinstruktur vom COX-1-Monomer (ovine)<sup>[81]</sup>

Der Zugang zur Bindungstasche des Enzyms erfolgt von der Membranseite aus und ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

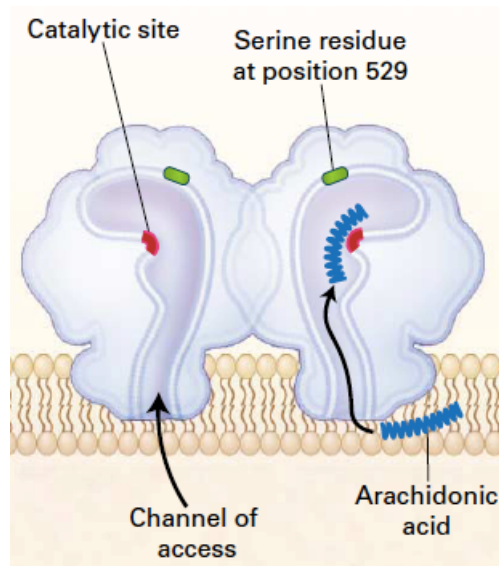


Abb. 4.2 schematische Darstellung der COX<sup>[82]</sup>

Arachidonsäure ist in veresterter Form ein wichtiger Lipidbestandteil von Zellmembranen und wird durch die Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Membran freigesetzt. Das so entstandene Substrat der COX kann direkt von der Membranseite durch den lipophilen Eingangskanal zum aktiven Zentrum gelangen und dort weiter in die verschiedenen Prostaglandine umgewandelt werden.

Wichtig für den Beginn der Reaktion ist eine neben der Bindungsstelle für Arachidonsäure lokalisierte Hämgruppe. Das Eisen(III) dieser Hämgruppe wird zunächst durch endogene Peroxide zu einem Radikalkation (Ferryl-oxo-(FeIV)-protoporphyrin Radikal) oxidiert. Nun kann ein Elektronentransfer über das Porphyrin-Ringsystem zum Tyrosin-385 im katalytischen Zentrum des Enzyms stattfinden. Das Tyrosin-Radikal initiiert die Cyclooxygenase-Reaktion, indem es ein Wasserstoff vom C<sub>13</sub> der Arachidonsäure abstrahiert. Durch die nun anschließende Addition von 2 Molekülen Sauerstoff an die Arachidonsäure erfolgt die Freisetzung des cyclischen Endoperoxids Prostaglandin G<sub>2</sub>. Durch abschließende Peroxidasereaktion erfolgt die Reduktion zum Prostaglandin H<sub>2</sub>, welches durch Isomerasen in die verschiedenen Prostaglandine und Thromboxan A<sub>2</sub> umgewandelt werden kann<sup>[83]</sup>.

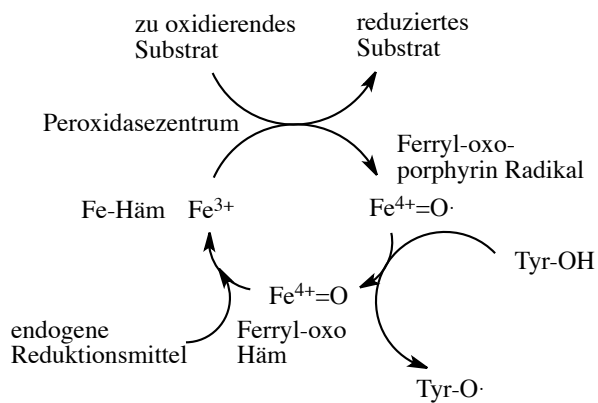


Abb. 4.3 Funktion des Häm bei der Peroxidase-Reaktion

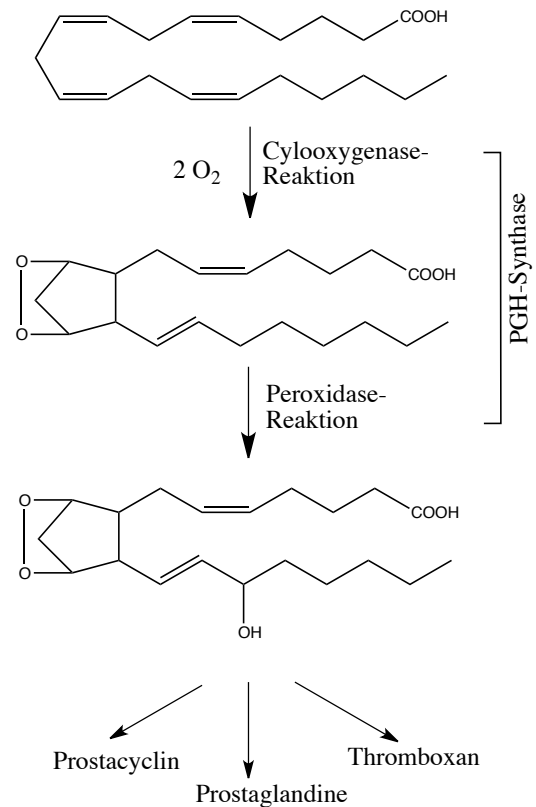


Abb. 4.4 Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen<sup>[84]</sup>

## 4.2 Isoenzyme der Cyclooxygenase

Isoenzyme sind Enzyme unterschiedlicher Aminosäuresequenz, die die selbe Reaktion katalysieren. Sie setzen die gleichen Substrate um, jedoch mit unterschiedlicher Aktivität. Ebenfalls unterschiedlich ist ihr Verhalten gegenüber Aktivatoren, Inhibitoren und Substratanaloga<sup>[85]</sup>. Das Wissen über die Existenz verschiedener Isoenzyme bei der COX liegt noch nicht allzu lang zurück. Erst durch die Arbeitsgruppe Needleham wurde 1990 eine der Isoformen entdeckt<sup>[86]</sup>, worauf die Einteilung in COX-1 und COX-2 erfolgte. Die Übereinstimmung von 61% in ihrer Aminosäuresequenz zeigt die Ähnlichkeit beider Enzyme. Während die COX-1 eine Sequenz von 576 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 71kDa aufweist, besteht die COX-2 aus 604 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 74kDa<sup>[87]</sup>. Wesentliche strukturelle Unterschiede besitzen die beiden Enzyme in der Aminosäuresequenz der Bindungstaschen. In der COX-1 wird der Eingangskanal durch die Aminosäuren Isoleucin(523), Histidin(513) und Isoleucin(434) begrenzt. In der COX-2 handelt es sich an gleicher Stelle um Valin(523), Arginin(513) und Valin(434). Da das Isoleucin(523) der COX-1 um eine Methylgruppe größer ist als das Valin(523) der COX-2, ergibt sich ein etwas

größerer Eingangskanal der COX-2 (Abb. 4.5). Durch die Synthese von räumlich anspruchsvollen COX-Inhibitoren kann darüber eine COX-2-Selektivität vermittelt werden<sup>[88]</sup>.

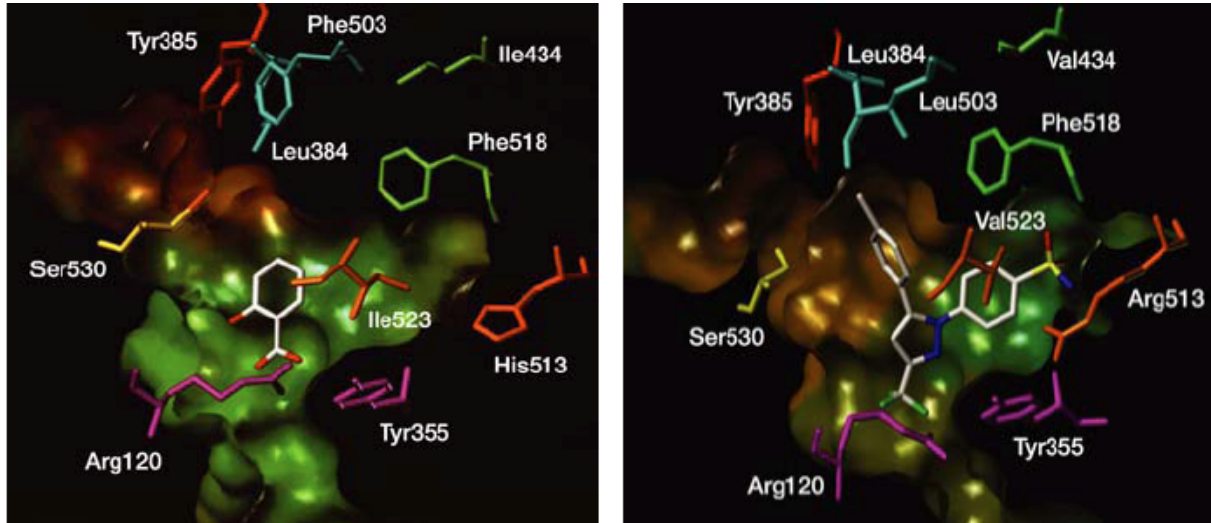


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der hydrophoben Bindungskanäle von COX-1 (links) mit dem Inhibitor Acetylsalicylsäure und COX-2 (rechts) mit dem Inhibitor Celecoxib<sup>[89]</sup>

Neben strukturellen Variationen spielen auch Unterschiede in Vorkommen und Expression der Enzyme eine wichtige Rolle. So spricht man bei der COX-1 von einem konstitutiv exprimierten Enzym, welches in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt und dort an physiologischen Reaktionen beteiligt ist. Die Bildung des Enzyms erfolgt im endoplasmatischen Reticulum. Die COX-2 dagegen ist ein induzierbares Enzym, dessen Expression durch Entzündungsprozesse im Körper hochreguliert wird und das vor allem für die Synthese von Prostaglandinen bei pathophysiologischen Vorgängen verantwortlich gemacht wird. Neben der Lokalisation im endoplasmatischen Reticulum kann die COX-2 auch in der Kernmembran gebildet werden<sup>[90]</sup>.

Neben den schon genannten Cyclooxygenasen 1 und 2 existiert ein weiteres Isoenzym, welches als COX-3 bezeichnet wird. Im Jahr 2002 gelang der Arbeitsgruppe um Simmons die Isolation der COX-3 aus dem cerebralen Cortex eines Hundes<sup>[91]</sup>. Heute weiß man, dass die COX-3 auf dem gleichen Gen wie der COX-1 kodiert ist. Durch posttranskriptionale Veränderungen entsteht dann die Splicevariante der COX-3. Die Expression des Isoenzym erfolgt vor allem im ZNS. Dadurch gelingt die Erklärung pharmakologischer Effekte von Paracetamol und anderen NSAR, die nur schwache Inhibitoren von COX-1 und 2 sind, aber leicht ins ZNS penetrieren können<sup>[92]</sup>.



## 4.3 Funktionen der Prostaglandine

### 4.3.1 Physiologische Funktionen

Die Funktionen der Prostaglandine als Gewebshormone sind sehr vielfältig. So spielen sie z.B. eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung durch Aktivierung oder Hemmung der Thrombozytenaggregation. Während  $\text{PGI}_2$  hemmende Eigenschaften aufweist, führt Thromboxan  $\text{A}_2$  zur Aktivierung der Thrombozyten. Des Weiteren beeinflussen sie die Kontraktion und Relaxation von extravaskulärer glatter Muskulatur. Als Beispiel können erhöhte Spiegel von Prostaglandinen während des Geburtsvorganges angeführt werden, die für die Uteruskontraktion verantwortlich sind. Auch die Steuerung der Nierenfunktion unterliegt dem Einfluss der Prostaglandine.  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGD}_2$  können den renalen Blutfluss steigern und damit zu vermehrter Harnausscheidung führen. Ebenfalls bekannt sind gastroprotektive Effekte durch eine erhöhte Durchblutung der Mucosa, eine gehemmte Salzsäureproduktion und erhöhte Bicarbonat- und Schleimsekretion<sup>[93]</sup>.

### 4.3.2 Pathophysiologische Funktionen

Eine große Rolle spielen die Prostaglandine bei der Beeinflussung von Schmerz- und Entzündungsprozessen im Körper. Die Verstärkung des Schmerzempfindens erfolgt durch Überführung von schwer erregbaren Nozizeptoren im geschädigten Gewebe zu leicht erregbaren. Dabei werden vor allem tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle in ihrer Aktivierungsschwelle herabgesetzt. Desweiteren führen Prostaglandine zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Dadurch können Zellen des Immunsystems und andere Entzündungsmediatoren wie Histamin und Bradykinin leicht ins entzündete Gewebe eindringen. Folgen sind Schwellung, Rötung und Schmerz. Ebenfalls beeinflusst wird die Körpertemperatur. Eine erhöhte Konzentration des  $\text{PGE}_2$  im Hypothalamus kann die Temperatur des Körpers beeinflussen und Fieber hervorrufen. Neuere Erkenntnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen erhöhter COX-2-Expression und der Entstehung sowie Progression von Tumoren<sup>[12]</sup>. Dabei stimulieren Prostaglandine unter anderem das Zellwachstum, erhöhen die Resistenz der Zellen gegenüber apoptotischen Signalen<sup>[94]</sup>, fördern die Angiogenese und erhöhen die Genexpression der Aromatase<sup>[95]</sup>.

#### 4.4 Testsystem

Bei der Quantifizierung des inhibitorischen Potenzials der Zeise-Verbindungen wurde ein käuflich erwerbbares Fertig-Kit der Firma Cayman Chemicals verwendet. Dabei wird zunächst die zu untersuchende Substanz mit der Cyclooxygenase 1 bzw. 2 inkubiert und anschließend Arachidonsäure hinzugegeben. In Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der zu untersuchenden Substanz auf die COX wird die Arachidonsäure in das Prostaglandin  $\text{PGH}_2$  umgewandelt. Da dieses für die Quantifizierung zu instabil ist, erfolgt durch Zugabe von  $\text{SnCl}_2$  die Reduktion zum stabileren  $\text{PGF}_2\alpha$ . Die Quantifizierung erfolgt über einen Enzym-Immunoassay (EIA). Dafür wird eine Platte verwendet, die auf dem Boden mit monoklonalen Mausantikörpern versehen ist. Pro Well wird nacheinander die Probe ( $\text{PGF}_2\alpha$ ), ein Tracer (= ein mit Acetylcholinesterase gelinktes Prostaglandin) und ein Prostaglandin-Antiserum (=spezifische Antikörper gegen Prostaglandine) pipettiert. Daraus ergibt sich eine Konkurrenz des  $\text{PGF}_2\alpha$  aus der Probe und dem Tracer um die begrenzten PG-Antikörper. Die Prostaglandin-Antikörper-Konjugate binden wiederum an die sich am Boden befindlichen Mausantikörper. Durch Waschen der Platte werden ungebundene Prostaglandine entfernt. Nun erfolgt die Zugabe von Ellmann's Reagenz, welches Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure enthält. Acetylthiocholin ist das Substrat der Acetylcholinesterase und wird in Thiocholin gespalten, welches wiederum mit der 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure zur 5-Thio-2-nitrobenzoesäure reagiert, die auf Grund ihrer gelben Farbe bei 415nm UV-photometrisch quantifiziert werden kann (Abb. 4.6).

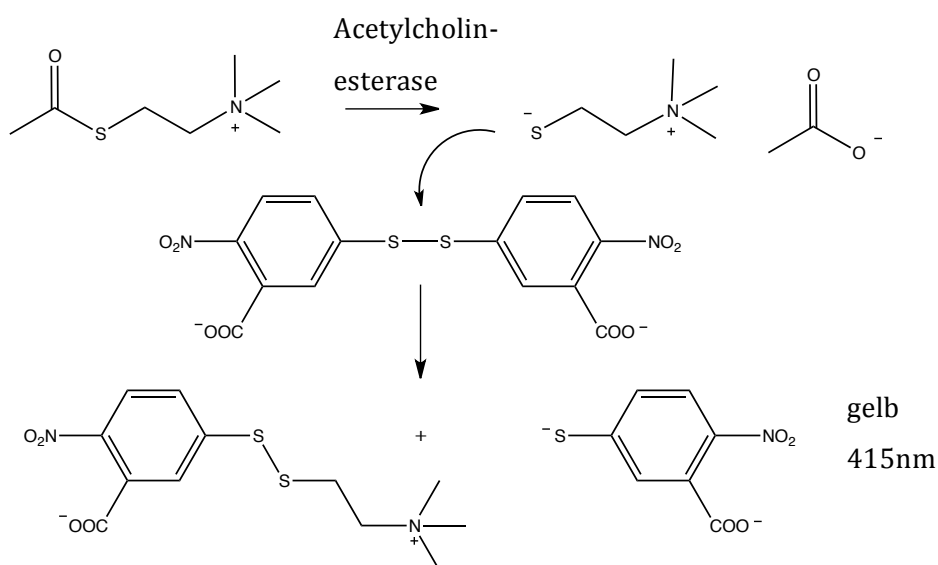


Abb. 4.6 Reaktion zur Farbentwicklung im COX Inhibitor Screening Assay Kit

#### 4.4.1 Probleme des Testsystems

Die im Assay verwendeten Enzymlösungen sind mit Diethyldithiocarbamat (DDC) stabilisiert. Dabei handelt es sich um eine Thiol-Verbindung, deren wichtigste Aufgabe der Oxidationsschutz der Enzyme ist. Durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid wird das DDC zum Beispiel zum Disulfiram reduziert<sup>[96]</sup>. Desweiteren ist die Komplexierung von Metallionen wie Mangan, Kupfer und Zink bekannt, mit dessen Eigenschaft Enzyme wie z.B. die Superoxiddismutase gehemmt werden<sup>[97]</sup>. Die Funktion des DDC als Stabilisierungsreagenz bei der Prostaglandin-H-Synthase wurde eingehend untersucht<sup>[98]</sup>. Dabei ist DDC zunächst nur während der Isolierung, Aufarbeitung und Lagerung des Enzyms zugesetzt worden. Für Untersuchungen an dem Enzym wurde das Stabilisierungsreagenz lange Zeit entfernt. Absorptionsmessungen der Cyclooxygenase über die Zeit zeigten jedoch Veränderungen innerhalb kürzester Zeit, was zu stark schwankenden Messergebnissen führte. In Abwesenheit von DDC unterliegt das Enzym einer schnellen Inaktivierung in Gegenwart von Hydroperoxiden und Arachidonsäure<sup>[99]</sup>. Heute weiß man, dass die Enzymaktivität in Anwesenheit von DDC nicht beeinflusst wird und somit auf die Entfernung verzichtet werden kann. Das DDC reagiert mit den oxidierten Intermediaten des Enzyms und fungiert so als reduzierendes Agens<sup>[100]</sup>.

Die Fähigkeit Metallionen komplexieren zu können, könnte bei der Testung der Platinkomplexe zu einem Problem werden. Die hohe Affinität von Platinverbindungen zu schwefelhaltigen Substanzen ist ausreichend bekannt<sup>[101][102]</sup>. In einem Vorversuch wurde daher die Reaktion der Zeise-anaologen Komplexe mit Natrium-diethyldithiocarbamat untersucht. Abb. 4.7 zeigt die UV-Spektren der beiden Edukte. Die schwarze Linie stellt das Spektrum des But-ASS-Zeise-Komplexes dar. Bei 305nm zeigt sich ein kleines Absorptionsmaximum, welches typisch für Platinkomplexe ist. Das Absorptionsmaximum bei 272nm kann dem Chromophor des Acetylsalicylsäureliganden zugeordnet werden. Das DDC (rote Linie) zeigt ebenfalls 2 Absorptionsmaxima bei 268nm und bei 293nm. Unmittelbar nach Zugabe von DDC zum Platinkomplex wurde erneut ein UV-Spektrum aufgenommen. Dabei zeigt sich ein neues Absorptionsmaximum bei 345nm. Das dem Acetylsalicylsäureliganden zugeordnete Absorptionsmaximum bei 272nm bleibt bestehen. Als Lösungsmittel wurde bei allen vermessenen Lösungen DMF verwendet. Aufgrund der Eigenabsorption des Lösungsmittels wurde auf eine Darstellung von 200-250nm verzichtet.

Um die Identität des neu entstandenen Komplexes zu klären, wurde dieser aus der Lösung isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht.

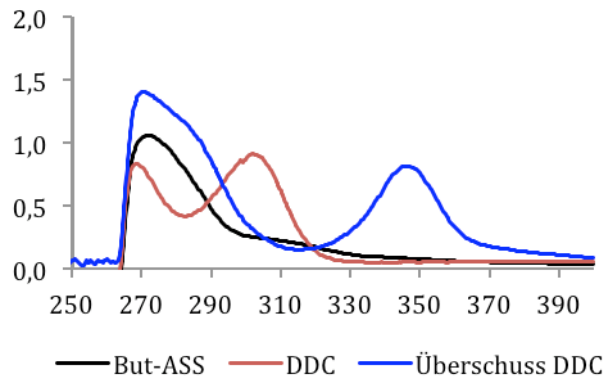


Abb. 4.7 UV-Spektrum von a) But-ASS-Zeise (schwarz), b) DDC (rot) und c) unmittelbar nach Zugabe von DDC zu dem Platinkomplex (blau)

Das NMR-Spektrum (Abb. 4.8) zeigt eindeutig nur Protonen, die dem DDC zugeordnet werden können. Durch die Reaktion mit dem Stabilisierungsreagenz wurde die Olefinkomponente am Platin verdrängt. So wird deutlich, dass es sich bei dem aufgenommenen UV-Spektrum (Abb. 4.7 blaue Linie) um ein additives Spektrum aus dem Acetylsäureliganden und dem DDC-Platin Komplex handelt. Schon 1992 war es gelungen, von dem DDC-Platinkomplex eine Kristallstruktur aufzunehmen (Abb. 4.8).

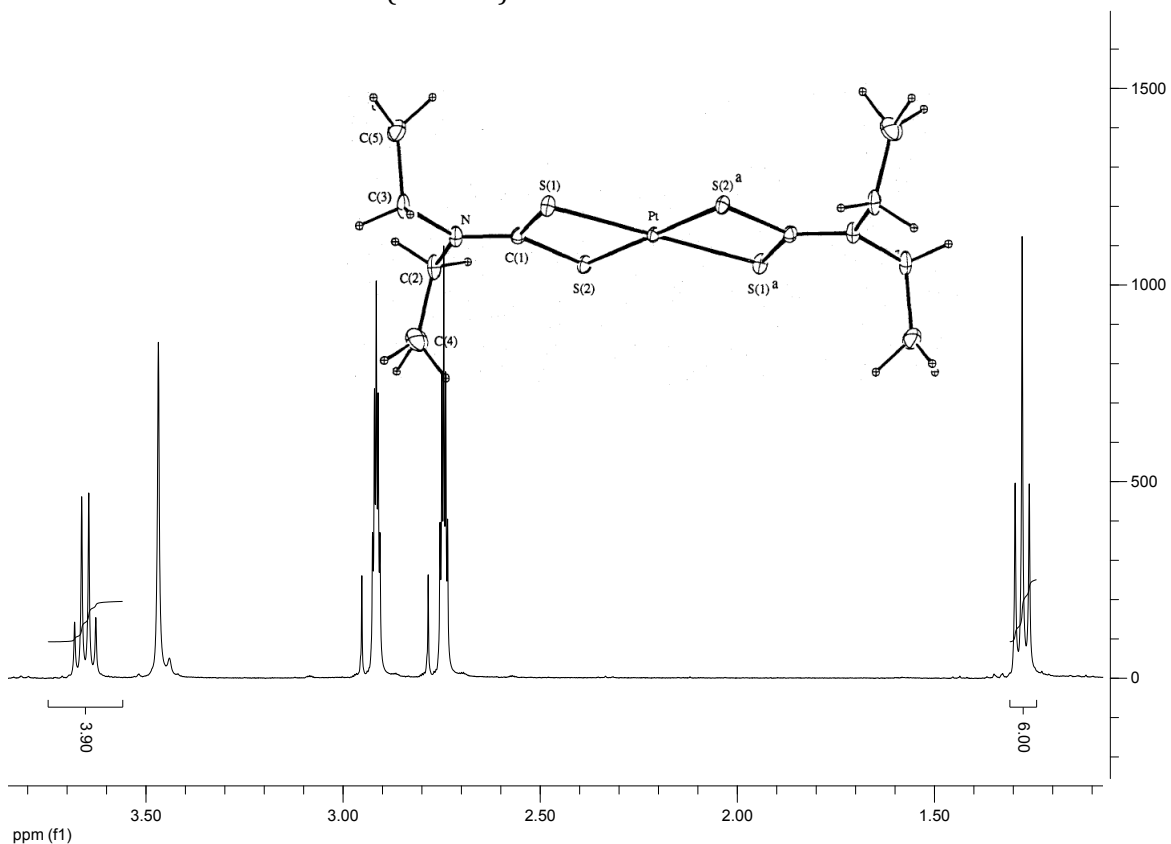


Abb. 4.8 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in DMF und Kristallstruktur von Bisdietyldithiocarbamato Pt(II)<sup>[103]</sup>

Um zu sehen, welchen Einfluss das DDC im COX-Assay auf die Platinkomplexe hat, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dazu ist COX-1-Lösung mit But-Cele-Zeise 10min bei 37°C inkubiert worden. Das But-Cele-Zeise besitzt den großen Vorteil, dass mittels Continuum Source-AAS sowohl Platin als auch Fluor quantitativ erfasst werden können. Nach Inkubation erfolgte die Abtrennung des Enzyms durch Zentrifugieren über eine Membran, die alle Moleküle größer 10kDa zurückhält. Im Filtrat sollten sich daher alle Komplexe und Salze befinden, während das Enzym auf der Membran verbleibt. Die sich auf der Filtermembran befindende Cyclooxygenase wird mit Wasser aufgenommen.

Wenn während der Inkubation der DDC-Platinkomplex entstanden ist, so würde man im Filtrat mittels AAS zum einen Platin aus dem DDC-Platinkomplex und zum anderen Fluor aus dem vom Platin verdrängten But-Cele-Liganden quantitativ bestimmen können. Die Wiederfindung des Platins erfolgte zu 5% im Filtrat und zu 76% in der wässrigen COX-Lösung. Ebenfalls erfolgte die Bestimmung der Wiederfindung von Fluor. Hier wurde kein Fluor im Filtrat gefunden und 60% in der COX-Lösung. Der jeweilige Verlust an Fluor und Platin könnte durch Adsorption an der Filtermembran erklärt werden.

Der Versuch wurde leicht variiert noch einmal durchgeführt. Vor Inkubation von Enzym und But-Cele-Zeise wurde das DDC durch Zentrifugation über die 10kDa Membran entfernt. Die DDC-freie COX wurde in Wasser aufgenommen und mit dem Komplex inkubiert. Es folgte die erneute Zentrifugation und anschließende Bestimmung von Fluor und Platin sowohl im Filtrat als auch in der COX. Die ermittelte Verteilung beider Atome bestätigt die Ergebnisse des ersten Versuchs. Im Filtrat konnte erneut kein Fluor und nur 5% Platin gefunden werden. In der COX-Lösung befanden sich 74% Fluor und 61% Platin.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass unter den Bedingungen des Assays anscheinend kein DDC-Platinkomplex gebildet wurde. Viel mehr entsteht der Eindruck, dass der But-Cele-Zeise-Komplex mit der Cyclooxygenase wechselwirkt – vielleicht sogar kovalent gebunden hat.

Um ganz sicher zu gehen, dass die ermittelte COX-Hemmung nicht durch einen DDC-Platinkomplex hervorgerufen wird, wurde dieser an beiden Isoenzymen in einer Konzentration von 10µM getestet. Dabei zeigt er nur ein geringes inhibitorisches Potenzial (Tabelle 4.1).

<b>Platin-Komplex</b>	<b>COX-1-Hemmung bei 10 µM [%]</b>	<b>COX-2-Hemmung bei 10 µM [%]</b>
Bisdietyldithiocarbamato Pt(II)	18	20

Tabelle 4.1 COX-Hemmung vom DDC-Platin Komplex

#### 4.5 Einfluss der Platinkomplexe auf die Enzymaktivität an isolierten Cyclooxygenasen

Das Konzept, die meist zytotoxischen Eigenschaften von Metallkomplexen mit der COX-Hemmung von NSAR zu verbinden, ist in der Arbeitsgruppe Gust kein neuer Ansatz. Erste vielversprechende Verbindung war das Co-ASS. Es zeigte ähnlich zytotoxische Effekte wie Cisplatin und eine COX-Hemmung, die das inhibitorische Potenzial des reinen NSAR übertrifft. Vor allem an der COX-2 konnte durch die Komplexbildung ein deutlich gesteigerter Effekt erzielt werden<sup>[104]</sup>.

Ausgehend vom Co-ASS wurde in weiteren Arbeiten des Arbeitskreises die Metallkomponente ausgetauscht (Abb. 4.9). Entstehende neutrale Komplexe mit Ruthenium als Metallkomponente zeigten ein ähnlich starkes Potenzial, die Cyclooxygenasen zu hemmen (Tabelle 4.2). Die Komplexbildung von Eisen hatte dagegen einen Verlust der COX-Hemmung zur Folge<sup>[105]</sup>. Ein weiterer Nachteil dieser Verbindungen ist ihre schlechte Löslichkeit begründet durch die sehr hohe Lipophilie. Um diese Eigenschaften zu verbessern wurden geladene Metallkomplexe synthetisiert. Positiv geladene Komplexe wurden durch die Verwendung von Silber als Metallion erhalten, für negativ geladene Komplexe griff man auf Platin zurück. Auf diese Weise entstand das Prop-ASS-Zeise, welches als Leitstruktur dieser Arbeit dient. Durch die Komplexbildung der Acetylsalicylsäure am Platin kann die Hemmung der COX-1 im Vergleich zum Co-ASS gesteigert werden. Bei einer Testkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  hemmt das Co-ASS die Aktivität um 39%, während bei dem Platinkomplex eine vollständige Inaktivierung zu beobachten ist (Tabelle 4.2). Bei der Quantifizierung der COX-2-Aktivität zeigt das Enzym eine höhere Aktivität beim Platinkomplex.

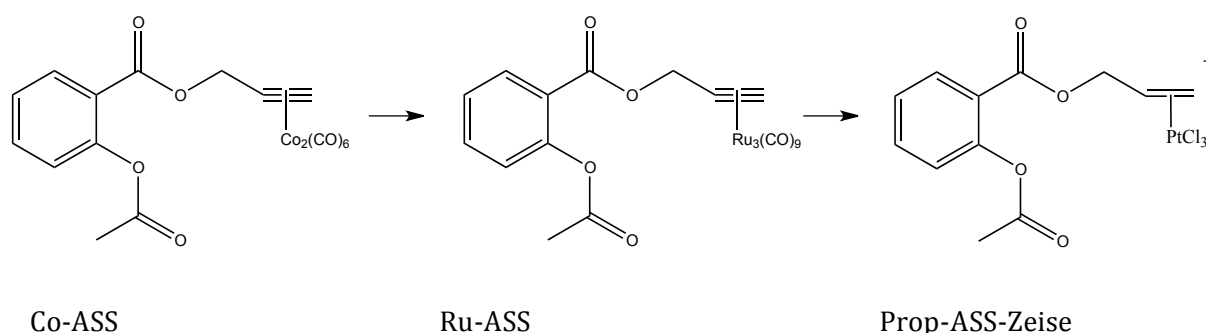


Abb. 4.9 vom Co-ASS zu NSAR-Zeise-Verbindungen

getestete Verbindung	COX-1 Hemmung bei 10 $\mu$ M [%]	COX-2 Hemmung bei 10 $\mu$ M [%]
ASS	29	1
Co-ASS	37	58
Ru-ASS	43	33
Prop-ASS-Zeise	100	39

Tabelle 4.2 COX-Hemmung verschiedener ASS-Metall-Komplexe im Vergleich zu ASS

Ausgehend vom Prop-ASS-Zeise wurde nun das NSAR als Ligand am Platinzentrum variiert, um zu schauen, ob die Hemmung der Cyclooxygenasen noch weiter verstärkt oder sogar eine Selektivität hinsichtlich einer Isoform des Enzyms erhalten werden kann.

#### 4.5.1 unselektive NSAR-Liganden

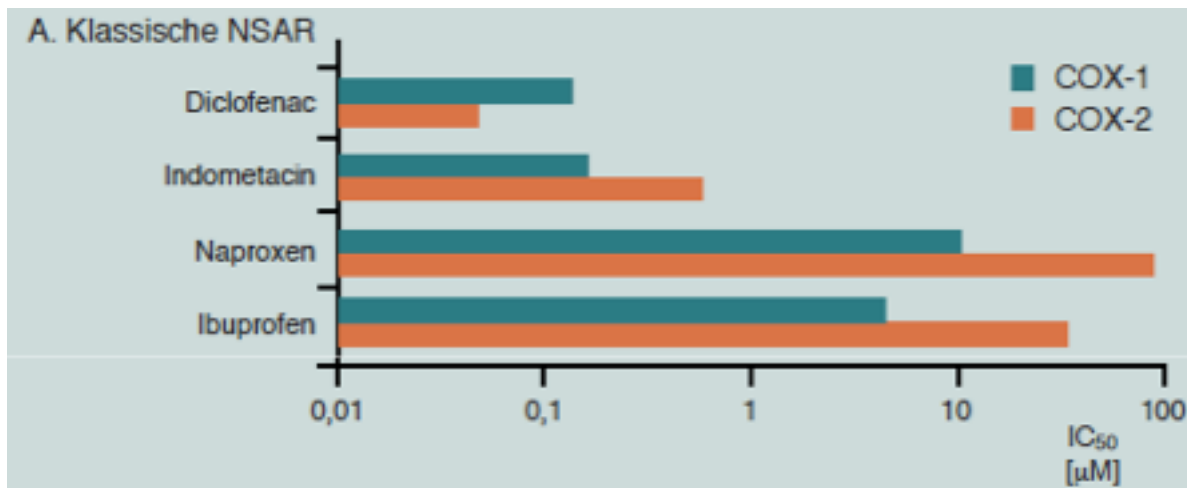


Abb. 4.10 IC<sub>50</sub>-Werte für klassische NSAR bei der COX-1- und COX-2-Inhibition (Endotoxin-induzierte PGE<sub>2</sub>-Produktion unter Verwendung von humanem Vollblut)<sup>[106]</sup>

Als Liganden wurden Naproxen und Ibuprofen ausgewählt, die in ihrer Fähigkeit, die COX zu hemmen, der Acetylsalicylsäure ähnlich sind. Mit Indometacin steht ein stärkerer COX-Inhibitor zur Verfügung. Alle haben die Gemeinsamkeit stärkere Inhibitoren an der COX-1 als an der COX-2 zu sein. Das Diclofenac nimmt durch seine leichte COX-2-Präferenz bei den klassischen NSAR eine Sonderstellung ein (Abb. 4.10).

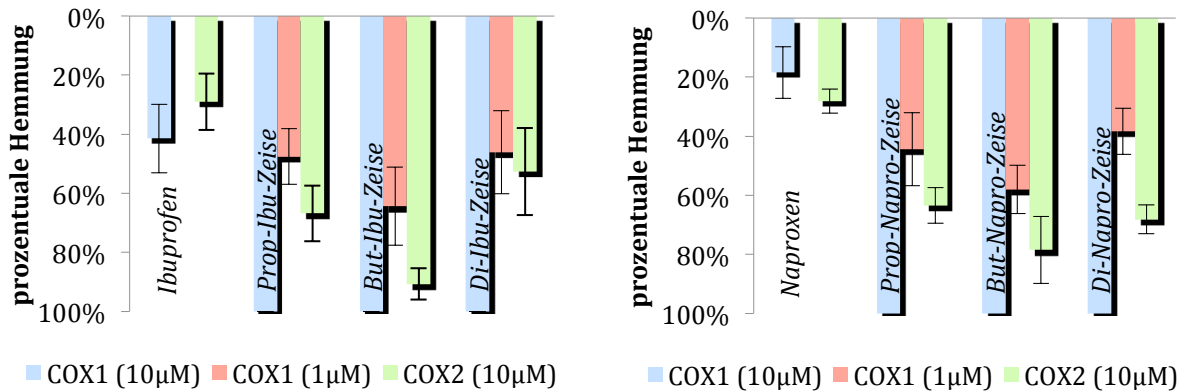


Abb. 4.11 COX-Hemmung von Ibuprofen und den entsprechenden Ibuprofen-Zeise-Komplexem (links) und Naproxen mit den entsprechenden Naproxen-Zeise-Komplexen (rechts), dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  sdv,  $n \geq 4$

Schaut man sich Abb. 4.11 an, so stellt man fest, dass in beiden Fällen die untersuchten Platinkomplexe dem reinen NSAR vor allem an der COX-1 überlegen sind. Wie schon beim ASS beschrieben, zeigt sich bei einer Testkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  an der COX-1 eine vollständige Inaktivierung des Enzyms. Um die Hemmung des Enzyms zu quantifizieren und einen Vergleich der Platinkomplexe untereinander ermöglichen zu können, wurden sie an der COX-1 mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  getestet. Dabei zeigt sich sowohl bei den Ibu-Zeise-Komplexen als auch bei den Napro-Zeise-Komplexen, dass der But-NSAR-Zeise-Komplex die größte Hemmung zur Folge hat. Dieser Trend lässt sich ebenfalls bei der Hemmung an der COX-2 feststellen. Auch hier sind die Platinkomplexe, verglichen mit dem reinen NSAR, potenter. Obwohl bekannt ist, dass die Prop-NSAR-Zeise-Komplexe eine hohe Instabilität in wässrigen Umgebungen aufweisen, wurden sie dennoch getestet. Die Inkubationszeit beträgt nur 10min und liegt damit unterhalb der ermittelten Halbwertszeiten (siehe Kapitel 3.1). So kann vermutet werden, dass die Hauptwirkung durch den Platinkomplex hervorgerufen wird und nicht durch seine Spaltprodukte.

