

**Neue und selektive GSTP1-Inhibitoren mit 1,2,4-Trioxanstruktur als
Grundlage für die Entwicklung einer effektiven Tumorthherapie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Maria Lisa Denise Bräutigam

aus Dormagen

Köln

2016

Berichtersteller :

Prof. Dr. Axel G. Griesbeck
Prof. Dr. Nicole Teusch
Prof. Dr. Svetlana Tsogoeva

Tag der mündlichen Prüfung:

20.01.2016

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Axel G. Griesbeck, Frau Prof. Nicole Teusch und Herrn Markus Pietsch, die mir dieses besondere Projekt anvertraut und mich in ihren Arbeitsgruppen aufgenommen haben. Nur durch die enge Kooperation und die gute Betreuung war es mir möglich, die vorliegende Dissertation erfolgreich abzuschließen und mich in den vergangenen Jahren fachlich wie persönlich weiterzuentwickeln.

Des Weiteren möchte ich mich bei Tobias Schenk bedanken, der seine Masterarbeit im Rahmen dieses Projekts angefertigt hat, und bei meinen Praktikanten Patricia Rochels, Andreas Maaßen und Cristoph Schwarz, die durch ihre fleißige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dank schulde ich auch Dr. Viktor Schlundt und Miriam Sheikh, von denen ich mein Projekt übernommen habe und die ausgezeichnete Vorarbeit geleistet haben.

Dr. Wiebke Seemann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Herzig danke ich für die freundliche Einarbeitung in die qPCR.

Ganz besonderer Dank gilt aber allen drei Arbeitsgruppen, deren Mitglied ich in den vergangenen Jahren war, sowie den Arbeitskreisen Goldfuß und Schörken, die mich wohlwollend aufgenommen haben, sich immer hilfsbereit gezeigt haben, mich unterstützt haben, eine äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben und die vergangenen Jahre zu einer sehr schönen Zeit gemacht haben, an die ich mich in Zukunft immer gerne zurückerinnern werde.

Speziell herausstellen möchte ich dabei: Moritz Vollmer, meinen ersten Laborkollegen, der mir vor allem in der Anfangszeit eine große Hilfe war, meine Laborkollegin Angelika Eske und Margarethe Kleczka, die mir in den vergangenen drei Jahren zu sehr guten Freundinnen geworden sind, die ich nicht mehr missen möchte, Miriam Sheikh und Michaela Steinkrüger, mit denen ich auch außerhalb der Arbeit großartige Dinge erlebt habe und das hoffentlich auch in Zukunft werde, und Sonja Stahn und Katharina Toepler, die sich als äußerst hilfsbereite Kolleginnen ausgezeichnet haben, die den Laboralltag sehr angenehm gestaltet haben.

Zusätzlich möchte ich mich bei meiner guten Freundin Lisa Zehner für die Korrekturarbeiten bedanken.

Und zuletzt danke ich herzlichst meinen Eltern Vera und Martin und meiner Schwester Julia, die mich jederzeit bedingungslos unterstützt haben.

Erläuterungen

Diese Doktorarbeit wurde im Zeitraum von Juni 2012 bis Januar 2016 am Department für Chemie, dem Institut für Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln und der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der Technischen Hochschule Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. Axel G. Griesbeck angefertigt.

Abkürzungen

4-NBA	4-Nitrobenzaldehyd
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
AP-1	Activator protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BF ₃ ·Et ₂ O	Bortrifluorid-Diethyletherat
BSA	Rinderserumalbumin
CDNB	2,4-Dinitrochlorbenzol
CHCl ₃	Chloroform
Co(thd) ₂	Bis(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptandionat)cobalt(II)
C _q	Threshold-Cycle
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Et ₂ O	Diethylether
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of interest
GSH	Glutathion
G-Site	Glutathion-Bindungstasche der GST
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hpGST	Humane plazentale GST
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
H-Site	Bindungstasche der GST für das Elektrophil
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die 50% Hemmung bewirkt
IR	Infrarotspektroskopie
ISC	Intersystem Crossing
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_s	Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes
MAPEG	Membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDR	Multi-Drug-Resistance
MRP1	Multidrug Resistance-Related Protein1
MW	Mittelwert

n	Hill-Koeffizient
NBDHEX	6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol -4-ylthio)hexanol
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOX4	NADPH-abhängige Oxidase 4
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
P-gp	P-Glykoprotein
ppm	parts per million
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
rhGST	rekombinante humane GST
ROS	Reactive Oxygen Species
[S]	Substratkonzentration
SD	Standardfehler
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Smp	Schmelzpunkt
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGM2	Transglutaminase 2
TNBC	Triple-negative breast cancer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPP	<i>meso</i> -Tetraphenylporphyrin
TRAF-2	TNF receptor-associated factor 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V_E	enzymatische Geschwindigkeit
V_G	Gesamtgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
V_{NE}	nichtenzymatische Geschwindigkeit

Kurzzusammenfassung

Es wurden selektive Inhibitoren der GSTP1 mit 1,2,4-Trioxanstruktur als potentielle Wirkstoffe gegen multiresistente Tumore synthetisiert. Die Darstellung dieser Substanzen erfolgte über Typ-II-Photooxygenierung allylischer Alkohole mit anschließender Säure-katalysierter Peroxyacetalisierung unter Verwendung von 4-Nitrobenzaldehyd. Über diesen Syntheseweg konnten unterschiedlich substituierte 1,2,4-Trioxane dargestellt werden. Die höchste biologische Aktivität zeigten Verbindungen mit aromatischen Estersubstituenten am 1,2,4-Trioxanring.

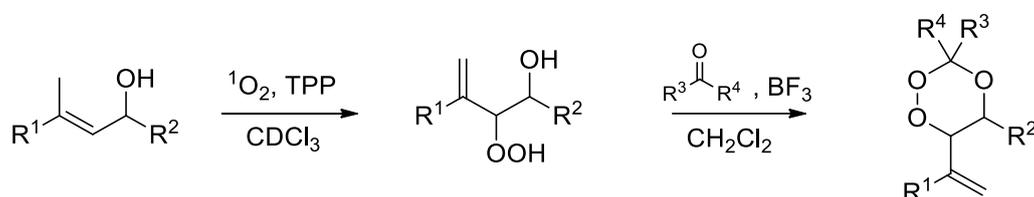


Abbildung 1 Synthese von 1,2,4-Trioxanen.

Es wurde eine Leitstruktur entwickelt, die einen α,β -ungesättigten aromatischen Estersubstituenten in Position 6 des 1,2,4-Trioxangerüsts und in Position 3 einen 4-Nitrophenylsubstituenten aufweist. Die Verbindungen dieser Substanzklasse zeigen Inhibition der GSTP1 im niedrig mikromolaren Bereich. Durch Aktivitätsstudien an den GST-Klassen A und M konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen selektiv GSTP1 inhibieren.

Nachdem mittels quantitativer PCR 12 Krebszelllinien, die hohe GSTP1-Expressionsniveaus zeigen, identifiziert worden waren, wurde die Aktivität der 1,2,4-Trioxane gegenüber GST, die in Krebszelllysaten vorkommt, nachgewiesen. Die GST in der Brustkrebsepithelzelllinie HBL100 und der Lungenkarzinomzelllinie SK-MES-1 wird durch 1,2,4-Trioxane noch effektiver inhibiert als aufgereinigte GSTP1 (IC₅₀ im nanomolaren Bereich).

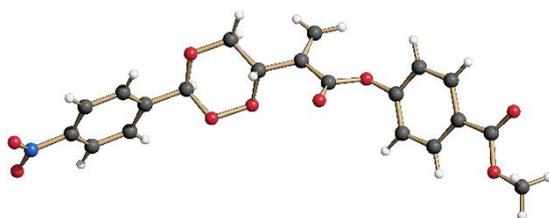


Abbildung 2 Kristallstruktur des hochaktiven GSTP1-Inhibitors Methyl-4-((2-[3-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]acryloyl)oxy)-benzoat.

Abstract

Selective GSTP1 inhibitors bearing a 1,2,4-trioxane were synthesized as potential drug candidates in circumventing chemoresistance. The compounds were synthesized by type II photooxygenation route of allylic alcohols followed by acid-catalyzed peroxyacetalization with 4-nitrobenzaldehyde. Using this route, a series of diverse 1,2,4-trioxanes was be generated. The highest biological activity was achieved by introducing an aromatic ester moiety into the compounds.

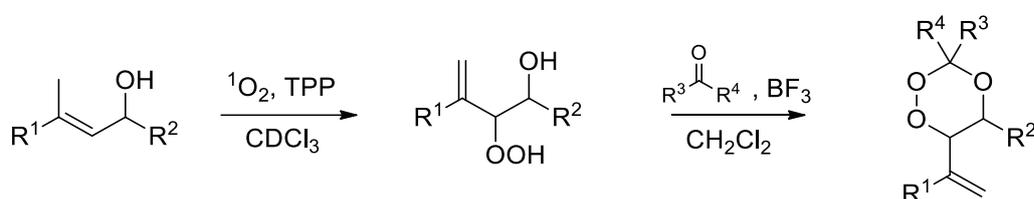


Figure 1 Synthesis of 1,2,4-trioxanes.

A lead structure bearing an α,β -unsaturated aromatic ester substituent in position 6 of the 1,2,4-trioxane and a 4-nitrophenyl substituent in position 3 was developed. The compounds showed activity against GSTP1 in the low micromolar range. In addition, activity studies against the GST classes A and M revealed a high selectivity towards GSTP1 for the tested compounds.

After identification of 12 highly GSTP1-expressing cancer cell lines by qPCR, activity of the 1,2,4-trioxanes against GST in cancer cell lysates was determined. The GST from the breast cancer epithelial cell line HBL100 and the lung carcinoma cell line SK-MES-1 was inhibited by 1,2,4-trioxanes in the high nanomolar range making these compounds more active in cell lysates than against the isolated enzyme.

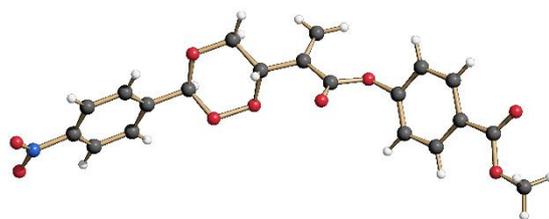


Figure 2 Structure of the highly active GSTP1 inhibitor Methyl 4-((2-[3-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-trioxane-6-yl]acryloyl)oxy)-benzoate in the crystal.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Resistenzen in der Chemotherapie	1
1.1.1	MDR-Modulatoren	2
1.2	Glutathion-Transferasen	2
1.3	GSTP1-Expression in Tumorzellen	3
1.3.1	GSTP1 und MDR	4
1.3.2	JNK-Signalweg	5
1.3.3	GSTP1-TRAF2 Interaktion und andere Signalwege	6
1.4	GSTP1 als Zielstruktur für die Wirkstoffentwicklung	8
1.4.1	Bekannte Inhibitoren	8
1.4.2	GSTP1-aktivierte Prodrugs	11
1.4.3	Klinische Relevanz	11
1.5	Von Artemisinin zu niedermolekularen 1,2,4-Trioxanen	12
1.5.1	Artemisinin	12
1.5.2	Artemisinin und Krebs	14
1.5.3	Niedermolekulare Endoperoxide mit antiproliferativer Wirkung	15
1.5.4	Synthese von 1,2,4-Trioxanen	16
2	Aufgabenstellung	21
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Synthesen	22
3.1.1	Synthese der 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivate 4 - 8	22
3.1.2	Synthese der 1,2,4-Trioxanderivate mit Methylacrylatsubstitution 16b/17b	24
3.1.3	Synthese der vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxane 22 - 24	26
3.1.4	Synthese des 1,3-Dioxans 32	28
3.1.5	Synthese von den 1,2,4-Trioxanen mit Phenyl- und Benzylestersubstituenten 33c – 42c und 46c	30
3.2	Glutathion-Transferase-Inhibitionsassay	39
3.2.1	Validierung des Assays	39
3.2.2	Initiales 1,2,4-Trioxan-Screening	42
3.2.3	Testung von Naturstoffen mit 1,2,4-Trioxanmotiv	44
3.2.4	Testung von 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivaten	45
3.2.5	Testung von vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxanderivaten	46
3.2.6	Optimierung des Substituenten an Position 3 des Trioxanrings	47
3.2.7	Aktivität des 1,2,4-Trioxangrundgerüsts	49
3.2.8	Testung von 1,2,4-Trioxanderivaten mit aromatischer Esterfunktion	50

3.2.9	Charakterisierung von 1,2,4-Trioxanderivaten mit aromatischer Esterfunktion	52
3.2.10	Selektivität der 1,2,4-Trioxane	64
3.2.11	DMSO-Stabilität der 1,2,4-Trioxane	67
3.2.12	Miniaturisierung des GST-Inhibitionsassays	69
3.2.13	Bewertung der biochemischen Daten	72
3.3	GST-Expression in Krebszelllinien	75
3.3.1	Effizienz der qPCR	75
3.3.2	Validierung des Assays	77
3.3.3	Stabilität der Referenzgene	81
3.3.4	Zelllinien-Screening	83
3.3.5	Analyse der Proteinexpression	87
3.4	Testungen im Zelllysate	89
3.4.1	Validierung des Assays	89
3.4.2	IC ₅₀ -Bestimmungen in Zelllysaten	91
3.5	Zelluläre Studien	94
3.5.1	Zelluläre GSH-Konzentrationen	94
3.5.2	Zytotoxizität der 1,2,4-Trioxane	96
3.5.3	Zellulärer GST-Assay	99
4	Zusammenfassung	100
5	Ausblick	104
6	Experimenteller Teil	105
6.1	Biologischer Teil	105
6.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	105
6.1.2	Glutathion-Transferase-Inhibitionsassay	105
6.1.3	Zelllyse	112
6.1.4	Western Blot	113
6.1.5	Kultivierung von Krebszelllinien	116
6.1.6	qPCR	118
6.1.7	Zellviabilitäts-Assay	121
6.1.8	GSH/GSSG-Bestimmung in Zelllinien	123
6.2	Synthetischer Teil	124
6.2.1	Allgemeine Methoden	124
6.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	126
6.2.3	Synthesen	127
7	Literaturverzeichnis	189
8	Anhang	203
8.1	Kristalldaten	203

1 Einleitung

1.1 Resistenzen in der Chemotherapie

In den letzten Jahren hat sich die medikamentöse Krebstherapie vom Einsatz unselektiver, stark toxischer Zytostatika hin zur individualisierten Therapie deutlich weiterentwickelt und die therapeutische Kontrolle einer Reihe von neoplastischen Erkrankungen ermöglicht. Ein zunehmend häufiger auftretendes Problem ist jedoch die Resistenzentwicklung in Tumoren, d.h. Tumorzellen und Tumorepithelzellen zeigen eine verminderte Sensitivität gegenüber der Chemotherapie.^[1]

Die Faktoren, die zu Resistenzbildung führen, können dabei intrinsischer Natur sein oder während einer Chemotherapie entstehen. Zur intrinsischen Resistenz zählen Faktoren, die schon vor Beginn der Chemotherapie bestanden haben, z.B. die verminderte Absorption und die schlechte Verträglichkeit eines Arzneistoffs. Für die während der Chemotherapie erworbene Resistenz sind genetische oder epigenetische Veränderungen im Tumor selbst oder der Tumorumgebung verantwortlich.^[1-2] Dazu gehören Veränderungen in der Zielstruktur des eingesetzten Arzneistoffs, die Unterdrückung von Apoptose, Reparaturmechanismen geschädigter DNA, Inaktivierung von Arzneistoffen, epithelial-mesenchymale Transition (EMT) oder das Ausschleusen von Arzneistoffen durch Effluxpumpen (Abbildung 3).^[3] Diese Faktoren können vor allem dazu führen, dass personalisierte Therapie ihre Effektivität verliert. So sind Resistenzen gegen in der Chemotherapie eingesetzte monoklonale Antikörper wie Cetuximab bekannt.^[4]

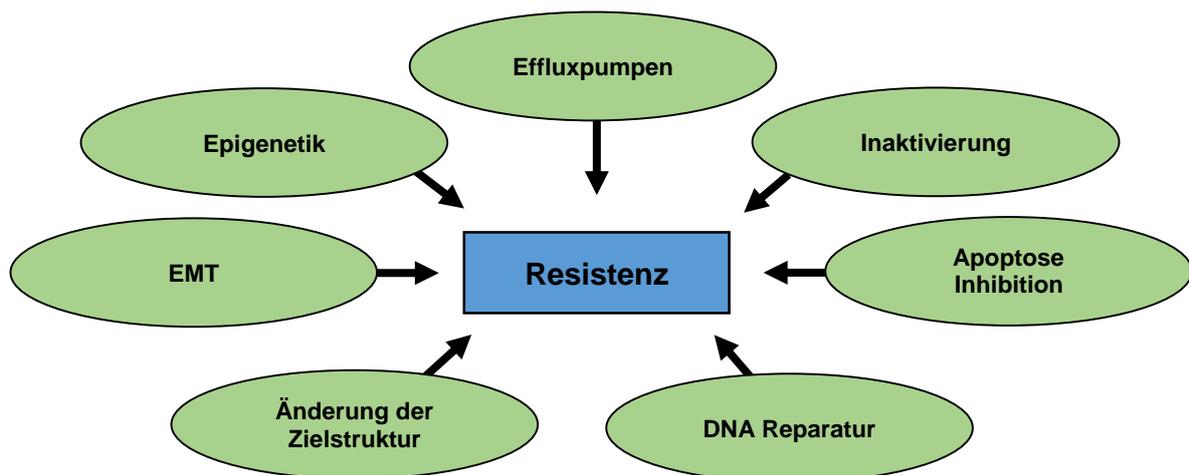


Abbildung 3 Zelluläre Mechanismen, die zu Resistenzen in Tumorzellen führen können.^[3]

Ein Teil der Resistenzmechanismen sind nicht spezifisch für Tumorzellen; sie treten unter anderem auch in Bakterien auf. Dazu gehören z.B. die verstärkte Expression von Effluxpumpen

und Mutationen der Zielstruktur des Wirkstoffs.^[5] Andere wie EMT sind wiederum spezifisch für Tumorzellen.

Die Überexpression von Effluxpumpen, vor allem der ABC-Transporter wie z.B. P-Glykoprotein (P-gp) und Multi-Drug-Resistance-Related Protein 1 (MRP1), die Substanzen aktiv aus der Zelle befördern, ist wohl die häufigste Resistenzursache. Die klinische Relevanz dieses Resistenzmechanismus konnte dabei in mehreren Studien belegt werden.^[1] Mit der Überexpression geht häufig die gesteigerte Aktivität von metabolisierenden Enzymen, welche die Wirkstoffe inaktivieren, einher. Dies betrifft sowohl die Enzyme des Phase-I-Metabolismus, wie z.B. die Familie der Cytochrom-P450-abhängige Enzyme, aber auch Phase II Enzyme, die Konjugationen katalysieren, wie UDP-Glucuronosyltransferase oder Glutathion-Transferase P1.^[3]

1.1.1 MDR-Modulatoren

Die Therapie von Krebserkrankungen mit mehreren Chemotherapeutika zur gleichen Zeit ist das grundlegende Verfahren, um Resistenzen zu überwinden. Zeigen Tumore jedoch eine verminderte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, wird von Multi-Drug-Resistance (MDR) gesprochen.^[6]

Um die MDR in der Chemotherapie zu umgehen, werden sogenannte MDR-Modulatoren entwickelt. Diese greifen die zelluläre Struktur an, die für die Resistenzbildung verantwortlich ist. In Kombination mit einem klassischen Zytostatikum können sie dazu führen, dass die durch Veränderungen in der Tumorzelle entstandenen Resistenzen aufgehoben werden und Tumorzellen wieder für die Chemotherapie sensitiv werden.^[7]

Das am besten untersuchte Beispiel für MDR-Modulatoren ist die Gruppe der Inhibitoren des P-gp, die den verstärkten Efflux von Wirkstoffen aus der Tumorzelle blockieren soll. Schon Mitte der 1980er Jahre wurde die Fähigkeit des Calciumkanalblockers Verapamil, P-gp zu inhibieren, entdeckt.^[8] Seitdem wurde eine Vielzahl an Inhibitoren entwickelt, von denen die „dritte Generation“ in klinischen Studien der Phasen I – III evaluiert wurde oder derzeit noch wird.^[9] Dieses Positivbeispiel zeigt, dass MDR-Modulatoren für die Zukunft ein potentes Mittel darstellen, um Resistenzen in der Chemotherapie zu überwinden.

1.2 Glutathion-Transferasen

Glutathion-Transferasen (auch als Glutathion-S-Transferasen bzw. abgekürzt als GSTs bezeichnet) bilden eine beim Menschen ubiquitär vorkommende Enzymsuperfamilie, die eine wichtige Funktion im Phase-II-Metabolismus einnimmt.^[10] Dabei katalysieren GSTs die Konjugation des Pseudotripeptids Glutathion (GSH) mit einer Vielzahl von Elektrophilen (Abbildung 4). Diese können sowohl exogener als auch endogener Herkunft sein. Der durch die Konjugation bedingte Anstieg der Hydrophilie ermöglicht das effiziente Ausschleußen der Konjugate

aus der Zelle und die anschließende renale oder biliäre Ausscheidung aus dem Organismus.^[11] Darüber hinaus tragen GSTs durch ihre Peroxidase-Aktivität zum Abbau von endogenen Radikalen, wie ROS (reaktive Sauerstoffspezies), bei und übernehmen eine zentrale Funktion für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts von Zellen.^[12]

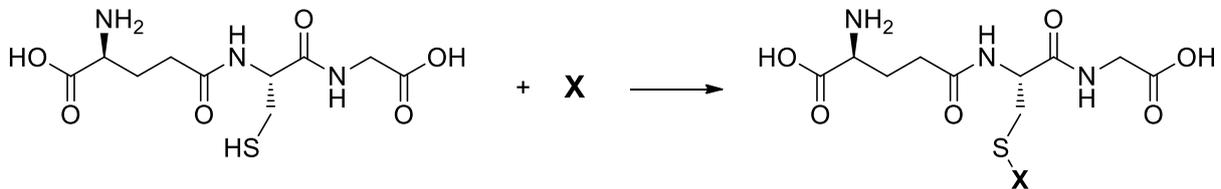


Abbildung 4 Bindung des Pseudotripeptids GSH an elektrophile Verbindungen (X).

Die GSTs können in drei Familien unterteilt werden: mikrosomale, mitochondriale und zytosolische GSTs. Die mikrosomalen GSTs, auch MAPEG (Membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) genannt, sind nur wenig für den Metabolismus von Xenobiotika verantwortlich. Sie unterscheiden sich strukturell stark von den anderen GSTs, sind vor allem in den Eicosanoid-Stoffwechsel involviert und liegen gebunden an das endoplasmatische Retikulum oder die Kernmembran vor.^[13]

Mitochondriale und zytosolische GSTs, die auch als lösliche GSTs zusammengefasst werden, spielen demgegenüber eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel exogener Substanzen.

Die mitochondriale GST, auch GST Kappa, wird fälschlicherweise oft zu den zytosolischen GSTs gezählt. Sie kommt allerdings nicht im Zytosol, sondern nur in Mitochondrien und Peroxisomen vor.^[13a]

Die zytosolischen GSTs können in sieben Klassen unterteilt werden, die mit griechischen Buchstaben benannt werden: Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta und Zeta (abgekürzt: A, M, O, P, S, T und Z).^[11] Innerhalb einer GST-Klasse liegt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz typischerweise bei über 40%, während sie zwischen den einzelnen Klassen weniger als 25% betragen kann.^[14] Eine katalytisch aktive Einheit besteht dabei aus Hetero- oder Homodimeren; Heterodimere können nur innerhalb einer GST-Klasse gebildet werden.^[13a, 15] Beide Monomere haben dabei eine hochkonservierte Glutathion (GSH)-Bindungstasche (G-Site) und eine Bindungstasche für das Elektrophil (H-Site), die sich je nach GST-Klasse sehr stark unterscheidet und die Spezifität der jeweiligen GST vorgibt. Die G-Site ist dabei nur nach Dimerisierung vollständig.^[16]

1.3 GSTP1-Expression in Tumorzellen

GSTP1 ist ein Vertreter der zytosolischen GSTs, der nahezu in allen Gewebetypen vorkommt, besonders häufig aber in stark proliferierenden Zellen.^[17] In gesunden Geweben finden sich

besonders hohe GSTP1-Konzentrationen in Epithelzellen der ableitenden Harnwege, der Lunge und des Magen-Darm-Traktes, in denen das Enzym eine Schutzfunktion gegen exogene Giftstoffe und Karzinogene ausübt.^[18] Sowohl in gesunden als auch in Tumorzellen kommt GSTP1 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern vor.^[19]

Es sind vier funktionelle Isoenzyme der GSTP1 bekannt, die aus Punktmutationen des Isoleucin 105 zu Valin und des Alanin 114 zu Valin resultieren und die mit *A-*D bezeichnet werden. Für die Isoenzyme sind unterschiedlich hohe Aktivitäten und verschiedene Substratspezifitäten berichtet worden, was sich auf die zytoprotektiven Eigenschaften der GSTP1 auswirkt.^[20] So ist z.B. bekannt, dass GSTP1*C das Risiko für Brustkrebs mindert, GSTP1*B und *C die dominanten Isoenzyme im malignen Gliom sind.^[17, 21]

Alle vier Isoenzyme bestehen aus Dimeren mit zwei identischen Untereinheiten, die je aus zwei Domänen zusammengesetzt sind. Die N-terminale Domäne, die für die Bindung von GSH verantwortlich ist, weist eine Thioedoxin-ähnliche Faltung ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$) auf, während die C-terminale Domäne ausschließlich aus α -Helices aufgebaut ist.^[22] Im katalytischen Zentrum der GSTP1 befindet sich ein Tyrosin-Rest (Tyr-7), der durch Stabilisierung des gebildeten Thiolanions eine entscheidende Rolle für die Aktivierung des GSHs spielt. Ein zweiter Tyrosin-Rest (Tyr-108) befindet sich in der H-Site des Enzyms; dieser ist hochkonserviert und begünstigt Michael-Additionen von GSH an Elektrophile.^[23]

1.3.1 GSTP1 und MDR

Überexpression von GSTP1 in Tumorzellen ist ein relevanter Faktor, der zur MDR beiträgt. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass in Tumorgeweben und Krebszelllinien erhöhte GSTP1-Spiegel vorkommen. So zeigten *Tew et al.* in einem umfangreichen Screening, dass in 58 von 60 getesteten Krebszelllinien GSTP1 die vorherrschende GST-Klasse ist.^[24] Darüber hinaus gibt es Studien, die GSTP1-Überexpression in Brustkrebs, Darmkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Leukämie und anderen Krebsarten nachweisen.^[25] Mit der Überexpression von GSTP1 geht häufig eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einher. *In-vitro* konnte nachgewiesen werden, dass oftmals eingesetzte Arzneistoffe, wie Cisplatin, Doxorubicin, Chlorambucil und Paclitaxel, Substrate der GSTP1 sind.^[17] Die Relevanz von GSTP1-Überexpression konnte ebenfalls klinisch nachgewiesen werden; so korreliert GSTP1-Überexpression mit Paclitaxel-Resistenzen in Brustkrebs.^[26] Aktuelle Publikationen zeigen, dass auch Temozolomid-Resistenzen bei Gliom-Patienten möglicherweise GSTP1 vermittelt sind.^[27] Durch erhöhte GSTP1-Niveaus in den Zellen werden diese Chemotherapeutika schneller metabolisiert und wieder aus den Tumorzellen ausgeschleust. Somit verringert sich die Halbwertszeit und Effektivität der eingesetzten Substanzen: es entstehen Resistenzen.

Die Überexpression von GSTP1 korreliert teilweise mit der Hochregulation von anderen Proteinen, die im Zusammenhang mit MDR stehen, wie P-gp und MRP1. Diese Proteine gehören zu den ABC-Transportern und können GSH-Konjugate effektiv aus Zellen heraus transportieren. So konnten *Geng et al.* 2013 zeigen, dass Überexpression von P-gp und GSTP1 in Magentumoren *ex-vivo* zu einer Abnahme der Chemosensitivität führte.^[28] Zusätzlich wiesen *O'Brian et al.* nach, dass die Kotransfektion von MRP1 und GSTP1 zur Resistenzbildung in Krebszellen führt.^[29]

GSTP1 ist die Zielstruktur verschiedener Serin/Threonin Proteinkinasen; dazu gehören EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und Protein Kinase C. Durch GSH-abhängige Phosphorylierung erhöht sich die katalytische Aktivität der GSTP1 signifikant, was zu einem noch schnelleren Metabolismus von Zytostatika und einer Verstärkung der MDR führen kann. Die Phosphorylierung von Ser-42 und Ser-148 der GSTP1 ist dabei entscheidend für die Zunahme der Aktivität.^[30]

Andere Klassen der zytosolischen GST werden auch im Kontext mit MDR genannt, dazu gehören vor allem GSTA1 und GSTM. Diese kommen jedoch in weitaus weniger Gewebetypen und in geringeren Konzentrationen in Krebszellen vor.^[24]

1.3.2 JNK-Signalweg

Neben dem Verursachen von Resistenzen in Tumorzellen durch erhöhten Metabolismus interagiert GSTP1 auch mit verschiedenen zellulären Signalwegen. Die bekannteste Interaktion ist dabei wohl die von *Adler et al.* entdeckte Bindung an die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK).^[31] JNK ist Teil des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Es gibt wiederum mehrere Substrate, die durch JNK phosphoryliert werden; das bekannteste ist das Protoonkogen c-Jun.^[32] Es ist Teil der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 und reguliert Zellproliferation und -apoptose. Aber auch ATF2, p53 und ELK-1 werden durch JNK reguliert.^[33]

Zwar ist die Rolle von JNK in Krebszellen noch nicht vollständig aufgeklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Aktivierung dieser Kinase die Expression von antiapoptotischen Faktoren unterdrückt und die Apoptose begünstigt wird.^[34] Die Aktivierung von JNK wird durch eine Vielzahl an Faktoren ausgelöst; dazu gehören unter anderem ROS, proinflammatorische Zytokine und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).^[34]

Monomere GSTP1, die nicht katalytisch aktiv ist, bildet einen Komplex mit JNK und kann diese dadurch inaktivieren. Daher sind hohe zelluläre GSTP1-Niveaus in der Lage, die Apoptose in Krebszellen zu unterdrücken. Die Interaktion von GSTP1 mit JNK und die damit verbundenen zellulären Prozesse sind in Abbildung 5 dargestellt. GSTP1 dissoziiert von JNK infolge hoher

ROS-Niveaus, die z.B. durch Medikamenten-Applikation verursacht werden, und bildet katalytisch aktive Dimere. Auch die Applikation von GSTP1-Inhibitoren, abhängig von der Bindungsstelle des Inhibitors, kann den Zerfall des JNK-GSTP1-Komplexes induzieren.^[31a] Durch das Wegfallen der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen JNK und GSTP1 wird JNK aktiviert und kann zur Apoptose in Krebszellen führen.

Mit dieser Interaktion zwischen JNK und GSTP1 kann die Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika, die nicht Substrat der GSTP1 sind, erklärt werden. GSTP1-Überexpression kann nicht nur zur direkten Resistenz durch erhöhten Metabolismus führen, sondern auch zur Hemmung von Apoptose.^[11]

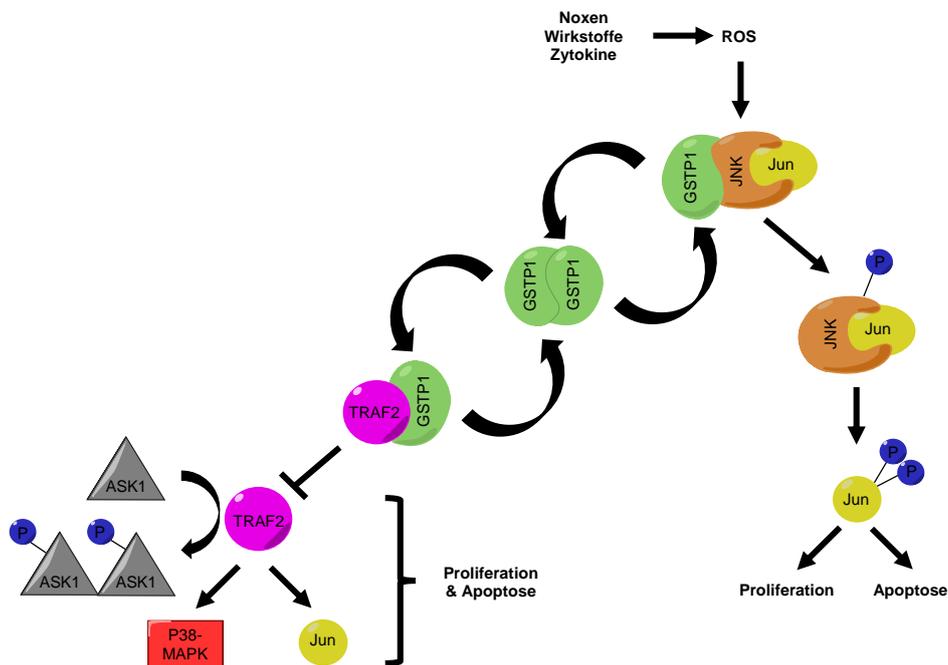


Abbildung 5 Interaktion von monomerer GSTP1 mit JNK und TRAF2 und damit verbundene Signalkaskaden.^[12]

Die Komplexbildung mit JNK ist auch für GSTA und GSTM beschrieben worden, allerdings ist die Protein-Protein-Wechselwirkung für diese GST-Klassen deutlich geringer.^[31a]

1.3.3 GSTP1-TRAF2 Interaktion und andere Signalwege

Im Jahr 2006 berichteten *Wu et al.* erstmals über die direkte Interaktion zwischen GSTP1 und dem TNF receptor-associated factor 2 (TRAF-2).^[35] TRAF-2 gehört zu der Familie der TNF Rezeptor-assoziierten Faktoren, welche die zelluläre Antwort der membranständigen TNF-Rezeptoren vermitteln. Über diesen Signalweg kann TNF- α eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF- κ B, regulieren.

TRAF-2 interagiert direkt mit der apoptosis signal-regulating Kinase 1 (ASK-1), die für die Aktivierung von verschiedenen Zielstrukturen, u.a. JNK und p38, verantwortlich ist.^[17]

Bindet nun monomere GSTP1 an TRAF-2, wird die Aktivierung von ASK-1 durch diesen Komplex unterdrückt und damit auch die durch ASK-1 vermittelten apoptotischen Prozesse (vgl. Abbildung 5). So kann GSTP1 die Aktivierung von JNK nicht nur direkt verhindern (Kapitel 1.3.2), sondern auch indirekt über die Wechselwirkung mit TRAF-2. Mithilfe von GSTP1-Überexpression und GSTP1-Knockdown in der Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa konnte gezeigt werden, dass GSTP1 die TNF- α vermittelte Aktivierung von ASK-1 durch Bindung an TRAF-2 negativ beeinflusst und dadurch die Apoptose unterdrückt wird.^[35]

Die Protein-Protein-Interaktion zwischen TRAF-2 und GSTP1 kann genau wie die GSTP1-JNK-Wechselwirkung durch einen GSTP1-Inhibitor verhindert werden.^[36]

Inwieweit die Interaktion zwischen TRAF-2 und ASK-1 jedoch ein relevanter Faktor in durch GSTP1-Überexpression resistenten Tumorzellen ist, ist noch unklar, da die Studienlage noch nicht ausreichend ist.

Weiterhin gibt es eine Vielzahl an aktuellen Publikationen, die die Interaktion zwischen GSTP1 und einer Reihe zellulärer Zielstrukturen nachweisen.

Zhou et al. zeigten 2013, dass GSTP1 für die Aktivierung von Peroxiredoxin 6, einer Peroxidase die ein wichtiges antioxidatives Schutzsystem der Zelle darstellt, verantwortlich ist.^[37]

In humanen Gliom-Zellen kommt es durch Komplexbildung zwischen GSTP1 und Transglutaminase 2 (TGM2) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin, einem häufig eingesetzten Zytostatikum.^[38]

Möglicherweise deaktiviert GSTP1 durch direkte Interaktion STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), ein Protein, das für proliferative Zellprozesse verantwortlich ist und eine Rolle in der Onkogenese spielt.^[39]

Ob diese Interaktionen in Tumorzellen, die eine verstärkte GSTP1-Expression zeigen, relevant sind und zur Resistenzbildung bzw. der Unterdrückung oder Induktion von Apoptose beitragen, ist noch ungeklärt. Zusammenfassend scheint jedoch eine hohe GSTP1-Expression in Tumoren mit einer schlechten Prognose einherzugehen, was auch mit klinischen Daten belegt werden kann.^[26, 40]

Alleine durch die Metabolisierung einer Reihe von Chemotherapeutika und die direkte Interaktion mit JNK ist GSTP1 eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung von Inhibitoren. Diese könnten, eingesetzt als Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika, als MDR-Modulatoren in Krebszellen dienen. Als Monotherapie könnten GSTP1-Inhibitoren als Induktoren von Apoptose eingesetzt werden.

1.4 GSTP1 als Zielstruktur für die Wirkstoffentwicklung

1.4.1 Bekannte Inhibitoren

In den vergangenen Jahrzehnten wurde sehr viel an der Entwicklung potenter GSTP1-Inhibitoren geforscht. Die vielversprechendsten Ansätze für die Entwicklung von Leitstrukturen werden im Folgenden kurz dargestellt.

Einer der ersten GSTP1-Inhibitoren, die entdeckt wurden, ist das Schleifendiuretikum Etacrynsäure (Struktur vgl. 3.2.1). Etacrynsäure inhibiert den Na-K-2Cl-Cotransporter in der Henleschen Schleife und führt so bei einer Standarddosierung von 25 mg zu einer starken Diurese.^[41] Schon Mitte der 1980er Jahre wurde die Inhibition von GSTs aus der Ratte durch verschiedene Diuretika beschrieben.^[42] Seitdem wurden die Eigenschaften von Etacrynsäure ausführlich charakterisiert. Es ist bekannt, dass Etacrynsäure sowohl Inhibitor als auch Substrat von GSTP1 ist. Das durch GST-Katalyse und durch spontane Reaktion mit GSH entstehende Konjugat zeigt ebenfalls inhibitorische Eigenschaften.^[43] Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass Etacrynsäure und das Etacrynsäure-GSH-Konjugat mit beiden Bindungstaschen der GSTP1 interagieren, die Aktivität von Etacrynsäure liegt dabei im niedrigen mikromolaren Bereich und zeigt nur wenig Selektivität zwischen den GST-Klassen P, A und M.^[44]

Die Effektivität von Etacrynsäure als GSTP1-Inhibitor konnte in zahlreichen *in-vitro*-Versuchen gezeigt werden. So erhöht Etacrynsäure die Sensitivität der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 gegenüber Chlorambucil und Melphalan und führt zu einer erhöhten Toxizität von Doxorubicin im Tumorgewebe *ex-vivo*.^[45]

Etacrynsäure wird in der Forschung häufig als Referenzinhibitor der GSTP1 eingesetzt. Mehrere zu Etacrynsäure analoge Verbindungen wurden in den vergangenen Jahren synthetisiert und auf GSTP1-Aktivität hin untersucht. Dazu gehören auch die Oxadiazole (Struktur vgl. Abbildung 6A) von *Yang et al.*, die eine höhere Aktivität an isolierter GSTP1 und in Krebszellen als Etacrynsäure zeigen.^[46] Ob diese Optimierungen der Etacrynsäure-Grundstruktur zu einem besseren klinischen Profil der Substanzklasse beitragen, ist allerdings noch unklar.

Ein weiterer nennenswerter Ansatz für die Entwicklung von GSTP1-Inhibitoren sind GSH-analoge Verbindungen, die sich durch Derivatisierung des Glutathion-Grundgerüsts auszeichnen. Häufig ist der Vorteil dieser Verbindungen eine hohe Affinität zur G-Site der GSTs, an der sie kompetitiv mit GSH konkurrieren. Als besonders effektiv hat sich dabei eine S-Benzyl-Substitution erwiesen.^[17]

Die Nachteile der GSH-Analoga sind die Instabilität gegenüber γ -Glutamyltransferase, die den Glutamatrest des GSHs abspaltet und GSH auf diese Weise inaktiviert, sowie die mangelnde Selektivität der Verbindungen, da die hochkonservierte G-Site der Glutathion-Transferasen innerhalb der zytosolischen GSTs äußerst ähnlich ist.

Dennoch wurde Mitte der 1990er Jahre TER117 (vgl. Abbildung 6B) entwickelt, ein GSH-Analogon, mit einer S-Benzylsubstitution und einem D-Phenylglycinrest anstelle des Glycins. Diese Verbindung zeigt hohe Aktivität und Selektivität gegenüber GSTP1 (K_i^{GSH} : 0.4 μM) und ist gleichzeitig stabil gegenüber γ -Glutamyltransferase.^[47] Die Selektivität von TER117 gegen GSTP1 im Vergleich zu GSTA1 und GSTM2 kann durch die 1997 publizierte Kristallstruktur des GSTP1-Inhibitor-Komplexes erklärt werden. Durch den räumlich anspruchsvollen D-Phenylglycinrest kommt es zur sterischen Hinderung in den Bindungstaschen der GSTA1 und GSTM2.^[23]

Ter117 zeichnet sich durch hohe Aktivität gegenüber GSTP1 in Tumorzelllinien aus und erhöht so die Toxizität von alkylierenden Substanzen wie Chlorambucil.^[48]

Neben diesen altbekannten Verbindungen gibt es eine Reihe an neuen Substanzklassen, die in den letzten Jahren als GSTP1-Inhibitoren identifiziert wurden und die sich strukturell stark unterscheiden. Dazu gehören sowohl Naturstoffe als auch niedermolekulare, synthetische Inhibitoren.

Im Jahr 2005 wurde von *Ricci et al.* das Benzoxadiazol-Derivat 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) (Struktur vgl. Abbildung 6C) als potenter Inhibitor von GSTP1 (IC_{50} : 0.8 μM) und GSTM2 entdeckt. Trotz mangelnder Selektivität für GSTP1 konnte die Effektivität von NBDHEX *in-vitro* und *in-vivo* nachgewiesen werden. Die zytostatische Wirkung von Temozolomid auf Melanome im Mausmodell wird durch NBDHEX deutlich gesteigert.^[49] Darüber hinaus wurde die Zytotoxizität dieser Verbindung in Lungenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen. Dabei ist der Wirkungsmechanismus nicht nur auf die Inhibition der GSTP1 zurückzuführen, sondern auch auf die Aktivierung von JNK.^[50]

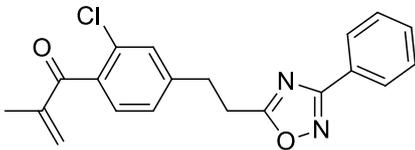
Eine weitere Klasse von GSTP1-Inhibitoren sind Cumarin-Derivate. Im Jahr 2015 wurde eine Reihe von synthetischen Cumarinen entwickelt, die Aktivität gegenüber GSTP1 zeigen.^[51] Die aktivste Verbindung dieser Reihe ist in Abbildung 6D dargestellt. Allerdings zeigen auch die natürlichen Cumarine 8-Methoxypsoralen und Quercetin *in-vitro*-Aktivität an GSTP1. Dabei legen Studien nahe, dass es sich bei Quercetin um einen kovalenten Inhibitor handelt, der den Cysteinrest 47 (Cys-47) der GSTP1 bindet.^[52] Auch bei diesen Inhibitoren konnten *in-vitro* Studien den ajuvanten Effekt der GSTP1-Inhibition auf die Zytostatika-vermittelte Zytotoxizität zeigen.^[53]

Die kovalente Bindung an Cys-47 wurde ebenfalls für Isothiocyanate, wie z.B. Benzylisothiocyanat, nachgewiesen. Dabei kommt es erst durch Bindung an GSH zu einer spezifischen Aktivierung durch GSTP1 und dann zur Übertragung des Benzylthiocyanats auf den Cysteinrest. Cys-47 hat dabei keine Funktion für die katalytische Aktivität im aktiven Zentrum des Enzyms, sondern ist Teil einer terminalen α -Helix, der, wenn durch einen Inhibitor modifiziert, die Interaktion zwischen GSH und GST sterisch hindert.^[54]

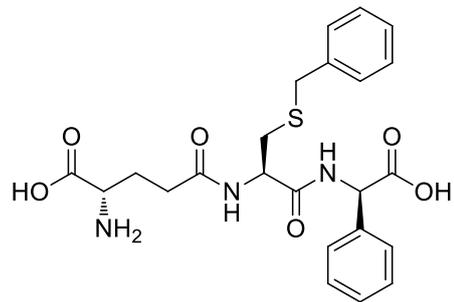
Andere in der Literatur beschriebene GSTP1-Inhibitoren sind α -Tocopherol, Curcumin, Merbromin und 3-Cinnamyl-5-bromomethylenetetrahydro-2-furanon (HEL) (vgl. Abbildung 6E-H).^[11, 55]

Zusammenfassend ist eine große Zahl an GSTP1-Inhibitoren mit hoher *in-vitro*-Aktivität bekannt. Die *in-vivo*-Aktivität dieser Verbindungen im Menschen ist in den meisten Fällen jedoch noch nicht erforscht. Auch die Selektivität vieler Inhibitoren ist ungeklärt. Trotz hoher Anstrengungen scheint noch kein GSTP1-Inhibitor gefunden, der das Potential hat, zukünftig als Arzneistoff zugelassen zu werden.

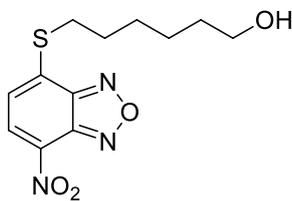
A)



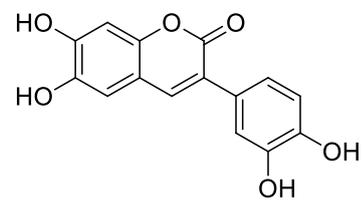
B)



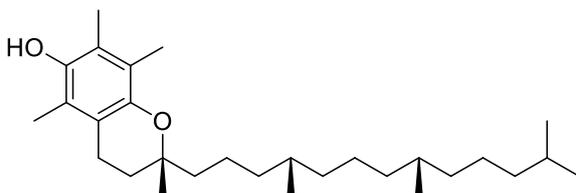
C)



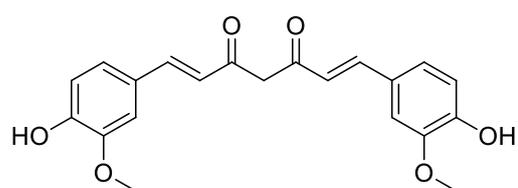
D)



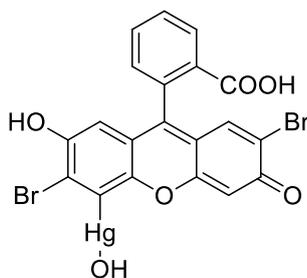
E)



F)



G)



H)

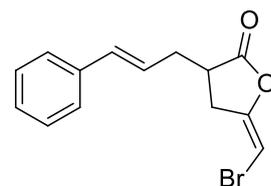


Abbildung 6 Strukturen literaturbekannter GSTP1-Inhibitoren: Etacrynsäurederivat mit Oxadiazolrest (A), TER117 (B), NBDHEX (C), Cumarinderivat (D), α -Tocopherol (E), Curcumin (F), Merbromin (G) und HEL (H).

1.4.2 GSTP1-aktivierte Prodrugs

Im Kontrast zu der Idee mithilfe von GSTP1-Inhibitoren MDR in Tumorzellen zu überwinden, wurden Prodrugs konzipiert, welche die Überexpression von GSTP1 in Tumorzellen ausnutzen, um spezifisch aktiviert zu werden. Das prominenteste Beispiel dieser GSTP1-spezifischen Prodrugs ist Canfosfamid (TLK286), das eine dem GSH analoge Struktur aufweist. Durch GST-Katalyse wird das GSH-Gerüst abgespalten und eine alkylierende, dem N-Lost ähnliche Verbindung freigesetzt (Abbildung 7), die Reaktion ist dabei nicht GSTP1-selektiv, GSTA1 katalysiert diese Reaktion ebenfalls.^[56] Infolge der notwendigen Aktivierung durch GSTs wird das zytotoxische Alkylans spezifisch in Zellen mit hoher GST-Aktivität frei gesetzt, was auf zahlreiche Tumorzellen zutrifft.

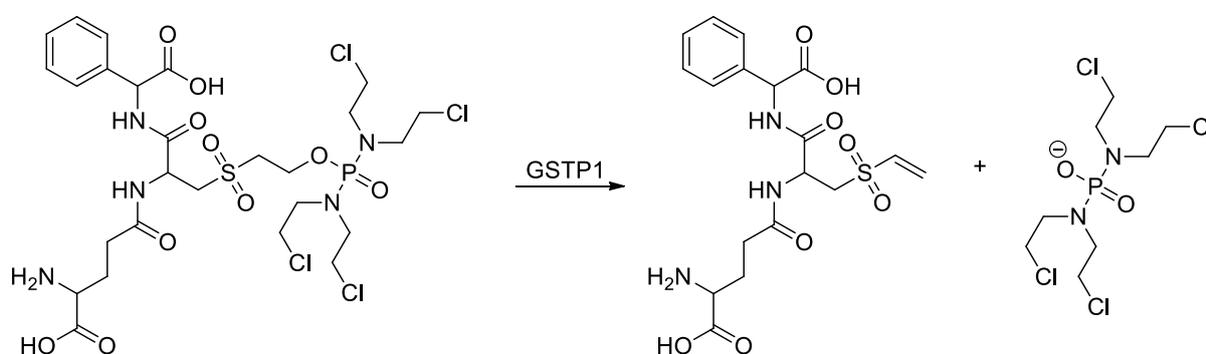


Abbildung 7 Aktivierung von Canfosfamid durch GSTP1.^[56]

Nach erfolgreichen *in-vitro*-Untersuchungen wurde Canfosfamid unter anderem in mehreren klinischen Phase I-III Studien zur Therapie von resistenten Ovarialkarzinomen und NSCLC evaluiert. In diesen Studien konnten vor allem für Kombinationstherapien mit anderen Zytostatika vielversprechende Ergebnisse erzielt werden.^[57]

Mit der klinischen Wirksamkeit von Canfosfamid ist der Beweis erbracht, dass GSTP1-Überexpression in Tumorzellen klinische Relevanz hat. Darüber hinaus deutet dies an, dass GSTP1 eine geeignete Zielstruktur für Wirkstoffentwicklung ist.

1.4.3 Klinische Relevanz

Trotz der zahllosen literaturbekannten GSTP1-Inhibitoren, die in *in-vitro*-Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, ist die Studienlage für *in-vivo*-Daten oder sogar Effektivität der Verbindungen im Menschen bis jetzt noch sehr begrenzt.

Der erste GSTP1-Inhibitor, der in einer klinischen Studie am Menschen evaluiert wurde, ist Etacrynsäure. In einer klinischen Phase I-Studie von 1991 mit 27 Patienten, die solide Tumore (vor allem Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Cervixkarzinom) aufwiesen, wurde Etacrynsäure (25 – 75 mg/kg, p.o.) in Kombination mit dem alkylierenden Zytostatikum Thiotepa verabreicht.

Wie zu erwarten, trat als Nebenwirkung der Etacrynsäure vor allem eine starke Diurese auf. Die Kombination von Etacrynsäure und Thiotepa führte aber auch zu einer verstärkten Myelosuppression, was den klinischen Einsatz von Etacrynsäure stark limitiert.^[58] In einer zweiten Studie (1994) wurde die orale Bioverfügbarkeit von Etacrynsäure negativ beurteilt.^[59] Danach wurden keine Studien mehr veröffentlicht, die den Einsatz von Etacrynsäure als GSTP1-Inhibitor im Menschen untersuchen.

Ein aussichtsreicherer Kandidat in der klinischen Testung war das zellgängige Prodrug TER199 (Ezatiostat, TLK199), welches durch Veresterung der beiden freien Carboxylgruppen von TER117 entsteht und durch intrazelluläre Esterase wieder die Säure freisetzt. Nach positiven Ergebnissen in *in-vitro*-Testungen und Phase I klinischen Studien, in denen TER199 als Monotherapie und als Kombinationstherapie mit Lenalidomid, einem bei multiplen Myelom eingesetzten Immunmodulator, angewendet wurde, wurden mehrere Phase II-Studien begonnen. Allerdings sind bisher nur die Ergebnisse einer Phase II Studie veröffentlicht, in der TER199 als Monotherapie gegen Myelodysplastisches Syndrom in 89 Patienten eingesetzt wurde (bis zu 3 g/Tag), da zuvor gezeigt werden konnte, dass TER199 die Proliferation von Myeloblasten stimuliert. In dieser 2012 veröffentlichten Studie zeigt TER199 Effektivität, die wahrscheinlich hauptsächlich durch Aktivierung des JNK-Signalwegs verursacht wird.^[60] Auch wenn noch keine weiteren Daten zu der klinischen Effektivität von TER199 vorliegen, so deuten diese ersten klinischen Resultate an, dass GSTP1-Inhibition ein valides Prinzip für die Entwicklung neuer Arzneistoffe ist.