Beim Indometacin und den Indo-Zeise-Komplexen zeigen sich etwas andere Effekte. Die noch bei Ibuprofen und Naproxen festgestellte Überlegenheit der Platinkomplexe gegenüber dem reinen NSAR kann beim Indometacin durch die Komplexbildung von Platin nicht erreicht werden (Abb 4.12 links). Sowohl an COX-1 als auch an COX-2 ist das Indometacin der stärkere Inhibitor. Der Vergleich der 3 Indo-Zeise-Komplexe untereinander bestätigt, dass die But-NSAR-Verbindung die größte Hemmung aufweist.

Insgesamt zeigen die Indo-Zeise-Komplexe eine höhere Aktivität an beiden Isoenzymen im Vergleich zu den Ibu-Zeise- und Napro-Zeise-Komplexen.



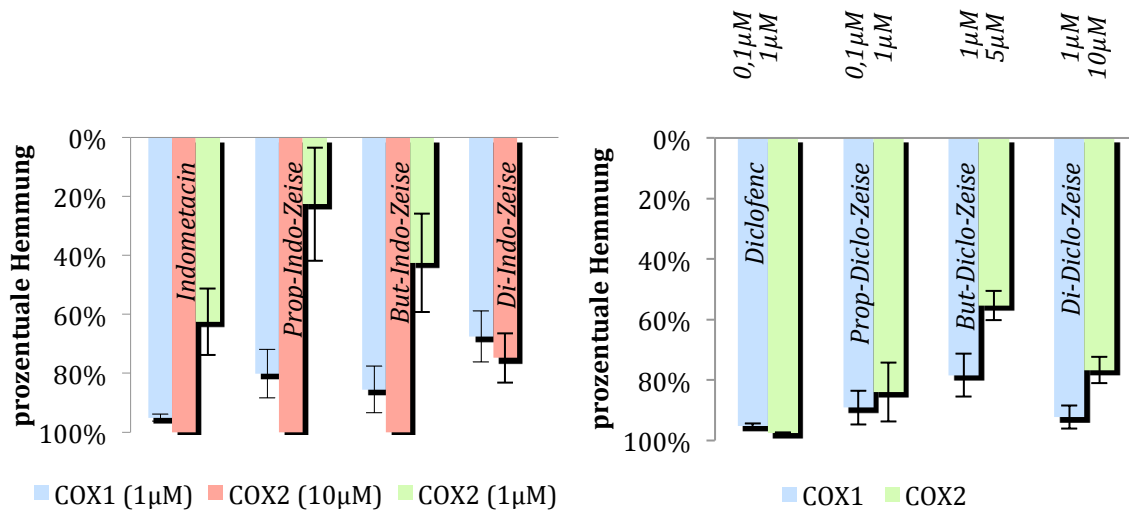


Abb. 4.12 COX-Hemmung von Indometacin und den entsprechenden Indometacin-Zeise-Komplexen (links) und Diclofenac mit den entsprechenden Diclofenac-Zeise-Komplexen (rechts), dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  sdv,  $n \geq 4$

Auch bei der Untersuchung der Diclo-Zeise-Komplexe kommen diese nicht an die Hemmung des reinen NSAR heran (Abb 4.12 rechts). Der Prop-Diclo-Zeise-Komplex zeigt eine ähnlich starke Wirkung wie Diclofenac. Da bisher aber der But-NSAR-Komplex die höchste Hemmung zeigte, könnte hier die Instabilität des Prop-Diclo-Zeise die Ursache sein. Eine additive Hemmung von Prop-Diclo-Zeise und aus der Spaltung entstehendem Diclofenac könnte an dieser Stelle diskutiert werden. Die aus der Literatur bekannte COX-2 Präferenz des Diclofenacs konnte mit diesem Testsystem nicht ermittelt werden. Gründe könnten hier in der Enzymauswahl liegen. Bei der COX-1 handelt es sich um ein aus Schafen isoliertes Enzym, während es sich bei der COX-2 um ein human rekombinantes Enzym handelt.

Nimmt man die aus der Literatur bekannten  $IC_{50}$ -Werte, die an oviner COX-1 und human rekombinanter COX-2 ermittelt wurden, so bewegen sich die hier erhaltenen Daten in der gleichen Größenordnung<sup>[107][108]</sup>.

Um zu sehen, welchen Einfluss die Derivatisierung an der Säurefunktion der NSAR zur Folge hat, wurden auch die Liganden an beiden Isoenzymen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Die meisten klassischen NSAR sind charakterisiert durch das Vorhandensein einer Säurefunktion und ein bis mehreren aromatischen Ringen. Ziel ist es, das natürliche Substrat, die Arachidonsäure, in ihren Strukturmerkmalen zu imitieren. Durch Derivatisierung an der Säurefunktion fällt der hydrophile Bereich der NSAR weg. Eine verminderte Affinität zur Enzymbindungsstasche und damit verringerte Hemmwirkung wäre zu erwarten.

Ligand	COX-1-Hemmung [%] ± sdv	COX-2-Hemmung [%] ± sdv	Ligand	COX-1-Hemmung [%] ± sdv	COX-2-Hemmung [%] ± sdv
<b>Ibuprofen</b>	38 ± 0,09	30 ± 0,09	<b>Indometacin</b>	95 ± 0,01*	61 ± 0,09*
<b>Prop-Ibu</b>	42 ± 0,11	25 ± 0,14	<b>Prop-Indo</b>	36 ± 0,10	40 ± 0,14
<b>But-Ibu</b>	31 ± 0,08	22 ± 0,10	<b>But-Indo</b>	26 ± 0,10	13 ± 0,11
<b>Di-Ibu</b>	17 ± 0,16	31 ± 0,10	<b>Di-Indo</b>	27 ± 0,03	33 ± 0,02
<b>Naproxen</b>	16 ± 0,07	27 ± 0,02	<b>Diclofenac</b>	98 ± 0,01**	95 ± 0,01*
<b>Prop-Napro</b>	32 ± 0,04	50 ± 0,08	<b>Prop-Diclo</b>	36 ± 0,10	22 ± 0,15
<b>But-Napro</b>	22 ± 0,13	32 ± 0,07	<b>But-Diclo</b>	23 ± 0,17	17 ± 0,20
<b>Di-Napro</b>	23 ± 0,03	28 ± 0,16	<b>Di-Diclo</b>	27 ± 0,02	17 ± 0,06

Tabelle 4.3 Übersicht über die COX-Hemmung der Liganden an beiden Isoenzymen, getestet bei einer Konzentration von 10µM, \* Testkonzentration 1µM, \*\* Testkonzentration 0,01µM

Bei den Ibuprofen-Derivaten zeigt sich beim Prop-Ibu nahezu das gleiche inhibitorische Potenzial wie beim Ibuprofen. Eine geringe Abnahme ist beim But-Ibu an beiden Isoenzymen im Vergleich mit Ibuprofen zu sehen. Die Testung des dimeren Ibuprofen-Derivats zeigt einen deutlichen Verlust der Hemmung an COX-1, ist aber an der COX-2 genauso potent wie das Ibuprofen. Da die Bindungstasche der COX-1 im Vergleich zur COX-2 durch die veränderte Aminosäuresequenz viel kleiner ist, kann wahrscheinlich die dimere Verbindung keinen Zugang zur aktiven Seite des Enzyms finden. Dennoch fällt die erwartete Abnahme, gerade von Prop-Ibu-Zeise und But-Ibu-Zeise, nicht so stark aus. Bekannt ist die Interaktion der Säurefunktion der NSAR mit dem Arginin120, die vor allem in der COX-1 wichtig für die Orientierung der NSAR in der Bindungstasche ist. Die hier erhaltenen Ergebnisse erwecken den Eindruck, dass diese Koordinationsstelle nur einen geringen Einfluss auf die Hemmung des Enzyms hat, da die Säurefunktion in allen Fällen als Ester inaktiviert vorliegt. Ähnliche Effekte zeigen auch die Liganden der Naproxenester im Vergleich zum Naproxen.

Viel deutlicher ist dagegen die Abnahme der Hemmung bei der Derivatisierung von Diclofenac und Indometacin. Die Veresterung des Indometacins führt zum deutlichen Verlust der Hemmung von COX-1 (von 95% bei 1µM für Indometacin auf 26% bei 10µM für But-Indo-Zeise). An der COX-2 scheint die Derivatisierung keinen so großen Einfluss zu spielen, woraus sich bei den synthetisierten Liganden eine COX-2-Präferenz ergibt. Als Ursache wird die nicht so essentielle Interaktion mit dem Arginin120 in der COX-2 gesehen<sup>[109][110]</sup>. Das Diclofenac zeigt in der Bindungstasche im Vergleich zu den anderen NSAR eine andere räumliche Orientierung. Die Carboxylfunktion ist hier nicht zum Arginin120 orientiert, sondern das Molekül liegt um 180° gedreht in der Bindungstasche und interagiert mit dem Tyrosin 385 (Abb 4.13). Die veränderte

Raumorientierung und der dadurch gesteigerte Platzbedarf im aktiven Zentrum sind auch der Grund für die leichte COX-2-Präferenz des Diclofenacs.

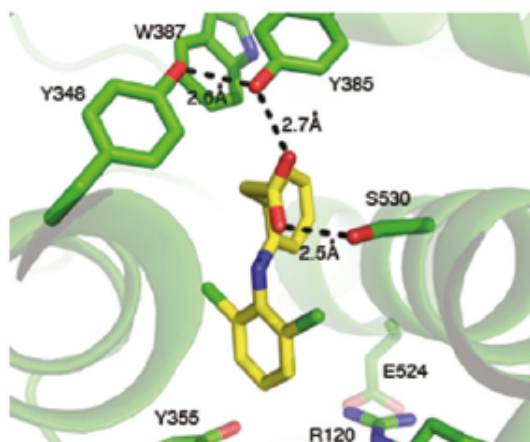


Abb. 4.13 räumliche Orientierung des Diclofenacs in der COX-1<sup>[111]</sup>

#### 4.5.2 COX-2-selektive Liganden

Als COX-2-selektive Liganden wurden zum einen das Celecoxib und zum anderen 2 Diarylacrylsäurederivate verwendet.

Verbindung	Konz. COX-1 μM	COX-1-Hemmung in % ± sdv	Konz. COX-2 μM	COX-2-Hemmung in % ± sdv
Celecoxib	10	17 ± 0,08	0,05	82 ± 0,06
But-Cele	10	18 ± 0,04	10	96 ± 0,07
But-Cele-Zeise	1	89 ± 0,06	1	34 ± 0,11
Phenacrylsäure	1	keine Hemmung	1	12 ± 0,10
But-Phenacryl	10	8 ± 0,13	10	8 ± 0,02
But-Phenacryl-Zeise	1	89 ± 0,03	1	28 ± 0,08
Br-Phenacrylsäure	10	19 ± 0,08	1	16 ± 0,19
But-Br-Phenacryl	10	22 ± 0,04	10	38 ± 0,15
But-Br-Phenacryl-Zeise	1	75 ± 0,02	1	26 ± 0,06

Tabelle 4.4 Übersicht der COX-Hemmung von bekannten COX-2-Inhibitoren, deren Ester und Zeise-analogen Platin-Komplexe

Das Celecoxib ist ein COX-2-Hemmer, der am Markt als Celebrex® erhältlich ist. Seine Selektivität für das Isoenzym 2 kann eindeutig mit den in Tabelle 4.4 gemessenen Werten

gezeigt werden. Die Aufoxidation der Methylgruppe des Celecoxibs und anschließende Veresterung zum But-Cele führt zu einer schlechteren COX-2-Hemmung. Durch die darauf folgende Komplexierung am Platin kann das Enzym im Vergleich zu But-Cele sowohl bei der Isoform 1 als auch 2 wieder deutlich stärker gehemmt werden. Verglichen mit Celecoxib wird die COX-1 vom Platinkomplex stärker gehemmt, bleibt aber an der COX-2 deutlich dahinter zurück. Dabei geht die COX-2-Selektivität vollständig verloren.

Die beiden Diarylacrylsäuren wurden bereits von der Arbeitsgruppe Knaus synthetisiert und hinsichtlich ihrer COX-Hemmung getestet. Dabei wurde für Phenacrylsäure ein  $IC_{50}$ -Wert an der COX-1 von  $1,5\mu\text{M}$  und an der COX-2 von  $3,0\mu\text{M}$  ermittelt. Für die Br-Phenacrylsäure ermittelte man an der COX-1 einen  $IC_{50}$ -Wert von  $>100\mu\text{M}$  und an der COX-2 einen  $IC_{50}$ -Wert von  $5,3\mu\text{M}$ <sup>[112]</sup>. Damit stellt die Phenacrylsäure einen unselektiven COX-Hemmer dar. Durch die Einführung eines Broms am aromatischen Ring wird mit der Br-Phenacrylsäure dann eine COX-2-Selektivität erreicht. Auch in den hier ermittelten Testergebnissen zeigt sich bei der Br-Phenacrylsäure eine stärkere Hemmung der COX-2 als an der COX-1.

Wie schon beim Celecoxib geht durch die Veresterung bereits jede COX-2-Selektivität bzw. – Präferenz verloren. Auch durch die anschließende Komplexierung am Platin kann die COX-2 Selektivität nicht zurückerhalten werden.

Damit ist der Versuch, eine COX-2-Selektivität durch den Einsatz von COX-2-selektiven Liganden am Platin zu erreichen, gescheitert. Allerdings bedingte bereits die Einführung der Olefinkomponente am COX-2-Hemmer den Verlust der COX-2-Selektivität. Daher kann der Verlust der Selektivität nicht allein auf die Komplexierung des Metalls zurückgeführt werden.

## 4.6 Struktur-Wirkungsbeziehung von Platinkomplexen an der COX

Platinkomplexe als COX-Hemmer könnten einen neuen Ansatzpunkt bei der Therapie von Tumoren bieten, bei deren Entwicklung eine Überregulation der COX zu beobachten ist.

### 4.6.1 Einfluss der Abgangsgruppen

Bleibt die Frage nach den strukturellen Voraussetzungen am Platin, die für eine COX-Hemmung verantwortlich sind. Dazu wurden zunächst verschiedene Platinkomplexe an den isolierten Enzymen getestet.

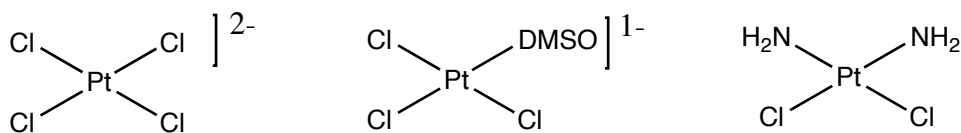


Abb. 4.14 Strukturvariationen in der Anzahl der Abgangsgruppen am Platin

Alle getesteten Zeise-NSAR-Komplexe waren einfach negativ geladene Platinkomplexe mit 3 Chlorabgangsgruppen. Wenn man von einem Austausch der Chloroliganden gegen Aqualiganden ausgeht, die eine Aktivierung des Platinkomplexes bedingen und vielleicht eine kovalente Bindung in der COX zur Folge haben, so könnte die Anzahl der Abgangsgruppen eine große Rolle spielen. Deshalb wurden Kaliumtetrachloroplatinat (4 Abgangsgruppen), ein Platin-DMSO-Komplex (3 Abgangsgruppen) und Cisplatin (2 Abgangsgruppen) an den isolierten COX-Enzymen getestet.

Platin-Komplex	COX-1-Hemmung bei 10 $\mu\text{M}$ [%]	COX-2-Hemmung bei 10 $\mu\text{M}$ [%]
Kaliumtetrachloroplatinat	18	keine Wirkung
DMSO-Pt(Cl) <sub>3</sub>	18	27
Cisplatin	keine Wirkung	25

Tabelle 4.5 COX-Hemmung von Platinkomplexen mit unterschiedlicher Anzahl an Abgangsgruppen

Die Ergebnisse in Tabelle 4.5 zeigen keinen Einfluss bezüglich der Anzahl der Abgangsgruppen auf die Hemmung der COX an beiden Isoenzymen. Sowohl an COX-1 als auch an COX-2 kann nur eine leichte Inaktivierung des Enzyms beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die Anzahl der Abgangsgruppen, sondern die Olefinkomponente eine entscheidende Rolle spielen muss. Dazu wurde das Zeise-Salz untersucht. Allein durch die Anwesenheit des Ethens wird sowohl an COX-1 als auch an COX-2 eine deutlichere Steigerung der hemmenden Wirkung festgestellt. Eine Präferenz für eines der Isoenzyme kann beim Zeise-Salz nicht festgestellt werden (Tabelle 4.6).

Platin-Komplex	COX-1-Hemmung bei 1 $\mu\text{M}$ [%]	COX-2-Hemmung bei 1 $\mu\text{M}$ [%]
Zeise-Salz	36 $\pm$ 0,17	35 $\pm$ 0,09

Tabelle 4.6 COX-Hemmung von Zeise-Salz

#### 4.6.2 Ursache der COX-Hemmung

Ziel war es, über den Einsatz von COX-Hemmern als Liganden am Platin eine Selektivität hinsichtlich der Isoformen COX-1 und COX-2 zu erreichen. Wie die Ergebnisse in Abb. 4.11 und Abb. 4.12 zeigen, konnten unselektive NSAR als Liganden am Platin durchaus eine Selektivität für die COX-1 aufweisen. Der Versuch, mit COX-2-Hemmern eine COX-2-Selektivität der Platinkomplexe zu vermitteln, konnte hier noch nicht realisiert werden (Tabelle 4.4). Bleibt die Ursache der Hemmung zu klären. Ist es einfach nur eine Besetzung der Bindungstasche oder können die Platinkomplexe kovalent an Aminosäuren binden? Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden an der Universität Bochum im Arbeitskreis Prof. Sheldrick LC-MS-Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es dabei die COX-1 auf die Anwesenheit von Platinierungsstellen zu untersuchen.

Dazu wurde die COX-1 mit Zeise-Salz inkubiert. Anschließend folgte ein enzymatischer Verdau der COX mit Trypsin. Dabei wird die Peptidsequenz nach jedem Arginin und Lysin gespalten. Die erhaltenen Peptidfragmente werden an einer RP-Phase mit gradientischem Fließmittel aufgetrennt und mittels MS/MS detektiert. Die Auswertung der MS-Spektren erfolgte mit der SEQUEST-Analyse. Dabei handelt es sich um eine bioinformatische Methode, die die gemessenen MS/MS-Spektren mit virtuell erzeugten Spektren aus der FASTA-Proteindatenbank vergleicht<sup>[113]</sup>. Das Maß der Übereinstimmung ist im  $X_{\text{Corr}}$ -Wert enthalten. Je höher dieser Wert, desto sicherer ist die Identifizierung der Peptidsequenz. Für 1-fach-geladene Peptide sollte er mindestens 1,8 betragen, für 2-fach-geladene 2,5 und für 3-fach-geladene 3,5. Der  $\Delta C_n$ -Wert gibt den Abstand zum nächsten möglichen Treffer an und sollte  $\leq 0,08$  betragen<sup>[114]</sup>. Als letzter Schritt erfolgt die Zuordnung der identifizierten Peptide zu einem Protein. Für eine valide Proteinidentifikation sollten mindestens zwei unique Peptide identifiziert worden sein<sup>[115]</sup>.

Bei der SEQUEST-Analyse wurde nach folgenden möglichen Modifikationen gesucht:

193	$[^{195}\text{Pt}]^{2+}$	221	$[(\text{C}_2\text{H}_4)^{195}\text{Pt}]^{2+}$
229	$[^{195}\text{PtCl}]^+$	247	$[(\text{H}_2\text{O})^{195}\text{PtCl}]^+$ ,
257	$[(\text{C}_2\text{H}_4)^{195}\text{PtCl}]^+$	265	$[^{195}\text{PtCl}_2]$
293	$[(\text{C}_2\text{H}_4)^{195}\text{PtCl}_2]$		

Ergebnis sind 5 Peptidsequenzen, auf denen Modifikationen mit Platin gefunden werden konnten. Die möglichen Koordinationsstellen des Zeise-Salzes sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Sehr interessant ist vor allem die platinierter Aminosäure Tyr385. Diese befindet sich im aktiven Zentrum der COX und ist essentiell für die Bindung der Arachidonsäure. Bei einem Austausch dieser Aminosäure konnten Untersuchungen bereits zeigen, dass es zum vollständigen Verlust der Aktivität des Enzyms führt.

Peptidsequenz	Aminosäure	Modifikation	z	SEQUEST-Parameter		Ionen
				X <sub>Corr</sub>	ΔC <sub>n</sub>	
COX-1 + Zeise-Salz				X <sub>Corr</sub>	ΔC <sub>n</sub>	
C.HPNS@IFGESMIEMGAPFSLK.G	S516	221	3	4,31	0,25	28/76
V.IEE@YVQQLSGYFLQLK.F	E346 E347	229	3	3,76	0,52	24/60
L.E@KC@HPNSIFGESMIEMGAPFSL K.G	E510 C512	265	3	4,64	0,17	31/88
W.K@AS@TFGGGEVGFNLVK.T	K546 S548	293	3	3,20		19/56
E.FNQLY@HWHPLMPDSFR.V	Y385	265	3	3,67	0,31	20/60

Tabelle 4.7 gefundene Platinierungsstellen(@) in der COX-1 mit ESI-MS/MS-Spektroskopie

In Abb. 4.15 ist exemplarisch das MS/MS-Spektrum der Peptidsequenz W.K@AS@TFGGGEVGFNLVK.T dargestellt. Das Peptidfragment wurde durch den Verdau mit Trypsin erhalten und wird im Massenspektrometer weiter fragmentiert. Die Schnittstelle des Trypsins ist durch den Punkt in der angegebenen Sequenz gekennzeichnet. Bei der weiteren Fragmentierung entstehen die sogenannten b-Ionen, die vom N-terminalen Ende der Peptidsequenz gezählt werden und die y-Ionen, die vom C-terminalen Ende gezählt werden. So besteht  $y_2^+$  aus den Aminosäuren K+V und ergibt die Molmasse 246. Das  $b_5^{3+}$ -Ion ist 3-fach positiv geladen und hat somit eine Gesamtmasse 1124g/mol. Sie errechnet sich aus der Addition der Molmassen KASTF und enthält 2x die Platinmodifikation 293 vom Zeise-Salz. Die modifizierte Aminosäure wird mit @ in der Aminosäuresequenz gekennzeichnet und sitzt im hier genannten Beispiel auf den Aminosäuren Lysin und Serin. Meistens werden im MS-Spektrum nicht alle Fragmente detektiert. In dem unten dargestellten MS-Spektrum konnten von 56 möglichen Fragmenten 19 identifiziert werden (Tabelle 4.7 letzte Spalte).

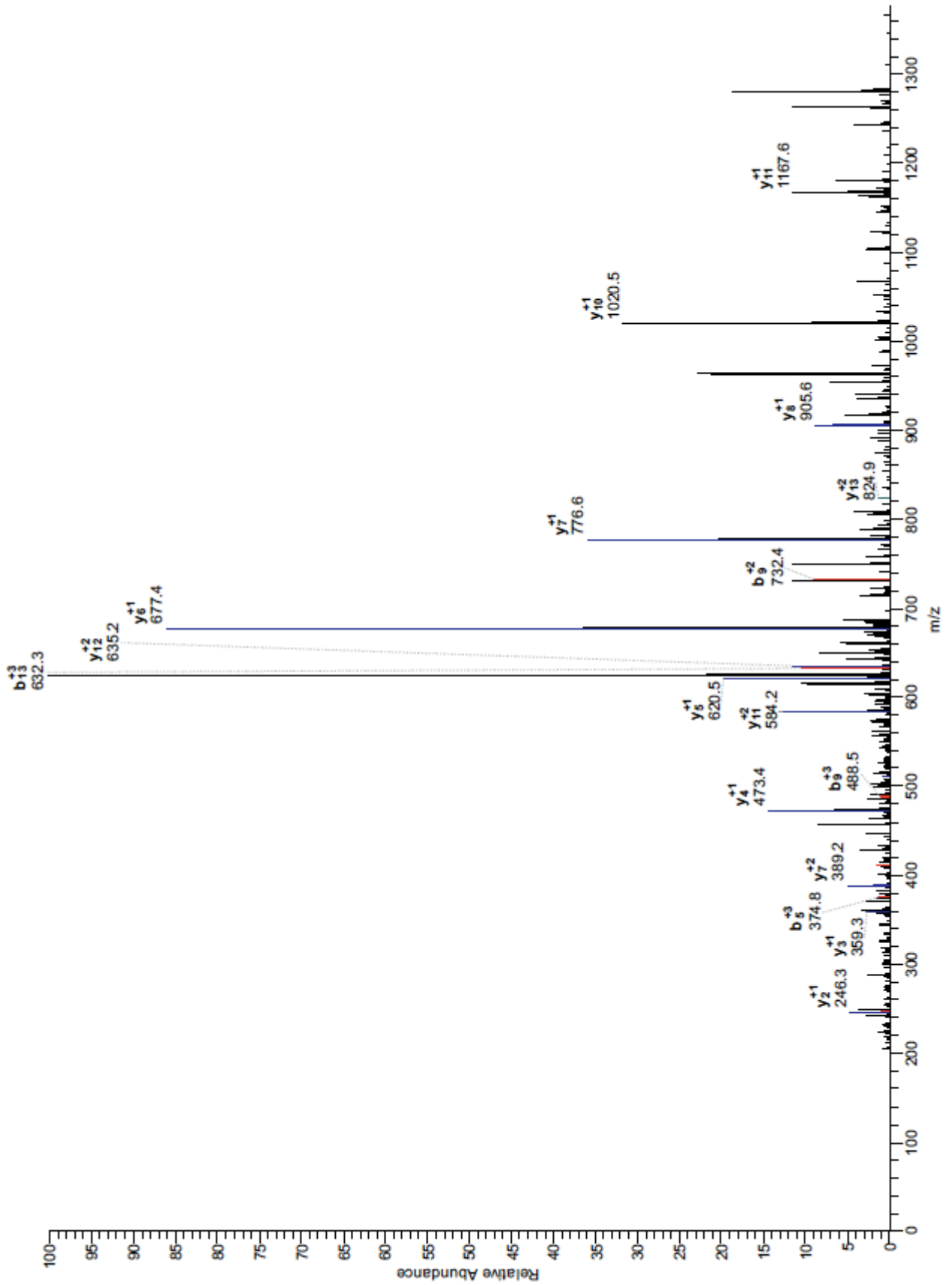


Abb. 4.15 MS/MS-Spektrum der Peptidsequenz W.K@AS@TFGGVGFNLVK.T



#### 4.7 Hemmung der COX im Ganzzellassay

Für die Untersuchung der COX-Hemmung in Zellen wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 verwendet, die durch eine geringe Expression der COX-1 und eine hohe Konzentration an konstitutiv exprimierter COX-2 gekennzeichnet ist<sup>[116]</sup>. Nachdem die Zellen für 24h mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von Arachidonsäure. Das Substrat der COX wird sehr schnell in PGE<sub>2</sub> umgewandelt und von den Zellen ins Medium abgegeben. Nach Aufnahme des Mediums erfolgt die Quantifizierung des Prostaglandins mittels Enzym-Immunoassay. Dabei wird nicht das PGE<sub>2</sub> bestimmt, da dieses sehr schnell über die PG-15-Dehydrogenase verstoffwechselt wird<sup>[117][118]</sup>. Die Halbwertszeit von PGE<sub>2</sub> beträgt nur ungefähr 30s<sup>[119]</sup>. Quantifiziert wird daher das stabile Bicyclo-Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Derivat. Der Assay basiert auf der Konkurrenz zwischen PGE<sub>2</sub> und einem PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat um eine begrenzte Anzahl von PGE<sub>2</sub>-Mausantikörpern. Während die Menge des PGE<sub>2</sub>-Tracers konstant bleibt, variiert die Menge des PGE<sub>2</sub>. Der Antikörper-PGE<sub>2</sub>-Komplex bindet an polyklonale IgG-Mausantikörper, die am Plattenboden fixiert sind. Nach Zugabe von Ellmann's Reagenz wird dieses durch die Acetylcholinesterase gespalten (Abb. 4.6).

Ligand	COX-2-Hemmung bei 10µM [%] + sdv	Ligand	COX-2-Hemmung bei 10µM [%] + sdv
<b>Ibuprofen</b>	42 ± 0,02	<b>Indometacin</b>	44 ± 0,03
<b>But-Ibu</b>	keine Hemmung	<b>But-Indo</b>	30 ± 0,06
<b>Di-Ibu</b>	34 ± 0,06	<b>Di-Indo</b>	35 ± 0,12
<b>Naproxen</b>	62 ± 0,24	<b>Diclofenac</b>	35 ± 0,08
<b>But-Napro</b>	keine Hemmung	<b>But-Diclo</b>	34 ± 0,13
<b>Di-Napro</b>	keine Hemmung	<b>Di-Diclo</b>	41 ± 0,07
<b>But-Phenacryl</b>	30 ± 0,11	<b>But-Br-Phenacryl</b>	24 ± 0,12
<b>But-Cele</b>	23 ± 0,19		

Tabelle 4.8 Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Bildung in MDA-MB-231-Zellen von den NSAR und den NSAR-Liganden

Die Ergebnisse des PGE<sub>2</sub>-Assays sind nicht so leicht zu interpretieren, da neben der Hemmung des Enzyms auch andere Faktoren wie Löslichkeit und Zellaufnahme eine Rolle spielen. Auffällig sind die geringen Unterschiede zwischen den getesteten NSAR und den NSAR-Liganden. Die deutliche Abnahme der COX-Hemmung von Indometacin und Diclofenac durch die Veresterung, wie sie an den isolierten Enzymen zu sehen war, ist im Ganzzellassay nicht vorhanden.

Platinkomplex	COX-2-Hemmung bei 10µM [%] ± sdv	Ligand	COX-2-Hemmung bei 10µM [%] ± sdv
<b>But-Ibu-Zeise</b>	20 ± 0,03	<b>But-Indo-Zeise</b>	24 ± 0,04
<b>Di-Ibu-Zeise</b>	15 ± 0,00	<b>Di-Indo-Zeise</b>	24 ± 0,09
<b>But-Napro-Zeise</b>	28 ± 0,04	<b>But-Diclo-Zeise</b>	22 ± 0,08
<b>Di-Napro-Zeise</b>	23 ± 0,01	<b>Di-Diclo-Zeise</b>	keine Hemmung
<b>But-Phenacryl-Zeise</b>	16 ± 0,04	<b>But-Br-Phenacryl-Zeise</b>	30 ± 0,03
<b>But-Cele-Zeise</b>	32 ± 0,05		

Tabelle 4.9 Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Bildung in MDA-MB-231-Zellen von But-NSAR-Zeise-Komplexen

Die Untersuchung der Platinkomplexe zeigt eine geringe Hemmung der COX. Waren die Komplexe an den isolierten Enzymen den reinen NSAR und ihren Liganden zum Teil noch deutlich überlegen, so geht der Effekt an Zellen vollständig verloren. Neben der Zellaufnahme, die für alle getesteten Verbindungen eine wichtige Rolle spielt, besteht bei den Platinkomplexen zusätzlich noch die Gefahr der Inaktivierung durch Reaktionen mit anderen Proteinen als der COX, Membranbestandteilen und anderen Nucleophilen.

## 5 Zytotoxizität

Man geht davon aus, dass derzeit in Deutschland jährlich etwa 59.000 Frauen an Brustkrebs erkranken und rund 17.000 daran sterben. Damit ist das Mammakarzinom der Tumor, der bei Frauen am häufigsten auftritt<sup>[120]</sup>. Er nimmt unter allen neu auftretenden Krebserkrankungen einen Anteil von 29% ein<sup>[121]</sup>. Neben dem chirurgischen Eingriff sowie der Strahlentherapie wird auch die Chemotherapie als Behandlungsmethode eingesetzt. Platinkomplexe stellen dabei eine Gruppe der möglichen Chemotherapeutika dar und werden häufig in Kombinationstherapien mit anderen Zytostatika eingesetzt.

Seit der Entdeckung des Cisplatin durch Rosenberg<sup>[122]</sup> 1965 ist dieses aus der Tumorthherapie nicht mehr wegzudenken. Die Weiterentwicklung führte zu mehreren in der Krebstherapie etablierten Vertretern. Die bekanntesten neben dem Cisplatin sind Oxaliplatin und Carboplatin. Anwendungsgebiete neben dem Brustkrebs sind unter anderem das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom und Hodenkrebs.

Die hier durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen erfolgten an 2 verschiedenen Brustkrebszelllinien: die MDA-MB-231- und MCF-7-Zelllinie. Diese wurden jeweils über mehrere Tage mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und anschließend ein Kristallviolett-Assay zur Ermittlung der Zellmenge verwendet.

Die MDA-MB-231-Zellen sind hochinvasive Tumorzellen mit schneller Ausbildung von Metastasen<sup>[123]</sup>. Die Zellen wurden einer 51-jährigen Frau, die 1973 an Brustkrebs erkrankt war und 1 Jahr später daran verstarb, entnommen<sup>[124]</sup>. Charakteristische Merkmale dieser Zelllinie sind das hormonunabhängige Verhalten<sup>[125][126]</sup> und die starke konstitutive Expression der Cyclooxygenase 2<sup>[127][128]</sup>.

Die MCF-7-Zellen wurden 1970 ebenfalls einer Brustkrebspatientin entnommen<sup>[129]</sup>. Im Gegensatz zu den MDA-MB-231-Zellen erfolgt das Zellwachstum weniger invasiv. Sie besitzen unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Progesteron und Androgene und werden daher als hormonabhängig bezeichnet<sup>[130][131]</sup>. Die Cyclooxygenase betreffend wird hier vor allem die COX-1 konstitutiv exprimiert. Eine Induktion der COX-2-Expression durch entsprechende Stimuli konnte ebenfalls nachgewiesen werden<sup>[127]</sup>.

## 5.1 Testsystem

Um zellproliferationshemmende Effekte der NSAR-Zeise-Komplexe zu erfassen, wurde ein Kristallviolett-Assay verwendet.

Nach Aussaat der Zellen erfolgte 3 Tage später in 96-Loch-Mikrotiterplatten die Substanzzugabe in verschiedenen Konzentrationen (50µM, 40µM, 30µM, 20µM, 10µM, 5µM und 2,5µM). Dabei werden pro Substanz je 5 Platten benötigt, um den zytotoxischen Effekt zeitabhängig erfassen zu können. Als Zeitpunkte wurden 48h, 72h, 96h, 120h und 144h gewählt. In jedem Zelltest wurde als Referenzsubstanz das Cisplatin in den Konzentrationen (10µM, 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,612µM und 0,306µM) mitgetestet. Zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgt das Fixieren der Zellen am Plattenboden mit Glutaraldehyd. Danach können die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und UV-photometrisch vermessen werden. Zur Beurteilung der zellproliferationshemmenden Effekte wird aus den erhaltenen Absorptionswerten ein  $T/C_{corr}$ -Wert ermittelt. Er gibt die relative prozentuale Wachstumshemmung durch die getesteten Substanzen an.

$$T/C_{corr} [\%] = \frac{T^* - c_0}{c^* - c_0} * 100 \quad \text{Gleichung 5.1 Berechnung des } T/C_{corr}\text{-Wertes}$$

$$\tau [\%] = \frac{T^* - c_0}{c_0} * 100 \quad \text{Gleichung 5.2 Berechnung des } \tau\text{-Wertes}$$

$c_0$  Mittelwert der Extinktionen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ )

$c^*$  Mittelwert der Extinktionen der Lösungsmittelkontrolle bei Testende

$T^*$  Mittelwert der Extinktionen der Proben bei Testende

Bei der Berechnung der  $T/C_{corr}$ -Werte werden durch die Subtraktion der Ausgangszellmenge die Änderungen der Zellmasse der Kontrollkulturen und der behandelten Kulturen nach der Substanzzugabe aufeinander bezogen. Damit erfasst man die zytostatischen Effekte. Liegen zytozide Wirkungen vor, so muss an Stelle des  $T/C_{corr}$ -Wertes der  $\tau$ -Wert berechnet werden (Gleichung 5.2). Hier wird der Anteil der getöteten Zellen in Bezug zur Ausgangszellmenge gesetzt.

Man kann die Substanzen anhand ihrer ermittelten  $T/C_{\text{corr}}$ -Werte folgendermaßen einteilen:

> 80 %	keine antiproliferative Wirkung
80 % - 20 %	antiproliferative Wirkung
20 % - 0 %	zytostatische Wirkung
< 0 %	zytotoxische Wirkung

In dieser Arbeit werden unter zytotoxischen Wirkungen alle oben genannten Beeinflussungen des Zellwachstums verstanden.

## 5.2 Ergebnisse

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen erfolgten sowohl zeit- als auch konzentrations-abhängig. Abb. 5.1 stellt den zeitabhängigen Verlauf von But-Salicyl-Zeise bei 4 verschiedenen Konzentrationen dar. Bei einer Testkonzentration von  $10\mu\text{M}$  zeigt sich keine Beeinflussung des Zellwachstums. Auffällig ist der bereits nach 48 h einsetzende toxische Effekt bei den höheren Konzentrationen. Bei  $20\mu\text{M}$  und  $30\mu\text{M}$  scheint allerdings nach 48h das Wachstum der Zellen wieder einzusetzen.