1.5 Von Artemisinin zu niedermolekularen 1,2,4-Trioxanen

1.5.1 Artemisinin

Der Naturstoff Artemisinin (Struktur vgl. Abbildung 11), der 1972 erstmals aus *Artemisia annua* (einjähriger Beifuß) isoliert wurde, ist ein bemerkenswertes Sesquiterpenlacton, welches als Pharmakophor eine Endoperoxid-Gruppe beinhaltet. Seit der Isolation durch Tu Youyou (Nobelpreis für Medizin, 2015) sind Artemisinin und seine Derivate zu wichtigen Grundsteinen der Antimalaria-Therapie geworden und lösen andere Wirkstoffe, gegen die sich zunehmend Resistenzen bilden, ab.^[61]

Auch wenn Artemisinin hochwirksam gegen Malaria ist, ist der Wirkmechanismus gegen *Plasmodium falciparum* nach wie vor umstritten. Als sicher wird mittlerweile angenommen, dass es sich bei Artemisinin und seinen Derivaten um Prodrugs handelt, welche durch reduktive Spaltung des Peroxids in den Vakuolen der Parasiten aktiviert werden. Fraglich ist immer noch,

durch welchen Prozess diese Aktivierung ausgelöst wird. Derzeit gilt als am wahrscheinlichsten, dass freie Eisenionen oder Abbauprodukte des Hämoglobins mit Artemisinin reagieren.^[62] Aber auch eine mitochondriale Aktivierung wird diskutiert.^[63]

Artemisinin selbst zeigt schlechte pharmakokinetische Eigenschaften, da es sowohl in Wasser als auch in Öl kaum löslich ist.^[61] Seine semisynthetischen Derivate Artesunat (Struktur vgl. 3.2.3) und Artemether (Struktur vgl. Abbildung 8) sind jedoch zugelassene Arzneimittel; Artesunat ist mittlerweile sogar das Mittel der ersten Wahl bei schweren Verlaufsformen der Malaria.^[64]

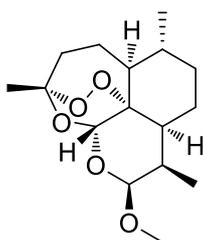


Abbildung 8 Das semisynthetische Artemisininderivat Artemether.

Auch wenn die erste Totalsynthese für Artemisinin schon 1983 beschrieben wurde, wird der Großteil der jährlich benötigten Menge an Artemisinin immer noch aus *Artemisia annua* isoliert.^[65] Im Jahr 2013 wurde zum ersten Mal Artemisinin im Tonnen-Maßstab in einem semisynthetischen Prozess ausgehend von Artemisininsäure produziert. Diese Synthese verläuft über ein Hydroperoxid, welches mittels Singulett-Sauerstoff und Tetraphenylporphyrin in Dichlormethan generiert wird, und liefert eine Gesamtausbeute von 55% (Abbildung 9). Mithilfe dieser Syntheseroute konnte die Firma *Sanofi* im Jahr 2014 sechzig Tonnen Artemisinin herstellen.^[66] Dieser Erfolg beweist, dass die in Kapitel 1.5.4 beschriebene Photooxygenierung mittels Singulett-Sauerstoff großtechnisch zur Synthese von Wirkstoffen eingesetzt werden kann.

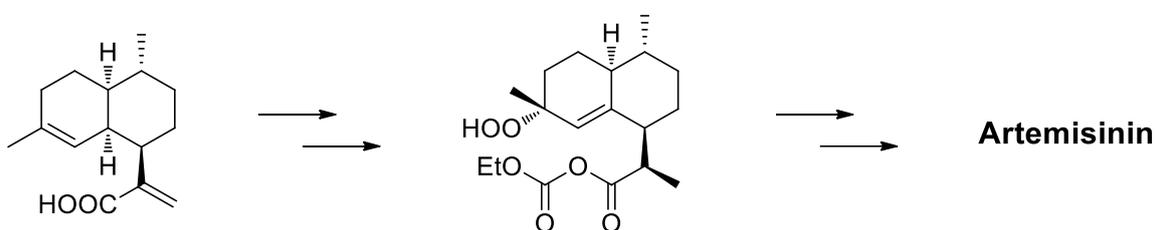


Abbildung 9 Synthese von Artemisinin ausgehend von Artemisininsäure über ein Hydroperoxid.

1.5.2 Artemisinin und Krebs

Aufgrund der einzigartigen Struktur und der geringen Toxizität wird die Wirkung von Artemisinin und seinen Derivaten in der Vergangenheit auch bei anderen Krankheiten untersucht. Neben der Wirkung gegen Malaria, wird der Effekt von Artemisinin gegen Infektionskrankheiten, vor allem auf virale Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebs derzeit evaluiert.^[67]

Die Wirkung von Artemisinin auf Tumore kommt wahrscheinlich durch Bildung von ROS zustande, die möglicherweise durch Häm-Aktivierung von Artemisinin in den Mitochondrien gebildet werden, ähnlich dem Mechanismus in Parasiten bei der Malariabekämpfung.^[68] Die eingesetzten Dosen von Artemisinin liegen im Bereich bis zu 50 mg/kg im Mausmodell und sind damit deutlich höher als bei der Therapie gegen Malaria (2 – 4 mg/kg am Menschen).^[67]

In mehreren Einzelfallstudien wurden jedoch schon verschiedene Artemisinin-derivate allein oder in Kombination mit der Standardtherapie am Menschen eingesetzt und zeigten vielversprechende Ergebnisse.^[69] Zudem wurde in einer Studie im Jahr 2014 mit 23 Patientinnen, die metastasierenden Brustkrebs aufwiesen, das pharmakokinetische Verhalten von Artesunat bei hochdosierter Langzeit-Applikation geklärt (ClinicalTrials.gov NCT00764036).^[70]

Allerdings sind die zellulären Mechanismen, die durch Artemisinin gebildete ROS beeinflusst werden, noch weitestgehend unklar und Ziel der aktuellen Forschung. So werden apoptotische, antiproliferative, antiangiogene und antimetastatische Effekte von Artemisinin und seinen Derivaten diskutiert.^[71]

Artemisinin scheint darüber hinaus kein Substrat der Effluxpumpen P-gp und MRP1 zu sein, was seinen Einsatz in multiresistenten Tumoren interessant erscheinen lässt.^[72] Allerdings berichteten *Efferth et al.*, dass die Aktivität von Artemisinin-derivaten mit der Expression von Glutathion-assoziierten Enzymen korreliert, da diese möglicherweise die Endoperoxidbrücke des Artemisinins aktivieren und zur Bildung von ROS beitragen.^[73]

Im Jahr 2002 berichteten *Mukanganyama et al.*, dass Artemisinin neben anderen Wirkstoffen gegen Malaria ein potenter Inhibitor der humanen GSTP1 mit einem IC₅₀-Wert von 2 µM ist, weshalb Artemisinin ein geeigneter Wirkstoff bei multiresistenten Tumoren wäre.^[74] Die Dissoziationskonstante K_i für die GSH-Bindungstasche wurde an isolierter, rekombinanter GSTP1 mit 2.4 µM bestimmt; die Interaktion entspricht einer gemischten Hemmung. Als gemischte Hemmung wird eine Form der Enzymhemmung verstanden, bei welcher der Inhibitor sowohl an das Enzym binden kann, wenn kein Substrat gebunden ist, als auch wenn Substrat gebunden ist. Die Bindungsaffinitäten sind jedoch nicht für beide Zustände identisch.

Obwohl schon seit über zwanzig Jahren Effekte von Artemisinin auf Krebszellen bekannt sind, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Es besteht die Notwendigkeit weiterer Grundlagenforschung und klinischer Untersuchungen, um bestehende Hypothesen zu bestätigen.

1.5.3 Niedermolekulare Endoperoxide mit antiproliferativer Wirkung

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Synthesen für Verbindungen mit Peroxidstruktur entwickelt, die Aktivität gegen Plasmodien zeigen. Einige dieser Endoperoxide wurden auch auf ihre antitumorale Wirkung hin evaluiert.

So zeigten die von *Terzic et al.* publizierten Endoperoxide, die sich von Desoxycholsäure ableiten (Abbildung 10A), antiproliferative Aktivität gegenüber Krebszelllinien verschiedenen Ursprungs mit LC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich.^[75] Auch andere Triterpene mit Steroidgerüst und Endoperoxidfunktion zeigten Aktivität gegen Tumorzellen; jedoch wurde der Wirkmechanismus bisher nicht aufgeklärt.^[76] Dies ist ebenfalls für eine Reihe von 1,2,4-Trioxanen (Struktur vgl. Abbildung 10B) mit IC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich der Fall.^[77]

Verschiedene Aminoendoperoxide (Abbildung 10C) lösen Apoptose in Tumorzelllinien aus (Aktivität im hohen mikromolaren Bereich), indem sie die Bildung von ROS durch die NADPH-abhängige Oxidase 4 (NOX4) induzieren, was der Aktivierung von Artemisinin über die Bildung von Radikalen entspricht.^[78]

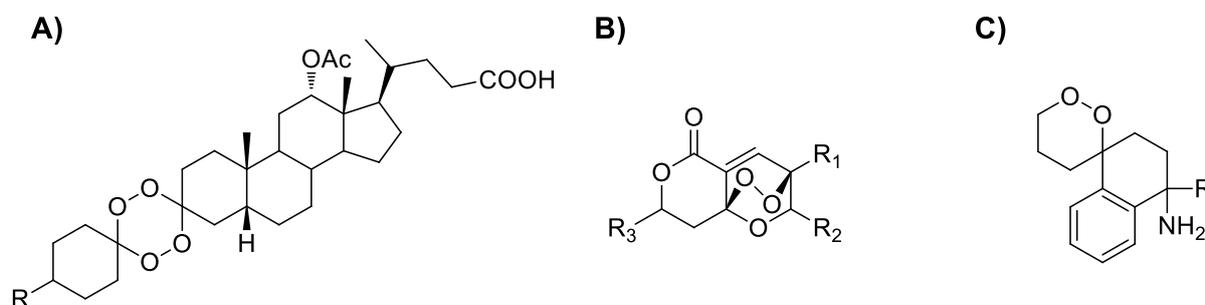


Abbildung 10 Verschiedene Peroxide mit Wirkung gegenüber Tumorzellen: Desoxycholsäurederivate (A), 1,2,4-Trioxane mit zyklischer Enolat-Struktur (B), Aminoendoperoxide (C).

Diese ersten positiven Ergebnisse der Evaluation von synthetischen Endoperoxiden deuten an, dass die antitumorale Aktivität von Artemisinin auf niedermolekulare Moleküle mit Peroxidstruktur übertragbar ist. Ob die Wirkung gegenüber Tumorzellen im Zusammenhang mit GSTP1 steht, ist dabei noch völlig unklar.

1.5.4 Synthese von 1,2,4-Trioxanen

Artemisinin und seine semisynthetischen Derivate sind vielversprechende Substanzen, nicht nur in der Therapie der Malaria, sondern auch bei Krebserkrankungen. Da diese Verbindungen aber keine optimalen pharmakokinetischen Eigenschaften aufweisen und die Gewinnung von Artemisinin durch Synthese oder Isolierung aus *Artemisia annua* kostenintensiv ist, ist die Entwicklung synthetischer niedermolekularer 1,2,4-Trioxane mit verbesserten Eigenschaften ein sinnvoller Schritt. Eine Vielzahl an synthetischen Verbindungen, die als Pharmakophor ein 1,2,4-Trioxan aufweisen (Abbildung 11), wurde in den letzten Jahren synthetisiert. Im Folgenden werden verschiedenen Strategien zur Synthese von 1,2,4-Trioxanen besprochen.

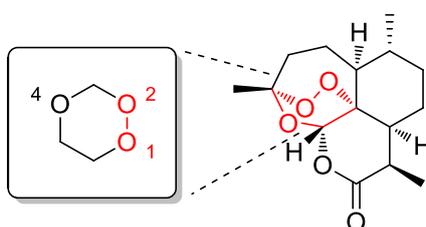


Abbildung 11 Die Struktur von Artemisinin mit einem 1,2,4-Trioxan als zentralem Pharmakophor.^[77]

Häufig genutzte Reaktionen für die Synthese dieser Heterozyklen sind die Addition von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die Ozonolyse und Reaktionen mit atmosphärischem oder Singulett-Sauerstoff. Oft verlaufen diese Synthesen über die Bildung eines Hydroxyhydroperoxids, welches anschließend zu einem 1,2,4-Trioxan acetalisiert werden kann.

Die ersten publizierten Syntheserouten für die Darstellung von 1,2,4-Trioxanen hatten als Zwischenstufen Hydroxyhydroperoxide, die durch Epoxidöffnung mittels H_2O_2 erhalten wurden.^[79] Bei dieser Methode erfolgt die Epoxidöffnung mit 98%igem H_2O_2 , was die Anwendung stark limitiert. Die Acetalisierung zum entsprechenden 1,2,4-Trioxan wurde in Aceton mittels Kupfersulfat-Katalyse durchgeführt (Abbildung 12).

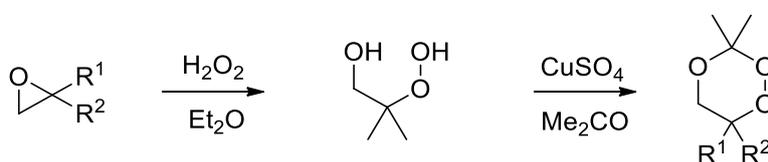


Abbildung 12 Synthese von 1,2,4-Trioxanen durch Öffnung von Epoxiden mittels H_2O_2 und anschließender Acetalisierung.

Seitdem wurde eine Vielzahl an Reaktionswegen, die zu unterschiedlich substituierten 1,2,4-Trioxanen führen, veröffentlicht.

Dussault und *Davies* beschrieben 1996 einen Syntheseweg, der Hydroperoxide durch Ozonolyse liefert, welche durch Zyklisierung mit einem Elektrophil wie z.B. Iod in die entsprechenden

1,2,4-Trioxane überführt werden können (Abbildung 13). Die Reaktion kann mit verschiedenen Katalysatoren durchgeführt werden, wie z.B. Quecksilberacetat.^[80]

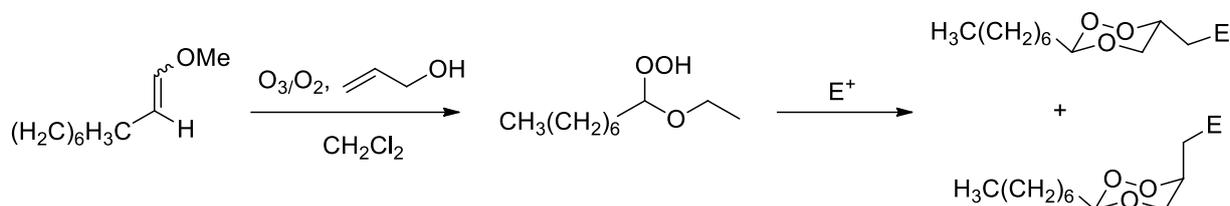


Abbildung 13 Synthese von 1,2,4-Trioxanen via Zyklisierung von ungesättigten Hydroperoxyacetalen.

Auch *Bloodworth et al.* konnten in den 1990er Jahren 1,2,4-Trioxane durch Mercurierung mit Quecksilberacetat darstellen. Die dreistufige Synthese geht von einem Hydroperoxid, das photochemisch generiert wird (siehe unten), und einem Aldehyd aus. Diese werden Trifluoressigsäure-katalysiert zu einem Hemi-Peroxyacetal umgesetzt. Anschließend erfolgt die Zyklisierung unter Quecksilberacetat-Katalyse. Die Abspaltung des Quecksilberrestes erfolgt reduktiv (Abbildung 14).^[81] Die Reaktion kann auch durch ein N-Halogensuccinimid katalysiert werden; dies schränkt die Substrate, die eingesetzt werden können, jedoch deutlich ein.^[82]

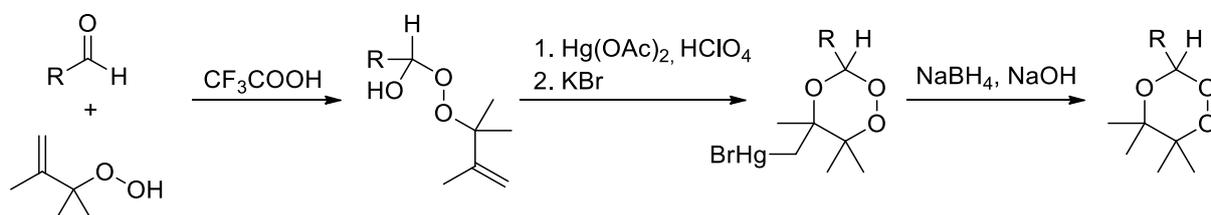


Abbildung 14 Darstellung von 1,2,4-Trioxanen via Mercurierung.

Im Jahr 1980 wurde von *Yamamoto et al.* die Bildung von 5-Arylamino-1,2,4-trioxanen mittels atmosphärischen Sauerstoffs berichtet. Dafür wurde ein primäres Arylamin mit einer Aldehydkomponente für längere Zeit unter Lichtausschluss in einer Hexan-Diethylether-Mischung autoxydiert (Abbildung 15).^[83]

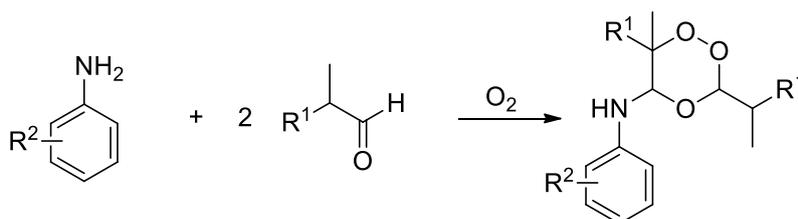


Abbildung 15 Synthese von 5-Arylamino-1,2,4-trioxanen mittels atmosphärischen Sauerstoffs.

Ebenfalls ausgehend von atmosphärischem Sauerstoff können Spirotrioxane dargestellt werden. Dieser Syntheseweg nutzt Bis(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptandionat)cobalt(II) ($\text{Co}(\text{thd})_2$) als Katalysator um Triethylsilylperoxide aus allylischen Alkoholen zu generieren. Anschließend wird mit *p*-Toluolsulfonsäure acetalisiert (Abbildung 16).^[84]

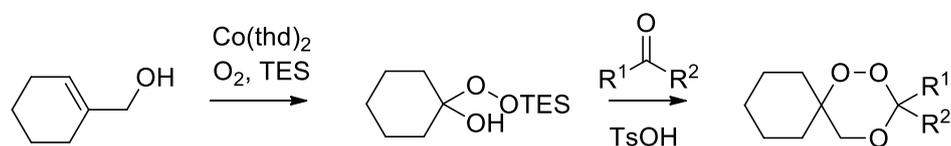


Abbildung 16 Synthese von Spirotrioxanen.

Es sind noch weitere Synthesewege bekannt, die zu 1,2,4-Trioxanen führen. Besonders hervorzuheben ist der Einsatz von Singulett-Sauerstoff zur Generierung von Hydroxyhydroperoxiden und die anschließende Peroxoacetalisierung, was 1990 erstmals von *Chandan Singh* durchgeführt wurde.^[85] Die Darstellung von zyklischen Endoperoxiden und von Hydroperoxiden mittels Singulett-Sauerstoff war zwar bereits bekannt, die Synthese von niedermolekularen 1,2,4-Trioxanen mittels dieser photochemischen Route jedoch zuvor noch nicht durchgeführt worden.^[86]

Beginnend mit allylischen Alkoholen wurden durch Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff β -Hydroxyhydroperoxide generiert, welche durch säurekatalysierte Acetalisierung mit verschiedenen Ketonen und Aldehyden in die entsprechenden 1,2,4-Trioxane überführt wurden (Abbildung 17).

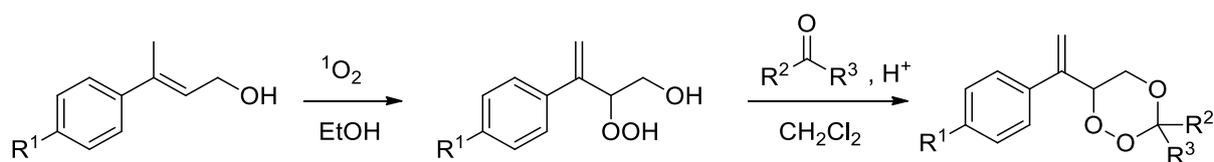


Abbildung 17 Synthese von 1,2,4-Trioxanen über Hydroxyhydroperoxide, die mittels Singulett-Sauerstoff generiert werden.

Bei der Darstellung von Hydroxyhydroperoxiden handelt es sich um eine Typ II-Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff im ersten angeregten Zustand, der 22 kcal/mol über dem Grundzustand liegt und bei dem zwei Elektronen mit antiparallelem Spin in einem antibindenden Orbital vorliegen.^[87] Die Erzeugung des Singulett-Sauerstoffs erfolgt photochemisch durch Triplettensensibilisierung. Ein Farbstoffmolekül dient dabei als Sensibilisator und wird durch Absorption von Licht in einen angeregten Singulett-Zustand gebracht. Entweder kann der Sensibilisator durch Abstrahlen von Energie wieder in den Grundzustand zurückkehren oder durch Spinumkehr, sogenanntem Intersystem Crossing (ISC), in den angeregten Triplett-Zustand

übergehen. Dieser Triplett-Zustand kann dann Energie auf ein sich im Grundzustand befindliches Sauerstoff-Molekül übertragen. Es entsteht Singulett-Sauerstoff; der Sensibilisator fällt in den Grundzustand zurück (Abbildung 18).^[88]

Als Triplett-Sensibilisatoren kommen eine Vielzahl an Farbstoffen in Betracht. Abhängig von den Reaktionsbedingungen werden Bengalrosa, Methyleneblau und Porphyrine häufig eingesetzt.^[89]

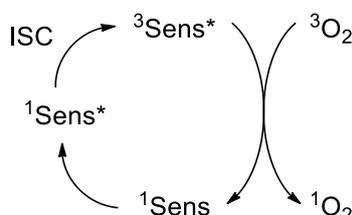


Abbildung 18 Generierung von Singulett Sauerstoff mittels Triplett-Sensibilisierung.^[90]

Die Addition von Singulett-Sauerstoff läuft über die erstmals von *Günther Schenck* beschriebene *Schenck-En*-Reaktion ab.^[91] Es kommt zur Addition von Singulett-Sauerstoff an eine Doppelbindung verbunden mit der Abstraktion eines allylständigen Protons (Abbildung 19A). Es sind verschiedene Intermediate postuliert, die während der Reaktion entstehen könnten. Es kann sich dabei um eine konzentriert, eine zwitterionisch, eine biradikalisch oder eine peroxidisch ablaufende Reaktion handeln (Abbildung 19B).^[92]

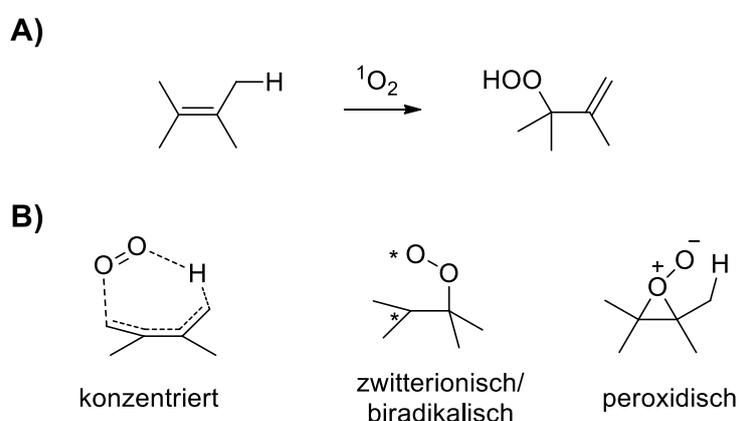


Abbildung 19 A) Schenck-En-Reaktion und **B)** mögliche Intermediate der Reaktion.

Aufgrund der hohen Reaktivität von Singulett-Sauerstoff ist es möglich, dass bei der Photooxygenierung ein Isomerengemisch entsteht, wenn in einem Molekül mehrere allylische Wasserstoffatome abstrahiert werden können. Jedoch ist die Regioselektivität der *Schenck-En*-Reaktion durch mehrere empirische Regeln vorhersehbar. Bei dreifach substituierten Doppelbindungen reagieren vermehrt Wasserstoffatome an der höher-substituierten Seite der Doppelbindung (*cis*-Effekt, Abbildung 20A). Bei Olefinen, die in α -Position einen Substituenten

(z.B. einem Carbonyl-, Phenyl- oder Cyanosubstituenten) tragen, wird vornehmlich das geminale Wasserstoffatom abstrahiert (*gem*-Effekt, Abbildung 20B). Der „large-group-non-bonding“-Effekt beschreibt das Phänomen, dass bei hochsubstituierten Olefinen mit sterisch anspruchsvollen Resten die Abstraktion des H-Atoms meist an der dazu geminalen Methylgruppe erfolgt (Abbildung 20C).^[93]

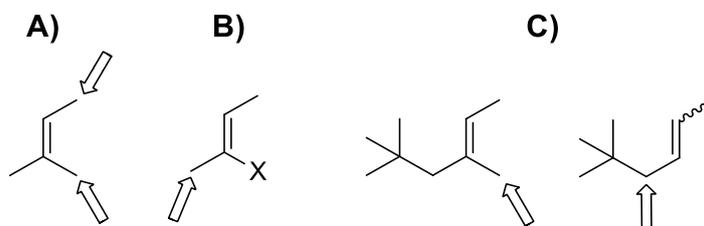


Abbildung 20 Regioselektivität der Schenck-En-Reaktion: **A)** *cis*-Effekt, **B)** *gem*-Effekt, **C)** „large-group-non-bonding“-Effekt.^[93]

Ausgehend von unterschiedlichen Substraten ermöglicht die *Schenck-En*-Reaktion von allylischen Alkoholen die Darstellung einer großen Anzahl an Hydroxyhydroperoxide, die in einer Peroxoacetalisierung in 1,2,4-Trioxane überführt werden können. Dieser elegante Syntheseweg hat zu Hunderten neuen 1,2,4-Trioxanen geführt, die für die Testung an verschiedenen Zielstrukturen zur Verfügung stehen.^[94] Einige Beispiele für die strukturelle Vielfalt sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die Reaktion zeichnet sich neben hoher Vielfältigkeit auch durch Kosteneffektivität und geringe Umweltbelastung aus, da das einzig notwendige Oxidationsmittel Sauerstoff ist.

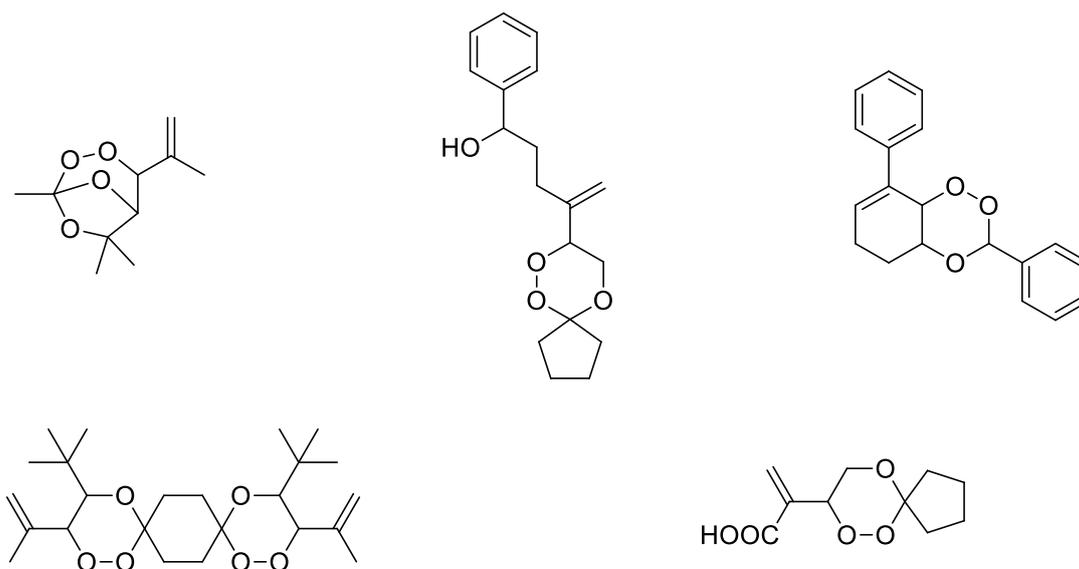


Abbildung 21 1,2,4-Trioxane, die via Singulett-Sauerstoff-En-Reaktion dargestellt werden können.^[95]

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten potente und selektive Inhibitoren der GSTP1 entwickelt werden und dabei die Bereiche Synthese, enzymkinetische Testung und Entwicklung zellbasierter Assaysysteme abgedeckt werden. Effektive GSTP1-Inhibitoren könnten das Potential haben, MDR in Krebszellen zu umgehen und Apoptose auszulösen und damit zu einer optimierten Tumorthherapie beitragen.

In der Arbeitsgruppe *Griesbeck* besteht umfangreiches Fachwissen über die Synthese von niedermolekularen zyklischen Peroxiden. 1,2,4-Trioxane, die eine Strukturähnlichkeit zu dem literaturbekannten GSTP1-Inhibitor Artemisinin aufweisen, können über eine Typ II Photooxygenierung ausgehend von allylischen Alkoholen gefolgt von einer Peroxyacetalisierung dargestellt werden.

Vor Beginn dieser Arbeit wurden einige 1,2,4-Trioxane mit schwacher Aktivität gegenüber GSTP1 identifiziert. Diese sollten modifiziert werden, um zu einer hochaktiven Leitstruktur zu gelangen.

Die Interaktion der potentiellen Inhibitoren mit der GSTP1 sollte durch die Bestimmung von Dissoziationskonstanten und Hemmtyp in einem spektrophotometrischen Assay am isolierten Enzym eingehend kinetisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die Selektivität der neuen Inhibitoren gegenüber GSTP1 gezeigt werden, indem die Aktivität der Verbindungen an anderen cytosolischen GSTs untersucht werden sollte.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der Identifizierung geeigneter zellulärer Systeme mittels qPCR, um die neu identifizierten Inhibitoren anschließend in einem zellbasierten Assay auf Aktivität gegenüber GSTP1 in Krebszellen überprüfen zu können.

Verbindungen, die hohe Aktivität gegenüber dem isolierten Enzym zeigen, sollten weitergehend in Lysaten von Krebszellen mit GSTP1-Überexpression und mithilfe von zellulären Zytotoxizitätstests charakterisiert werden. Bei Vorliegen eines geeigneten Fluoreszenzsensors könnte zusätzlich ein zellulärer GSTP1-Assay etabliert werden, der die intrazelluläre GSTP1-Aktivität visualisiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesen

Vor dem Beginn der praktischen Arbeit dieser Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe *Griesbeck* verschiedene niedermolekulare 1,2,4-Trioxane synthetisiert. Das Potential dieser Moleküle, GSTP1 zu inhibieren, wurde in der Arbeitsgruppe *Pietsch* (Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln) nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 1,2,4-Trioxane wurden ausgehend von allylischen Alkoholen über eine *Schenk-En*-Reaktion (Typ II Photooxygenierung) gefolgt von einer Peroxyacetalisierung dargestellt (Abbildung 22).

Die Photooxygenierung stellt dabei eine besonders elegante Methode dar, sauerstofffunktionalisierte Verbindungen zu synthetisieren, da lediglich Sauerstoff, ein löslicher Farbstoff als Sensibilisator und eine Lichtquelle benötigt wird.

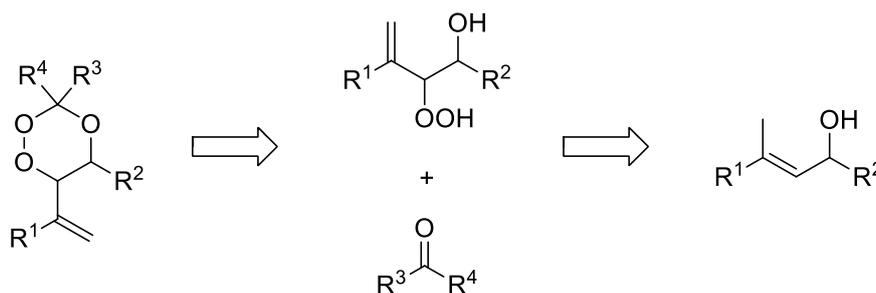


Abbildung 22 Retrosynthese von 1,2,4-Trioxanen ausgehend von allylischen Alkoholen.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten 1,2,4-Trioxane wurden in einem biochemischen Assay getestet, um Hinweise auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen bezüglich der GSTP1-Inhibition zu erhalten. Gleichzeitig wurden neue biologisch hochaktive und selektive Substanzen synthetisiert.

3.1.1 Synthese der 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivate **4 - 8**

Um den Einfluss von Alkylsubstituenten am 1,2,4-Trioxanring auf die GSTP1 Inhibition zu evaluieren, wurden ausgehend von Mesityloxid **1**, entsprechend der Vorschrift von *El-Idreesy*, 1,2,4-Trioxane mit 6-Isopropenyl- und 5-Methylsubstituenten synthetisiert (Abbildung 23).^[96] Dabei wurde im ersten Schritt Mesityloxid **1** mittels Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether in einer moderaten Ausbeute von 43% zum allylischen Alkohol **2** reduziert. Die Aufarbeitung erfolgte durch Waschen mit Wasser und NaOH-Lösung (15%). Eine weitere Aufreinigung durch Destillation oder Säulenchromatographie war nicht erforderlich.

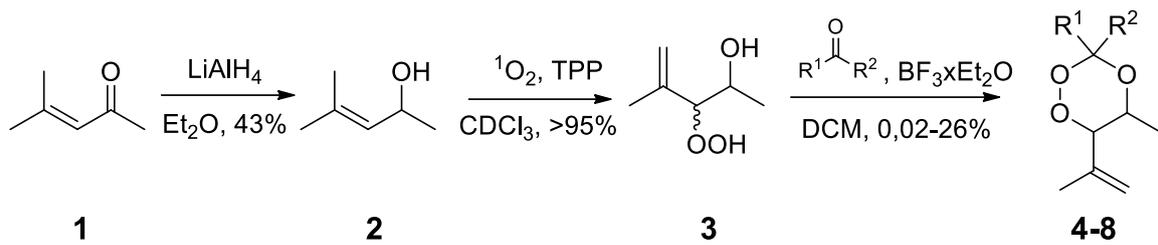


Abbildung 23 Synthese von 5-Methyl-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,4-trioxanen.

Die anschließend durchgeführte Photooxygenierung zum Hydroperoxid **3** wurde, anders als in der Literatur beschrieben, in Lösung durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden sowohl Chloroform als auch deuteriertes Chloroform eingesetzt, als Photosensibilisator diente *meso*-Tetra-phenylporphyrin (TPP). Die Belichtungszeiten variierten je nach Ansatzgröße und verwendetem Lösungsmittel zwischen 16 und 24 Stunden. Die Reaktion resultierte in einem Diastereomerengemisch mit dem *syn*-Hydroperoxid als Hauptdiastereomer. Das Verhältnis zwischen *syn* und *anti* wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmt und beträgt *syn:anti* 89:11. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhältnis (*syn:anti* 93:7), wobei die Photooxygenierung in Tetrachlorkohlenstoff erfolgte.^[96]

Das Diastereomerengemisch **3** wurde ohne weitere Aufreinigung peroxyacetalisiert. Als Katalysator hierfür wurde Bortrifluorid-Diethyletherat ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) eingesetzt. Das Hydroxyhydroperoxid **3** wurde mit fünf verschiedenen Aldehyden bzw. Ketonen zu den entsprechenden 1,2,4-Trioxanen umgesetzt; wobei die entstandenen 1,2,4-Trioxane **4**, **5** und **6** bereits durch *El-Idreesy* beschrieben worden sind.^[96] Die Charakterisierung erfolgte mittels $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie und stimmte mit der Literatur überein. Zusätzlich wurden die 1,2,4-Trioxane **7** und **8** synthetisiert; diese tragen einen elektronenziehenden Substituenten in Position 4 des Phenylringes. Dieses Substitutionsmuster hat sich als besonders interessant für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der GSTP1-Inhibition erwiesen. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulen chromatographie. Die bei der Peroxyacetalisierung im Überschuss eingesetzten schwer flüchtigen Aldehyde und Ketone konnten zuvor mit NaHSO_3 -Lösung erfolgreich abgetrennt werden. Strukturinformationen und Syntheseausbeuten der 1,2,4-Trioxane **4 - 8** können aus Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 Ausbeute der Peroxyacetalisierung des Hydroxyhydroperoxids **3** zu den 1,2,4-Trioxanen **4** – **8**.

Verbindung	R	Ausbeute	Literatúrausbeute ^[96]
4	R ¹ = R ² = CH ₃	0.02%	65%
5	R ¹ = H, R ² = Phenyl	13%	33%
6	R ¹ +R ² = Cyclohexyl	15%	26%
7	R ¹ = H, R ² = 4-Nitrophenyl	6%	-
8	R ¹ = H, R ² = 4-Chlorophenyl	26%	-

Die Ausbeuten der Verbindungen **5** und **6** lagen etwas unter den Literaturwerten. Die besonders niedrige Ausbeute von Verbindung **4** kann eventuell auf deren hohe Flüchtigkeit zurückgeführt werden.

Die Verbindungen **5**, **7** und **8** lagen nach der Peroxyacetalisierung als Diastereomergemische vor, wobei in allen Fällen ein Hauptdiastereomer mit einem Diastereomerenverhältnis von mindestens *dr* = 85:15 entstanden ist (bestimmt über ¹H-NMR). Um diese Verbindungen eindeutig biologisch charakterisieren zu können, wurden die Diastereomere säulenchromatographisch voneinander getrennt und nur das Hauptdiastereomer vollständig charakterisiert und biologisch evaluiert.

3.1.2 Synthese der 1,2,4-Trioxanderivate mit Methylacrylatsubstitution **16b/17b**

Ausgehend von β -Formylcrotylacetat **11**, welches als Grundstoff für die industrielle Vitamin A-Synthese eingesetzt wird, wurde durch Oxidation mit Natriumchlorit und anschließender Hydrolyse mit Kaliumcarbonat 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** hergestellt (Abbildung 24).^[97] Die entstandene Säure **13** konnte aus Chloroform umkristallisiert werden. Die Ausbeuten dieser zweistufigen Synthese waren gut, dabei allerdings stark abhängig von der Reinheit der Ausgangsverbindung. Die Säure kann in größerem Maßstab synthetisiert werden und ist, wenn vor Feuchtigkeit geschützt, lagerstabil.

Die so synthetisierte 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** konnte durch Reaktion mit Thionyl- oder Sulfurylchlorid in Methanol in den entsprechenden Methylester **14** überführt werden.

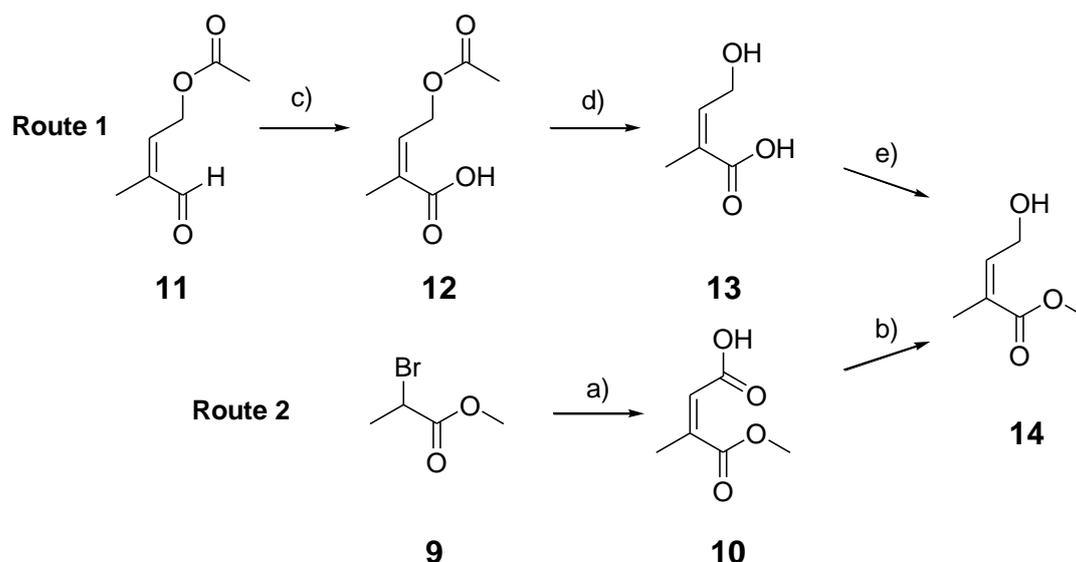


Abbildung 24 Alternative Syntheserouten für Verbindung **14**. a) 1. PPh₃, CH₃CN, 24 h, Reflux; 2. DIPEA, Glyoxylsäure, 24 h, RT; b) 1M Boran-THF-Komplex, 16 h, -78°C → RT; c) 1. NaClO₂/H₂O₂, wässrige K₂PO₄-Lösung, 2 h RT; d) K₂CO₃, MeOH/H₂O, 4h, RT, e) SOCl₂/MeOH, 4 h, Reflux.

Eine alternative Syntheseroute, die das C₅-Acetat als Ausgangsstoff und die damit verbundenen Qualitätsschwankungen umgeht, lieferte den Methylester **14** ausgehend von Methyl-2-bromopropionat **9** über eine *Wittig*-Reaktion gefolgt von einer Reduktion (Abbildung 24). Bei diesem Syntheseweg wurde zuerst das für die *Wittig*-Reaktion benötigte Ylid *in situ* aus Triphenylphosphan und Methyl-2-bromopropionat **9** generiert und mit Glyoxylsäure umgesetzt. Als Base diente Diisopropylethylamin (DIPEA). Die entstandene Säure **10** wurde selektiv mit einem Boran-THF Komplex zum primären Alkohol **14** reduziert. Auch dieser Syntheseweg ist in der Literatur beschrieben. Die NMR-Daten des Endprodukts **14** stimmen mit der Literatur überein.^[98]

Route 1 lieferte eine Gesamtausbeute von 27%, Route 2 von 38%. Allerdings ist Route 2 deutlich zeit- und kostenintensiver. Verbindung **14** konnte durch Photooxygenierung in Chloroform mit TPP als Photosensibilisator zum Hydroxyhydroperoxid **15** umgesetzt werden, welches anschließend ohne weitere Aufreinigung zu den 1,2,4-Trioxanen **16b** und **17b** umgesetzt wurde (Abbildung 25). Die Peroxyacetalisierung des Hydroperoxids **15** erfolgte Lewis-Säure katalysiert mit BF₃·xEt₂O und mit 4-Nitrobenzaldehyd (4-NBA) **16a** oder 2,4-Dinitrobenzaldehyd **17a** als Aldehydkomponente.

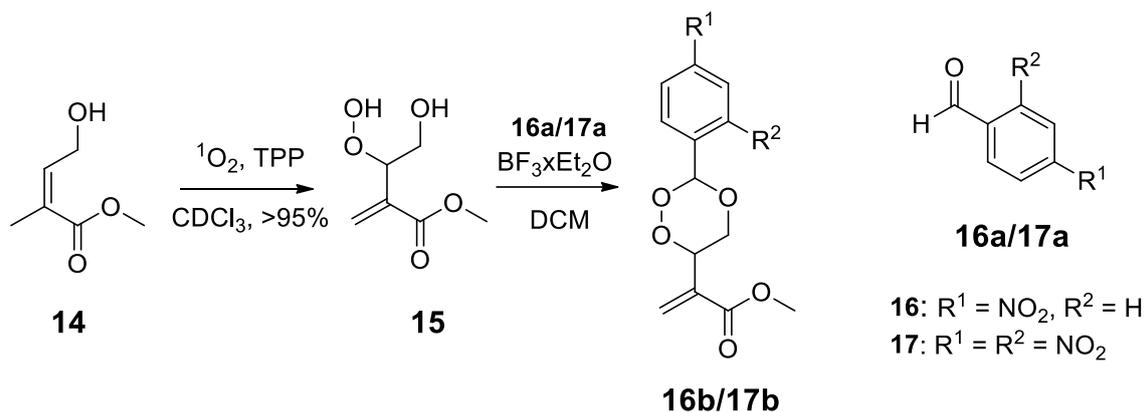


Abbildung 25 Synthese der 1,2,4-Trioxane **16b** und **17b**.

Die Synthese des 1,2,4-Trioxans **16b** wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[99] Da Verbindung **16b** jedoch den Ausgangspunkt für die Leitstrukturidentifizierung von GSTP1-Inhibitoren mit einem 1,2,4-Trioxanmotiv darstellte, wurde diese Verbindung neu synthetisiert und biologisch getestet, um die Aktivität gegen GSTP1 erneut nachzuweisen. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren stimmten mit den Werten in der Literatur überein und wiesen keine Verunreinigungen auf.

Das 1,2,4-Trioxan **17b** wurde analog zu **16b** synthetisiert, um den Einfluss eines zusätzlichen Nitrosubstituenten am Aromaten zu untersuchen. Die Ausbeute der Acetalisierung war bei Verbindung **17b** deutlich geringer als bei Verbindung **16b** (7% im Vergleich zu 28% Ausbeute^[99]), was möglicherweise durch erhöhte Instabilität des Produktes zu erklären ist. Die zwei elektronenziehenden Nitro-Substituenten wirken sich wahrscheinlich destabilisierend auf die Peroxyacetalenheit aus. Mit ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sowie einer Elementaranalyse konnte die Identität und Reinheit des 1,2,4-Trioxans **17b** belegt werden.

3.1.3 Synthese der vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxane **22** - **24**

Mit dem *p*-Nitrophenylsubstituent in Position 3 des 1,2,4-Trioxanes hat sich ein verstärkender Einfluss auf die Fähigkeit dieser Verbindungen, GSTP1 zu inhibieren, herausgestellt. Aus diesem Grund wurde eine zweite *p*-Nitrophenylgruppe in den Substituenten an Position 6 des 1,2,4-Trioxanrings eingeführt (Abbildung 26). Die Synthese solcher vinyl-aryl-substituierter 1,2,4-Trioxane ist literaturbekannt, ebenso wie ihre Wirkung gegen Plasmodien in Mäusen.^[100] Neu ist die 4-Nitrosubstitution am aromatischen Rest. Die Synthese-Übersicht wird in Abbildung 26 gegeben.

Im ersten Schritt wurde 4-Nitroacetophenon **18** in einer lösungsmittelfreien *Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)* Reaktion mit einer Ausbeute von 58% zu Verbindung **19** umgesetzt.^[101] Als Katalysator wurde 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en/Caesiumcarbonat (DBU/CsCO₃) eingesetzt, was zu einer sehr hohen *E*-Selektivität der Reaktion führte. Über NMR-Analytik

konnte das *Z*-Isomer nicht nachgewiesen werden, lediglich bei dünnschichtchromatographischer Auftrennung waren mögliche Spuren zu erkennen.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung und vollständiger Abtrennung des *Z*-Isomers wurde versucht, den Ester **19** mit Natriumborhydrid zum allylischen Alkohol **20** zu reduzieren. Allerdings konnte mit NaBH₄ keine Reaktion beobachtet werden, sodass die Reaktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) in wasserfreiem THF durchgeführt wurde. Mit DIBAL-H wurde der Ester selektiv zum Alkohol reduziert. Dies wurde durch NMR- und IR-Analytik bestätigt.

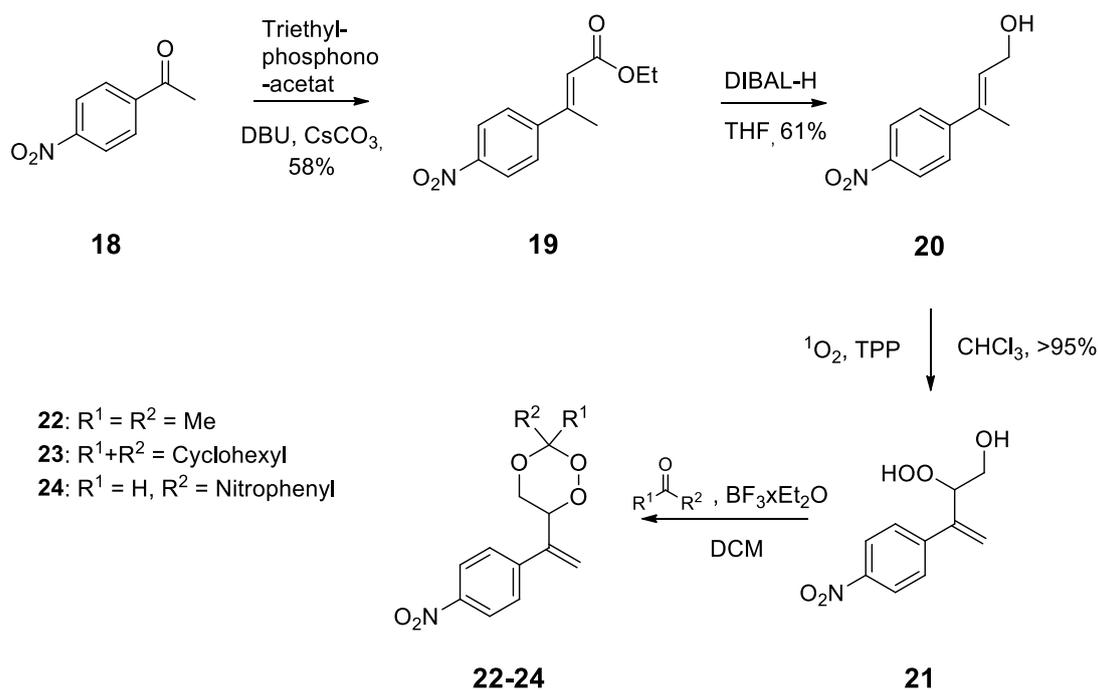


Abbildung 26 Synthese 6-vinyl-aryl-substituierter 1,2,4-Trioxane.

Es wurde ein größerer Ansatz von Verbindung **20** mit Singulett-Sauerstoff photooxygeniert, da das Hydroperoxid **21** mit verschiedenen Aldehyden und Ketonen umgesetzt werden sollte. Der Größe des Ansatzes geschuldet, wurde die Reaktion in nicht deuteriertem Chloroform durchgeführt. Die Wahl des Lösungsmittels, die Größe des Reaktionsansatzes und die deaktivierenden Eigenschaften der Nitrophenylgruppe führten zu einem sehr langsamen Reaktionsverlauf. Die Belichtung, welche über ¹H-NMR verfolgt wurde, bis keine Ausgangsverbindung mehr nachweisbar war, dauerte 7 Tage. Dabei waren im ¹H-NMR Verunreinigungen zu erkennen, die entweder auf Nebenreaktionen oder auf den einsetzenden Zerfall des Hydroperoxids zurück zu führen sind. Aufgrund der Instabilität von Hydroperoxiden wurde dennoch ohne weitere Aufreinigung peroxyacetalisiert. Die Peroxyacetalisierung wurde BF₃·Et₂O-katalysiert in Dichlormethan bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch, nachdem überschüssiges Aldehyd oder Keton entweder am Rotationsverdampfer entfernt wurde oder mittels gesättigter NaHSO₃-Lösung abgetrennt wurde. Die Ausbeuten sind

mit 2 – 23% für den Acetalisierungsschritt mäßig bis schlecht, was höchstwahrscheinlich an den während der Photooxygenierung entstandenen Verunreinigungen des Hydroperoxids liegt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wiesen die charakteristischen Signale des 3,6-disubstituierten 1,2,4-Trioxanrings auf. Zusätzlich konnten die Verbindungen über IR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert werden.

3.1.4 Synthese des 1,3-Dioxans **32**

Um zu ermitteln, ob der 1,2,4-Trioxanring für die biologische Aktivität der Verbindung **16b** notwendig ist, sollte eine Verbindung mit gleichem Substitutionsmuster aber mit einem zentralen 1,3-Dioxanring synthetisiert werden (Verbindung **26**, Abbildung 27B). Ausgehend vom Allylalkohol **14** (siehe 3.1.2) wurde versucht, Formaldehyd zu addieren, um das Diol **25** zu erhalten (Abbildung 27A). Dabei wurde unter verschiedenen Bedingungen, wie Temperatur- und Lösungsmittelvariation, sowohl Phasentransferkatalyse mit wässriger Formaldehyd-Lösung als auch Umsetzung mit Paraformaldehyd versucht, jedoch konnte das Diol **25** nicht isoliert werden.^[102]

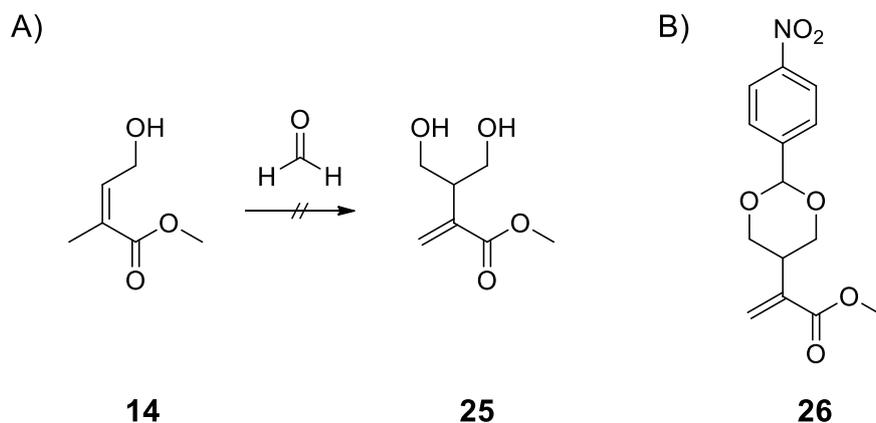


Abbildung 27 A) Syntheschema der potentiellen Addition von Formaldehyd an den Allylalkohol **14** B) Struktur eines 1,3-Dioxan analog zu dem 1,2,4-Trioxan **26**.