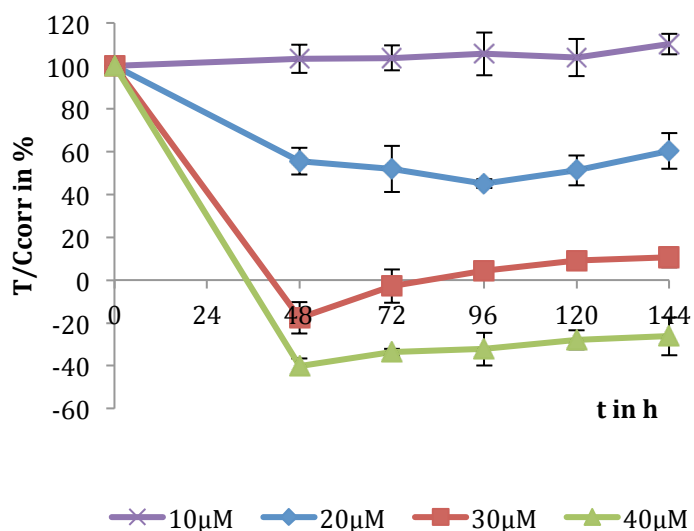


Abb. 5.1 zeitabhängige Zytotoxizität am Beispiel von But-Salicyl-Zeise an MCF-7-Zellen in verschiedenen Konzentrationen

Die Untersuchung der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abb. 5.2 dargestellt. Auch hier wurde als Beispiel die ermittelte Dosis-Wirkungskurve von But-Salicyl-Zeise abgebildet. Dabei wird die Konzentration logarithmisch dargestellt und die Kurve mittels Boltzmann Funktion mathematisch gefittet. Durch Ablesen der Konzentration auf der x-Achse bei 50% erhält man den  $IC_{50}$ -Wert. Er gibt die Substanzkonzentration an, bei der das Zellwachstum zu 50% gehemmt ist.

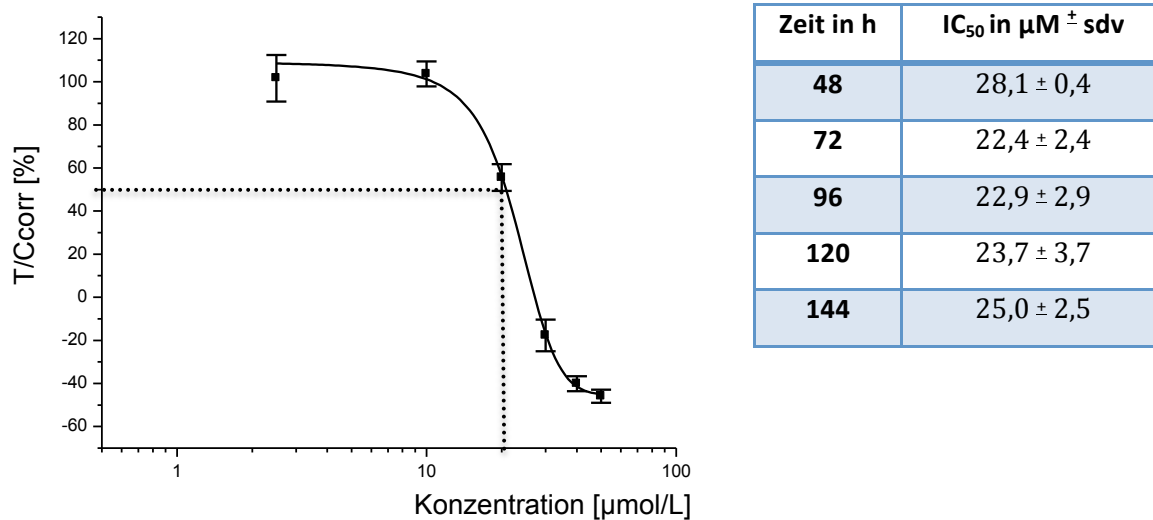


Abb. 5.2 konzentrationsabhängige Zytotoxizität nach 96h am Beispiel But-Salicyl-Zeise (links) und nebenstehend die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte zu verschiedenen Zeitpunkten

Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten bestätigen die Abnahme der antiproliferativen Effekte aus Abb. 5.1. Da in den meisten Fällen der  $IC_{50}$ -Wert nach 72h bzw. 96h den kleinsten Wert annimmt, werden im Folgenden nur noch die 96h-Werte angegeben und miteinander verglichen.

In Tabelle 5.1 sind die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte nach 96h von allen getesteten Platinkomplexen dargestellt. Nicht untersucht wurden die Prop-NSAR-Zeise-Komplexe, die aufgrund ihrer geringen Stabilität (siehe Kapitel 2) innerhalb kürzester Zeit im Zellmedium zersetzt werden.

Grundsätzlich ist zu beobachten, dass alle NSAR-Zeise-Komplexe nur geringe antiproliferative Effekte aufweisen. Beim Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte an beiden Zelllinien können jeweils nur sehr geringe Unterschiede entdeckt werden. Dabei lässt sich kein Trend hinsichtlich größerer antiproliferativer Effekte für eine der beiden Zelllinien zeigen.

Platinkomplex	IC <sub>50</sub> an MCF-7-Zellen nach 96h $\pm$ sdv	IC <sub>50</sub> an MDA-MB-232-Zellen nach 96h $\pm$ sdv
Cisplatin	2,3 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,2
Zeise	>50	>50
But-Salicyl-Zeise	22,9 $\pm$ 0,9	18,5 $\pm$ 1,6
Di-Salicyl-Zeise	14,4 $\pm$ 2,6	19,5 $\pm$ 2,6
But-Napro-Zeise	17,5 $\pm$ 0,9	18,2 $\pm$ 1,3
Di-Napro-Zeise	40,1 $\pm$ 1,3	24,6 $\pm$ 7,6
But-Ibu-Zeise	12,7 $\pm$ 1,5	12,4 $\pm$ 0,4
Di-Ibu-Zeise	28,8 $\pm$ 0,3	32,3 $\pm$ 0,4
But-Indo-Zeise	13,6 $\pm$ 2,2	17,7 $\pm$ 1,9
Di-Indo-Zeise	22,2 $\pm$ 1,0	22,9 $\pm$ 1,7
But-Diclo-Zeise	11,6 $\pm$ 1,6	15,7 $\pm$ 1,0
Di-Diclo-Zeise	34,1 $\pm$ 7,4	31,3 $\pm$ 3,0
Phenacryl-Zeise	17,9 $\pm$ 4,1	20,8 $\pm$ 2,0
Br-Phenacryl-Zeise	11,5 $\pm$ 0,9	11,6 $\pm$ 0,9
But-Cele-Zeise	19,8 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 2,3

Tabelle 5.1 IC<sub>50</sub>-Werte der NSAR-Zeise-Komplexe an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen

Die Zytotoxizität von Cisplatin kann mit keinem der hier getesteten NSAR-Zeise-Komplexe erreicht werden. Bei der Ausgangssubstanz, dem Zeise-Salz, kann eine Beeinflussung des Zellwachstums bis zu einer Konzentration von 50 $\mu$ M nicht beobachtet werden. Die größten proliferationshemmenden Effekte zeigen die Komplexe But-Diclo-Zeise und Br-Phenacryl-Zeise. Strukturelle Zusammenhänge mit der zytotoxischen Wirkung lassen sich nur schwer ableiten, da die Liganden einen sehr heterogenen Aufbau besitzen. Neben den strukturellen Einflüssen spielen auch Lipophilie und Zellaufnahme eine entscheidende Rolle.

Ein Vergleich der zytotoxischen Effekte von monomeren NSAR-Zeise-Komplexen mit den dimeren NSAR-Zeise-Komplexen ist in Abb. 5.3 dargestellt.

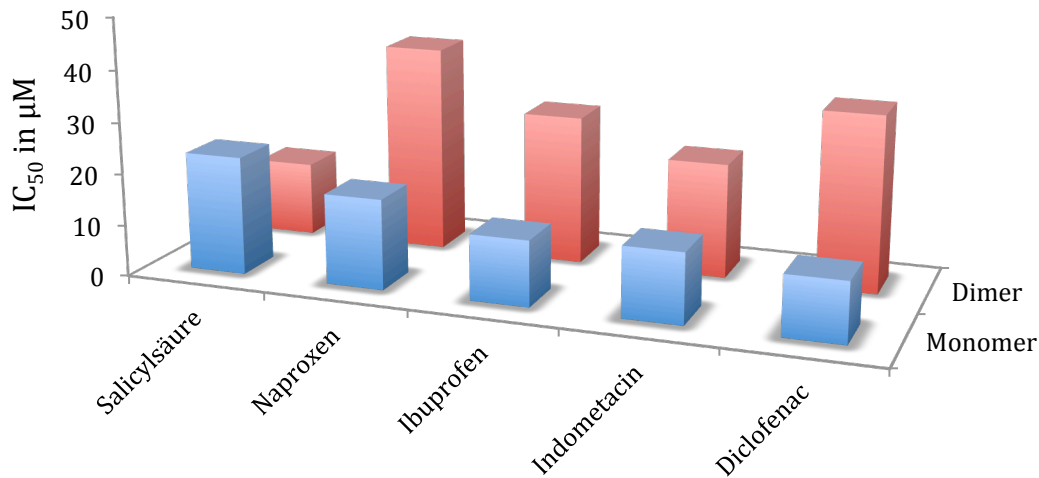


Abb. 5.3 Vergleich der monomeren NSAR-Zeise-Komplexen mit ihren dimeren NSAR-Zeise-Komplex anhand der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte

Hier fällt auf, dass mit Ausnahme des But-Salicyl-Zeise-Komplexes alle But-NSAR-Zeise-Komplexe größere antiproliferative Effekte zeigen als ihre dimeren Strukturanaloga. Ein Überschreiten der Sättigungslöslichkeit als mögliche Ursache kann ausgeschlossen werden. Die Bestimmung der Löslichkeit in Kapitel 3 zeigt, dass alle Komplexe bis zu einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  unterhalb ihrer Sättigungskonzentration liegen. In Betracht gezogen werden muss die Esterspaltung der dimeren NSAR-Zeise-Komplexe einseitig zum NSAR und dem Alkohol. Der entstehende Platinkomplex weist wahrscheinlich einen Chelatring zur endständigen Alkoholgruppe auf (Kapitel 3.2.5 Abb.3.13). Geht die Chelatbildung mit dem Verlust von einem Chlorliganden einher, so verliert der Komplex gegenüber den But-NSAR-Komplexen eine Aktivierungsstelle. Würden die Komplexe ihre Zytotoxizität über die Bindung an nucleophile Targets, wie z.B. der DNA, vermitteln, wären damit die Di-NSAR-Zeise-Komplexe durch den Chelatring im Nachteil.

Um den Einfluss der COX-Hemmung zu beurteilen, zeigt Abb. 5.4 die Korrelation der prozentualen Hemmung gegen den ermittelten  $IC_{50}$ -Wert der Zytotoxizität. Dabei wurden im linken Diagramm alle NSAR-Zeise-Komplexe verwendet, die bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  an der COX-1 getestet wurden und gegen die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte an MCF-7 Zellen aufgetragen. Dabei scheint die Verteilung der Datenpunkte keinen mathematischen Zusammenhang zu ergeben. Trägt man die COX-2-Hemmung gegen die  $IC_{50}$ -Werte an MDA-MB-231 Zellen auf, so scheint sich ein linearer Zusammenhang zu ergeben (Abb. 5.4 rechts). Es entsteht der Eindruck, dass eine Zunahme der COX-2-Hemmung eine erhöhte Zytotoxizität zur Folge hat. Der hier



dargestellte lineare Zusammenhang muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. In die Korrelation wurden nur NSAR-Zeise-Komplexe einbezogen, die bei einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  getestet wurden. Da die Testkonzentrationen an der COX-2 sehr heterogen waren, resultiert daraus nur ein sehr kleiner Stichprobenumfang. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurde der in Klammern gesetzte Datenpunkt. Um den mathematischen Zusammenhang abzusichern, wäre es notwendig, von allen Komplexen den  $\text{IC}_{50}$ -Wert an den COX-Enzymen zu ermitteln und diese dann erneut mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten der Zytotoxizität zu korrelieren.

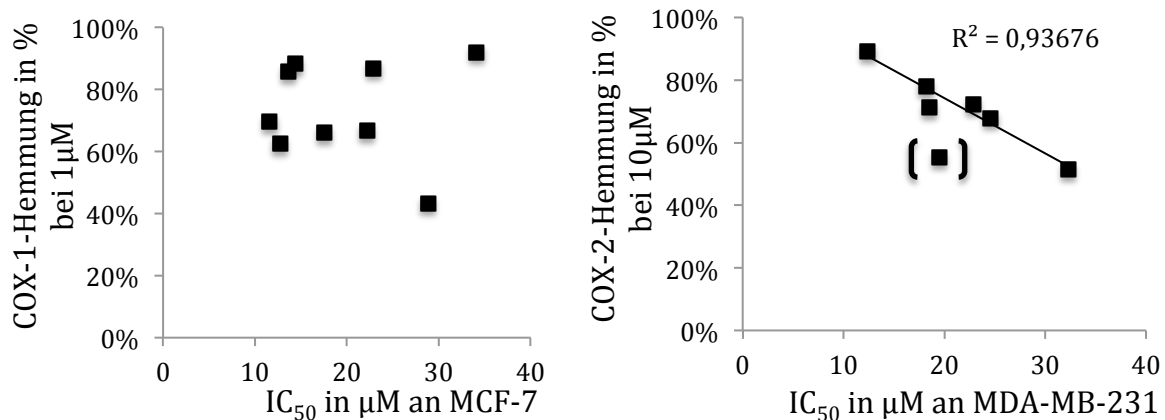


Abb. 5.4 Korrelation von Zytotoxizität und COX-Hemmung; links: Hemmung der COX-1 in % bei  $10\mu\text{M}$  gegen den  $\text{IC}_{50}$ -Wert an MCF-7-Zellen, rechts: Hemmung der COX-2 in % bei  $10\mu\text{M}$  gegen den  $\text{IC}_{50}$ -Wert an MDA-Zellen

Abschließend steht noch der Vergleich der NSAR-Zeise-Komplexe mit ihren Liganden aus. Dafür wurden die ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte an MCF-7-Zellen in Abb. 5.5 vergleichend dargestellt. In den meisten Fällen kann dabei eine kleine Abnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes nach Komplexierung des Liganden am Platin festgestellt werden. Deutlicher ausgeprägt ist die Zunahme der Zytotoxizität lediglich bei But-Salicyl und Di-Indo nach Umsetzung mit Platin. Der Di-Ibu-Zeise-Komplex weist sogar nach Komplexierung am Metall verringerte antiproliferative Effekte auf. Die an den MCF-7-Zellen dargestellten Unterschiede zwischen Ligand und Zeise-Komplex finden sich auch an der MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie wieder. Dort ist ebenfalls die Zytotoxizitätszunahme bei But-Salicyl und Di-Indo nach Komplexierung am deutlichsten ausgeprägt. Auch der Verlust an proliferationshemmender Wirkung im Vergleich zum Liganden bei Di-Ibu-Zeise kann dort festgestellt werden.

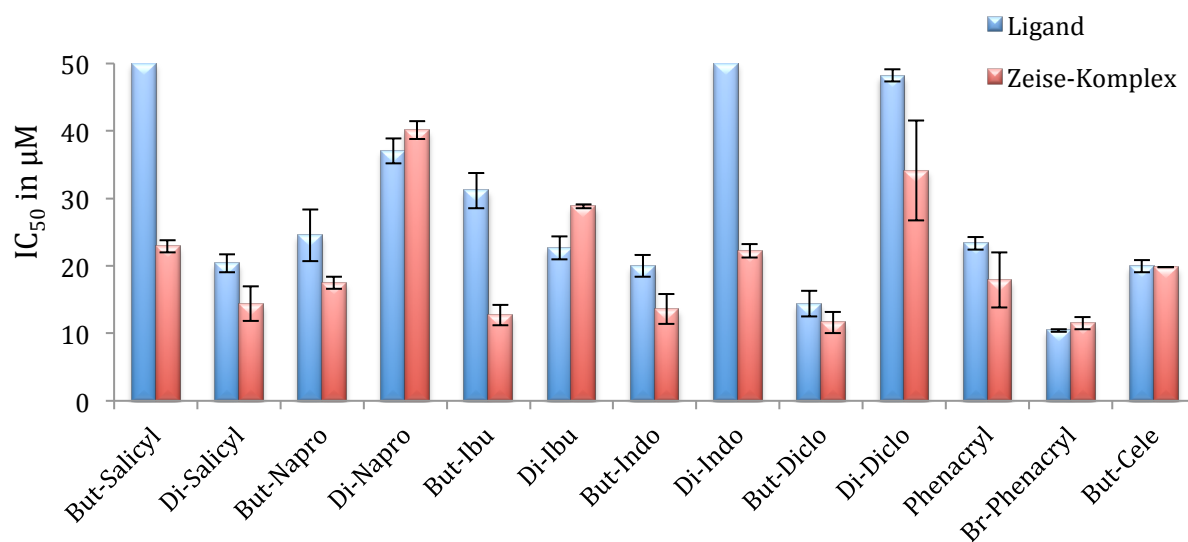


Abb. 5.5 Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von NSAR-Ligand mit NSAR-Zeise-Komplex an MCF-7-Zellen

## 6 Zelluläre Aufnahme der NSAR-Zeise-Komplexe

Um eine toxische Wirkung in den Zielzellen zu erreichen, müssen die Komplexe zuerst ins Innere der Zelle gelangen. Dabei stellt die äußere Membran eine erste Barriere da. Durch ihre Lipiddoppelschicht ist sie vor allem für geladene und hydrophile Stoffe eine Hürde, während lipophile Stoffe oft ungehindert durch sie hindurch diffundieren können. Neben der Diffusion stehen noch andere Transportmöglichkeiten zur Durchquerung der Zellmembran zur Verfügung. Unter Verbrauch von Energie kann die Zelle aktiv Stoffe vom Extrazellulärraum mit Hilfe von Kanälen oder Transportern aufnehmen. Dieser Vorgang geschieht meistens entgegen des Konzentrationsgefälles. Eine weitere Möglichkeit wäre die Aufnahme über Phago- und Pinozytose, bei der die aufzunehmende Substanz in Form von Vesikeln in die Zelle transportiert wird<sup>[12]</sup>.

### 6.1 Zellaufnahme

Zur Zellaufnahme von Platinkomplexen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Untersuchungen durchgeführt<sup>[132]</sup>. Lange Zeit beschäftigte man sich vor allem mit der Frage des zellulären Aufnahmemechanismus von Cisplatin. Die Annahme einer passiven Diffusion bestätigten Studien, die zeigen konnten, dass die Aufnahme keiner Sättigung unterliegt<sup>[133][134]</sup> und durch Zusatz von Strukturanaloga nicht gehemmt werden kann<sup>[135]</sup>. Erste Zweifel an rein passiver Diffusion kamen auf durch die Hemmung der Zellakkumulation des Cisplatins in Gegenwart von reaktiven Aldehyden. Dabei wurde als Ursache eine Veränderung von Membranproteinen diskutiert<sup>[136][137]</sup>. Ebenfalls zeigen Untersuchungen einen direkten Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Kupfertransportern und der Aufnahme von Cisplatin<sup>[138][139]</sup>. Hefezellen mit einem Mangel an dem Kupferaufnahme-Protein Ctr1 weisen eine erhöhte Resistenz und eine verringerte Zellakkumulation von Cisplatin auf. Neben dem Kupfertransporter scheinen auch organische Kationentransporter (OTC's) einen wichtigen Einfluss zu haben<sup>[140][141]</sup>. Sie gehören zu einer Familie von Transportern, die eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung von Arzneistoffen, Giften und endogenen Substanzen in Leber und Niere vermitteln. Neuere Studien untersuchen die Rolle der OTC's bei tumorspezifischen Aktivitäten verschiedener Platinkomplexe<sup>[142]</sup>.

### 6.1.1 Durchführung der Zellaufnahme

Als Grundlage für die Untersuchung die Arbeiten wurden von Koch<sup>[143]</sup> und Sommer<sup>[144]</sup>, sowie die Optimierungen von Kapp<sup>[145]</sup> benutzt. Die Untersuchung der Zellaufnahme erfolgte zeitabhängig über einen Zeitraum von 24h exemplarisch an MCF-7-Brustkrebszellen. Auf eine Testung an MDA-MB-231-Zellen wurde aufgrund der geringen Unterschiede zu den MCF-7-Zellen in der Zytotoxizität verzichtet (siehe Kapitel 6.2 Tabelle 6.1). Als Zellmedium wurde FCS-freies Medium verwendet, um eine Inaktivierung der Platinkomplexe durch eventuelle Reaktionen mit dem Kälberserum zu unterbinden. Die Zellen wurden mit 10µM Testkonzentration inkubiert. Zum gewünschten Zeitpunkt erfolgte das Abstoppen der Aufnahme und die Gewinnung des Zellpellets. Nach Lyse der Zellpellets wurde zum einen der Platingehalt mit AAS und zum anderen der Proteingehalt mit Bradford bestimmt. Durch Kenntnis von Proteingehalt und Zellvolumen der MCF-7- Zellen<sup>[146]</sup> kann der zelluläre Gehalt des Platinkomplexes berechnet werden. Setzt man die ermittelte intrazelluläre Konzentration des untersuchten Komplexes mit der Substanzkonzentration im Medium ins Verhältnis, erhält man den Anreicherungsgrad.

Berechnung der intrazellulären Platin-Konzentration

$$C_{\text{intra}}(\mu\text{M}) = \frac{\text{pmolPt} / \mu\text{g Protein}}{8,85} * 1000$$

Berechnung des Anreicherungsgrades

$$\text{AG} = C_{\text{intra}} / C_{\text{extra}}$$

### 6.1.2 Ergebnisse

Wie schon im Kapitel 5.2 erwähnt, könnten die geringen antiproliferativen Effekte an den Krebszellen mit einer verringerten Zellaufnahme einhergehen. Während für Cisplatin neben den OTC- bzw. Kupfertransportern die passive Diffusion durch den neutralen Ladungszustand des Moleküls ermöglicht wird, ist dies für NSAR-Zeise-Komplexe eher unwahrscheinlich. Die einfache negative Ladung der Verbindungen erschwert die Diffusion durch die Zellmembran als möglichen Eintrittsweg in die Zelle. Abb. 6.1 zeigt die zeitabhängige Zellaufnahme von Cisplatin im Vergleich zum Zeise-Salz, But-Salicyl-Zeise und Di-Salicyl-Zeise. Der ermittelte

Anreicherungsgrad von  $3,7 \pm 1,0$  bei Cisplatin liegt in den Größenordnungen von den aus der Literatur bekannten Werten<sup>[147]</sup>. Das Zeise-Salz, welches keine Beeinflussung des Zellwachstums zeigte, reichert sich im gleichen Umfang wie Cisplatin in den MCF-7-Zellen an. Der Austausch des Ethenliganden gegen den But-Salicyl-Liganden erhöht den Anreicherungsgrad von 3,1 (Zeise) auf 7,2 (But-Salicyl-Zeise) nach 24h. Vielleicht könnte hier die Erhöhung der Lipophilie Grund für die bessere zelluläre Aufnahme sein. Eine weitere Erhöhung der lipophilen Eigenschaften wird durch den Liganden Di-Salicyl erreicht. Die zeitabhängige Kurve von Di-Salicyl-Zeise ist ebenfalls in Abb. 6.1 abgebildet. Eine weitere Steigerung der Anreicherung kann allerdings nicht festgestellt werden. Der Anreicherungsgrad liegt nach 24h mit 4,9 unterhalb der Anreicherung von But-Salicyl-Zeise. Auffällig bei den beiden NSAR-Zeise-Komplexen ist die sprunghafte Anreicherung innerhalb der ersten 2h. Danach scheint kein weiterer Komplex mehr aufgenommen zu werden. Im Falle des Di-Salicyl-Zeise kann sogar ein leichte Abnahme der aufgenommenen Menge des Komplexes beobachtet werden.

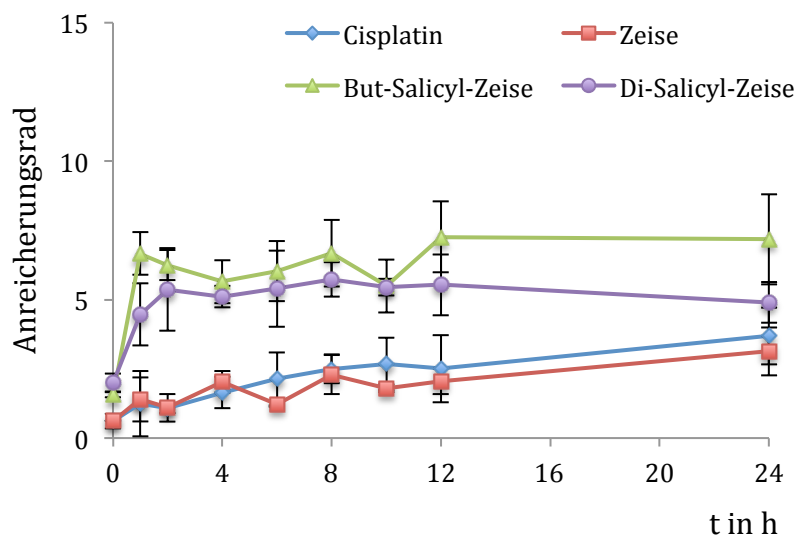


Abb. 6.1 Darstellung der Zellaufnahme von ausgewählten Zeise-Komplexen im Vergleich mit Cisplatin

Auch bei den anderen NSAR-Zeise-Komplexen kann ein sprunghafter Anstieg in den ersten beiden Stunden beobachtet werden. Tabelle 6.1 zeigt von allen Komplexen den Anreicherungsgrad nach 2h und nach 24h. Dabei kann, wie beim Di-Salicyl-Zeise schon angedeutet, in vielen Fällen eine Abnahme vom 2h-Wert hin zum 24h-Wert beobachtet werden. Am deutlichsten ausgeprägt scheint dieser Effekt beim Di-Indo-Zeise zu sein ( $8,9 \pm 2,7$  nach 2h und  $12,0 \pm 0,3$  nach 24h). Vielleicht sind dies erste Hinweise auf aktive Ausschleusmechanismen der Zellen. Das But-Ibu-Zeise weist mit einem Anreicherungsgrad von 21,1 die höchste zelluläre Aufnahme nach 24h auf, zeigt aber mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $28,8\mu M$  (siehe Tabelle 6.1) nur

schwache antiproliferative Effekte. Damit kann anhand der Zellaufnahme keine Begründung für die schwachen zytotoxischen Effekte gefunden werden.

Platinkomplex	Anreicherungsgrad nach 2h $\pm$ sdv	Anreicherungsgrad nach 24h $\pm$ sdv
Cisplatin	1,1 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 1,0
Zeise	1,1 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,9
But-Salicyl-Zeise	6,3 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 1,6
Di-Salicyl-Zeise	5,4 $\pm$ 1,5	4,9 $\pm$ 0,7
But-Napro-Zeise	14,1 $\pm$ 1,3	9,5 $\pm$ 1,2
Di-Napro-Zeise	9,7 $\pm$ 4,0	10,4 $\pm$ 0,8
But-Ibu-Zeise	24,2 $\pm$ 1,3	21,1 $\pm$ 0,8
Di-Ibu-Zeise	10,5 $\pm$ 1,5	8,3 $\pm$ 1,6
But-Indo-Zeise	8,9 $\pm$ 2,7	12,0 $\pm$ 0,3
Di-Indo-Zeise	35,6 $\pm$ 5,9	20,7 $\pm$ 5,8
But-Diclo-Zeise	8,4 $\pm$ 2,0	9,4 $\pm$ 0,5
Di-Diclo-Zeise	3,3 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 2,4
Phenacryl-Zeise	16,2 $\pm$ 1,4	13,0 $\pm$ 0,9
Br-Phenacryl-Zeise	9,1 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 0,7
But-Cele-Zeise	11,9 $\pm$ 2,0	10,6 $\pm$ 1,5

Tabelle 6.1 Anreicherungsgrad von NSAR-Zeise-Komplexen nach 2h und nach 24h

Das Auftragen des LogP-Wertes gegen den Anreicherungsgrad lässt ebenfalls keinen direkten Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Platinkomplexe und der Zellaufnahme erkennen (Abb. 6.2).

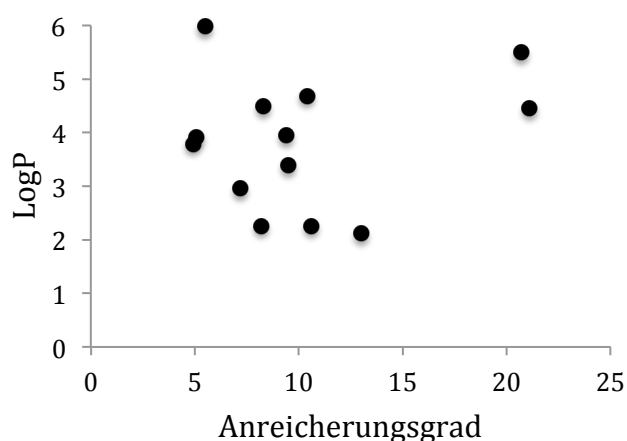


Abb. 6.2 Korrelation der LogP-Werte (ermittelt bei 80/20 Acetonitril/0,1% TFA) mit dem Anreicherungsgrad

Daraus könnte man schlußfolgern, dass die Aufnahme der Komplexe nicht durch passive Diffusion erfolgt. Als Alternative könnte die Aufnahme über sogenannte organische

Anionentransporter (OATP's) diskutiert werden. Bei diesen Transportern handelt es sich um Proteine in der Plasmamembran, die vor allem in Leber, Niere und der Blut-Hirn-Schranke vorkommen<sup>[148]</sup>. Diese Transporter sind an einer Vielzahl von Transportprozessen beteiligt, wobei die Substrate nicht zwangsweise anionischen Charakter aufweisen müssen. Der Transport vieler Substanzen, wie z. B. Schilddrüsenhormone, Digoxin, Pravastatin oder Prostanoiden konnte bislang auf die OATP's zurückgeführt werden<sup>[149]</sup>. Die genaue Funktion und Substratspezifität dieser Transporter konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Das Vorhandensein des Transporters in den MCF-7-Zellen<sup>[150][151]</sup> und MDA-MB-231-Zellen<sup>[152]</sup> wurde in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen. Spezifische Hemmstoffe für die einzelnen Subtypen der OATP's wurden noch nicht gefunden. Als ein unselektiver Hemmstoff kommt das Ouabain in Frage, das aber neben der Hemmung der OATP's auch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hemmt<sup>[153]</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen eine Aufnahmehemmung von Schilddrüsenhormonen in Gegenwart von 3-Iodthyronamin<sup>[154]</sup>. Eine gleichzeitige Inkubation von Hemmstoff und Zeise-NSAR-Komplexe könnte Aufschluss darüber geben, ob diese OATP's als mögliche Transporter in Frage kommen.

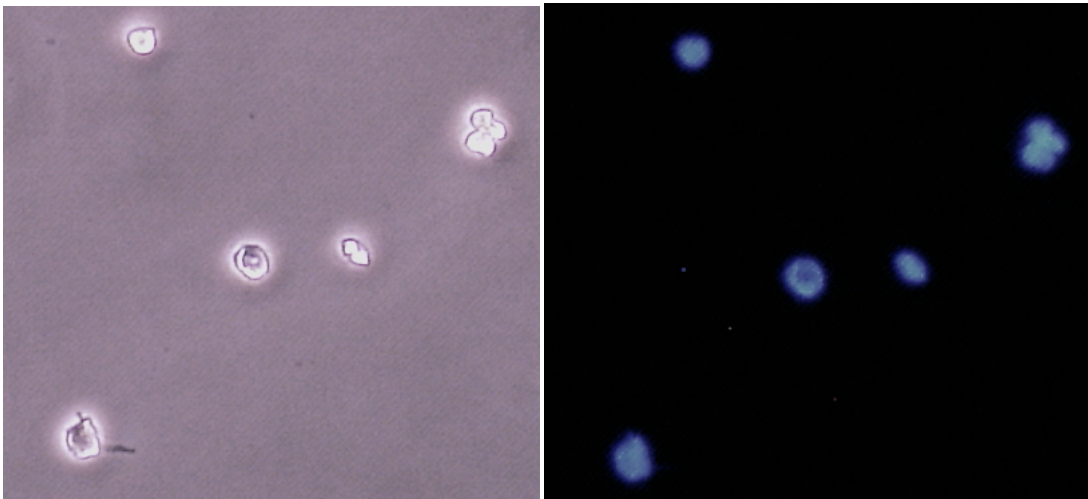
## 6.2 Zellkernaufnahme

Die Bestimmung der Zellaufnahme zeigte im Vergleich zum Cisplatin eine höhere Anreicherung der NSAR-Zeise-Komplexe und konnte damit nicht die geringen Zytotoxizitätswerte erklären. Allerdings gibt die Methode der Zellaufnahme keinen Aufschluss darüber, ob die Komplexe wirklich aufgenommen wurden oder vielleicht nur mit Membranbestandteilen der Zelle reagiert haben. Bei Reaktion mit Membranbestandteilen wäre eine Anlagerung auf der Außenseite der Zellen denkbar. Durch die Bestimmung des Platingehaltes im Kern könnte diese Anlagerung an die Außenseite der Zellen widerlegt werden. Für die Vermittlung der Zytotoxizität muss für die NSAR-Zeise-Komplexe die DNA als Target in Betracht gezogen werden. Um die DNA zu erreichen, müssten die Komplexe ebenfalls in den Zellkern gelangen.

### 6.2.1 Durchführung der Zellkernaufnahme

Bei der Kernisolierung wurde auf eine im Arbeitskreis etablierte Methode zurückgegriffen<sup>[145]</sup>. Dabei wird zunächst wie bei der Zellaufnahme ein Zellpellet gewonnen. Auch hier wurde FCS-freies Medium verwendet, um eine Inaktivierung der Platinkomplexe durch eventuelle Reaktionen zu unterbinden. Durch Vorquellen des erhaltenen Zellpellets in einem hypotonen

Puffer und anschließender Zugabe einer Nonidet-Lösung in Kombination mit Vortexen wird die Abtrennung der am Kern anhaftenden zytosolischen Komponenten ermöglicht<sup>[155][156]</sup>. Zum lysierten Zellpellet werden nun 2 verschieden konzentrierte Saccharose-Lösungen gegeben. Da die Zellkerne die höchste Dichte aller Zellkompartimente aufweisen, können sie bei Zentrifugation des Dichtegradienten als einzige sedimentieren. Die anderen Zellbestandteile können auf diese Weise sehr einfach abgetrennt werden. Um das Ergebnis der Kernisolierung zu visualisieren, wurden die Kerne auf einen Objektträger aufgetragen und mit dem Mikroskop betrachtet. Abb. 6.3 zeigt Fotos der isolierten Zellkerne. Um den Beweis anzutreten, dass es sich dabei auch um Zellkerne handelt, wurde die DNA, Hauptbestandteil der Kerne, angefärbt. Ein gebräuchliches Mittel zur Markierung der DNA in der Fluoreszenzmikroskopie stellt das Reagenz DAPI dar. Das Ergebnis ist im rechten Bild dargestellt.



*Abb. 6.3 isolierte Zellkerne aus MCF-7-Zellen links ohne Zusätze; rechts nach Zugabe von DAPI*

Für die quantitative Bestimmung der Platinkomplexe ist die Gewinnung von intakten Zellkernen sehr wichtig, um einen Verlust an Platin während der Aufreinigung ausschließen zu können. Nach Isolierung der Zellkerne erfolgt das Lysieren der Kernpellets. Wie auch schon bei der Zellaufnahme erfolgt nun zum einen die Bestimmung des Platingehaltes mittels AAS und zum anderen die Messung des Proteingehaltes mit dem Bradford-Assay. Für die zeitabhängige Bestimmung wurden als Inkubationszeiten jeweils 2h, 8h und 24h gewählt.



### 6.2.2 Ergebnisse

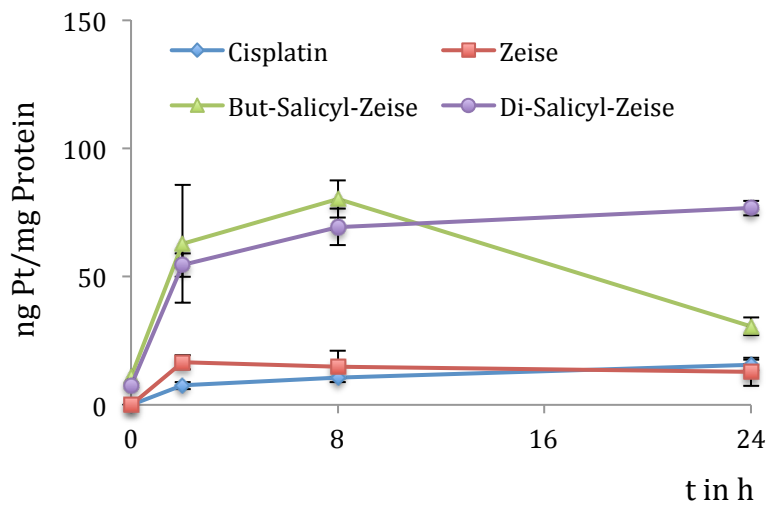


Abb. 6.4 Darstellung der Zellkernaufnahme von ausgewählten Zeise-Komplexen im Vergleich mit Cisplatin

Abb. 6.4 zeigt die zeitabhängige Zellkernaufnahme von Cisplatin im Vergleich zum Zeise-Salz, But-Salicyl-Zeise und Di-Salicyl-Zeise. Wie auch schon bei der Zellaufnahme (Abb. 6.1) zu sehen war, werden Cisplatin und das Zeise-Salz in annähernd gleichen Mengen im Zellkern in sehr geringen Größenordnungen aufgenommen. Das Di-Salicyl-Zeise wird von den hier dargestellten Zeise-Komplexen quantitativ am meisten im Zellkern angereichert. Bei der Zellaufnahme zeigte noch der But-Salicyl-Zeise-Komplex die höchste Anreicherung. Auffällig ist dabei der starke Abfall des But-Salicyl-Zeise-Gehaltes im Kern vom 8h-Wert hin zum 24h-Wert. Auch bei der Zellaufnahme konnte dieser Abfall bei einigen Komplexen beobachtet werden.

In Tabelle 6.2 ist die Kernaufnahme nach 2h und nach 24h von allen untersuchten Platinkomplexen dargestellt. Dabei wird die Abnahme des Platiningehaltes bei vielen Komplexen hin zum 24h-Wert sehr deutlich sichtbar und liefert einen weiteren Hinweis auf den vermuteten aktiven Auswärtstransport. Wie schon bei der Zellaufnahme festgestellt, ist der Abfall der Platinkonzentration beim Di-Indo-Zeise am größten. War der But-Indo-Zeise-Komplex bei der Zellaufnahme nach 24h der am stärksten angereicherte Komplex, so ist es bei der Kernanreicherung der Di-Indo-Zeise-Komplex.

Die Gegenüberstellung der Zellaufnahme mit der Zellkernaufnahme zeigt, dass ein großer Anteil des in die Zelle aufgenommenen Platinkomplexes auch weiter in den Kern gelangt. Bei der Zellaufnahme wird das gefundene Platin auf den Gesamtproteingehalt der Zelle bezogen, während bei der Zellkernaufnahme der Bezug auf die Kernproteine erfolgt. Damit kann bei einigen Verbindungen (But-Indo-Zeise, Di-Indo-Zeise und But-Diclo-Zeise) das höhere Platin/Protein-Verhältnis bei der Kernaufnahme im Vergleich zur Zellaufnahme erklärt werden.

Platinkomplex	Kernaufnahme ng Pt/mg Protein nach 2h $\pm$ sdv	Kernaufnahme ng Pt/mg Protein nach 24h $\pm$ sdv
Cisplatin	7,5 $\pm$ 1,5	15,6 $\pm$ 2,1
Zeise	16,5 $\pm$ 2,8	12,9 $\pm$ 5,5
But-Salicyl-Zeise	62,8 $\pm$ 23,0	30,7 $\pm$ 3,5
Di-Salicyl-Zeise	54,5 $\pm$ 4,6	76,7 $\pm$ 2,8
But-Napro-Zeise	117,6 $\pm$ 13,6	125,0 $\pm$ 36,3
Di-Napro-Zeise	179,2 $\pm$ 2,5	117,4 $\pm$ 59,4
But-Ibu-Zeise	316,1 $\pm$ 83,3	132,2 $\pm$ 13,2
Di-Ibu-Zeise	111,3 $\pm$ 18,4	52,1 $\pm$ 25,2
But-Indo-Zeise	234,9 $\pm$ 121,1	114,2 $\pm$ 42,8
Di-Indo-Zeise	563,6 $\pm$ 55,9	219,7 $\pm$ 33,2
But-Diclo-Zeise	205,4 $\pm$ 5,8	64,8 $\pm$ 27,1
Di-Diclo-Zeise	64,4 $\pm$ 1,8	30,9 $\pm$ 11,2
Phenacryl-Zeise	129,6 $\pm$ 6,1	68,4 $\pm$ 10,7
Br-Phenacryl-Zeise	80,6 $\pm$ 20,1	31,1 $\pm$ 5,4
But-Cele-Zeise	114,6 $\pm$ 24,3	124,3 $\pm$ 35,1

Tabelle 6.2 Zellkernaufnahme von NSAR-Zeise-Komplexen nach 2h und nach 24h

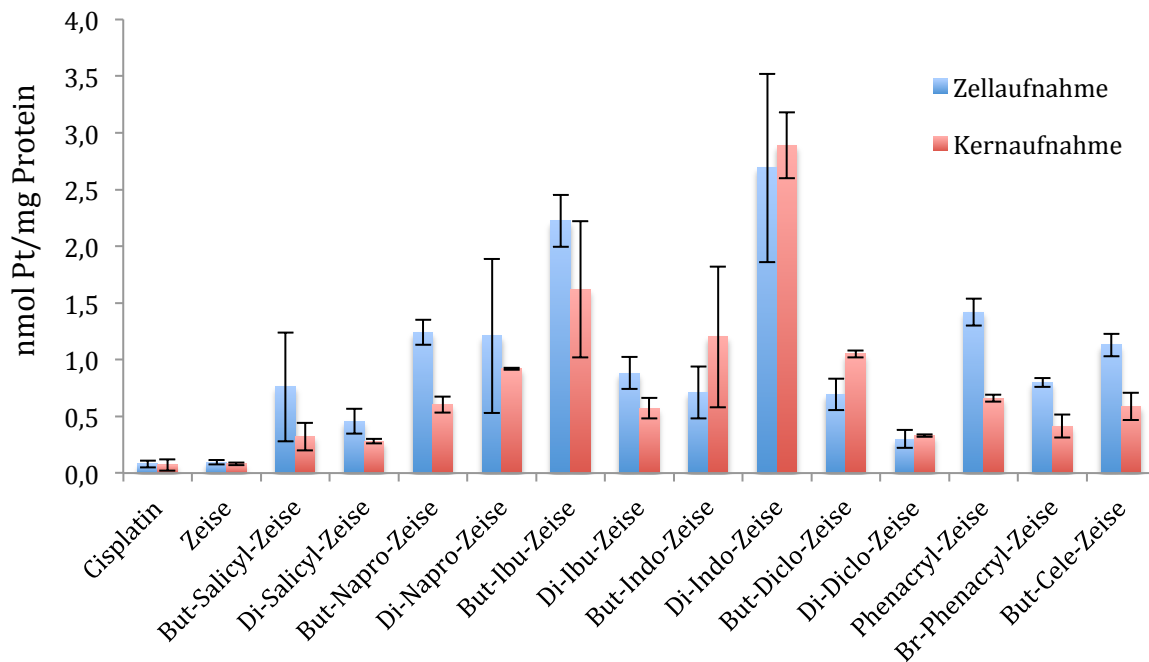


Abb. 6.5 Vergleich Zellaufnahme mit Zellkernaufnahme

Ziel der Untersuchung von Zellaufnahme und Zellkernaufnahme war es, die Ursache der geringen antiproliferativen Effekte der NSAR-Zeise-Komplexe zu finden. Die Vermutung einer

unzureichenden Aufnahme konnte jedoch widerlegt werden. Die Komplexe werden im Vergleich zu Cisplatin stärker in die Zelle aufgenommen und auch in größerem Umfang im Zellkern angereichert. Dabei scheint kein direkter Zusammenhang zwischen der Menge des aufgenommenen Komplexes und der resultierenden Zytotoxizität zu bestehen. Auffällig ist bei einigen Komplexen die Abnahme der zellulären Konzentration mit steigender Inkubationszeit. Der hier beobachtete Zeitraum betrug 24h. Der erste Zeitpunkt für die Ermittlung des Zellwachstums beim Zytotoxizitätstest erfolgt jedoch erst nach 48h. Es muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Zellen in der Lage sind, die Platinkomplexe aktiv wieder aus der Zelle zu transportieren. Dadurch könnte es den Zellen gelingen, nachhaltige Schäden durch die Platinkomplexe zu vermeiden.

Desweiteren wird die DNA als Target zur Vermittlung antiproliferativer Effekte vermutet. Daher muss in weiteren Untersuchungen zunächst geklärt werden, ob die NSAR-Zeise-Komplexe überhaupt in der Lage sind, an die DNA zu binden.

## 7 DNA-Bindungsstudien

Platinkomplexe sind dafür bekannt, ihre Zytotoxizität über die Bindung an die DNA zu vermitteln. Dabei ist das Cisplatin eines der am besten untersuchten Komplexe hinsichtlich der Bindung an Zellbestandteile<sup>[157]</sup>. Fraktionierungsversuche an Leukämiezellen der Maus ergaben die Bindung von Cisplatin zu 5-10% an unlösliche Zellfragmente wie Membranbestandteile. 20% des Cisplatins wurden in der mit Ethanol gefällten Fraktion, die hauptsächlich DNA und RNA enthält, gefunden und weitere 20%-50% waren in der Phenol-löslichen Fraktion zusammen mit den Proteinen enthalten. Weitere 20-55% waren weder mit Phenol noch mit Ethanol abzutrennen. Man geht davon aus, dass es sich dabei um zum Teil intakten Platinkomplex und um Reaktionsprodukte mit kleineren Biomolekülen handeln könnte<sup>[158]</sup>. Weiterhin wird angenommen, dass nur ca. 1% des in die Zelle aufgenommenen Cisplatins an die DNA bindet<sup>[159]</sup>. Dabei kann die Bindung an die DNA grundsätzlich an allen Basen erfolgen. Es ist jedoch bekannt, dass die Bindung bevorzugt am nucleophilsten Zentrum, dem N-7-Atom des Guanins, erfolgt. Nach anfänglicher Bindung erfolgt zu 65% ein intrastrand crosslink zum benachbarten Guanin, zu 25% ein intrastrand crosslink zum benachbarten Adenin und zu 1% ein interstrand crosslink, der zur Quervernetzung der beiden DNA-Stränge führt<sup>[160][161]</sup>. Ebenfalls bekannt, aber mit wenig Einfluss auf den Wirkmechanismus von Cisplatin, sind DNA-Protein-Vernetzungen und Monoaddukte (Abb. 7.1). Bevor das Cisplatin jedoch an die DNA binden kann, muss es zunächst in seine reaktive Form überführt werden. Nach intravenöser Gabe bleibt durch die hohe extrazelluläre Chloridkonzentration (ca. 100mM) der Platinkomplex unverändert. Nach zellulärer Aufnahme liegt eine bedeutend geringere Chloridkonzentration vor (ca. 4mM)<sup>[162]</sup>. Diese Änderung bedingt einen Ligandenaustausch der beiden Chloroliganden gegen Aqualiganden, wobei der Platinkomplex eine Ladungsänderung von neutral hin zu zweifach positiv durchläuft. Die Aqualiganden stellen sehr gute Abgangsgruppen dar und ermöglichen die Bindung an die DNA-Basen. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und dem positiv geladenem *cis*-Diamminechloro-aquaplatin(II)-Komplex beschleunigen die Bindung. Da die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der NSAR-Zeise-Komplexe deutlich hinter den Erwartungen zurück geblieben sind, soll das Bindungsvermögen an die DNA untersucht werden.

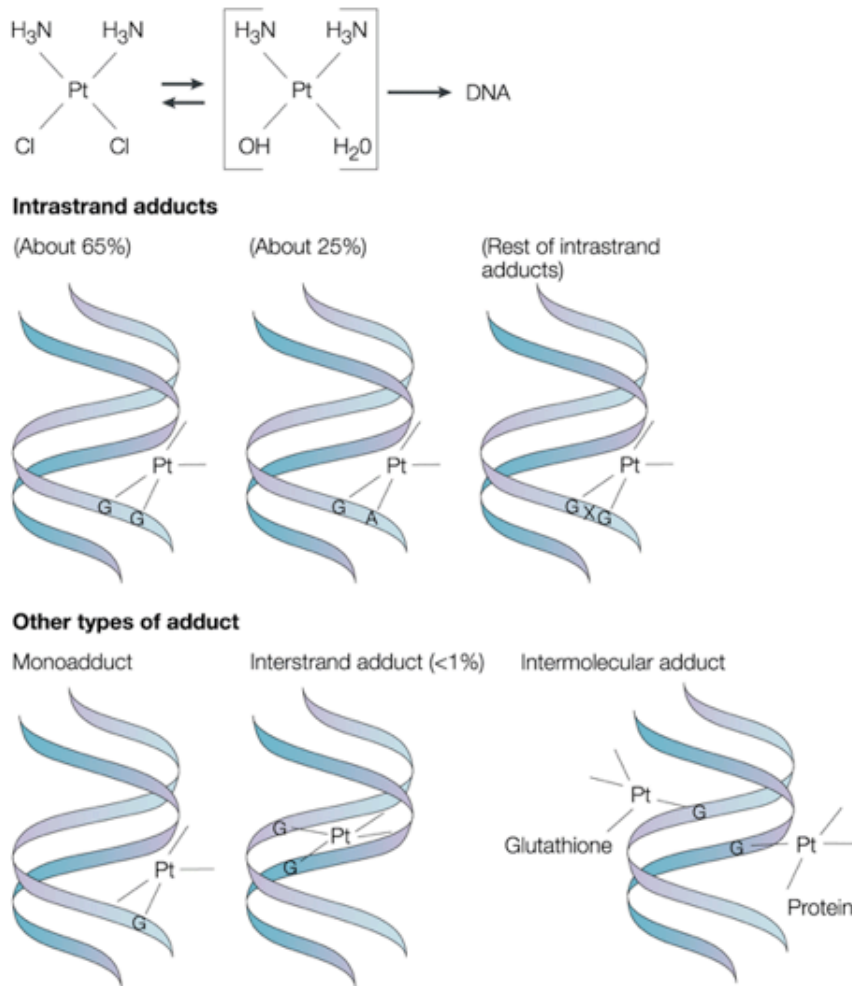


Abb. 7.1 schematisch dargestellte Cisplatin-DNA-Addukte<sup>[163]</sup>

## 7.1 DNA-Bindung an isolierter DNA

Als isolierte DNA ist Lachssperma-DNA verwendet worden. Dazu wurde eine DNA-Lösung in PBS hergestellt und mit dem zu untersuchenden Platinkomplex inkubiert. In definierten Zeitabständen ist ein Aliquot der Lösung entnommen und die DNA mit Ethanol gefällt worden. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde in Wasser gelöst. Um den Platingehalt zu bestimmen, erfolgte die Vermessung der Lösung mittels AAS. Für die Gehaltsbestimmung der DNA wurde bei 260nm UV-photometrisch quantifiziert. Aus beiden Messwerten kann das Nucleosid/Substanzverhältnis berechnet werden. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um eine bereits beschriebene Methode<sup>[164]</sup>, die an einigen Stellen leicht abgewandelt wurde<sup>[165]</sup>.

Strukturell gesehen kann bei den NSAR-Zeise-Verbindungen der Austausch von 3 Chloroliganden gegen Aqualiganden erfolgen. Resultat wäre wie beim Cisplatin ein zweifach positiv geladener Platinkomplex, der in dieser reaktiven Form in der Lage sein sollte, an die DNA binden zu können.

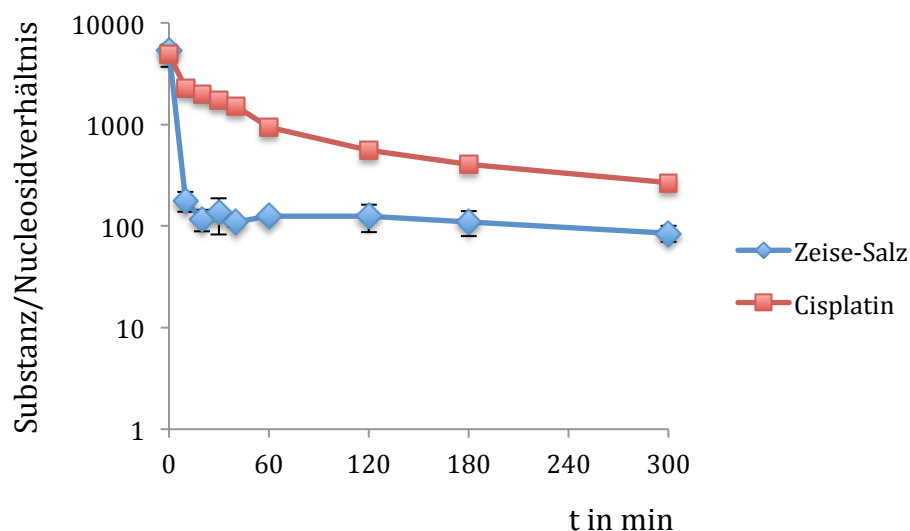


Abb. 7.2 zeitabhängige Darstellung der Bindung von Cisplatin und Zeise-Salz an isolierter DNA

Das Zeise-Salz zeigt verglichen mit Cisplatin eine deutlich schnellere DNA-Bindung. Auch das am Ende erreichte Substanz/Nucleosidverhältnis ist beim Zeise-Salz kleiner (Abb. 7.2). Das heißt, dass beim Cisplatin quantitativ weniger Platin gebunden hat als beim Olefin-Platinkomplex. Wie schon oben angedeutet, kann dies mit der Anzahl der Abgangsgruppen erklärt werden. Dazu kommt, dass der Ethenligand einen stärkeren Transeffekt im Vergleich zu den Amingruppen des Cisplatins aufweist und daraus eine erhöhte Reaktivität des Zeise-Salzes abgeleitet werden kann. Im Zytotoxizitätstest konnte beim Zeise-Salz kein proliferationshemmender Effekt festgestellt werden. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert lag oberhalb der Konzentration von  $50\mu\text{M}$ . Eine Erklärung für die nicht vorhandenen toxischen Effekte kann mit dem Bindungsvermögen an isolierter DNA nicht gefunden werden. Ebenfalls untersucht wurde die zeitabhängige Bindung an isolierter DNA von den But-NSAR-Zeise- und Di-NSAR-Zeise-Komplexen. Tabelle 7.1 zeigt das zu jeweils 3 Zeitpunkten ermittelte Nucleosid/Substanzverhältnis.

Platinkomplex	Nucleosid/Substanzverhältnis $\pm$ sdv		
	10min	60min	300min
<b>Cisplatin</b>	2284 $\pm$ 404	947 $\pm$ 99	268 $\pm$ 12
<b>Zeise</b>	177 $\pm$ 39	126 $\pm$ 13	85 $\pm$ 15
<b>But-Salicyl-Zeise</b>	76 $\pm$ 23	34 $\pm$ 12	25 $\pm$ 5
<b>Di-Salicyl-Zeise</b>	291 $\pm$ 14	119 $\pm$ 12	24 $\pm$ 14
<b>But-Napro-Zeise</b>	149 $\pm$ 42	67 $\pm$ 11	30 $\pm$ 10
<b>Di-Napro-Zeise</b>	64 $\pm$ 5	46 $\pm$ 1	25 $\pm$ 4
<b>But-Ibu-Zeise</b>	209 $\pm$ 46	68 $\pm$ 2	38 $\pm$ 8
<b>Di-Ibu-Zeise</b>	134 $\pm$ 45	94 $\pm$ 23	64 $\pm$ 21
<b>But-Indo-Zeise</b>	101 $\pm$ 16	76 $\pm$ 13	37 $\pm$ 3
<b>Di-Indo-Zeise</b>	271 $\pm$ 203	208 $\pm$ 23	72 $\pm$ 8
<b>But-Diclo-Zeise</b>	47 $\pm$ 6	143 $\pm$ 94	23 $\pm$ 8
<b>Di-Diclo-Zeise</b>	192 $\pm$ 75	60 $\pm$ 30	57 $\pm$ 24
<b>Phenacryl-Zeise</b>	162 $\pm$ 38	108 $\pm$ 46	60 $\pm$ 17
<b>Br-Phenacryl-Zeise</b>	300 $\pm$ 26	230 $\pm$ 59	51 $\pm$ 13
<b>But-Cele-Zeise</b>	273 $\pm$ 18	76 $\pm$ 5	111 $\pm$ 1

Tabelle 7.1 Nucleosid/Substanzverhältnis, bestimmt an isolierter DNA von NSAR-Zeise-Komplexen zu 3 verschiedenen Zeitpunkten

Dabei kann man feststellen, dass bei allen NSAR-Zeise-Komplexen nach 10min mehr Platin an die DNA gebunden hat als bei Cisplatin. Das Nucleosid/Substanzverhältnis nach 10min liegt bei den NSAR-Zeise-Komplexen in der gleichen Größenordnung, die das Cisplatin nach 5h erreicht. Für die Inkubation wird ein Nucleosid/Substanzverhältnis von 20 eingesetzt. Nach Fällung der DNA ist in vielen Fällen nach 5h das Ausgangsverhältnis nahezu wieder erreicht (Tabelle 7.1) Das bedeutet, dass die eingesetzte Menge an Platinkomplex fast quantitativ an die DNA gebunden hat. Unterschiede zwischen den monomeren NSAR-Zeise-Komplexen und den dimeren NSAR-Zeise-Komplexen lassen sich nicht feststellen. Damit scheint der Ligand keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu nehmen. Um weitere Erkenntnisse über die Art der DNA-Interaktion zu bekommen, wurden weitere Untersuchungen wie CD-Spektroskopie und Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur durchgeführt. Aus den Ergebnissen beider Methoden kann vielleicht geklärt werden, ob eine kovalente Bindungen eine Rolle spielen oder die Komplexe die Struktur der DNA beeinflussen.

## 6.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Circulardichroismus ist eine Form der Spektroskopie im UV/VIS-Bereich, bei der die unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht einer optisch aktiven Substanz gemessen wird. Sie wird unter anderem zur Aufklärung der Sekundärstruktur

von Proteinen und der DNA benutzt. Die CD-Spektroskopie wurde durchgeführt, um Hinweise auf die Interaktion von NSAR-Zeise-Komplexen mit der DNA zu erhalten. Obwohl nur der Zucker der Nukleotide chiral ist, führt die spezifische strukturelle Anordnung der Basen zu einer übergeordneten Asymmetrie und damit zu einem verstärkten CD-Signal abhängig von der Sekundärstruktur. Dabei sind 3 DNA-Konformationen bekannt: A-Form, B-Form und Z-Form (Abb.7.3). Die Unterschiede der verschiedenen DNA-Formen liegen z.B. in der Anzahl der Basenpaare pro Windung, dem Abstand der Basenpaare untereinander, und der Konformation der Ribose<sup>[166][167]</sup>.

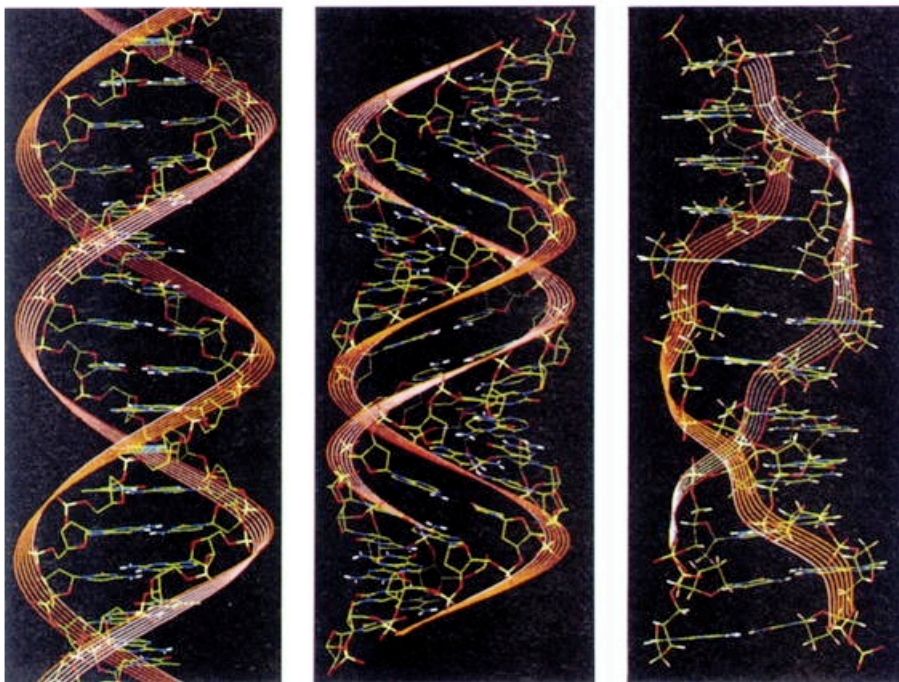


Abb. 7.3 DNA-Konformationen; B-DNA links, A-DNA mittig und Z-DNA rechts<sup>[168][169]</sup>

Die am häufigsten vorliegende Konformation unter physiologischen Bedingungen ist die B-Form. Änderungen im CD-Spektrum von B-DNA im Bereich von 220-350nm sind ein gebräuchliches Mittel, um die Interaktion von Metallkomplexen zu verfolgen<sup>[170][171]</sup>.



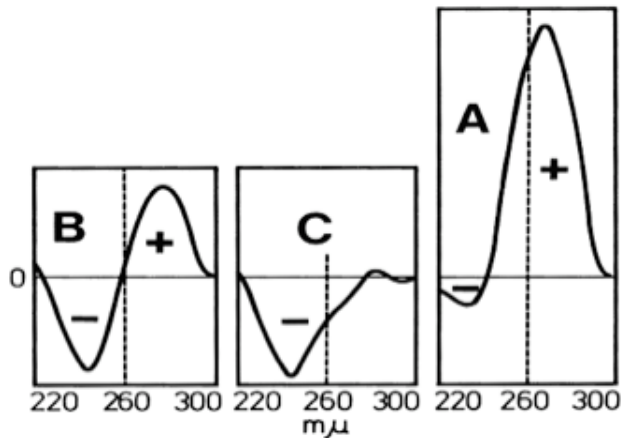


Abb. 7.4 Skizze von CD-Spektren der reinen DNA-Konformationen B, C (bzw. Z) und A<sup>[172]</sup>

Die CT-DNA, die in der B-Form vorliegt, besitzt zwei deutlich erkennbare Signale. Dabei wird das positive Signal bei 276nm durch die Basenstapelung hervorgerufen, während die negative Bande bei 244nm einer charakteristischen Absorption der Helixkonformation zugeordnet werden kann. Abb. 7.5 zeigt das CD-Spektrum von reiner CT-DNA und mit NSAR-Zeise-Komplexen inkubierter CT-DNA. Als Auswahl wurde zum einen das Zeise-Salz genommen, das keinerlei zytotoxisches Potenzial zeigte. Zum anderen wurde das But-Napro-Zeise und das Di-Napro-Zeise gemessen, um eventuelle Unterschiede zwischen monomeren und dimeren NSAR-Liganden am Platin aufzudecken. Stellvertretend für die COX-2-selektiven Liganden wurde der But-Br-Phenacryl-Zeise-Komplex vermessen. Dabei fällt auf, dass keinerlei Unterschiede in allen aufgenommenen CD-Spektren erkennbar sind. Minimale Abweichungen von der Kurve der CT-DNA lassen sich nur im Bereich von 244nm feststellen. Am dort bestehenden Minimum zeigen alle getesteten NSAR-Zeise-Komplexe eine verringerte Absorption. Eine Beeinflussung der DNA-Konformation durch NSAR-Zeise-Komplexe kann daraus aber nicht abgeleitet werden. Eine Interkalation der Platinkomplexe in die DNA-Doppelhelix war auch nicht unbedingt zu erwarten. Strukturell gesehen weisen die Substanzen durch ihre sehr unterschiedlichen NSAR-Liganden nicht die nötige Planarität auf. Viel wahrscheinlicher ist die Ausbildung kovalenter Bindungen an die Basen der DNA-Stränge.

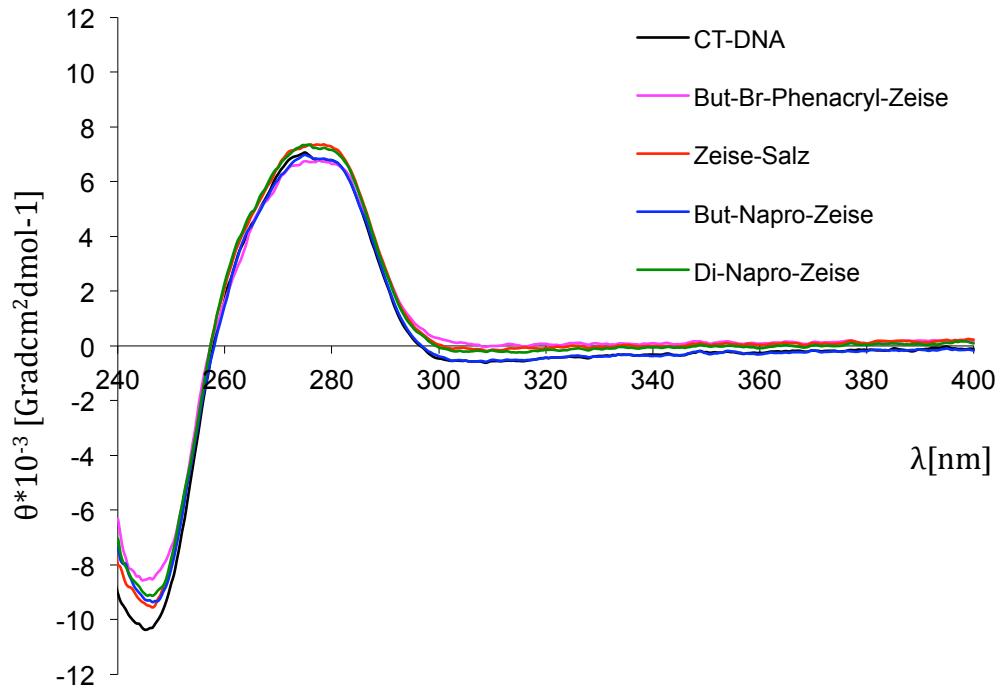


Abb. 7.5 CD-Spektrum von DNA und mit NSAR-Zeise-Komplex inkubierter DNA

## 7.2 Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur

Bei der DNA handelt es sich um die Bibliothek unserer Zellen. Die Aufklärung der Struktur erfolgte 1953 durch Watson und Crick<sup>[173]</sup>. Sie besteht aus 2 Einzelsträngen, die komplementär zueinander angeordnet sind. Die daraus entstehende DNA-Doppelhelix wird durch die Wechselwirkung verschiedener Kräfte zusammengehalten. Eine wichtige Rolle spielen dabei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren (Abb. 7.6). Durch Erhitzen der DNA erfolgt die Trennung in ihre beiden Einzelstränge. Dabei ist die DNA-Schmelztemperatur definiert als die Temperatur, bei der 50% der Doppelhelix zum Einzelstrang dissoziiert vorliegen. Eine sehr weit verbreitete Methode, um den Schmelzvorgang der DNA zu ermitteln, ist die Messung der temperaturabhängigen Absorptionsänderung bei 260nm mittels UV-Spektroskopie. Dabei kann mit steigender Temperatur eine Zunahme der Absorption beobachtet werden (hyperchromer Effekt). Dies beruht auf der Tatsache, dass der molare Absorptionskoeffizient der Doppelhelix aufgrund der Basenstapelung geringer ist, als der molare Absorptionskoeffizient des Einzelstranges. Wenn man nun die Änderung der UV-Absorption in Abhängigkeit der Temperatur aufzeichnet, ergibt sich eine sigmoide Schmelzkurve. Durch die 1. Ableitung der Kurvenfunktion lässt sich der Schmelzpunkt als Maximum darstellen (Abb. 7.7).

Die Schmelztemperatur der DNA ist abhängig von der Anzahl an GC- bzw. AT-Basenpaaren. Das GC-Basenpaar ist aufgrund der 3 Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 7.6) stabiler im Vergleich zum AT-Basenpaar und lässt sich erst bei höheren Temperaturen voneinander trennen. Daher bedingt eine GC-reiche DNA-Sequenz einen höheren Schmelzpunkt<sup>[174]</sup>.

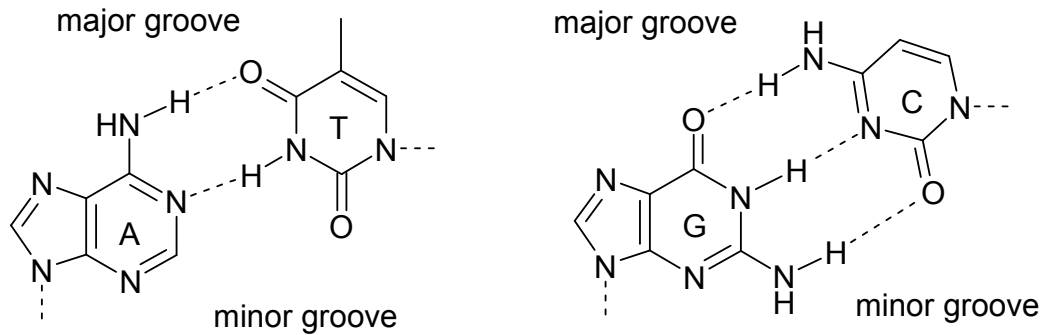


Abb. 7.6 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA

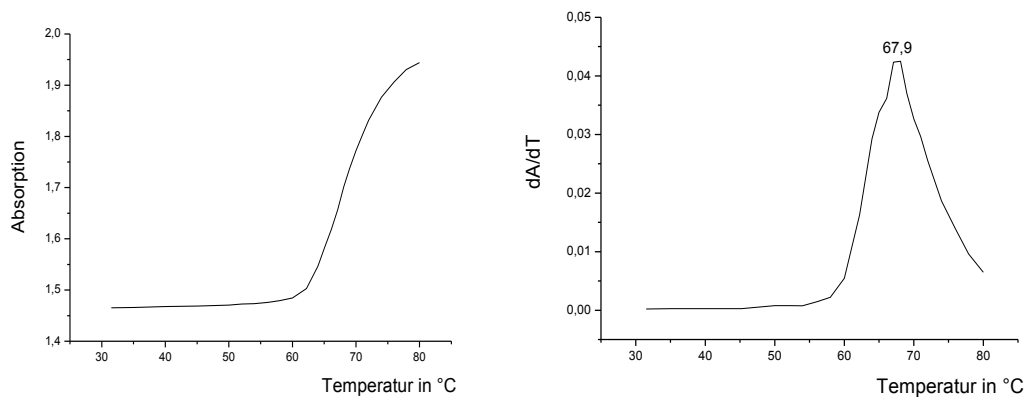


Abb. 7.7 Schmelzpunktdiagramm von But-Salicyl-Zeise

Die Schmelztemperatur der reinen CT-DNA beträgt 67°C. Die Substanzen wurden 1h mit der DNA in einem Natriumphosphat-Puffer inkubiert und anschließend die Schmelzpunktkurve aufgenommen.

Tabelle 7.2 zeigt die ermittelten Schmelztemperaturen von mit NSAR-Zeise-Komplexen inkubierter DNA.

Platinkomplex	DNA-Schmelztemperatur $T_m$ in °C
CT-DNA	67,0
Zeise	67,9
But-Salicyl-Zeise	67,9
But-Napro-Zeise	67,1
Di-Napro-Zeise	68,4
But-Indo-Zeise	68,0
Di-Indo-Zeise	67,1
But-Phenacryl-Zeise	68,1
But-Br-Phenacryl-Zeise	67,0

Tabelle 7.2 Schmelztemperatur von CT-DNA inkubiert mit NSAR-Zeise-Komplex

Der Einfluss der NSAR-Zeise-Komplexe wurde exemplarisch an einigen Substanzen überprüft. Dabei lässt sich keine signifikante Erhöhung bzw. Erniedrigung gegenüber der reinen DNA-Schmelztemperatur feststellen. Di-Napro-Zeise mit einem Schmelzpunkt von 68,4°C zeigt mit einer Erhöhung um 1,4°C die größte Zunahme Schmelztemperatur, wobei auch diese Differenz nicht signifikant ist, geht man von einem Fehler von  $\pm 1^\circ\text{C}$  aus. Durch Veränderungen der Schmelztemperatur  $T_m$  können Rückschlüsse auf die Art der DNA-Interaktion und auf die Bindungsstärke gezogen werden. Dabei führt eine Schwächung der DNA-Doppelhelix zur Abnahme der Schmelztemperatur. Oftmals kann dies ein Hinweis auf kovalente Bindungen sein<sup>[175]</sup>. Durch die Bindung an die DNA vergrößert sich der Abstand der Windung. Folglich wird die helikale Struktur geschwächt und kann schon bei geringeren Temperaturen zur ungeordneten random-coil-Struktur übergehen<sup>[176]</sup>. Bindet allerdings ein kationischer Komplex an die DNA, so entsteht eine Anziehung zwischen dem negativen Phosphatrückgrat der DNA und dem positiven Komplex. Durch diesen Vorgang würde die Schmelztemperatur wieder steigen<sup>[177]</sup>. Bei Stärkung der Doppelhelix erhöht sich der Schmelzpunkt. Beispiel dafür sind Interkalatoren, die sich zwischen den Strängen einlagern und so die Doppelhelix stärken<sup>[178][179]</sup>. Auch Platinkomplexe können in die DNA interkalieren, wenn sie als strukturelle Voraussetzung eine planare räumliche Anordnung aufweisen. Die hier ermittelten Schmelztemperaturen unterschieden sich viel zu gering von der Schmelztemperatur der reinen DNA. Zieht man die Ergebnisse der CD-Spektroskopie hinzu, so kann eine Interkalation der NSAR-Zeise-Komplexe ausgeschlossen werden. Allerdings konnte auch die vermutete kovalente Bindung der Platinkomplexe mit diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Um diese nachzuweisen, könnte man beispielsweise eine  $^1\text{H-NMR}$  Kinetik mit 5'-GMP aufnehmen.