Aus diesem Grund wurde alternativ versucht ein 1,3-Dioxan mit 2,4-Substitutionsmuster zu synthetisieren (Verbindung **32**, Abbildung 28). Der Syntheseweg ist analog zu den Synthesen von 1,2,4-Trioxepanen, welche bereits von *Viktor Schlundt* beschrieben wurden, nur dass vor dem letzten Acetalisierungsschritt das photochemisch generierte Hydroperoxid **30** zum Alkohol **31** reduziert wird.^[103]

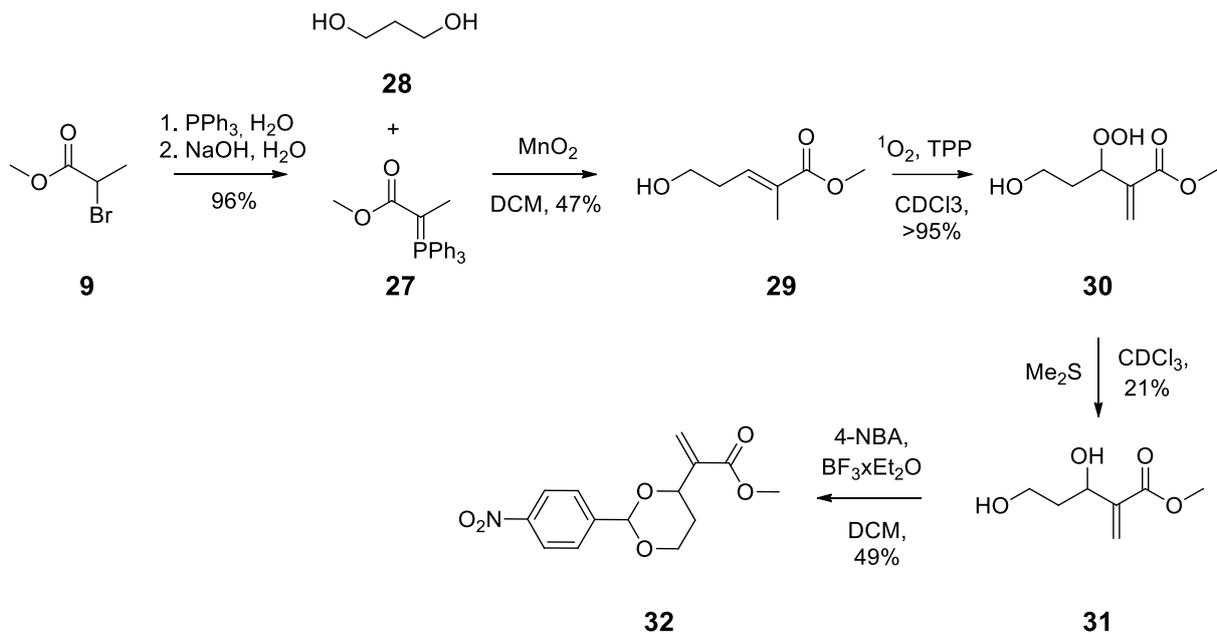


Abbildung 28 Syntheseweg des 1,3-Dioxans **32**.

Im ersten Schritt wurde Methyl-2-brompropionat **9** mit Triphenylphosphan in wässriger Lösung umgesetzt und anschließend *in situ* mit Natriumhydroxid zum entsprechenden Ylen **27** deprotoniert. Die Umsetzung erfolgte nahezu quantitativ. Eine Aufreinigung des Ylens **27** vor der folgenden *Wittig*-Reaktion war nicht erforderlich.

Das Ylen **27** wurde in Dichlormethan mit 1,3-Propandiol **28** und einem 18-fachen Überschuss an aktiviertem Mangandioxid zum Alkohol **29** umgesetzt. Nach der Reaktion konnte überschüssiges Mangandioxid abfiltriert werden und das Produkt nach Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 47% erhalten werden.

Wie zuvor beschrieben wurde die Photooxygenierung in deuteriertem Chloroform mit TPP als Photosensibilisator durchgeführt. Das Hydroperoxid **30** wurde dabei ohne nennenswerte Verunreinigung quantitativ gebildet. Ohne weitere Aufreinigung wurde zu dem Photooxygenierungsprodukt **30** ein 10-facher Überschuss Dimethylsulfid gegeben, um das Hydroperoxid **30** zum Diol **31** zu reduzieren. Nach Säulenchromatographie zeigte das Signal des Kohlenstoffs, an dem zuvor das Hydroperoxid gebunden war, im ^{13}C -NMR-Spektrum einen 10 ppm-Shift zu höherem Feld, was darauf schließen lässt, dass die Reduktion erfolgreich war.

Im letzten Schritt wurde das Diol **31** zum 1,3-Dioxan **32** acetalisiert. Die Durchführung erfolgte analog zu den Peroxyacetalisierungen der Hydroperoxide $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -katalysiert unter inerten Bedingungen in Dichlormethan. Als Aldehyd wurde 4-NBA eingesetzt, um eine möglichst hohe Strukturähnlichkeit zum 1,2,4-Trioxan **16b** zu gewährleisten. Nach Aufreinigung wurde das 1,3-Dioxan **32** mit 49% Ausbeute isoliert. Diese gute Ausbeute ist wahrscheinlich durch den Aufreinigungsschritt zwischen Reduktion und Acetalisierung bedingt. Die vorgelagerte Reduktion des Hydroperoxids **30** liefert allerdings nur 21% Ausbeute, sodass die Gesamtausbeute

von Photooxygenierung, Reduktion und Acetalisierung bei nur 10% liegt. Verglichen mit der Synthese von 1,2,4-Trioxan **16b**, bei der Photooxygenierung und Peroxyacetalisierung mit einer Ausbeute von 28% durchgeführt wurden, ist die Ausbeute somit eher gering.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 1,3-Dioxans **32** tritt das charakteristische Singulett des sich durch die Acetalisierung an Position 2 des Dioxanrings befindenden Wasserstoffatoms bei 5.70 ppm auf. Reinheit und Identität des Moleküls **32** wurden durch NMR, IR und Elementaranalyse belegt.

3.1.5 Synthese von den 1,2,4-Trioxanen mit Phenyl- und Benzylestersubstituenten **33c – 42c** und **46c**

Nachdem der Substituent in 3-Position des 1,2,4-Trioxans mit Einfügen der *p*-Nitrophenylgruppe ausreichend optimiert worden war und eine α,β -ungesättigte Estergruppe in 6-Position des 1,2,4-Trioxans als positiver Einfluss auf die GSTP1-Inhibition identifiziert worden war, wurde die Alkoholkomponente des Esters variiert. Der Methylester der Verbindung **16b** (vgl. 3.1.2) wurde durch verschiedene Phenolderivate und Benzylalkohol ersetzt. Die Synthese dieser 1,2,4-Trioxane mit α,β -ungesättigtem aromatischen Ester kann über direkte Veresterung der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (Synthese vgl. 3.1.2) mit Phenolen oder anderen Alkoholen gefolgt von Photooxygenierung und Peroxyacetalisierung erfolgen. Die Synthese dieser 1,2,4-Trioxane wurde erstmals 2013 von *Griesbeck et al.* beschrieben.^[95b] Die Retrosynthese ist in Abbildung 29 dargestellt.

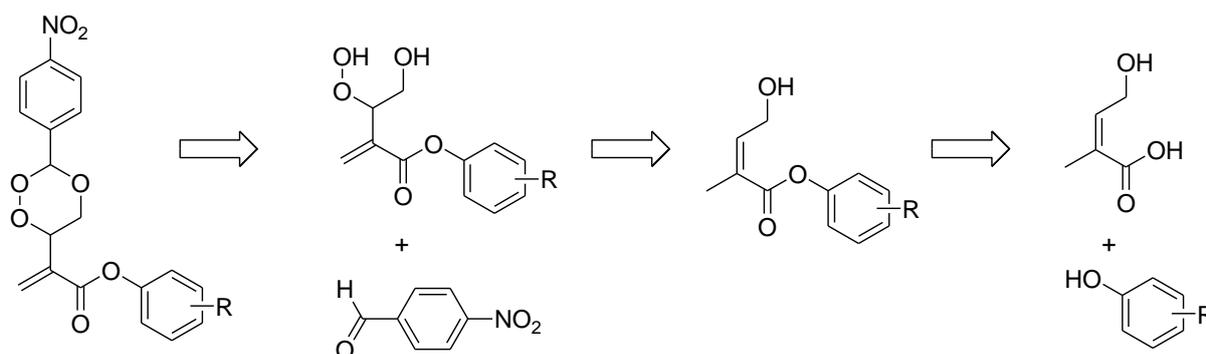


Abbildung 29 Retrosynthese von 1,2,4-Trioxanen mit α,β -ungesättigter aromatischer Esterfunktion.

Der erste Schritt dieser Syntheseroute, die Substratsynthese für die Photooxygenierung, ist die *Steglich*-Veresterung verschiedener Phenolderivate und Benzylalkohol mit 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13**. Als Kupplungsreagenzien wurden dafür jeweils in Kombination *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) eingesetzt (Abbildung

30). Die Reaktion wurde inert in Dichlormethan durchgeführt und der Verlauf der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

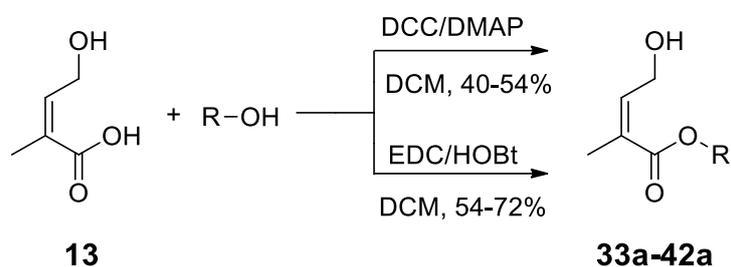


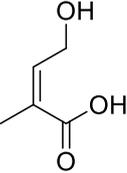
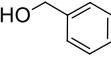
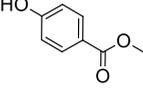
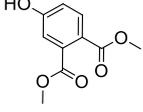
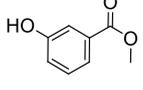
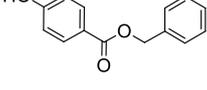
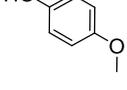
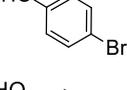
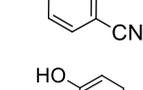
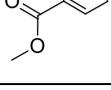
Abbildung 30 Synthese der Substrate **33a - 42a** mittels EDC/HOBt oder DCC/DMAP Kupplung.

Bei den Veresterungen, die mit DCC durchgeführt wurden, konnte nach Beendigung der Reaktion der entstandene, schwer lösliche *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert werden, bevor das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt wurde. Da sich die vollständige Abtrennung des *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs auch durch Säulenchromatographie als schwierig erwies, wurden die Substrate teilweise noch mit leichten Verunreinigungen photooxygeniert.

Bei Kupplungen mit EDC entsteht ein wasserlösliches Harnstoffderivat, das vor der säulenchromatographischen Aufreinigung durch Extraktion abgetrennt werden konnte.

Tabelle 2 gibt Aufschluss über die Strukturen und die Ausbeuten der Verbindungen **33a - 42a** und mit welchem Reagenz die Verbindungen dargestellt wurden.

Tabelle 2 Synthetisierte 4-Hydroxy-2-methylcrotonsäureester **33a** - **42a** mit Syntheseausbeute und verwendetem Kupplungsreagenz.

Säurekomponente	Verbindung	Alkoholkomponente	Ausbeute	Kupplungsreagenzien
	33a		40%	DCC/DMAP
	34a		46%	DCC/DMAP
	35a		40%	DCC/DMAP
	36a		45%	DCC/DMAP
	37a		40%	DCC/DMAP
	38a		54%	DCC/DMAP
	39a		72%	EDC/HOBt
	40a		54%	EDC/HOBt
	41a		66%	EDC/HOBt
	42a		-	DCC/DMAP

Die Ausbeuten der Veresterung waren moderat bis gut. Dabei waren die Ausbeuten, wenn DCC/DMAP genutzt wurde, im Durchschnitt etwas geringer als bei den Kupplungen, die mit EDC/HOBt durchgeführt worden sind.

Alle aromatischen 4-Hydroxy-2-methylcrotonsäureester wurden über ^1H - und ^{13}C -NMR charakterisiert.

Die Hydroxybenzoesäuremethylester, die für die Synthese der Verbindungen **36a**, **37a** und **42a** eingesetzt wurden, wurden zuvor durch Methylierung der entsprechenden Hydroxybenzoesäuren dargestellt. Die Veresterung erfolgte mit Sulfurylchlorid in Methanol und 2 h Erhitzen unter Rückfluss. Die Umsetzung war bei allen drei Reaktionen nahezu quantitativ, sodass die Produkte nur mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen wurden, um mögliche Reste der freien Säure zu entfernen. Eine weitere Aufreinigung war nicht mehr nötig.

Sterisch anspruchsvollere Phenolderivate konnten nicht mit DCC/DMAP oder EDC/HOBt an 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** gekuppelt werden. So zeigte Salicylsäuremethylester bei der Umsetzung mit DCC/DMAP und 4-Hydroxy-2-methylcrotonsäure **13** keine Reaktion. Als Alternativroute, um die entsprechenden aromatischen Ester für die Photooxygenierungen zugänglich zu machen, wurde erneut der Umweg über eine *Wittig*-Reaktion mit anschließender Reduktion gemacht (vgl. 3.1.2). Abbildung 31 zeigt diese Syntheseroute am Beispiel von Verbindung **46a**. Dieser Syntheseweg wurde mit drei verschiedenen Phenolderivaten durchgeführt, um die Produkte **35a**, **42a** und **46a** darzustellen.

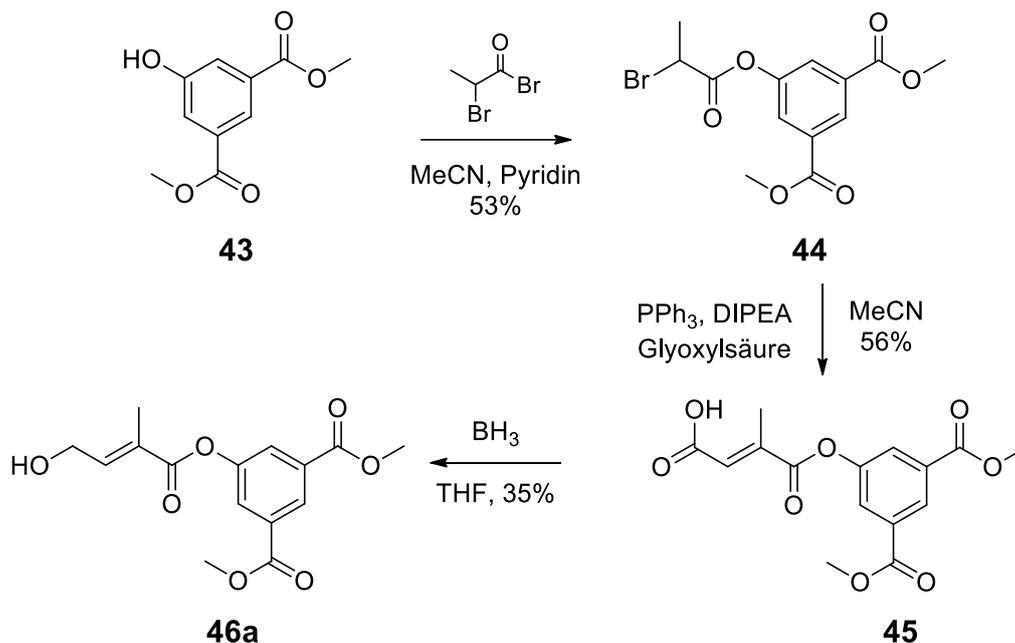


Abbildung 31 Syntheseweg sterisch anspruchsvoller aromatischer 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäureester am Beispiel der Verbindung **46a** über eine Acylierung gefolgt von einer *Wittig*-Reaktion und Reduktion mit BH_3 .

Im ersten Schritt wurde das entsprechende Phenol mit 2-Brompropansäurebromid acyliert. Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre in Acetonitril mit Pyridin als Base durchgeführt. Die Ausbeuten nach säulenchromatographischer Aufreinigung lagen bei 53 bis 79%.

Im nächsten Schritt wurde eine Eintopf-*Wittig*-Reaktion durchgeführt, bei der zuerst das Ylid *in situ* aus dem Acylierungsprodukt und Triphenylphosphan hergestellt wurde, welches dann durch Zugabe von DIPEA und Glyoxylsäure zum entsprechenden Olefin umgesetzt werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte durch fraktionierende Extraktion bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Ausbeuten lagen bei 28 bis 67%. Eine weitere Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie war nicht notwendig.

Die Olefine wurden über ^1H - und ^{13}C -NMR charakterisiert. Dabei ist besonders das Proton in α -Stellung zur neu in das Molekül eingeführten Carbonsäuregruppe bei ca. 7 ppm im ^1H -NMR-Spektrum charakteristisch.

Bis auf geringe Lösungsmittelrückstände waren in den NMR-Spektren keine nennenswerten Verunreinigungen zu sehen.

Im letzten Schritt wurde die Säurefunktion der Olefine zum gewünschten Alkohol reduziert. Als Reduktionsmittel wurde BH_3 eingesetzt. Die Reaktion wurde in THF unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Die Produkte wurden säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Ausbeuten lagen zwischen 33 und 40%.

Die Signale im ^1H - und ^{13}C -Spektrum der Verbindung **35a**, die über die Reduktion mit BH_3 dargestellt wurde, stimmten mit den NMR-Spektren der über die *Steglich*-Veresterung synthetisierten Verbindung **35a** überein. Auch die Verbindungen **42a** und **46a** wurden über ^1H - und ^{13}C -Spektren charakterisiert. Die Verbindungen wiesen keine Verunreinigungen auf.

Tabelle 3 Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte und Gesamtausbeute für die Darstellung der Photooxygenierungs-substrate über Acylierung gefolgt von *Wittig*-Reaktion und Reduktion mit BH_3 .

Verbindung	Ausbeute Acylierung	Ausbeute Wittig	Ausbeute Reduktion	Gesamt- ausbeute
35a	76%	67%	33%	17%
42a	79%	28%	40%	9%
46a	53%	56%	35%	10%

Tabelle 3 zeigt, dass die Gesamtausbeuten der Synthese bei nur 9 bis 17% lagen und damit deutlich geringer waren als die Ausbeuten der *Steglich*-Veresterung. Verbindung **35a** wurde sowohl über *Steglich*-Veresterung als auch über den Alternativweg synthetisiert und kann daher herangezogen werden, um die Ausbeuten beider Synthesewege direkt miteinander zu vergleichen. Es zeigt sich, dass die Veresterung mehr als doppelt so hohe Ausbeuten lieferte. Zudem ist der Umweg über die *Wittig*-Reaktion deutlich zeit- und kostenintensiver als die *Steglich*-Veresterung. Somit bietet diese Syntheseroute zwar die Möglichkeit, Ester darzustellen, die sonst nicht zugänglich sind, aber der Einsatz sollte sich aus oben genannten Gründen auf diese sterisch anspruchsvollen Ester beschränken.

Die Photooxygenierung der Substrate **33a** - **42a** und **46a** zu den entsprechenden Hydroperoxiden wurde vollständig in deuteriertem Chloroform durchgeführt. Als Photosensibilisator wurde dabei wiederum TPP eingesetzt (Abbildung 32).

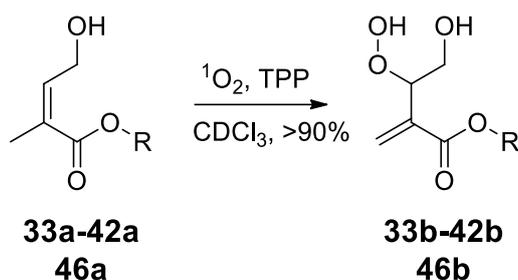


Abbildung 32 Photooxygenierung der aromatischen 4-Hydroxy-2-methylcrotonsäureester **33a - 42a** und **46a**.

Die Belichtungszeiten der Reaktionen variierten von 8 bis 24 h. Es wurde solange photooxygeniert, bis im $^1\text{H-NMR}$ mindestens 90% Umsatz zu sehen war (Tabelle 4). Allerdings ist die Reaktionsdauer nicht nur abhängig von den Eigenschaften des Substrats, sondern wird auch durch die Ansatzgröße, die Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel und die Distanz zur Lichtquelle beeinflusst. Ein Vergleich der Reaktionszeiten der verschiedenen Substrate ist deshalb nur schwer möglich. Die Reaktionen wurden vollständig in deuteriertem Chloroform durchgeführt, um den Isotopeneffekt des Lösungsmittels zu nutzen, der die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff verlängert und die Reaktionszeit so verkürzt.^[87] Darüber hinaus zeigte sich, dass leichtes Ansäuern des Chloroforms und der damit einhergehende Farbumschlag des TPPs von violett nach grün aufgrund der Protonierung des Sensibilisators zu deutlich schnelleren Reaktionsabläufen führte.

Über NMR-Analytik kann die Entstehung der Hydroperoxide sehr gut verfolgt werden. Besonders charakteristisch sind dabei das Wegfallen des Signals der Methylgruppe bei ca. 2 ppm und die entstehenden diastereotopen Protonen der neugebildeten terminalen Doppelbindung. Diese treten im $^1\text{H-NMR}$ als zwei charakteristische Singulett-Signale bei ca. 6.2 und 6.7 ppm auf (Tabelle 4).

Teilweise sind Verunreinigungen in den $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der Photooxygenierungen zu sehen. Ein Grund dafür können ablaufende Nebenreaktionen sein. Bei allen Substraten gibt es zwei potentiell reaktive Protonen, allerdings sollte durch den geminalen Effekt bevorzugt die Methylgruppe in β -Position der Carbonylfunktion reagieren. Das Entstehen geringer Mengen an Nebenprodukten ist jedoch nicht auszuschließen. Zusätzlich könnten vor allem bei langen Belichtungszeiten Zerfallsprodukte entstehen. Eine säulenchromatographische Aufreinigung der entstehenden Verbindungen **33b - 42b** und **46b** ist aufgrund der Instabilität der Hydroperoxidfunktion nicht möglich. Es wurden deshalb keine Ausbeuten bestimmt und die Produkte, trotz Verunreinigungen, peroxyacetalisiert.

Tabelle 4 Reaktionszeiten der Photooxygenierung und $^1\text{H-NMR}$ -Signale der charakteristischen Protonen der endständigen Doppelbindung der Verbindungen **33b** – **42b** und **46b**.

Verbindung	Reaktionsdauer (> 90% Umsatz)	$\delta^{[a]}$
		$\underline{\text{H}_2\text{C}=\text{C}}$ (ppm)
33b	15 h	6.02, 6.51 (m)
34b	23 h	6.21, 6.70
35b	13 h	6.21, 6.69
36b	14 h	6.20, 6.68
37b	17 h	6.20, 6.67
38b	12 h	6.22, 6.71
39b	14 h	6.18, 6.67
40b	15 h	6.17, 6.64
41b	8 h	6.18, 6.63
42b	24 h	6.19, 6.70
46b	18 h	6.24, 6.71

[a] Die NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform aufgenommen, das Lösungsmittelsignal diente als interner Standard; ^1H -Spektren wurden bei 300 MHz aufgenommen.

Im letzten Schritt der Synthese wurden die Hydroxyhydroperoxide **32b** - **42b** und **46b** zu den entsprechenden 1,2,4-Trioxanen **32c** - **42c** und **46c** peroxyacetalisiert. Die Reaktion wurde Lewis-Säure-katalysiert mit $\text{BF}_3 \cdot \text{xEt}_2\text{O}$ in Dichlormethan durchgeführt (Abbildung 33). Alle Hydroperoxide wurden mit 4-NBA peroxyacetalisiert, um den Effekt der Estervariation auf die biologische Aktivität untersuchen zu können.

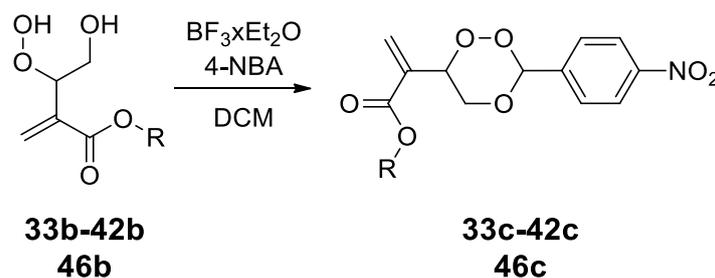


Abbildung 33 Peroxyacetalisierung der Hydroperoxide **33b-42b** und **46b**.

Die Produkte wurden, nach Abtrennung des 4-NBA mit NaHSO_3 -Lösung, säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Ausbeuten der Peroxyacetalisierung liegen zwischen 8 und 34%, sind also schlecht bis moderat (Tabelle 5). Entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute hat vor allem die Reinheit der eingesetzten Hydroperoxide. Entstehen bereits während der Photooxygenierung Nebenprodukte oder Verunreinigungen, wirkt sich das auf die Ausbeute der Peroxyacetalisierung aus. Darüber hinaus ist es möglich, dass bei der Acetalisierung

Diastereomere entstehen, da ein neues stereogenes Zentrum am 1,2,4-Trioxan gebildet wird und die Substrate bereits ein stereogenes Zentrum beinhalten. Die Kristallstruktur von Verbindung **35c** ist in Abbildung 34 dargestellt und beweist die relative Konfiguration des Hauptdiastereoisomers.



Abbildung 34 Kristallstruktur des 1,2,4-Trioxans **35c**.

Die einzige Verbindung dieser Serie an 1,2,4-Trioxanen, die vor dieser Arbeit literaturbekannt war, ist der Benzylester **33c**. Die in der Literatur angegebene Ausbeute liegt bei 57%.^[95b] Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten stimmen für diese Verbindung mit der Literatur überein.

Auch die Phenolesterderivate wurden über ^1H - und ^{13}C -NMR charakterisiert. Zusätzlich wurden Elementaranalysen, IR- und MS- Analytik durchgeführt, um die neuen Verbindungen zu charakterisieren und deren Reinheit zu gewährleisten. Die Peroxyacetalisierung kann in den NMR-Spektren besonders gut nachvollzogen werden, da die neuentstandene Acetalgruppe besonders prägnant ist. Der tertiäre Kohlenstoff an der 3-Position des Trioxanrings, d.h. das Zentrum des Acetals, erscheint bei 102.8 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum. Der daran gebundene Wasserstoff erscheint als Singulett im ^1H -NMR-Spektrum bei 6.20 bis 6.30 ppm (Tabelle 5).

Tabelle 5 Übersicht über die Ausbeuten der Peroxyacetalisierung und die charakteristischen NMR-Signale des Acetalkohlenstoffs der 1,2,4-Trioxane **33c** - **42c** und **46c**.

Verbindung	Ausbeute	δ (OCHO) ^[a]	
		¹ H-NMR (ppm)	¹³ C-NMR (ppm)
33c	15%	6.27	102.5
34c	19%	6.20	102.6
35c	34%	6.28	102.8
36c	8%	6.27	102.8
37c	21%	6.29	102.8
38c	30%	6.29	102.8
39c	17%	6.28	102.6
40c	15%	6.28	102.8
41c	20%	6.31	102.7
42c	28%	6.30	102.8
46c	31%	6.28	102.8

[a] Die NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform aufgenommen, das Lösungsmittelsignal diente als interner Standard; ¹H-Spektren wurden bei 300 MHz und ¹³C-Spektren bei 75 MHz aufgenommen.

3.2 Glutathion-Transferase-Inhibitionsassay

Die unter 3.1 synthetisierten Verbindungen wurden an Glutathion-Transferasen auf Enzyminhibition mithilfe eines spektrophotometrischen Assay getestet.^[104] Der Assay beruht auf der enzymkatalysierten Reaktion von L-Glutathion mit 2,4-Dinitrochlorbenzol (CDNB) (vgl. 6.1.2). Das Produkt dieser Reaktion absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messung erfolgte zeitabhängig, wobei die Zunahme der Absorption proportional zur Enzymaktivität war. Ein GST-Inhibitor verringerte demnach die Zunahme der Absorption.

Anfangs wurden alle Inhibitoren an kommerziell erhältlicher humaner plazentaler GST (hpGST) getestet, da diese kinetisch und physikochemisch dieselben Eigenschaften aufweist wie GSTP1, die in Tumorzellen überexprimiert wird.^[105]

Um aktive Inhibitoren auf Selektivität hin testen zu können, wurden zusätzlich Experimente mit anderen GST-Klassen, die rekombinant exprimiert wurden, durchgeführt (Kapitel 3.2.10).

Bei dem Assay handelt es sich um ein sogenanntes „label-free“-Detektionsverfahren, welches ohne die Markierung der Assaybestandteile durch z.B. Fluoreszenzfarbstoffe auskommt und damit kosteneffizient ist. Außerdem erlaubt ein solches Verfahren die Messung am nativen Enzym.^[106]

3.2.1 Validierung des Assays

Die Etablierung des GST-Inhibitionsassays erfolgte in der Arbeitsgruppe *Pietsch* (Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln), bevor die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation begonnen wurden. Die Dissoziationskonstanten (K_s) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) wurden sowohl für CDNB als auch für GSH an hpGST bestimmt. Es wurden K_s -Werte anstelle von Michaelis-Konstanten ermittelt, da die Interaktion von CDNB und GSH mit GSTP1 unter Gleichgewichtsbedingungen abläuft und nicht mit Steady-State zu erklären ist.^[107] Auch für die in Kapitel 3.2.10 aufgeführten GSTA1 und GSTM2 wird von Gleichgewichtsbedingungen ausgegangen, da kaum Informationen in der Literatur zu der Kinetik dieser Enzyme vorliegt. Die Bestimmung der K_s -Werte und Michaelis-Konstanten ist jedoch identisch.

Der V_{max} -Wert gibt die maximal erreichbare Umsatzgeschwindigkeit bei einer fixen Enzymkonzentration an.

Darüber hinaus wurde der literaturbekannte GSTP1 Inhibitor Etacrynsäure **47** zur Evaluierung des Assays genutzt.

Der Assay wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe *Teusch* (Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Technische Hochschule Köln, TH) etabliert und miniaturisiert (vgl. 3.2.12). Die graphische Darstellung der K_s - Bestimmung für beide Substrate ist in Abbildung 35 gezeigt.

Die Gesamtgeschwindigkeit V_G (●), die sowohl die enzymatische als auch die nichtenzymatische Reaktion (V_{NE}) umfasst, und die nichtenzymatische Reaktion (■) sind aufgetragen. Wird V_{NE} von V_G subtrahiert, erhält man den Wert für die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit V_E . Alle Experimente wurden bei einer Enzymkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Die Bestimmung des K_S -Werts für CDNB erfolgte bei einer fixen GSH-Konzentration von 5 mM. Bei dieser Konzentration befindet sich das Enzym bereits im Sättigungsbereich für GSH, damit ist die Umsatzgeschwindigkeit nahezu unabhängig von der GSH-Konzentration. Für die K_S -Wert-Bestimmung von GSH wurde eine CDNB-Konzentration von 1 mM gewählt, was der schlechten Löslichkeit von CDNB unter den beschriebenen Assaybedingungen geschuldet ist.

Aus diesem Experiment ergab sich ein K_S -Wert für CDNB von 1.06 ± 0.06 mM und ein K_S -Wert für GSH von 0.65 ± 0.04 mM. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM). Für V_{\max}^{CDNB} wurde ein Wert von 1.94 ± 0.11 mOD ml s^{-1} μg^{-1} (MW \pm SEM) ermittelt, für V_{\max}^{GSH} ein Wert von 0.94 ± 0.04 mOD ml s^{-1} μg^{-1} (MW \pm SEM).

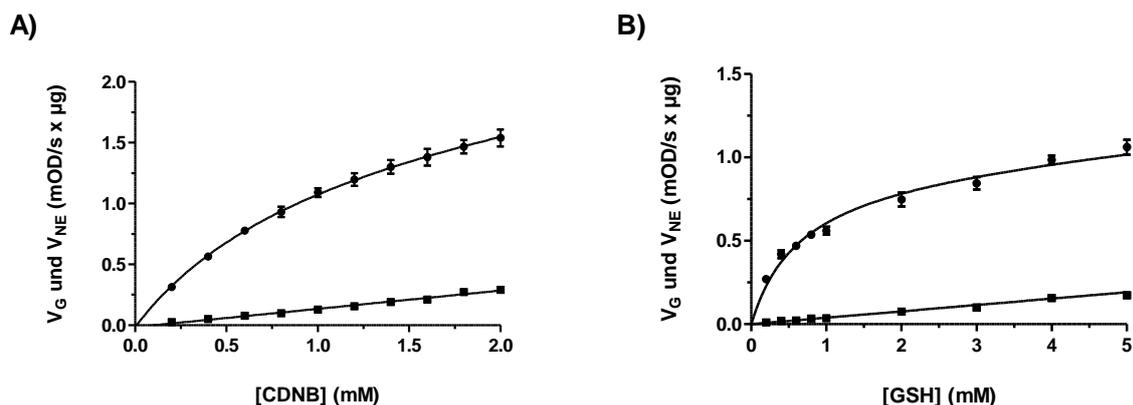


Abbildung 35 Graphische Darstellung der Bestimmung von K_S und V_{\max} an hpGST für die Substrate **A)** CDNB und **B)** GSH. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$) der Gesamtgeschwindigkeit V_G (●) und der nichtenzymatischen Reaktion V_{NE} (■). Die Experimente wurden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ hpGST durchgeführt. Für die Charakterisierung von CDNB wurde 5 mM GSH verwendet, für jene von GSH 1 mM CDNB.

In Tabelle 6 sind die K_S - und V_{\max} -Werte beider Substrate von den Bestimmungen am Institut für Pharmakologie und an der TH Köln zusammengefasst und mit Literaturwerten verglichen. Die K_S^{CDNB} -Werte waren sehr stabil. Beide Bestimmungen wichen nur 0.08 mM von dem in der Literatur angegebenen Wert ab, obwohl der Literaturwert bei 2.5 mM GSH und 25 °C statt 37 °C ermittelt wurde.^[108]

Die ermittelten K_S^{GSH} -Werte lagen ebenfalls im Bereich des Literaturwerts. Allerdings war der an der TH Köln ermittelte Wert etwas erhöht. Das bedeutet, die Affinität von GSH zur hpGST war unter diesen Assaybedingungen etwas geringer als in der Literatur beschrieben.

Die V_{\max} -Werte können nur schwer miteinander verglichen werden, da sie von der eingesetzten Enzymmenge abhängen.

Tabelle 6 Vergleich der K_s - und V_{max} -Werte für CDNB und GSH an hpGST ermittelt an der TH Köln mit dem Tecan Infinite M100pro und am Institut für Pharmakologie mit dem BioTek Synergy™ 2 mit Literaturwerten. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 3 - 5)

	K_s^{CDNB} (mM)	K_s^{GSH} (mM)	V_{max}^{CDNB} (mOD ml s ⁻¹ μg^{-1})	V_{max}^{GSH} (mOD ml s ⁻¹ μg^{-1})
TH Köln	1.06 \pm 0.06	0.65 \pm 0.04	1.94 \pm 0.11	0.94 \pm 0.04
Institut für Pharmakologie^[a]	0.90 \pm 0.08	0.52 \pm 0.04	1.39 \pm 0.10	0.67 \pm 0.02
Literatur^[108]	0.98 \pm 0.06	0.45 \pm 0.05	-	-

[a] Die Werte wurden von *Miriam Sheikh* ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde der IC_{50} -Wert (die Inhibitorkonzentration bei der die halbmaximale Enzymhemmung erreicht ist) von Etacrynsäure **47** ermittelt. Etacrynsäure (Abbildung 36A) ist ein reversibler Inhibitor, der unselektiv verschiedene GST-Klassen hemmt.^[43] Etacrynsäure **47** wurde als Schleifendiuretikum entwickelt, die Wirkung gegen verschiedene GST-Klassen wurde aber schon in den 1980er Jahren entdeckt.^[42]

Es ist bekannt, dass Etacrynsäure **47** nicht nur verschiedene GST-Klassen hemmt, sondern auch selbst Substrat von GSTs ist. Durch die enzymkatalysierte Bindung von Etacrynsäure **47** an GSH entsteht ein Produkt, das seinerseits ebenfalls GSTs inhibieren kann.^[44a]

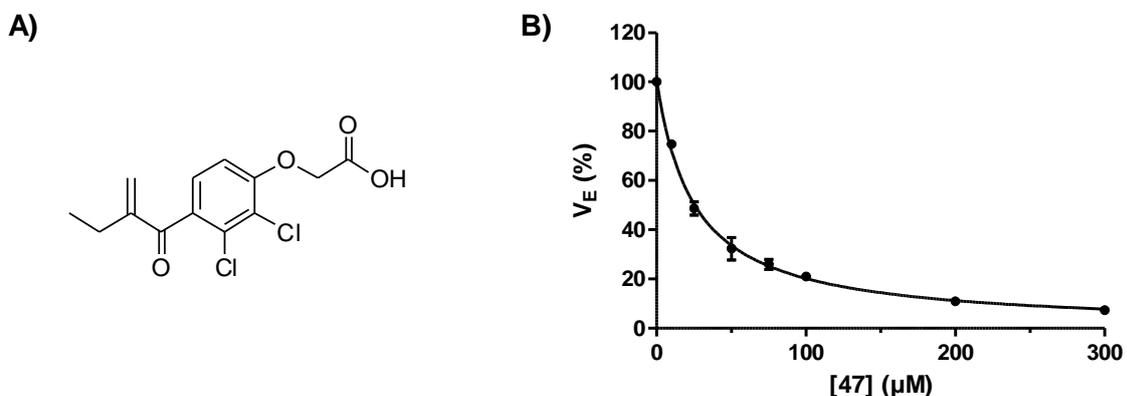


Abbildung 36 A) Strukturformel von Etacrynsäure **47 B)** Inhibition von hpGST durch Etacrynsäure **47**. Abgebildet ist MW \pm SEM (n = 3). Die Messung wurde mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hpGST; 1 mM CDNB, 1 mM GSH und 7 Inhibitorkonzentrationen im Bereich 10 – 300 μM durchgeführt.

In Abbildung 36 ist die Bestimmung des IC_{50} -Werts von Etacrynsäure **47** an der TH Köln dargestellt. Es wurde ein IC_{50} -Wert von $25.4 \pm 2.8 \mu\text{M}$ (MW \pm SEM, n = 3) ermittelt. Am Institut für Pharmakologie wurde für Etacrynsäure ein IC_{50} -Wert von $30.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ (MW \pm SEM, n = 3) bestimmt. Zwischen den Werten besteht kein statistisch signifikanter Unterschied (statistische Analyse mittels ungepaartem t-Test).

Die IC_{50} -Werte für Etacrynsäure **47**, die in der Literatur angegeben sind, schwanken stark. Allerdings wurden die Werte unter verschiedenen Bedingungen bestimmt, so wurde der Assay teilweise bei Raumtemperatur oder 30 °C, mit Ethanol anstelle von DMSO durchgeführt oder die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 270 nm. Die meisten Werte, die an hpGST oder GSTP1 gemessen wurden, liegen jedoch im Bereich von 10 μ M, sowohl für Etacrynsäure selbst als auch für das Etacrynsäure-GSH-Konjugat.^[43, 51, 109]

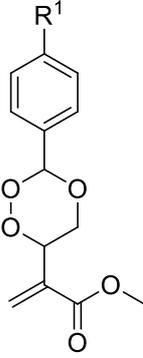
Die gemessenen Werte sind folglich zwei bis dreimal höher als die Literaturwerte. Dennoch bewegen sich die Werte immer noch im gleichen Konzentrationsbereich, so dass Etacrynsäure **47** als Positivkontrolle für den Assay valide ist. Die K_i -Werte für Etacrynsäure an hpGST werden in Kapitel 3.2.9 besprochen.

Zusammenfassend wurde der Assay mit der Bestimmung der K_s -Werte beider Substrate als auch dem IC_{50} -Wert von Etacrynsäure **47** erfolgreich etabliert. Die bestimmten Werte lagen im Bereich der Literaturangaben. Der Assay weist eine hohe Stabilität auf, da er an unterschiedlichen Geräten in verschiedenen Laboren reproduzierbar ist. Diese Robustheit ist ein Faktor, der die Qualität der folgenden Messergebnisse sicherstellt. Es steht somit ein valides System für die Suche nach neuen GST-Inhibitoren zur Verfügung.

3.2.2 Initiales 1,2,4-Trioxan-Screening

In einem ersten Screening wurde in der Arbeitsgruppe *Pietsch* eine Auswahl an 1,2,4-Trioxanen an hpGST getestet. Die Synthese der 1,2,4-Trioxane erfolgte durch *Lars Oliver Hoinck* (Arbeitsgruppe *Griesbeck*).^[99] *Miriam Sheikh* und *Rocky Aricioglu* führten die Messungen durch. Es wurden sowohl IC_{50} -Werte als auch die Dissoziationskonstanten (K_i -Werte) bestimmt. Die K_i -Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Verbindungen **16b** und **48 – 51** unterscheiden sich nur in Position 4 des Aryl-Substituenten.

Tabelle 7 K_i -Werte (μM) der Verbindungen **16b** und **48 - 51** bestimmt an hpGST. Es sind Mittelwerte \pm SEM angegeben. Alle Werte wurden von *Miriam Sheikh* und *Rocky Aricioglu* ermittelt.

	Compd	R ¹	$K_i^{\text{GSH[a]}}$	$K_i^{\text{CDNB}}, \alpha^{\text{[b]}}$
	16b	NO ₂	70.0 \pm 5.4	486 \pm 166, $\alpha = 0.395 \pm 0.106$
	48	F	110.6 \pm 3.5	755 \pm 176, $\alpha = 0.279 \pm 0.040$
	49	H	139.4 \pm 1.8	1578 \pm 651, $\alpha = 0.746 \pm 0.604$
	50	NC	92.4 \pm 1.9	628 \pm 190, $\alpha = 0.402 \pm 0.156$
	51	Cl	81.1 \pm 8.9	389 \pm 106, $\alpha = 0.567 \pm 0.169$

[a] Die Experimente wurden mit 1 mM CDNB durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Gleichung der parabolischen kompetitiven Hemmung (Gleichung 11). [b] Die Experimente wurden mit 5 mM GSH durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Gleichung der gemischten Hemmung (Gleichung 8).

Es zeigte sich, dass die Inhibitoren **16b** und **48 – 51** alle kompetitiv an der GSH-Bindungsstelle interagierten, wobei es sich um einen parabolischen Hemmmechanismus handelte. Diese Art der Hemmung wird unter 3.2.9 noch ausführlich erläutert, da sie für die GST-Hemmung durch 1,2,4-Trioxane charakteristisch zu sein scheint. An der Elektrophilen-Bindungstasche zeigte sich eine gemischte Hemmung mit ausgeprägter unkompetitiver Komponente ($0 < \alpha < 1$).

Die K_i -Werte für GSH lagen im oberen zweistelligen, bzw. niedrig dreistelligen mikromolaren Bereich. Dabei stellte sich heraus, dass Verbindung **49**, die keinen elektronenziehenden Substituenten in Position 4 trägt, die inaktivste Verbindung dieser Serie war. Dem gegenüber wirkten sich vor allem Nitro- und Chlor-Substitution positiv auf die inhibitorische Aktivität der 1,2,4-Trioxane aus. Der K_i -Wert der Verbindung **16b**, dem aktivsten Inhibitor dieser Serie, war um Faktor zwei niedriger als der K_i -Wert der Verbindung **49**.

Auch wenn die getesteten Verbindungen nur sehr schwache Inhibitoren sind, zeigte dieses initiale Screening, dass niedermolekulare 1,2,4-Trioxane in der Lage sind, hpGST zu inhibieren. Als erster Hinweis auf mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen kann gefolgert werden, dass Arylsubstituenten mit elektronenziehenden Substituenten, vor allem Nitrogruppen, in Position 3 des 1,2,4-Trioxanrings einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Substanzen haben.

In einem weiteren Screening wurden 1,2,4-Trioxansäuren an hpGST untersucht (Daten werden nicht gezeigt). Die Synthese wurde von *Viktor Schlundt* (Arbeitsgruppe *Griesbeck*) durchgeführt; die Testung erfolgte durch *Miriam Sheikh* und *Rocky Aricioglu*. Eine der 1,2,4-Trioxansäuren unterschied sich von der getesteten Verbindung **16b** lediglich durch eine freie

Carboxygruppe anstelle des Methylesters.^[95b] Diese Verbindung zeigte, trotz guter Wasserlöslichkeit und damit verbundenen hohen Testkonzentrationen, keine Hemmung an hpGST. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass eine Veresterung der α,β -ungesättigten Carboxygruppe für die Inhibition der hpGST durch 1,2,4-Trioxanderivate zwingend erforderlich ist.

3.2.3 Testung von Naturstoffen mit 1,2,4-Trioxanmotiv

Die Idee, niedermolekulare 1,2,4-Trioxane als GSTP1-Inhibitoren zu testen, basierte auf einer Veröffentlichung von *Mukanganyama et al.* aus dem Jahre 2002.^[74] In dieser Veröffentlichung wurden mehrere Wirkstoffe gegen Malaria als Inhibitoren für verschiedene GST-Klassen untersucht. Die Autoren geben den IC_{50} -Wert für den Naturstoff Artemisinin **52**, der einen 1,2,4-Trioxanring beinhaltet, mit $2 \mu\text{M}$ an rekombinanter humaner GSTP1 an. Aus diesem Grund wurden in dem unter 3.2.2 beschriebenen initialen Screening von 1,2,4-Trioxanen auch Artemisinin **52** und dessen Derivate Dihydroartemisinin **53** und Artesunat **54** an hpGST getestet. Die Strukturformeln der drei Artemisinin-derivate sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Testung dieser drei Derivate ergab jedoch keine Inhibition von hpGST bei Konzentrationen von bis zu $100 \mu\text{M}$.

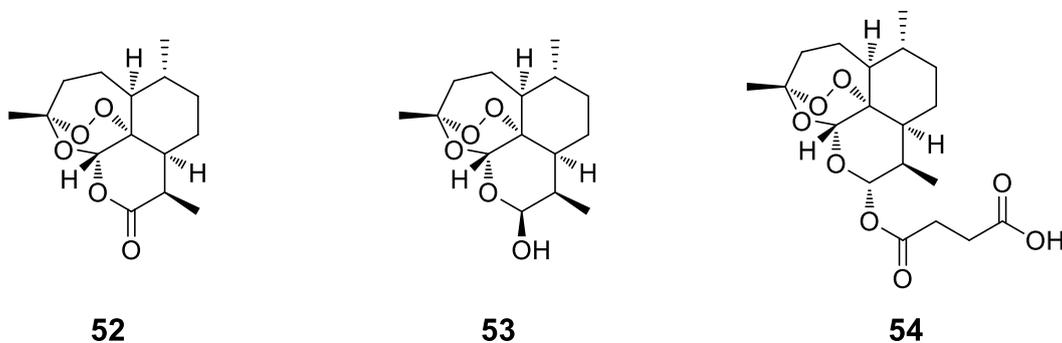


Abbildung 37 Struktur von Artemisinin **52**, Dihydroartemisinin **53** und Artesunat **54**.

Da in der Veröffentlichung von *Mukanganyama et al.* Artemisinin unter anderem an rekombinanter, humaner GSTP1 (rhGSTP1) aber auch an rhGSTA1 und rhGSTM2 getestet wurde, wurde die Untersuchung mit diesen rhGSTs wiederholt. Diese rekombinanten humanen GST-Klassen standen ebenfalls für die unter 3.2.10 beschriebene Selektivitätstestung zur Verfügung. Die Testung wurde bei $100 \mu\text{M}$ der entsprechenden Verbindung durchgeführt. Es wurden $1 \mu\text{g/ml}$ Enzym und je 1 mM GSH und CDNB eingesetzt. Die prozentuale enzymatische Restaktivität der drei GSTs in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ **52**, **53** bzw. **54** ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Restaktivität (%) von rekombinanter, humaner GSTP1, GSTA1 und GSTM2 in Anwesenheit von 100 μM Artemisinin **52**, Dihydroartemisinin **53** bzw. Artesunat **54**. Angegeben sind MW \pm SEM (n = 3). Die Messungen erfolgten bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB.

Verbindung	rhGSTP1	rhGSTA1	rhGSTM2
52	96.0 \pm 1.0%	64.2 \pm 2.5%	96.9 \pm 0.6%
53	97.7 \pm 1.9%	61.0 \pm 1.0%	100.0 \pm 0.4%
54	96.6 \pm 1.2%	89.5 \pm 3.0%	94.4 \pm 2.7%

An der rhGSTP1 und rhGSTM2 zeigten weder Artemisinin **52** noch dessen Derivate **53** und **54** eine Hemmung bei einer Konzentration von 100 μM . Lediglich rhGSTA1 wurde durch Artemisinin **52** und Dihydroartemisinin **53** bei 100 μM leicht inhibiert. Der durch *Mukanganyama et al.* berichtete IC_{50} -Wert an rhGSTA1 von 6 μM wurde jedoch nicht reproduziert.

Dass die von *Mukanganyama et al.* veröffentlichten Werte nicht reproduzierbar sind und Artemisinin wahrscheinlich kein GSTP1-Inhibitor ist, stellten *Hiller et al.* bereits im Jahr 2006 fest.^[110] Es scheint also nicht an den gewählten Assaybedingungen zu liegen, dass keine Inhibition von GSTP1 durch Artemisinin-derivate beobachtet wurde.

Auch wenn sich die ursprüngliche Idee, dass bei 1,2,4-Trioxanen ein Zusammenhang zwischen GSTP1-Hemmung und Aktivität gegen Malaria besteht, nicht bestätigt hat, so wurde dennoch mit dieser Substanzklasse ein neuer Strukturraum für GSTP1-Inhibitoren gefunden.

3.2.4 Testung von 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivaten

Fünf 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivate (**4** – **8**) wurden im GST-Inhibitionsassay an hpGST getestet. Die Synthese dieser Verbindungen sowie deren Strukturformeln können Kapitel 3.1.1 entnommen werden.

Die initiale Testung erfolgte bei einer Inhibitorkonzentration von 500 μM für die Substanzen **4** – **7**. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit unter den Assaybedingungen, wurde das Chlorphenylderivat **8** bei 50 μM getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Inhibition der hpGST durch die Verbindungen **4** – **8**. Dargestellt ist die Hemmung bei der höchsten testbaren Konzentration (MW \pm SEM, n = 3).

Verbindung	Inhibition (%)	Konzentration (μM)	IC_{50} (μM)
4	-0.843 \pm 1.935	500	-
5	6.14 \pm 3.22	500	-
6	6.75 \pm 5.64	500	-
7	40.6 \pm 3.4	500	731 \pm 72
8	3.11 \pm 0.14	50	-

Die Verbindungen **4** – **6** und **8** zeigten bei 50 bzw. 500 μM keine Inhibition der hpGST. Diese vier Verbindungen wurden nicht weiter charakterisiert.

Verbindung **7**, die in Position 3 des 1,2,4-Trioxanrings 4-nitrophenylsubstituiert ist, zeigte bei 500 μM eine Inhibition von $40.6 \pm 3.4\%$ (MW \pm SEM, n = 3) und ist damit deutlich aktiver als die anderen Substanzen dieser Serie. Der direkte Vergleich zwischen Verbindung **5**, die in Position 3 des 1,2,4-Trioxanrings einen Phenylsubstituenten trägt, und Verbindung **7** zeigt, dass die Nitrosubstitution des 3-Phenylsubstituenten einen entscheidenden Einfluss auf die Inhibition von hpGST durch 1,2,4-Trioxane hat.

Der IC₅₀-Wert von Verbindung **7** lag bei $731 \pm 72 \mu\text{M}$ (MW \pm SEM, n = 3). Verbindung **16b** ist im Vergleich dazu deutlich aktiver (IC₅₀: 173 μM , vgl. 3.2.6). **16b** und **7** unterscheiden sich im Substituenten an Position 6 des 1,2,4-Trioxanrings. Statt des Isopropenylsubstituenten in Verbindung **7** hat **16b** einen Methylacrylatsubstituenten. Darüber hinaus hat Verbindung **7** in Position 5 des Trioxanrings einen zusätzlichen Methylsubstituenten. Dieser könnte ein sterisches Hindernis für die Interaktion mit der hpGST darstellen, wenn davon ausgegangen wird, dass der Trioxanring essentiell für die Aktivität der Verbindungen ist. Der Verlust an Aktivität der Verbindung **7** gegenüber **16b** könnte aber auch im Fehlen des Methylester begründet sein.

3.2.5 Testung von vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxanderivaten

Singh et al. zeigten 2010, dass vinyl-aryl-substituierte 1,2,4-Trioxane im Mausmodell hochaktiv gegen *Plasmodium yoelii nigeriensis* sind.^[100] *Plasmodium yoelii nigeriensis* ist ein Plasmodienstamm, der im Tiermodell tödlich verlaufende Malaria auslöst.

Da sich die ursprüngliche Idee, 1,2,4-Trioxane als GSTP1-Inhibitoren einzusetzen, aus der Theorie entwickelt hat, dass Substanzen, die Aktivität gegen Malaria zeigen, auch GSTP1-Inhibitoren sind, sollten diese vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxane gegen hpGST getestet werden. In der Publikation von *Singh et al.* wurden Spiroverbindungen, die durch Acetalisierung mit cyclischen Ketonen synthetisiert wurden, getestet. Die Arylgruppe war dabei meist ein Biphenylrest oder ein in Position 4 substituierter Phenylrest.^[100]

Für die Untersuchung an hpGST wurden die bisherigen Erkenntnisse zu Struktur-Aktivitätsbeziehungen der 1,2,4-Trioxane mit den aus der Literatur gewonnenen Strukturen zusammengeführt. Als Arylsubstituent wurde eine 4-Nitrophenylgruppe in das Molekül eingebracht, da sich diese als vorteilhaft für die Inhibition von hpGST erwiesen hat. Es wurden drei Verbindungen getestet (Synthese und Strukturformeln vgl. 3.1.3), von denen Verbindung **23** eine Spiroverbindung ist. Verbindung **24** trägt zusätzlich zu der Vinyl-4-nitrophenylgruppe in Position 6 des Trioxans einen 4-Nitrophenylrest in Position 3.

In einem initialen Test wurden die Verbindungen **22** – **24** bei der höchst möglichen Konzentration im GST-Inhibitionsassay untersucht (**22**, **24** = 50 μ M, **23** = 200 μ M). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 abgebildet. Angegeben sind immer Mittelwerte \pm SEM aus 3 Experimenten.

Tabelle 10 Inhibition der hpGST durch die Verbindungen **22** – **24**. Aufgeführt ist die Inhibition bei der höchstmöglichen Konzentration, bei der die jeweilige Verbindung noch gelöst war (MW \pm SEM, n = 3).

Verbindung	Inhibition (%)	Konzentration (μ M)
22	22.8 \pm 2.5	50
23	35.0 \pm 4.5	200
24	20.4 \pm 5.2	50

Die Verbindungen **22** und **24** wiesen bei 50 μ M ca. 20% Inhibition auf. Verbindung **23** zeigte bei einer Konzentration von 200 μ M 35.0 \pm 4.5% Hemmung der hpGST. Verglichen mit Verbindung **7** (vgl. 3.2.4) und Verbindung **16b** (vgl. 3.2.2) waren die Verbindungen **22** und **24** bei 50 μ M etwas aktiver gegen hpGST. Trotz verbesserter Aktivität wurden die Verbindungen **22** – **24** nicht weiter charakterisiert, da die Löslichkeit unter den gegebenen Assaybedingungen im Verhältnis zur Aktivität zu gering war.

Auffällig an diesen Verbindungen war jedoch, dass sie nahezu die gleiche Aktivität zeigten trotz unterschiedlicher Substituenten in Position 3 des 1,2,4-Trioxanrings. Der in Position 3 befindliche 4-Nitrophenylsubstituent ging in vorangegangenen Studien mit einem positiven Einfluss auf die Aktivität der Trioxane im Vergleich zu Cyclohexyl- oder Methylsubstituenten einher (vgl. 3.2.4). Für die in Position 6 vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxane scheint der 3-Substituent am Trioxanring keine Rolle zu spielen. Dies könnte mit einer anderen Ausrichtung des 1,2,4-Trioxans in der Bindungstasche der hpGST erklärt werden. Diese Theorie wäre nur durch eine Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu beweisen.

3.2.6 Optimierung des Substituenten an Position 3 des Trioxanrings

Verbindung **16b** wurde im initialen 1,2,4-Trioxan-Screening als aktivster hpGST-Inhibitor der anfänglich untersuchten Verbindungen identifiziert (vgl. 3.2.2). Daher stellte Verbindung **16b** den Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer 1,2,4-Trioxane als GST-Inhibitoren dar. Um die Reproduzierbarkeit der biologischen Aktivität der Verbindung **16b** zu gewährleisten, wurde diese erneut synthetisiert und im GST-Inhibitionsassay getestet. Der von *Miriam Sheikh* für Verbindung **16b** bestimmte IC₅₀-Wert an hpGST lag bei 146 μ M. Die Neusynthese und erneute Testung der Verbindung resultierte in einem IC₅₀-Wert von 173 \pm 21 μ M (vgl. Tabelle 11), womit die Reproduzierbarkeit der hpGST-Hemmung durch **16b** sichergestellt wurde.

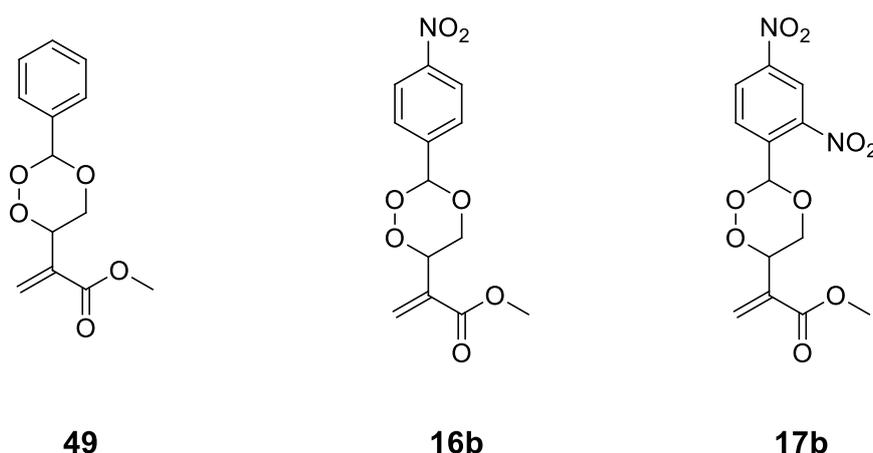


Abbildung 38 Die Strukturformeln der hpGST-Inhibitoren **16b**, **17b** und **49**.

Zusätzlich soll der Einfluss des 4-Nitrosubstituenten am Phenylrest in Position 3 des 1,2,4-Trioxans diskutiert werden. Im Vergleich der Verbindung **49**, dem unsubstituierten Phenylderivat, und Verbindung **16b** zeigte sich, dass der 4-Nitrosubstituent einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität der 1,2,4-Trioxane hat (Abbildung 38). Der IC₅₀-Wert im initialen Screening lag für Verbindung **49** ca. 200 µM höher als für Verbindung **16b**. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde Verbindung **17b** (Abbildung 38) synthetisiert, um zu evaluieren, ob ein zusätzlicher Nitrosubstituent am Phenylrest in Position 3 des Trioxanrings die Aktivität der Verbindung weiter erhöhen kann.

Für die dinitrosubstituierte Verbindung **17b** wurde ein IC₅₀-Wert an hpGST von 434 ± 71 µM (MW ±SEM, n = 3) bestimmt. Damit ist auch diese Verbindung deutlich inaktiver an hpGST als die mononitrierte Verbindung **16b** (Tabelle 11).

Zusammenfassend kann vermerkt werden, dass die Acetalisierung der Hydroxyhydroperoxide mit 4-Nitrobenzaldehyd zu den aktivsten 1,2,4-Trioxanen gegen hpGST führt. Aus diesem Grund wurden alle weiteren 1,2,4-Trioxane mit ebenjenem 4-Nitrobenzaldehyd peroxyacetalisiert, um entsprechenden 3-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-trioxane zu erhalten.

Tabelle 11 IC₅₀-Werte der Verbindungen **16b**, **17b** und **49** an hpGST

Verbindung	IC ₅₀ -Wert (µM)	
	Initialer Screen ^[a]	Neusynthese
49	346	-
16b	146	173 ± 21
17b	-	434 ± 71

[a] Messungen durchgeführt von *Miriam Sheikh*

3.2.7 Aktivität des 1,2,4-Trioxangrundgerüsts

In den vorigen Kapiteln wurde gezeigt, dass 1,2,4-Trioxane mit unterschiedlichen Substituentenmustern in der Lage sind hpGST zu inhibieren. Bis jetzt war jedoch unklar, ob der 1,2,4-Trioxanring für die Aktivität der Substanzen von Nöten ist oder der inhibitorische Effekt nur auf die Substituenten am 1,2,4-Trioxangerüst zurück zu führen ist. Daher wurden drei Moleküle (**19**, **32** und **56**, vgl. Abbildung 39), die eine ähnliche Struktur wie Verbindung **16b** aber keinen 1,2,4-Trioxanring aufweisen, im GST-Inhibitionsassay an hpGST getestet.

Verbindung **19** ist ein Edukt zur Synthese der vinyl-aryl-substituierten 1,2,4-Trioxane (vgl. 3.1.3). Diese Verbindung hat ähnlich Verbindung **16b** einen 4-Nitrophenylsubstituenten und eine α,β -ungesättigte Esterfunktion; allerdings handelt es sich um den Ethylester. Verbindung **55** ist ein Zimtsäurederivat, das ebenfalls eine 4-Nitrosubstitution am Aromaten und eine α,β -ungesättigte Esterfunktion aufweist. Verbindung **32** ist ein 1,3-Dioxan, das dieselben Substituenten wie das 1,2,4-Trioxan **16b** jedoch in Position 2 und 4 des zentralen Dioxanrings trägt.

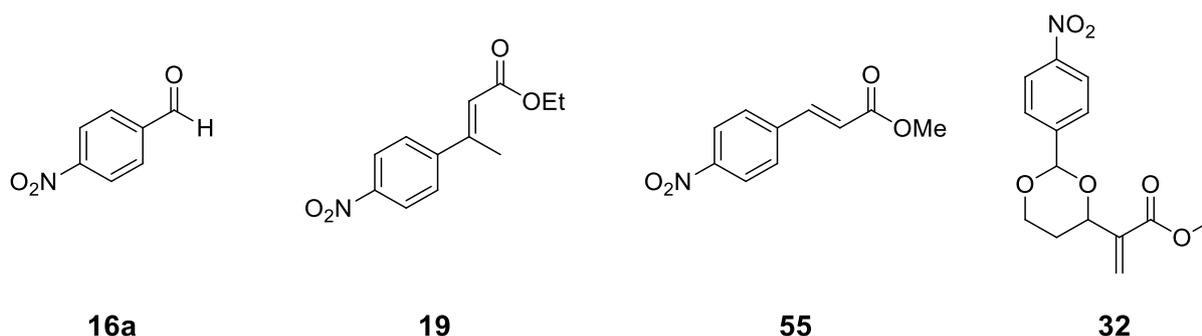


Abbildung 39 Strukturformeln der Verbindungen **16a**, **19**, **55** und **32**.

Die Aktivität der drei Verbindungen gegen hpGST wurde bei der jeweils höchstmöglichen Konzentration, bei der die entsprechende Substanz gelöst vorlag, dreimal bestimmt ([**19**], [**55**] = 200 μ M, [**32**] = 500 μ M). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Alle drei Verbindungen zeigen keine Inhibition der hpGST bei hohen Konzentrationen.

Die Schlussfolgerung, die aus diesem Ergebnis gezogen werden kann, ist, dass die Substituenten nicht alleine für die Aktivität der 1,2,4-Trioxane gegen hpGST verantwortlich sind. Der 1,2,4-Trioxanring ist zwar essentiell für die Aktivität von Verbindung **16b**, allerdings kann nicht eindeutig geklärt werden, warum dies so ist. Ob der 1,2,4-Trioxanring mit dem Enzym selbst interagiert oder nur als Spacer zwischen den Substituenten agiert, könnte z.B. durch eine Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes geklärt werden. Für eine Untersuchung dieser Art ist die Bindung der 1,2,4-Trioxane zum Enzym noch deutlich zu schwach, sodass Kristallisation nicht möglich ist. Alternativ könnte eine Verbindung analog zu **16b** synthetisiert werden,

die einen Cyclohexanring anstelle des Trioxans aufweist. Diese Verbindung ist jedoch nicht literaturbekannt und die Synthese wurde in dieser Arbeit nicht versucht.

Tabelle 12 Inhibition der hpGST durch die Verbindungen **16a**, **19**, **32** und **55**. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM (n = 3).

Verbindung	Inhibition (%)	Konzentration (μ M)
16a	3.74 \pm 2.36	500
19	-5.15 \pm 6.50	200
32	12.6 \pm 3.3	500
55	0.947 \pm 1.057	200

Weiterhin wurde 4-Nitrobenzaldehyd **16a** (4-NBA) im GST-Inhibitionsassay getestet. Sollten 1,2,4-Trioxane mit einem 3-(4-Nitrophenyl)-Substituenten unter den Assaybedingungen nicht stabil sein, würde 4-NBA **16a** bei deren Zerfall entstehen. Um auszuschließen, dass das Zerfallsprodukt und nicht die 1,2,4-Trioxane selbst die Wirkung an hpGST verursachen, wurde die Aktivität von **16a** bei einer Konzentration von 500 μ M bestimmt. 4-NBA **16a** zeigt keine Aktivität gegenüber hpGST (vgl. Tabelle 12), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die 1,2,4-Trioxanverbindungen für die biologische Aktivität verantwortlich sind. Auch dass ein anderes Zerfallsprodukt als **16a** für die Inhibition der hpGST verantwortlich ist, ist eher unwahrscheinlich. Das Austauschen von **16a** bei der Acetalisierung durch andere Aldehyde und Ketone hat einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität der 1,2,4-Trioxane, sodass dieser Teil des Moleküls für die biologische Aktivität von Bedeutung ist.

3.2.8 Testung von 1,2,4-Trioxanderivaten mit aromatischer Esterfunktion

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass ein 4-Nitrophenylsubstituent in Position 3 des 1,2,4-Trioxansrings vorteilhaft für die Inhibition von hpGST ist.

Darüber hinaus hat die Testung der 5-Methyl-6-isopropenyl-1,2,4-trioxanderivate unter 3.2.4 ergeben, dass ein α,β -ungesättigtes Estermotiv in Position 6 des 1,2,4-Trioxanrings wahrscheinlich auch die inhibitorische Aktivität gegenüber hpGST im Vergleich zu Alkylresten erhöht.

Im nächsten Schritt wurde nun das Estermotiv variiert. Der Methylrest der Verbindung **16b** wurde in einem ersten Schritt durch einen Phenyl- bzw. Benzylrest ersetzt (Verbindung **34c** und **33c**). Bei Verbindung **35c** wurde statt mit Phenol mit 4-Hydroxybenzoesäuremethylester gekuppelt. Dies bringt eine zusätzliche Methylesterfunktion in das Molekül ein, die möglicher-

weise die Hydrophilie des Moleküls erhöhen kann. Verbindung **39c** ist am Phenylrest des Esters in *para*-Position methoxysubstituiert. Die Strukturen dieser Verbindungen werden in Abbildung 40 gezeigt.

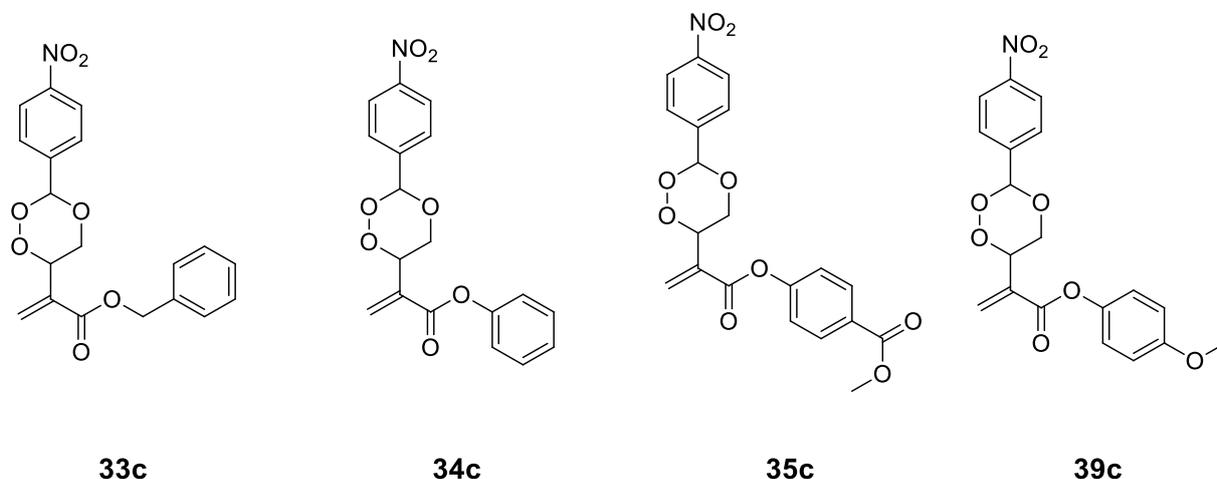


Abbildung 40 Strukturformel der 1,2,4-Trioxanester **33c**, **34c**, **35c** und **39c**.

In Tabelle 13 ist die Inhibition von hpGST durch die Verbindungen **16b**, **33c**, **34c**, **35c** und **39c** bei 10 μM angegeben.

Verbindung **16b** war der inaktivste Inhibitor dieser Serie. Bei einer Konzentration von 10 μM zeigte **16b** nur $2.55 \pm 0.38\%$ Inhibition der hpGST. Der Benzylester **33c** war bei gleicher Konzentration vierfach wirksamer; der Phenylester **34c** war fast achtmal aktiver als der ursprüngliche Methylester **16b**. Verbindung **39c** zeigte mit $19.3 \pm 2.2\%$ Inhibition bei 10 μM nahezu dieselbe Aktivität wie der Phenylester **34c**.

Verbindung **35c** wies bei 10 μM eine Inhibition der hpGST von über 85% auf, sie war damit viermal aktiver als der Phenylester **34c** und mehr als 30mal aktiver als **16b**.

Tabelle 13 Inhibition der hpGST durch die Verbindungen **16b**, **33c**, **34c**, **35c** und **39c** bei einer Konzentration von 10 μM des jeweiligen Inhibitors. Angegeben ist MW \pm SEM ($n = 3$, für **35c** $n = 6$).

Verbindung	Inhibition \pm SEM (%) [I] = 10 μM
16b	2.55 ± 0.38
33c	11.2 ± 1.7
34c	19.8 ± 0.8
35c	87.1 ± 1.1
39c	19.3 ± 2.2

Es zeigte sich, dass das Austauschen des Methylesters gegen einen aromatischen Ester einen großen Einfluss auf die Aktivität der 1,2,4-Trioxane gegenüber hpGST hatte.

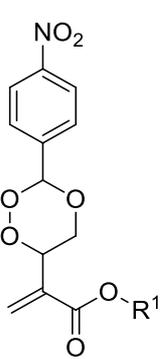
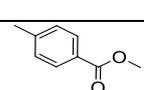
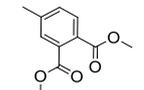
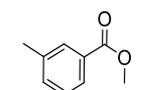
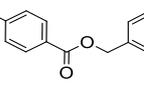
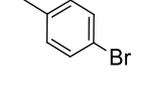
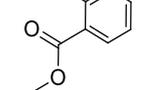
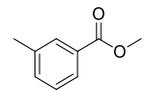
Das zusätzliche Einbringen des Benzoessäuremethylesters in Verbindung **35c** führte nicht nur zu einer verbesserten Löslichkeit sondern auch zu einem Sprung in der Aktivität der 1,2,4-Trioxane. Die Methylestergruppe am Arylsubstituenten scheint ein wichtiges Motiv für die Aktivität gegenüber hpGST zu sein. Dagegen scheint der 4-Methoxysubstituent der Verbindung **39c** keinen zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität der 1,2,4-Trioxane zu haben.

Da die Verbindungen **33c**, **34c** und **39c** unter den Assaybedingungen nur sehr begrenzt löslich waren (maximal 20 μM), wurde auf eine weitere Charakterisierung mit IC_{50} - und K_i -Wert Bestimmung verzichtet.

3.2.9 Charakterisierung von 1,2,4-Trioxanderivaten mit aromatischer Esterfunktion

Nachdem unter 3.2.8 beschrieben wurde, dass der Austausch der α,β -ungesättigten Methylesterfunktion der 1,2,4-Trioxane durch einen Phenylesterrest zu einem deutlichen Anstieg der Inhibition der hpGST führte, wurde eine Serie von sieben 1,2,4-Trioxanen mit α,β -ungesättigtem aromatischen Ester getestet. Die Strukturen und die IC_{50} -Werte der getesteten Verbindungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Zur Auswertung wurden die Gleichungen **2** – **4** verwendet.

Tabelle 14 Strukturen und IC₅₀-Werte der charakterisierten Verbindungen. Abgebildet sind MW ± SEM (n = 3, für **35c** n = 6). Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt.

Grundstruktur	Verbindung	R ¹	IC ₅₀ ± SEM (μM)	Hill-Koeffizient (n), v _{[I]→∞} (%)
	35c		2.90 ± 0.65	n = 1.95 ± 0.28
	36c		2.38 ± 0.59	n = 1.41 ± 0.08
	37c		9.33 ± 0.48	-
	38c		1.80 ± 0.35	v _{[I]→∞} = 32.4 ± 2.4
	40c		9.60 ± 0.35	-
	42c		7.94 ± 0.68	v _{[I]→∞} = 53.7 ± 1.3
	46c		3.36 ± 0.09	n = 1.09 ± 0.01

Die IC₅₀-Werte aller sieben 1,2,4-Trioxane lagen unter 10 μM. Für vier der sieben Verbindungen (**35c**, **36c**, **38c** und **46c**) wurden sogar IC₅₀-Werte von unter 4 μM gemessen. Vergleicht man diese Werte mit dem IC₅₀-Wert der Verbindung **16b** (173 ± 21 μM, vgl. 3.2.6) ist das ein Zugewinn an Aktivität um mehr als das vierzigfache. Die Verbindungen waren ebenfalls deutlich aktiver als die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47**.

Bei zwei der sieben getesteten 1,2,4-Trioxane trat eine Restaktivität (v_{[I]→∞}) der hpGST auf. Dies bedeutet, dass auch bei unendlich hoher Inhibitorkonzentration die hpGST nicht vollständig inhibiert wurde. Die Restaktivität belief sich bei Verbindung **38c** auf 32.4 ± 2.4% (MW ± SEM), bei Verbindung **42c** auf 53.7 ± 1.3% (MW ± SEM) (Abbildung 41C). Dies könnte damit erklärt werden, dass der Enzym-Inhibitor-Komplex weiterhin in der Lage ist, Substrat umzusetzen.^[111]

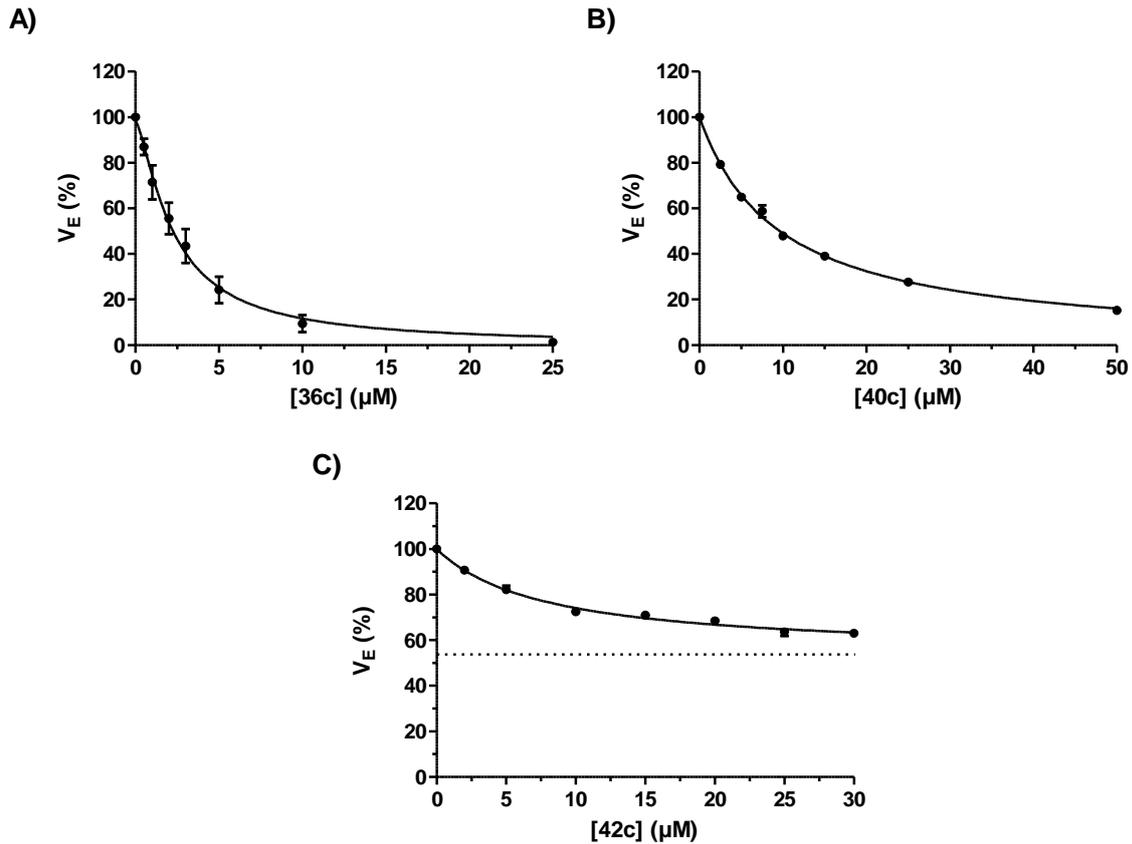


Abbildung 41 Inhibition von hpGST durch die Verbindungen **36c** (A), die Verbindung **40c** (B) und **42c** (C). Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt. Dargestellt sind MW \pm SEM ($n = 3$). Die gepunktete Linie in **7c** gibt den $v_{E \rightarrow \infty}$ -Wert für Verbindung **42c** an.

Drei der sieben Verbindungen (**35c**, **36c** und **46c**) zeigten einen Hill-Koeffizienten > 1 . Dies deutet an, dass mehr als ein Inhibitor-Molekül an der Inhibition eines hpGST-Moleküls beteiligt war. In Abbildung 41A ist die IC_{50} -Bestimmung von Verbindung **36c** graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Regressionskurve deutlich steiler verläuft als bei Verbindung **40c**, die einen Hill-Koeffizienten von eins aufweist (Abbildung 41B).

Um auszuschließen, dass es sich bei der Inhibition durch die 1,2,4-Trioxane um unspezifische Effekte handelt, wurde der IC_{50} -Wert an hpGST für Verbindung **35c** in Anwesenheit von einem Tensid bestimmt (Abbildung 42). Gerade im mikromolaren Konzentrationsbereich neigen unpolare Verbindungen oft dazu, Agglomerate zu bilden, die dann unspezifisch mit Enzymen interagieren können. Es handelt sich um eine sogenannte promiskuitive Hemmung. Die Zugabe von 0.01% Triton X-100 ist ausreichend, um diese promiskuitive Hemmung zu unterdrücken.^[112]

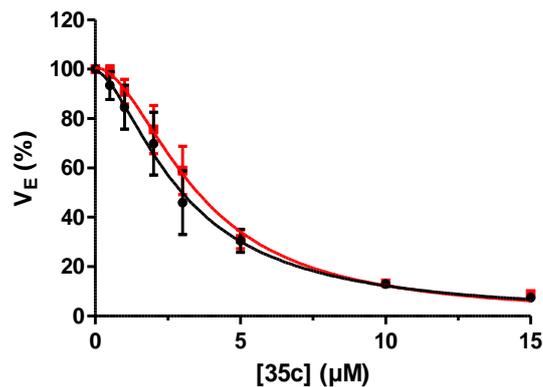


Abbildung 42 Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Verbindung **35c** an hpGST in Anwesenheit (■) und Abwesenheit (●) von 0.01% (v/v) Triton X-100. Dargestellt sind MW \pm SEM ($n = 3$ für die Werte in Anwesenheit von Triton X-100, $n = 6$ für die Werte in Abwesenheit von Triton X-100).

In Anwesenheit von 0.01% (v/v) Triton X-100 wurde ein IC_{50} -Wert an hpGST für **35c** von $3.45 \pm 0.58 \mu\text{M}$ (MW \pm SEM, $n = 3$) gemessen. Der Hill-Koeffizient ist 2.00 ± 0.30 . Ohne Triton X-100 lag der IC_{50} -Wert bei $2.90 \pm 0.65 \mu\text{M}$ (MW \pm SEM, $n = 6$), der Hill-Koeffizient war 1.95 ± 0.28 . Der Zusatz von Triton X-100 hat demnach keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Inhibition von hpGST durch **35c** (ermittelt mit einem ungepaarten t-Test). Dieses Ergebnis schließt eine unspezifische Hemmung der hpGST durch 1,2,4-Trioxane aus.

Nachdem der Aktivitätsbereich der sieben 1,2,4-Trioxane **35c** – **38c**, **40c**, **42c** und **46c** durch Bestimmung der IC_{50} -Werte bekannt war, wurden die Dissoziationskonstanten (K_i -Werte) der sieben Verbindungen ermittelt. Darüber hinaus wurden die Dissoziationskonstanten von Etacrynsäure **47** bestimmt.

Für jede Verbindung wurde der K_i -Wert für CDNB und für GSH ermittelt, wobei die K_i^{GSH} -Werte bei 1 mM CDNB, die K_i^{CDNB} -Werte bei 5 mM GSH bestimmt wurden. In Tabelle 15 sind die K_i^{GSH} -Werte inklusive der Parameter α und β sowie der Hemmtyp zusammengefasst, in Tabelle 16 die K_i^{CDNB} -Werte.

Das kinetische Modell, das diesen Bestimmungen zugrunde liegt, ist in Abbildung 43 dargestellt.

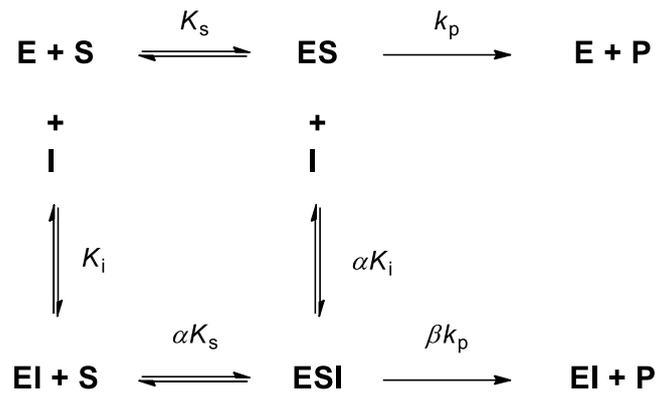


Abbildung 43 Allgemeiner Mechanismus der reversiblen Enzymhemmung mit I = Inhibitor, E = Enzym, S = Substrat und P = Produkt.^[111]

Der Zusammenhang zwischen α und β und dem zugrunde liegenden kinetischen Modell ist in Abbildung 43 dargestellt. Enzym (E) und Substrat (S) bilden zusammen den Enzym-Substrat-Komplex (ES) mit der Dissoziationskonstante K_s , der mit der Geschwindigkeitskonstante k_p zum Produkt (P) weiterreagiert. Ein Inhibitor (I) kann dabei entweder mit S um E konkurrieren (charakterisiert durch K_i) oder an ES binden, sodass ein Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (ESI) entsteht (charakterisiert durch αK_i).

Es gilt, bei $\alpha \gg 1$ handelt es sich um eine kompetitive Hemmung, bei $0 < \alpha \ll 1$ um eine unkompetitive Hemmung und bei $\alpha = 1$ um eine nichtkompetitive Hemmung. Darüber hinaus wird von gemischten Hemmung gesprochen, wenn $\alpha > 1$ ist oder $0 < \alpha < 1$ ist.

Wenn ESI mit der Geschwindigkeitskonstante βk_p zum Produkt und dem Enzym-Inhibitor-Komplex EI umgesetzt werden kann, wird von hyperbolischer Hemmung ausgegangen ($0 < \beta < 1$). Ist β gleich Null, wird ausgehend von ESI kein Produkt mehr gebildet; die Hemmung ist linear.

Hyperbole Hemmung kann sowohl als gemischte Hemmung auftreten ($\alpha > 1$), als auch als nichtkompetitive Hemmung ($\alpha = 1$).^[111]

Für die Referenzsubstanz **47** wurde ein K_i^{GSH} -Wert von $18.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ bestimmt und ein K_i^{CDNB} -Wert von $27.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$. Die Werte stimmen mit der Literatur überein. Von *Awasthi et al.* wurde 1993 ein K_i -Wert von $11.5 \mu\text{M}$ für die GSH-Bindungsstelle publiziert.^[44a] Allerdings geben die Autoren an, dass das entstehende Konjugat aus Etacrynsäure **47** und GSH ein noch deutlich stärkerer GST-Inhibitor ist (K_i -Wert von $1.5 \mu\text{M}$).

Die getesteten sieben 1,2,4-Trioxane zeigen an beiden Bindungsstellen niedrigere Dissoziationskonstanten als die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47**.

Tabelle 15 Charakterisierung der Verbindungen **35c – 38c, 40c, 42c, 46c** und **47** an der GSH-Bindungsstelle von hpGST über die Parameter K_i^{GSH} , α und β sowie den Hemmtyp. Angegeben sind MW \pm SEM (n = 3).

Verbindung	K_i^{GSH} (μ M)	α, β	Hemmtyp
35c	3.46 \pm 0.17 ^[a]	-	parabol kompetitiv
36c	0.790 \pm 0.044	$\alpha = 9.43 \pm 2.80$	gemischt
37c	2.73 \pm 0.20	$\alpha = 6.27 \pm 0.58$	gemischt
38c	1.26 \pm 0.16	$\alpha = 2.22 \pm 0.45$ $\beta = 0.308 \pm 0.036$	hyperbol gemischt
40c	4.11 \pm 0.87	$\alpha = 22.6 \pm 14.6$ $\beta = 0.457 \pm 0.290$	hyperbol gemischt
42c	11.7 \pm 5.3	$\beta = 0.410 \pm 0.064$	hyperbol nichtkompetitiv
46c	5.15 \pm 0.39	-	parabol kompetitiv
47^[b]	18.9 \pm 1.4	-	unkompetitiv

[a] K_i wurde durch Auftragung der IC₅₀-Werte gegen GSH-Konzentration bestimmt. [b] Bestimmt von *Miriam Sheikh* und *Rocky Aricioglu*.

Tabelle 16 Charakterisierung der Verbindungen **35c – 38c, 40c, 42c, 46c** und **47** an der CDNB-Bindungsstelle von hpGST über die Parameter K_i^{CDNB} , α und β sowie den Hemmtyp. Angegeben sind MW \pm SEM (n = 3).

Verbindung	K_i^{CDNB} (μ M)	α, β	Hemmtyp
35c	21.1 \pm 4.6	-	nichtkompetitiv
36c	6.40 \pm 0.47	-	nichtkompetitiv
37c	8.07 \pm 1.92	-	kompetitiv
38c	2.28 \pm 0.35	$\alpha = 3.12 \pm 0.85$ $\beta = 0.819 \pm 0.040$	hyperbol gemischt
40c	14.4 \pm 3.6	$\alpha = 1.88 \pm 0.11$ $\beta = 0.509 \pm 0.047$	hyperbol gemischt
42c	7.42 \pm 2.79	$\beta = 0.332 \pm 0.088$	Hyperbol nichtkompetitiv
46c	12.5 \pm 1.2	$\alpha = 2.40 \pm 0.27$	gemischt
47^[a]	27.4 \pm 1.2	-	nichtkompetitiv

[a] Bestimmt von *Miriam Sheikh* und *Rocky Aricioglu*.

Die K_i^{GSH} -Werte der sieben getesteten 1,2,4-Trioxane waren mit Ausnahme des Wertes von Verbindung **42c** niedriger als die entsprechenden K_i^{CDNB} -Werte. Die K_i^{GSH} -Werte der Substanzen lagen unter 12 μM , wobei Verbindung **36c** die stärkste Bindung zum Enzym mit einem K_i^{GSH} -Wert von $0.790 \pm 0.044 \mu\text{M}$ aufwies. Fünf der sieben getesteten Verbindungen wiesen sogar einen K_i^{GSH} -Wert von weniger als 5 μM auf (**35c – 38c, 40c**).

An der CDNB-Bindungsstelle lagen die Dissoziationskonstanten der sieben getesteten 1,2,4-Trioxane unter 22 μM . Vier der sieben K_i^{CDNB} -Werte lagen unter 10 μM (**36c – 38c, 42c**). Verbindung **38c** besaß die höchste Affinität zu hpGST und bindet an diese mit einem K_i^{CDNB} -Wert von $2.28 \pm 0.35 \mu\text{M}$.

Vergleicht man die K_i -Werte dieser aromatischen Ester mit den K_i -Werten der Methylesterverbindung **16b**, zeigt sich der Einfluss des Esters auf die Aktivität der 1,2,4-Trioxanstruktur. Verbindung **16b** zeigte einen K_i^{GSH} -Wert von $70.0 \pm 5.4 \mu\text{M}$ und einen K_i^{CDNB} -Wert von $486 \pm 166 \mu\text{M}$. Verbindung **36c**, die aktivste der Serie, ist damit 88-mal affiner zur GSH-Bindungsstelle der hpGST als Verbindung **16b**. Der Einfluss der Estervariation auf die K_i^{CDNB} -Werte ist noch ausgeprägter. Der Affinitätsverlust des Methylesters im Vergleich zu den aromatischen Trioxanestern ist dreistellig.

Zusätzlich zu den Affinitäten wurde auch der Hemmtyp der Verbindungen **35c – 38c, 40c, 42c, 46c** und **47** an hpGST ermittelt. Dafür wurden die Parameter α und β bestimmt (vgl. Tabelle 15 und Tabelle 16).

Für die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** wurde an der GSH-Bindungsstelle eine unkompetitive Hemmung ermittelt, für die CDNB-Bindungsstelle eine nichtkompetitive. In der Literatur ist beschrieben, dass Etacrynsäure selbst für beide Bindungsstellen ein nichtkompetitiver Inhibitor der GSTP1 ist, das Produkt aus Etacrynsäure und GSH allerdings kompetitiv mit der GSH- und der CDNB-Bindungsstelle interagiert.^[44a] Jedoch wurden die Literaturwerte bei abweichenden Substratkonzentrationen ermittelt, zu dem wurde der Inhibitor zuerst mit dem Enzym vorinkubiert, bevor die enzymatische Reaktion mit Zugabe von CDNB gestartet wurde. Dies hat möglicherweise zu einem abweichenden Ergebnis geführt.

Für drei der sieben getesteten 1,2,4-Trioxane (**36c, 36c** und **42c**) wurde ein nichtkompetitiver Hemmtyp an der CDNB-Bindungsstelle festgestellt. Die anderen 4 Inhibitoren interagierten kompetitiv mit der CDNB-Bindungsstelle (**37c**) oder zeigten gemischte Hemmung (**38c, 40c, 46c**). Der Parameter α war dabei immer > 1 , was auf eine ausgeprägte kompetitive Komponente der Hemmung schließen lässt.

Der Unterschied zwischen kompetitiver und nichtkompetitiver Hemmung lässt sich sehr gut durch verschiedene Linearisierungsverfahren der Michaelis-Menten-Auftragung graphisch

darstellen. Häufig angewendete Methoden sind der Lineweaver-Burk-Plot und der Dixon-Plot.^[113]

Beim Lineweaver-Burk Plot wird die reziproke Geschwindigkeit ($1/v$) gegen die reziproke Substratkonzentration ($1/[S]$) aufgetragen, sodass sich für jede Inhibitorkonzentration eine Gerade ergibt. In einem sekundären Plot können dann die Steigungen der einzelnen Geraden und die Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinate abgebildet werden. Es ergeben sich erneut zwei Geraden. Der K_i -Wert und der αK_i -Wert können aus den Schnittpunkten dieser beiden Geraden mit der Abszisse ermittelt werden.

In Abbildung 44 sind die Michaelis-Menten- und die Lineweaver-Burk-Auftragungen für einen nichtkompetitiven Inhibitor (**36c**) und einen kompetitiven Inhibitor (**37c**) dargestellt. Es handelt sich um die Bestimmung der K_i^{CDNB} -Werte der beiden Inhibitoren bei 5 mM GSH und 2 $\mu\text{g/ml}$ hpGST.

In der Lineweaver-Burk-Auftragung für Verbindung **36c** (Abbildung 44B) wird deutlich, dass es sich um eine nichtkompetitive Hemmung handelt. Der Schnittpunkt aller Regressionsgeraden liegt auf der Abszisse.

Bei Verbindung **37c** liegt in der Lineweaver-Burk-Auftragung der Schnittpunkt der Regressionsgeraden nahezu auf der Ordinate (Abbildung 44D). Liegt der Schnittpunkt genau auf der Ordinate, kann von kompetitiver Hemmung ausgegangen werden. Die Hemmung der hpGST durch Verbindung **37c** hat somit einen sehr stark ausgeprägten kompetitiven Charakter.

Der exakte Wert für die Dissoziationskonstante und die Art der Hemmung muss mithilfe des Michaelis-Menten Plot errechnet werden, die Lineweaver-Burk-Auftragung dient lediglich zur Abschätzung der Werte.

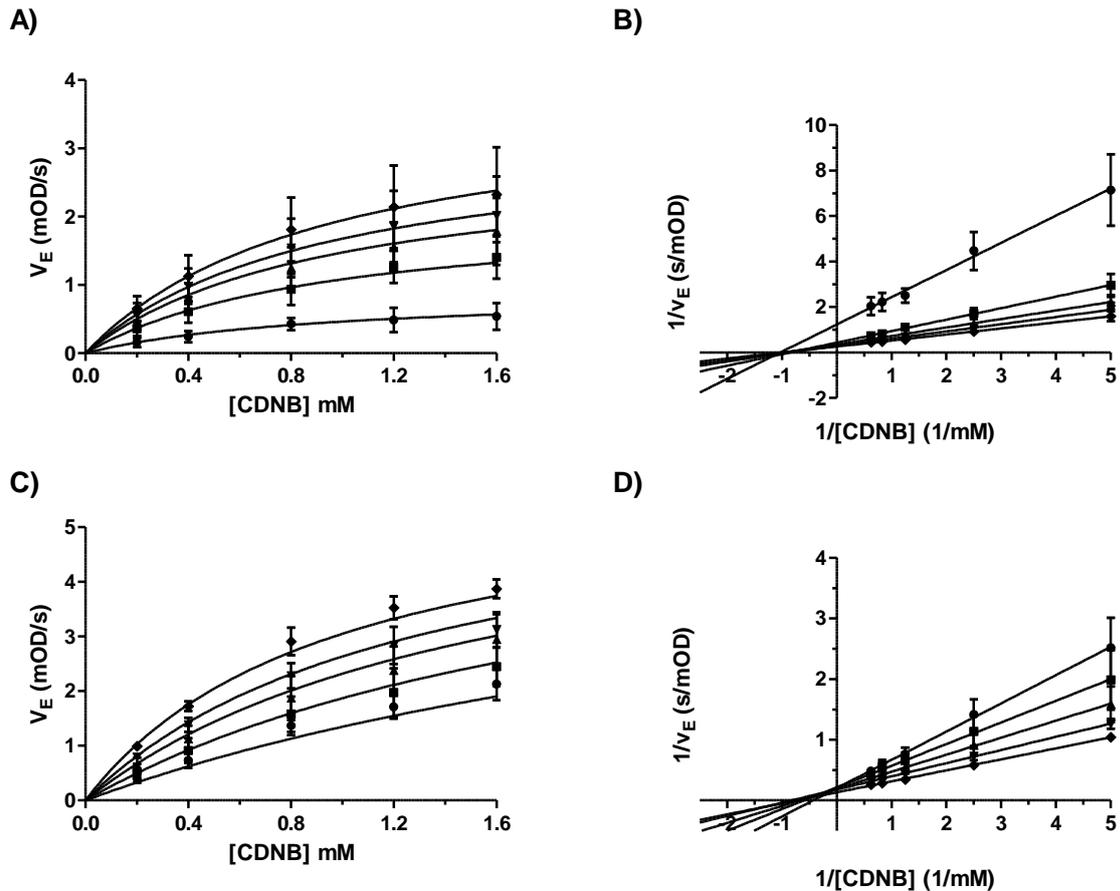


Abbildung 44 **A)** Michaelis-Menten Plot und **B)** Lineweaver-Burk Plot für die Bestimmung des K_i^{CDNB} -Wertes von Verbindung **36c**. Konzentrationen von **36c**: 0 μM (\blacklozenge), 1 μM (\blacktriangledown), 2 μM (\blacktriangle), 5 μM (\blacksquare), 20 μM (\bullet). **C)** Michaelis-Menten Plot und **D)** Lineweaver-Burk Plot für die Bestimmung des K_i^{CDNB} -Wertes von Verbindung **37c**. Konzentrationen von **37c**: 0 μM (\blacklozenge), 2.5 μM (\blacktriangledown), 5 μM (\blacktriangle), 10 μM (\blacksquare), 20 μM (\bullet). Angaben sind MW \pm SEM (n = 3).

Für drei der sieben charakterisierten Inhibitoren (**38c**, **40c** und **42c**) ergab sich darüber hinaus eine hyperbole Hemmung an der CDNB-Bindungsstelle. Bei Verbindung **38c** und **40c** handelte es sich um eine hyperbol gemischte Hemmung, bei Verbindung **42c** um eine hyperbol nicht-kompetitive Hemmung.

An der GSH-Bindungsstelle der hpGST ergab sich für diese drei Inhibitoren derselbe Hemmtyp. Die hpGST konnte Substrat umsetzen, auch wenn die Inhibitoren gebunden waren. Der Begriff hyperbole Hemmung leitet sich vom Dixon Plot ab. In diesem wird die reziproke Umsatzgeschwindigkeit ($1/v$) gegen die Inhibitorkonzentration $[I]$ aufgetragen.^[114] Bei linearer Inhibition ($\beta = 0$) ergibt sich für jede Substratkonzentration eine Gerade. Tritt hyperbole Hemmung auf, ergeben sich je Substratkonzentration keine Geraden, sondern Hyperbeln. Für Verbindung **38c** ist der Dixon-Plot in Abbildung 45C dargestellt. Der hyperbole Verlauf ist deutlich zu erkennen. Die hyperbole Hemmung wird auch in den sekundären Lineweaver-Burk-Plots sichtbar (Abbildung 45B). Hier verlaufen die Auftragungen der Steigung und des Ordinatenabschnitts aus dem Primärplot gegen die Inhibitorkonzentration hyperbol. Auf diese Weise ist zwar der Hemmtyp einfach zu erkennen, allerdings können die beschriebenen Verfahren nicht

eingesetzt werden, um den K_i -Wert der hyperbolischen Hemmung abzuschätzen. Dessen Berechnung kann nur über die Michaelis-Menten Gleichung erfolgen.

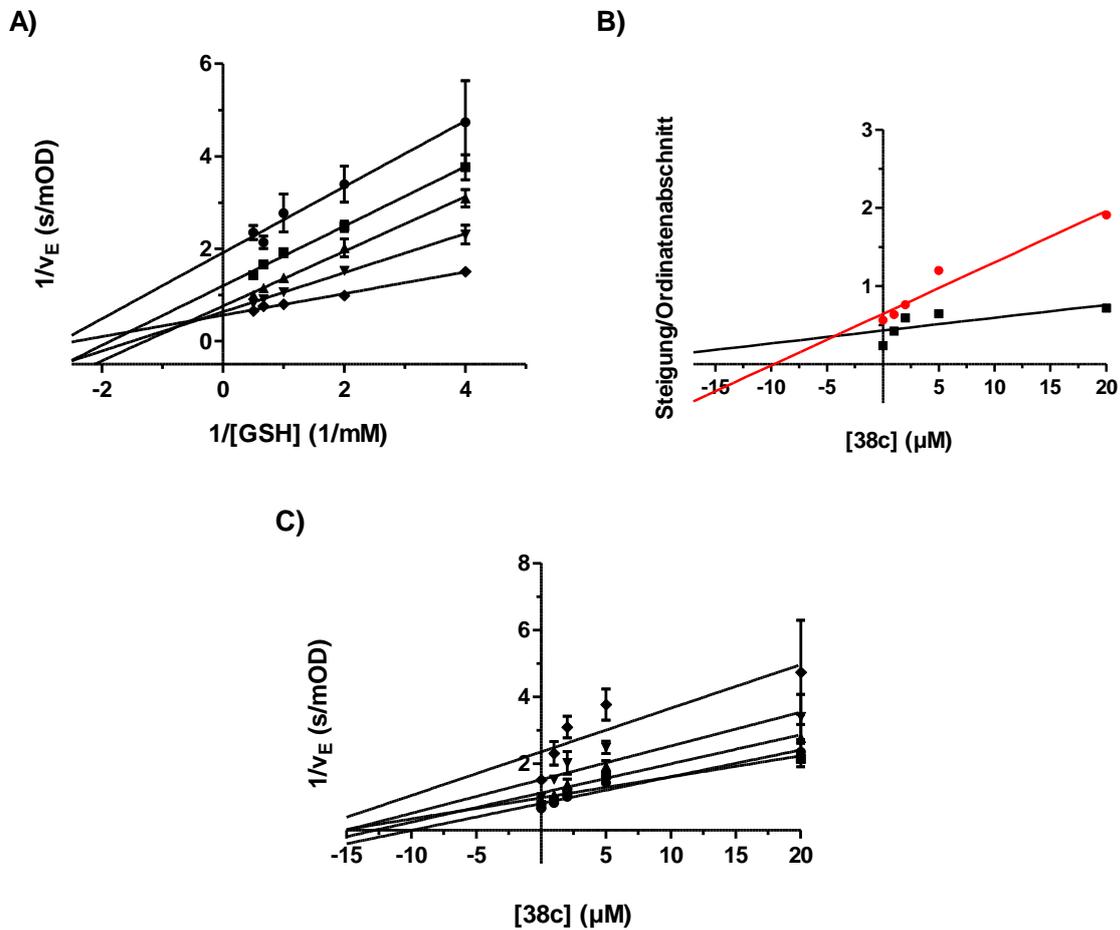


Abbildung 45 **A)** Lineweaver-Burk Plot, **B)** sekundärer Lineweaver-Burk Plot und **C)** Dixon Plot für die hyperbole Hemmung von hpGST durch Verbindung **38c** bei variabler GSH Konzentration. Für **11A)** und **C)** sind $MW \pm SEM$ ($n = 3$) abgebildet. Konzentrationen von **38c** in **A)**: 0 μM (\blacklozenge), 1 μM (\blacktriangledown), 2 μM (\blacktriangle), 5 μM (\blacksquare), 20 μM (\bullet). In **B)** sind die Steigung (\blacksquare) und der Ordinatenabschnitt (\bullet) aus dem primären Lineweaver-Burk-Plot aufgetragen.

Neben den drei hyperbolischen Inhibitoren (**38c**, **40c** und **42c**), zeigten zwei der sieben 1,2,4-Trioxane eine lineare gemischte Hemmung gegenüber der GSH-Bindungsstelle der hpGST (**36c** und **37c**), wobei die Hemmung eine deutliche kompetitive Komponente aufwies ($\alpha > 1$). Verbindung **35c** und **46** wiesen eine parabol kompetitive Hemmung an der GSH-Bindungsstelle auf. Derselbe Hemmtyp wurde bei allen unter 3.2.2 getesteten 1,2,4-Trioxanen an der GSH-Bindungsstelle der hpGST festgestellt. Dies weist auf ein häufigeres Auftreten des parabol kompetitiven Hemmtyps bei der Interaktion zwischen 1,2,4-Trioxanen und der GSH-Bindungsstelle der hpGST hin. Die parabolische Hemmung ist ein in der Literatur selten beschriebenes Phänomen, das im Folgenden etwas ausführlicher erläutert werden soll.^[115] Zu erkennen ist sie, ähnlich der hyperbolischen Hemmung, im Dixon-Plot. Anstelle eines linearen Verlaufs bei Auftragung der reziproken Umsatzgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration erhält

man Parabeln. Dasselbe Phänomen kann im sekundären Lineweaver-Burk-Plot bei Auftragung der Steigung der Geraden aus dem primären Lineweaver-Burk Plot gegen die Inhibitor-konzentration beobachtet werden. Exemplarisch für die parabol kompetitive Hemmung ist der Lineweaver-Burk-Plot und der Dixon-Plot für die Interaktion von Verbindung **35c** mit der GSH-Bindungsstelle der hpGST dargestellt (Abbildung 46) dargestellt.

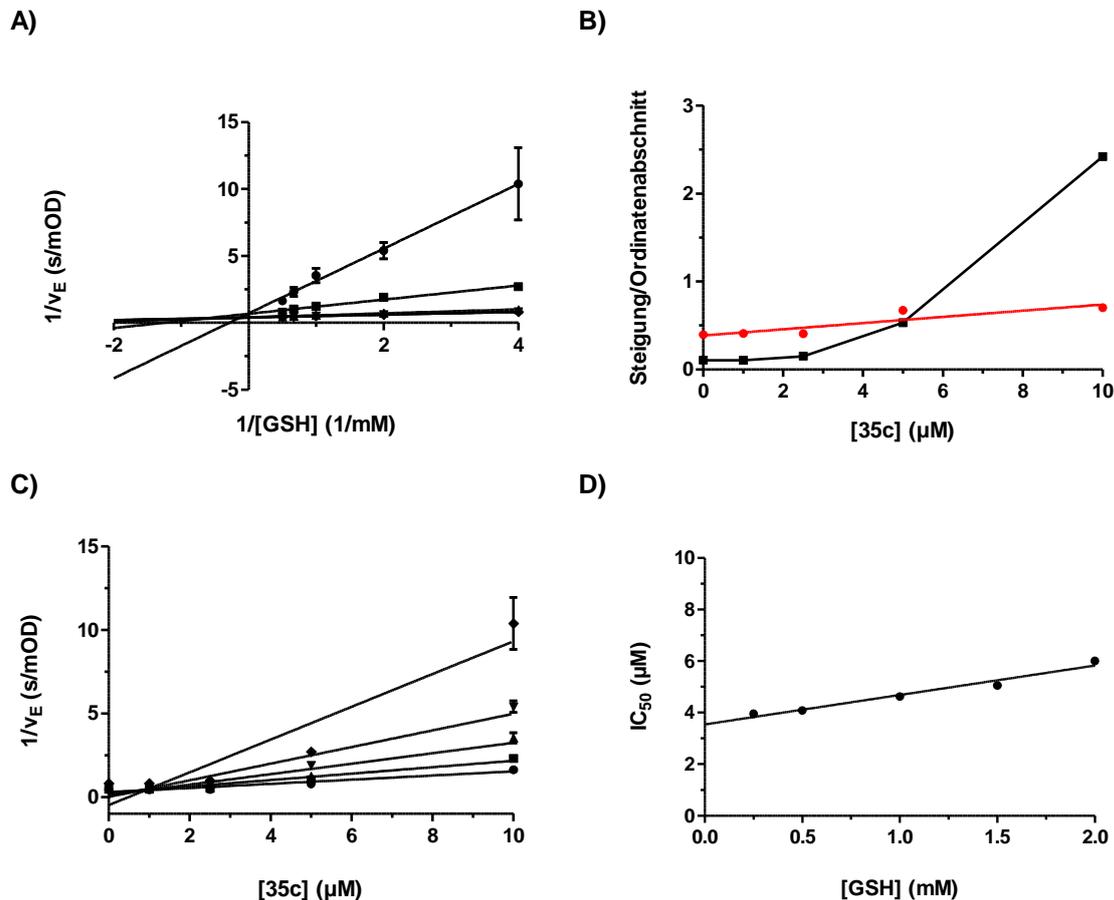


Abbildung 46 A) Lineweaver-Burk-Plot, B) sekundärer Lineweaver-Burk-Plot und C) Dixon-Plot für die parabol kompetitive Hemmung von hpGST durch Verbindung **35c** bei variabler GSH-Konzentration. D) Auftragung der IC_{50} -Werte gegen die GSH-Konzentration. Der K_i ergibt sich als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate. Abgebildet sind MW \pm SEM ($n = 3$). Konzentrationen von **35c** in A): 0 μM (\blacklozenge), 1 μM (\blacktriangledown), 2.5 μM (\blacktriangle), 5 μM (\blacksquare), 10 μM (\bullet). In B) sind die Steigung (\blacksquare) und der Ordinatenabschnitt (\bullet) der Geraden aus dem primären Lineweaver-Burk-Plot in A) aufgetragen.