### 7.3 Untersuchung der DNA-Bindung in MCF-7-Zellen

Die Fähigkeit der NSAR-Zeise-Komplexe, an DNA zu binden, haben die Untersuchungen unter Punkt 7.1 bewiesen. Dennoch stellt sich die Frage, warum keine ausreichende Proliferationshemmung der Zellen festgestellt wird. Die Ergebnisse der Zell- sowie Zellkernaufnahmen belegen, dass ausreichend Platinkomplex bis in den Zellkern, zum vermeintlichen Target, gelangt. Allerdings kann dabei nicht festgestellt werden, ob der Platinkomplex noch intakt dort ankommt. Es besteht die Möglichkeit, dass der Komplex schon vor Erreichen des Targets bereits mit anderen Nucleophilen reagiert hat und lediglich in inaktivierter Form den Zellkern erreicht. Die Untersuchung des Platingehaltes an zellulärer DNA soll darüber Aufschluss geben. Dazu wurden MCF-7-Zellen für 2h mit 10 $\mu$ M Platinkomplex inkubiert und anschließend pelletiert. Nach Isolierung der Zellkerne wurden diese zuerst mit Proteinase und anschließende mit RNAse verdaut. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung durch eine Chloroform-Phenolextraktion<sup>[180][181]</sup>. Am Ende wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Die hier angewendete Methode wurde bereits im Arbeitskreis Gust etabliert und publiziert<sup>[145][182]</sup>.

Die Aufnahme eines UV-Spektrums vom DNA-Pellet gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der isolierten DNA. Dabei soll hier vor allem die Abtrennung der Proteine gewünscht sein. Auf die Anwesenheit von eventuell vorhandener RNA wurde hier nicht geprüft. Um die Reinheit zu bestimmen, werden verschiedene Absorptionsquotienten bei verschiedenen Wellenlängen gebildet. Zum einen gibt es das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis, das über 1,8 liegen sollte. Ist es kleiner liegen noch große Mengen Protein neben der DNA vor. Bei 280nm werden vor allem die aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan erfasst, die bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Allerdings werden sehr große Mengen an Proteinen gebraucht (>60%), um ein Verhältnis <1,8 zu erhalten<sup>[183][184]</sup>. Deshalb wird ein zweiter Quotient der Wellenlängen  $A_{260}/A_{230}$  hinzugezogen. Hier wird ausgenutzt, dass die Anwesenheit von Proteinen zu einer Verschiebung des Minimums hin zu größeren Wellenlängen führt. Bei Abwesenheit von Proteinen sollte das Minimum unter 231nm liegen<sup>[185]</sup>. Das gewünschte Verhältnis soll >2,2 sein.

Abbildung 7.8 zeigt exemplarisch das UV-Spektrum einer aus MCF-7-Zellen isolierter DNA. In der nebenstehenden Tabelle sind die berechneten Quotienten dargestellt und erfüllen alle oben beschriebenen Reinheitskriterien.

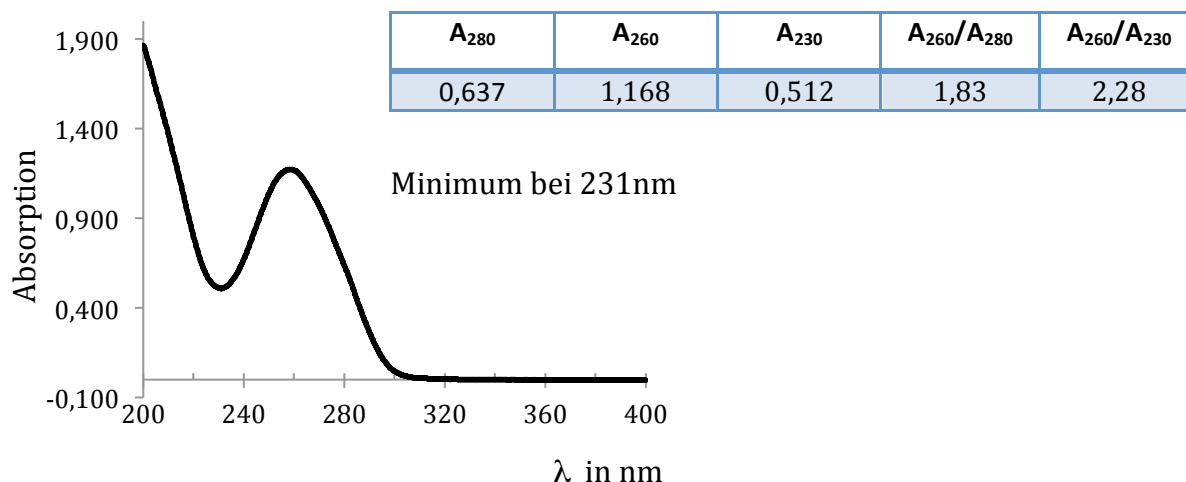


Abb. 7.8 UV-Spektrum von isolierter DNA aus MCF-7-Zellen und dazu berechnete Absorptionsquotienten zur Charakterisierung der Reinheit

Platinkomplex	Bindung an isolierter DNA aus Lachssperma [nmol Pt/mg DNA] nach 2h	DNA-Bindung in MCF-7-Zellen [nmol Pt/mg DNA] nach 2h
<b>Cisplatin</b>	6,0 ± 0,3	0,7 ± 0,3
<b>Zeise</b>	25,6 ± 0,5	0,5 ± 0,1
<b>But-Salicyl-Zeise</b>	86,2 ± 7,9	1,0 ± 0,3
<b>Di-Salicyl-Zeise</b>	36,5 ± 13,9	0,4 ± 0,1
<b>But-Napro-Zeise</b>	76,1 ± 21,5	0,7 ± 0,3
<b>Di-Napro-Zeise</b>	104,3 ± 8,6	1,3 ± 0,6
<b>But-Ibu-Zeise</b>	84,7 ± 0,6	1,5 ± 0,9
<b>Di-Ibu-Zeise</b>	28,7 ± 6,4	0,8 ± 0,3
<b>But-Indo-Zeise</b>	51,3 ± 14,0	3,1 ± 1,7
<b>Di-Indo-Zeise</b>	18,2 ± 5,7	7,2 ± 2,4
<b>But-Diclo-Zeise</b>	45,6 ± 0,5	1,4 ± 0,5
<b>Di-Diclo-Zeise</b>	118,9 ± 4,8	0,5 ± 0,1
<b>Phenacryl-Zeise</b>	63,4 ± 16,8	0,5 ± 0,1
<b>Br-Phenacryl-Zeise</b>	36,8 ± 6,8	0,7 ± 0,1
<b>But-Cele-Zeise</b>	55,4 ± 12,1	0,8 ± 0,1

Tabelle 7.3 Gegenüberstellung des gefundenen Platingehaltes an Lachssperma-DNA und aus MCF-7-Zellen isolierter DNA nach einer Inkubationszeit von je 2h

War die Bindung der Zeise-NSAR-Komplexe an isolierter DNA (Lachssperma) noch deutlich der Menge an gebundenem Cisplatin überlegen, so relativiert sich dieses Verhältnis bei der DNA-Bindung unter zellulären Bedingungen (Tabelle 7.3). Die Menge an gebundenem Platin liegt in der gleichen Größenordnung wie Cisplatin. Nur die Indo-Zeise-Verbindungen weisen mit ca. 3

nmol Pt/mg DNA für But-Indo-Zeise und ca. 7 nmol Pt/mg DNA für Di-Indo-Zeise eine deutlich erhöhte Bindungskapazität auf. Allerdings scheint die Menge des gebundenen Platins nicht mit der Zytotoxizität zu korrelieren (Abb. 7.9). Vergleicht man die beiden Indo-Zeise Verbindungen, so zeigt die But-Indo-Zeise-Verbindung höhere zytotoxische Effekte bei weniger gebundenem Platin an der DNA. Ein weiterer Vergleich der Naproxen-Zeise-Verbindungen bestätigt den nicht vorhandenen Einfluss der DNA-Bindung auf die proliferationshemmenden Effekte.

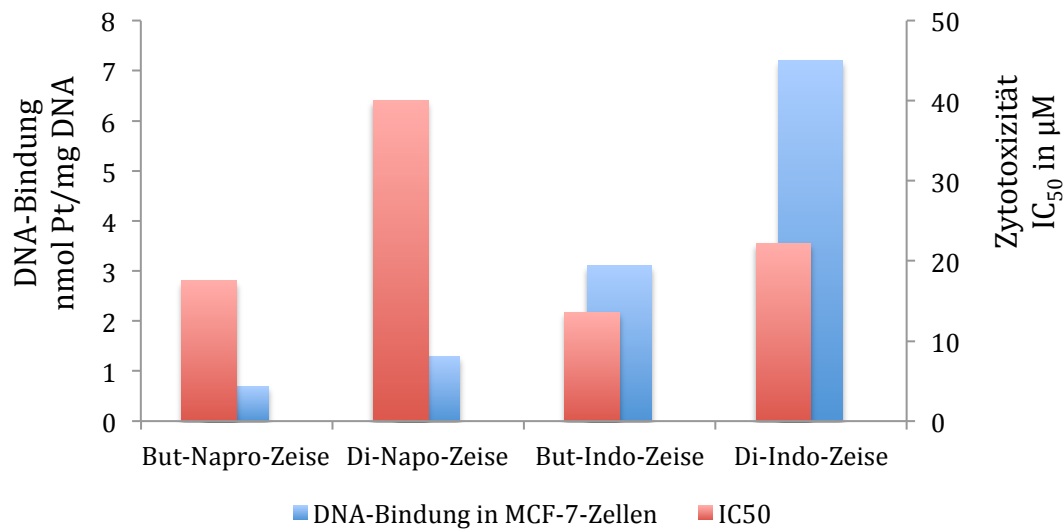


Abb. 7.9 Gegenüberstellung von gebundenem Platin an zellulärer DNA mit den ermittelten IC<sub>50</sub>-Werten der Zytotoxizitätsuntersuchung ebenfalls an MCF-7-Zellen

Der geringe Einfluss der DNA-Bindung könnte auf die Vermittlung zytotoxischer Effekte über andere zelluläre Targets hindeuten. Alternativ könnten DNA-Platin-Addukte diskutiert werden, die schnell durch Reparaturenzyme erkannt<sup>[186]</sup> und beseitigt werden und dadurch keine antiproliferativen Effekte auslösen können. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte die Reaktion mit Proteinen sein. Die Fähigkeit der NSAR-Zeise-Komplexe mit Nucleophilen zu reagieren, zeigt sowohl die Bindung an isolierter DNA, als auch die Reaktion mit DDC (siehe Kapitel 4.3.1, Abb. 4.7). Daher wäre denkbar, dass die Komplexe als inaktivierte Protein-Platinverbindung in den Zellkern gelangen und in inaktivierter Form nicht mehr an die DNA binden können.

## 8 Proteinbindung

Die Bindung der NSAR-Zeise-Komplexe an Proteine mit folgender Inaktivierung ist eine Möglichkeit, die geringen antiproliferativen Effekte der Komplexe zu erklären. Das Proteinbindungsvermögen von Cisplatin ist bereits gut untersucht und erklärt einige der Nebenwirkungen wie Nephro- und Ototoxizität<sup>[187]</sup>. Für die hier durchgeführte Untersuchung der Proteinbindung wurde humanes Serumalbumin verwendet. Die Serumalbumine stellen die größte Proteinfraction im Blutplasma dar. Ihre Aufgabe besteht vor allem in der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und dem Transport von wasserunlöslichen Stoffen<sup>[188]</sup> (z.B. Fettsäuren, Hormone, Arzneistoffe).

Für den Versuch wurde eine HSA-Lösung (40mg/ml) mit 10 $\mu$ M Platinkomplex bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot der Inkubationslösung entnommen und mit 10%iger TCA-Lösung gefällt. Das gefällte Protein wird zentrifugiert und der Platinegehalt im Überstand mittels AAS bestimmt.

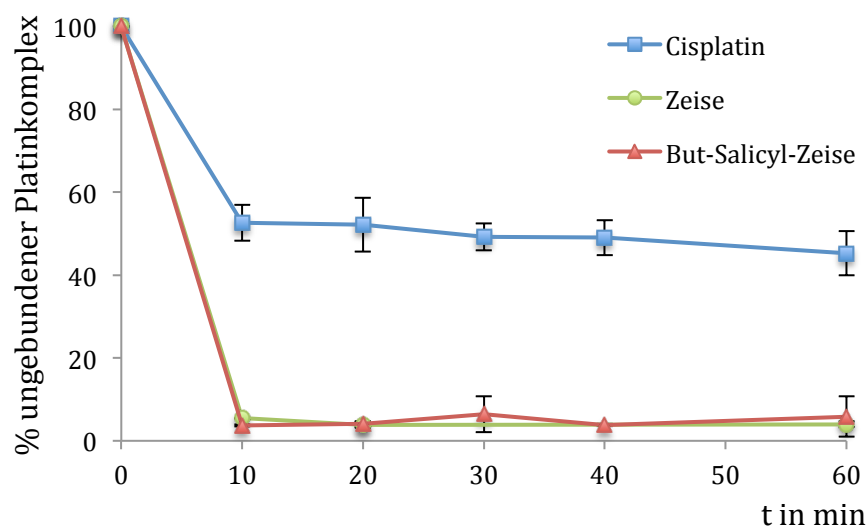


Abb. 8.1 zeitabhängige Proteinbindung von Zeise-Salz und But-Salicyl-Zeise im Vergleich mit Cisplatin

Cisplatin zeigt innerhalb der ersten 10min eine relativ starke initiale Bindung an das HSA. Danach nimmt der weitere Gehalt an Cisplatin im Überstand nur sehr langsam ab. Anders



dagegen die beiden Zeise-Verbindungen. Nach bereits 10min kann im Überstand kein Platin mehr gefunden werden (Abb 8.1). Auch die Untersuchung weiterer NSAR-Zeise-Komplexe zeigt das gleiche Verhalten. Die Ergebnisse würden für eine rasend schnelle Inaktivierung der NSAR-Zeise-Komplexe sprechen und die Erklärung für die geringen antiproliferativen Effekte liefern. Auch die geringe Hemmung der COX im PGE<sub>2</sub>-Assay kann durch die Inaktivierung durch Proteine erklärt werden. Die Zellaufnahmestudien wurden in FCS-freiem Medium durchgeführt. An dieser Stelle wäre interessant, die Zellaufnahme in FCS-haltigem Medium zu wiederholen. Durch eine mögliche Reaktion von FCS mit den Platinkomplexen würde dann vielleicht in einer geringeren Anreicherung resultieren. Der FCS-Zusatz enthält wichtige Wachstumsfaktoren für die Zellen. Bei kurzen Inkubationszeiten von 24h scheint das Fehlen des FCS keinen Einfluss zu spielen. Bei längeren Inkubationszeiten, wie im Falle des Zytotoxizitätstests, kann auf den Zusatz von FCS nicht verzichtet werden.

## 9 Zusammenfassende Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und biochemische Testung von NSAR-Zeise-Verbindungen. Ausgangspunkt war die Entdeckung, dass das Zeise-Salz die Fähigkeit besitzt, beide Isoformen der Cyclooxygenase in beträchtlichem Umfang zu hemmen. Durch Austausch des Ethens gegen unselektive NSAR und selektive COX-2-Hemmer sollten Platinkomplexe erhalten werden, die durch ihren Liganden eine Selektivität für eines der beiden Isoenzyme vermittelt bekommen. Die Synthese erfolgte dabei in 2 Schritten. Zunächst wurden bekannte NSAR an ihrer Säurefunktion mit einer olefinischen Seitenkette derivatisiert. Danach konnte das Platin an die eingeführte Doppelbindung komplexiert werden. Als Ausgangsverbindung wurde dabei jeweils das Zeise-Salz eingesetzt. Um einen möglichst geringen Einfluss der Seitenkette auf die Eigenschaften des Platinkomplexes zu erhalten, wurde als olefinische Seitenkette zunächst die sehr kurze Allylgruppe gewählt. Die resultierenden Platinkomplexe zeigten allerdings in wässrigen Medien eine sehr schnelle Zersetzung, die eine weitere Testung pharmakologischer Eigenschaften nicht ermöglichte. Dabei erfolgte die Spaltung des Liganden jeweils an der funktionellen Gruppe, die das NSAR mit der Allylseitenkette verknüpfte. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um einen Ester. Jedoch wurden auch stabilere funktionelle Gruppen, wie Ether und Amide, gespalten. Diskutiert wurde als Ursache der schnellen Zersetzung die Ausbildung eines intramolekularen Chelatringes, der zu einer Aktivierung des allylischen C-Atoms gegenüber Nucleophilen führt. Durch die Erweiterung der Seitenkette um eine CH<sub>2</sub>-Einheit von Propenyl- zur Butenyl-Seitenkette sollte die Chelatbildung erschwert werden. Resultat waren deutlich stabilere Komplexe, die für weitere pharmakologische Testungen verwendet werden konnten. Neben den NSAR-Monomeren wurden auch NSAR-Dimere (Homodimere) als Liganden synthetisiert. Angestrebt wurde mit den dimeren NSAR-Liganden ein verstärkter Einfluss bei der Vermittlung der Selektivität der COX-Hemmung. Aber auch diese Platinkomplexe unterlagen einer schnellen Zersetzung. Allerdings erfolgte nur die Abspaltung von einem NSAR. Das auf der anderen Seite gebundene NSAR blieb innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 72h stabil. Daher wurden die dimeren NSAR-Zeise-Komplexe ebenfalls in weitere pharmakologische Untersuchungen mit einbezogen. Bei langen Inkubationszeiten in wässrigen Medien muss jedoch die einseitige Spaltung bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Wie schon oben erwähnt, wurde das Zeise-Salz als Inhibitor von sowohl COX-1 als auch COX-2 im Arbeitskreis entdeckt. Bisher sind keine Platinkomplexe als COX-Inhibitoren in der Literatur beschrieben. Die Testung anderer Platinkomplexe, wie z.B. Cisplatin oder Kaliumtetrachloro-

platinat, zeigte keine hemmenden Fähigkeiten. Das ließ auf einen spezifischen Hemmmechanismus des Zeise-Salzes schließen. Um die Ursache der COX-Hemmung zu finden, wurden in Kooperation mit der Uni Bochum LC-MS-Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die COX-1 mit dem Zeise-Salz inkubiert und anschließend enzymatisch verdaut. Durch Auftrennung der Peptidfragmente durch RP-HPLC und Detektion mittels MS/MS konnten platinierte Aminosäuren unter Angabe der Koordinationsstelle am Enzym gefunden werden. Dabei handelte es sich bei einer der platinierten Aminosäuren um das Tyrosin<sup>385</sup>. Diese Aminosäure befindet sich im aktiven Zentrum und ist essentiell für die Bindung der Arachidonsäure in der Bindungstasche der COX. Die Platinierung an dieser Stelle dient daher sehr gut als Erklärung für die resultierende Hemmung des Enzyms in Gegenwart von Zeise-Salz. Durch den Austausch des Ethens gegen unselektive und selektive NSAR sollten Platinkomplexe mit Präferenz bzw. Selektivität hinsichtlich einer Isoform des Enzyms erhalten werden. Als unselektive NSAR wurden Ibuprofen, Naproxen, Indometacin und Diclofenac als Liganden verwendet. Um den Effekt auf die Cyclooxygenasen zu untersuchen, wurden die Platinverbindungen zunächst an isolierten Enzymen getestet. Da die Komplexe nur 10min im wässrigen Medium mit dem Enzym inkubiert wurden, konnten auch die instabilen Prop-NSAR-Komplexe untersucht werden. Dabei zeigten die Komplexe eine unterschiedlich stark ausgeprägte Präferenz für die COX-1. Die stärkste COX-1 Selektivität zeigten in annähernd gleichem Ausmaß die Ibu-Zeise und die Napro-Zeise-Verbindungen. Die Diclo-Zeise-Verbindungen wiesen neben der starken COX-1-Hemmung auch eine Zunahme der COX-2-Hemmung auf. Eine noch stärkere COX-2-Hemmung konnte bei den Indo-Zeise-Komplexen beobachtet werden. Der Einfluss der Seitenkettenlänge scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die But-NSAR-Zeise-Komplexe zeigten eine minimal stärkere Hemmung im Vergleich zu den Prop-NSAR-Zeise-Komplexen. Allerdings muss hier bedacht werden, dass dieser Effekt durch eine beginnende Spaltung der Prop-NSAR-Zeise im wässrigen Inkubationspuffer während der Inkubation mit dem Enzym hervorgerufen werden kann. Ein wenig deutlicher ist die Abnahme des inhibitorischen Potenzials von den But-NSAR-Zeise-Komplexen hin zu den dimeren NSAR-Zeise-Komplexen. Auf Grund der räumlichen Größe könnte man hier einen erschweren Zugang zur Bindungstasche des Enzyms diskutieren. Ein weiterer interessanter Effekt tritt beim Vergleich der NSAR-Zeise-Komplexe mit dem reinen NSAR auf. Sind die Ibu-Zeise- und Napro-Zeise-Komplexe in ihrer Fähigkeit die COX zu hemmen den beiden reinen NSAR Ibuprofen und Naproxen deutlich überlegen, so können die Diclo-Zeise- und Indo-Zeise-Verbindungen das inhibitorische Potenzial von Diclofenac und Indometacin nicht erreichen. Als COX-2 selektive Liganden wurden das Celecoxib und zwei (E)-2,3-Diarylacrylsäuren, die sich in ihrem aromatischen Substitutionsmuster unterscheiden, verwendet. Die Testung der Platinkomplexe führte nicht zur erhofften COX-2-Selektivität, sondern ergab erneut ein leichte

COX-1-Präferenz. Allerdings resultierte schon aus der Einführung der olefinischen Seitenkette bei den COX-2-Hemmern der Verlust der COX-2-Selektivität. Daher kann der Einfluss des Platins hier nicht abschließend diskutiert werden. Dazu müssen Liganden synthetisiert werden, die eine Doppelbindung enthalten und vor Komplexierung mit dem Platin noch COX-2 selektiv sind.

Um die Hemmung der COX im zellulären Kontext zu untersuchen, wurde der PGE<sub>2</sub>-Assay verwendet. Als Zelllinie wurde in diesem Assay die MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie verwendet, bei der eine konstitutive COX-2-Expression bekannt ist. Unter zellulären Bedingungen bleiben die NSAR-Zeise-Komplexe deutlich hinter den Erwartungen zurück. Alle Platinkomplexe zeigten geringere Effekte als die reinen NSAR.

Damit im Einklang stehen die geringen antiproliferativen Effekte aller NSAR-Zeise-Komplexe, die im Kristallviolettassay an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen ermittelt wurden. An isolierter DNA zeigen die Komplexe hervorragende Bindungseigenschaften. Nach 5 Stunden Inkubation mit der DNA kann bei allen untersuchten Komplexen ein Nucleosid/Substanzverhältnis zwischen 20 und 100 gefunden werden. Das ergibt beste Voraussetzung, um zytotoxische Effekte auf die Krebszellen über ihr DNA-Bindungsvermögen auszuüben. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen jedoch bei keinem der getesteten NSAR-Zeise-Komplexe unterhalb von 10 µM. Die Untersuchung des DNA-Bindungsvermögens erfolgte daher erneut unter zellulären Bedingungen. Nach Isolierung der DNA aus mit NSAR-Zeise-Komplexen inkubierten MCF-7-Zellen, konnte dort nur wenig gebundenes Platin nachgewiesen werden. Um eine Erklärung der schlechten pharmakologischen Eigenschaften unter zellulären Bedingungen gegenüber den hervorragenden Eigenschaften an den isolierten Targets zu finden, wurde zum einen die Zell- und Zellkernaufnahme der Komplexe und zum anderen die Reaktion mit Proteinen untersucht. Für die Zellaufnahmestudien wurden MCF-7-Zellen verwendet. Als Vergleich wurde Cisplatin getestet, da für diesen Komplex in vitro und in vivo gute pharmakologische Effekte bekannt sind. Für Cisplatin wurde einen Anreicherungsgrad von 3,7 ermittelt. In der gleichen Größenordnung liegt das Zeise-Salz, welches im Zytotoxizitätstest keinerlei Beeinflussung des Zellwachstums zeigte. In Abhängigkeit vom Liganden konnte für alle NSAR-Zeise-Komplexe ein deutlich höherer Anreicherungsgrad im Vergleich zu Cisplatin ermittelt werden. Die stärkste Aufnahme nach 24h zeigte der But-Ibu-Zeise-Komplex mit einem Anreicherungsgrad von 21,1. Auch die quantitative Bestimmung des Platiningehaltes im Zellkern zeigt, dass die Komplexe in der Lage sind, ihr Target zu erreichen.

Die Untersuchung der Proteinbindung ergab eine rasend schnelle Reaktion von NSAR-Zeise-Komplexen mit humanem Serumalbumin. Dabei ist es nicht gelungen, eine Kinetik aufzunehmen, da bereits nach 10min die Reaktion quantitativ abgelaufen war. Somit scheint die Anwesenheit von Proteinen bei der Testung unter zellulären Bedingungen die Erklärung für die schlechten pharmakologischen Eigenschaften zu sein. Die Reaktion mit den Proteinen führt zu einer

Inaktivierung der Komplexe, die mit dem Verlust der COX-Hemmung und der DNA-Bindung einhergeht.

## 10 Ausblick

Das Zeise-Salz stellt ein neues interessantes Pharmakophor in der medizinischen Chemie dar. Durch den Austausch des Ethens gegen NSAR konnte bereits eine COX-1-Selektivität erreicht werden. Die Suche nach Liganden, die geeignete strukturelle Merkmale zur Komplexierung am Platin aufweisen und gleichzeitig eine Selektivität für die COX-2 besitzen, könnte zu COX-2 selektiven NSAR-Zeise-Komplexen führen. Ein großes Problem stellt die Reaktivität der Zeise-Komplexe gegenüber Proteinen dar, die aus den 3 Chlorabgangsgruppen resultiert. Durch den Austausch von 2 Chlorliganden gegen chelatisierende Liganden, könnte die Reaktivität deutlich gesenkt werden. Dabei hat die Wahl der Liganden auch Auswirkungen auf die Gesamtladung des Komplexes. Bei Oxalat würde die negative Ladung beibehalten werden. Ethylendiamin als Ligand dagegen würde zu einem Ladungswechsel führen und einfach positiv geladene Komplexe hervorbringen. Die Veränderung der Reaktivität kann dann vergleichend für alle Komplexe an der HPLC ermittelt werden. Die Untersuchung der Zellaufnahme in Gegenwart von Hemmstoffen spezifischer Transportwege könnte Hinweise auf den Aufnahmemechanismus geben. Zellaufnahmestudien und Untersuchungen der Stabilität mit FCS-haltigem Medium würden zeigen, ob die Inaktivierung der Komplexe bereits im Medium stattfindet. In diesem Fall wäre neben der Beeinflussung der Reaktivität mit veränderten Abgangsgruppen ebenfalls das Verpacken der Zeise-Salze in Liposomen denkbar. Ein weiterer Ansatz wäre die Kopplung der negativ geladenen NSAR-Zeise-Komplexe mit den permanent kationisch geladenen Dendrimeren. Als nach außen neutral geladenes Konjugat sollten diese Verbindungen problemlos in die Zelle gelangen können. Eine in der Zelle erzwungene Dissoziation zu freiem NSAR-Zeise-Salz und Dendrimer führt zu einem Multitargetwirkstoff. Eine Entfaltung zytotoxischer Eigenschaften über die Platinierung von COX und DNA, neben den Effekten der Dendrimere, wäre denkbar.

## 11 Abstract

The aim of this thesis was the synthesis and the biochemical testing of NSAID-Zeise complexes. Starting from the observation that Zeise's salt has the ability to inhibit cyclooxygenase enzymes we exchanged the ethene for alkene-derived nonselective NSAIDs and selective COX-2 inhibitors. The synthesis was carried out in two steps. Initially established NSAIDs were equipped at their acid function with an olefinic side chain which allowed binding to platinum via the double bond. In order to keep low the influence of the side chain on the properties of the resulting platinum complex, the short allyl group has been chosen. However, this drug design led to platinum complexes which degraded very fast in aqueous media. HPLC analytic measurements indicated cleavage at the functional group between the NSAID and the allylic side chain. Esters but also the more stable ethers and amides were cleaved. A possible explanation could be the formation of an intramolecular chelate, which activates the allylic-carbon-atom toward nucleophiles. Elongation of the side chain made the chelate formation energetically unfavorable resulting in more stable complexes and allowing their use for further pharmacological tests. Besides complexes of monomeric NSAID ligands also dimers of NSAIDs were coordinated and tested for COX-inhibitory properties and cytotoxicity against various cell lines.

As mentioned above, Zeise's salt was detected as an inhibitor of COX enzymes. Other platinum complexes, e.g. Cisplatin or potassium tetrachloroplatinate did not show inhibitory properties indicating a specific mode of action of Zeise's salt. To our best knowledge this is the first description of a platinum complex as COX-inhibitor.

In order to get more insight into the mode of action LC-MS studies were performed in cooperation with the University of Bochum. For this purpose, COX-1 was incubated with Zeise's salt and enzymatically digested. Separation of the peptide fragments using RP-HPLC and detection with MS/MS documented platinum bound amino acids. Interestingly one of them was Tyrosine385 located in the active site of COX representing the essential amino acid for the oxidation of arachidonic acid. This platination might be the reason for the inhibition of the enzyme in presence of Zeise's salt.

The influence of the bound NSAIDs was first studied on the example of the nonselective COX-inhibitors Ibuprofen (Ibu), Naproxen (Napro), Diclofenac (Diclo) and Indomethacin (Indo). Interestingly it has to be noted that a preference of all complexes for COX-1 could be determined due to the binding to platinum. Ibu-Zeise and Napro-Zeise showed the highest COX-1 selectivity. The most effective COX-2 inhibitor among the complexes was Indo-Zeise. The length of the side chain played a subordinate role. But-NSAID-Zeise complexes showed only a slightly greater inhibiting activity compared to the prop-NSAID-Zeise derivatives.

Celecoxib and two (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids with different substitution pattern of the aromatic rings were used as selective COX-2 inhibitors and were derived in the same way as discussed above. Unfortunately, the COX-2 selectivity went lost and a slight COX-1 preference was took place. This was not the effect of complexation because already the introduction of the olefinic side chain induced the loss of COX-2 selectivity. Therefore alternative ligands have to be synthesized which on the one hand contain a double bond and on the other hand still show COX-2 selectivity before coordination to platinum.

To investigate the COX-inhibition in a cellular context we established a PGE<sub>2</sub> assay with MDA-MB-231 breast cancer cells which show a constitutive COX-2 expression. Under cellular conditions, the NSAID-Zeise complexes remain significantly below expectations. All platinum complexes showed lower effects than the pure NSAID.

DNA- and protein-binding studies documented that NSAID-Zeise complexes can react readily with biomolecules. After 5 hours of incubation with DNA all studied complexes showed a nucleoside/substance ratio of 20-100. This promises good cytotoxic effects on cancer cells via their DNA-binding ability. However, none of the tested NSAID-Zeise complexes showed IC<sub>50</sub> values below 10 μM against MCF-7- and MDA-MB-231 cells. DNA isolated from the nuclei of MCF-7 cells was platinated only to a small amount and delivers an explanation for the low cytotoxicity. To find the reason for the poor pharmacological properties under cellular conditions with respect to the outstanding properties at the isolated targets, investigations on cellular uptake, uptake by nuclei and protein binding were carried out.

For studies on the cellular uptake MCF-7 cells were used. Cisplatin used as reference showed an accumulation grade of 3.7. Zeise's salt, which did not influence cell growth but was taken up in the same amount. NSAIDs bound at Zeise's salt significantly increased enrichment in comparison to Cisplatin. The highest accumulation grade of 21.1 (after 24 hours) showed the But-Ibu-Zeise complex. The quantitative determination of platinum content in the nucleus indicated that the complexes are now able to reach the target DNA.

Unfortunately, all NSAID-Zeise complexes were rapidly bound to human serum albumin. After 10 min the reaction was already completed. It is very likely that this reaction would lead to inactivation of the complexes and consequently to a reduction of COX inhibition and cytotoxicity.



## 12 Experimenteller Teil

### 12.1 Materialien

#### ➤ Geräte

- Analysenwaage: Sartorius BP 211D
- Atomabsorptionsspektrometer: Vario 6 (Analytik Jena AG); Untergrundkorrektur durch Deuteriumlampe
- Atomabsorptionsspektrometer: ContrAAA 700 (Analytik Jena AG) Continuum Source AAS
- Autoklav: 2540 ELV Dampf-Sterilisator (Tutthauer)
- CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank: B 5060 EK-CO<sub>2</sub> (Heraeus); SNW300TVBB (Nalge Nunc International)
- Elementaranalysator: 240 B und C (Perkin-Elmer)
- Kernresonanzspektroskopie: Avance/DPX 400 (Bruker)
- Massenspektrometrie: CH-/A-Varian MAT (70eV)
- Mikroplattenreader: Flashscan S12 (Analytikjena AG)
- Schmelzpunktapparatur Büchi Melting Point B-545
- Steril-Werkbank Lamin Air HB2448 (Heraeus)
- UV-Spektroskopie: Milton Roy Spectronic 601  
Shimadzu UV-2101PV (Software: UVProbe 1.10)
- Zählkammer: Neubauer 0.100 mm, 0.0025 mm<sup>2</sup> (Carl Zeiss Jena)
- Zentrifuge: Megafuge 1.0 R (Heraeus)
- HPLC Kontron Instruments; Software: Kroma System 2000
- Finnigan LTQ Massenspektrometer (Thermo Electron Corp.)
- HPLC System (Dionex), *reversed phase*-Säule (Luna C<sub>18</sub>, Phenomenex)

#### ➤ Lösungen und Reagenzien

##### LC-MS-Untersuchungen

COX-1 (Biomol)

Trypsin (Promega) in 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Nanosep® 10kDa (PALL Life Sciences)

### Zytotoxizitätstestung

- FCS: fetales Kälberserum (BioWhittaker, PAN Biotech oder Biochrom)
- Glutardialdehydlösung 1%: 25%ige wässrige Lösung (Merck) mit PBS verdünnt
- Kristallviolettlösung 0.02%: Lösung in Aqua dest
- PBS (phosphate buffered saline): 8.0g NaCl, 1.0g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0.15g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, 0.2g KCl, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit Wasser auf 1 Liter auffüllen
- Trypsinlösung : 0.05% Trypsin (ICN), 0.02% EDTA in PBS

### Zellkernaufnahme

- 0,25M Saccharose: 4,279g Saccharose (M=342,9g/l) in 50ml H<sub>2</sub>O
- 0,88M Saccharose: 15,061g Saccharose in 50ml H<sub>2</sub>O
- RS-Puffer:     10mM Tris-HCl (M=157,6g/mol) 1,576g/l  
                  10mM NaCl (M=58,44g/mol) 0,584g/l  
                  1,5mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (M=203,31g/mol) 0,305g/l
- 10%(v/v) Nonidet-Lösung: 5ml Nonidet in 45ml bidest. H<sub>2</sub>O  
im Ultraschallbad homogenisieren

### DNA-Bindung

- DNS: 'DNA from salmon testes' (Sigma)

### DNA-Isolierung aus MCF-7-Zellen

- TE-Puffer:     zur Herstellung von 100ml  
                  10mM Tris-HCl                   157,6mg  
                  1mM EDTA-Dinatriumsalz     37,2mg  
                  auf pH 7,8 mit 2N NaOH einstellen
- TE+0,5% SDS-Verdau-Puffer  
                  0,05 Natriumdocecylsulfonat in 10ml TE-Puffer unter Erwärmen lösen
- 3M Natriumacetat-Puffer     zur Herstellung von 100ml  
                  NaCH<sub>3</sub>COOH\*3H<sub>2</sub>O           41g  
                  1mM EDTA-Dinatriumsalz     37,2g  
                  die Salze in 70ml H<sub>2</sub>O lösen und mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen
- equilibriertes Phenol (Sigma aldrich)  
                  10 mM Tris HCl

pH 8.0

1 mM EDTA

- C-P-Mischung  
die Mischung ist kurz vor Gebrauch frisch herzustellen  
pro Ansatz werden 0,5 ml dieser Mischung benötigt  
0,25 ml equilibriertes Phenol + 0,25ml Chloroform mischen und bei  
5000U/min, 4°C 10min zentrifugieren  
obere wässrige Phase wird verworfen
- Proteinase K  
aus Tritirachium album  
≥500 units/mL, gepufferte wässrige Glycerol-Lösung (Sigma aldrich)
- Ribonuclease A (Sigma aldrich)  
50mg Lyophilisat in 5ml sterilfiltrierten Natriumphosphat-Puffer (0,06M  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O; pH 6,4)lösen und in 300µl Portionen einfrieren

#### Proteinbindung

- Bradford-Reagenz: 250 mg Serva Blue G, 250 ml Ethanol (95%), 500 ml  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (86%), 250 ml H<sub>2</sub>O; vor Gebrauch mit Wasser 1:5 verdünnen
- Humanserumalbumin (HSA): Sigma
- 10%(v/v) Nonidet-Lösung: 5ml Nonidet in 45ml bidest. H<sub>2</sub>O  
im Ultraschallbad homogenisieren

## 12.2 Methoden

### ➤ Untersuchungen mit der HPLC

#### Stabilität

HPLC-Anlage:	Kontron Instruments
Stationäre Phase:	Eurospers 100-5 C18 Knauer, 250x4mm
Detektion:	UV-Detektion
Fließmittel:	Acetonitril/0,1% TFA

Die zu untersuchende Substanz wird jeweils in Methanol gelöst und mit einem Anteil Wasser versetzt. Die resultierende Konzentration nach Zugabe der Lösungsmittel beträgt 1mM. Die Fließmittelzusammensetzung und die Wellenlänge, bei der detektiert wird, variiert in Abhängigkeit vom Analyt.