Die parabolische Inhibition kann mit der Annahme erklärt werden, dass mehr als ein Inhibitormolekül mit einem GSH-Molekül um die Bindungsstelle am Enzym konkurriert. Diese Annahme wird auch durch die bei den IC_{50} -Wert Bestimmungen aufgetretenen Hill-Koeffizienten von > 1 gestützt. Ein solches Verhalten ist typisch für Enzym-Inhibitor-Interaktionen an denen mehr als ein Inhibitormolekül beteiligt ist.

Eine komplexe Stöchiometrie bei der parabol kompetitiven Inhibition führte teilweise zu einer nicht eindeutigen Kinetik bei der K_i -Wert-Bestimmung. Bei Verbindung **35c** konnte kein passendes Modell gefunden werden, um den K_i -Wert zu bestimmen. Alternativ wurde der K_i -Wert

daher durch Auftragen der IC_{50} -Werte gegen die Substratkonzentration ermittelt. Der K_i -Wert ergibt sich aus dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden (vgl. Abbildung 46D) entsprechend der Cheng-Prusoff-Gleichung.^[116]

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle sieben charakterisierten 1,2,4-Trioxane mit aromatischer Esterfunktion hochaktive Inhibitoren der hpGST sind. Der Austausch der Methyl-estergruppe durch Phenylesterderivate hat einen deutlichen Anstieg der Aktivität (um mehr als Faktor 10) verursacht. Die Verbindungen waren zudem alle aktiver als die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47**.

Verbindung **36c** zeigte die stärkste Bindung an der GSH-Bindungsstelle mit einem K_i^{GSH} -Wert von unter 1 μ M.

Die Verbindungen **38c**, **40c** und **42c** zeigten zwar eine hohe Affinität zur hpGST, waren aber aufgrund des hyperbolen Charakters der Hemmung ineffiziente Inhibitoren, da auch in Anwesenheit hoher Inhibitorkonzentrationen immer noch Substrat umgesetzt wurde.

Versucht man aus diesen Daten erste Schlussfolgerungen für die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der 1,2,4-Trioxane zu ziehen, zeigt sich, dass Methylester-Substituenten in *meta*- und *para*-Position des Phenylesters wie in **36c**, der aktivsten Verbindung der Serie, besonders dienlich für die Aktivität der Verbindungen an der GSH-Bindungsstelle sind. **37c** ist lediglich in *meta*-Position substituiert und zeigte die zweithöchste Aktivität gegenüber hpGST mit einem K_i^{GSH} von $2.73 \pm 0.20 \mu$ M. Verbindung **35c** ist *para*-substituiert und um ca. Faktor 4 inaktiver als **36c**. Demgegenüber weist **46c** zwei Methylesterreste in *meta*-Position auf und war um Faktor 6 inaktiver als **36c**.

Überraschend dabei ist, dass Verbindung **37c** zwar den Verbindungen **36c**, **35c** und **46c** strukturell sehr ähnelt, aber dennoch als einziger Inhibitor kompetitiv mit der CDNB-Bindungsstelle interagiert.

Generell ist eine kompetitive Hemmung der GSH-Bindungsstelle eher zu bevorzugen. GSH ist das einzige Substrat mit dem der Inhibitor an dieser Bindungsstelle konkurrieren muss. Aufgrund des breiten Substratspektrums der GSTP1 muss ein Inhibitor an der Bindungstasche des Elektrophils (CDNB-Bindungsstelle) mit vielen Substraten konkurrieren. Diese komplexen Interaktionen können in dem GST-Inhibitionsassay nicht überprüft werden. Die Daten aus dem *in-vitro*-Experiment sind damit nur bedingt auf die *in-vivo*-Situation übertragbar. An der GSH-Bindungsstelle imitiert der GST-Inhibitionsassay im begrenzten Umfang die *in-vivo*-Situation. GSH-Konzentrationen in menschlichen Zellen variieren im Bereich 0.1 bis 10 mM.^[117] Der GST-Inhibitionsassay deckt einen Bereich von 0.25 bis 5 mM GSH ab, was für die Übertragbarkeit der Daten auf die *in-vivo*-Situation vorteilhaft sein sollte.

Zieht man diese Tatsache in Betracht scheinen die Verbindungen **35c**, **36c** und **46c** die interessantesten Substanzen für weitere Charakterisierungen zu sein.

3.2.10 Selektivität der 1,2,4-Trioxane

GSTP1 wird besonders stark in schnell proliferierenden Zellen exprimiert, vor allem in Tumorzellen, und stellt eine interessante Zielstruktur für Wirkstoffe dar. Die Inhibition von GSTP1 könnte Resistenzen in der Chemotherapie minimieren und möglicherweise Apoptose in Tumoren induzieren.^[17]

Allerdings werden Glutathion-Transferasen ubiquitär in gesunden menschlichen Zellen exprimiert, wo sie wichtige zelluläre Funktionen erfüllen. GSTs stehen nicht nur im Zusammenhang mit Multi-Drug-Resistance, sondern nehmen eine entscheidende Rolle im Metabolismus aller Zellen ein. Demzufolge hätte die Inhibition aller im Menschen vorkommenden GSTs wahrscheinlich gravierende negative Auswirkungen. Selektivität ist für einen potentiellen GSTP1-Inhibitor daher von großer Bedeutung.

Um die unter 3.2.9 charakterisierten 1,2,4-Trioxane auf GSTP1-Selektivität zu testen, wurden die Verbindungen an rekombinanter humaner GSTP1, GSTA1 und GSTM2 evaluiert.

GSTA1 und GSTM2 gehören genau wie GSTP1 zur Familie der zytosolischen GSTs und werden auch im Zusammenhang mit GST Überexpression in Tumorzellen genannt.^[118] Allerdings zeigten *Tew et al.* in einem großangelegten Screening, dass GSTP1 die dominant exprimierte GST in den meisten Tumorzelllinien ist und GSTA1 und GSTM2 in deutlich geringeren Konzentrationen vorliegen.^[24] Dafür übernehmen GSTA1 und GSTM2 im gesunden Gewebe entscheidende Funktionen. So ist zum Beispiel GSTA1 besonders hoch in Leberzellen exprimiert, um Xenobiotika zu verstoffwechseln. GSTM2 kommt hingegen vor allem in der Großhirnrinde vor.^[17, 119]

Um die 1,2,4-Trioxane an GSTA1 und GSTM2 evaluieren zu können, wurden im Arbeitskreis *Baumann* (Institut für Biochemie, Department für Chemie, Universität zu Köln) GSTP1, GSTA1 und GSTM2 rekombinant in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Inhibitionsstudien wurden ebenfalls am Institut für Biochemie analog zum GSH-Inhibitionsassay mit hpGST durchgeführt. Die rhGSTP1 erlaubt neben den Selektivitätstestungen einen direkten Vergleich mit hpGST. Die praktischen Arbeiten in diesem Kapitel wurden zum Großteil von *Tobias Schenk* im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

Zuerst wurden die K_s -Werte und V_{max} -Werte von CDNB und GSH für alle drei rekombinanten Enzyme bestimmt (vgl. Tabelle 17). Bei der rhGSTP1 war der K_s^{CDNB} höher als bei der hpGST; für den K_s^{GSH} verhielt es sich umgekehrt.

Für rhGSTA1 und rhGSTM2 wurden deutlich geringere K_s^{CDNB} -Werte als für rhGSTP1 bestimmt. Der K_s^{GSH} -Wert für rhGSTA1 lag im Bereich der hpGST. Für rhGSTM2 wurde ein Wert von 0.17 ± 0.01 mM bestimmt. Damit wies rhGSTM2 die höchste Affinität für GSH auf.

Tabelle 17 Vergleich der K_s - und V_{max} -Werte für CDNB und GSH ermittelt an rhGSTP1, rhGSTA1 und rhGSTM2. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 3). Die Werte wurden von Tobias Schenk bestimmt.

	K_s^{CDNB} (mM)	K_s^{GSH} (mM)	V_{max}^{CDNB} (mOD ml s ⁻¹ μ g ⁻¹)	V_{max}^{GSH} (mOD ml s ⁻¹ μ g ⁻¹)
rhGSTP1	1.55 \pm 0.08	0.30 \pm 0.04	10.4 \pm 0.6	3.24 \pm 0.24
rhGSTA1	0.34 \pm 0.03	0.69 \pm 0.05	3.99 \pm 0.08	3.47 \pm 0.05
rhGSTM2	0.47 \pm 0.06	0.17 \pm 0.01	21.0 \pm 1.6	16.8 \pm 0.4

Um hpGST und rhGSTP1 vergleichen zu können und um die Aktivität der Testsubstanzen an rhGSTA1 und rhGSTM2 zu evaluieren, wurde, wenn möglich, der IC₅₀-Wert der sieben α,β -ungesättigten aromatischen Ester an allen drei rekombinanten Enzymen bestimmt. Die Vorgehensweise entsprach dabei den IC₅₀-Bestimmungen an hpGST. Es wurde 1 mM CDNB und 1 mM GSH eingesetzt und bei einer Enzymkonzentration von 1 μ g/ml gemessen. Lediglich für rhGSTM2 wurde aufgrund der hohen Aktivität eine Konzentration von 0.25 μ g/ml eingesetzt.

Bei Substanzen die keine oder nur eine sehr geringe Aktivität gegen eines der rekombinanten Enzyme zeigten, wurde bei einer Konzentration von 30 μ M eine Dreifachbestimmung in Triplicaten durchgeführt. Diese Ergebnisse werden als enzymatische Restaktivität (%) angegeben, normalisiert auf die enzymatische Aktivität in Abwesenheit von Inhibitor.

Die Ergebnisse an den rekombinanten Enzymen im Vergleich zur hpGST sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Untersucht wurden die sieben in Kapitel 3.2.9 beschriebenen aromatischen Trioxanester, die Methylester Verbindung **16b**, sowie die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47**.

Tabelle 18 Inhibition von hpGST, rhGSTP1, rhGSTA1 und rhGSTM2 durch die Verbindungen **16b**, **35c** – **38c**, **40c**, **42c**, **46c** und **47**. Angegeben sind IC₅₀-Wert (μM), Hill-Koeffizient n und die Restaktivität v_{[I]→∞} (%) oder die Restaktivität bei [I] = 30 μM (%), normalisiert auf die enzymatische Aktivität in Abwesenheit von Inhibitor. Es werden MW ± SEM (n = 3) angegeben.

Verbindung	hpGST ^[a]	rhGSTP1	rhGSTA1	rhGSTM2
16b ^[b]	173 ± 21	83.3 ± 7.9%	105 ± 2%	93.4 ± 0.7%
35c ^[b]	2.90 ± 0.65 (ns) n = 1.95 ± 0.28 (ns)	1.65 ± 0.38 n = 1.40 ± 0.13	74.2 ± 1.4%	97.5 ± 3.6%
36c ^[b]	2.38 ± 0.59 (ns) n = 1.41 ± 0.08 (ns)	1.77 ± 0.59 n = 2.18 ± 0.44	96.9 ± 2.2%	38.0 ± 3.5 n = 1.14 ± 0.19
37c ^[b]	9.33 ± 0.48 (*)	6.74 ± 0.57 n = 0.779 ± 0.018	91.2 ± 3.8%	82.3 ± 3.1%
38c	1.80 ± 0.35 (ns) v _{[I]→∞} = 32.4 ± 2.4	2.06 ± 0.47 n = 2.06 ± 0.17	3.93 ± 0.22 v _{[I]→∞} = 28.1 ± 1.5 n = 1.95 ± 0.27	85.1 ± 6.8%
40c ^[b]	9.60 ± 0.35 (ns)	9.17 ± 0.28 n = 0.859 ± 0.009	21.1 ± 1.3 n = 1.34 ± 0.08	99.3 ± 0.5%
42c ^[b]	7.94 ± 0.68 (***) v _{[I]→∞} = 53.7 ± 1.3 (**)	1.69 ± 0.15 v _{[I]→∞} = 77.3 ± 4.5	8.94 ± 0.25 n = 1.26 ± 0.06	92.8 ± 1.2%
46c ^[b]	3.36 ± 0.09 (ns) n = 1.09 ± 0.01 (**)	4.45 ± 0.55 n = 1.30 ± 0.03	82.8 ± 1.2%	89.9 ± 2.1%
47	30.9 ± 0.6 (ns)	29.2 ± 1.5	8.64 ± 0.15	48.3 ± 6.6

[a] Die statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test ist in Klammern angegeben und vergleicht die IC₅₀-Werte, die an hpGST gemessen wurden, mit denen an rhGSTP1 (ns P > 0.05, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001). [b] Die Werte an rhGSTP1, rhGSTA1 und rhGSTM2 wurden von Tobias Schenk ermittelt.

Bei Vergleich der IC₅₀-Werte an rhGSTP1 und hpGST zeigten sechs von den neun getesteten Substanzen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Dazu gehören die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47**, die vier aktivsten 1,2,4-Trioxane (**35c**, **36c**, **38c** und **46c**) und das weniger aktive 1,2,4-Trioxan **40c**. Für Verbindung **16b** wurde aufgrund von Inaktivität bei 30 μM kein IC₅₀-Wert bestimmt. Allerdings lag die Restaktivität von hpGST in Anwesenheit von 50 μM **16b** bei 81.7 ± 3.1%. Der Unterschied der beiden GSTs scheint bei dieser Verbindung ebenfalls eher gering zu sein.

Diese hohe Übereinstimmung zwischen hpGST und rhGSTP1 war zu erwarten, da in der Literatur hpGST und GSTP1 als kinetisch und physikochemisch äquivalent beschrieben wurden.^[105] Zusätzlich berichteten Shea et al., dass die Aminosäuresequenz des N-Terminus von hpGST und GSTP1 aus Tumorzellen identisch ist.^[120]

Bei den Verbindungen **37c** und **42c** ist der IC_{50} -Wert an rhGSTP1 signifikant niedriger als an hpGST.

Für sechs der aromatischen 1,2,4-Trioxanester (**35c**, **36c**, **37c**, **38c**, **40c** und **46c**) wird ein Hill-Koeffizient $\neq 1$ an rhGSTP1 ermittelt. Lediglich Verbindung **42c** zeigt einen Hill-Koeffizienten = 1 an diesem Enzym. In Anwesenheit von Verbindung **42c** weist rhGSTP1 eine Restaktivität bei unendlich hoher Inhibitorkonzentration von $77.3 \pm 4.5\%$ auf, für hpGST liegt dieser Wert bei $53.7 \pm 1.3\%$.

Die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** wies für rhGSTA1 eine schwach ausgeprägte Selektivität mit einem IC_{50} -Wert von $8.64 \pm 0.15 \mu\text{M}$ auf, während sie an rhGSTM2 mit einem IC_{50} von $48.3 \pm 6.6 \mu\text{M}$ wirkte. Etacrynsäure **47** zeigte folglich eine leichte Selektivität für rhGSTA1, da sie an diesem Enzym um Faktor 3 aktiver war als an rhGSTP1.

Von den getesteten 1,2,4-Trioxanen zeigten fünf Verbindungen (**16b**, **35c**, **36c**, **37c** und **46c**) keine Aktivität gegenüber GSTA1. Verbindung **38c** war der aktivste rhGSTA1-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von $3.93 \pm 0.22 \mu\text{M}$.

An der rhGSTM2 waren alle untersuchten 1,2,4-Trioxane bis auf Verbindung **36c** inaktiv, für die ein IC_{50} -Wert von $38.0 \pm 3.5 \mu\text{M}$ ermittelt wurde.

Die Selektivität betreffend zeigten drei der sieben aromatischen Trioxanester (**35c**, **37c** und **46c**) ein sehr gutes Profil. Die Verbindungen sind potente rhGSTP1-Inhibitoren, zeigen aber gegen rhGSTA1 und rhGSTM2 keine Hemmung. Die hochaktive Verbindung **36c**, die den niedrigsten K_i -Wert an der GSH-Bindungsstelle der hpGST aufweist, zeigt eine 15-fache Selektivität gegenüber der rhGSTP1 im Vergleich zu rhGSTM2 und ist vollständig inaktiv gegenüber rhGSTA1.

Im Gegensatz dazu zeigte die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** keine Selektivität für rhGSTP1.

3.2.11 DMSO-Stabilität der 1,2,4-Trioxane

Während der Durchführung der kinetischen Studien zeigte sich, dass die Aktivität der Trioxaninhibitoren abnahm, wenn diese längere Zeit (mehrere Stunden) in DMSO gelöst waren. Aus diesem Grund wurden die Inhibitoren für die zuvor beschriebenen Messungen unmittelbar vor jeder Testung neu gelöst und verdünnt, um den Einfluss von möglichen Instabilitäten der Verbindungen auf die Messergebnisse zu minimieren.

Dennoch sollte dieses Phänomen genauer charakterisiert werden, um den Effekt für zukünftige, zellbasierte Studien abschätzen zu können. Der vermutete Aktivitätsverlust bei Lagerung in DMSO wurde evaluiert, indem eine Verdünnungsreihe der Verbindung **36c** in DMSO hergestellt und dreimal an rhGSTP1 getestet wurde. Die erste Messung erfolgte direkt nach Lösung

der Substanz, die anderen Messungen nach 30 min und 2 h. Die Testung erfolgte wie auch zuvor bei 1 µg/ml rhGSTP1, 1 mM GSH und 1 mM CDNB in Dreifachbestimmung. Die IC₅₀-Bestimmung ist in Abbildung 47 dargestellt. Hieraus ist zu erkennen, dass sich der IC₅₀-Wert mit zunehmender Zeit zu höheren Konzentrationen hin verschiebt, d.h. die Hemmwirkung des 1,2,4-Trioxans mit der Zeit abnimmt.

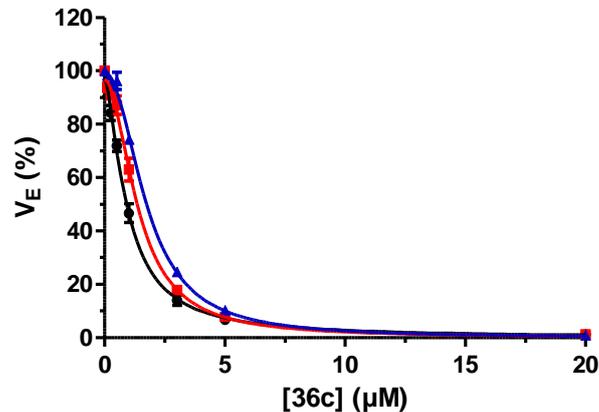


Abbildung 47 IC₅₀-Bestimmung von Verbindung **36c** an rhGSTP1. Es wurden drei Verdünnungsreihen des Inhibitors in DMSO hergestellt und zu den Zeitpunkten 0 min (●), 30 min (■) und 2 h (▲) vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der 3 Messungen ± SEM. Die Testung wurde bei 1 µg/ml rhGSTP1, 1 mM CDNB und 1 mM GSH durchgeführt.

In Tabelle 19 sind die ermittelten IC₅₀-Werte und die Hill-Koeffizienten (n) aufgeführt und mit den von *Tobias Schenk* erhaltenen Werten verglichen. Sowohl der IC₅₀-Wert, als auch der Hill-Koeffizient nahmen mit der Zeit zu. Zwischen dem IC₅₀-Wert, der direkt nach Lösen des Inhibitors gemessen wurde und den Werten nach 30 min und 2 h ist ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar. Auch der Hill-Koeffizient änderte sich entscheidend und deutet eine Änderung der Stöchiometrie der Inhibitor-Enzym-Interaktion an. Die statistische Auswertung erfolgte dabei durch einfaktorielle Varianzanalyse mit Turkey Post-hoc-Test, der die drei Werte einzeln miteinander vergleicht.

Vergleicht man jedoch die Werte, die *Tobias Schenk* für frisch gelösten Inhibitor **36c** an rhGSTP1 gemessen hat, mit den Werten aus dieser Messreihe ergibt sich für IC₅₀ und n kein signifikanter Unterschied (ermittelt durch einfaktorielle Varianzanalyse mit Dunetts Post-hoc-Test).

Tabelle 19 IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die Hemmung von rhGSTP1 durch Verbindung **36c**. Die Werte wurden zu drei Zeitpunkten nach Lösung des Inhibitors in DMSO bestimmt. Zusätzlich ist der von *Tobias Schenk* am Institut für Biochemie bestimmte Wert angegeben. Alle Werte sind als MW ± SEM (n = 3) angegeben.

	0 min	30 min	2 h	Werte bestimmt durch <i>T. Schenk</i>
IC ₅₀ (µM)	0.939 ± 0.074	1.41 ± 0.10	1.76 ± 0.01	1.77 ± 0.59
n	1.50 ± 0.06	1.97 ± 0.01	2.09 ± 0.04	2.18 ± 0.44

Es wurden ¹H-NMR-Studien in deuteriertem DMSO mit Verbindung **16b** durchgeführt, die zeigten, dass Verbindung **16b** auch über 24 h in DMSO stabil bleibt. Es konnten keine Abbauprodukte festgestellt werden. Überträgt man dies auch auf Verbindung **36c**, könnte die Veränderung der Aktivität gegenüber rhGSTP1 eventuell durch unspezifische Bindung an Reaktionsgefäße oder Zusammenlagerung des Inhibitors verursacht werden.

Die Veränderung der Aktivität innerhalb von 2 h beschränkt sich auf einen Faktor von etwa zwei. Dies entspricht, wie der Vergleich mit den Daten von *Tobias Schenk* zeigt, der Messgenauigkeit innerhalb des GST-Inhibitionsassays. Die Aktivitätsänderung über die Zeit sollte zwar bei zukünftigen Messungen mit 1,2,4-Trioxanlösungen beachtet werden, eine grundlegende Änderung des Messergebnisses zeigt sich jedoch nicht. Zumindest für einen kurzen Zeitraum, der für die manuelle Testung der Substanzen ausreicht, sind die Substanzen stabil. Bevor Testungen im größeren Durchsatz durchgeführt werden, sollte die Stabilität der Substanzen genauer evaluiert und möglicherweise durch chemische Modifikationen verändert werden.

3.2.12 Miniaturisierung des GST-Inhibitionsassays

Die bisher gezeigten Daten wurden alle mithilfe eines robusten und transferierbaren Assays in 96-Well-Mikrotiterplatten erhoben. Dies geschah ausschließlich durch manuelles Pipettieren der Assaykomponenten. Um für weitergehende Screenings neuer Moleküle den Durchsatz an Messungen zu erhöhen, sollte das 96-Well-Format auf 384-Well-Mikrotiterplatten übertragen werden. Für die meisten biochemischen und zellbasierten Assays ist dies ohne Probleme möglich und mittlerweile Standard in der industriellen Forschung und zunehmend auch in der akademischen Forschung anzutreffen.^[121]

Mit der Miniaturisierung geht auch eine Automatisierung einher, die eine problemlose Handhabung der verkleinerten Assayvolumina ermöglicht. Für den GST-Inhibitionsassay bedeutete dies, eine Verringerung des Volumens um Faktor 5 (von 200 auf 40 µl, vgl. Tabelle 20), wobei alle Komponenten des Assays gleichermaßen reduziert wurden.

Das Pipettieren der 384-Well-Platten erfolgte hierbei durch einen 96-Kanal-Simultanpipettierer (CyBi®-Well).

Tabelle 20 Volumen der Komponenten für den GST-Inhibitionsassay in 96-Well-Mikrotiterplatten und in 384 Well Mikrotiterplatten.

Komponente	96-Well-Format	384-Well-Format
Assaypuffer	120 µl	24 µl
CDNB-Stock	10 µl	2 µl
Inhibitor-Stock/ DMSO	10 µl	2 µl
Enzym-Stock/ Puffer	10µl	2 µl
GSH-Stock	50 µl	10 µl
Gesamt	200 µl	40 µl

Um den Assay im 384-Well-Format zu etablieren, wurden die K_s -Werte für GSH und CDNB sowie die IC_{50} -Werte der Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** und des hochaktiven 1,2,4-Trioxans **35c** an hpGST erneut bestimmt. Die untersuchten Konzentrationsbereiche der Substrate GSH und CDNB sowie der getesteten Verbindungen **35c** und **47** entsprachen dabei exakt jenen Bereichen, die im 96-Well-GST-Assay zur Anwendung kamen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sowie der statistische Vergleich mit den Resultaten des 96-Well-Mikrotiterplatten-Assays können Tabelle 21 entnommen werden.

Tabelle 21 K_s -Werte für GSH und CDNB sowie IC_{50} -Werte der Verbindungen **35c** und **47** ermittelt an hpGST im 96- und 384-Well-Format. Alle Werte sind als MW \pm SEM angegeben (n = 3, für **35c** in 96-Well-Format: n = 6)

	96-Well-Format ^[a]	384-Well-Format
K_s^{CDNB} (mM)	1.06 \pm 0.06(ns)	1.03 \pm 0.05
K_s^{GSH} (mM)	0.65 \pm 0.04(***)	1.03 \pm 0.003
IC_{50} 35c (µM)	2.90 \pm 0.65(ns) n: 1.95 \pm 0.28(ns)	4.10 \pm 0.45 n: 1.25 \pm 0.02
IC_{50} 47 (µM)	30.9 \pm 0.6(**)	22.7 \pm 1.2 n: 0.755 \pm 0.018

[a] Das Ergebnis des statistischen Vergleichs der Daten mittels ungepaartem t-Test ist in Klammern angegeben (ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Der K_s^{CDNB} -Wert, der im 384-Well-Format bestimmt wurde, wies keine statistisch signifikante Abweichung zum im 96-Well-Format ermittelten Wert auf. Anders war dies beim K_s^{GSH} -Wert. Der im 384-Well-Format bestimmte Wert war mit 1.03 ± 0.003 mM signifikant höher als die Werte, die in 96-Well-Platten bestimmt wurden (vgl. 3.2.1). Ein Grund für den erhöhten Wert könnte in der Durchführung der Messung liegen. Im 96-Well-Format wurden verschiedene Volumina des GSH-Stocks über den Injektor unmittelbar vor Messbeginn am Mikroplatten Reader injiziert, was aufgrund der Unterschreitung des Minimalvolumens von $5 \mu\text{l}$ bei dem 384-Well-Format nicht möglich war. Daher wurde hier eine GSH-Verdünnungsreihe in einer Vorlegeplatte vorbereitet und über den Simultanpipettierer in die zu vermessende Platte pipettiert. Dadurch ergab sich eine zeitliche Verzögerung zwischen dem Start der enzymatischen Reaktion und dem Messbeginn. Diese unumgängliche Variation in der Durchführung könnte das Messergebnis beeinflusst haben.

Dennoch lag der K_s^{GSH} -Wert im niedrigen millimolaren Bereich, in dem Bereich in dem auch der K_s^{CDNB} -Wert lag. Unter den gegebenen Assaybedingungen sollten vergleichbare Werte messbar sein.

Dies zeigte auch die Bestimmung des IC_{50} -Wertes des 1,2,4-Trioxans **35c** in 384-Well-Mikrotiterplatten. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten oder den bestimmten n-Werten in den unterschiedlichen Formaten vor. Der im 384-Well-Format bestimmte IC_{50} -Wert für Etacrynsäure **47** war signifikant niedriger als der im 96-Well-Format ermittelte Wert. Allerdings gilt das nur für den am Institut für Pharmakologie bestimmten IC_{50} . Der Wert der an der TH Köln bestimmt wurde ($25.4 \pm 2.8 \mu\text{M}$, vgl. Kapitel 3.2.1) weicht nicht signifikant von dem Wert in 384-Well-Platten ab. Die Schwankungen sind dementsprechend durch Messungenauigkeiten des Assays zu erklären.

Auffällig war, dass der Hill-Koeffizient für Etacrynsäure $\neq 1$ ist, allerdings, anders als bei den 1,2,4-Trioxanen, ist $n < 1$. Dieses Phänomen tritt auch bei den Testungen mit Zelllysaten auf und wird in Kapitel 3.4.2 ausführlich besprochen.

Zusammenfassend war die Assayetablierung im 384-Well-Format erfolgreich. Die Schwankungen zwischen den Messungen in 96- und 384-Well-Platten liegen im Bereich der Messungenauigkeit des GST-Inhibitionsassays.

Es steht damit ein Assay zur Verfügung, um größere Substanzdatenbanken einfach und schnell auf GST-Inhibition zu überprüfen. Der miniaturisierte Assay erlaubt nicht nur einen höheren Testdurchsatz, sondern verringert auch den Verbrauch an Inhibitor, Substraten und Enzym um 80% pro Messpunkt. Ein weiterer Vorteil ist, dass alle Messungen im 384-Well-Format in Vierfachbestimmung anstatt Triplikaten durchgeführt werden, sodass pro Messwert mehr Datenpunkte erhoben werden und die Genauigkeit des Assays verbessert wird.

Nachteil des Assays sind die Totvolumina, die durch Ansetzen von Vorlegeplatten entstehen und die in jede Messung mit eingerechnet werden müssen, sodass sich das 384-Well-Assay-format erst rentiert, wenn eine größere Anzahl an Verbindungen getestet werden soll.

3.2.13 Bewertung der biochemischen Daten

In einem biochemischen Assay wurde gezeigt, dass 1,2,4-Trioxane hpGST sowie rhGSTP1 inhibieren können. Der für diese Testungen etablierte, literaturbekannte spektrophotometrische Assay hat sich dabei sowohl im 96-Format als auch im 384-Well-Mikrotiterplatten-Format als stabil erwiesen.^[104]

Die für die eingesetzte Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** bestimmten kinetischen Werte sind konform mit Literaturdaten und bestätigen die Stabilität des Assays.^[43-44] Artemisinin konnte aufgrund seiner Inaktivität in diesem Assay nicht als Referenzsubstanz für die Hemmung von hpGST genutzt werden.

Es wurde eine Serie niedermolekularer 1,2,4-Trioxane mit Substituenten in den Positionen 3 und 6 synthetisiert, die hpGST im hohen zweistelligen bis dreistelligen mikromolaren Bereich hemmen (**16b**, **48** – **51**). Der Substituent in Position 3 der 1,2,4-Trioxane konnte durch Acetalisierung des Hydroxyhydroperoxids **15** mit unterschiedlich substituierten Benzaldehyden optimiert werden. Als besonders vorteilhaft für die Inhibition der hpGST hat sich hierbei ein 4-Nitrophenylsubstituent erwiesen.

Darüber hinaus konnte in Kapitel 3.2.7 gezeigt werden, dass dem 1,2,4-Trioxanring eine wichtige Rolle für die Aktivität der Substanzklasse zukommt, wobei in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, ob es sich um eine direkte Interaktion des Trioxanrings mit der hpGST oder einen indirekten Einfluss handelt.

Eine deutliche Verbesserung der inhibitorischen Aktivität konnte durch die Optimierung des Substituenten in Position 6 des zentralen 1,2,4-Trioxanrings erreicht werden. Die Einführung eines α,β -ungesättigten aromatischen Esters resultierte in einem drastischen Anstieg der Aktivität mit K_i -Werten im einstellig mikromolaren bis dreistellig nanomolaren Bereich. Dabei zeigten die Inhibitoren meist ein kompetitives Verhalten gegenüber der GSH-Bindungsstelle. Typisch für die Interaktion der 1,2,4-Trioxane mit der hpGST scheint ein parabol kompetitiver Hemmmechanismus zu sein, der in der Literatur nur selten beschrieben ist. Diese Art der Hemmung resultiert aus einer Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung mit einer Stöchiometrie $\neq 1$.^[115b]

Neben der ausführlichen kinetischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Substanzen mit α,β -ungesättigten aromatischen Estern größtenteils selektiv für GSTP1 im Vergleich zu GSTA1 und GSTM2 sind.

Verbindung **36c** (vgl. Abbildung 48, die entscheidenden funktionellen Gruppen sind farblich hervorgehoben) hat sich als vielversprechendstes 1,2,4-Trioxane erwiesen. Sie zeigt die

stärkste Bindung an der GSH-Bindungsstelle der hpGST (K_i^{GSH} : $0.790 \pm 0.044 \mu\text{M}$) und ist inaktiv gegenüber GSTA1. Zusätzlich weist sie eine 20fache Selektivität für GSTP1 im Vergleich zu GSTM2 auf.

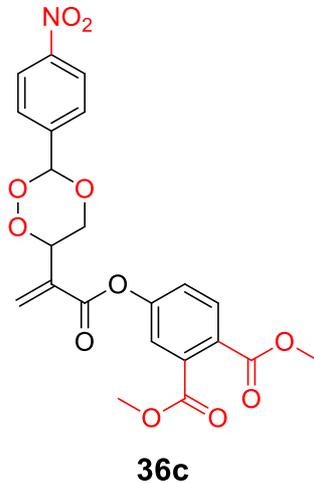


Abbildung 48 Die neuidentifizierte Leitstruktur **36c**, die als potenter und selektiver GSTP1-Inhibitor charakterisiert wurde.

In der aktuellen Literatur finden sich viele neuartige Leitstrukturen für GSTP1-Inhibitoren. Werden diese mit Verbindung **36c** verglichen, zeigen eine Vielzahl der beschriebenen Substanzen eine deutlich geringere Aktivität gegenüber GSTP1, die oftmals im zweistelligen mikromolaren Bereich liegt.^[51, 53, 55b] Auch wird die Selektivität der Inhibitoren nur selten überprüft. So veröffentlichten *Rotili et al.* 2015 Analoga von NBDHEX (6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol) die zwar GSTP1 im dreistelligen nanomolaren Bereich inhibieren, jedoch eine deutlich höhere Aktivität gegenüber GSTM2 zeigten.^[122]

Der bis jetzt vielversprechendste Inhibitor der GSTP1 ist das schon in den 1990er Jahren beschriebene GSH-Analogon TLR199 (Struktur vgl. 1.4.1), dessen aktive Form TER117 einen K_i -Wert von $0.4 \mu\text{M}$ an GSTP1 aufweist. Gleichzeitig ist diese Verbindung 50-mal aktiver gegenüber GSTP1 als an anderen GST-Klassen.^[47-48] TLR199 ist bis jetzt der einzige GSTP1-Inhibitor, der Effizienz in klinischen Studien zeigte.^[60] Damit kann TLR199 immer noch als Standard für die Entwicklung neuer GSTP1-Inhibitoren angesehen werden. Limitierend für den *in-vivo* Einsatz der GSH-Analoga ist die Gefahr der Hydrolyse durch γ -Glutamyltransferasen.^[123] Diese Möglichkeit besteht bei den 1,2,4-Trioxanen nicht. Verglichen mit TLR199 zeigt Verbindung **36c** eine ähnliche Aktivität und Selektivität und ist damit ein interessanter Kandidat für eine weitere Leitstrukturoptimierung.

Fragen, die im Folgenden noch adressiert werden müssen, um Verbindung **36c** weiter zu charakterisieren, betreffen vor allem die Zellgängigkeit und Effektivität der Verbindung in Tumorzellen. Aber auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindung bedürfen wahrscheinlich weiterer Optimierung. So ist die Wasserlöslichkeit der aromatischen 1,2,4-

Trioxanester für zellbasierte Studien sehr gering und könnte z.B. durch den Austausch eines Methylestersubstituent durch eine Carboxylgruppe erhöht werden. Ein weiterer Punkt, der noch der Klärung bedarf, ist die Stabilität der Verbindungen. Lagerung der 1,2,4-Trioxane als Feststoffe ist lichtgeschützt bei Raumtemperatur zwar problemlos möglich, wie sich die Verbindungen im wässrigen Assaymilieu verhalten, wurde nicht untersucht. Da schon in DMSO-Lösung Veränderungen in der Aktivität der Verbindungen auftreten, könnte dies unter wässrigen Bedingungen auch möglich sein.

3.3 GST-Expression in Krebszelllinien

Es wurden 15 humane Krebszelllinien und die primäre humane Brustepithelzelllinie HMEC auf GSTP1-, GSTA1- und GSTM2-Expression (Genes of interest, GOI) untersucht. Dafür wurde ein stabiles System zur RNA-Isolation, zum Umschreiben der RNA in cDNA (RT-PCR) und zur relativen Quantifizierung der cDNA mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) etabliert. Die Quantifizierung erfolgte mittels SYBR-Green I-Assay, der auf unspezifischer Bindung des Farbstoffs an doppelsträngige DNA beruht. Ist nach mehreren Amplifikationszyklen so viel doppelsträngige DNA in der Probe vorhanden, dass ein definierter Fluoreszenzwert erreicht ist, handelt es sich um den Threshold-Cycle (C_q -Wert). Je niedriger der C_q -Wert ist, desto mehr RNA des entsprechenden Gens ist in der ursprünglichen Probe vorhanden. Da von einer Verdopplung der DNA-Menge während jedes Amplifikationszyklus ausgegangen werden kann, entspricht die Abnahme des C_q -Wertes um eins einer Verdopplung der ursprünglichen Anzahl an RNA-Templates in der Probe.^[124]

Das Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm definierte die Qualität der isolierten RNA, deren Umschreibung in cDNA als quantitativ betrachtet wurde. Im Anschluss an jede qPCR wurde eine Schmelzpunktanalyse der Produkte durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu gewährleisten.

Die so erhaltenen GST-Expressionsprofile wurden genutzt, um geeignete Zellsysteme für die Charakterisierung der GSTP1-Inhibitoren in humanen Tumorzelllinien zu identifizieren.

Die Quantifizierung erfolgte in Bezug auf Referenzgene, deren Expression unabhängig von externen Faktoren in allen humanen Zellen stabil ist.^[125] In dieser Studie wurden drei Referenzgene genutzt: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1) und Succinat-Dehydrogenase-Komplex (SDHA), da dies dem Standard zur Generierung valider qPCR-Daten entspricht.^[126] Gerade die Quantifizierung eines GOI über verschiedenen Zelltypen hinweg ist problematisch und sollte auf keinen Fall nur mit einem Referenzgen durchgeführt werden. Eine absolute Quantifizierung von RNA ist vor allem aufgrund der Instabilität dieser problematisch.^[127]

Die qPCR wurde sowohl in Glaskapillaren (LightCycler 2.0, Roche) als auch in 96-Well-Mikrotiterplatten (LightCycler 96, Roche und CFX96 Touch™, Bio-Rad) immer als Dreifachbestimmungen in Triplikaten durchgeführt. Dabei waren die Reaktionsvolumina und Assaykonzentrationen stets gleich.

3.3.1 Effizienz der qPCR

Theoretisch wird während jedes Zyklus der qPCR die Anzahl der PCR-Produkte verdoppelt; dies entspräche einer Effizienz von 100%. In der Realität weicht die Effizienz oftmals von diesem theoretischen Wert ab. Wird die Effizienz, die für jedes Primerpaar unterschiedlich ist,

nicht berücksichtigt, kann dies zur einer Verzerrung der Ergebnisse führen.^[128] Unter anderem können Dimerbildung der Primer, schlecht gewählte Hybridisierungstemperaturen und eine Vielzahl an Chemikalien die Effizienz der qPCR herabsetzen, während unspezifische Primer und Polymerase-Inhibitoren zu erhöhten Werten führen können^[129]. In der Laborpraxis sollte die Effizienz zwischen 90 und 110% liegen und vor Beginn der eigentlichen Messreihe bestimmt werden.

Die Bestimmung der Effizienz erfolgt separat für jedes Primerpaar, wobei eine Verdünnungsreihe der Template-cDNA bei sonst gleichbleibenden Assaybedingungen eingesetzt wird. Aus der Steigung der Regressionsgeraden bei logarithmischer Auftragung der cDNA-Konzentration gegen den C_q -Wert kann die Effizienz der PCR bestimmt werden.^[128]

Vor dem eigentlichen Zelllinien-Screening (vgl. Kapitel 3.3.4) wurde die Effizienz der qPCR für die Primerpaare der GOIs und der drei Referenzgene mit einem LightCycler 2.0 in der Arbeitsgruppe *Herzig* (Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln) bestimmt. Es wurden vier cDNA-Konzentrationen im Bereich 3 bis 100 ng eingesetzt, dabei stammte die eingesetzte cDNA aus A-549. Da diese Zelllinie nur sehr geringe Mengen an GSTA1 exprimiert, wurde zur Evaluierung des GSTA1-Primerpaares cDNA aus MCF-7 genutzt. Zusätzlich wurde in MCF-7 die Effizienz der GAPDH- und der HPRT1-Primer noch einmal bestimmt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die Bestimmungen erfolgten dreimal in Duplikaten; es werden immer Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. In Abbildung 49 ist die Abhängigkeit der C_q -Werte von \log_{10} (cDNA-Konzentration) graphisch dargestellt.

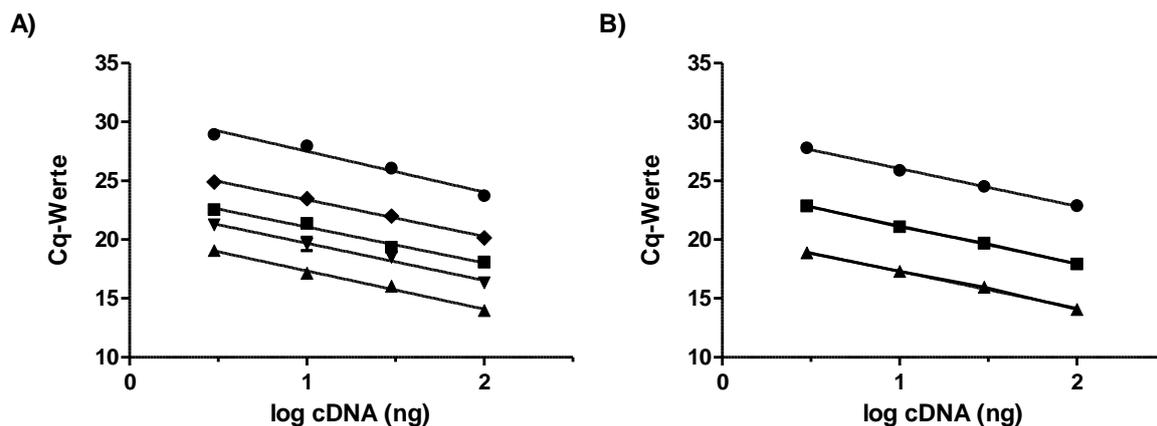


Abbildung 49 Bestimmung der Effizienz der qPCR durch Auftragung der C_q -Werte gegen \log_{10} (cDNA-Konzentration) Für **A)** wurde cDNA aus A-549 Zellen verwendet. Folgende Primerpaare sind angegeben: GSTM2 (●), SDHA (◆), HPRT1 (■), GSTP1 (▼), GAPDH (▲). Für **B)** wurde cDNA aus MCF-7 verwendet und die Primer GSTA1 (●), HPRT1 (■) und GAPDH (▲) evaluiert. Angegeben sind MW \pm SD (n = 3 in Duplikaten).

Aus den Steigungen der Regressionsgeraden ergaben sich die Effizienzen, die in Tabelle 22 zusammengefasst sind. Die Mittelwerte der Effizienzen, die mit cDNA aus A-549 ermittelt wurden, lagen zwischen $96 \pm 13\%$ (GSTM2) und $112 \pm 4\%$ (HPRT1). Mit cDNA aus MCF-7 lagen die Werte zwischen $105 \pm 8\%$ (HPRT1) und $109 \pm 8\%$ (GAPDH). Somit lagen die ermittelten Werte in dem geforderten Bereich von 90 bis 110%, mit Ausnahme der Effizienz des HPRT1-Primerpaares, die mit cDNA aus A-549 bestimmt wurde.

Tabelle 22 Die Effizienz der qPCR für alle Primerpaare, errechnet aus der Steigung der Geraden in **Abbildung 49**. Angegeben sind MW \pm SD (n = 3 in Duplikaten).

Primerpaar	Effizienz (%)	Template-cDNA
GSTP1	108 ± 7	A-549
GSTA1	106 ± 7	MCF-7
GSTM2	96 ± 13	A-549
GAPDH	103 ± 9	A-549
GAPDH	109 ± 8	MCF-7
HPRT1	112 ± 4	A-549
HPRT1	105 ± 8	MCF-7
SDHA	110 ± 7	A-549

Eine einfaktorielle Varianzanalyse der in Tabelle 22 gezeigten Werte ergab, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen besteht. Dies bedeutet, dass für die Bestimmung der Genexpression die gleiche Effizienz für die sechs Primerpaare vorausgesetzt werden kann und daher die Effizienz bei statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt werden muss.

Aus der Analyse der Effizienzen geht ebenfalls hervor, dass in dem gewählten Konzentrationsbereich von 3 bis 100 ng die PCR linear verläuft (vgl. Abbildung 49), sodass für die Expressionsanalyse eine konstante cDNA-Konzentration von 30 ng eingesetzt wurde.

3.3.2 Validierung des Assays

Der qPCR-Assay wurde mit drei verschiedenen Thermocyclern (LightCycler 2.0, LightCycler 96 und CFX96 Touch™) in der Arbeitsgruppe *Herzig* (Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln) und der Arbeitsgruppe *Teusch* (Fakultät für angewandte Naturwissenschaften, Technische Hochschule Köln) evaluiert, um die Reproduzierbarkeit der Daten sicher zu stellen.

In einem ersten Experiment wurden die qPCR-Effizienzen für GSTA1, GAPDH und HPRT1 mit cDNA aus MCF-7 mit dem LightCycler 96 und dem CFX96 Touch™ erneut bestimmt, um exemplarisch an diesen Primern zu zeigen, dass die Effizienz der qPCR nicht abhängig vom eingesetzten Gerät ist. Die Versuche wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die berechneten Effizienzen der drei evaluierten Primer sind für die drei Geräte in Tabelle 23 angegeben.

Tabelle 23 Die Effizienz der qPCR für GSTA1, GAPDH und HPRT1 bestimmt mit cDNA aus MCF-7 an drei verschiedenen Geräten: dem LightCycler 2.0 (LC 2.0), dem LightCycler 96 (LC 96) und dem CFX96 Touch™. Angegeben sind MW \pm SD (n = 3 in Duplikaten).

Primerpaar	Effizienz (%)	Gerät
GSTA1	106 \pm 7	LC 2.0
	121 \pm 10	LC 96
	105 \pm 11	CFX96 Touch™
GAPDH	109 \pm 8	LC 2.0
	88 \pm 8	LC 96
	105 \pm 11	CFX96 Touch™
HPRT1	105 \pm 8	LC 2.0
	108 \pm 14	LC 96
	104 \pm 18	CFX96 Touch™

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse der in Tabelle 23 angegebenen Werte zeigt, dass es weder einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Effizienzen für ein Primerpaar bestimmt an verschiedenen Geräten, noch zwischen den Effizienzen der drei Primerpaare bestimmt an einem Gerät gab. Somit kann angenommen werden, dass der verwendete Thermocycler keinen Einfluss auf die Effizienz der qPCR hat. Dementsprechend wurde für das Screening der 16 Zelllinien (vgl. 3.3.4) vorausgesetzt, dass die qPCR-Effizienz unabhängig vom Primerpaar und vom verwendeten Thermocycler stets konstant ist und deswegen nicht einbezogen werden muss.

In einem zweiten Experiment wurden die RNA-Expressionsniveaus der drei GOIs und der drei Referenzgene in cDNA aus HeLa-Zellen bestimmt. HeLa ist eine in der Forschung häufig eingesetzte Cervixkarzinom-Zelllinie.^[130] Vergleichswerte für GSTP1-RNA-Expressionsniveau in HeLa sind in der Literatur dennoch nicht zu finden.

Die Testung wurde an den drei verschiedenen Thermocyclern jeweils dreimal in Triplikaten wiederholt. Die erhaltenen C_q -Werte für die sechs untersuchten Gene sind in Abbildung 50A dargestellt. Die C_q -Werte der einzelnen Gene gemessen an den unterschiedlichen Geräten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse miteinander verglichen. Für keines der Gene ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Thermocyclern.

Zusätzlich wurde die Testung mittels $\Delta\Delta C_q$ -Methode ausgewertet, um die relative Expression der untersuchten Gene in Bezug auf ein Referenzgen zu bestimmen. Da sich GAPDH als das stabilste der drei Referenzgene erwiesen hat (vgl. 3.3.3), wurde es zur Normalisierung genutzt. Die $\Delta\Delta C_q$ -Methode findet Anwendung, da es sich um den Vergleich der Expressionslevel in einer Zelllinie mit unterschiedlichen Geräten handelt. Mit dieser Methode Zelllinien aus unterschiedlichen Organismen und Gewebetypen zu vergleichen, ist aufgrund der nicht sichergestellten Stabilität der Referenzgene problematisch.^[127]

Das Balkendiagramm in Abbildung 50B zeigt die relative Expression der untersuchten Gene in Bezug auf die Messung, die am LightCycler 2.0 durchgeführt wurde. Mit dieser Darstellung werden Unterschiede deutlich sichtbar, da eine Abnahme des C_q -Wertes um eins schon eine Verdopplung der relativen Expression bedeutet. Dennoch sind bei statistischer Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene vorhanden.

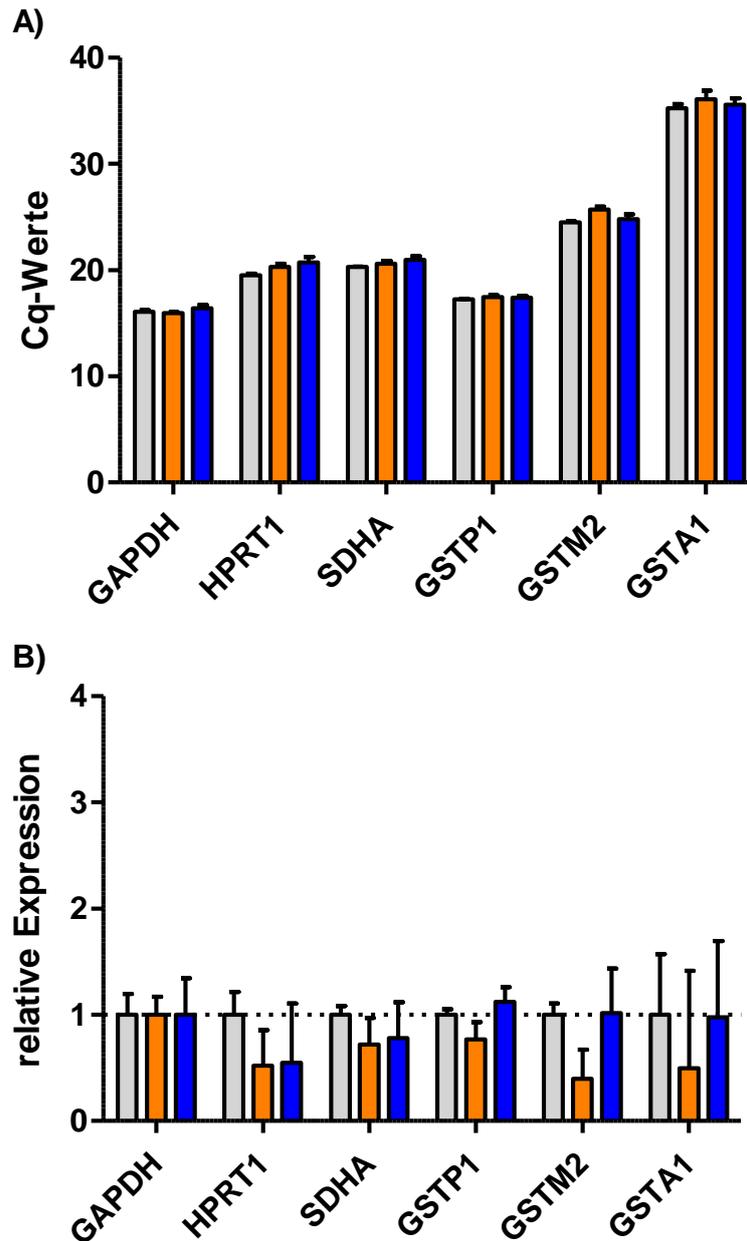


Abbildung 50 Darstellung der C_q -Werte für die sechs untersuchten Gene in HeLa (**A**) und der Expressionsanalyse der sechs untersuchten Gene in HeLa in Relation zu GAPDH ($\Delta\Delta C_q$ -Methode, **B**). Dabei wurde die Messung mit dem LightCycler 2.0 (grau) als Referenzwert genutzt. (Lightcycler 96 = orange, CFX96 Touch™ = blau). Dar- gestellt sind $MW \pm SEM$ ($n = 3$).

Zusammenfassend war die Validierung des qPCR-Assays erfolgreich. Es wurde sichergestellt, dass der Assay in unterschiedlichen Laboren mit verschiedenen Geräten reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse liefert. Der qPCR-Assay zeigt eine hohe Robustheit, die besonders bei qPCR-Daten wichtig ist, da schon geringe Schwankungen das Ergebnis deutlich verändern können.

3.3.3 Stabilität der Referenzgene

Die relative Quantifizierung der GST-Expression in Krebszelllinien wird in Bezug auf ein Referenzgen durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Referenzgene in allen Zelllinien gleichermaßen stabil exprimiert werden, ist es sinnvoll in jeder Studie mindestens zwei Referenzgene zu evaluieren. Schwankungen der C_q -Werte einzelner Gene können durch Schwankungen in der RNA-Isolation entstehen.^[127] Ein stabiles Verhältnis der C_q -Werte der Referenzgene weist dennoch auf eine konstante Expression hin.

In dieser Studie wurden drei Referenzgene evaluiert (GAPDH, HPRT1 und SDHA). Diese drei haben in einem 2002 publizierten Screening die stabilste Expression gezeigt.^[125]

In Tabelle 24 sind die Mittelwerte der C_q -Werte der Referenzgene aus dem gesamten Screening zusammengefasst. Die Mittelwerte wurden aus den Messungen der 16 charakterisierten Zelllinien ermittelt.

Tabelle 24 Mittelwerte und SEM der C_q -Werte der Referenzgene aus allen Messungen der 16 Zelllinien. Der Mittelwert setzt sich aus 16 Einzelwerten zusammen, die wiederum die Mittelwerte aus 3 Messungen pro Zelllinie in Triplikaten (für HeLa 9 Messungen in Triplikaten) darstellen.

	$C_q(\text{GAPDH})$	$C_q(\text{HPRT1})$	$C_q(\text{SDHA})$
Mittelwert	16.3	20.7	22.4
SEM	0.18	0.23	0.22

Die Expression der Referenzgene ist insgesamt sehr konstant. Der Standardfehler liegt für die drei Gene bei ungefähr 0.2, wobei GAPDH den stabilsten Wert zeigt. Aus diesem Grund wurde GAPDH in Kapitel 3.3.4 als Bezugsgen für die Datenanalyse genutzt.

In Tabelle 25 sind die Mittelwerte der ΔC_q -Werte der Referenzgene aufgelistet. Auch diese sind zusammengefasst aus den 16 evaluierten Zelllinien.

Tabelle 25 Mittelwerte und SEM der ΔC_q -Werte der Referenzgene aus allen Messungen der 16 Zelllinien. Der Mittelwert setzt sich aus 16 Einzelwerten zusammen, die wiederum die Mittelwerte aus 3 Messungen pro Zelllinie in Triplikaten (für HeLa 9 Messungen in Triplikaten) darstellen.

	$\Delta(C_{q\text{HPRT1}} - C_{q\text{GAPDH}})$	$\Delta(C_{q\text{SDHA}} - C_{q\text{GAPDH}})$	$\Delta(C_{q\text{SDHA}} - C_{q\text{HPRT1}})$
Mittelwert	4.38	6.09	1.71
SEM	0.18	0.21	0.26

Es zeigt sich, dass das Verhältnis zwischen der Expression von HPRT1 und GAPDH mit einem Wert von 4.38 ± 0.18 (MW \pm SEM) am stabilsten ist. Somit wird dieser ΔC_q -Wert für die Bewertung der Qualität der Expressionsanalyse eingesetzt.

In Tabelle 26 sind die Differenzen der C_q -Werte von GAPDH und HPRT1 für sämtliche untersuchten Zelllinien aufgeführt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM ($n = 3$, für HeLa $n = 9$).

Tabelle 26 $\Delta(C_{qHPRT1}-C_{qGAPDH})$ -Werte für die 16 charakterisierten Zelllinien. Angegeben ist MW \pm SEM ($n = 3$, für HeLa $n = 9$).

Zelllinie	$\Delta(C_{qHPRT1}-C_{qGAPDH})$
A-549	3.99 ± 0.11
HeLa^[a]	4.04 ± 0.18
HL60	3.83 ± 0.32
U-87	$5.60 \pm 0.26^{[b]}$
SK-BR-3	$6.18 \pm 0.11^{[b]}$
SK-MES-1	$3.22 \pm 0.20^{[b]}$
HBL100	4.71 ± 0.19
HMEC	4.04 ± 0.14
A-431	4.75 ± 0.45
U-251	4.31 ± 0.19
MCF-7	4.56 ± 0.31
HepG2	4.86 ± 0.27
MDA-MB 231	$3.63 \pm 0.16^{[b]}$
HT-29	4.40 ± 0.04
Jurkat	$3.82 \pm 0.09^{[b]}$
Molt-4	4.19 ± 0.14

[a] $n = 9$ in Triplikaten, [b] ein Einstichproben t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zum Mittelwert des gesamten Screenings von 4.38.

Mit einem Einstichproben-t-Test wurde überprüft, ob der $\Delta(C_{qHPRT1}-C_{qGAPDH})$ -Wert einer Zelllinie von dem gesamten Mittelwert (4.38) signifikant abweicht. Dies ist bei fünf der 16 getesteten Zelllinien der Fall (U-87, SK-BR-3, SK-MES-1, MDA-MB 231 und Jurkat). Die stärkste Abweichung zeigen dabei SK-BR-3 (6.18 ± 0.11) und SK-MES-1 (3.22 ± 0.20).

Bei diesen fünf Zelllinien kann angenommen werden, dass entweder Messschwankungen die Expressionsanalyse beeinflussen oder die Expression mindestens eines Referenzgens nicht stabil ist. Für die Auswertung der Expression der GSTs sollte dies berücksichtigt werden.

3.3.4 Zelllinien-Screening

Die Expression von GSTP1, GSTM2 und GSTA1 auf RNA-Ebene wurde in 16 Zelllinien evaluiert. Es wurden Zelllinien aus unterschiedlichen Gewebearten und Krebstypen ausgewählt, die in Tabelle 27 zusammengefasst sind. Unter den untersuchten Zelllinien waren auch eine triple-negative breast cancer (TNBC)-Zelllinie und Zelllinien vom Typ Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC), die für die Entwicklung neuer Therapieansätze besonders interessant sind.

Eine derart umfangreiche Analyse von Krebszelllinien in Hinsicht auf ihre GSTP1-Expression wurde bis jetzt nur von *Tew et al.* publiziert. In der 1996 veröffentlichten Studie wurden mehr als 50 Zelllinien mittels quantitativem Northern-Blot auf GSTP-, GSTA- und GSTM-RNA-Expression untersucht und die Konzentration der entsprechenden Proteine bestimmt.^[24] Sieben Zelllinien, die in dieser Veröffentlichung charakterisiert wurden, sind in das hier beschriebene Screening aufgenommen worden (A-549, U-251, Molt-4, HL-60, MCF-7, MDA-MB 231 und HT-29). Somit besteht eine direkte Vergleichsmöglichkeit für diese Zelllinien mit Literaturwerten.

In dem Screening wurde auch die primäre, humane Brustepithelzelllinie HMEC evaluiert, die nicht aus Tumorgewebe stammt, sowie die Brustepithelzelllinie HBL100, die zwar krebszellartiges Verhalten zeigt, aber aus einer gesunden Spenderin isoliert wurde.

Für jede Zelllinie wurde aus mindestens zwei Zellpassagen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um Zellmutationen auszuschließen. Für jede qPCR wurde separat umgeschriebene cDNA eingesetzt. Die qPCR wurde für jede Zelllinie mindestens dreimal in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 27 Gewebeursprung und Krebstyp der 16 Zelllinien, deren GST-Expression charakterisiert wurde.

Gewebe	Zelllinie	Krebstyp
Brust	SK-BR-3 ^[131]	Adenokarzinom (HER2-positiv)
	HBL100 ^[132]	-
	MCF-7 ^[133]	Adenokarzinom (Estrogen-sensitiv)
	MDA-MB 231 ^[134]	Adenokarzinom (TNBC)
	HMEC ^[135]	-
Lunge	SK-MES-1 ^[136]	Plattenepithelkarzinom (NSCLC)
	A-549 ^[131]	Adenokarzinom (NSCLC)
Gehirn	U-251 ^[137]	Glioblastom
	U-87 ^[131]	Glioblastom
Leber	HepG2 ^[138]	Leberzellkarzinom
Haut	A431 ^[133]	Plattenepithelkarzinom
Colon	HT-29 ^[131]	Adenokarzinom
Cervix	HeLa ^[130]	Adenokarzinom
Peripheres Blut	HL-60 ^[139]	Promyelozytenleukämie
	Jurkat ^[140]	T-Zell Leukämie
	Molt-4 ^[141]	Akute lymphatische Leukämie

Zur Auswertung wurden die C_q -Werte, die für das Referenzgen GAPDH ermittelt wurden, von den C_q -Werten der GOIs subtrahiert, um die Vergleichbarkeit zwischen den Werten zu gewährleisten. Je niedriger der ΔC_q -Wert ist, desto höher ist die RNA-Expression in der entsprechenden Zelllinie. In Tabelle 28 sind die ΔC_q -Werte der drei untersuchten GSTs sortiert nach absteigenden $\Delta(C_{qGSTP1}-C_{qGAPDH})$ -Werten dargestellt.

Tabelle 28 Relative Expression von GSTP1, GSTM2 und GSTA1 in Bezug auf die GAPDH Expression für 16 Zelllinien. Angegeben sind MW \pm SEM aus drei Experimenten in Triplikaten.

Zelllinie	$\Delta(C_{qGOI} - C_{qGAPDH})$		
	GSTP1	GSTM2	GSTA1
HMEC	0.253 \pm 0.304	12.4 \pm 0.9	17.2 \pm 0.6
HBL100	0.654 \pm 0.164	11.2 \pm 0.3	19.9 \pm 0.7
SK-MES-1	0.669 \pm 0.143	6.48 \pm 0.21	16.6 \pm 0.15
HT-29	0.813 \pm 0.179	11.6 \pm 0.9	11.1 \pm 0.2
A-431	0.911 \pm 0.056	11.8 \pm 0.3	20.7 \pm 0.8
HeLa^[a]	1.24 \pm 0.16	8.88 \pm 0.31	19.5 \pm 0.41
A-549	2.00 \pm 0.12	9.41 \pm 0.12	15.7 \pm 0.22
HL60	2.02 \pm 0.25	10.8 \pm 0.23	-
Jurkat	2.07 \pm 0.13	7.38 \pm 0.44	21.7 \pm 1.3
MDA-MB 231	2.07 \pm 0.30	5.15 \pm 0.92	19.0 \pm 1.15
U-251	2.09 \pm 0.23	5.23 \pm 0.15	19.8 \pm 1.00
U-87	3.52 \pm 0.14	7.00 \pm 0.11	-
Molt-4	3.85 \pm 0.07	7.35 \pm 0.35	26.1 \pm 0.6
HepG2	16.8 \pm 0.42	7.80 \pm 0.04	6.95 \pm 0.06
SK-BR-3	17.3 \pm 0.12	10.8 \pm 0.03	15.3 \pm 1.4
MCF-7	20.3 \pm 0.8	11.4 \pm 0.3	8.22 \pm 0.35



[a] n = 9 in Triplikaten

Von den 16 evaluierten Zelllinien zeigten 13 eine starke GSTP1-Expression. Die ΔC_q -Werte liegen zwischen 0.253 ± 0.304 (HMEC) und 3.85 ± 0.07 (Molt-4). Die Differenz von circa 3.6 Einheiten entspricht dabei einer ungefähren Änderung in der Expression um den Faktor Zwölf. HMEC, bei der es sich nicht um eine Tumorzelllinie handelt, zeigte die stärkste Expression von GSTP1. In der Literatur wurden keine Vergleichsdaten gefunden, die dieses Ergebnis bestätigen. Allerdings gibt es Hinweise, dass GSTP1 eine protektive Rolle in Brustepithelzellen einnimmt, indem die Zellen vor oxidativem Stress und Karzinogenen geschützt werden.^[142] Promoter-Methylierung und damit Silencing der GSTP1 in gesunden Brustepithelzellen kann zur Tumorgenese führen.^[143] Das hohe GSTP1-Niveau in HMEC ist daher nicht überraschend. Die Krebszelllinie mit der höchsten GSTP1-Expression war HBL100. Eine erhöhte GSTP1 Expression auf Protein-Ebene wurde bereits 1991 in dieser Zelllinie beschrieben.^[144] Auch bei HBL100 handelt es sich um ein Brustepithelzelllinie, allerdings mit krebsartigem Verhalten.^[145] So zeigen die Zellen z.B. Aneuploidie und kontinuierliches Wachstum in Kultur.^[132] Ebenfalls eine sehr hohe GSTP1-RNA-Expression zeigten die Zelllinien SK-MES-1, HT-29 und A-431.

SK-MES-1 ist eine Lungenkrebszelllinie, die nicht nur GSTP1 überexprimiert, sondern auch andere Faktoren die mit MDR in Verbindung stehen wie P-Glykoprotein. *Wang et al.* demonstrierten 2011, dass diese Zelllinie Resistenzen gegen die Chemotherapeutika Doxorubicin und Cisplatin zeigt.^[146] Dies macht SK-MES-1 zu einem sehr interessanten Modellsystem für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen MDR und GSTP1. Daher sind weitere Zellexperimente mit SK-MES-1 sinnvoll, auch wenn die Referenzgene eine geringe Stabilität gezeigt haben (vgl. 3.3.3).

Studien mit HT-29 zeigten erhöhte Protein- und Aktivitäts-Niveaus der GSTP1, was mit deren RNA-Expression korreliert. Die Studie von *Zhang et al.* demonstrierte, dass auch andere Kolonkarzinom-Zelllinien deutlich mehr GSTP1 exprimieren als gesunden Kolonzellen.^[147] Darüber hinaus gibt es Untersuchungen in Biopsiegewebe von Kolonkarzinom-Patienten, die nahelegen, dass das GSTP1-Niveau im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erhöht ist und GSTP1 ein klinisch relevanter Faktor ist.^[148]

Für A-431 liegen keine Vergleichswerte aus der Literatur für die GSTP1-Expression auf RNA- oder Protein-Ebene vor.

A-549, HL60, Jurkat, U-251 und MDA-MB 231 zeigten nahezu die gleichen $\Delta(C_{qGSTP1}-C_{qGAPDH})$ -Werte. Dies stimmt nicht mit den Werten von *Tew et al.* überein, die eine deutliche Abstufung um einen Faktor von ca. 2.5 zwischen der RNA-Expression in A-549 zu HL60 und MDA-MB 231 bestimmt haben.^[24] Dies würde sich in einer Differenz der ΔC_q -Werte von mindestens eins widerspiegeln. U-251 zeigt in dieser Publikation noch deutlich höhere RNA-Werte als A-549. Demgegenüber zeigen andere Publikationen hohe GSTP1-Aktivität in HL60- und MDA-MB 231-Zellen, die hohe RNA-Expression in diesen Zellen wahrscheinlich machen^[149]

Für Molt-4 stimmt die moderate RNA-Expression von GSTP1, die in diesem Screening bestimmt wurde, ungefähr mit jener aus der Publikation von *Tew et al.* überein.

SK-BR-3, MCF-7 und HepG2 zeigen die geringste GSTP1-Expression. Die Werte für diese Zelllinien sind um mehrere Größeneinheiten kleiner als für die übrigen Zelllinien. Es gibt Veröffentlichungen, welche die niedrige GST-Expression für MCF-7 bestätigen.^[24, 150] Für HepG2 und SK-BR-3 liegen keine Vergleichswerte für die Expression von GSTP1 in der Literatur vor. Auffällig ist, dass die TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 eine hohe GSTP1-Expression aufweist, SK-BR-3 und MCF-7 die nicht tripelnegativ sind, also Estrogenrezeptor oder HER2 exprimieren, kaum GSTP1 enthalten. Die Therapieoptionen für TNBC sind per se limitiert, GSTP1-Überexpression könnte diese Problematik wahrscheinlich noch verstärken.^[151]

GSTA1 und GSTM2 werden in deutlich geringerem Maße als GSTP1 in den evaluierten Zelllinien exprimiert. Besonders für GSTA1 wurden sehr niedrige RNA-Niveaus nachgewiesen. Für 14 der 16 Zelllinien lag der $\Delta(C_{qGSTM2}-C_{qGAPDH})$ -Wert über 15. Nur HepG2 und MCF-7 zei-

gen eine vermehrte GSTA1-Expression. Da GSTA1 in der Leber exprimiert wird, um Xenobiotika zu metabolisieren, ist eine erhöhte Expression in der Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 erwartungsgemäß.^[17]

Auch GSTM2 wird deutlich schwächer exprimiert als GSTP1. Die höchste Expression zeigen MDA-MB 231 und U-251. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von *Tew et al.*^[24] Allerdings wurden in beiden Zelllinien höhere GSTP1 als GSTM2-Niveaus ermittelt. Damit ist GSTM2 nicht die dominierende GST-Klasse in diesen Zelllinien. Es konnte keine Tumorzelllinie identifiziert werden die geringe GSTP1-Mengen beinhaltet, aber eine starke GSTM2-Expression zeigt.

Die systematische Evaluation der GSTP1-RNA-Expression hat gezeigt, dass GSTP1 in Krebszelllinien sehr häufig überexprimiert wird und die dominante GST-Klasse in Krebszellen darstellt. Dabei ist der Gewebsursprung der Zelllinien nicht entscheidend.

GSTM2 und GSTA1 kommen dagegen in niedrigeren Konzentrationen vor.

Als Zelllinien für weitere Testungen wurden HBL100 und SK-MES-1 ausgewählt. Dies sind die Krebszelllinien mit den höchsten GSTP1-Spiegeln auf RNA-Ebene. HBL100 zeigt neben sehr hoher GSTP1-Expression kaum Expression von GSTM2 und GSTA1. Damit ist HBL100 eine geeignete Zelllinie, um den Einfluss von Inhibitoren selektiv auf GSTP1 zu untersuchen.

SK-MES-1 zeigt zwar eine etwas stärkere Expression von GSTM2, dennoch ist GSTP1 die dominante GST in dieser Zelllinie. SK-MES-1 ist aufgrund der bekannten Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika als Modell für therapieresistente Tumoren von Interesse.^[146]

Als Zelllinie für mögliche Selektivitätstestungen von Inhibitoren im Zellversuch oder im Zelllysate wurde HepG2 ausgewählt. Diese Krebszelllinie exprimiert kaum GSTP1, dafür aber höhere Level an GSTM2 und GSTA2. Ob diese Mengen jedoch für weitergehende Experimente in Zellen ausreichend sind, ist unklar.

Zusätzlich wurde MCF-7 als Referenz ausgewählt. In dieser Zelllinie werden nur sehr geringe Mengen an GSTM2 und GSTP1 exprimiert. Mithilfe dieser Zelllinie können jene Effekte auf Zellen untersucht werden, die nicht durch GST vermittelt werden.

3.3.5 Analyse der Proteinexpression

Mithilfe von Western-Blots, wurde überprüft, ob die in Kapitel 3.3.4 bestimmten RNA-Niveaus von GSTP1 auf die Proteinexpression übertragbar sind. Dafür wurden für vier Zelllinien Zelllysate hergestellt. Zu den vier Zelllinien gehören die beiden stark GSTP1-exprimierenden Zelllinien SK-MES-1 und HBL100 und die Zelllinien MCF-7 und HepG2, die kaum GSTP1 exprimieren. Pro Zelllinie wurden 50 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die hergestellten Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Auf

dieser wurde GSTP1 mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Immundetektion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 zusammengefasst. Die SDS-PAGE zeigt eine gleichmäßige Beladung und Auftrennung der Banden.

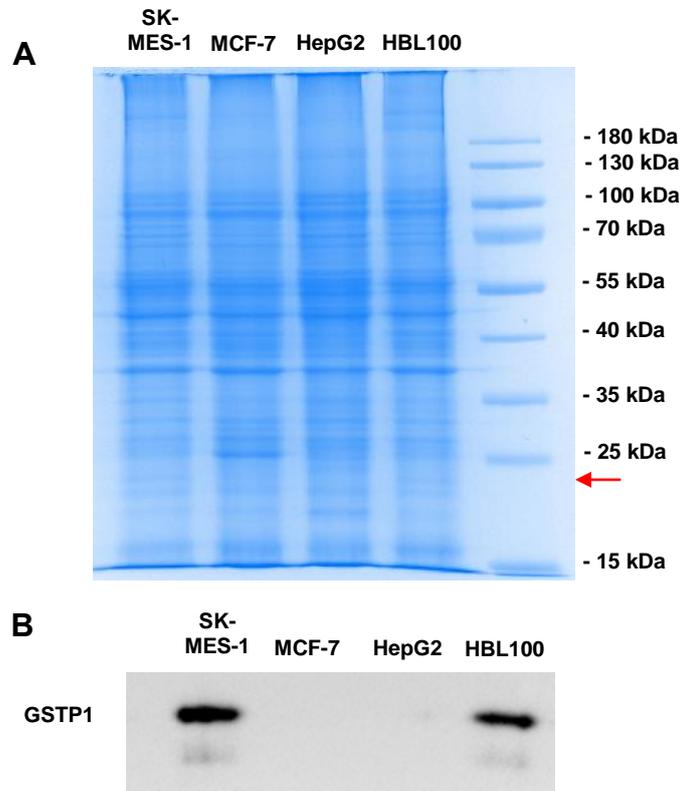


Abbildung 51 A) Auftrennung der Zelllysate mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau. **B)** Detektion von GSTP1 (23 kDa) mittels Western-Blot.

Mittels Western Blot konnte die Expression des GSTP1-Proteins in SK-MES-1 und HBL100 nachgewiesen werden. In diesen Zelllinien ist eine hohe GSTP1-Expression zu erkennen. Unter den GSTP1-Banden bei 23 kDa sind zusätzlich schwächere Banden erkennbar, die auf GSTP1-Fragmente hinweisen.

Wie zu erwarten, konnte in HepG2 und MCF-7 keine GSTP1 nachgewiesen werden.

Damit wurde gezeigt, dass die Ergebnisse der qPCR auf die Proteinexpression übertragbar sind und eine hohe RNA-Expression mit einer hohen Proteinexpression einhergeht.

3.4 Testungen im Zelllysate

Die Charakterisierung von Substanzen mithilfe von Zelllysate ist ein Zwischenschritt zwischen den biochemischen Untersuchungsverfahren an isolierten Enzymen und den zellulären Assays. Limitierungen zellulärer Assays wie mangelnde Membranpermeabilität oder unspezifische Zytotoxizität von Verbindungen werden hierdurch zunächst umgangen. Dennoch ist der Einsatz von Zelllysaten eine Annäherung an die *in-vivo*-Situation, da der gesamte Zellinhalt für die Testungen eingesetzt wird.

Es wurden zwei Zelllinien, die eine hohe GSTP1-Expression zeigen (HBL100 und SK-MES-1) und zwei Zelllinien mit niedriger GSTP1-Expression (HepG2 und MCF-7) für Zelllysate-Studien ausgewählt. Die Zelllysate wurden mithilfe des Detergens Triton X-100 und Ultraschall hergestellt (vgl. Kapitel 6.1.3). Die anschließende Testung erfolgte analog zu dem in Kapitel 3.2 beschriebenen spektrophotometrischen GST-Inhibitions-Assay, es wurde lediglich anstelle von Enzymlösung Zelllysate eingesetzt. Als nicht-enzymatische Kontrolle diente Lysepuffer. Wenn nicht anders beschrieben, wurde Zelllysate mit einem Gesamtproteingehalt von 2 mg/ml eingesetzt. Die Testungen erfolgten bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB. Zusätzlich zu dem zugesetzten GSH enthielten die lysierten Zellen unterschiedliche Mengen an aktivem GSH, das die Messungen beeinflussen könnte (vgl. Kapitel 3.5.1).

3.4.1 Validierung des Assays

Zunächst wurde der Einfluss der Triton X-100-Konzentration auf die GST-Aktivität im Zelllysate untersucht. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergens, welches häufig zur Zelllyse eingesetzt wird, da es nicht zur Denaturierung von Proteinen führt.^[152] Für Aktivitätsstudien der GSTP1 sind Triton X-100-Konzentrationen im Zelllysate bis zu 1% beschrieben.^[150b] Der Einfluss von drei unterschiedlichen Triton-X-100 Konzentrationen im Lysepuffer (0.1, 0.5 und 1%) auf die GST-Aktivität in HBL100- und SK-MES-1-Lysate wurde evaluiert (Tabelle 29).

Tabelle 29 Einfluss der Triton X-100 Konzentration im Lysepuffer und Einfluss der Lagerung des Lysates auf die GST-Aktivität. Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt; die Gesamtproteinkonzentration der Zelllysate war 2 mg/ml. Dargestellt sind MW \pm SEM (n = 3 in Triplikaten).

V_E (mOD/s)			
Triton X-100	HBL100	SK-MES-1	Lagerung
1% (v/v)	1.24 \pm 0.18	1.06 \pm 0.08	frisch lysiert
1% (v/v)	1.10 \pm 0.08	1.41 \pm 0.01	min. 48 h bei -80 °C
0.5% (v/v)	1.12 \pm 0.03	1.60 \pm 0.18	frisch/gefroren
0.1% (v/v)	1.56 \pm 0.13	1.82 \pm 0.02	frisch/gefroren

Die Triton X-100-Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die GST-Aktivität in HBL100-Zelllysate (ermittelt mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse). Die Aktivitäten lagen zwischen 1.12 ± 0.03 und 1.56 ± 0.13 mOD/s.

Dagegen wurde die GST-Aktivität in SK-MES-1-Lysat signifikant von der Triton X-100-Konzentration beeinflusst (ermittelt mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse). Das Absenken der Detergens-Konzentration von 1 auf 0.5% führte zu einer signifikanten GST-Aktivitätssteigerung (ermittelt durch ungepaarten t-Test). Ein möglicher Grund dafür könnte das Zerfallen der dimeren Struktur der GST bei hoher Detergens-Konzentration sein, da bekannt ist, dass Triton X-100 einen Effekt auf die Dimerisierung von Proteinen haben kann.^[153] Da dieser Effekt bei HBL100-Zelllysate nicht erkennbar war, sollte GSTP1 davon aber nicht betroffen sein. Für die weiteren Experimente wurde eine Triton X-100-Konzentration von 1% im Lysepuffer verwendet, um eine einheitliche GST-Aktivität in den Lysaten zu gewährleisten.

Zusätzlich wurde die Lagerstabilität des Lysats evaluiert. Dafür wurde in dem 1% Detergens enthaltenden Lysat direkt nach der Zelllyse die GST-Aktivität bestimmt. Anschließend wurde das Lysat bei -80 °C für mindestens 48 h gelagert und die GST-Aktivität erneut ermittelt. Während die Lagerung bei -80 °C auf die GST-Aktivität im HBL100-Lysat keinen signifikanten Einfluss hatte, nahm die Aktivität in SK-MES-1-Lysat signifikant zu (ermittelt durch ungepaarten t-Test). Damit wurde gezeigt, dass die Zelllysate bei -80 °C lagerstabil sind und es nicht zu einem Aktivitätsverlust der GST kommt. Weitere Untersuchungen wurden sowohl mit frisch lysierten Zellen als auch mit für mehrere Tage (bis zu 96 h) gelagertem Lysat durchgeführt.

In einem weiteren Experiment wurde der lineare Zusammenhang zwischen Gesamtproteinmenge des Lysats und der GST-Aktivität nachgewiesen. Dafür wurde die GST-Aktivität in fünf Lysatverdünnungen mit Gesamtproteinmengen zwischen 0.25 und 2 mg/ml und einem Leerwert bestimmt. Die Ergebnisse für HBL100 und SK-MES-1 sind in Abbildung 52 dargestellt.

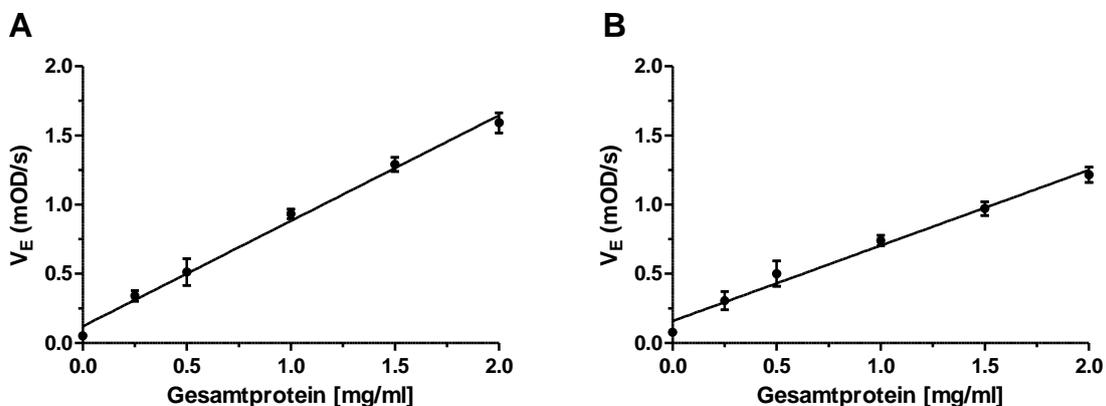


Abbildung 52 Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Gesamtproteinmenge des Zelllysats von SK-MES-1 (A), und HBL100 (B). Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt. Dargestellt sind MW \pm SEM ($n = 3$ in Triplikaten).

Die Zelllysate beider Zelllinien zeigten über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich einen linearen Zusammenhang zwischen Gesamtproteinmenge und GST-Aktivität. Der Sättigungsbereich der GST-Aktivität wird auch bei der höchsten Konzentration von 2 mg/ml nicht erreicht. Dabei war die GST-Aktivität im SK-MES-1-Lysat höher als im HBL100-Lysat. Dies könnte an der höheren GSTA1 und GSTM2-Menge in SK-MES-1 gelegen haben (vgl. 3.3.4), da das eingesetzte Substrat CDNB nicht spezifisch für GSTP1 ist. Beide Zelllysate zeigen bei 2 mg/ml Gesamtprotein ausreichende Aktivität, um Substanzen bei dieser Proteinmenge evaluieren zu können.

Zusätzlich zu SK-MES-1 und HBL100 wurden MCF-7- und HepG2-Zellen lysiert und auf GST-Aktivität untersucht. Beide Zelllinien exprimieren nur geringe Mengen an GSTP1, dafür jedoch etwas höhere Mengen an GSTM2 und GSTA1 (vgl. 3.3.4). Die GST-Aktivitäten in den Lysaten dieser Zelllinien sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30 GST-Aktivität in MCF-7- und HepG2-Lysaten. Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt; die Gesamtproteinkonzentration der Zelllysate war 2 mg/ml. Dargestellt sind MW \pm SEM (n = 3 in Triplikaten).

Triton X-100	V_E (mOD/s)	
	HepG2	MCF-7
1% (v/v)	0.024 \pm 0.009	0.020 \pm 0.012

Die Lysate beider Zelllinien zeigten nahezu keine GST-Aktivität, so dass diese nicht als Negativkontrollen genutzt werden konnten. Um für Selektivitätsstudien Zelllinien mit ausreichender GSTM2 oder GSTA1 zur Verfügung zu haben, müssten diese Proteine von den Zellen transgen produziert werden, d.h. das entsprechende genetische Material durch Transfektion eingebracht werden. Die Transfektion humaner Krebszelllinien mit der cDNA von GSTs ist möglich, wie *Johansson et al.* am Beispiel von MCF-7 zeigen konnten.^[154] Für die vorliegende Arbeit standen jedoch keine Möglichkeiten für Selektivitätstestungen in Zellen oder Zelllysaten zur Verfügung.

3.4.2 IC₅₀-Bestimmungen in Zelllysaten

Nachdem gezeigt wurde, dass bei einer Gesamtproteinmenge von 2 mg/ml die GST-Aktivität in HBL100- und SK-MES-1-Lysat für Inhibitionsstudien ausreichend ist, wurden der IC₅₀-Wert, der Hill-Koeffizient n und die Restaktivität $v_{[I] \rightarrow \infty}$ von vier Verbindungen ermittelt. Zu den vier Substanzen gehört die Referenzverbindung Etacrynsäure **47**, die beiden hochaktiven 1,2,4-

Trioxane **35c** und **36c**, sowie die etwas weniger aktive Verbindung **40c** (Strukturformeln vgl. 3.2.9). Die Ergebnisse im Vergleich zu den Daten an hpGST sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 Inhibition von hpGST und GST in HBL100- und SKMES1-Lysaten durch die Verbindungen **35c**, **36c**, **40c** und **47**. Angegeben sind der IC₅₀-Wert (μM), der Hill-Koeffizient (n) und die Restaktivität $v_{[I] \rightarrow \infty}$ (%). Dargestellt sind MW ± SEM (n = 3 in Triplikaten).

Verbindung	hpGST	HBL100 ^[b]	SK-MES-1 ^[b]
35c	2.90 ± 0.65 ^[a] n = 1.95 ± 0.28	0.222 ± 0.010 (*) n = 0.788 ± 0.043	0.729 ± 0.193 (ns) n = 0.457 ± 0.012
36c	2.38 ± 0.59 n = 1.41 ± 0.08	0.412 ± 0.078 (*) n = 0.857 ± 0.133	0.638 ± 0.012 (*) n = 0.734 ± 0.097
40c	9.60 ± 0.35	4.90 ± 0.33 (***)	5.75 ± 0.75 (**) $v_{[I] \rightarrow \infty} = 21.1 \pm 0.04$
47	30.9 ± 0.6	18.8 ± 0.3 (***) n = 0.883 ± 0.049	13.5 ± 1.04 (***) n = 0.838 ± 0.022

[a] MW ± SEM (n = 6 in Triplikaten) [b] Die statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test ist in Klammern angegeben und vergleicht die IC₅₀-Werte, die an hpGST gemessen wurden, mit denen an Zelllysaten (ns P > 0.05, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001).

An der GST im HBL100-Lysat und im SK-MES-1-Lysat waren die IC₅₀-Werte aller vier Verbindungen niedriger als an isolierter hpGST. Bis auf den IC₅₀-Wert der Verbindung **35c** an GST im SK-MES-1-Lysat lagen für alle Werte statistisch signifikante Unterschiede vor. Für **47** und **40c** waren die IC₅₀-Werte an GST in beiden Zelllysaten um ca. Faktor zwei niedriger als an hpGST. Für die 1,2,4-Trioxane **35c** und **36c** war der Zugewinn an Aktivität noch ausgeprägter. Die mit Zelllysate gemessenen IC₅₀-Werte (im dreistellig nanomolaren Bereich) waren bis zu einer Größenordnung geringer als entsprechende Werte an hpGST.

Auffällig war, dass der Hill-Koeffizient für die Verbindungen **35c**, **36c** und **47** kleiner als eins war. Für die 1,2,4-Trioxane **35c** und **36c** wurde an hpGST ein Hill-Koeffizient von mehr als eins bestimmt, so dass hier wahrscheinlich mehr als ein Inhibitor-Molekül an der Inhibition eines hpGST-Moleküls beteiligt war (vgl. 3.2.9). Ein Hill-Koeffizient von weniger als eins deutet auf eine negative Kooperativität oder auf eine Interaktion des Inhibitors mit verschiedenen Bindungstaschen, die eine unterschiedliche Affinität zum Inhibitor aufweisen, hin.^[155] Da die untersuchten Zelllinien primär GSTP1 exprimieren und diese in ihren physikochemischen und kinetischen Eigenschaften identisch zur hpGST ist, erscheint eine Veränderung des Hemmtyps nicht plausibel.^[105] Wahrscheinlicher ist, dass andere GST-Klassen, deren Expression nicht überprüft wurden, z.B. mikrosomale GST, ebenfalls mit den Inhibitoren interagieren und zu einer Veränderung der Hill-Koeffizienten führen. Dass GSTM2 oder GSTA1 die Mes-

sungen beeinflussen ist unwahrscheinlich, da die GST-Aktivität in HepG2 sehr niedrig ist, obwohl diese Zelllinie die höchste GSTA1-Expression und hohe GSTM2-Expression zeigt. Die Expression dieser GST-Klassen ist in HBL100 und SK-MES-1 niedriger als in HepG2, so dass die Aktivität der beiden Enzyme keine Rolle spielen sollte.

Eine andere Erklärung für die niedrigen Hill-Koeffizienten ist, dass die GSH-Mengen, die bereits im Zelllysate vorhanden sind, mit CDNB reagieren, bevor das zum Assaygemisch hinzugegebene GSH die Reaktion startet. Dies führt möglicherweise zu einer schwachen Verzerrung der Messergebnisse.

In Abbildung 53 ist die Inhibition von hpGST (\blacktriangle) und von GST im SK-MES-1-Lysat (\bullet) durch Verbindung **36c** dargestellt. Für den im SK-MES-1-Lysat bestimmten IC_{50} -Wert ist eine deutliche Verschiebung zu niedrigeren Werten erkennbar, einhergehend mit einer Veränderung des Hill-Koeffizienten.

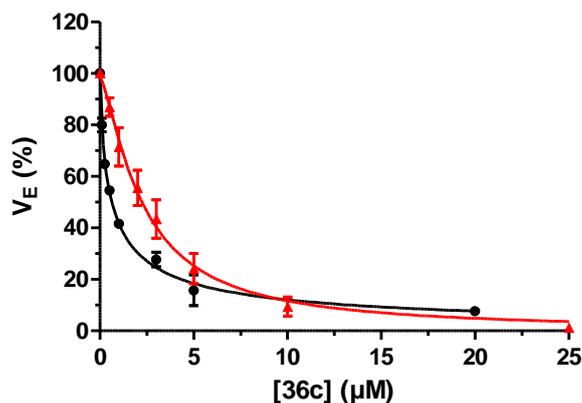


Abbildung 53 Inhibition von hpGST (\blacktriangle) und GST in SK-MES-1-Zelllysate (\bullet) durch Verbindung **36c**. Die Testungen wurden bei 1 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt. Messungen mit SK-MES-1 erfolgten mit einer Gesamtproteinmenge von 2 mg/ml. Dargestellt sind MW \pm SEM (n=3).

Zusammenfassend war die Testung der 1,2,4-Trioxane in Zelllysaten erfolgreich. Die Inhibitoren zeigten höhere Aktivität gegenüber der GST in HBL100- und SK-MES-1-Zellen als gegenüber isolierter hpGST oder rhGSTP1. Damit ist der erste Schritt zum Effektivitätsnachweis in lebenden Krebszellen gelungen. Die Inhibitoren werden nicht durch unspezifische Bindung oder Abbau durch andere Enzyme im Zelllysate inaktiviert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere GST-Klassen außer GSTP1, GSTM2 und GSTA1 in den Zellen inhibiert werden oder andere Enzyme und zelluläre Bindungspartner mit den 1,2,4-Trioxanen interagieren und so die Inhibitionsstudien beeinflussen. So wird z.B. der Einfluss von mikrosomaler GST auf MDR diskutiert.^[154]

3.5 Zelluläre Studien

Nachdem die Untersuchungen der 1,2,4-Trioxane am isolierten Enzym und in Zelllysaten zur Identifikation einer Leitstruktur im hohen nanomolaren Bereich geführt haben, war der nächste Schritt für die Charakterisierung von GST-Inhibitoren die zelluläre Testung. Dafür sollte ein Assay entwickelt werden, der auf einem Fluoreszenzsensor beruht, mit dem intrazelluläre GSTP1 quantifiziert werden kann, da derzeit ein solcher Assay nicht kommerziell erhältlich ist. In der Literatur sind wenige Sensoren für die intrazelluläre Quantifizierung der GST-Aktivität beschrieben.^[150b, 156] Die Möglichkeiten besagter Sensoren werden in diesem Kapitel diskutiert. Zusätzlich wurden Zytotoxizitätsstudien durchgeführt, um den allgemeinen Effekt der 1,2,4-Trioxane auf Krebszellen zu evaluieren. Da GSTP1 nicht nur für den Metabolismus von Chemotherapeutika verantwortlich ist, sondern auch über Interaktion mit dem JNK-Signalweg die Apoptose in Krebszellen unterdrückt, besteht die Möglichkeit, dass effektive GSTP1-Inhibitoren einen zytotoxischen Effekt gegen GSTP1-exprimierende Zellen haben.^[31a]

3.5.1 Zelluläre GSH-Konzentrationen

Für die Zelllinien HBL100 und SK-MES-1 wurden die intrazelluläre GSH- und GSSG (Glutathiondisulfid)-Konzentration mithilfe des GSH/GSSG-GloTM Assays der Firma *Promega* ermittelt. Der Assay beruht auf der Freisetzung von Luciferin infolge der GST-katalysierten Reaktion eines GST-spezifischen Luciferin-Derivats mit GSH nach Zellyse. Das freigesetzte Luciferin wird mit einer Luciferase umgesetzt, wobei die resultierende Lumineszenz proportional zur GSH-Konzentration in der ursprünglichen Probe ist.

Die Quantifizierung der GSH-Konzentration erfolgte mit einer einmalig gemessenen Standardgeraden mit sieben GSH-Konzentrationen im Bereich von 0.25 bis 16 μM und einem Leerwert (Abbildung 54). Die Standardgerade zeigte Linearität über den gesamten Messbereich. Für die Bestimmung der GSSG-Konzentration wurden die Konzentrationen der Standardgeraden halbiert.

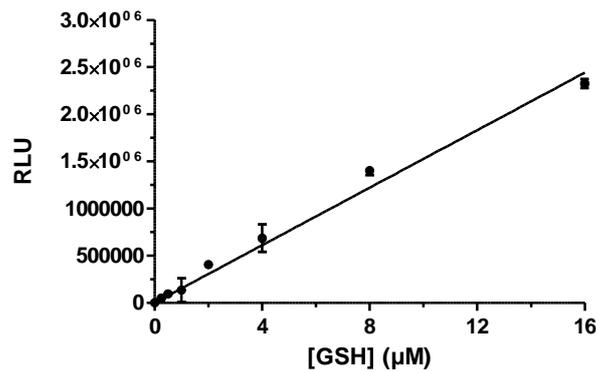


Abbildung 54 Die Glutathion-Standardgerade bestimmt mit dem GSH/GSSG-Glo™ Assay. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Der abgedeckte Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,25 und 16 µM GSH. Dargestellt sind MW ± SD (n = 1 in Triplikaten).

Zur Bestimmung der GSH- und GSSG-Konzentrationen wurden 2×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Assay entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die in Tabelle 32 aufgeführten Konzentrationen beziehen sich auf die GSH- und GSSG-Konzentrationen pro Well nach der Zellyse.

Tabelle 32 GSH- und GSSG-Konzentrationen im HBL100- und SK-MES-1-Zellysate nach 24 h Inkubation von 2×10^4 Zellen in 96-Well-Platten und anschließender Zellyse. Angegeben sind MW ± SEM (n = 3 in Triplikaten).

	HBL100 (µM)	SK-MES-1 (µM)
GSH	10.8 ± 1.1	17.9 ± 0.5
GSSG	0.286 ± 0.060	0.520 ± 0.060

Mit dem GSH/GSSG-Glo™ Assay können keine absoluten GSH-Konzentrationen in Zellen bestimmt werden, da die genaue Zellzahl pro Well unbekannt ist; es kann nur ein relativer Vergleich untersuchter Zelllinien erfolgen.

So geht aus dem Assay hervor, dass SK-MES-1 ein signifikant höheres GSH-Niveau als HBL100 aufweist (ermittelt durch ungepaarten t-Test). Es ist bekannt, dass hohe intrazelluläre GSH-Konzentrationen in Krebszellen mit deren metastatischer Aktivität und Zellproliferation korrelieren, sodass für SK-MES-1 hohe GSH-Niveaus zu erwarten sind.^[157]

Das Detektionsprinzip der in der Literatur beschriebenen Sensoren für zellbasierte GST-Assays beruht auf Fluoreszenzaktivierung durch Umsetzung mit GSH.^[156] Somit sind neben hohen GSP1-Konzentrationen hohe GSH-Konzentrationen für zellbasierte GST-Assay-Systeme sinnvoll und SK-MES-1 ist somit die favorisierte Zelllinie für weitere Studien.

GSSG ist ein Indikator für oxidativen Stress in Zellen.^[157] Die Ratio GSH/GSSG liegt in Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, zwischen eins und zehn, ruhende Zellen zeigen ein Verhältnis zwischen 50 und 100.^[158] Bei den untersuchten Zelllinien lag das Verhältnis bei etwas über 30.

3.5.2 Zytotoxizität der 1,2,4-Trioxane

Mithilfe des CellTiter-Glo[®] Assays der Firma *Promega* wurde die Referenzsubstanz Etacrynsäure **47** und das als Leitsubstanz identifizierte 1,2,4-Trioxan **36c** auf Zytotoxizität hin untersucht. Dieser Assay beruht auf der Quantifizierung von ATP mittels Luciferase-katalysierter Umsetzung von Luciferin unter ATP-Verbrauch. Die entstehende Lumineszenz ist proportional zur Zellviabilität. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers in 384-Well-Platten mit einem Gesamtvolumen von 40 oder 100 μ l.

Da die Verbindungen **47** und **36c** für die Zytotoxizitätsbestimmung in DMSO gelöst werden müssen, wurde der Effekt von DMSO auf die GSP1-exprimierenden Zelllinien HBL100 (grau) und SK-MES-1 (blau) evaluiert (Abbildung 55). Die Endkonzentration an DMSO bei den Testungen sollte möglichst nicht toxisch sein, aber dennoch die Löslichkeit der Testsubstanzen sicherstellen.

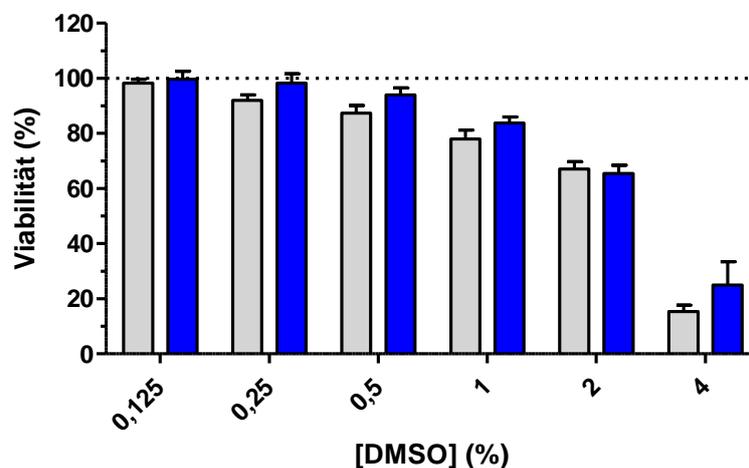


Abbildung 55 Zytotoxizität von DMSO auf HBL100 (grau) und SK-MES-1 (blau) ermittelt mithilfe des CellTiter-Glo[®] Assays. Es wurden 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der DMSO-Zugabe wurde erneut 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor der CellTiter-Glo[®] Assay durchgeführt wurde. Die Werte sind normalisiert auf den Leerwert ohne DMSO. Angegeben sind MW \pm SEM (n = 3 in Quadruplikaten). Die gepunktete Linie gibt 100% Viabilität an.

Beide Zelllinien zeigten bei DMSO-Konzentrationen von mehr als 0.5% eine deutliche Abnahme der Viabilität. Bei 0.5% DMSO lag der Viabilitätsverlust für SK-MES-1 bei $5.96 \pm 2.49\%$, für HBL100 bei $12.6 \pm 2.7\%$. Somit zeigte SK-MES-1 eine etwas bessere DMSO-Toleranz als

HBL100. Darüber hinaus ist die GST-Aktivität und die GSH-Konzentration in SK-MES-1 höher als in HBL100 (vgl. 3.4.1 und 3.5.1), weshalb die Zytotoxizität der Verbindungen **47** und **36c** an dieser Zelllinie bestimmt wurde. Die Untersuchungen wurden bei 0.5% DMSO durchgeführt, da bei dieser Konzentration das Verhältnis von DMSO-Toxizität zu Substanzlöslichkeit am vorteilhaftesten ist.

Die Zytotoxizität von Etacrynsäure **47** wurde an SK-MES-1 (grau) und MCF-7 (blau) bestimmt (Abbildung 56). Da MCF-7 nahezu keine GST-Expression zeigte, können an dieser Zelllinie zytotoxische Effekte, die nicht GST-vermittelt sind, nachgewiesen werden. Der Assay wurde bei fünf Etacrynsäure-Konzentrationen im Bereich von 20 bis 400 μM durchgeführt; zusätzlich wurde ein Leerwert ohne Substanz mit 0.5% DMSO ermittelt und zu 100% Viabilität gesetzt.

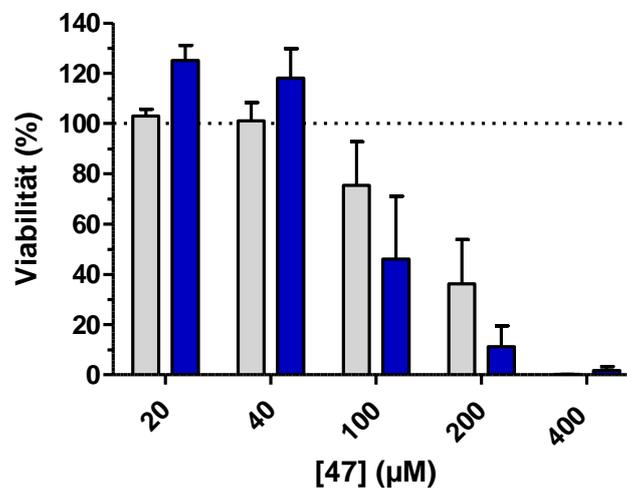


Abbildung 56 Zytotoxizität von Verbindung **47** auf SK-MES-1 (grau) und MCF-7 (blau) ermittelt mithilfe des CellTiter-Glo[®] Assays. Es wurden 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Substanzzugabe wurde erneut 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor der CellTiter-Glo[®] Assay durchgeführt wurde. Die Werte sind normalisiert auf den Leerwert. Angegeben sind MW \pm SEM (n = 3 in Quadruplikaten). Die gepunktete Linie gibt 100% Viabilität an.

Bei Konzentrationen bis zu 40 μM zeigte Etacrynsäure keine zytotoxischen Effekte auf SK-MES-1 und MCF-7. Bei niedrigen Konzentrationen scheint Etacrynsäure die Proliferation von MCF-7 sogar zu steigern. Ein proliferativer Effekt bei niedrigen Konzentrationen von **47** auf die Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 wurde ebenfalls von *Aizawa et al.* 2003 gezeigt.^[159] Bei Konzentrationen ab 100 μM wirkt Etacrynsäure auf beide Zelllinien stark zytotoxisch, wobei es keinen signifikanten Unterschied der Toxizität gegen SK-MES-1 und MCF-7 gibt (ermittelt mit ungepaartem t-Test). Dies lässt darauf schließen, dass die durch Etacrynsäure verursachte Toxizität nicht GSTP1 vermittelt ist, was mit Literaturdaten übereinstimmt.^[149b]

Die Toxizität von Verbindung **36c** wurde an SK-MES-1 bei drei Konzentrationen (1, 2 und 20 μM) bestimmt. Dabei war 20 μM die höchst mögliche Konzentration, bei der die Verbindung noch in Lösung vorlag; die niedrigeren Konzentrationen liegen im Bereich des IC_{50} -Wertes an der GST im SK-MES-1-Lysat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 dargestellt. Die Normalisierung erfolgte dabei auf den Leerwert ohne Inhibitor.

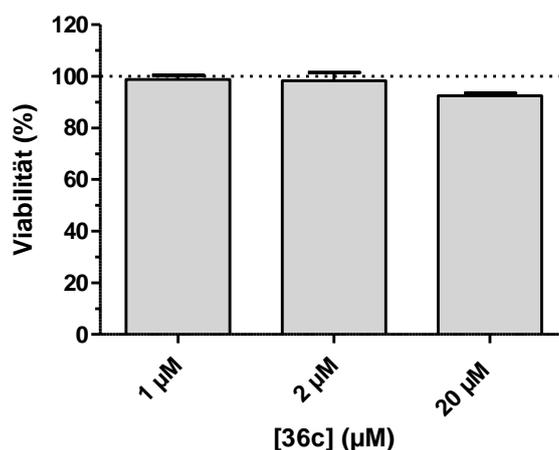


Abbildung 57 Zytotoxizität von Verbindung **36c** auf SK-MES-1 ermittelt mithilfe des CellTiter-Glo[®] Assay. Es wurden 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Substanzzugabe wurde erneut 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor der CellTiter-Glo[®] Assay durchgeführt wurde. Die Werte sind normalisiert auf den Leerwert. Angegeben sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ($n = 3$ in Quadruplikaten). Die gepunktete Linie gibt 100% Viabilität an.

Verbindung **36c** zeigte bei der höchsten getesteten Konzentration von 20 μM keine Zytotoxizität gegenüber SK-MES-1. Dies entspricht mehr als dem 30fachen der IC_{50} -Konzentration dieser Verbindung **36c** in SK-MES-1-Lysat. Da Verbindung **36c** keine zytotoxischen Effekte gegenüber SK-MES-1 zeigt, wurde auf die Testung an MCF-7 verzichtet.

Die fehlende Zytotoxizität des 1,2,4-Trioxanderivats **36c** könnte auf mangelnde Membranpermeabilität zurückzuführen sein. Von niedermolekularen Verbindungen werden Verbindungen mit einem Molekulargewicht von bis zu 500 g/mol gezählt. Die Verbindung **36c** weist mit 473 g/mol ein sehr hohes Molekulargewicht und kaum hydrophile Reste auf.^[160] Andererseits ist das nur schlecht wasserlösliche 1,2,4-Trioxan Artemisinin sehr gut Zellmembran-gängig.^[161] Eine weitere Erklärung für die mangelnde Toxizität könnten Instabilitäten der 1,2,4-Trioxane sein. In der Literatur liegen keine Informationen über das Verhalten der 1,2,4-Trioxanverbindungen in wässriger Lösung bei 37 °C vor. Möglicherweise zerfällt Verbindung **36c**, bevor sie die Zellmembran passiert hat.

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass Verbindung **36c** die katalytische Aktivität der GSTP1 auf zellulärer Ebene hemmt, nicht aber die Interaktion zwischen GSTP1 und der JNK beeinflusst. Bei der JNK-GSTP1-Interaktion handelt es sich um die Komplexbildung eines GSTP1 Monomers mit der Kinase.^[31a] Die Bindung eines Inhibitors muss diese Interaktion

nicht zwangsläufig stören. Wäre dies für die niedermolekularen 1,2,4-Trioxane der Fall, würden GSTP1-vermittelte Arzneimittelresistenzen zwar durch **36c** umgangen werden, der Inhibitor würde aber keine Apoptose in Krebszellen auslösen.

Welcher Sachverhalt zutreffend ist, könnte durch einen zellulären GST-Assay aufgeklärt werden.

3.5.3 Zellulärer GST-Assay

Ein Assaysystem, mit dem die GST-Aktivität in lebenden Zellen detektiert werden kann, ist notwendig für die weitere Charakterisierung der 1,2,4-Trioxanderivate.