Platinkomplex	Fließmittel Acetonitril/0,1%TFA	Wellenlänge in nm	Retentionszeit in min
Prop-ASS-Zeise	65/35	230	6,45
Di-ASS-Zeise	65/35	230	9,32
Prop-Salicyl-Zeise	65/35	240	9,08
But-Salicyl-Zeise	70/30	240	7,51
Di-Salicyl-Zeise	65/35	240	21,54
Salicylamid-Zeise	55/45	240	7,55
Prop-Ibu-Zeise	70/30	220	8,38
But-Ibu-Zeise	70/30	220	18,26
Prop-Napro-Zeise	65/35	230	13,25
But-Napro-Zeise	70/30	230	10,69
Di-Napro-Zeise	75/25	230	20,40
Prop-Diclo-Zeise	80/20	275	8,88
But-Diclo-Zeise	70/30	275	17,14
Prop-Indo-Zeise	80/20	230	7,23
But-Indo-Zeise	70/30	230	19,45
Di-Indo-Zeise	75/25	230	34,93
Prop-Para-Zeise	60/40	245	5,36

Tabelle 12.1 Übersicht der verwendeten Fließmittelzusammensetzung, Detektionswellenlänge und Retentionszeiten

## Lipophilie

Standardsubstanzen:

Standard-substanzen	logP	t <sub>R</sub> in min
Acetophenon	1,58	4,60
Anisol	2,11	5,10
Toluol	2,77	31,78
Naphtalen	3,17	7,84
Biphenyl	3,63	6,12
Hexylbenzen	5,24	6,95
Octylbenzen	6,30	17,40

Tabelle 12.2 Standards zur Kalibrierung der LogP-Wert-Bestimmung

HPLC-Anlage: Kontron Instruments  
 Stationäre Phase: C18 Knauer,  
 Detektion: UV-Detektion bei 254nm  
 Fließmittel: Acetonitril/0,1% TFA 80:20

Aus den Standardsubstanzen wird zunächst eine Mischung hergestellt, wobei die Konzentration der einzelnen Bestandteile ca 1 mg/ml beträgt. Für Hexylbenzen und Octylbenzen wird auf Grund der geringen Absorptionskoeffizienten eine Konzentration von ca 2-3 mg/ml benötigt. Als Lösungsmittel für die Standards wird Acetonitril verwendet. In analoger Weise werden die zu untersuchenden Substanzen in Acetonitril gelöst. Aus der Retentionszeit der Standardsubstanzen und der Totzeit wird zunächst der  $k'$ -Wert berechnet. Durch Auftragen der ermittelten  $\log k'$ -Werte und den aus der Literatur bekannten  $\log P$  Werte wird durch lineare Regression eine Kalibriergerade erhalten, auf dessen Grundlage die Ermittlung der  $\log P$ -Werte der Untersuchungssubstanzen erfolgt.

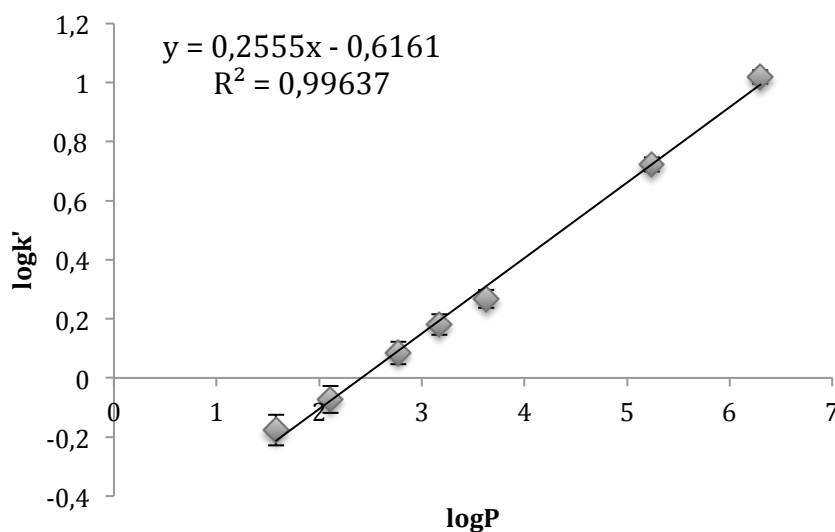


Abb. 12.1 Kalibriergerade der LogP-Wert Bestimmung

### ➤ Sättigungslöslichkeit

Die Löslichkeit der Substanzen wurde in PBS durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Substanz in 300µl PBS gelöst und solange zugegeben bis ein Bodensatz erkennbar war. Dann wurde die gesättigte Lösung unter Schütteln bei 37°C für 2h stehen gelassen. In dieser Zeit wurde mit der Substanz an der AAS in einem Bereich von 10-400ppb kalibriert, wobei die Verdünnung der Standardlösungen auch hier mit PBS erfolgte.

Nach Ablauf der 2h wurde die gesättigte Lösung bei 15000 Umdrehungen für 10min bei 37°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen mit PBS verdünnt und an der AAS vermessen.

➤ **COX-Assay****Grundlagen des Versuches**

Bei der Quantifizierung des inhibitorischen Potenzials der Zeise-Verbindungen wurde ein käuflich erwerbbares Fertig-Kit der Firma Cayman Chemicals verwendet. Dabei wird zunächst die zu untersuchende Substanz mit der Cyclooxygenase 1 bzw. 2 und ihrem Substrat, der Arachidonsäure, inkubiert. In Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der zu untersuchenden Substanz auf die COX, wird die Arachidonsäure in das Prostaglandin  $\text{PGH}_2$  umgewandelt. Da dieses für die Quantifizierung zu instabil ist, erfolgt durch Zugabe von  $\text{SnCl}_2$  die Reduktion zum stabileren  $\text{PGF}_2\alpha$ . Die Quantifizierung von  $\text{PGF}_2\alpha$  erfolgt über einen Enzym Immunoassay (EIA). Dafür wird eine 96 Loch Platte verwendet, die auf dem Plattenboden mit monoklonalen Mausantikörpern versehen ist. Pro Well wird nacheinander die Probe ( $\text{PGF}_2\alpha$ ), ein Tracer (= ein mit Acetylcholinesterase gelinktes Prostaglandin) und ein Prostaglandin Antiserum (=spezifische Antikörper gegen Prostaglandine) pipettiert. Daraus ergibt sich eine Konkurrenz des  $\text{PGF}_2\alpha$  aus der Probe und dem Tracer um die begrenzten PG-Antikörper. Die Prostaglandin-Antikörper-Konjugate binden wiederum an die sich am Boden befindlichen Mausantikörpern. Durch Waschen der Platte werden ungebundene Prostaglandine entfernt. Nun erfolgt die Zugabe von Ellmann's Reagenz, welches Acetylthiocholin und 5,5'-dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure enthält. Acetylthiocholin ist das Substrat der Acetylcholinesterase und wird in Thiocholin gespalten, welches wiederum mit der 5,5'-dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-thio-2-Nitrobenzoesäure reagiert, die gelb gefärbt ist und bei 415nm quantifiziert werden kann.

**Reagenzien**

Puffer	0,1M Tris-HCl pH 8,0 5mM EDTA 2mM Phenol
Häm	100µl Häm werden mit 400µl Puffer verdünnt
Arachidonsäure	50µl Arachidonsäure+50µl KOH+400µl H <sub>2</sub> O
1M HCl	
gesättigte $\text{SnCl}_2$ -Lösung	

## Durchführung

Für die zu testenden Substanzen wurden 10 mM Stammlösungen in DMF verwendet. Zuerst werden 10µl COX-1 bzw. COX-2 mit 950µl Puffer, 10µl Häm und 20µl der Testsubstanz in einem 1,5ml Eppendorfgefäß im Wasserbad bei 37°C für 10min inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 10µl Arachidonsäure und weitere 2min Inkubation. Um eine völlige Inaktivierung der Enzyme zu ermitteln wird die COX vor der Inkubation im Wasserbad gekocht. Um eine 100%ige Aktivität des Enzyms zu ermitteln, werden die 20µl Substanz durch Puffer ersetzt.

Um die enzymatische Reaktion zu stoppen werden die Eppendorfgefäße vom Heizbad entfernt und mit 50µl 1M HCl versetzt. Für die Reduktion von PGH<sub>2</sub> zu PGF<sub>2</sub>α werden 100µl einer Zinn(II)chloridlösung dazugegeben und die trüben Lösungen für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden die Lösungen 1:2000 mit Puffer verdünnt. Von den verdünnten Proben werden jeweils 50µl auf eine ELISA 96-Loch-Platte, die mit IgG-Mausantikörpern gecoatet ist, pipettiert. Als Standard wird eine Verdünnungsreihe von Prostaglandin E<sub>2</sub> hergestellt. Von diesen Standardlösungen werden gleichermaßen 50µl gemeinsam auf die Platte pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50µl eines Prostaglandin-Acetylcholinesterase-Konjugates in jedes Well mit Ausnahme von Blk, und TA. Ebenfalls hinzugegeben werden 50µl Prostaglandin-Antikörper in alle Wells mit Ausnahme von Blk, NSB und TA (siehe Pipettierschema). Die Platte wird nach Belegung mit den Proben mit einer Folie abgedeckt und für 18h im Dunkeln inkubiert.

Nach 18h Inkubation werden die Lösungen in den Wells abgesaugt und 5x mit einem mitgelieferten Puffer gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 200µl Ellmann's Reagenz pro Well. Um der Farbreaktion ein wenig Zeit zu geben, wird die Platte auf einem Schüttler im Dunkeln für 60-90min stehen gelassen. In regelmäßigen Zeitabständen (alle 20min) erfolgt die UV-photometrische Vermessung bei 415nm. Liegt der Absorptionswert in den B<sub>0</sub>-Wells zwischen 0,8 und 1,0 ist die Farbentwicklung abgeschlossen.

Blk	K1	K1	BC1	BC1	S3		S11		S4		S12
Blk	K2	K2	BC2	BC2	S4		S12		S5		
NSB	K3	K3	IA 1	IA 1	S5		S13		S6		S13
NSB	K4	K4	IA 1	IA 1	S6		S14		S7		
B <sub>0</sub>	K5	K5	IA 2	IA 2	S7		S15		S8		S14
B <sub>0</sub>	K6	K6	IA 2	IA 2	S8		S1	COX-1	S9		
B <sub>0</sub>	K7	K7	S1	COX-2	S9		S2		S10		S15
TA	K8	K8	S2		S10		S3		S11		

Abb. 12.2 Plattenbelegung beim COX-Assay

Blk	Blank
NSB	non-specific-binding: in Abwesenheit eines spezifischen Antikörpers kann eine kleine Menge des Tracers ans Well binden
B <sub>0</sub>	maximum binding: beschreibt die maximale Menge an Tracer, die der Antikörper in Abwesenheit des Analyt binden kann
TA	total activity: maximale Aktivität des Acetylcholinesterase-gelinkten Tracers
BC1	Background COX-1
BC2	Background COX-2
IA1	100% Aktivität der COX-1
IA2	100% Aktivität der COX-2

### Auswertung

Zunächst wird der Mittelwert der NSB-Wells vom Mittelwert der B<sub>0</sub>-Wells subtrahiert und ergibt den korrigierten B<sub>0</sub>-Wert. Damit kann nun der %B/B<sub>0</sub>-Wert für die Prostaglandin-Standards und die untersuchten Substanzen berechnet werden.

$$\%B/B_0 = \frac{S - NSB}{B_0(korr)} \quad S = \text{Absorption der Substanzen}$$

Das Auftragen der %B/B<sub>0</sub>-Werte der Standards gegen die Konzentration in logarithmischer Skalierung ergibt eine sigmoide Kalibrierkurve, auf deren Grundlage die Berechnung der Substanzen erfolgen kann. Zum Fitten der Kurve wurde die mathematische Funktion Logistic verwendet.

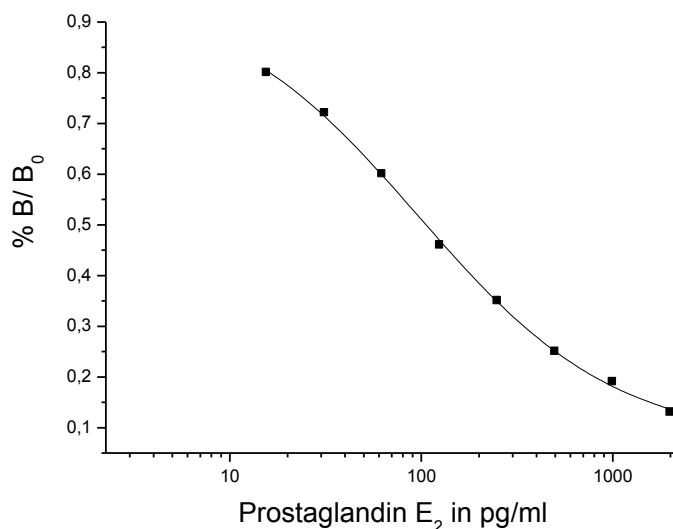


Abb. 12.3 Kalibrierung mit Prostaglandin E<sub>2</sub>



### ➤ PGE<sub>2</sub>-Assay

Beim PGE<sub>2</sub>-Assay wird die Produktion von PGE<sub>2</sub> quantifiziert, die nach Zugabe von Arachidonsäure zu MDA-MB-231-Zellen beginnt. Dazu werden zunächst in 3 24-Loch-Platten pro Well 30000 MDA-MB-231-Zellen ausgesät. Nachdem die Zellen auf dem Plattenboden zu 70% Konfluenz gewachsen sind (in der Regel 3-4 Tage) erfolgt die Substanzzugabe. Dabei wird das alte Medium in jedem Well abgesaugt und durch 500µl neues substanzhaltiges Medium ersetzt. Bei den Stammlösungen der Substanzen wurden 10mM Lösungen in DMF verwendet, die mit Medium 1:1000 verdünnt wurden. Daraus resultiert eine Testkonzentration von 10µM auf den Zellen. Die ersten beiden Wells einer Platte wurden jeweils zum Auftragen der Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die Inkubationszeit nach Substanzzugabe beträgt 24h. Nach Ablauf der 24h erfolgt die Zugabe der Arachidonsäure. Dazu wird eine 1,1M Arachidonsäurelösung ebenfalls 1:1000 mit Medium verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 50µl in jedes Well pipettiert, so dass sich dort eine Arachidonsäurekonzentration von 1µM ergibt. Es erfolgt eine weitere Stunde Inkubation, um der zellulären COX die Zeit zu geben die Arachidonsäure ins Prostaglandin E<sub>2</sub> umzuwandeln. Um die Reaktion zu stoppen wird mit einer Pipette das Medium abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Sowohl das abgenommene Medium als auch die Zellplatten werden bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

Zur Messung des Prostaglandins erfolgt die Verdünnung des abgenommenen Mediums 1:25 mit dem im Kit mitgelieferten EIA-Buffer. Zur Quantifizierung werden 50µl der verdünnten Probe auf eine mit Antikörpern gecoatete Platte pipettiert. Als Standard wird eine Verdünnungsreihe von Prostaglandin E<sub>2</sub> hergestellt und ebenfalls auf die Platte gebracht. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 50µl Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat und Prostaglandin E<sub>2</sub>-Antikörper. Danach wird die Platte mit einer Folie abgedeckt und für 18h im Kühlschrank inkubiert. Das Waschen und Anfärben der Platte erfolgt mit genau den gleichen Reagenzien und nach dem gleichen Ablauf wie schon beim COX-Assay beschrieben.

### ➤ LC-MS-Untersuchungen

#### **Proteinaufreinigung, Inkubation mit Zeise Salz und tryptischer Verdau**

Zuerst wird die COX-1 vom Stabilisierungsreagenz DDC und dem Detergenz Tween 20 durch Zentrifugation bei 4°C und 5000g über einem Ausschlussfilter (Nanosep®) gereinigt. Danach erfolgt die Inkubation in äquimolarer Menge mit dem Zeise-Salz für 1h, 800 rpm und 37°C. Nach der Inkubation wird die COX durch Zugabe von 2µg Trypsin verdaut. Nach 14h Verdau bei 37°C

und 1000rpm erfolgt das Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Absenken des pH-Wertes auf 2-3. Unverdautes Protein wurde durch Verwendung eines 10 kDa Ausschlussfilters (Nanosep®) entfernt. Das Filtrat wurde bis auf 15 µl aufkonzentriert.

### massenspektrometrische Analyse und Datenauswertung

50 µg des Peptidgemisches wurden an einer selbstgepackten *reversed phase*-Säule mit einem Innendurchmesser von 100 µm und einer Länge von 9-10 cm unter Druck geladen. Die ESI-MS Untersuchungen wurden an einem Finnigan LTQ Massenspektrometer durchgeführt. Der Massenspektrometer war zu einem doppelgradienten HPLC System direkt gekoppelt, ausgerüstet mit einem Famos Autosampler und einem Switchos Ventil. Die Elution der Peptide in dem Massenspektrometer erfolgte durch einen steigenden 180minütigen Gradient von Puffer A (2 % Acetonitril/0,1 % Methansäure) und Puffer B (80 % Acetonitril/0,1 % Methansäure). Der Elektrospray entstand durch eine Spannung von 1,8 kV bei einer Flussrate von 200-300 nl·min<sup>-1</sup>. Die Kapillartemperatur betrug 200 °C und die Kollisionsenergie (CID) war bei 35 % eingestellt. MS- und MS/MS-Spektren wurden unter Verwendung der Xcalibur-Software aufgenommen. Das Übersichtsspektrum wurde im 300-2000 m/z-Bereich aufgenommen und die zehn intensivsten Ionen wurden automatisch für weitere MS/MS-Analyse ausgewählt. Die Auswertung der entstandenen MS/MS-Spektren erfolgte mithilfe des SEQUEST Algorithmus durch Verwendung der Bioworks™ Software (Version 3.3.1). Als dynamischen Modifikationen wurden die Oxidierung von Methionin und die Metallierung von S, T, D, E, H, C, K, Y und M berücksichtigt. Die identifizierten tryptischen oder halbtryptischen Peptiden mussten zusätzlich die Kriterien Xcorr ≥ 1.80/2.50/3.15 für die einfach/zweifach/dreifach geladene Ionen, ΔCn ≥ 0.1, Sp ≥ 500 und Rsp ≤ 5 erfüllen. Pro zugeordnetes MS/MS-Spektrum war eine minimale Intensität von 1,00 × 10<sup>2</sup> und eine 30%ige Sequenzabdeckung erforderlich. Für die SEQUEST-Analyse wurden die Massenverschiebungen 193, 221, 229, 247, 257, 265, 293 und 301 vorgegeben, die den Fragmenten {<sup>195</sup>Pt}<sup>2+</sup>, {(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sup>195</sup>Pt}<sup>2+</sup>, {<sup>195</sup>PtCl}<sup>+</sup>, {(H<sub>2</sub>O)<sup>195</sup>PtCl}<sup>+</sup>, {(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sup>195</sup>PtCl}<sup>+</sup>, {<sup>195</sup>PtCl<sub>2</sub>}, {(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sup>195</sup>PtCl<sub>2</sub>} und {<sup>195</sup>PtCl<sub>3</sub>}<sup>-</sup> entsprechen.

### ➤ **Kristallviolettassay**

Zur Ermittlung der Zytotoxizität wird der  $IC_{50}$  Wert der Substanzen in einem konzentrations- und zeitabhängigem Zelltest an Brustkrebszelllinien bestimmt. Zum einen wurden MCF-7 Zellen verwendet, die sich durch ein hormonunabhängiges Wachstum und der Expression der Cyclooxygenase 1 auszeichnen. Zum anderen wurde an MDA-MB-231 Zellen getestet, die eine überwiegende Expression der Cyclooxygenase 2 aufweisen und durch ein hormonabhängiges Wachstum gekennzeichnet sind.

### **Zellaussaat**

Für die Aussaat wird ein 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche benötigt, die mit ca. 70% konfluenten Zellen am Boden bewachsen ist. Das alte Medium wird abgesaugt, dann mit 2ml sterilem PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin der Boden der Zellkulturfläche benetzt. Das Trypsin wird abgesaugt und die Flasche für 2min in den Brutschrank gestellt. Nun können die Zellen mit 5ml FCS-haltigem Medium vom Boden abgelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 5ml Pipette vereinzelt werden.

Nun können 20µl der Zellsuspension auf die Neubauerzählkammer pipettiert werden. Alle 8 Quadrate der Zählkammer werden ausgezählt damit aus dem Mittelwert durch Multiplikation mit 10<sup>4</sup> die Zellkonzentration/ml ermittelt werden kann. Die Zellen werden in 96 Lochwellplatten ausgesät, wobei pro Well 100µl Zellsuspension pipettiert werden. Daraus kann das Gesamtvolumen des benötigten FCS-haltigen Mediums berechnet werden und mit der ermittelten Zellkonzentration so verdünnt werden, dass letztendlich eine Zelldichte von 750 Zellen pro Well erreicht wird. Pro Abstopzeitpunkt wird eine Platte benötigt. Die belegten Platten werden für 3 Tage im Brutschrank kultiviert, damit die Zellen sich bei der Substanzzugabe in ihrer log-Wachstumsphase befinden.

### **Substanzzugabe**

Die Substanzzugabe erfolgt am 4. Tag nach der Zellaussaat. Dazu werden 20mM Substanzstammlösungen in DMF verwendet. Diese werden zunächst auf 10mM, 5mM und 2,5mM jeweils 1:1 mit DMF verdünnt. Dann erfolgt die Vorverdünnung mit FCS-haltigem Medium. Von dem substanzhaltigem Medium werden 100µl pro Well pipettiert. Dabei erfolgt pro Konzentration eine 4-fach Bestimmung (siehe Abbildung). Als Blindwert wird DMF in einer Konzentration von 10µM auf die Zellen gegeben. Cisplatin dient als Referenzsubstanz und wird in den Konzentrationen 20µM, 10µM, 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM und 0,3125µM.

## Pipettierschema

Ausgangslsg.	$\mu\text{l}/5\text{ml Medium}$	Endkonzentration
20mM	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{M}$
	20 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{M}$
	15 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{M}$
10mM	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$
5mM	10 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
2,5mM	10 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{M}$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lösungsmittel 10 $\mu\text{M}$											
B	0,31	$\mu\text{M}$			2,5	$\mu\text{M}$			2,5	$\mu\text{M}$		
C	0,62	$\mu\text{M}$			5	$\mu\text{M}$			5	$\mu\text{M}$		
D	1,25	$\mu\text{M}$			10	$\mu\text{M}$			10	$\mu\text{M}$		
E	2,5	Cisplatin			20	Substanz 2			20	Substanz 3		
F	5	$\mu\text{M}$			30	$\mu\text{M}$			30	$\mu\text{M}$		
G	10	$\mu\text{M}$			40	$\mu\text{M}$			40	$\mu\text{M}$		
H	20	$\mu\text{M}$			50	$\mu\text{M}$			50	$\mu\text{M}$		

Abb. 12.4 Plattenbelegung beim Zytotoxizitätstest auf einer 96-Loch-Platte

## Abstoppen der Zellplatten

Das Abstoppen der Zellplatten erfolgt nach 48h, 72h, 96h, 120h und 144h nach Substanzzugabe. Dazu wird das alte Medium in den Wells abgesaugt und 100 $\mu\text{l}$  einer 1%igen Glutardialdehyd dazupipettiert und dort für 25min belassen. Dabei werden die Zellen auf dem Plattenboden fixiert. Nach Ausschütten der Glutardialdehydlösung werden die Wells mit 180 $\mu\text{l}$  unsterilen PBS befüllt und können so bis zu einer Woche im Kühlschrank gelagert werden. Innerhalb dieser Zeit sollte das Anfärben und Vermessen der Platten stattfinden.

## Anfärben und Vermessen

Nach dem Ausschütten des PBS aus den Wells erfolgt die Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  einer 0,02% Kristallviolett-Lösung. Dabei werden die Platten nacheinander im 1min Takt mit der Farbstofflösung versehen. Der Farbstoff bekommt 30min Zeit, um alle Zellen anzufärben. Nach Ablauf der Zeit wird das Kristallviolett ausgeschüttet, die Wells mit Wasser 3x gewaschen,

befüllt und weitere 30min stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wird das Wasser ausgeschüttet und die Platte wird auf einem Papiertuch trocken geklopft. Danach erfolgt sofort die Zugabe von 180µl 70%igem Ethanol. Nun werden die Platten für 3h auf einem Schüttler stehen gelassen. Anschließend kann die violette Lösung in den Wells bei 595nm vermessen werden.

## Auswertung

Zur Beurteilung der zellproliferationshemmenden Effekte wird aus den erhaltenen Absorptionswerten der  $T/C_{corr}$ -Wert ermittelt. Er gibt die relative prozentuale Wachstumshemmung durch die getesteten Substanzen an.

$$T/C_{corr} [\%] = \frac{T^* - c_0}{c^* - c_0} * 100 \quad \text{Gleichung 12.1 Berechnung des } T/C_{corr}\text{-Wertes}$$

$$\tau [\%] = \frac{T^* - c_0}{c_0} * 100 \quad \text{Gleichung 12.2 Berechnung des } \tau\text{-Wertes}$$

$c_0$  Mittelwert der Extinktionen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ )

$c^*$  Mittelwert der Extinktionen der Lösungsmittelkontrolle bei Testende

$T^*$  Mittelwert der Extinktionen der Proben bei Testende

Bei der Berechnung der  $T/C_{corr}$ -Werte wird durch die Subtraktion der Ausgangszellmenge die Änderungen der Zellmasse der Kontrollkulturen und der behandelten Kulturen nach der Substanzzugabe aufeinander bezogen. Damit werden die zytostatischen Effekte erfasst. Liegen zytozide Wirkungen vor, wird der  $\tau$ -Wert berechnet. Hier wird der Anteil der getöteten Zellen in Bezug zur Ausgangszellmenge gesetzt.

### ➤ Zellaufnahme

Für die Bestimmung der Zellaufnahme werden zunächst MCF-7 Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellaufnahme wird zeitabhängig über einen Zeitraum von 24 h beobachtet, so dass 9 6-Loch-Platten benötigt werden, wobei eine Platte für die Erzeugung der Blankpellets dient. Pro Well werden 2 ml Zellsuspension ausgesät. Für die Herstellung der Zellsuspension wird eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 70% konfluenten MCF-7 Zellen verwendet und mit Medium auf das gewünschte Gesamtvolumen verdünnt. Danach werden die Zellen bis zu einer

Konfluenz von 70% wachsen gelassen, was in den meisten Fällen 4-5 Tage Zeit benötigte. Für die Substanzzugabe werden 20mM Lösungen verwendet, die im 1. Schritt 1:1 mit DMF (=10mM) und anschließend 1:1000 mit FCS freiem Medium verdünnt werden. Das alte Medium auf den Zellen wird abgesaugt und durch 2ml substanzhaltiges FCS freies Medium ersetzt.

Nach definierten Zeitpunkten (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h und 24h) wird das Medium abgesaugt, mit 2ml PBS gewaschen und mit 0,2ml trypsiniert. Die abgelösten Zellen werden mit 1ml FCS-haltigen Medium aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend werden die Zellen für 5min bei 4000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das überstehende Medium wird verworfen während das Zellpellet mit 500µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert wird. Bis zur Analytik werden die Zellpellets bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung der Zellaufnahme muss zum einen der Platingehalt der Zellpellets mit der AAS ermittelt werden. Zum anderen muss der Proteingehalt nach der Methode von Bradford quantifiziert werden. Dafür werden die Zellpellets mit 300µl 1%iger Tritonlösung versetzt und gevortext. Anschließend müssen die Zellen mittels Sonotrode lysiert werden. Von dieser Lösung werden 25µl abgenommen und mit 225µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Diese Lösung wird für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford genutzt. Für die AAS werden 100µl Probelösung mit 10µl 18% HCl und 10µl H<sub>2</sub>O versetzt und gemessen.

Zelllinie	mittlerer Durchmesser (µm)	mittleres Zellvolumen (pl)	Proteinmenge pro Zelle (pg)	Proteinkonzentration pro Zelle (ng/pl)
MCF-7	15.38 ± 1.50	1.92 ± 0.55	217.1 ± 73.0	8.85

Berechnung der intrazellulären Platin-Konzentration

$$C_{intra}(\mu M) = \frac{pmolPt / \mu g Protein}{8,85} * 1000$$

Berechnung des Anreicherungsgrades

$$AG = C_{intra} / C_{extra}$$

➤ **Zellkernaufnahme**

Die Bestimmung der Zellkernaufnahme wird in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen durchgeführt. Die Zellen werden dabei bis zu einer Konfluenz von 70% in FCS-haltigem Medium kultiviert. Für die Substanzzugabe wird zunächst das FCS-haltige Medium abgesaugt und substanzhaltiges Medium (10µM) ohne FCS zu den Zellen gegeben. Um den zeitlichen Verlauf der Kernaufnahme zu

verfolgen werden die Zellen nach 3 verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt: 2h, 8h und 24h. Dazu wird das Medium abgesaugt, mit 10ml PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Zellen werden in 10ml FCS-haltigem Medium aufgenommen, vereinzelt und in ein 15ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 2000U/min, 4°C, 5 min und anschließendem Waschen mit 5ml eiskaltem PBS wird das Zellpellet erhalten. Das Pellet wird bis zur weiteren Aufarbeitung im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden. Die Kernisolierung beginnt mit Zugabe von 4,75ml eiskaltem RS-Puffer und 5min Lagerung auf Eis. Nach Zugabe von 250µl kalter 10%iger Nonidetlösung wird gründlich gevortext und wieder 5min auf Eis gelagert. Um die Kerne vom anhaftenden Cytosol zu befreien wird erneut ca. 10s gevortext und bei 1000U/min, 4°C und 5min zentrifugiert. Das so erhaltene Rohkernpellet wird in 500µl 0,25M Sacharose-Lösung resuspendiert und mit 500µl 0,88M Sacharose-Lösung unterschichtet. Durch erneute Zentrifugation bei 2500U/min, 4°C, 10min wird das Kernpellet erhalten. Die überstehende Lösung wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Kernpellet mit 500µl PBS gewaschen (Zentrifugation 2000U/min; 5 min; Raumtemperatur). Bis zur Vermessung der Kerne kann das Pellet bei -20°C aufbewahrt werden.

#### ➤ **Bestimmung der DNA-Bindung**

Als Substanzstammlösungen wurden 20mM Lösungen der Platinkomplexe in DMF verwendet. Für die Herstellung der DNA-Lsg. von 250µg/ml wird im Vorfeld ebenfalls eine Stammlösung von 12-16mg DNA in 12ml PBS hergestellt. Diese Stammlösung kann über mehrere Wochen im Tiefkühlschrank aufbewahrt und bei Bedarf auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden. Zunächst werden 20µl der zu untersuchenden Platinstammlösungen in 80µl PBS verdünnt.

Danach werden 30µl des verdünnten Platinkomplexes mit 2970µl DNA-Lsg. (250µg/ml) inkubiert. Sofort nach Zugabe der Untersuchungslösung zur DNA-Lösung erfolgt die Abnahme von 200µl Inkubationslösung. Dieses Aliquot wird mit 100µl 0,9M Natriumacetatlösung versetzt, kurz gevortext und anschließend wird durch Zusatz von 900µl kaltem Ethanol und leichtem Umschwenken die DNA gefällt. Zu definierten Zeitpunkten (10min, 20min, 30min, 40min, 60min, 120min, 180min und 300min) werden weitere Aliquote aus der Inkubationslösung entnommen und die DNA in gleicher Weise gefällt. Nachdem die gefällte DNA 1h im Tiefkühlschrank gelagert wurde, wird bei 4000U/min 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand kann abgegossen werden. Zum Waschen der DNA-Pellets wird erneut 500µl kalter Ethanol dazugegeben, gründlich gevortext und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen der Waschlösung wird das DNA-Pellet bei -20°C bis zur Vermessung gelagert. Die analytische Untersuchung gliedert sich zum einen in die quantitative Bestimmung der DNA mittels UV-

Messung und zum anderen die quantitative Bestimmung des Platin-Gehaltes mittels Graphitrohr-AAS. Dazu werden die DNA-Pellets in 500µl Aqua bidest gelöst. Für die AAS-Messungen wird im Bereich von 10-400µg/l Platin mit der zu messenden Substanz kalibriert. Von den gelösten DNA-Pellets werden 100µl für die AAS-Messungen verwendet. Alle Lösungen für die AAS werden vor der Messung mit 10µl 1%iger Tritonlösung und 10µl 18%iger HCl versetzt um die Absorption des Platins an den Kunststoffschläuchen zu verhindern.

Für die Quantifizierung des DNA-Gehaltes wird am UV-Gerät zunächst im Bereich von 20-100µg/ml DNA kalibriert. Anschließend werden die gelösten DNA-Pellets vermessen und quantifiziert. Aus dem ermittelten DNA-Gehalt und dem gemessenen Platingehalt kann zunächst ein Substanz/DNA-Verhältnis in pmol Komplex/pg DNA berechnet werden. Durch das bekannte mittlere Nukleotidmolgewicht von 307,9 g/mol kann daraus das Nukleotid/Substanzverhältnis berechnet werden. Jeder Wert wurde aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### ➤ **DNA-Bindung in MCF-7-Zellen**

Für die Isolierung der DNA wurden MCF-7 in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 70% gezüchtet und, wie schon bei der Zellaufnahme beschrieben, mit 10µM Substanz in FCS-freien Medium inkubiert. Da bei den hier untersuchten Substanzen die Zellkernaufnahme ein Maximum nach 2h zeigte, wurde die Substanzaufnahme der Zellen nach 2h abgestoppt und die Zellkerne, wie unter 11.5. beschrieben, isoliert. Die so erhaltenen Zellkerne werden in 430µl TE+0,5%SDS-Verdau-Puffer suspendiert. Dann erfolgt die Zugabe von 50µl einer 25mM CaCl<sub>2</sub>-Lsg. und 10µl Proteinase K. Der Ansatz wurde über Nacht (12h) bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 10µl Ribonuclease und weitere 4h Inkubation. Zur Abtrennung der RNA und der Proteine erfolgt nun die Chloroform-Phenolextraktion. Dazu wird der Ansatz mit 0,5ml TE-gesättigtem Phenol versetzt und kräftig geschüttelt. Zur Phasentrennung wird bei 5000 U/min, 4°C für 10min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut mit TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt. Der Reinigungsschritt wird insgesamt 3x wiederholt. Nun wird die wässrige Phase 2x mit 0,5ml einer frisch hergestellten Chloroform-Phenol-Mischung (1:1) ausgeschüttelt. Als letzter Reinigungsschritt wird die wässrige Phase nun mit 0,5ml Chloroform versetzt, geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Um noch vorhandene Phenolreste in der wässrigen Phase zu entfernen, wird diese 2x mit jeweils 1ml Diethylether versetzt und kräftig geschüttelt. Die obere Diethyletherphase wird verworfen. Zur Fällung der DNA wird zunächst die wässrige Phase mit 50µl 3M Natriumacetatpuffer versetzt. Danach erfolgt die Zugabe von insgesamt 1,1ml Ethanol in 3 kleinen Portionen. Nach jeder Zugabe wird das Eppendorfgefäß 2-3x leicht geschwenkt.



## ➤ DNA-Schmelztemperatur und CD-Spektroskopie

### DNA Vorbereitung

Die Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) wird bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Es werden 2-3 mg der CT-DNA in 2 ml 10 mM Phosphatpuffer gelöst. Die Lösung wird für jeweils 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend für 30 min eine Pause eingelegt. Dieser Zyklus wird sechsmal wiederholt.

Dadurch erhält man eine DNA-Lösung mit geringer Viskosität und einer besseren Löslichkeit. Durch diese Behandlung schätzt man, dass abschließend eine Lösung mit 600 Basenpaaren der doppelsträngigen DNA vorliegt. Die Reinheit der DNA kann bestimmt werden durch die Bildung des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentrationsbestimmung M (Basenpaare) erfolgt durch die Absorptionsbande bei 260 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260} = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , welcher aus dem Lambert-Beerschen Gesetz erfolgt. Diese DNA-Lösung kann bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden und innerhalb weniger Tage verbraucht werden.

### Schmelztemperaturbestimmung $T_m$

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde zusätzlich eine Peltier-Temperatursteuereinheit an das UV/Vis Spektrometer angebracht. Die Proben wurden in einem Verhältnis 1:5 [Metallkomplex]:[DNA] angesetzt. Die Temperatur wurde im Bereich 25 bis 80 °C untersucht. Die Extinktion der DNA-Bande bei 260 nm wird gegen die Temperatur aufgetragen und die Schmelztemperatur  $T_m$  wird mit Hilfe der ersten Ableitung im Programm Origin 7.5 ermittelt, wobei die Messgenauigkeit  $\pm 1 \text{ °C}$  beträgt.

### Circulardichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden am CD-Spektrometer J-715 der Firma Jasco am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen an der Ruhr-Universität Bochum aufgenommen. Dazu wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:5 mit DNA versetzt und bei Raumtemperatur gemessen. Die Inkubationszeit variiert zwischen 2 und 24 Stunden, bei schwerlöslichen Komplexen ist 1 % DMF zugegeben worden. Die Parameter bei denen die Spektren aufgenommen wurden,

betragen: Küvettenschichtdicke 1cm, Bandbreite 2.0nm, Auflösung 1.0nm, Akkumulation 10, Messgeschwindigkeit 100nm/min, Messbereich 220nm bis 400nm.