In der Literatur finden sich fluoreszenzbasierte Sensoren, die durch eine GST katalysierte Reaktion mit GSH aktiviert werden. *Fujikawa et al.* berichteten von einem GST-Substrat mit einem Aminofluoreszein-Grundgerüst, das membranpermeabel ist und bei Umsetzung mit GSH eine starke Fluoreszenz zeigt.^[162] Ein anderer Ansatz ist von *Alander et al.* 2009 veröffentlicht worden.^[150b] Durch Bindung der primären Aminofunktionen des Rhodamingrundgerüsts an 2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure wird die Fluoreszenz des Rhodamins gelöscht. Bei Umsetzung mit GSH wird GST-katalysiert Rhodamin frei und dessen Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 522 nm messbar. Ein ähnlicher Sensor wurde ebenfalls auf Basis des Kristallviolett publiziert.^[163]

Die Synthese einer der genannten Sensoren war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da solche Synthesen sehr zeitaufwendig sind und sich die Aufreinigung als kompliziert herausgestellt hat. Darüber hinaus ist nicht geklärt, wie effektiv diese Sensoren in Zellen mit nativer GST-Expression funktionieren würden.

In Kooperation mit der Firma *Promega* wurde versucht, einen zellbasierten Assay mit einem GSTP1-spezifischen Luciferinderivat zu entwickeln. In diesem Assay wird nach GSTP1-vermittelter Umsetzung mit GSH Luciferin frei. Dieses kann äquivalent zum GSH/GSSG-Glo™ Assay durch Umsetzung mit Luciferase quantifiziert werden. Dieser Assay zeigte an isolierter GSTP1 sehr gute Ergebnisse; die Signalstärke reichte in zellbasierten Experimenten jedoch nicht aus, um einen reproduzierbaren Assay entwickeln zu können.

Dementsprechend ist derzeit kein geeigneter Sensor verfügbar, der GST-Inhibitionsstudien in lebenden Zellen ermöglichen würde. Die Entwicklung eines solchen Sensors ist für die weitere Suche nach effektiven GSTP1-Inhibitoren essentiell. Nur so könnte abschließend geklärt werden, ob die zuvor entwickelten niedermolekularen 1,2,4-Trioxane GSTP1 in Tumorzellen effektiv hemmen können.

4 Zusammenfassung

Der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapie in Krebszellen kann eine Vielzahl an Faktoren zugrunde liegen. Ein klinisch relevanter Faktor ist dabei die Überexpression des Phase-II-Metabolismus-Enzyms GSTP1. Ausgehend von Artemisinin, für das neben seiner Wirkung gegen Malaria zusätzlich eine inhibitorische Wirkung gegenüber GSTP1 diskutiert wird, sollten im Rahmen dieser Arbeit niedermolekulare GSTP1-Inhibitoren entwickelt werden. Der Naturstoff Artemisinin besitzt als zentrales Pharmakophor einen 1,2,4-Trioxanring. Auch wenn die Aktivität von Artemisinin gegenüber GSTP1 in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, wurden niedermolekulare 1,2,4-Trioxane identifiziert, die GSTP1 effektiv hemmen. Mithilfe der Synthese über eine Typ-II-Photooxygenierung gefolgt von Peroxyacetalisierung von allylischen Alkoholen konnte eine Reihe an in der Literatur nicht bekannten 1,2,4-Trioxanen dargestellt (Abbildung 58) und auf Aktivität gegenüber GSTP1 getestet werden.

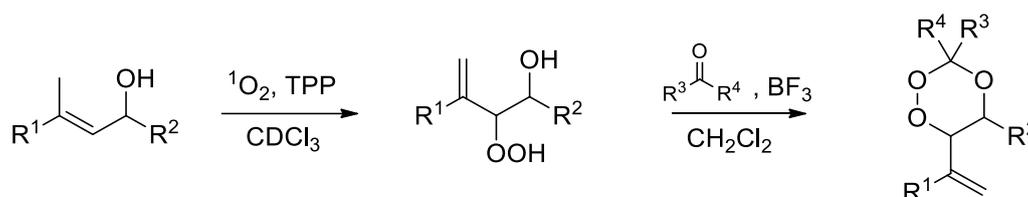


Abbildung 58 Synthese von 1,2,4-Trioxanen via Typ-II-Photooxygenierung gefolgt von Peroxyacetalisierung.

Die Testung der 1,2,4-Trioxane erfolgte zunächst mithilfe eines spektrophotometrischen Assays in 96-Well-Platten, bei dem hpGST, die kinetisch und physikochemisch identisch zu GSTP1 aus Tumorzellen ist, CDNB und GSH eingesetzt wurden.^[105] Durch GST-Katalyse entsteht ein Konjugat aus GSH und CDNB, welches Licht einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert. Mithilfe dieses Assays wurden IC₅₀-Werte und K_i-Werte für Inhibitoren an hpGST bestimmt.

Durch ein initiales Screening konnte gezeigt werden, dass hpGST durch 1,2,4-Trioxane gehemmt wird. Als ersten Hinweis auf eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Verbindungen konnte nachgewiesen werden, dass ein 4-Nitrophenylsubstituent in Position 3 des 1,2,4-Trioxanringes einen besonders positiven Einfluss auf die Aktivität der Verbindungen hat.

Die ersten Inhibitoren auf 1,2,4-Trioxan-Basis mit IC₅₀-Werten von über 100 μM waren in Position 6 des Heterozyklus Methylacrylat-, Isoprenyl- oder Arylvinyl-substituiert. Eine deutliche Steigerung der Aktivität gegenüber hpGST um ca. Faktor sieben konnte erzielt werden, indem der Methylester der Verbindung **16b** gegen einen Phenylester (Verbindung **34c**) ausgetauscht wurde.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde eine Reihe von sieben 1,2,4-Trioxanen mit unterschiedlich substituierten Vinyl-Phenylester-Substituenten in Position 6 des Trioxanringes synthetisiert.^[164] Die Substrate für die Photooxygenierung konnten dabei durch *Steglich*-Veresterung in guten Ausbeuten dargestellt werden.

Die Testung mithilfe des GST-Inhibitionsassays ergab für alle sieben Verbindungen IC_{50} -Werte von weniger als 10 μ M. Damit sind alle Verbindungen deutlich aktiver als der literaturbekannte Referenz-Inhibitor Etacrynsäure, für den ein IC_{50} -Wert von $30.9 \pm 0.6 \mu$ M bestimmt wurde.

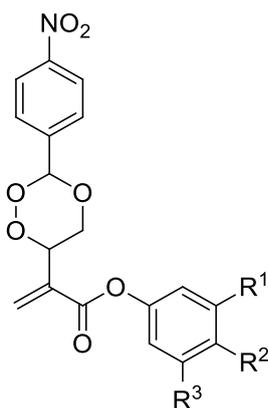
Die Bestimmung der K_i -Werte an der GSH-Bindungsstelle der hpGST ergab für die sieben 1,2,4-Trioxane Werte von weniger als 12 μ M. Dabei war Verbindung **36c** die potenteste dieser Reihe mit einem K_i -Wert von $0.790 \pm 0.044 \mu$ M. Die Interaktion der Verbindungen mit der GSH-Bindungstasche der hpGST konnte für sechs der sieben 1,2,4-Trioxane mit einem kompetitiven oder gemischten Hemmtyp beschrieben werden, nur Verbindung **42c** zeigte nicht-kompetitives Verhalten. Für mehrere 1,2,4-Trioxane konnte parabolische Inhibition beobachtet werden. Dies deutet an, dass möglicherweise mehr als ein Inhibitormolekül mit GSH um die Bindungsstelle am Enzym konkurriert.

An der CDNB-Bindungsstelle wurden K_i -Werte zwischen 2 und 13 μ M ermittelt. Den niedrigsten K_i^{CDNB} -Wert zeigte Verbindung **38c** mit $2.28 \pm 0.35 \mu$ M. Allerdings wies die Hemmung der hpGST durch diese Verbindung einen ausgeprägten hyperbolischen Charakter auf, so dass die Inhibition durch **38c** ineffektiv ist. An der CDNB-Bindungsstelle zeigen die sieben Verbindungen mit Ausnahme von **37c** nichtkompetitive oder gemischte Inhibition.

Um zu überprüfen, ob die sieben hochaktiven 1,2,4-Trioxane selektiv GSTP1 inhibieren, wurden ihre Aktivitäten gegenüber den rekombinant exprimierten, cytosolischen GST-Vertretern GSTA1 und GSTM2 bestimmt. Nur für drei der sieben 1,2,4-Trioxane (**38c**, **40c** und **42c**) konnten IC_{50} -Werte an rhGSTA1 ermittelt werden; die anderen vier Verbindungen zeigen keine nennenswerte Aktivität gegenüber dieser GST. Die drei ermittelten IC_{50} -Werte an rhGSTA1 lagen höher als die IC_{50} -Werte der entsprechenden Verbindungen an hpGST.

An rhGSTM2 zeigte nur Verbindung **38c** ausreichend Aktivität, um einen IC_{50} -Wert bestimmen zu können ($38.0 \pm 3.5 \mu$ M); die anderen sechs 1,2,4-Trioxane zeigten keine Hemmung gegenüber rhGSTM2. Die Referenzsubstanz Etacrynsäure hingegen wies keine Selektivität für hpGST gegenüber rhGSTM2 und rhGSTA1 auf.

Aus der Aktivitäts- und Selektivitätsbestimmung der sieben 1,2,4-Trioxane mit α,β -ungesättigten aromatischen Estern lässt sich ableiten, dass für die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen die Einführung eines Methylestersubstituenten in Position 3 und/oder 4 des Phenylrings an der α,β -ungesättigten Esterfunktion von Vorteil ist. In Tabelle 33 sind die IC_{50} - und K_i -Werte an hpGST und die IC_{50} -Werte an rhGSTA1 und rhGSTM2, wenn diese bestimmbar waren, für die vier vielversprechendsten Verbindungen zusammengefasst.



35c: $R^1, R^3 = H, R^2 = COOMe$

36c: $R^1 = H, R^2, R^3 = COOMe$

37c: $R^1, R^2 = H, R^3 = COOMe$

46c: $R^2 = H, R^1, R^3 = COOMe$

Abbildung 59 Strukturformeln der Verbindungen **35c – 37c** und **46c**

Tabelle 33 Überblick über die Parameter K_i^{GSH} , K_i^{CDNB} und IC_{50} an hpGST, rhGSTA1 und rhGSTM2, falls bestimmbar, für die Verbindungen **35c**, **36c**, **37c** und **46c**.

Verbindung	K_i^{GSH} (μM)	K_i^{CDNB} (μM)	IC_{50} (μM)		
			hpGST	rhGSTA1	rhGSTM2
35c	3.46	21.1	2.90	-	-
36c	0.790	6.40	2.38	-	38.0
37c	2.73	8.07	9.33	-	-
46c	5.15	12.5	3.36	-	-

Nachdem eine hochaktive und selektive 1,2,4-Trioxan-Leitstruktur identifiziert worden war, sollten durch eine RNA-Expressionsanalyse mittels qPCR Krebszelllinien ermittelt werden, die GSTP1 überexprimieren. Es wurden insgesamt 16 Zelllinien auf ihre GSTP1-, GSTA1- und GSTM2-RNA-Expression hin untersucht. 13 Zelllinien wurden dabei identifiziert, die hohe GSTP1-Expression auf RNA-Ebene zeigten. Die höchsten GSTP1-Niveaus wiesen die Brustepithelzelllinien HMEC und HBL100 auf, wobei es sich bei HMEC um gesunde Primärzellen handelt, gefolgt von der Lungenkarzinomzelllinie SK-MES-1. Die Zelllinien mit der niedrigsten GSTP1-Expression waren HepG2, SK-BR-3 und MCF-7. Diese Zelllinien könnten als potentielle Negativkontrolle für zellbasierte Studien dienen. Es konnten keine Krebszelllinien mit hohen GSTA1- und GSTM2-Niveaus identifiziert werden.

Durch Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die GSTP1-Expression auf RNA-Ebene mit der Proteinexpression in den Zelllinien HBL100, SK-MES-1, MCF-7 und HepG2 übereinstimmt.

Um die 1,2,4-Trioxan-Leitstrukturen weitergehend zu charakterisieren, wurden Lysate der Zelllinien HBL100 und SK-MES-1, da in diesen hohe GSTP1-Expression nachgewiesen wurde, mithilfe von Triton X-100 hergestellt. Die Inhibition der GST-Aktivität durch verschiedene 1,2,4-

Trioxane wurde in diesen Lysaten ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die GST-Aktivität in HBL100- und SK-MES-1-Lysat durch 1,2,4-Trioxane effektiv gehemmt wird. Die Aktivität der Verbindungen ist gegenüber der GST in den Zelllysaten sogar deutlich höher als gegenüber der isolierten hpGST. Für Verbindung **36c** lag der IC₅₀-Wert an der GST in HBL100-Lysat bei $0.412 \pm 0.078 \mu\text{M}$, das ist ca. um Faktor fünf niedriger als an hpGST.

Da die Testungen in Zelllysate erfolgreich verlaufen sind, wurde für Verbindung **36c** die Zytotoxizität gegenüber der Krebszelllinie SK-MES-1 ermittelt. Allerdings konnte für **36c** im Gegensatz zu der Referenzsubstanz Etacrynsäure keine zytotoxische Wirkung festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise durch mangelnde Zellgängigkeit der Substanz erklärt werden, was endgültig jedoch nur durch einen zellbasierten GSTP1-Assay geklärt werden könnte, der im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine vielversprechende Leitstruktur für die selektive Inhibition von GSTP1 entwickelt werden, jedoch bedarf diese in Zukunft noch weiterer Optimierung. Es konnte gezeigt werden, dass die 1,2,4-Trioxane mit α,β -ungesättigtem Estersubstituenten im selben Aktivitätsbereich für die Inhibition der GSTP1 liegen, wie die klinisch wirksame Verbindung TER199. Jedoch wäre eine weitere Aktivitätssteigerung um mindestens Faktor 10 sinnvoll, um hohe Dosierungen im klinischen Einsatz, wie sie bei TER199 notwendig sind, zu vermeiden (vgl. 1.4.3). Dies könnte durch weitere Variation der Phenylkomponente des Esters geschehen.

Darüber hinaus ist die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen für biologische Testungen sehr gering. Für weitergehende Untersuchungen wäre eine Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften sinnvoll. Dies könnte durch synthetische Modifikationen der Inhibitoren geschehen. So könnten z.B. die Methylester-Substituenten durch Carboxylgruppen ersetzt werden. Ebenso könnte versucht werden, die Inhibitoren in Cyclodextrine zu verpacken, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Der Einschluss von Verbindungen in Cyclodextrine ist ein bekanntes Mittel, um die Löslichkeit dieser zu verbessern und es besteht weniger die Gefahr, dass die Verbindungen durch Modifikationen ihre inhibitorische Aktivität verlieren.^[165]

Um weitere Verbindungen kosten- und zeitsparend in größerem Umfang evaluieren zu können und die Leitstrukturoptimierung voranzubringen, steht mit dem in Kapitel 3.2.12 etablierten Assay in 384-Well-Platten ein valides Testsystem zur Verfügung.

Eine weitere Frage, die noch geklärt werden sollte, sind die Interaktionen von 1,2,4-Trioxanen mit anderen zellulären Bindungspartnern. So konnte in Kapitel 3.4.2 das kinetische Verhalten der Inhibitoren in Zelllysaten nicht vollständig geklärt werden. Durch Identifikation weiterer Interaktionspartner der 1,2,4-Trioxane könnten diese Unklarheiten beseitigt werden.

Sollten die oben aufgeführten Punkte erfolgreich umgesetzt werden, ist die Entwicklung eines geeigneten Sensors, der GST-Inhibitionsstudien in lebenden Zellen ermöglichen würde, zur vollständigen *in-vitro*-Charakterisierung der neu entdeckten Leitstruktur, wie in Kapitel 3.5.3 besprochen, essentiell. Von einem Fluoreszenzsensor ausgehend könnte ein Assay entwickelt werden, der die Testung potentieller GSTP1-Inhibitoren im Hochdurchsatz-Screening erlaubt. Der Amino-Fluorescein-Sensor von *Fujikawa et al.* scheint dabei der bis jetzt vielversprechendste Ansatz zu sein.^[162] Ein solcher Assay könnte abschließend klären, ob die 1,2,4-Trioxane die Zellmembran passieren und intrazelluläre GSTP1 inhibieren. Bei positiven Ergebnissen könnte als nächster Schritt über die Testung der 1,2,4-Trioxane *in vivo* nachgedacht werden.^[166]

6 Experimenteller Teil

6.1 Biologischer Teil

6.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Wenn nicht anders im entsprechenden Kapitel aufgeführt, wurden Chemikalien (wie Puffer-substanzen, Kulturmedien, etc.) und Verbrauchsmaterialien über die Firmen *Sigma-Aldrich*, *Carl Roth*, *VWR International*, *Life Technologies* und *Lonza* bezogen.

6.1.2 Glutathion-Transferase-Inhibitionsassay

Um Substanzen auf GSTP1-Inhibition hin zu untersuchen wurde ein spektrophotometrischer Assay verwendet, bei dem 2,4-Dinitrochlorbenzol mit L-Glutathion reagiert. Das entstehende Produkt besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm (Abbildung 60).^[104] Die Zunahme der Absorption über die Zeit entspricht der Umsatzgeschwindigkeit.

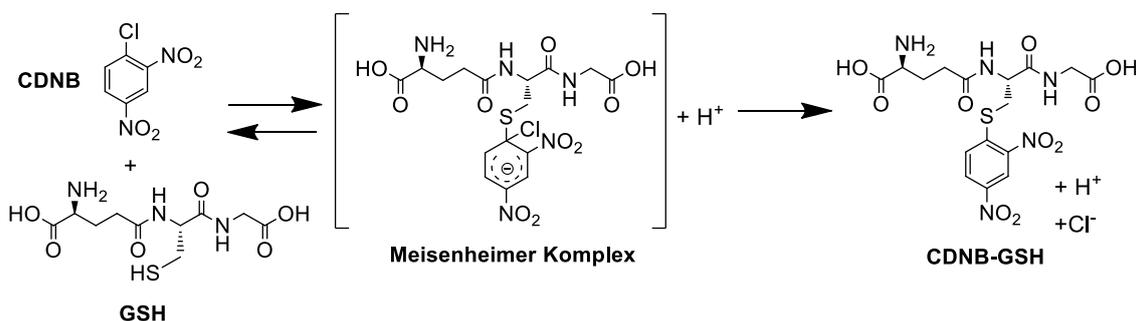


Abbildung 60 Reaktionsverlauf von GSH mit CDNB über einen Meisenheimer Komplex zum Konjugat, das bei 340 nm detektiert werden kann. Die Reaktion läuft sowohl unkatalysiert, als auch unter GST-Katalyse ab.

Alle Untersuchungen wurden mit einem multifunktionalen Mikroplatten Reader (*Synergy™ 2*, *BioTek* oder *Infinite M100pro*, *Tecan*) durchgeführt. Es wurden transparente 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden der Firma *Brand* verwendet (abgesehen von Studien in 384-Well-Platten, vgl. 6.1.2.5). CDNB, GSH, Dimethylsulfoxid (DMSO) und humane plazentale Glutathion-Transferase (hpGST) wurden über die Firma *Sigma-Aldrich* bezogen. Darüber hinaus wurden Messungen mit rekombinanten humanen Glutathion-Transferasen der Klassen P1, A1 und M2 (rhGSTP1, rhGSTA1 und rhGSTM2) durchgeführt. Diese wurden im Arbeitskreis *Baumann* (Institut für Biochemie, Universität zu Köln) von *T. Schenk* im Rahmen seiner Masterarbeit in *E.coli* exprimiert. Die hpGST wurde gelöst (1 mg/ml) gelöst, alle Enzyme wurden in Lösung bei -80 °C gelagert.

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt, jeweils in technischen Duplikaten oder Triplikaten. Das Gesamtvolumen des Assays lag bei 200 µl (40 µl Gesamtvolumen in 384 Well Platten) mit 10% (v/v) DMSO-Anteil. Die Untersuchungen wurden alle bei 37 °C durchgeführt.

Der Assay wurde in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.5), der mit 1 mM EDTA versetzt wurde, durchgeführt. Dieser Assaypuffer wurde unmittelbar vor den Messungen 1 h mit Stickstoff begast.

Enzymverdünnungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.5), der mit 1 mM EDTA, 2 mM Mercaptoethanol und 20% (v/v) Glycerol versetzt wurde (Enzympuffer), angesetzt.

CDNB wurde jedes Mal frisch vor Beginn der Messungen in DMSO gelöst. GSH wurde vor Beginn der Messung in entgastem Assaypuffer gelöst.

Der Assay wurde durch Injektion von GSH-Lösung gestartet. Nachdem die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt wurde, wurde die Zunahme der Absorption bei 340 nm in An- und Abwesenheit des Enzyms in einem Zeitraum von 5 min bestimmt. Die Geschwindigkeit der nicht enzymatischen Reaktion wurde von der totalen Umsatzgeschwindigkeit subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel 2010 (*Microsoft Cooperation*) und GraphPad Prism 5.03 (*GraphPad Software*).

6.1.2.1 K_s -Wert Bestimmung

Die Konstanten K_s (Dissoziationskonstante) für hpGST wurden jeweils mit CDNB und GSH als variables Substrat bestimmt. Dabei wurde die Konzentration des zweiten Substrats konstant gehalten. Je Substrat wurde die Umsatzgeschwindigkeit in Anwesenheit von 9 verschiedenen Konzentrationen gemessen, jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit von Enzym. Die getesteten Konzentrationsbereiche und die Pipettierschemata sind Tabelle 34 und Tabelle 35 zu entnehmen

Tabelle 34 Pipettierschema für die Bestimmung des K_s -Wertes für CDNB.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	120 µl	-	-
DMSO	10 µl	-	-
CDNB	10 µl	4 – 40 mM	0.2 – 2 mM
hpGST/ Enzympuffer	10 µl	40 µg/ml/ -	2 µg/ml/ -
GSH (über Injektor)	50 µl	20 mM	5 mM

Tabelle 35 Pipettierschema für die Bestimmung des K_S -Wertes für GSH.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	45 -165 μ l	-	-
DMSO	10 μ l	-	-
CDNB	10 μ l	20 mM	1 mM
hpGST/ Enzympuffer	10 μ l	40 μ g/ml/ -	2 μ g/ml/ -
GSH (über Injektor)	5 - 125 μ l	8 mM	0.2 - 5 mM

Die Auswertung wurde basierend auf der Auftragung nach Michaelis und Menten durchgeführt, die durch die folgende Gleichung beschrieben wird:^[167]

Gleichung 1
$$v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_S + [S]}$$

Mithilfe dieser Gleichung konnten K_S -Wert und V_{max} (maximale Umsatzgeschwindigkeit) berechnet werden. Dabei steht v_0 für die anfängliche Umsatzgeschwindigkeit bei fixer Substratkonzentration [S]. Angegeben wird der Mittelwert aus mindestens drei Messungen \pm Standardfehler (MW \pm SEM).

6.1.2.2 Inhibitor Screening

Die zu testenden Inhibitoren wurden unmittelbar vor der Messung in DMSO gelöst. Pro Inhibitor wurden drei Verdünnungsstufen in Eppendorf-Gefäßen angesetzt, die so gewählt wurden, dass ein möglichst großer Konzentrationsbereich abdeckt wurde. Bei aktiven Verbindungen wurde nur eine Messung in Triplikaten durchgeführt, um den Konzentrationsbereich für die IC_{50} -Bestimmung abschätzen zu können. Bei inaktiven oder sehr schwer löslichen Verbindungen wurde die höchst mögliche Konzentration dreimal in Triplikaten gemessen. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.1.2.3 beschrieben.

Das Ergebnis wurde als Inhibition angegeben, dafür wurde die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Abwesenheit von Inhibitor auf 100% normalisiert. Ausgehend davon wurde dann die Inhibition in % in Anwesenheit eines Inhibitors bestimmt. Angegeben wird der Mittelwert aus mindestens drei Messungen \pm Standardfehler (MW \pm SEM).

6.1.2.3 IC₅₀-Bestimmung

Die zu testenden Inhibitoren wurden unmittelbar vor der Messung in DMSO gelöst und eine 20fach konzentrierte Verdünnungsreihe in Eppendorf-Gefäßen hergestellt. Je IC₅₀-Bestimmung wurden 7 Inhibitorkonzentrationen plus ein Leerwert (nur DMSO) getestet. Die Konzentrationsbereiche der Inhibitoren wurde vorab bei einem Screening ermittelt (vgl. 6.1.2.2). Um Wägefehler zu minimieren, wurde jede Messung mit einer neuen Inhibitor-Einwaage durchgeführt.

Es wurden IC₅₀-Werte gegenüber allen vier erwähnten GSTs bestimmt. Je nach Enzymcharge wurde die kommerzielle hpGST bei 1 bis 3 µg/ml Endkonzentration eingesetzt. Die rekombinanten Enzyme rhGSTP1 und rhGSTA1 wurden bei 1 µg/ml getestet, rhGSTM2 aufgrund der hohen Aktivität bei 0.25 µg/ml. Die Konzentration der Substrate CDNB und GSH war dabei immer mit 1 mM. In Tabelle 36 sind die Testkonzentrationen und das Pipettierschema zusammengefasst.

Tabelle 36 Pipettierschema für IC₅₀-Bestimmungen.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	120 µl	-	-
Inhibitor/ DMSO	10 µl	20 fache Well Konzentration	variierend
CDNB	10 µl	20 mM	1 mM
GST/ Enzympuffer	10 µl	5 - 60 µg/ml/ -	0.25 - 3 µg/ml/ -
GSH (über Injektor)	50 µl	4 mM	1 mM

Die Bestimmung des IC₅₀-Wertes erfolgte mithilfe einer der folgenden Gleichungen.^[168] Dabei steht v_i für die Umsatzgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Inhibitors, $[I]$ für die Inhibitorkonzentration, n für den Hill-Koeffizienten und $v_{([I] \rightarrow \infty)}$ für die enzymatische Restaktivität bei unendlicher Inhibitorkonzentration. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus mindestens drei Messungen \pm Standardfehler (MW \pm SEM).

Gleichung 2
$$v_i = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)}$$

Gleichung 3
$$v_i = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^n}$$

Gleichung 4
$$v_i = \frac{v_0 - v_{[I] \rightarrow \infty}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)} + v_{[I] \rightarrow \infty}$$

6.1.2.4 K_i -Bestimmung

K_i -Werte (Dissoziationskonstanten) wurden für die aktivsten Inhibitoren an der hpGST jeweils für CDNB und GSH als variables Substrat bestimmt. Dabei wurde die Konzentration des zweiten Substrats in Anwesenheit verschiedener Inhibitorkonzentrationen konstant gehalten. Es wurden fünf verschiedene Substratkonzentrationen und je Substratkonzentration vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen plus Leerwert getestet. Der Konzentrationsbereich des Inhibitors wurde vom IC_{50} -Wert abgeleitet. Um Wägefehler zu minimieren, wurde jede Messung mit einer neuen Inhibitoreinwaage durchgeführt. In Tabelle 37 und Tabelle 38 sind die Pipettierschemata für die Bestimmung der K_i -Werte beider Substrate zusammengefasst.^[168]

Tabelle 37 Pipettierschema für die K_i -Wert Bestimmung für CDNB.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	120 μ l	-	-
Inhibitor/ DMSO	10 μ l	20 fache Well Konzentration	variierend
CDNB	10 μ l	4 - 32 mM	0.2 – 1.6 mM
GST/ Enzympuffer	10 μ l	20 - 60 μ g/ml/ -	1 - 3 μ g/ml/ -
GSH (über Injektor)	50 μ l	20 mM	5 mM

Tabelle 38 Pipettierschema für die K_i -Wert Bestimmung für GSH.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	130 - 165 μ l	-	-
Inhibitor/ DMSO	10 μ l	20 fache Well Konzentration	variierend
CDNB	10 μ l	20 mM	1 mM
GST/ Enzympuffer	10 μ l	20 - 60 μ g/ml/ -	1 - 3 μ g/ml/ -
GSH (über Injektor)	5 - 40 μ l	10 mM	0.25 - 2 mM

Für die Auswertung wurde mithilfe von GraphPad Prism 5 das passende kinetische Modell zur K_i -Wert Bestimmung ausgewählt. Folgende Modelle wurden für die Auswertung in Betracht gezogen:

Kompetitive Hemmung:

Gleichung 5
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Nichtkompetitive Hemmung:

Gleichung 6
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Unkompetitive Hemmung:

Gleichung 7
$$v_i = \frac{\left(\frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}\right) \times [S]}{\left(\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}\right) + [S]}$$

Gemischte Hemmung:

Gleichung 8
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \times \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}$$

Hyperbole, gemischte Hemmung:

Gleichung 9
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{\alpha K_m \times \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + \alpha K_i}\right) + [S] \times \left(\frac{[I] + \alpha K_i}{\beta [I] + \alpha K_i}\right)}$$

Hyperbole, gemischte Hemmung – nicht kompetitiv:

Gleichung 10
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + K_i}\right) + [S] \times \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + K_i}\right)}$$

Parabole kompetitive Hemmung:

Gleichung 11
$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)^2 + [S]}$$

6.1.2.5 Miniaturisierung des Glutathion-Transferase-Inhibitionsassays

Der spektrophotometrische Glutathion-Transferase-Inhibitionsassay wurde miniaturisiert und halb automatisiert in 384-Well-Platten durchgeführt. Dafür wurden transparente 384-Well-Platten der Firma *Greiner Bio-One* benutzt. Das Assayvolumen wurde auf 40 µl reduziert, jede Messung wurde dreimal durchgeführt, statt Triplikaten in Quadruplikaten. Alle Messungen wurden mit hpGST durchgeführt.

Zum Pipettieren der 384-Well-Platten wurde der CyBi®-Well Simultanpipettierer der Firma *CyBio* genutzt.

Die Lösungen wurden wie unter 6.1.2 beschrieben hergestellt. Für IC₅₀-Bestimmungen wurde der Assaypuffer in 8-Zeilen Reservoirs der Firma *Axygen* vorgelegt. Die CDNB-, Inhibitor- und Enzymlösungen wurden in transparenten 96-Well V-Boden Platten (*Greiner Bio-One*) vorgelegt. Pro Well wurden mindestens 30 µl der entsprechenden Lösung vorgelegt. Die Pipettier-Reihenfolge und die Volumina, die in die 384-Well-Platten pipettiert wurden, sind in Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 39 Pipettierschema für IC₅₀-Bestimmungen in 384-Well-Platten.

Komponente	Volumen	Stock Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer (mit CyBi-Well)	24 µl	-	-
Inhibitor/ DMSO (mit CyBi-Well)	2 µl	20-fache Well Konzentration	variierend
CDNB (mit CyBi-Well)	2 µl	20 mM	1 mM
GST/ Enzympuffer (mit CyBi-Well)	2 µl	40 µg/ml/ -	2 µg/ml/ -
GSH (über Injektor)	10 µl	4 mM	1 mM

Die K_s -Bestimmung von CDNB in 384-Well-Platten erfolgte wie unter 6.1.2.1 beschrieben, nur mit verkleinertem Volumen. Lösungen wurden wie bei den IC₅₀-Bestimmungen in V-Boden Platten oder in 8-Zeilen-Reservoirs vorgelegt.

Bei der K_s -Bestimmung von GSH konnte die GSH-Lösung nicht über den Injektor des Mikroplatten Readers dazugegeben werden, um die Reaktion zu starten, da das pipettierbare Minimalvolumen des Injektors unterschritten wurde. Stattdessen wurde eine GSH-Verdünnungsreihe in einer V-Boden 96-Well Platte angesetzt und über den CyBi®-Well Simultanpipettierer in die 384-Well-Platten pipettiert. In alle Wells wurde 24 µl Assaypuffer und 10 µl GSH-Lösung mit variierender Konzentration gegeben. Danach wurde die Platte im Mikroplatten Reader ausgelesen.

Auswertungen für K_s - und IC₅₀-Werte erfolgte entsprechend den Messungen im 96-Well-Assay-Format (vgl. 6.1.2.1 und 6.1.2.3).

6.1.2.6 Glutathion Transferase Inhibitionsassay mit Zellysat

Statt isolierter Glutathion-Transferasen wurden in dem zuvor beschriebenen spektrophotometrischen Assay auch Zellysate eingesetzt. Die Zellysate wurden wie unter 6.1.3

beschrieben hergestellt. Es wurden die Lysate vier verschiedener Krebszelllinien untersucht, MCF-7, HepG2, SK-MES-1 und HBL100. Die Lysate wurden sowohl frisch, direkt nach der Zellyse, als auch nach Lagerung bei -80 °C verwendet.

Die allgemeine Durchführung des Assays wurde dabei nicht verändert. Statt Enzymlyse wurde pro Well 10 µl Zellysat eingesetzt, statt Enzympuffer als nicht enzymatische Kontrolle wurde der entsprechende Lysepuffer eingesetzt.

Die verwendete Lysatmenge bezieht sich immer auf den Gesamtproteingehalt in mg/ml (Bestimmt nach Bradford, vgl. 6.1.3.1). Lysatverdünnungen wurden auch in dem für die Lyse benutzten Lysepuffer angesetzt.

IC₅₀-Bestimmungen wurden mit einem Gesamtproteingehalt der Lysate von 2 mg/ml durchgeführt.

6.1.3 Zellyse

Es wurden vier Krebszelllinien lysiert (MCF-7, HepG2, SK-MES-1 und HBL100), um für die Charakterisierung von Inhibitoren im unter 6.1.2 beschriebenen Assay eingesetzt zu werden und GSTP1 in diesen Zellen über Western Blot nachzuweisen. Es wurde mit Triton X-100 lysiert. Dem Lysepuffer wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugesetzt (P8340, *Sigma-Aldrich*), um den Abbau der GSTP1 durch Proteasen zu verhindern. Die genaue Zusammensetzung des Puffers kann Tabelle 40 entnommen werden.

Tabelle 40 Zusammensetzung des Lysepuffers auf Basis von PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung).

Komponente	Gehalt
Glycerol	20 % (v/v)
Triton X-100	0.1 – 1% (v/v)
Protease Inhibitor Cocktail	1 x

Die zu lysierenden Zellen wurden wie vom Hersteller empfohlen in 75 cm²-Kulturflaschen kultiviert (6.1.5). Bei 90% Konfluenz wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA 5 min bei 37 °C abgelöst. Das Trypsin wurde mit vier Millilitern des entsprechendem Mediums neutralisiert und in ein 15 ml Falcon überführt, die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert. Es wurde so viel Lysepuffer verwendet, dass eine Zellzahl von 1x10⁷ Zellen pro Milliliter Lysepuffer erreicht wurde. Die Zellen wurden dreimal für 10 sec mit Ultraschall behandelt und dann bei 4 °C und 4000 x g 30 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und der Gesamtproteingehalt nach Bradford bestimmt. Die Proben wurden entweder frisch verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

6.1.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford^[169]

Für die Gesamtproteinbestimmung der Zellysate wurde Roti®-Quant Coomassie Brilliant Blue Reagenz der Firma *Carl Roth* verwendet. Der Assay wurde in 200 µl Gesamtvolumen in transparenten 96-Well-Platten der Firma *Brand* durchgeführt.

Es wurde eine BSA-Standardgerade mit neun Konzentrationen im Bereich von 2.5 bis 75 µg/ml Protein bei jeder Messung mitgeführt. Dafür wurde eine Serumalbumin (BSA, *Carl Roth*) Stammlösung (0.5 mg/ml) hergestellt.

Die zu untersuchenden Zellysate wurden 1:100 mit demineralisiertem Wasser verdünnt; das Coomassie-Reagenz wurde 1:5 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

Für die Messung wurden 40 µl der Probe oder des BSA-Standards in ein Well pipettiert, anschließend wurden 160 µl des Coomassie-Reagenz dazugegeben, für 5 min inkubiert und die Absorption bei 590 nm mithilfe eines multifunktionalen Mikroplatten Reader (*Infinite M200, Tecan*) gemessen. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

Mithilfe der BSA-Standardgeraden konnten der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

6.1.4 Western Blot

6.1.4.1 SDS-PAGE

Die unter 6.1.3 beschriebenen Zellysate wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aufgetrennt.

Dafür werden die Zellysate-Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine in Richtung Anode. Je größer ein Protein ist, desto stärker wird es in der Acrylamid-Gel-Matrix zurückgehalten. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.^[170]

Das verwendete Trenngel enthielt 12.5% Acrylamid, das Sammelgel 5% Acrylamid. Die genaue Zusammensetzung der Gele kann Tabelle 41 entnommen werden. Die Gele wurden mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System der Firma *Bio-Rad* gegossen und die Elektrophorese auch mit diesem System bei 60 mA durchgeführt.

Als Laufpuffer wurde Rotiphorese® 10x SDS-PAGE Puffer der Firma *Carl Roth* 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

Pro Zellysate wurden 50 µg Gesamtprotein (bestimmt nach Bradford) in eine Tasche des Gels aufgetragen. Zuvor wurden die Proben mit fünffach konzentriertem Laemmli Puffer (Zusammensetzung Tabelle 42) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Tabelle 41 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-Page. Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, APS = Ammoniumperoxodisulfat, TEMED = Tetramethylethyldiamin.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Lösung	8.35 ml	1.25 ml
Tris-HCL pH 8.8	5 ml	-
Tri-HCL pH 6.8	-	1.88 ml
10% SDS-Lösung	200 µl	75 µl
Glycerin (87%)	2.15 ml	-
VE-Wasser	4.1 ml	4.1 ml
10% APS	200 µl	75 µl
TEMED	15 µl	5 µl

Tabelle 42 Zusammensetzung des Laemmli-Puffers.

Komponente	Volumen
SDS	10%
Glycin	50%
Bromphenolblau	0.5%
Dithiothreitol	10 mM
Tris-HCl pH 6.8	250 mM

6.1.4.2 Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Um Proteine nach der SDS-Page sichtbar zu machen, wurden jene Gele, die nicht für einen Western Blot benutzt wurden, mit Coomassie-Brillant-Blau Färbereagenz (40% Isopropanol, 10% Essigsäure und 0,1% Coomassie-Brillant-Blau) gefärbt. Dafür wurden die Gele nach der Gelelektrophorese für 15 min in ein Färbebad gelegt. Anschließend wurden die Gele für 10 min mit Wasser gewaschen und über Nacht in Entfärbelösung gelegt (10% Acetat). Die gefärbten Gele wurden mithilfe des ChemiDoc™ MP System der Firma *Bio-Rad* abfotografiert.

6.1.4.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine, die mittels SDS-Page aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran® BA85, *Whatman*) übertragen.

Als Blotting-Puffer wurde 25 mM Tris Puffer mit 192 mM Glycin genutzt. Für das Blotting wurde das Rotiphorese® PROclamp MINI Tank-Blotting-System der Firma *Carl Roth* verwendet. Das SDS-Gel, die Nitrocellulose-Membran und vier Blottingpapiere (1 mm Dicke, *Carl Roth*) wurden für mindestens 10 min in Blotting-Puffer equilibriert. Dann wurde das Blottingsystem nach Angaben des Herstellers zusammen gebaut. Der Proteintransfer erfolgte von der Kathode zur Anode. Dementsprechend wurden auf die Kathodenseite zwei durchtränkte Blottingpapiere gelegt, dann das SDS-Gel. Darauf wurde die Membran platziert und erneut zwei weitere Whatman Paper gelegt. Der Transfer erfolgte bei 300 mA über einen Zeitraum von einer Stunde.

Anschließend wurde die Oberseite der Membran markiert und die unbesetzten Stellen der Membran mit einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS-T Puffer (Tabelle 43) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Es wurde dreimal für je 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen.

Tabelle 43 Zusammensetzung des TBS-T Puffers.

Komponente	Volumen
Natriumchlorid	8 g
Tris 1 M pH 7.5r	20 ml
Tween	1 ml
VE-Wasser	ad 1000 ml

6.1.4.4 Immunodetektion von GSTP1

Um das Zielprotein GSTP1 auf der Membran zu detektieren, wurde zuerst mit einem primären, monoklonalen anti-humanen GSTP1 Maus-Antikörper (sc-376481, *Santa Cruz*) inkubiert. Dafür wurde der primäre Antikörper 1:1000 in TBS-T Puffer (Zusammensetzung vgl. 6.1.4.3) verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C in diese Lösung gelegt.

Anschließend wurde dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, bei dem es sich um einen an Meerrettich-Peroxidase gebundenen anti-Maus Antikörper handelte (sc-2005, *Santa Cruz*). Der Antikörper wurde 1:5000 mit TBS-T Puffer verdünnt und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde dreimal bei Raumtemperatur 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit 2 ml Luminol-Reagenz (sc-2048, *Santa Cruz*) übergossen und 1 min inkubiert. Dann wurde die Lumineszenz mithilfe des ChemiDoc™ MP Systems der Firma *Bio-Rad gemessen*. Das Luminol-Reagenz wurde

unmittelbar vor Verwendung aus gleichen Teilen Lösung A und Lösung B angesetzt. Die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase setzt das darin enthaltene Luminal in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unter Emission von Chemolumineszenz um.

6.1.5 Kultivierung von Krebszelllinien

Alle Zelllinien mit denen im Rahmen dieser Dissertation gearbeitet wurde, um RNA für die qPCR zu isolieren (6.1.6), wurden über die Firmen *DMSZ* (A-431, HT-29, A-549, HeLa, HepG2, MCF-7, SK-BR-3, Molt-4, Jurkat, HL60), *ECACC* (MDA-MB 231, U-87, SK-MES-1), *CLS Cell Line Service* (HBL100, U-251) und *Lonza* (HMEC) bezogen. Bis zur Inkulturnahme wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Sicherheitswerkbank steril durchgeführt. Die Zellen wurden in sterilen 75 cm² Kulturflaschen in 20 ml Medium in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert (mit Ausnahme von MDA-MB 231, diese Zelllinie wurde ohne CO₂ kultiviert). Die Zellkulturmedien, die benutzt wurden, wurden wie von den Zulieferern empfohlen angesetzt. Die Zusammensetzung der Kulturmedien für die Zelllinien MCF-7, HepG2, SK-MES-1 und HBL100, mit denen über die qPCR hinaus Experimente durchgeführt wurden, sind in Tabelle 44 zusammengefasst.

Bei Erreichen einer bestimmten Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dafür wurde das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung 5 min bei 37 °C abgelöst. Das Trypsin wurde mit Kulturmedium neutralisiert und ein Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

Die Suspensionszelllinien Jurkat und Molt-4 wurden subkultiviert, indem ein Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt wurde und diese mit frischem Kulturmedium aufgefüllt wurde.

Tabelle 44 Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die Zelllinien MCF-7, HepG2, SK-MES-1 und HBL100, mit denen weitergehende Studien durchgeführt wurden.

Zelllinie	Kulturmedium
MCF-7	RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum + 1x MEM nicht essentielle Aminosäuren + 1 mM Natriumpyruvat + 1x Penicillin/Streptomycin
HepG2	RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum + 1x Penicillin/Streptomycin
SK-MES-1	Minimum Essentiell Medium + 2 mM Glutamin + 1x MEM nicht essentielle Aminosäuren + 10% fetales Kälberserum + 1x Penicillin/Streptomycin
HBL100	Mc Coy's 5A Medium + 2 mM Glutamin + 10% fetales Kälberserum + 1x Penicillin/Streptomycin

6.1.5.1 Einfrieren von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu konservieren, werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wurden die Zellen, wie unter 6.1.5 beschrieben, trypsinisiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 °C kaltem Kryomedium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro 1.8 ml Medium erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde in Kryovials überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierbox bei -80 °C eingefroren.

Es wurde eine Auftaukontrolle durchgeführt bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

6.1.5.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Zellzahl und Viabilität wurde mithilfe eines LUNA™ Automated Cell Counter der Firma Logos Biosystems bestimmt. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0.4%, Amresco) gemischt. 12 µl dieser Suspension wurden auf ein LUNA™ Cell Counting Slide gegeben und vermessen.

6.1.6 qPCR

6.1.6.1 Einfrieren des Zellpellets

Um RNA isolieren zu können, wurden Zellpellets von 16 Zelllinien eingefroren. Pro Zelllinie wurden mindestens zwei Pellets aus unterschiedlichen Zellpassagen eingefroren. Bei adhärennten Zelllinien wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung 5 min bei 37 °C abgelöst. Die Trypsinlösung wurde mit Kulturmedium neutralisiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Volumen an Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt, welches ca. $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen entsprach. Die Zellen wurden bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Um sicher zu stellen, dass keine Reste des Kulturmediums im Zellpellet enthalten sind, wurde erneut bei 300 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

6.1.6.2 RNA-Isolation

Die RNA der unter 6.1.5.1 eingefrorenen Zellpellets wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Zur Lyse der Zellen wurden 20 Gauge Kanülen verwendet, durch die die Zellsuspension zehnmals durchgezogen wurde. Die Isolation erfolgte genau nach Angaben des Kit-Herstellers. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser von der Säule gewaschen.

Die RNA-Konzentration wurde mithilfe der Absorption bei 260 nm an einem VWR® Spectrophotometer UV-1600PC und folgender Formel bestimmt:

Gleichung 12
$$c = OD_{260} \times 40 \times F$$

Dabei ist c die RNA-Konzentration in µg/ml und F der Verdünnungsfaktor.

Die Reinheit der RNA-Isolation wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Konzentration sollte dabei bei mindestens 5 µg pro 40 µl für die reverse Transkription liegen und die Ratio 260/280 nm zwischen 1.5 und 3.

Die RNA wurde stets sofort in cDNA transkribiert

6.1.6.3 Reverse Transkription

Die unter 6.1.6.2 isolierte RNA wurde mithilfe des Reverse Transcription Systems der Firma *Promega* in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA mithilfe von Oligo(dT)₁₅ Primern umgeschrieben.

Das Volumen, welches 1 µg RNA entsprach, wurde mit RNase freiem Wasser auf 9 µl aufgefüllt. Die RNA wurde für 10 min bei 70 °C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Zu jeder Probe wurde 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer und 10 µl Mastermix (vgl. Tabelle 45) hinzugegeben.

Tabelle 45 Zusammensetzung des Mastermix für die reverse Transkription.

Komponente	Volumen pro Probenansatz
MgCl ₂ , 25mM	4 µl
Reverse Transkription 10x Puffer	2 µl
dNTP Mix, 10mM	2 µl
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, 2500 u	0.5 µl
AMV Reverse Transkriptase, 1500 u	15 u → 0.2 µl
Nuclease freies Wasser auf 10µl	1.3 µl

Die reverse Transkription wurde bei 42 °C für 15 min durchgeführt. Anschließend wurde für 5 min bei 95 °C und 5 min bei 0 °C inkubiert. Um die RNA abzubauen wurde je Probe 0.5 µl RNase H (2.5 U, *Life Technologies*) dazugegeben und bei 37 °C für 20 min inkubiert.

Die first strand cDNA wurde bis zur Durchführung der qPCR bei -20 °C gelagert.

6.1.6.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) ist eine sensitive Methode zur relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren. Ein Reaktionszyklus besteht dabei aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation. Die entstandene doppelsträngige DNA wird während jedes Zyklus quantifiziert. Zur Quantifizierung wird der Farbstoff SYBR Green I eingesetzt, der, wenn er an doppelsträngiger DNA bindet, 1000-fach stärker fluoresziert als ungebunden (Absorption 494 nm, Emission 521 nm). Als Referenzpunkt zur Quantifizierung wird ein Fluoreszenzwert während der exponentiellen Phase der PCR definiert. Wird dieser Wert überschritten ist der C_q-Wert (Threshold-Cycle) erreicht. Dieser Wert wird zur relativen Quantifizierung der qPCR verwendet.^[171] Um die

Spezifität der PCR nachzuweisen, wurden nach der Amplifikation die Schmelzpunkte der PCR-Produkte bestimmt.

Drei Gene wurden mittels qPCR quantifiziert (GSTP1, GSTA1 und GSTM2). Zusätzlich wurden drei Gene als Referenz mitgeführt (GAPDH, HPRT1 und SDHA).

Die für die qPCR verwendeten Primer-Paare waren alle literaturbekannt und wurden über *Eurofins* bezogen (Tabelle 47). Der SYBR Green Mastermix wurde von der Firma *Qiagen* (QuantiTect SYBR® Green PCR Kit) bezogen. Der Assay wurde auf drei verschiedenen Geräte etabliert, dem LightCycler 2.0 (*Roche*), dem LightCycler 96 (*Roche*) und dem CFX96 Touch™ (*Bio-Rad*). Die Messungen mit dem LightCycler 2.0 wurden in Glaskapillaren durchgeführt. Die Messungen mit den beiden anderen Geräten in weißen 96-Well-qPCR-Platten. Das allgemeine qPCR-Protokoll, mit dem gearbeitet wurde, kann Abbildung 61 entnommen werden. Für jede Zelllinie wurden drei PCRs durchgeführt, die Durchführung erfolgte in Triplikaten. Das Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz betrug 20 µl. Die Zusammensetzung kann Tabelle 46 entnommen werden. Pro Well wurden 30 ng cDNA eingesetzt. Zunächst wurden ein Primer-Mastermix und ein cDNA/SYBR Green Mastermix angesetzt. Anschließend wurden die Primer und dann der DNA-Mastermix in die Wells/Kapillaren pipettiert. Die Platten/Kapillaren wurden vor der Messung kurz zentrifugiert.

Folgende Zelllinien wurden in dem Screen evaluiert: HMEC, HBL100, SK-MES-1, HT-29, A-431, Hela, A-549, HL60, Jurkat, MDA-MB 231, U-251, U-87, MOLT4, HepG2, SK-BR-3, MCF-7.

Tabelle 46 Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen
cDNA (30 ng/µl)	1 µl
QuantiTect® SYBR Green	10 µl
Sense Primer (10 µM)	1.5 µl
Antisense Primer (10 µM)	1.5 µl
RNAse freies Wasser	6 µl

Für die Auswertung wurde auf das stabilste Referenzgen normalisiert:

Gleichung 13 $\Delta C_q = C_q(\text{Zielgen}) - C_q(\text{Referenzgen})$

Mittels der $\Delta\Delta C_q$ -Methode kann die relative Expression eines Gens in einer der getesteten Zelllinien im Vergleich zu einer anderen Zelllinie bestimmt werden:

Gleichung 14 $relative\ Expression = 2^{-(\Delta C_q(Zelllinie1) - \Delta C_q(Zelllinie))}$

Vor dem eigentlichen Zellscreening wurde die Assay-Effizienz für alle Primerpaare evaluiert. Dafür wurde eine cDNA Verdünnungsreihe mit vier Konzentrationsschritten von 100 bis 3 ng cDNA mit jedem Primerpaar dreimal in Duplikaten getestet. Für alle Primerpaare erfolgte die Evaluation mit cDNA aus A-549, nur die GSTA1-Primer wurden mit cDNA aus MCF-7 evaluiert. Mit der folgenden Formel wurde aus der Steigung der sich ergebenden Gerade die Effizienz berechnet:

Gleichung 15 $Effizienz = 10^{(-\frac{1}{Steigung})} - 1$

Tabelle 47 Primer für die Expressionsanalyse.

Zielgen	Sense Primer (5'→3')	Antisense Primer (5'→3')
GSTP1 ^[172]	ACCTCCGCTGCAAATACATC	GACAGCAGGGTCTCAAAAGG
GSTA1 ^[173]	GACTCCAGTCT-TATCTCCAGCTTCC	TGCTTCTTCTAAAGATTTCTCA-TCCAT
GSTM2 ^[172]	CCTTCCCAAACCTGAAGGA	TTCAAGGCCCTACTTGTTGC
GAPDH ^[125]	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
HPRT1 ^[125]	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
SDHA ^[125]	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG

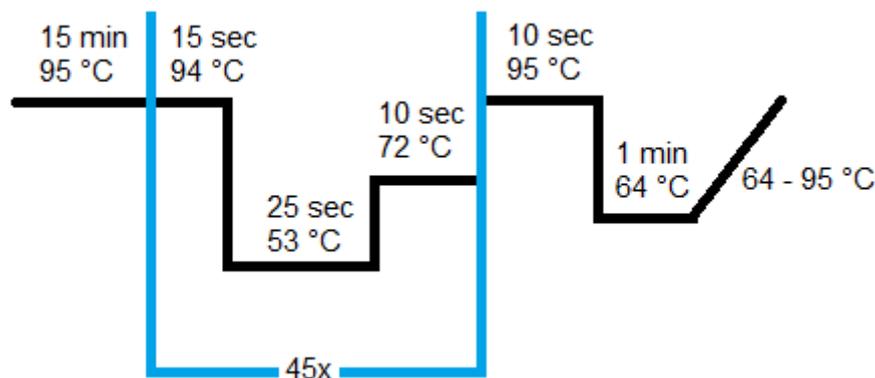


Abbildung 61 Nach Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 15 min wurden 45 Amplifikationszyklen durchlaufen, die aus einem Hybridisierungsschritt (15 sec bei 94 °C), einem Annealing-Schritt (25 sec bei 53 °C) und einem Elongationsschritt (10 sec bei 72 °C) bestanden. Am Ende jeder Messung wurde zusätzlich eine Schmelzpunktkurve aufgenommen.

6.1.7 Zellviabilitäts-Assay

Die Zytotoxizität verschiedener Substanzen wurde mithilfe des CellTiter-Glo[®] Assay der Firma Promega an drei Zelllinien getestet (MCF-7, SK-MES-1 und HBL100). Der Assay

wurde in weißen 384-Well-Mikrotiterplatten mit klarem Boden der Firma *Greiner Bio-One* nach Angaben des Herstellers mit einem Gesamtvolumen von 40 oder 100 µl durchgeführt (Tabelle 48).

Das Pipettieren in die 384-Well-Platten wurde mithilfe des CyBi®-Well Simultanpipettierers der Firma *CyBio* durchgeführt.