### ➤ Proteinbindung

Für die Bestimmung der Proteinbindung wird zunächst eine HSA-Lösung von 40mg/ml in PBS hergestellt. 2 ml HSA Lösung reichen für die Bestimmung von einer Substanz zeitabhängig über 8 (10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300min) Zeitpunkte. Als Ausgangssubstanzlösung wird wieder eine 20mM Stammlösung verwendet. Diese wird im Folgenden so verdünnt das man eine Endkonzentration von 3µM erreicht. Zunächst wird die 20mM Substanzlösung (15µl) auf 1000µl PBS verdünnt. Von dieser Lösung werden 20µl mit 1980µl HSA-Lösung inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0min, 10min, 20min, 30min, 40min, 60min, 120min, 180min, 300min) werden jeweils 150µl von der Inkubationslösung entnommen und mit 150µl 10%iger TCA Lösung versetzt. Die Proteine fallen sofort aus. Nach gründlichem Vortexen werden die Lösungen 1h im Tiefkühlfach gelagert und anschließend bei 4000U/min 4°C 5min lang zentrifugiert. Vom Überstand werden 200µl entnommen und mit 50µl 13%iger HNO<sub>3</sub> stabilisiert. Die Quantifizierung des Platingehaltes erfolgt mit AAS unter Zusatz von 10µl 1%iger Tritonlösung und 10µl 18%iger HCl. Für die Kalibrierung wird die Substanz im Bereich von 10 – 400µg/l verwendet. Als 100% ungebunden wird eine 3µM Substanzlösung in PBS vermessen.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung.

$$\% \text{ ungebundener Komplex} = \frac{c_t}{c_{t0}} * 100$$

$c_t$       Konzentration zum Zeitpunkt t

$c_{t0}$      Konzentration der 3µM Substanzlösung in PBS

### ➤ Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgt beim Test nach Bradford über eine photometrische Methode. Als Farbreagenz fungiert hier der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau

G 250. Der ungebundene kationische Farbstoff weist eine rote Farbe auf und kann im sauren Milieu mit Seitenketten von Proteinen Komplexe bilden, was einer Farbänderung zu blau verfolgt werden kann. Zunächst wird das Bradford Reagenz 1:5 kurz vor Gebrauch mit Aqua bidest. verdünnt. Die Proteinbestimmung erfolgt auf einer 96 Wellplatte. In jedes Well werden 200µl Bradford Reagenz pipettiert und anschließend wird der Referenzwert bei 595nm gemessen. Zur Kalibrierung werden HSA Lösungen im Konzentrationsbereich von 0-0,16 mg/ml hergestellt. Zur Proteinbestimmung werden 20µl Analyt ins Well pipettiert, wobei immer eine 3-Fach Bestimmung erfolgte. Anschließend erfolgt das Durchmischen der Lösungen mit einer Mehrkanalpipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Für die Beendigung der Komplexbildung wird die Platte 20min auf einen Schüttler gestellt und anschließend ebenfalls bei 590nm vermessen. Vor dem Messvorgang muss darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen in den Wells befinden.

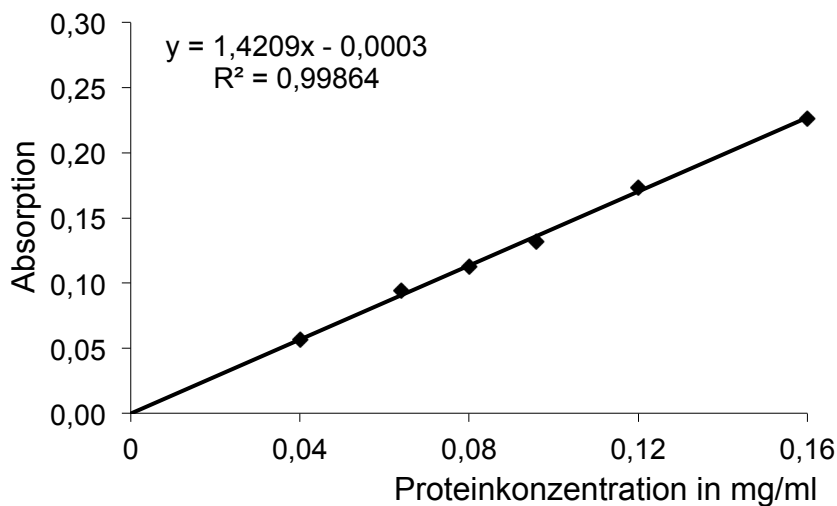


Abb. 12.5 Kalibrierung mit HSA zur quantitativen Bestimmung von Proteinen

## ➤ AAS

Für alle Platinbestimmungen an der AAS wurde folgendes Temperaturprogramm benutzt.

Clean: Temp. 2500°C Heizrate 1000°C/s Halten 6,0s

Nr.	Typ	Temp [°C]	Rate [°C/s]	Halten [s]	Zeit [s]
1	Trocknen	90	10	10	17
2	Trocknen	105	10	10	11,5
3	Trocknen	130	10	10	12,5
4	Trocknen	160	10	10	13
5	Pyrolyse	500	45	30	37,6
6	Pyrolyse	1000	100	10	15
7	Pyrolyse	1700	300	10	12,3
8	AZ*	1700	0	5	5
9	Atomisieren	2500	1500	4	4,5
10	Ausheizen	2500	1000	5	5,1

Tabelle 12.3 Temperaturprogramm zur Platinbestimmung an der Graphitrohr-AAS

Vermessen wurden jeweils 100µl Analyt, der mit 10µl 0,1% Triton und 10µl 18% HCl versetzt wurde.

Für die Fluorid-Bestimmung an der Continuum Source AAS wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet.

Nr.	Typ	Temp [°C]	Rate [°C/s]	Halten [s]	Zeit [s]
1	Trocknen	90	10	15	20,1
2	Trocknen	95	5	10	11,0
3	Trocknen	100	10	10	10,5
4	Trocknen	140	10	5	9,0
5	Pyrolyse	600	300	30	31,5
6	Gasanpassung	600	0	5	5,0
7	Atomisieren	1700	500	5	7,2
8	Ausheizen	2500	500	8	9,6

Tabelle 12.4 Temperaturprogramm zur Fluorid-Bestimmung an der Continuum Source AAS

## 12.3 Synthesen

### ➤ Synthese der Liganden

#### Allylbenzoat

$C_{10}H_{10}O_2$

Synthese aus Benzoylchlorid und Allylalkohol:

Der Alkohol (25mmol) wurde in Diethylether gelöst und mit 10 ml abs. Pyridin versetzt. Unter Kühlung, mittels Eisbad, erfolgte die langsame Zugabe des Säurechlorids. Anschließend wurde 3 h in der Kälte gerührt. Die Lösung wurde zuerst mit 10%iger HCl und anschließend mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lsg. ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Etherphase mit  $Na_2SO_4$  wurde das Lösungsmittel abrotiert. Zur Reinigung des Öles wurde eine Vakuumdestillation durchgeführt.

Produkt: farbloses Öl; Ausbeute: 24 mmol (85%)

#### $^1H$ -NMR (400 MHz; $CDCl_3$ ):

$\delta$  8.08 (d,  $J = 8.8$ , 2H, ArH), 7.59-7.54 (m, 1H, ArH), 7.47-7.42 (m, 2H, ArH), 6.10-6.00 (m, 1H,  $CH=CH_2$ ), 5.45-5.39 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 5.31-5.28 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.83 (dd,  $J = 5.6, 3.5$ , 2H, 0- $CH_2$ -)

#### Allyl-2-(4-isobutylphenyl)-propanoat

$C_{16}H_{22}O_2$

Synthese aus Benzoylchlorid und Allylalkohol:

Der Alkohol (25mmol) wurde in Diethylether gelöst und mit 10 ml abs. Pyridin versetzt. Unter Kühlung mittels Eisbad erfolgte die langsame Zugabe des Säurechlorids. Anschließend wurde 3 h in der Kälte gerührt. Die Lösung wurde zuerst mit 10%iger HCl und anschließend mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lsg. ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Etherphase mit  $Na_2SO_4$  wurde das Lösungsmittel abrotiert. Zur Reinigung des Öles wurde eine Vakuumdestillation durchgeführt.

Produkt: farbloses Öl; Ausbeute: 23 mmol (85%)

#### $^1H$ -NMR (400 MHz; $CDCl_3$ ):

$\delta$  7.22-7.19 (m, 2H, ArH), 7.09-7.07 (m, 2H, ArH), 5.84 (ddt,  $J = 17.2, 10.6, 5.4$ , 1H,  $CH_2=CH$ ), 5.20-5.12 (m, 2H,  $CH_2=CH$ ), 4.55 (dq,  $J = 5.5, 1.4$ , 2H, 0- $CH_2$ -), 3.72 (q,  $J = 7.2$ , 1H,  $CH-C=O$ ), 2.44 (d,  $J = 7.2$ , 2H,  $CH_2$ -Ar), 1.84 (dt,  $J = 13.5, 6.8$ , 1H,  $CH_3-CH-CH_3$ ), 1.49 (d,  $J = 7.2$ , 3H,  $CH_3-CH-C=O$ ), 0.89 (s, 6H,  $CH_3-CH$ )

➤ **allgemeine Synthese der Ester**

6.5 mmol der Säure wurden in abs. Dichlormethan gelöst/suspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 5,4 mmol Alkohol und einer Spatelspitze DMAP. DCC wurde äquimolar zur Säure eingewogen, in wenig abs. Dichlormethan gelöst und langsam zum Reaktionsansatz zugetropft. Danach wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) wurde über eine Glasfritte abgesaugt. Das Filtrat wurde mit 5 % NaOH-Lsg ausgeschüttelt. Die org. Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter Vakuum eingengt. Eventuelle Aufreinigung mittels Säulenchromatographie war anschließend notwendig. Das jeweils verwendete Fließmittel ist bei den einzelnen Substanzen genannt. Die Ausbeute der Reaktion liegt zwischen 50-80%.

**Allyl-2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetat**  
C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub>

Aufreinigung durch Säulen (Kieselgel/ Hexan:Ethylacetat 8:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.68-7.64 (m, 2H, ArH), 7.48-7.45 (m, 2H,ArH), 6.97 (d, J = 2.5, 1H, ArH), 6.87 (dd, J = 9.0, 0.5, 1H, ArH), 6.68-6.65 (m, 1H, ArH), 5.96-5.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.31-5.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.61 (dq, J = 5.6, 1.3, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O) 3.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C=O), 2,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar)

**Allyl-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoat**  
C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

Aufreinigung durch Säulen (Kieselgel/Hexan:Ethylacetat 3:2)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.70-7.67 (m, 3H, ArH), 7.41 (dd, J = 8.4, 1.7, 1H, ArH), 7.15-7.10 (m, 2H, ArH), 5.85 (ddt, J = 17.2, 10.7, 5.4, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.23-5.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.62-4.52 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.89-3.85 (m, 1H, CH-Ar)

**Allyl-2-(2-(2,6-dichlorphenylamino)phenyl)acetat**  
C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Aufreinigung durch Säulen (Kieselgel/Hexan:Ethylacetat 3:2)

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

$\delta$  7.47 (dd,  $J = 7.5, 3.7$ , 2H, ArH), 7.29-7.27 (m, 1H, ArH), 7.17-7.10 (m, 2H, ArH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.96-6.92 (m, 1H, ArH), 6.47 (d,  $J = 8.0$ , 1H, ArH), 6.01-5.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.34-5.28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.21-5.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH),  $\delta$  4.65 (dt,  $J = 5.6, 1.5$ , 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar)

**But-3-enyl 2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetat**  
**C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>**

Aufreinigung durch Säulen (Kieselgel/Dichlormethan:Methanol 10:1)

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

$\delta$  7.44 (d,  $J = 8.1$ , 2H, ArH), 7.25 (dd,  $J = 7.5, 1.5$ , 1H, ArH), 7.13-7.08 (m, 2H, ArH), 7.03 (s, 1H, NH), 6.92 (td,  $J = 7.4, 1.1$ , 1H, ArH), 6.47 (d,  $J = 8.0$ , 1H, ArH), 5.79 (ddt,  $J = 17.1, 10.3, 6.8$ , 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.09-4.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.18 (t,  $J = 6.7$ , 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar)  $\delta$  2.40 (qt,  $J = 6.7, 1.3$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

**But-3-enyl 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoat**  
**C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>**

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

$\delta$  7.79-7.70 (m, 3H, ArH), 7.42 (dd,  $J = 8.5, 1.9$ , 1H, ArH), 7.26 (d,  $J = 8.0, 1.9$ , 1H, ArH), 7.13 (dd,  $J = 9.0, 6.8, 2.4$ , 1H, ArH), 5.78-5.67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.04-4.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.15-4.06 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.92-3.85 (m, 4H, CH<sub>3</sub>-O, CH-Ar), 2.31 (qt,  $J = 6.7, 1.2$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.55-1.52 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH)

MS (EI):  $m/z$  (%) 284 (36) [M<sup>+</sup>], 229,7 (1,4), 185 (100), 170 (12), 142 (17), 115 (10)

**(Z)-But-2-en-1,4-diyl-bis-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoat**  
**C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>**

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):***

$\delta$  7.69-7.63 (m, 6H, ArH), 7.36 (dd,  $J = 8.5, 1.9$ , 2H, ArH), 7.14-7.09 (m, 4H, ArH), 5.62-5.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.64-4.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.90 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-O), 3.82 (m,  $J = 7.1$ , 2H, CH-Ar), 1.56-1.54 (d, 6H, CH<sub>3</sub>-CH)

MS (EI): m/z (%) 512 (12) [M<sup>+</sup>], 185 (100), 141 (10), 115 (5)

**But-3-enyl 2-(4-isobutylphenyl)propanoat**

**C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.20 (d, J = 8.2, 1.9, 2H, ArH), 7.09 (d, J = 6.2, 2H, ArH), 5.69 (ddt, J = 17.1, 10.3, 6.8, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.04-4.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.11 (t, J = 6.7, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.68 (q, J = 7.2, 1H, CH-Ar), 2.44 (d, J = 7.2, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 2.32 (qt, J = 6.7, 1.3, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.84 (dt, J = 13.5, 6.8, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.47 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH), 0.87 (d, J = 1.1, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

MS (EI): m/z (%) 260 (10) [M<sup>+</sup>], 217 (4), 206 (15), 161 (100)

**(Z)-But-2-en-1,4-diyl-bis-2-(4-isobutylphenyl)propanoat**

**C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.18-7.16 (d, 4H, ArH), 7.09-7.07 (d, 4H, ArH), 5.63-5.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.65-4.54 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.67 (q, J = 7.2, 2H, CH-Ar), 2.43 (d, J = 7.2, 4H, CH<sub>2</sub>-Ar), 1.83 (dq, J = 13.6, 6.8, 2H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.46 (d, J = 17.5, 6H, CH<sub>3</sub>-CH), 0.89-0.87 (d, 12H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

MS (EI): m/z (%) 463 (1) [M<sup>+</sup>-H], 259 (9), 205 (10), 189 (3), 161 (100)

**But-3-enyl-2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetat**

**C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.67-7.64 (m, 2H, ArH), 7.48-7.45 (m, 2H, ArH), 6.96 (d, J = 2.5, 1H, ArH), 6.87 (d, J = 9.0, 1H, ArH), 6.67 (dd, J = 9.0, 2.5, 1H, ArH), 5.77-5.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.09-5.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.16 (t, J = 6.7, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C=O), 2.40-2.35 (m, 5H, Ar-CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

MS (EI): m/z (%) 410 (37) [M<sup>+</sup>-H], 312 (15), 139 (100), 111 (26)



**(Z)-But-2-en-1,4-diyl-bis(2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetat****C<sub>42</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>****<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.65 (d, J = 8.3, 4H, ArH), 7.47-7.45 (d, 4H, ArH), 6.93 (d, J = 2.2, 2H, ArH), 6.85 (d, J = 9.0, 2H, ArH), 6.66 (dd, J = 9.1, 2.2, 2H, ArH), 5.73-5.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.67 (d, J = 4.4, 4H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.82 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-O), 3.66 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C=O), 2.37 (s, 6H, Ar-CH<sub>3</sub>)

**(Z)-But-2-en-1,4-diyl-bis-2-(2-(2,6-dichlorphenylamino)phenyl)acetat****C<sub>32</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>****<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.37-7.33 (d, 4H, ArH), 7.24-7.21 (dd, 2H, ArH), 7.14-7.10 (dt, 2H, ArH), 7.01-6.93 (m, 4H, ArH), 6.86 (s, J = 5.4, 2H, NH), 6.57-6.53 (d, 2H, ArH), 5.81-5.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.77-4.71 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.84-3.80 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C=O)

**Allyl-2-hydroxybenzoat****C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 10.73-10.70 (s, 1H, Ar-OH), 7.92-7.88 (dd, 1H, ArH), 7.57-7.52 (m, 1H, ArH), 6.98-6.93 (m, 2H, ArH), 6.16-6.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.50-5.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.34-5.29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.92-4.87 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-)

**But-3-enyl-2-hydroxybenzoat****C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 10.75 (s, 1H, Ar-OH), 7.87 (dd, J = 0.4, 1H, ArH), 7.54 (ddd, J = 8.5, 7.1, 1.6, 1H, ArH), 6.98-6.93 (m, 2H, ArH), 5.93 (ddt, J = 17.1, 10.3, 6.8, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.23-5.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.12-5.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.46-4.43 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 2.57 (qt, J = 6.6, 1.4, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

**N-Allyl-2-hydroxybenzamid**  
**C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

δ 12.78-12.71 (s, 1H, Ar-OH), 8.35-8.25 (s, 1H, CO-NH), 7.82 (dd, J = 8.0, 1.6, 1H, ArH), 7.43-7.39 (m, 1H, ArH), 6.95-6.84 (m, 2H, ArH), 6.00-5.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.24 (dq, J = 17.2, 1.7, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.13-5.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.04 (ddt, J = 9.2, 4.0, 2.2, 2H, NH-CH<sub>2</sub>.)

**(Z)-But-2-en-1,4-diylbis-2-hydroxybenzoat**  
**C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether:Diethylether 9:1

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

δ 10.68 (s, J = 2.4, 1H, Ar-OH), 7.88 (dd, J = 8.0, 1.7, 1H, ArH), 7.54 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.7, 2H, ArH), 6.99-6.92 (m, 4H, ArH), 6.08-6.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH), 5.15-5.14 (d, 4H, CH<sub>2</sub>-CH=CH)

**But-3-en-2-yl-2-hydroxybenzoat**  
**C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

δ 10.79 (s, 1H, Ar-OH), 7.91-7.89 (m, 1H, ArH), 7.56-7.52 (m, 1H, ArH), 6.98-6.93 (m, 2H, ArH), 6.05 (ddd, J = 17.3, 10.6, 5.8, 1H, ArH), 5.67-5.64 (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH), 5.38 (dt, J = 17.3, 1.3, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.22 (dt, J = 10.6, 1.3, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 1.48 (d, J = 6.5, 3H, CH<sub>3</sub>-CH)

**2-Methylbut-3-en-2-yl 2-hydroxybenzoat**  
**C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>**

Aufreinigung durch Säulen mit Petrolether

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  10.85 (s,  $J = 0.4$ , 1H, Ar-OH), 7.86-7.83 (m, 1H, ArH), 7.53-7.49 (m, 1H, ArH), 6.96-6.91 (m, 2H, ArH), 6.26 (ddd,  $J = 17.5, 10.9, 1.3$ , 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.33 (dd,  $J = 17.5, 0.8$ , 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.16 (dt,  $J = 10.9, 0.9$ , 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 1.70 (s,  $J = 9.4$ , 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**N-(4-(Allyloxy)phenyl)acetamid**  
**C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>**

2,9g Natrium wurden in 150ml abs. Ethanol gelöst um eine Natrium-Ethanolatlösung zu erhalten. In dieser wurde 15,12g (0,1mol) Paracetamol gelöst und 8,64ml (0,1mol) Allylbromid wurde zugegeben. Um die Reaktion zu starten erfolgte nun die Zugabe einer Spatelspitze Kaliumiodid. Der Ansatz wurde 5h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde der Ethanol abdestilliert und der Destillationsrückstand in 100ml einer 5%ige NaOH gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 3x mit Ether ausgeschüttelt. Durch Abrotieren des Ethers wurde das gewünschte Produkt erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.57-7.53 (m, 2H, ArH), 6.89-6.86 (m, 2H, ArH), 6.06 (ddt,  $J = 17.3, 10.5, 5.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.40 (dq,  $J = 17.3, 1.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.23 (dq,  $J = 10.6, 1.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.53 (dt,  $J = 5.2, 1.6$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-)

➤ **Synthese von COX-2-Liganden**

**(E)-3-(4-(Methylthio)phenyl)-2-phenylacrylsäure**  
**C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>S**

15mmol Phenyllessigsäure werden in 15ml Acetanhydrid gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 15mmol 4-Methylthiobenzaldehyd und 2ml Triethylamin. Der Ansatz wird 16h unter Reflux gekocht. Nach dem Abkühlen versetzt man die Lösung mit Diethylether und schüttelt die organische Phase mit 10% NaOH-Lsg. aus bis der pH der wässrigen Phase basisch ist. Die vereinten wässrigen Phasen werden mit konz. HCl auf einen pH von 1-2 eingestellt, wobei ein gelb-ockerfarbener Niederschlag ausfällt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, in Ethylacetat gelöst, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend das Lösungsmittel wieder abrotiert.

**(E)-3-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylsäure**  
**C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>S**

(E)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylsäure erhält man durch die Oxidation von (E)-3-(4-(methylthio)phenyl)-2-phenylacrylsäure. Dazu stellt man sich eine Lösung aus Eisessig und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 her und tropft diese langsam zur (E)-3-(4-(methylthio)phenyl)-2-phenylacrylsäure bei 50-60°C und lässt 8h rühren. Die Lösung wird in Eiswasser gegossen und anschließend mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Zur weiteren Aufreinigung werden die vereinigten Dichlormethan-phasen erneut mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. ausgeschüttelt. Zum Schluß werden die gesammelten NaHCO<sub>3</sub>-Phasen mit konz. HCl angesäuert. Unter ausdauerndem Kratzen am Glasrand fällt das gewünschte Sulfon als weißer Niederschlag aus. Dieser wird anschließend abgesaugt.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.92 (s, 1H, Ar-H), 7.78-7.75 (m, 2H, Ar-H), 7.41-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.37-7.34 (m, 2H, Ar-H), 7.27-7.24 (m, 2H, Ar-H), 3.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>)

**(E)-But-3-enyl 3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylat**  
**C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>S**

Synthese des Esters nach der allgemeinen Vorschrift – siehe oben

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.78-7.74 (m, 2H, ArH), 7.42-7.39 (m, 3H, ArH), 7.35-7.32 (m, 2H; ArH), 7.24 (m, *J* = 1.2 Hz, 2H, ArH), 5.82 (m, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=CH) 5.13-5.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.27-4.24 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>), 2.42 (qt, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

**(E)-2-(3-Bromphenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylsäure**  
**C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>4</sub>S**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.99-7.96 (s, 1H, Ar-CH=C), 7.84-7.79 (m, 2H, ArH), 7.60-7.55 (m, 1H, ArH), 7.51-7.47 (m, 1H; ArH), 7.43-7.33 (m, 3H, ArH), 7.26-7.23 (m, 1H, ArH), 3.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>).

**(E)-But-3-enyl-2-(3-bromphenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)acrylat -**  
**C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>4</sub>S**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.95-7.93 (s, 1H, Ar-CH=C), 7.83-7.80 (m, 2H, ArH), 7.60-7.57 (m, 1H, ArH), 7.49-7.47 (m, 1H, ArH), 7.40-7.33 (m, 3H, ArH), 7.24-7.21 (m, 1H, ArH), 5.88-5.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.14-5.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.28-4.24 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>), 2.45-2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

**4-(5-p-Tolyl-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-1-yl)benzensulfonamid**  
**C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S**

Das Celecoxib wurde durch Extraktion aus Celebrex 200mg Kapseln erhalten. Im ersten Schritt wurden dafür die Kapseln geöffnet und die leeren Kapselhüllen verworfen. Durch Zugabe von Aceton wurde das Celecoxib gelöst und durch Filtration von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, konnte das Celecoxib in ausreichender Reinheit gewonnen werden.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**

δ 7.93-7.88 (m, 2H, ArH), 7.50-7.47 (m, 2H, ArH), 7.19-7.16 (m, 2H, ArH), 7.12-7.10 (m, 2H, ArH), 6.74-6.73 (s, 1H, H-Pyrazol), 2.39-2.37 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>)

**4-(1-(4-Sulfamoylphenyl)-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-5-yl)-benzoesäure**  
**C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S**

Für die Oxidation von Celecoxib wurden 1,5g (3,9mmol) in 20 ml Wasser in einem 50ml Rundkolben suspendiert und mit 1g Natriumcarbonat versetzt. Nach Zugabe von 2g Kaliumpermanganat wurde der Ansatz unter Rühren langsam erhitzt und 45min unter Rückfluss gekocht. Die Farbänderung des Kaliumpermanganates zu Braunstein zeigt dabei den Endpunkt der Reaktion an. Anschließend wird der Braunstein heiß abgesaugt und mit wenig heißem Wasser gewaschen. Durch Ansäuern des Filtrates mit konz. HCl fällt die gewünschte Säure aus. Um die Ausbeute zu erhöhen wird der Ansatz noch 2h im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend der Niederschlag abgesaugt.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 8.07-8.04 (m, 2H, ArH), 8.01-7.97 (m, 2H, ArH), 7.63-7.59 (m, 2H, ArH), 7.55-7.51 (m, 2H, ArH), 7.18-7.17 (s, 1H, H-Pyrazol)

**But-3-enyl 4-(1-(4-sulfamoylphenyl)-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-5-yl)benzoat****C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S**

Synthese des Esters nach der allgemeinen Vorschrift – siehe oben

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

δ 8.06-8.01 (m, 2H, ArH), 8.01-7.95 (m, 2H ArH), 7.64-7.57 (m, 2H, ArH), 7.57-7.50 (m, 2H, ArH), 7.18-7.16 (s, 1H, H-Pyrazol), 5.97-5.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.21-5.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 5.11-5.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.40-4.35 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 2.57-2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

➤ **Synthese des Zeise-Salzes**

Als erstes werden 4g Tetrachloroplatinat in 50ml 3,5M O<sub>2</sub>-freier Salzsäure gelöst. Sollten gelbe Kristalle oder elementares Platin beim Lösungsvorgang am Boden zurückbleiben, muss die Lösung noch einmal filtriert werden. Als Katalysator werden nun 45mg SnCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O zu der Lösung gegeben und anschließend wird für 2-3h Ethen durch die Lösung geleitet. Dabei färbt sich die rote Tetrachloroplatinatlösung nun langsam zitronengelb. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit einem Kristall Zeise-Salz angeimpft und für 45min ins Tiefkühlfach gestellt. Die Nadeln werden abgesaugt und über KOH im Exsikkator getrocknet. Die abgesaugte Lösung wird am Rotationsverdampfer um die Hälfte reduziert und erneut ins Tiefkühlfach gestellt. Die entstandenen Kristalle werden ebenfalls abgesaugt und getrocknet. Die 2. Fraktion wird in Methanol gelöst, filtriert und anschließend das Lösungsmittel abgedampft. Die Ausbeute der Reaktion beträgt 2,8-3g Zeise-Salz.

➤ **Komplexierung der Liganden am Platin**

Die Komplexierung der Liganden ans Platin erfolgt durch einen Ligandenaustausch. Als Edukt wird dabei das Zeise-Salz verwendet, welches in O<sub>2</sub>-freien absoluten Ethanol gelöst wird. Der gewünschte Ligand wird ebenfalls in O<sub>2</sub>-freien absoluten Ethanol oder auch absolutem Aceton gelöst und bei Raumtemperatur zur Zeise-Lösung gegeben. Anschließend wird 3h bei 50°C gerührt. Nach Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer auf 5ml wird langsam Diethylether zugegeben. Dabei fällt der gewünschte Platinkomplex aus. Um die Kristallisation abzuschließen, wird der Ansatz für 30 Min ins Tiefkühlfach gestellt. Anschließend wurde der Niederschlag abgesaugt

**Kaliumallylbenzoattrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{10}H_{10}O_2)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  8.11-8.06 (m, 2H, ArH), 7.66-7.60 (m, 1H, ArH), 7.55-7.49 (m, 2H, ArH), 5.09-4.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.98-4.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.59-4.51 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.42-4.21 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 194,2°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 24,52 H% 2,25 (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

gefunden: C% 24,96 H% 2,26

**ESI-TOF** berechnet: 462,9375

gefunden: 462,9493

**Kaliumallyl 2-(4-isobutylphenyl)propanoattrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{16}H_{22}O_2)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.28-7.23 (m, 2H, ArH), 7.14-7.10 (m, 2H, ArH), 4.84 (m, J = 4.8, 1.1, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.76-4.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.38-4.26 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.27-4.12 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.81-3.75 (m, 1H, Ar-CH), 2.46-2.42 (d, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 1.90-1.80 (m, 1H CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.47-1.42 (dd, 3H, CH<sub>3</sub>-CH), 0.91-0.85 (d, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 178,9°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 33,12 H% 3,96 (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

gefunden: C% 33,00 H% 3,47

**ESI-TOF** berechnet: 547,0316

gefunden: 547,0311

**Kaliumallyl 2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetattrichloroplatinat(II)**

$K[(C_{22}H_{20}ClNO_4)(Cl)_3]$

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.76-7.74 (m, 2H, ArH), 7.66-7.63 (m, 2H, ArH), 7.12 (d, J = 2.5, 1H, ArH), 7.01 (dd, J = 9.0, 0.4, 1H, ArH), 6.69 (dd, J = 9.0, 2.6, 1H, ArH), 4.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.72 (dd, J = 12.0, 5.5, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.33-4.22 (m, 3H, CH<sub>2</sub>=CH, O-CH<sub>2</sub>-), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C=O), 2.35 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 187,3°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 36,52 H% 3,04	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 36,53 H% 2,93	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	697,9775
	gefunden:	697,9573

**Kaliumallyl 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoattrichloro-platinat(II)**

$K[Pt(C_{17}H_{18}O_3)(Cl)_3]$

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.80 (m, J = 9.6, 4.0, 3H, ArH), 7.50-7.47 (m, 1H, ArH), 7.27 (d, J = 2.4, 1H, ArH), 7.15-7.12 (m, 1H, ArH), 4.86 (m, J = 4.9, 1.6, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.78-4.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.39-4.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>=CH, O-CH<sub>2</sub>-), 3.98-3.93 (m, 1H, Ar-CH), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 1.57-1.54 (dd, 3H, CH<sub>3</sub>-CH)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 183,9°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 33,76 H% 3,12	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 33,52 H% 3,30	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	570,9953
	gefunden:	570,9975



**Kaliumallyl 2-(2-(2,6-dichlorphenylamino)phenyl)acetat-trichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{17}H_{15}Cl_2NO_2)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.51-7.43 (m, 2H, ArH), 7.35-7.27 (m, 1H, ArH), 7.19-7.08 (m, 2H, ArH), 7.07-7.03 (s, 1H, NH), 6.97-6.89 (m, 1H, ArH), 6.51-6.42 (d, 1H, ArH), 5.00-4.87 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.87-4.78 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.46-4.38 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.36-4.17 (m, 2H,  $O-CH_2-$ ), 3.93-3.84 (s, 2H,  $CH_2-Ar$ )

gelbes Pulver, Zersetzung bei 122,6°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 30,54 H% 2,42 (\*0,25  $C_2H_5OH$ )

gefunden: C% 30,50 H% 2,60

**ESI-TOF** berechnet: 637,9160

gefunden: 637,9067

**Kalium-N-(4-(allyloxy)phenyl)acetamidtrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{11}H_{13}NO_2)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.58-7.54 (m, 2H, ArH), 6.92-6.88 (m, 2H, ArH), 5.09-5.00 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.71-4.66 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ), 4.37-4.22 (m, 2H,  $O-CH_2-$ ), 4.22-4.16 (m, 1H,  $CH_2=CH$ )

gelbes Pulver, Zersetzung bei 203,4°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 25,42 H% 2,69 (\*0,25  $C_2H_5OH$ )

gefunden: C% 25,45 H% 2,74

**ESI-TOF** berechnet: 491,9641

gefunden: 491,9648

**Kaliumbut-3-enyl 2-(2-(2,6-dichlorphenylamino)phenyl)acetat-trichloro-**  
**platinat(II)****K[Pt(C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>)(Cl)<sub>3</sub>]****<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.51-7.47 (m, 2H, ArH), 7.33-7.31 (m, 1H, ArH), 7.19-7.06 (m, 3H, ArH, NH), 6.97-6.92 (m, 1H, ArH), 6.48-6.45 (m, 1H, ArH), 4.99-4.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.57-4.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.25-4.09 (d, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.92-3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 2.55-2.46 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2.02-1.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 103,6°C

**CHN-Analytik**            berechnet:    C% 31,64 H% 2,66    (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)  
                                  gefunden:    C% 31,69 H% 2,68

**ESI-TOF**                berechnet:    651,9311  
                                  gefunden:    651,9379

**Kaliumbut-3-enyl 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoat-trichloro-**  
**platinat(II)****K[Pt(C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>)(Cl)<sub>3</sub>]****<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.82-7.75 (m, 3H, ArH), 7.49-7.45 (m, 1H, ArH), 7.27 (d, J = 2.2, 1H, ArH), 7.15-7.12 (m, 1H, ArH), 4.96-4.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.53-4.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.20-4.03 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 4.02-3.94 (m, 1H, Ar-CH), 3.92-3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 2.45-2.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.93-1.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.57-1.51 (dd, 3H, CH<sub>3</sub>-CH)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 175,6°C

**CHN-Analytik** berechnet:    C% 34,91 H% 3,41    (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)  
                                  gefunden:    C% 34,50 H% 3,46

**ESI-TOF**                berechnet:    585,0104  
                                  gefunden:    585,0243

**Kalium-(Z)-but-2-en-1,4-diyl-bis-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-  
propanoatrichloroplatinat(II)**  
 $\text{K}[\text{Pt}(\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_5)(\text{Cl})_3]$

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

$\delta$  7.82-7.67 (m, 6H, ArH), 7.47-7.38 (m, 2H, ArH), 7.28-7.23 (m, 2H, ArH), 7.15-7.09 (m, 2H, ArH), 4.92-4.63 (m, 4H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 4.62-4.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 3.94-3.85 (m, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ , Ar-**CH**), 3.83-3.75 (m, 1H, Ar-**CH**), 1.56-1.43 (m, 6H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ )

gelbes Pulver, Zersetzung bei 138,6°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 45,89 H% 4,21	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 45,97 H% 4,24	
<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	813,1354	
	gefunden:	813,1012	

**Kaliumbut-3-enyl 2-(4-isobutylphenyl)propanoatrichloroplatinat(II)**  
 $\text{K}[\text{Pt}(\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2)(\text{Cl})_3]$

***<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):***

$\delta$  7.28-7.22 (m, 2H, ArH), 7.15-7.10 (m, 2H, ArH), 5.00-4.78 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 4.51-4.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 4.23-4.00 (m, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-}$ ), 3.83-3.75 (m, 1H, Ar-**CH**), 2.48-2.35 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ,  $\text{CH-}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.96-1.78 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 1.48-1.42 (dd, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 0.92-0.86 (d, 6H,  $\text{CH-}(\text{CH}_3)_2$ )

gelbes Pulver, Zersetzung bei 135,9°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 34,32 H% 4,20	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 34,34 H% 4,24	
<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	561,0473	
	gefunden:	561,0476	

**Kalium-(Z)-but-2-en-1,4-diyl-bis(2-(4-isobutylphenyl)propanoat-trichloroplatinat(II))**  
**K[Pt(C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>)(Cl)<sub>3</sub>]**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.30-7.19 (m, 4H, ArH), 7.15-7.10 (m, 4H, ArH), 4.82-4.39 (m, 5H, CH<sub>2</sub>=CH, CH<sub>2</sub>=CH), 3.79-3.71 (m, 2H, Ar-CH), 2.46-2.42 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ar), 1.88-1.81 (m, 2H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.48-1.38 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH), 0.89-0.85 (d, 12H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 142,9°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 47,11 H% 5,38 (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

gefunden: C% 47,44 H% 5,48

**ESI-TOF** berechnet: 765,1629

gefunden: 765,1657

**Kaliumbut-3-enyl-2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetat-trichloroplatinat (II)**  
**K[Pt(C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>)(Cl)<sub>3</sub>]**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.77-7.73 (m, 2H, ArH), 7.65-7.62 (m, 2H, ArH), 7.15 (d, J = 2.4, 1H, ArH), 7.00-6.97 (d, 1H, ArH), 6.70-6.67 (dd, 1H, ArH), 4.95-4.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.42-4.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.20-4.10 (m, 2H, , O-CH<sub>2</sub>-), 3.82 (m, 5H, CH<sub>3</sub>-O, CH<sub>2</sub>-C=O), 2.51-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2,34 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 1.93-1.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 137,3°C

**CHN-Analytik** berechnet: C% 36,95 H% 3,10 (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

gefunden: C% 36,78 H% 3,63

**ESI-TOF** berechnet: 711,9932

gefunden: 711,9963

**Kalium -(Z)-but-2-en-1,4-diyl-bis(2-(1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetat)trichloroplatinat(II)**

**$K[Pt(C_{43}H_{39}Cl_2N_2O_8)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.72-7.69 (m, 4H, ArH), 7.62-7.59 (m, 4H, ArH), 7.09 (d, J = 2.5, 2H, ArH), 6.97 (d, J = 9.0, 2H, ArH), 6.66 (dd, J = 9.0, 2.5, 2H, ArH), 4.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.79 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-O), 3.73 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C=O), 2.31 (s, 6H, Ar-CH<sub>3</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 185,2°C-189°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 45,59 H% 3,38	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 45,61 H% 3,39	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	1069,0540
	gefunden:	1069,0576

**Kalium-(Z)-but-2-en-1,4-diyl-bis-2-(2-(2,6-dichlorphenylamino)phenyl)-acetat)trichloroplatinat(II)**

**$K[Pt(C_{32}H_{26}Cl_4N_2O_4)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  7.51-7.42 (d, 4H, ArH), 7.31-7.26 (dd, 2H, ArH), 7.17-7.06 (m, 4H, ArH), 7.06-7.02 (s, 2H, NH), 6.99-6.89 (m, 2H, ArH), 6.48-6.44 (d, 2H, ArH), 5.05-4.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.86-4.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.78-4.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.89-3.83 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ar)

gelbes Pulver, Zersetzung nicht bestimmt

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 39,17 H% 2,78	(*0,25 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% H%	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	944,9324
	gefunden:	944,9379

**Kaliumallyl-2-hydroxybenzoatrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{10}H_{10}O_3)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  10.76-10.75 (s, 1H, Ar-OH), 8.06-8.02 (m, 1H, ArH), 7.60-7.55 (m, 1H, ArH), 7.04-6.98 (m, 2H, ArH), 5.12-4.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH, CH<sub>2</sub>=CH), 4.72-4.62 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.47-4.31 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 165,4°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 23,78 H% 2,19	(*0,33 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 23,42 H% 2,13	
<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	478,9319	
	gefunden:	478,9328	

**Kaliumbut-3-enyl-2-hydroxybenzoat**  
 **$K[Pt(C_{11}H_{12}O_3)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  10.82-10.80 (s, 1H, Ar-OH), 7.99-7.96 (m, 1H, ArH), 7.55-7.50 (m, 1H, ArH), 6.98-6.92 (m, 2H, ArH), 5.11-4.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.79-4.75 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 4.33-4.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 2.67-2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2.17-2.07 (m, 1H, , CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 173,4°C-186,7°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 24,59 H% 2,35	(*0,25 H <sub>2</sub> O)
	gefunden:	C% 24,25 H% 2,14	
<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	492,9476	
	gefunden:	492,9503	

**Kalium-N-allyl-2-hydroxybenzamidtrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{10}H_{11}NO_2)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  12.75-12.70 (s, 1H, Ar-OH), 8.35-8.26 (s, 1H, CO-NH), 7.84-7.77 (dd, 1H, ArH), 7.45-7.39 (m, 1H, ArH), 7.08-6.85 (m, 2H, ArH), 5.15-5.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.37-4.21 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-), 4.07-3.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 3.93-3.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 196,9°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 24,03 H% 2,46	(*0,33 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 23,78 H% 2,51	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	477,9478
	gefunden:	477,9518

**Kalium-(Z)-but-2-en-1,4-diylbis-2-hydroxybenzoattrichloroplatinat(II)**  
 **$K[Pt(C_{18}H_{16}O_6)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  10.66-10.65 (s, 1H, Ar-OH), 7.92-7.87 (dd, 2H, ArH), 7.52-7.47 (m, 2H, ArH), 6.94-6.83 (m, 4H, ArH), 5.13-5.06 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH=CH), 5.04-4.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH=CH)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 196,4°C

<b>CHN-Analytik</b>	berechnet:	C% 32,77 H% 2,65	(*0,33 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)
	gefunden:	C% 32,47 H% 2,54	

<b>ESI-TOF</b>	berechnet:	628,9644
	gefunden:	628,9639

**Kaliumbut-3-en-2-yl-2-hydroxybenzoattrichloroplatinat(II)**  
**K[Pt(C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>)(Cl)<sub>3</sub>]**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 7.93-7.90 (m, 1H, ArH), 7.54-7.49 (m, 1H, ArH), 6.99-6.92 (m, 2H, ArH), 5.76 (dd, *J* = 9.5, 6.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-CH), 4.83-4.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.40 (dd, *J* = 12.7, 1.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.28-4.23 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 1.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 167°C-179,8°C

**CHN-Analytik**            berechnet:    C% 24,80 H% 2,27  
                                  gefunden:    C% 24,80 H% 2,39

**ESI-TOF**                berechnet:    492,9475  
                                  gefunden:    492,9436

**Kalium-(E)-but-3-enyl 3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-phenylacrylat-trichloroplatinat(II)**  
**K[Pt(C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>S)(Cl)<sub>3</sub>]**

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; Aceton):**

δ 8.02 (s, 1H, Ar-CH=C), 7.77-7.73 (m, 2H, ArH), 7.41-7.37 (m, 5H, ArH), 7.29-7.26 (m, 2H, ArH), 4.99-4.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.65-4.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.19-4.13 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.10-3.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>), 2.52-2.46 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.96-1.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>).

gelbes Pulver, Zersetzung bei 210,7°C-219,6°C

**CHN-Analytik**            berechnet:    C% 34,47 H% 2,89  
                                  gefunden:    C% 34,29 H% 3,01

**ESI-TOF**                berechnet:    656,9780  
                                  gefunden:    656,9786



**Kalium-(E)-but-3-enyl-2-(3-bromphenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-acrylattrichloroplatinat(II)**

**$K[Pt(C_{20}H_{19}BrO_4S)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  8.12-8.10 (s, 1H, Ar-CH=C), 7.83-7.79 (m, 2H, ArH), 7.59-7.55 (m, 1H, ArH), 7.51-7.48 (m, 1H, ArH), 7.47-7.43 (m, 2H, ArH), 7.39-7.34 (m, 1H, ArH), 7.32-7.29 (m, 1H, ArH), 5.01-4.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.66-4.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.21-4.06 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 3.12-3.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>), 2.57-2.48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1.99-1.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 95,1°C

**CHN-Analytik**            berechnet:    C% 32,15 H% 3,07 (\*0,5 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)  
                                  gefunden:    C% 32,82 H% 3,37

**ESI-TOF**                berechnet:    736,8872  
                                  gefunden:    736,8889

**Kaliumbut-3-enyl 4-(1-(4-sulfamoylphenyl)-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-5-yl)benzoattrichloroplatinat(II)**

**$K[Pt(C_{21}H_{18}F_3N_3O_4S)(Cl)_3]$**

**$^1H$ -NMR (400 MHz; Aceton):**

$\delta$  8.15-8.11 (m, 2H, Ar-H), 8.01-7.97 (m, 2H, Ar-H), 7.62-7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.54-7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.19-7.18 (s, 1H, H-Pyrazol), 5.07-4.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.75-4.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 4.26-4.19 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 2.65-2.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2.02-1.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

gelbes Pulver, Zersetzung bei 124,2°C-130,6°C

**CHN-Analytik**            berechnet:    C% 31,68 H% 2,45% (\*0,25 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)  
                                  gefunden:    C% 31,88 H% 2,68%

**ESI-TOF**                berechnet:    765,9663  
                                  gefunden:    765,9591

## 13 Anhang

### 13.1 Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
AG	Anreicherungsgrad
APHS	2-(Acetoxyphenyl)-(Z)-styrylsulfid
CD	Circulardichroismus
COX	Cyclooxygenase
CT-DNA	calf-thymus DNA
DDC	Diethyldithiocarbamat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ESI-TOF	Elektrospray-Ionisation time-of-flight
FCS	fetales Kälberserum
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HSA	humanes Serumalbumin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
MMR	Mismatch-Reperatur
MS	Massenspektrometrie
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear overhauser effect
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OATP	organic anion transporting polypeptides
OCT	organic cation transporter
PBS	phosphate buffered saline
Sdv	Standardabweichung
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
UV	ultraviolett

## 13.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

### 13.3 Literaturverzeichnis

- 
- [1] Soetan, K. O.; Olaiya, C. O.; Oyewole, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants - a review. *African Journal of Food Science* (2010), 4(5), 200-222
- [2] Mendel, R. R.; Smith, A. G.; Marquet, A.; Warren, M. J. Metal and cofactor insertion. *Natural Product Reports* (2007), 24(5), 963-971
- [3] Levitt, L. S. The role of magnesium in photosynthesis. *Science* (Washington, DC, United States) (1954), 120 33-5
- [4] Shaul, O.; Magnesium transport and function in plants: The tip of the iceberg. *BioMetals* (2002), 15(3), 309-323
- [5] Malhotra V. K.; *Biochemistry for Students*. Tenth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India (1998)
- [6] Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.; *Harper's Biochemistry*, 25th Edition, McGraw-Hill, Health Profession Division, (2000)
- [7] Coleman, J. E.; Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* (1998), 2(2), 222-234
- [8] Kimura, E.; Roles of zinc (II) ion in zinc enzymes. *Pure and Applied Chemistry* (1993), 65(3), 355-9
- [9] Orvig, C.; Abrams, M. J. *Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction*. Chemical Reviews (Washington, D. C.) (1999), 99(9), 2201-2203
- [10] Rau S.; The history of diuretics. *Pharmazie in unserer Zeit* (2006), 35(4), 286-92
- [11] Steinhilber D., Schubert-Zsilavec M., Roth H. J.; *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*, Deutscher Apotheker Verlag, (2005)
- [12] Aktories; Förstermann; Hofmann; Sarke *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, Elsevier (2005)
- [13] Shaw, C. F.; III. Gold - based therapeutic agents. *Chemical Reviews* (Washington, D. C.) (1999), 99(9), 2589-2600
- [14] Navarro, M.; Perez, H.; Sanchez-Delgado, R. A.; Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold-chloroquine complex [Au(PPh<sub>3</sub>)(CQ)]PF<sub>6</sub>. *Journal of Medicinal Chemistry* (1997), 40(12), 1937-1939
- [15] Ott, I.; On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* (2009), 253(11+12), 1670-1681
- [16] Rosenthal, N. E.; Goodwin, F. K.; The role of the lithium ion in medicine. *Annual Review of Medicine* (1982), 33 555-68
- [17] Koepf-Maier P.; Koepf, H.; Neuse, E. W. Ferrocenium salts - the first antitumor iron compounds. *Angewandte Chemie* (1984), 96(6), 446-7
- [18] Kopf-Maier P.; Kopf H.; Neuse E. W.; Ferricenium complexes: a new type of water-soluble antitumor agent. *Journal of cancer research and clinical oncology* (1984), 108(3), 336-40
- [19] Hillard, E.; Vessieres, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C.; Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angewandte Chemie, International Edition* (2006), 45(2), 285-290
- [20] Jaouen G.; Top S.; Vessieres A.; Leclercq G; McGlinchey M. J.; The first organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) and their relevance to breast cancer. *Current medicinal chemistry* (2004), 11(18), 2505-17
- [21] Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N.; Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* (2011), 54(1), 3-25
- [22] Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions* (2008), (2), 183-194
- [23] Rosenberg B; Vancamp L; Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by elektolysis products from a platinum electrode. *Nature* (1965), 205 698-9
- [24] Wagstaff A J; Ward A; Benfield P; Heel R C.; Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* (1989), 37(2), 162-90
- [25] Raymond E.; Chaney S G; Taamma A.; Cvitkovic E.; Oxaliplatin : a review of preclinical and clinical studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* (1998), 9(10), 1053-71

- [26] Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic, E.; Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapeutics* (2002), 1(3), 227-235
- [27] Chatt, J.; Duncanson, L. A. Olefin Co-ordination compounds. III. Infrared spectra and structure: attempted preparation of acetylene compounds. *Journal of the Chemical Society* (1953), 2939-47
- [28] Seyferth, D.;  $[(C_2H_4)PtCl_3]^-$ , the Anion of Zeise 's Salt ,  $K[(C_2H_4)PtCl_3] \times H_2O$ . *Organometallics* (2001), 20(1), 2-6
- [29] Zeise, W. C. Von der Wirkung zwischen Platinchlorid und Alkohol, und von den dabei entstehenden neuen Substanzen; *Annalen der Physik und Chemie*, (1831), 21, 497
- [30] Liebig, J.; *Annalen der Chemie*, (1834), 9, 1, 9-11
- [31] Griess, P.; Martius, C. A.; *Annalen der Chemie*, (1861), 120, 324
- [32] Birnbaum, K.; *Annalen der Chemie*, (1868), 145, 68
- [33] Dewar, M. J. S.. A review of the p -complex theory. *Bulletin de la Societe Chimique de France* (1951), C71-9
- [34] Hartley, F. R.; Venanzi, L. M.; Platinum complexes with unsaturated amines. V. Thermodynamics of formation of complexes with unsaturated alcohols. *Journal of the Chemical Society [Section] A: Inorganic, Physical, Theoretical* (1967), (2), 330-2
- [35] Denning, R. G.; Hartley, F. R.; Venanzi, L. M.; Platinum complexes with unsaturated amines. IV. The thermodynamics of formation of complexes with some carbon-substituted allylammonium cations. *Journal of the Chemical Society [Section] A: Inorganic, Physical, Theoretical* (1967), (2), 328-30
- [36] Plutino, M.; Rosaria; O. S.; Roodt, Andreas; E.; Lars I.; Reaction mechanism for olefin exchange at chloro ethene complexes of platinum(II). *Inorganic Chemistry* (1999), 38(6), 1233-1238
- [37] Elding, L. I.; Groning, O.; Kinetics and mechanism for ligand substitution reactions of square-planar (dimethyl sulfoxide)platinum(II) complexes. Stability and reactivity correlations. *Inorganic Chemistry* (1978), 17(7), 1872-80
- [38] Otto, S.; Elding, L. I.; Low temperature kinetic study of very fast substitution reactions at platinum(II) trans to olefins. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (2002), (11), 2354-2360
- [39] Benedetti, M.; Fanizzi, F. P.; Maresca, L.; Natile, G.; The unexpected reactivity of Zeise 's anion in strong basic medium discloses new substitution patterns at the platinum center. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* (2006), (10), 1118-1120
- [40] Benedetti, M.; Antonucci, D.; Migoni, D.; Vecchio, V. M.; Ducani, C.; Fanizzi, F. P.; Water-soluble organometallic analogues of oxaliplatin with cytotoxic and anticlonogenic activity. *ChemMedChem* (2010), 5(1), 46-51
- [41] De Pascali, S. A.; Migoni, D.; Papadia, P.; Muscella, A.; Marsigliante, S.; Ciccarese, A.; Fanizzi, F. P.; New water-soluble platinum(II) phenanthroline complexes tested as cisplatin analogues: First-time comparison of cytotoxic activity between analogous four- and five-coordinate species. *Dalton Transactions* (2006), (42), 5077-5087
- [42] Schror K.; 100 years of successful drug discovery. The history of aspirin. *Pharmazie in unserer Zeit* (2009), 38(4), 306-13
- [43] Ulbrich, H.; Dannhardt G.; A heterogenous drug class. NSAID: classification and spectrum of action. *Pharmazie in unserer Zeit* (2002), 31(2), 146-54
- [44] Perrone, M. G.; Scilimati, A.; Simone, L.; Vitale, P.; Selective COX - 1 inhibition : a therapeutic target to be reconsidered. *Current Medicinal Chemistry* (2010), 17(32), 3769-3805
- [45] Li, M.; Lotan, R.; Levin, B.; Tahara, E.; Lippman, S. M.; Xu, X.; Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2000), 9(6)
- [46] Rayyan, Y.; Williams, J.; Rigas, B.; The role of NSAIDs in the prevention of colon cancer. *Cancer Investigation* (2002), 20(7 & 8), 1002-1011
- [47] Singh, B.; Lucci, A.. Role of Cyclooxygenase - 2 in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* (2002), 108(1), 173-179
- [48] Ott, I.; Kircher, B.; Bagowski, C. P.; Vlecken, D. H. W.; Ott, E. B.; Will, J.; Bensdorf, K.; Sheldrick, W. S.; Gust, R.. Modulation of the biological properties of aspirin by formation of a bioorganometallic derivative. *Angewandte Chemie, International Edition* (2009), 48(6), 1160-1163
- [49] Moreau, A.; Chen, Q.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E.. Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2006), 14(23)
- [50] Hassner A., Alexanian V., *Tetrahedron Lett.* (1978), 46, 4475-4478
- [51] Alexander, E. R.. *Principles of Ionic Organic Reactions.* (1950), 286 pp.

- [52] Buckles, R. E.; Bremer, K. G. A kinetic study of the Perkin condensation. *Journal of the American Chemical Society* (1953), 75 1487-9
- [53] Keller, R. N.; Potassium tetrachloroplatinate(II) (potassium chloroplatinite), *Inorg. Syntheses* (1946), II 247-50
- [54] Degen, I. A.; Rowlands, A. J. The Fourier transform Raman spectra of a series of platinum(II), palladium(II) and gold(III) square - planar complexes. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (1991), 47A(9-10), 1263-8
- [55] Hendra, P. J.; Raman spectra of complex anions of formula  $MX_4^{n-}$ , where M is gold(III), platinum(II), or palladium(II), and X is a halogen atom. *Journal of the Chemical Society [Section] A: Inorganic, Physical, Theoretical* (1967), (8), 1298-1301
- [56] Pietropaolo, R.; Graziani, M.; Belluco, U.; Reaction of tetrachloroplatinate(II) with ethylene in the presence of chlorostannate(II) ion. *Inorganic Chemistry* (1969), 8(7), 1506-10
- [57] Da, T. T.; Minh, N. Thi T.; Chi, N. T. T.; Dinh, N. H. Synthesis and spectral characterization of some complexes of platinum(II) containing h 2-methyleugenol. *Polyhedron* (2007), 26(13), 3271-3276
- [58] Love, R. A.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Andrews, L. C.; Bau, R.; Neutron diffraction study of the structure of Zeise's salt,  $KPtCl_3(C_2H_4) \cdot H_2O$ . *Inorganic Chemistry* (1975), 14(11), 2653-7
- [59] Demuth R.; Kober F.; *Grundlagen der Komplexchemie* (1992), 162pp
- [60] Hahn, C.; Enhancing electrophilic alkene activation by increasing the positive net charge in transition-metal complexes and application in homogeneous catalysis. *Chemistry--A European Journal* (2004), 10(23), 5888-5899
- [61] Ding, S.; McDowell, C. A.; Zeise 's salt studied by high resolution solid state  $^{13}C$  CPMAS and  $^1H$  SPEDA NMR spectroscopy. *Chemical Physics Letters* (1997), 268(1,2)
- [62] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage, Thieme Verlag (2005)
- [63] Zeise W. C.; *Annalen der Physik und Chemie* 1831, 97, 497-541
- [64] Milgrom, J.; Urry, W. H.; Ethers of olefin alcohols. (1965), 5 pp
- [65] Hartley, F. R.; Venanzi, L. M. Platinum complexes with unsaturated amines. V. Thermodynamics of formation of complexes with unsaturated alcohols. *Journal of the Chemical Society [Section] A: Inorganic, Physical, Theoretical* (1967), 2), 330-2
- [66] Jira, R.; Sedlmeier, J.; Smidt, J. Kinetics and mechanism of olefin oxidation with palladium and platinum compounds. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (1966), 693 99-108
- [67] Benedetti, M.; Fanizzi, F. P.; Maresca, L.; Natile, G.; The unexpected reactivity of Zeise 's anion in strong basic medium discloses new substitution patterns at the platinum center. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* (2006), (10), 1118-1120
- [68] Barone, C. R.; de Pinto, S.; Lorusso, G.; Di Masi, N. G.; Maresca, L.; Natile, G.; Deprotonation versus nucleophilic substitution in some platinum ( II ) coordinated olefins containing an electron withdrawing group. *Organometallics* (2010), 29(18), 4036-4040
- [69] Intini, F. P.; Pellicani, R. Z.; Boccarelli, A.; Sasanelli, R.; Coluccia, M.; Natile, G.; Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity of new amidineplatinum(II) complexes obtained by addition of ammonia to coordinated acetonitrile. *European Journal of Inorganic Chemistry* (2008), (29), 4555-4561
- [70] Xiao, Z.; Hausheer, F. H.; Petluru, P.; Platinum complexes with mononitrile-containing ligands. *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2007), 19 pp
- [71] Boss, R.; Scheffold, R.; Cleavage of allyl ethers with palladium/carbon. *Angewandte Chemie* (1976), 88(17), 578-9
- [72] Gigg, R.; Warren, C. D. The allyl ether as a protecting group in carbohydrate chemistry. II. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* (1968), (15), 1903-11
- [73] Barone, C. R.; Cini, R.; Clot, E.; Eisenstein, O.; Maresca, L.; Natile, G.; Tamasi, G.; A NMR, X - ray , and DFT combined study on the regio-chemistry of nucleophilic addition to platinum(II) coordinated terminal olefins. *Journal of Organometallic Chemistry* (2008), 693(17), 2819-2827
- [74] H.P.T. Ammon. *Hunnius* 10. Auflage (2010), S. 1020
- [75] Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Jaervinen, T.; Savolainen, J.; Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery* (2008), 7(3), 255-270
- [76] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001), 46(1-3), 3-26
- [77] Sangster, Octanol-Water Partition coefficients of simple organic compounds. *Journal of physical and chemical reference data*, (1989)
- [78] Meyer, V., R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Wiley-VCH, 8. Auflage, (1999)

- [79] Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (1998), 38, 97-120
- [80] Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M.; The x - ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase - 1. *Nature (London, United Kingdom)* (1994), 367(6460), 243-9
- [81] Garavito, R. M.; DeWitt, D. L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids* (1999), 1441(2-3), 278-287
- [82] Catella-L., Francesca; R., Muredach P.; Kapoor, S. C.; Cucchiara, A. J.; DeMarco, S.; Tournier, B.; Vyas, S. N.; FitzGerald, G. A.; Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *New England Journal of Medicine* (2001), 345(25), 1809-1817
- [83] Simmons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T.; Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* (2004), 56(3), 387-437
- [84] Hinz B; Brune K.; COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects. *Pharmazie in unserer Zeit* (1999), 28(1), 21-9
- [85] Löffler; Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4. Auflage, S. 63
- [86] Fu, J. Y.; Masferrer, J. L.; Seibert, K.; Raz, A.; Needleman, P.; The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1990), 265(28), 16737-40
- [87] Tanabe, T.; Tohnai, N.; Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* (2002), 68-69 95-114
- [88] Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature (London)* (1997), 385(6616), 555
- [89] FitzGerald, G. A. (2003). COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 11, 879-90
- [90] Morita, I.; Schindler, M.; Regier, M. K.; Otto, J. C.; Hori, T.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L.; Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry* (1995), 270(18), 10902-8
- [91] Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L.; COX 3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002), 99(21), 13926-13931
- [92] Botting, R.; Ayoub, S. S.; COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (2005), 72(2), 85-87
- [93] Aktories; Förstermann; Hofmann; Starke *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, 352-357
- [94] DuBois R. N.; Shao J.; Tsujii M.; Sheng H.; Beauchamp R. D.; G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer research* (1996), 56(4), 733-7
- [95] Chen, D.; Reierstad, S.; Lin, Z.; Lu, M.; Brooks, C.; Li, N.; Innes, J.; Bulun, S. E. Prostaglandin E2 induces breast cancer - related aromatase promoters via activation of p38 and c-Jun NH2-terminal kinase in adipose fibroblasts. *Cancer Research* (2007), 67(18), 8914-8922
- [96] Mankhetkorn, S.; Abedinzadeh, Z.; Houee-Levin, C.; Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical. *Free Radical Biology & Medicine* (1994), 17(6), 517-27
- [97] Jewett, S. L.; Rocklin, A. M.; Two applications using N,N '- diethyldithiocarbamate as a stain for copper in native polyacrylamide gels of superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry* (1996), 237(1), 65-69
- [98] MacDonald, I. D.; Graff, G.; Anderson, L. A.; Dunford, H. B.; 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1989), 272(1),194-202
- [99] Marnett, L. J.; Wlodawer, P.; Samuelsson, B.; Cooxygenation of organic substrates by the prostaglandin synthetase of sheep vesicular gland. *Journal of Biological Chemistry* (1975), 250(21), 8510-17
- [100] Hsuanyu, Y.; Dunford, H. B.; Reactions of prostaglandin H synthase in the presence of the stabilizing agents diethyldithiocarbamate and glycerol. *Biochemistry and Cell Biology* (1990), 68(6)

- [101] Lippert, B.; Cisplatin: chem. and biochemistry of a leading anticancer drug.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999; p 1999
- [102] Zimmermann, T.; Chval, Z.; Burda, J. V.; Cisplatin interaction with cysteine and methionine in aqueous solution: computational DFT/PCM Study. *Journal of Physical Chemistry B* (2009), 113(10), 3139-3150
- [103] Baker, A. T.; Emmett, M. T. The crystal and molecular structures of bis (diethyldithiocarbamate) platinum (II) and bis [bis (2-hydroxyethyl)dithiocarbamate]platinum(II). *Australian Journal of Chemistry* (1992), 45(2), 429-34
- [104] Ott, I.; Schmidt, K.; Kircher, B.; Schumacher, P.; Wiglenda, T.; Gust, R. Antitumor-active cobalt-alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid: studies on the mode of drug action. *J. Med.Chem.* 2005, 48, 622-629
- [105] Rubner, G.; Bendsdorf, K.; Wellner, A.; Kircher, B.; Bergemann, S.; Ott, I.; Gust, R.; Synthesis and biological activities of transition metal complexes based on acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry* (2010), 53(19), 6889-6898
- [106] Ulbrich H.; Dannhardt G. A heterogenous drug class. NSAID: classification and spectrum of action. *Pharmazie in unserer Zeit* (2002), 31(2), 146-54
- [107] Johnson, J. L.; Wimsatt, J.; Buckel, S. D.; Dyer, R. D.; Rao M., K.; Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1995), 324(1), 26-34
- [108] Barnett, J.; Chow, J.; Ives, D.; Chiou, M.; Mackenzie, R.; Osen, E.; Nguyen, B.; Tsing, S.; Bach, C.; et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology* (1994), 1209(1), 130-9
- [109] Kalgutkar, A. S.; Marnett, A. B.; Crews, B. C.; Rimmel, R. P.; Marnett, L. J. Ester and amide derivatives of the nonsteroidal antiinflammatory drug, Indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), 43(15), 2860-2870
- [110] Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Rowlinson, S. W.; Marnett, A. B.; Kozak, K. R.; Rimmel, R. P.; Marnett, L. J.; Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000), 97(2), 925-930
- [111] Sidhu, R. S.; Lee, J. Y.; Yuan, C.; Smith, W. L. Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. *Biochemistry* (2010), 49(33), 7069-7079
- [112] Moreau, A.; Chen, Q.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E.; Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2006), 14(23)
- [113] Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R., III. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (1994), 5(11), 976-89
- [114] Will, J.; Sheldrick, W. S.; Wolters, D.; Characterisation of cisplatin coordination sites in cellular *Escherichia coli* DNA-binding proteins by combined biphasic liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry. *JBIC, Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2008), 13(3), 421-434
- [115] Fränzel B., Dissertation Ruhr Universität Bochum (2010)
- [116] Liu, X.; Rose, D. P.; Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Research* (1996), 56(22), 5125-5127
- [117] Granstroem, E.; Hamberg, M.; Kindahl, H. Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE<sub>2</sub>: the reason for low assay reliability. *Prostaglandins* (1980), 19(6), 933-57
- [118] Hamberg, M.; Samuelsson, B.; Metabolism of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> in man. *Journal of Biological Chemistry* (1971), 246(22), 6713-21
- [119] Fitzpatrick, F. A.; Aguirre, R.; Pike, J. E.; Lincoln, F. H.; The stability of 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. *Prostaglandins* (1980), 19(6), 917-31
- [120] www.deutsche-krebshilfe.de Stand 2010
- [121] www.rki.de Krebsregisterdaten Stand 2005/2006
- [122] Rosenberg B; Vancamp L; Krigas T.; Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* (1965), 205 698-9
- [123] Mukhopadhyay, R.; Theriault, R. L.; Price, J. E.; Increased levels of a 6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis* (1999), 17(4), 325-332



- 
- [124] Cailleau R; Young R; Olive M; Reeves W. J. Jr.; Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* (1974), 53(3), 661-74
- [125] Cailleau R; Olive M.; Cruciger Q. V.; Long - term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* (1978), 14(11), 911-5
- [126] Treeck, O.; Pfeiler, G.; Horn, F.; Federhofer, B.; Houlihan, H.; Vollmer, A.; Ortmann, O.; Novel estrogen receptor beta transcript variants identified in human breast cancer cells affect cell growth and apoptosis of COS-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2007), 264(1-2), 50-60
- [127] Gilhooly, E. M.; Rose, D. P.; The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology* (1999), 15(2), 267-270
- [128] Liu, X.; Rose, D. P.; Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Research* (1996), 56(22), 5125-5127
- [129] Soule H. D.; Vazquez J.; Long A.; Albert S.; Brennan M.; A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* (1973), 51(5), 1409-16
- [130] Girault I.; Andrieu C.; Tozlu S.; Spyrtos F.; Bieche I.; Lidereau R.; Altered expression pattern of alternatively spliced estrogen receptor beta transcripts in breast carcinoma. *Cancer letters* (2004), 215(1), 101-12
- [131] Horwitz, K. B.; Costlow, M. E.; McGuire, W. L.; MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* (1975), 26(6), 785-95
- [132] Jung Y.; Lippard S. J.; Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical reviews* (2007), 107(5), 1387-407
- [133] Gale, G. R.; Morris, C. R.; Atkins, L. M.; Smith, A. B.; Binding of antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active agents. *Cancer Research* (1973), 33(4), 813-18
- [134] Binks S. P.; Dobrota M.; Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochemical pharmacology* (1990), 40(6), 1329-36
- [135] Gately D. P.; Howell S. B.; Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British journal of cancer* (1993), 67(6), 1171-6
- [136] Dornish J. M.; Pettersen E. O.; Requirement of a reactive aldehyde moiety for aldehyde-mediated protection against cis-dichlorodiammineplatinum-induced cell inactivation. *Biochemical pharmacology* (1990), 39(2), 309-18
- [137] Dornish J. M.; Pettersen E. O.; Oftebro R.; Modifying effect of cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives on cell inactivation and cellular uptake of cis-diamminedichloroplatinum(II) in human NHIK 3025 cells. *Cancer research* (1989), 49(14), 3917-21
- [138] Safaei R.; Howell S. B.; Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Critical reviews in oncology/hematology* (2005), 53(1), 13-23
- [139] Safaei R.; Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer letters* (2006), 234(1), 34-9
- [140] Ciarimboli, G.; Ludwig, T.; Lang, D.; Pavenstaedt, H.; Koepsell, H.; Piechota, H.; Haier, J.; Jaehde, U.; Zisowsky, J.; Schlatter, E.; Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *American Journal of Pathology* (2005), 167(6), 1477-1484
- [141] Yonezawa A.; Masuda S.; Nishihara K.; Yano I.; Katsura T.; Inui K.; Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochemical pharmacology* (2005), 70(12), 1823-31
- [142] Zhang, S.; Lovejoy, K. S.; Shima, J. E.; Lagpacan, L. L.; Shu, Y.; Lapuk, A.; Chen, Y.; Komori, T.; Gray, J. W.; Chen, X.; Lippard, S. J.; Giacomini, K. M.; Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Research* (2006), 66(17), 8847-8857
- [143] Sommer S., Dissertation Freie Universität Berlin (2001)
- [144] Koch M., Dissertation Universität Regensburg (1993)
- [145] Timo K., Dissertation Freie Universität Berlin (2005)
- [146] Gust R., Schnurr B., Krauser R., Bernhardt G., Koch M., Schmid B., Hummel E., Schönenberger H., J. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, (1998), 124, 585-597
- [147] Ghezzi A.; Aceto M.; Cassino C.; Gabano E.; Osella D.: Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of inorganic biochemistry* (2004), 98(1), 73-8
- [148] Hagenbuch, B.; Meier, P. J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* (2003), 1609(1), 1-18

- [149] Mikkaichi, T.; Suzuki, T.; Tanemoto, M.; Ito, S.; Abe, T.; The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (2004), 19(3), 171-179
- [150] Nozawa, T.; Suzuki, M.; Yabuuchi, H.; Irokawa, M.; Tsuji, A.; Tamai, I.; Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells. *Pharmaceutical Research* (2005), 22(10), 1634-1641
- [151] Nozawa, T.; Suzuki, M.; Takahashi, K.; Yabuuchi, H.; Maeda, T.; Tsuji, A.; Tamai, I.; Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2004), 311(3), 1032-1037
- [152] Wlcek, K.; Svoboda, M.; Thalhammer, T.; Sellner, F.; Krupitza, G.; Jaeger, W.; Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* (2008), 7(9), 1450-1455
- [153] Hagenbuch B; Meier P. J.; Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Seminars in liver disease* (1996), 16(2), 129-36
- [154] Ianculescu, A. G.; Friesema, E. C. H.; Visser, T. J.; Giacomini, K. M.; Scanlan, T. S.; Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Molecular BioSystems* (2010), 6(8), 1403-1410
- [155] Muramatsu, M.; Onishi, T.; Rapid isolation of nucleoli from detergent-purified nuclei of tumor and tissue culture cells. *Methods in Cell Biology* (1977), 15 221-34
- [156] Gurley L. R.; Enger M. D.; Walters R. A.; The nature of histone f1 isolated from polysomes. *Biochemistry* (1973), 12(2), 237-45
- [157] Jamieson, E. R.; Lippard, S. J.; Structure, recognition, and processing of cisplatin DNA adducts. *Chemical Reviews* (Washington, D. C.) (1999), 99(9), 2467-2498
- [158] Just G.; Holler E.; Platinum incorporation and differential effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on the growth of mouse leukemia P388/D1. *Cancer research* (1989), 49(24 Pt 1), 7072-7
- [159] Holler, E., Mechanism of action of tumor-inhibiting metal complexes in metal complexes in cancer chemotherapy, 1993, Hrsg. Keppler, B. K., VCH-Verlagsgesellschaft
- [160] Eastman, A.; Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* (1986), 25(13), 3912-15
- [161] Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van der Veer, J. L.; Den Hartog, J. H. J.; Lohman, P. H. M.; Reedijk, J.; Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* (1985), 24(3), 707-13
- [162] Ott I.; Gust R.; Special qualities of inorganic cytostatics. *Medicinal chemistry of platinum complexes. Pharmazie in unserer Zeit* (2006), 35(2), 124-33
- [163] Masters, J. R. W.; Koeberle, B.; Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumors. *Nature Reviews Cancer* (2003), 3(7), 517-525
- [164] Natarajan, G.; Malathi, R.; Holler, E.; Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. *Biochemical Pharmacology* (1999), 58(10), 1625-1629
- [165] Ott, I.; Dissertation Freie Universität Berlin (2004)
- [166] Dickerson, R. E.; Drew, H. R.; Conner, B. N.; Wing, R. M.; Fratini, A. V.; Kopka, M. L.; The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* (Washington, DC, United States) (1982), 216(4545), 475-85
- [167] Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M.; Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research* (2009), 37(6), 1713-1725
- [168] Kendrew A. (ed.), *The Encyclopaedia of Molecular Biology*, Plate 1. Copyright 1994 Blackwell Science
- [169] *Genomes 3*, Terence A. Brown. - 3. ed. - New York, NY [u.a.] : Garland Science, 2007
- [170] *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules* Edited by Gerald D. Fasman. Plenum Press, New York and London. 1996
- [171] Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody R. W.; *Circular Dichroism: Principles and Application* – 2nd edition. New York; Wiley-VCH, 2000
- [172] Dr. Johannes Winkler, Universität Wien  
<http://homepage.univie.ac.at/johannes.Winkler/index.html>
- [173] Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* (London, United Kingdom) (1953), 71, 737-8
- [174] Marmur J.; Doty, P.; Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of molecular biology* (1962), 5 109-18

- 
- [175] Scharwitz, M. A.; Ott, I.; Geldmacher, Y.; Gust, R.; Sheldrick, W. S.; Cytotoxic half-sandwich rhodium (III) complexes: Polypyridyl ligand influence on their DNA binding properties and cellular uptake. *Journal of Organometallic Chemistry* (2008), 693(13), 2299-2309
- [176] Zaludova R.; Kleinwachter V.; Brabec V.; The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum(II) complexes. *Biophysical chemistry* (1996), 60(3), 135-42
- [177] Zaludova R.; Zakovska A.; Kasparkova J.; Balcarova Z.; Kleinwachter V.; Vrana O.; Farrell N.; Brabec V.; DNA interactions of bifunctional dinuclear platinum(II) antitumor agents. *European journal of biochemistry / FEBS* (1997), 246(2), 508-17
- [178] Kelly, J. M.; Murphy, M. J.; McConnell, D. J.; OhUigin, C.; A comparative study of the interaction of 5,10,15,20-tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin and its zinc complex with DNA using fluorescence spectroscopy and topoisomerization. *Nucleic Acids Research* (1985), 13(1), 167-84
- [179] Tjahjono, D. H.; Mima, S.; Akutsu, T.; Yoshioka, N.; Inoue, H. Interaction of metallopyrazoliumylporphyrins with calf thymus DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2001), 85(2-3), 219-228
- [180] Fichtinger-Schepman, A. M.; van Dijk-Knijnenburg, H. C. M.; Dijt, F. J.; van der Velde-Visser, S. D.; Berends, F.; Baan, R. A.; Effects of thiourea and ammonium bicarbonate on the formation and stability of bifunctional cisplatin-DNA adducts: consequences for the accurate quantification of adducts in (cellular) DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* (1995), 58(3), 177-91
- [181] Fichtinger-Schepman A. M.; van Oosterom A. T.; Lohman P. H.; Berends F.; cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer research* (1987), 47(11), 3000-4
- [183] Glasel, J. A.; Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* (1995), 18(1), 62-3
- [184] Manchester, K. L.; Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* (1995), 19(2), 208, 10
- [185] Laws G. M.; Adams S. P.; Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: the importance of DNA purity. *BioTechniques* (1996), 20(1), 36-8v
- [186] Jung, Y.; Lippard, S. J.; Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States) (2007), 107(5), 1387-1407
- [187] Ivanov, A. I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J. A.; Barnham, K. J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P. J.; Cisplatin binding sites on human albumin. *Journal of Biological Chemistry* (1998), 273(24), 14721-14730
- [188] Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N.; Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology* (1998), 5(9), 827-835