Die Zellen wurden wie unter 6.1.5 beschrieben mit Trypsin gelöst und zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert, sodass pro Well 5×10^3 Zellen ausgesät wurden. Für Versuche bei denen nach Substanzzugabe 48 h inkubiert wurde, wurden 3×10^3 Zellen pro Well ausgesät. Für die Zellaussaat wurde die Zellen in ein 8-Zeilen- oder 12-Spalten-Reservoir der Firma *Axygen* überführt und mit dem CyBi®-Well Simultanpipettierer in die 384-Well-Platten pipettiert. Auf jeder Mikrotiterplatte wurden mindestens vier Wells ohne Zellen, d.h. lediglich mit Kulturmedium gefüllt, mitgeführt, um den Hintergrund der Reaktion zu erfassen.

Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Testsubstanzen zu den Zellen pipettiert. Bei den Versuchen mit 100 µl Gesamtvolumen wurde zusätzlich 20 µl frisches Medium zu den Zellen hinzugegeben.

Die Testsubstanzen wurden frisch vor der Zugabe in DMSO gelöst. Verdünnungsreihen wurden zehnfach konzentriert in 96-Well-V-Boden-Platten (*Greiner Bio-One*) in Kulturmedium mit 5% DMSO angesetzt, so dass die DMSO-Endkonzentration im Assay 0.5% betrug. Für jede Verdünnungsreihe wurde ein Leerwert mit 0.5% DMSO anstelle der Testsubstanz mit gemessen.

Für Tests zur DMSO-Verträglichkeit der Zelllinien wurden DMSO-Konzentrationen bis 4% getestet.

Tabelle 48 Workflow des CellTiter-Glo® Assays in 384-Well-Platten mit einem Gesamtvolumen von 40 oder 100 µl.

	40 µl Volumen	100 µl Volumen
1.Tag: Zellaussaat	18 µl	25 µl
2.Tag: Substanzzugabe	2 µl	5 µl
Zugabe von frischem Medium	-	20 µl
3/4.Tag: CellTiterGlo Reagenz	20 µl	50 µl

Nach 24 oder 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das CellTiter-Glo® Reagenz dazugegeben wurde. Das CellTiter-Glo® Reagenz wurde in einem 96-Deepwell-Reservoir der Firma *Nunc* vorgelegt. Nach der Zugabe des Reagenzes wurde für weitere 15 min inkubiert. Anschließend wurde die

Lumineszenz an einem multifunktionalen Mikroplatten Reader (*Tecan infinite M200*) gemessen.

Für die Auswertung wurde zuerst der Mittelwert der Wells, die ohne Zellen gemessen wurden, von den Messwerten mit Zellen subtrahiert. Die Daten wurden auf den Leerwert normalisiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Excel 2010 (*Microsoft Cooperation*) und GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software*). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

6.1.8 GSH/GSSG-Bestimmung in Zelllinien

Um den Glutathiongehalt der Zelllinien HBL100 und SK-MES-1 vergleichen zu können wurde der GSH/GSSG-Glo™ Assay der Firma *Promega* durchgeführt. Dabei wurde sowohl die reduzierte Form des Glutathions (GSH) als auch die oxidierte Form (GSSG) bestimmt.

Der Assay wurde in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden (*Greiner Bio-One*) durchgeführt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung in Triplikaten. Die GSH-Standardgerade zur Ermittlung des GSH-Gehalts der Zellen wurde nur einmal in Triplikaten durchgeführt.

Für den Assay wurden pro Well 2×10^4 Zellen pro Well (in 100 μ l Medium) ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Pro Zelllinie und Messung wurden sechs Wells ausgesät, drei Wells für die Bestimmung des Gesamtglutathions, drei Wells für die Bestimmung des oxidierten Glutathions.

Für die GSH-Standardgerade wurden ausgehend von einem 5 mM Stock sieben Konzentrationen zwischen 320 und 5 μ M (20fach zur Endkonzentration im Well) und ein Leerwert ohne GSH angesetzt. Je Verdünnung wurden 5 μ l GSH-Lösung in ein Well pipettiert.

Das Kulturmedium wurde aus den Wells mit den Zellen entfernt und in jedes Well wurden 50 μ l Gesamtglutathion-Reagenz oder oxidiertes Glutathion-Reagenz gegeben. Nach 5 min wurde in jedes Well 50 μ l Luciferin Generation Reagenz gegeben. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit wurden 100 μ l Luciferin Detection Reagenz dazugegeben. Nach erneuten 15 min Inkubation wurde die Lumineszenz an einem multifunktionalen Mikroplatten Reader (*Tecan infinite M200*) gemessen.

Die GSH-Standardgerade wurde zur Bestimmung der GSH und GSSG Konzentration in den einzelnen Zelllinien genutzt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

6.2 Synthetischer Teil

6.2.1 Allgemeine Methoden

Spektroskopische Methoden

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mittels den Spektrometern DPX 300 (300 MHz bzw. 75 MHz) und AV 300 (300 MHz bzw. 75 MHz) der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur aufgenommen. Als interner Standard diente das Lösungsmittelsignal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittel (CDCl_3 oder Aceton- d_6 , bezogen von der Firma *euriso-top*). Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Die Feinstruktur der ^1H -NMR-Signale wurde wie folgt beschrieben: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), dd (Dublett von Dublett), dt (Dublett von Triplett) und m (Multiplett). Die Multiziplität der ^{13}C -NMR-Signale wurde durch ATP-Experimente (attached proton test) bestimmt und mit den Abkürzungen q (CH_3), t (CH_2), d (CH) und s (quaternäres Kohlenstoffatom) beschrieben. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte teilweise unter Zuhilfenahme von 2D-Experimenten (H,H-COSY , HMQC und HMBC).

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden mit einem Fourier-Transform-Spektrometer des Typs Paragon 1000 der Firma *Perkin-Elmer* aufgenommen. Die relativen Intensitäten der Absorptionsbanden wurden mit den Abkürzungen s (stark), m (mittelstark) und w (schwach) beschrieben.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

HRMS-Messungen wurden an einem LTQ Orbitrap XL mit FTMS Analyzer der Firma *Thermo Scientific* durchgeführt. Als Ionisierungsmethode diente Electrospray Ionization (ESI), als Referenz wurde MET-ARG-PHE-ALA eingesetzt.

Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Als stationäre Phase wurden Alugram Xra SIL G/UV₂₅₄ Aluminiumfolien der Firma *Machery-Nagel* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht ($\lambda = 254$ oder 366 nm) oder einer KMnO_4 -Lösung.

Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde 60 M Kieselgel (0.035 – 0.070 nm) der Firma *Acros Organics* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

Analytische Methoden

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillarröhrchen in einer Schmelzpunktapparatur der Firma *Büchi* nach Tottoli bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

Elementaranalyse

Die CHN-Verbrennungsanalysen wurden mit Hilfe eines Varia EL-Analysesystems der Firma *Elementar* bestimmt.

Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallstruktur wurde mit einem Nonius KappaCCD-Diffraktrometer gemessen. Die Struktur wurde mit *SHELXS-97* und *SHELXL-97* gelöst.

Reagenzien und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden nach gängigen Verfahren durch Destillation absolutiert. Reagenzien wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *Acros Organics* und *TCI bezogen*. Sie wurden, wenn nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. 4-Acetoxy-2-methyl-crotonaldehyd wurde von *BASF* zur Verfügung gestellt.

Gase

Es wurden Argon und Sauerstoff der Firma *Air Products* verwendet.

6.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1 Methylierung mit Sulfurylchlorid

Unter Eiskühlung wurde die Säurekomponente in Methanol gelöst und Sulfurylchlorid langsam dazu getropft. Nach 2 h Erhitzen unter Reflux wurde die Reaktion durch Zugabe von H₂O beendet. Der entstandene Ester wurde durch Extraktion mit Ethylacetat aufgereinigt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde.

AAV2 Steglich-Veresterung

Unter inerten Bedingungen wurden in eine Lösung der Säurekomponente in Dichlormethan unter permanentem Rühren bei 0 °C DCC, die Alkoholkomponente und DMAP gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der überschüssige N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

AAV3 Veresterung mit EDC und HOBt

Säure- und Alkoholkomponente wurden unter Rühren in Dichlormethan gelöst. Das HOBt wurde bei RT dazugegeben. Nach 15 min Rühren wurde der Reaktionsansatz auf 0 °C gekühlt und das EDC zugefügt. Nach einer weiteren Stunde bei 0 °C wurde bis zur Beendigung der Reaktion bei RT weiter gerührt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch, nachdem überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde.

AAV4 Photooxygenierung

Eine Lösung des allylischen Alkohols und TTP (5×10^{-4} M) in deuteriertem Chloroform wurde mit einer 70 W Halogen-Metalldampfampe (*Osram HQI-T*) bei Raumtemperatur bestrahlt bis mindestens 90% Umsatz des Substrat im ¹H-NMR-Spektrum beobachtet werden konnte. Während der gesamten Belichtung wurde Sauerstoff mithilfe eines Teflonschlauchs durch den Reaktionsansatz gesprudelt. Anschließend wurde das Chloroform unter vermindertem Druck entfernt und das entstandene Hydroxyhydroperoxid wurde ohne weitere Aufreinigung acetalisiert.

AAV5 Peroxyacetalisierung

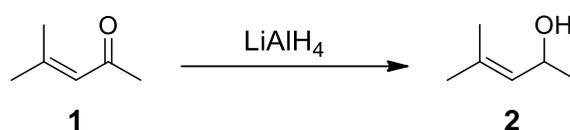
Zu einer Lösung des Hydroperoxids (eingesetzt als Rohprodukt der Photooxygenierung) und des Aldehyds oder Ketons in trockenem Dichlormethan wurde eine katalytische Menge BF₃·Et₂O (0.3 ml, ~48%) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde eine gesättigte NaHSO₃-Lösung dazugegeben. Der Ansatz wurde für zwei weitere Stunden gerührt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und

die organische Phase mit gesättigter NaHSO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgearbeitet.

6.2.3 Synthesen

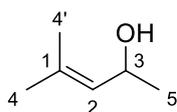
6.2.3.1 Substratsynthesen

Synthese von 4-Methylpent-3-en-2-ol (MaBr-1.0)



Unter inerten Bedingungen wurden 4.3 g LiAlH_4 (113 mmol) in 50 ml Diethylether gelöst. Langsam wurden 23.4 ml Mesityloxid **1** (20 g, 204 mmol) bei 0 °C dazu getropft. Nach 19 h Rühren bei RT wurden vorsichtig unter Eiskühlung 4 ml H_2O , anschließend 4 ml NaOH -Lösung (15%) und noch einmal 4 ml H_2O dazugegeben. Die organische Phase wurde mit 20 ml Diethylether ergänzt und mit H_2O (2 x 20 ml) und NaOH -Lösung (10%; 2 x 20 ml) gewaschen. Es wurde mit MgSO_4 getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde und das Produkt als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 8.80 g, 87.8 mmol, 43%

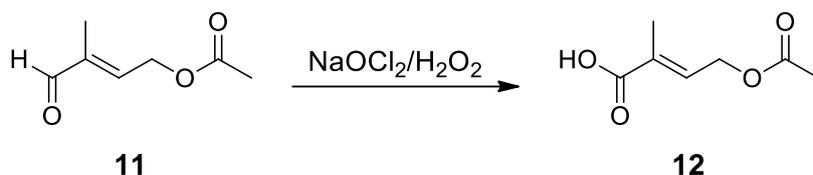


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ = 1.19 (d, J = 7.3 Hz, 3H, H-5), 1.66 (s, 3H, H-4/4'), 1.69 (s, 3H, H-4/4'), 4.53 (dq, J = 12.7, 6.3 Hz, 1H, H-3), 5.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-2).

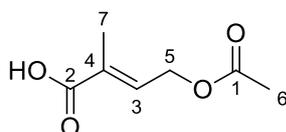
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ = 17.9 (q, C5), 23.6 (q, C4/C4'), 25.6 (q, C4/C4'), 64.7 (d, C3), 129.4 (d, C2), 133.9 (s, C1).

Synthese von 4-Acetoxy-2-methyl-2-butensäure (MaBr-2.0)

Zu einer Lösung von 10.3 g **11** (72.4 mmol) in 70 ml Acetonitril wurden 2.49 g KH_2PO_4 (18.3 mmol) in 28 ml H_2O und 7.5 ml H_2O_2 -Lösung (35%) gegeben. 9.30 g NaClO_2 (103 mmol) wurden in 100 ml H_2O gelöst und langsam unter Eiskühlung zu dem Reaktionsansatz getropft. Der Ansatz wurde für weitere 3.5 h gerührt. Anschließend wurden 0.7 g Na_2SO_3 (5.56 mmol) und 100 ml Salzsäure (8%) dazugegeben und mit Diethylether extrahiert (5 x 50 ml). Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als blass gelbliches Öl erhalten, das ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.^[97]

Ausbeute: 7.75 g, 49.0 mmol, 67%

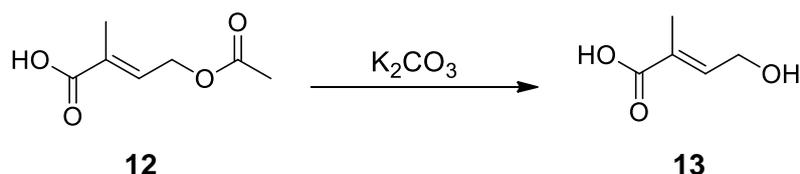


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ = 1.78 (s, 3H, H-7), 2.06 (s, 3H, H-6), 4.33 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H-5), 6.90 (m, 1H, H-3), 8.58 (s breit, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

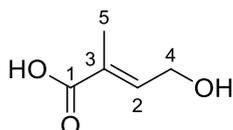
δ = 12.4 (q, C7), 20.9 (q, C6), 59.6 (t, C5), 127.9 (s, C4), 142.5 (d, C3), 172.6 (s, C2), 177.3 (s, C1).

Synthese von 2-Methyl-2-butensäure (MaBr-2.1)

Zu einer Lösung von 25 g K_2CO_3 (72.4 mmol) in 50 ml H_2O wurden 10 g **12** (63.3 mmol) getropft. Es wurden 50 ml Methanol dazugegeben und für 4 h gerührt. Anschließend

wurde das Methanol unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit Salzsäure (10%) auf pH 1 angesäuert. Es wurde mit Diethylether extrahiert (5 x 50 ml) und die vereinigte organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt umkristallisiert (Chloroform). Das Produkt fiel als farbloser Feststoff an.

Ausbeute: 4.17 g, 35.9 mmol, 57%



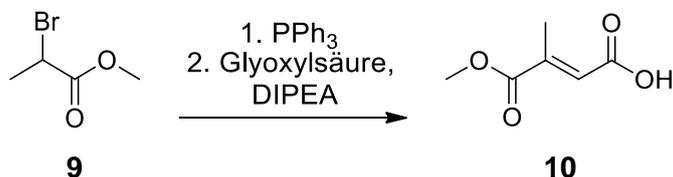
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.77 (s, 3H, H-5), 4.30 (d, J = 5.8 Hz, 2H, H-4), 6.83 (t, J = 5.8 Hz, 1H, H-2).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

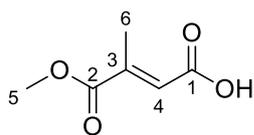
δ = 12.6 (q, C5), 59.7 (t, C4), 127.9 (s, C3), 143.1 (d, C2), 169.4 (s, C1).

Synthese von 4-Methoxy-3-methyl-4-oxobut-2-ensäure (MaBr-13.0)



Eine Lösung von 10 g Methyl-2-brompropionat (59.9 mmol) und 14.2 g Triphenylphosphin (54.2 mmol) in 50 ml Acetonitril wurde für 10 h bei 65 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurden 4.95 g Glyoxylsäure (66.9 mmol) und 9.4 ml DIPEA (6.00 g, 53.9 mmol) hinzugefügt und für weitere 2 h bei 0 °C und 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 20 ml Ethylacetat dazugegeben und die organische Phase mit gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert (3 x 30 ml). Die vereinte wässrige Phase wurde mit Ethylacetat gewaschen (2 x 40 ml) und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 50 ml) und die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck fiel das Produkt als gelblicher Feststoff an.

Ausbeute: 4.88 g, 30.8 mmol, 63%



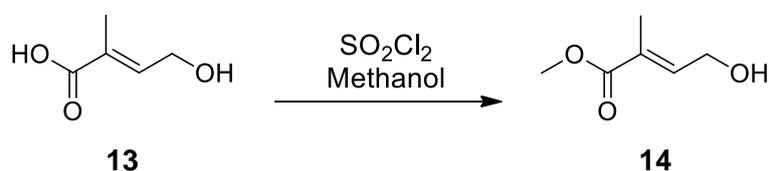
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 2.31 (d, J = 1.6 Hz, 3H, H-6), 3.82 (s, 3H, H-5), 6.80 (dd, J = 2.9, 1.4 Hz, 1H, H-4).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 14.6 (q, C6), 52.8 (q, C5), 126.0 (d, C4), 145.8 (s, C3), 167.4 (s, C2), 171.3 (s, C1).

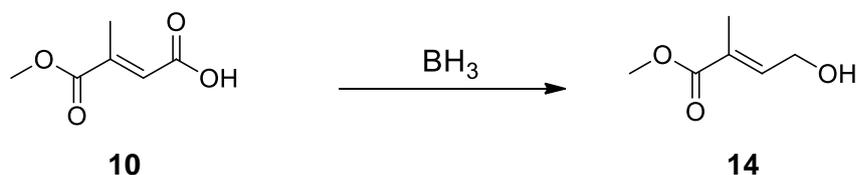
Synthese von Methyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-2.2)



Nach AAV1 wurden zu 1 g der Säure **13** (8.6 mmol) in 10 ml wasserfreiem Methanol langsam 1.3 ml Sulfurylchlorid (2.17 g, 16 mmol) getropft. Nach 3 h Erhitzen unter Reflux wurde die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert (6 x 10 ml). Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

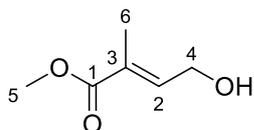
Ausbeute: 826 mg, 6.35 mmol, 74%

Alternativ



Unter inerten Bedingungen wurden 4.82 g **10** (30.5 mmol) in 40 ml Tetrahydrofuran gelöst. Es wurde auf -78 C gekühlt und 33.2 ml Boran-THF-Komplex (1 M) langsam hinzu getropft. Der Reaktionsansatz wurde langsam auf RT erwärmt und 18 h gerührt. Anschließend wurden 15 ml Essigsäure (50%) dazugegeben und das Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck entfernt. Nach Zugabe von 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 50 ml). Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen (3 x 30 ml) und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 2.37 g, 18.2 mmol, 60%



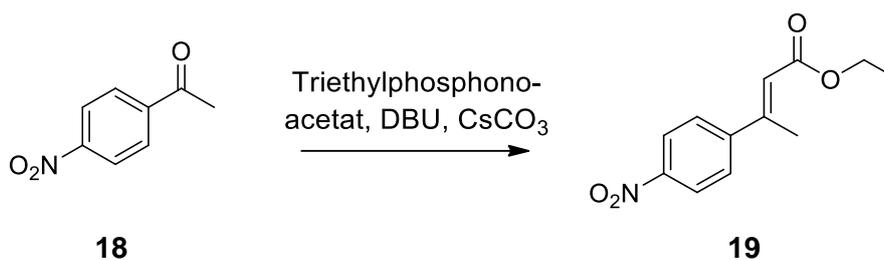
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 1.80 (d, J = 1.1 Hz, 3H, H-6), 3.72 (s, 3H, H-5), 4.30 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H-4), 6.79 (ddd, J = 6.0, 4.4, 1.4 Hz, 1H, H-2).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

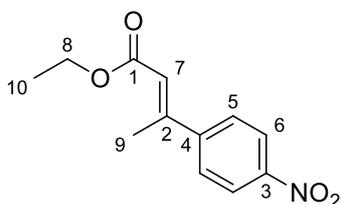
δ = 12.6 (q, C6), 51.9 (q, C5), 59.5 (t, C4), 128.0 (s, C3), 140.7 (d, C2), 168.3 (s, C1).

Synthese von Ethyl-3-(4-nitrophenyl)but-2-enoat (MaBr-CS1.0)



Unter inerten Bedingungen wurden zu einer Lösung von 2.06 g Cs₂CO₃, 1.0 ml Triethylphosphonoacetat (1.13 g, 5.04 mmol) und 0.15 ml DBU (0.153 g, 1.00 mmol) 0.997 g 4-Nitroacetophenon (6 mmol) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit 15 ml H₂O gestoppt und 2-mal mit jeweils 15 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (c-Hexan/Ethylacetat 90:10, R_f = 0.30) wurde das Produkt als farbloses Öl isoliert.^[101]

Ausbeute: 575 mg, 2.45 mmol, 55%



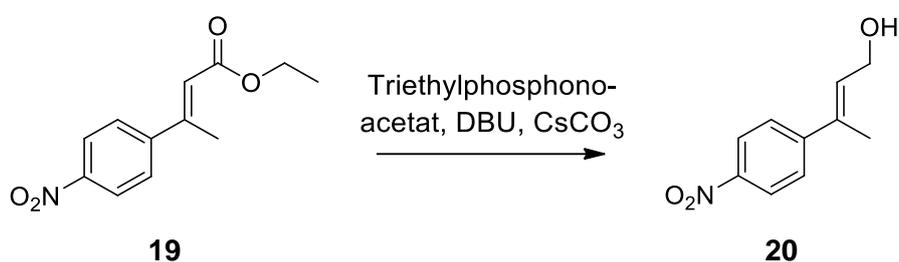
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 1.28 (t, J = 8.2 Hz, H3, H-10), 2.59 (m, 3H, H-9), 4.20 (q, J = 7.2 Hz, H2, H-8), 6.24 (m, 1H, H-7), 7.83 (m, 2H, H-5), 8.25 (m, 2H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

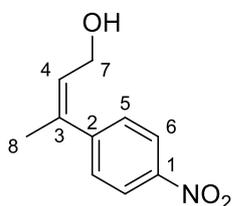
δ = 13.7 (q, C10), 16.9 (q, C9), 59.7 (t, C8), 119.7 (d, C7), 123.6 (d, C6), 127.6 (d, C5), 148.0 (s, C4), 148.3 (s, C3), 152.6 (s, C2), 165.6 (s, C1).

Synthese von 3-(4-Nitrophenyl)but-2-en-1-ol (MaBr-CS1.1)



1.05 g **19** wurden unter Schutzgas-Atmosphäre in 30 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Es wurden 8 ml DIBAL-H-Lösung (1 M) in Toluol dazugegeben und der Reaktionsansatz 22 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit gesättigter NaCl-Lösung gestoppt und mit Diethylether (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (c-Hexan/Ethylacetat 60:40, R_f = 0.25).

Ausbeute: 524 mg, 2.71 mmol, 61 %



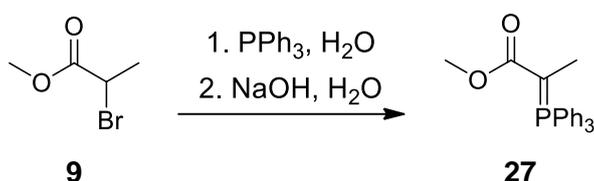
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 2.07 (s, 3H, H-8), 4.39 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-7), 6.09 (t, J = 6.1 Hz, H-4), 7.50 (m, 2H, H-5), 8.14 (m, 2H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

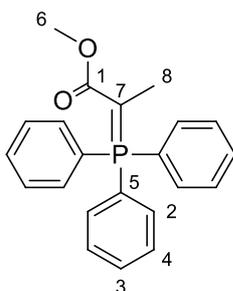
δ = 15.9 (q, C8), 59.9 (t, C7), 123.3 (d, C6), 126.5 (d, C5), 130.7 (d, C4), 136.5 (s, C3), 146.8 (s, C2), 149.3 (s, C1).

Synthese von Methyl-2-(triphenylphosphoranyliden)propanoat (PR-1.0)



Es wurden 14.8 g (56.4 mmol) Triphenylphosphan in einem Kolben vorgelegt und mit 7.0 ml (62.7 mmol) Methyl-2-brompropionat und 10 ml Wasser versetzt. Anschließend wurde 23 h bei 68 °C gerührt. Nach Abkühlen wurden zu dem Ansatz 5.2 g NaOH (139.0 mmol) gelöst in 147 ml Wasser gegeben und für 5 min gerührt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, sodass das Produkt als gelber Feststoff erhalten wurde.^[174]

Ausbeute: 18.8 g, 54 mmol, 96 %



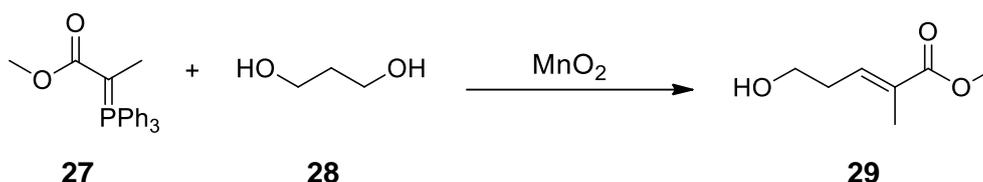
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.59 (d, J = 13.9 Hz, 3H, H-8_{minor}), 1.62 (d, J = 13.9 Hz, 3H, H-8_{major}), 3.12 (s, 3H, H-6_{major}), 3.59 (s, 3H, H-6_{minor}), 7.42-7.62 (m, 15H, H-2 + H-3 + H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

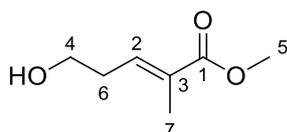
δ = 13.1 (t, C8), 31.8 (s, C7), 48.9 (t, C6), 119.0 (s, C5), 128.5 (d, C4), 132.0 (d, C3), 133.6 (d, C2), 169.4 (s, C1).

Synthese von Methyl-5-hydroxy-2-methylpent-2-enoat (PR-1.1)



5.0 g des Ylens **27** (14.3 mmol) und 0.47 ml Propan-1,3-diol **28** (0.5 g, 6.57 mmol) wurden in 17 ml Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 10.4 g aktiviertes Mangan(IV)-oxid (120 mmol) gegeben. Nachdem drei Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktionslösung abfiltriert. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*c*-Hexan/Ethylacetat 20:80, $R_f = 0.52$) aufgearbeitet, sodass ein gelbliches Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 447 mg, 3.10 mmol, 47 %



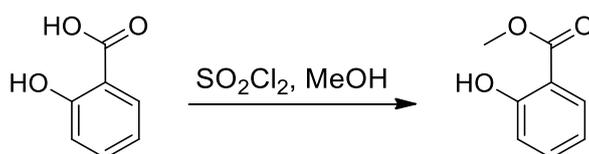
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.81$ (s, 3H, H-7), 2.40 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-6), 3.68 (m, 5H, H-4 + H-5), 6.74 (t, $J = 7.3$, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 12.6$ (q, C7), 32.1 (t, C6), 51.9 (q, C5), 61.2 (t, C4), 129.6 (s, C3), 138.7 (d, C2), 168.6 (s, C1).

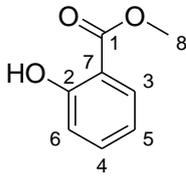
Synthese von Salicylsäuremethylester (MaBr-12.0)



Nach AVV1 wurden 10 g Salicylsäure (72.4 mmol) in 30 ml Methanol unter Einsatz von 5.85 ml Sulfurylchlorid (9.77 g, 72.4 mmol) umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion mit 30 ml H_2O , wurde mit Ethylacetat (5 x 15 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde

mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen (3 x 20 ml) und über MgSO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde und das Produkt als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 8.72 g, 57.3 mmol, 79%



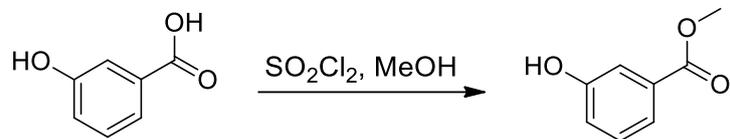
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.92 (s, 3H, H-8), 6.86 (m, 1H, H-6), 6.97 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H-5), 7.44 (ddd, J = 8.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.82 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H, H-4), 10.77 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

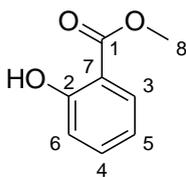
δ = 52.3 (q, C8), 112.5 (s, C7), 117.6 (d, C6), 119.2 (d, C5), 130.0 (d, C4), 135.8 (d, C3), 161.7 (s, C2), 170.7 (s, C1).

Synthese von 3-Hydroxybenzoesäuremethylester (MaBr-12.1)



Nach AVV1 wurden 5 g 3-Hydroxybenzoesäure (36.2 mmol) in 15 ml Methanol unter Einsatz von 2.93 ml Sulfurylchlorid (4.89 g, 36.2 mmol) methyliert. Nach Beendigung der Reaktion mit 25 ml H₂O, wurde mit Ethylacetat (5 x 15 ml) extrahiert. Die organische Phase über MgSO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.76 g, 31.3 mmol, 87%



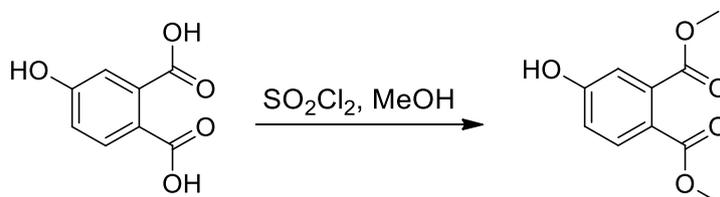
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 3.85 (s, 3H, H-8), 5.86 (s, 1H, OH), 7.09 (m, 1H, H-6), 7.31 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.48 (m, 2H, H-5 + H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Aceton- d_6):

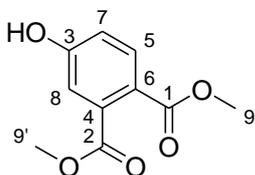
$\delta = 51.9$ (q, C8), 116.3 (d, C7), 120.4 (d, C6), 120.9 (d, C5), 130.1 (d, C4), 132.0 (s, C3), 157.9 (s, C2), 166.8 (s, C1).

Synthese von 1,2-Dimethyl-4-hydroxyphthalat (MaBr-12.2)



Nach AVV1 wurden 2 g 4-Hydroxyphthalsäure (11 mmol) in 15 ml Methanol unter Einsatz von 1.78 ml Sulfurylchlorid (2.97 g, 22 mmol) umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion mit 25 ml H_2O , wurde mit Ethylacetat (5 x 20 ml) extrahiert. Die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.23 g, 10.6 mmol, 97%



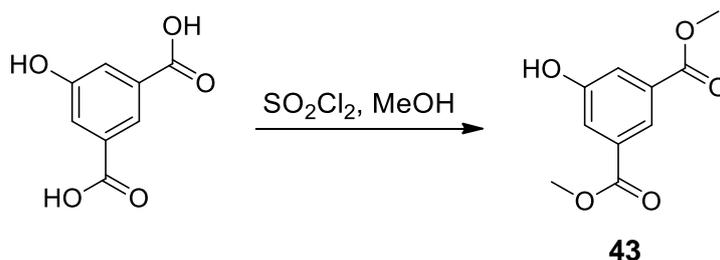
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6):

$\delta = 3.80$ (s, 3H, H-9/H-9'), 3.83 (s, 3H, H-9/H-9'), 7.02 (m, 2H, H-7 + H-8), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-5), 9.42 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Aceton- d_6):

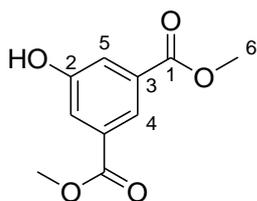
$\delta = 52.5$ (C9/C9'), 52.8 (C9/C9'), 115.8 (d, C8), 117.8 (d, C7), 122.1 (s, C6), 132.6 (d, C5), 137.3 (s, C4), 161.3 (s, C3), 167.2 (s, C2), 169.2 (s, C1).

Synthese von 1,3-Dimethyl-5-benzen-1,3-dicarboxylat (MaBr-AM6)



Nach AVV1 wurden 10 g 4-Hydroxyphthalsäure (55 mmol) in 50 ml Methanol unter Einsatz von 8.9 ml Sulfurylchlorid (14.9 g, 110 mmol) umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion mit 50 ml H₂O, wurde mit Ethylacetat (1 x 100 ml, 2 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase über MgSO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11.0 g, 52.3 mmol, 95%



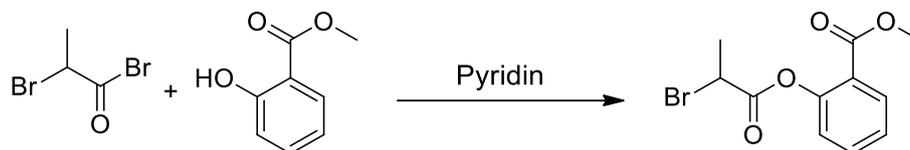
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 3.90 (s, 6H, H-6), 7.66 (m, 2H, H-7 + H-8), 8.08 (s, 1H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

δ = 52.7 (q, C6), 121.2 (d, C5), 122.2 (d, C4), 132.9 (s, C3), 158.7 (s, C2), 166.4 (s, C1).

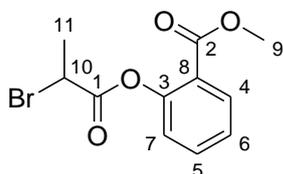
Synthese von Methyl-2-[(2-brompropanoyl)oxy]benzoat (MaBr-21.0)



Unter inerten Bedingungen bei 0 °C wurden 3.1 ml 2-Brompropionylbromid (6.39 g, 30 mmol) tropfenweise zu einer Lösung von 6.85 g Salicylsäuremethylester (45 mmol) und 3.6 ml Pyridin (3.55 g, 45 mmol) in 40 ml Acetonitril gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit 30 ml H₂O gestoppt und mit Ethylacetat (3 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit

NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die säulenchromatographische Aufreinigung (c-Hexan/Ethylacetat 80:20, R_f = 0.47) lieferte ein schwach gelbes Öl.

Ausbeute: 6.80 g, 23.7 mmol, 79%



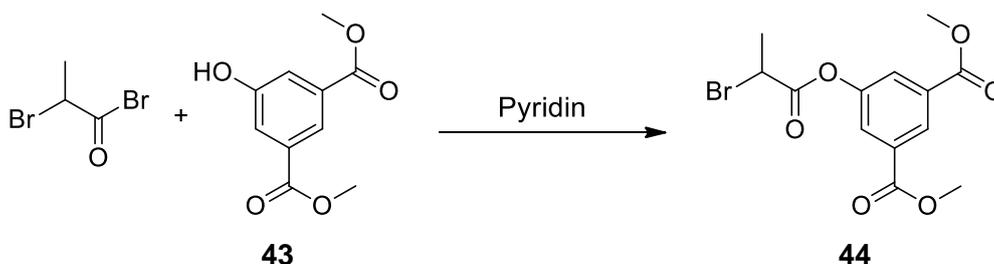
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 1.96 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-11) 3.86 (s, 3H, H-9), 4.86 (q, J = 6.9 Hz, 1H, H-10), 7.25 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H, H-7), 7.44 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.69 (ddd, J = 8.1, 7.6, 1.7 Hz, 1H, H-4), 8.02 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

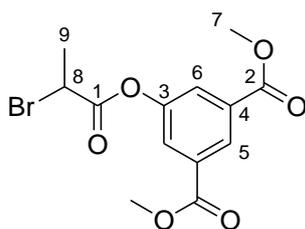
δ = 22.1 (q, C11), 41.1 (d, C10), 52.7 (q, C9), 124.2 (d, C7; s, C8), 127.4 (d, C6), 132.4 (d, C5), 135.0 (d, C4), 151.0 (s, C3), 165.4 (s, C2), 169.3 (s, C1).

Synthese von 1,3-Dimethyl-5-[(2-brompropionyl)oxy]benzen-1,3-dicarboxylat (MaBr-AM10)



Unter inerten Bedingungen bei 0 °C wurden 2.1 ml 2-Brompropionylbromid (4.33 g, 20 mmol) langsam zu einer Lösung von 6.31 g **43** (30 mmol) und 2.4 ml Pyridin (2.36 g, 30 mmol) in 30 ml Acetonitril getropft. Nach 90-minütigem Rühren bei 0 °C wurde die Reaktion mit 15 ml H₂O gestoppt und mit Ethylacetat (4 x 20 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die säulenchromatographische Aufreinigung (c-Hexan/Ethylacetat 80:20, R_f = 0.35) lieferte ein schwach gelbes Öl.

Ausbeute: 5.50 g, 15.9 mmol, 53%



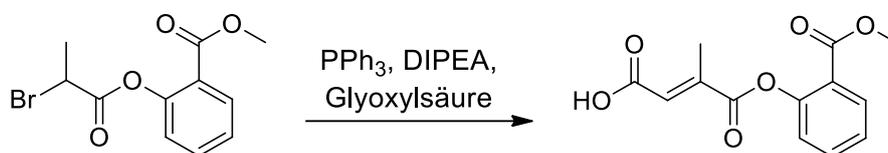
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 1.77 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-9), 3.90 (s, 3H, H-7), 4.51 (q, J = 6.9 Hz, 1H, H-8), 7.67 (d, J = 1.3 Hz, 2H, H-6), 8.09 (s, 1H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

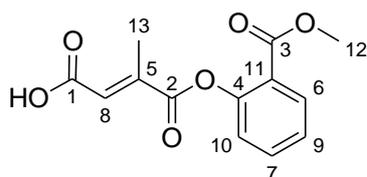
δ = 22.2 (d, C9), 41.7 (q, C8), 52.7 (q, C7), 121.2 (d, C6), 122.1 (d, C5), 132.9 (s, C4), 158.8 (s, C3), 166.5 (s, C2), 171.6 (s, C1).

Synthese von 4-[2-(Methoxycarbonyl)phenoxy]-3-methyl-4-oxobut-2-ensäure (MaBr-21.1)



Unter inerten Bedingungen wurden 5.25 g Triphenylphosphin (20 mmol) zur einer Lösung von 5.74 g Methyl-2-[(2-bromopropanoyl)oxy]benzoat (20 mmol) in 30 ml Acetonitril gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 24 h unter Reflux erhitzt. Das Reaktionsgefäß wurde auf 0 °C gekühlt und 1.48 g Glyoxylsäure (20 mmol) und 3.4 ml DIPEA (2.52 g, 20 mmol) wurden hinzugefügt. Es wurde für weitere 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 ml Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert (3 x 15 ml). Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen (2 x 10 ml) und anschließend mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von eins gebracht. Die wässrige Phase wurde nun mit Ethylacetat extrahiert (3 x 30 ml). Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.48 g, 5.60 mmol, 28%



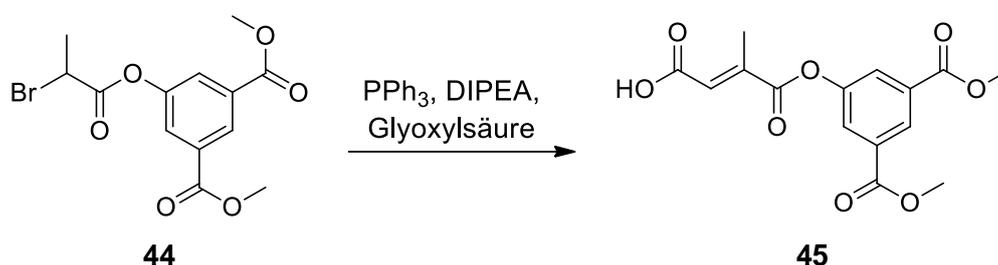
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 2.39 (d, J = 1.3 Hz, 3H, H-13), 3.82 (s, 3H, H-12), 6.30, (s, 1H, COOH), 6.99 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-8), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-10), 7.45 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-9), 7.72 (m, 1H, H-6), 8.04 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-7).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

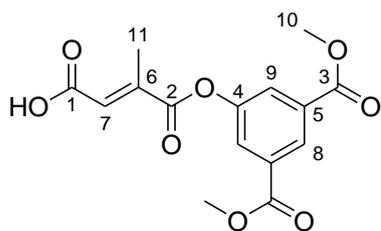
δ = 14.6 (q, C13), 52.6 (q, C12), 124.1 (s, C11), 124.8 (d, C10), 127.3 (d, C9), 129.2 (d, C8), 132.5 (d, C7), 135.0 (d, C6), 143.3 (s, C5), 151.5 (s, C4), 165.3 (s, C3), 166.6 (s, C2), 167.0 (s, C1).

Synthese von 4-[3,5-Bis(methoxycarbonyl)phenoxy]-3-methyl-4-oxobut-2-ensäure (MaBr-AM13)



Unter inerten Bedingungen wurden 2.1 g Triphenylphosphin (8 mmol) zur einer Lösung von 2.75 g **44** (8 mmol) in 25 ml Acetonitril gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 16 h unter Reflux erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf 0 °C gekühlt und 0.74 g Glyoxylsäure (8 mmol) und 1.4 ml DIPEA (1.06 g, 8 mmol) wurden hinzugefügt. Nach weiteren 48 h bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 ml Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert (3 x 20 ml). Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen (2 x 10 ml) und anschließend mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von eins gebracht. Die wässrige Phase wurde nun mit Ethylacetat extrahiert (3 x 30 ml). Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.44 g, 4.47 mmol, 56%



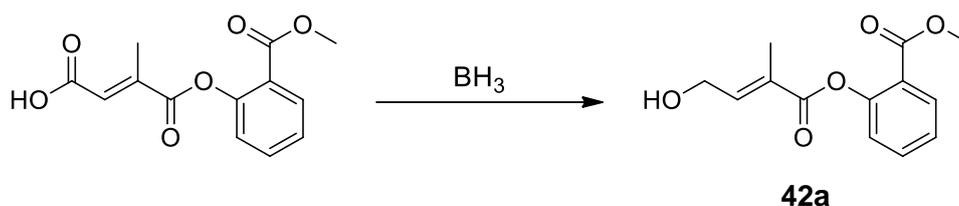
¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆):

δ = 2.38 (d, J = 1.4 Hz, 3H, H-11), 3.95 (s, 6H, H-10), 7.02 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-7), 8.09 (d, J = 1.3 Hz, 2H, H-9), 8.49 (s, 1H, H-8).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆):

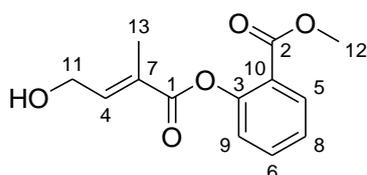
δ = 14.5 (q, C11), 53.0 (q, C10), 127.9 (d, C9), 128.4 (d, C8), 129.7 (d, C7), 133.1 (s, C6), 142.8 (s, C5), 152.1 (s, C4), 165.7 (s, C3), 166.3 (s, C2), 166.9 (s, C1).

Synthese von Methyl-2-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enyl)oxy]benzoat (MaBr-21.2)



Bei -78 °C wurden unter inerten Bedingungen 5.5 ml Boran-THF-Komplex (1 M) langsam zu einer Lösung von 1.43 g 4-[2-(Methoxycarbonyl)phenoxy]-3-methyl-4-oxobut-2-ensäure (5.45 mmol) in 15 ml Tetrahydrofuran getropft. Nach 20 h Rühren bei RT wurde die Reaktion mit Zugabe von 5 ml Essigsäure (50%) gestoppt. Das Tetrahydrofuran wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Säulenchromatographie (c-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.29) wurde das Produkt als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 544 mg, 2.17 mmol, 40%



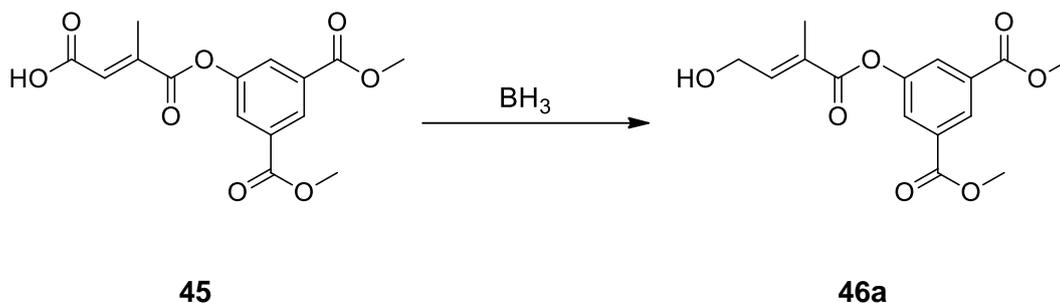
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.97 (d, J = 1.0 Hz, 3H, H-13), 3.82 (s, 3H, H-12), 4.44 (dd, J = 6.0, 0.6 Hz, 2H, H-11), 7.11 (m, 2H, H-4 + H-9), 7.31 (td, J = 7.7, 0.9 Hz, 1H, H-8), 7.56 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-5), 8.02 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

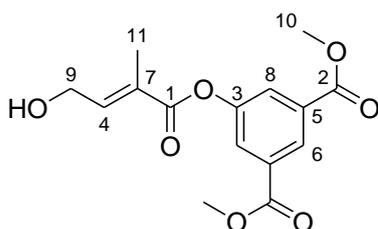
δ = 13.0 (q, C13), 52.4 (q, C12), 60.0 (t, C11), 123.4 (s, C10), 124.0 (d, C9), 126.1 (d, C8), 127.9 (s, C7), 131.9 (d, C6), 134.0 (d, C5), 142.7 (d, C4), 151.0 (s, C3), 165.2 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von 1,3-Dimethyl-5-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enoyl)oxy]benzen-1,3-dicarboxylat (MaBr-AM15)



Bei -78 °C wurden unter inerten Bedingungen 4.5 ml Boran-THF-Komplex (1 M) langsam zu einer Lösung von 1.44 g Säure **45** (4.5 mmol) in 20 ml Tetrahydrofuran getropft. Nach 20 h Rühren bei RT wurde die Reaktion mit Zugabe von 4 ml Essigsäure (50%) gestoppt. Das Tetrahydrofuran wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 45 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Säulenchromatographie (n-Hexan/Ethylacetat 60:40, R_f = 0.41) wurde das Produkt als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 488 mg, 1.58 mmol, 35%



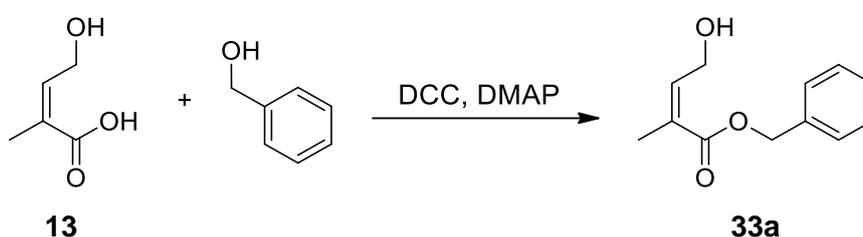
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94 (s, 3H, H-11), 3.93 (s, 6H, H-10), 4.45 (d, J = 5.1 Hz, 2H, H-9), 7.11 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H-4), 7.96 (d, J = 1.2 Hz, 2H, H-8), 8.55 (s, 1H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

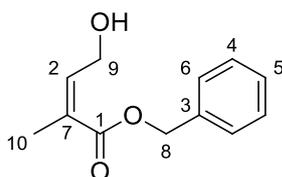
δ = 13.0 (q, C11), 52.7 (q, C10), 60.0 (t, C9), 127.4 (s, C7; d, C8), 128.1 (d, C6), 132.1 (s, C5), 143.6 (d, C4), 151.2 (s, C3), 165.6 (s, C2), 165.7 (s, C1).

Synthese von Benzyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-9.0)



Nach AVV2 wurden 334 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (2.9 mmol) mit 333 µl Benzylalkohol (346 mg, 3.2 mmol) in 10 ml Dichlormethan unter Einsatz von 680 mg DCC (3.3 mmol) und 91.5 mg DMAP (0.75 mmol) umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei RT gerührt und anschließend säulenchromatographisch aufgearbeitet (c-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.28). Das Produkt konnte als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 238 mg, 1.15 mmol, 40%



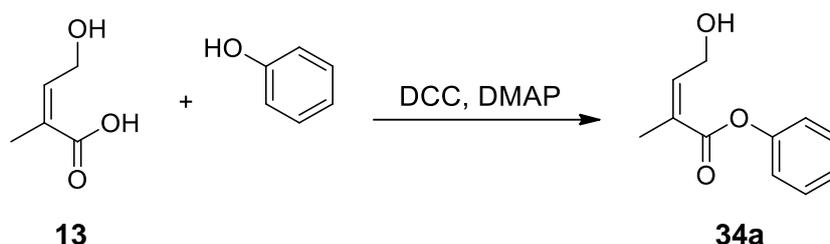
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.84 (d, J = 3.8 Hz, 3H, H-10), 4.30 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H-9), 5.19 (s, 2H, H-8), 6.86 (dt, J = 11.7, 5.8 Hz, 1H, H-2), 7.34 (m, 5H, H-4 + H-5 + H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

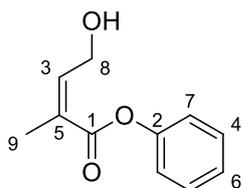
δ = 12.7 (t, C10), 59.5 (t, C9), 65.1 (t, C8), 127.7 (s, C7), 128.1 (d, C6), 128.2 (d, C5), 128.5 (d, C4), 140.9 (s, C3), 141.1 (d, C2), 167.4 (s, C1).

Synthese von Phenyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-10.0)



Nach AVV2 wurden 464 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (4 mmol) mit 395 mg Phenol (4.2 mmol) in 20 ml Dichlormethan unter Einsatz von 908 mg DCC (4.4 mmol) und 122 mg DMAP (1 mmol) verestert. Der Reaktionsansatz wurde vor der Aufreinigung für 36 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 50:50, $R_f = 0.40$) konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 357 mg, 1.86 mmol, 46%



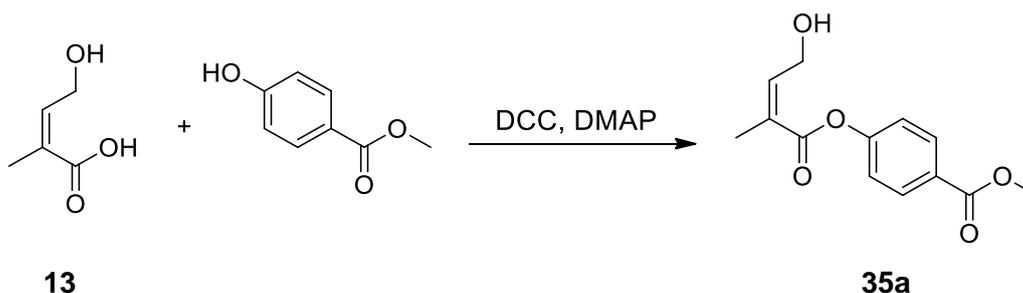
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.94$ (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, H-9), 4.38 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-8), 7.09 (m, 3H, H-3 + H-7), 7.24 (m, 1H, H-6), 7.40 (m, 2H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

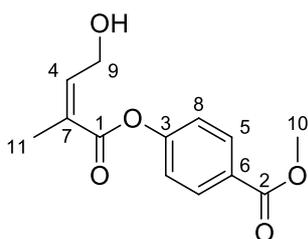
$\delta = 12.9$ (q, C9), 59.7 (t, C8), 121.6 (d, C7), 125.8 (d, C6), 127.7 (s, C5), 129.5 (d, C4), 142.8 (d, C3), 151.0 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von Methyl-4-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enoyl)oxy]benzoat (MaBr-8.0)



Nach AVV2 wurden 348 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (3 mmol) mit 486 mg 4-Hydroxybenzoesäuremethylester (3.2 mmol) in 15 ml Dichlormethan unter Einsatz von 680 mg DCC (3.3 mmol) und 91.6 mg DMAP (0.75 mmol) verestert. Der Reaktionsansatz wurde vor der Aufreinigung für 16 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 50:50, $R_f = 0.35$) konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 303 mg, 1.21 mmol, 40%



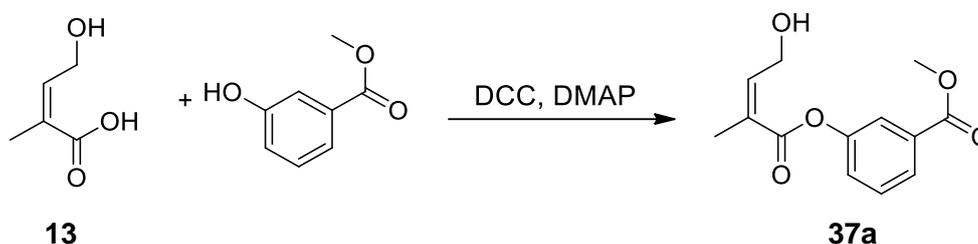
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.94$ (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, H-11), 3.90 (s, 3H, H-10), 4.44 (dd, $J = 5.9, 0.9$ Hz, 2H, H-9), 7.10 (m, 1H, H-4), 7.18 (m, 2H, H-8), 8.07 (m, 2H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

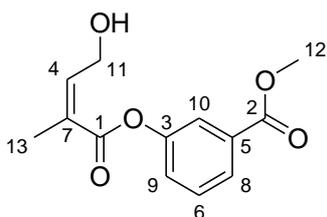
$\delta = 13.0$ (q, C11), 52.4 (q, C10), 60.0 (t, C9), 121.8 (d, C8), 127.7 (s, C6; s, C7), 131.3 (d, C5), 143.3 (d, C4), 154.8 (s, C3), 165.7 (s, C2), 166.6 (s, C1).

Synthese von Methyl-3-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enyl)oxy]benzoat (MaBr-17.0)



Nach AVV2 wurden 580 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (5 mmol) mit 912 mg 3-Hydroxybenzoesäuremethylester (6 mmol) in 20 ml Dichlormethan mit 1.237 g DCC (6 mmol) und 122 mg DMAP (1 mmol) verestert. Der Reaktionsansatz wurde für 22 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 60:40, $R_f = 0.29$) konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 495 mg, 1.98 mmol, 40%



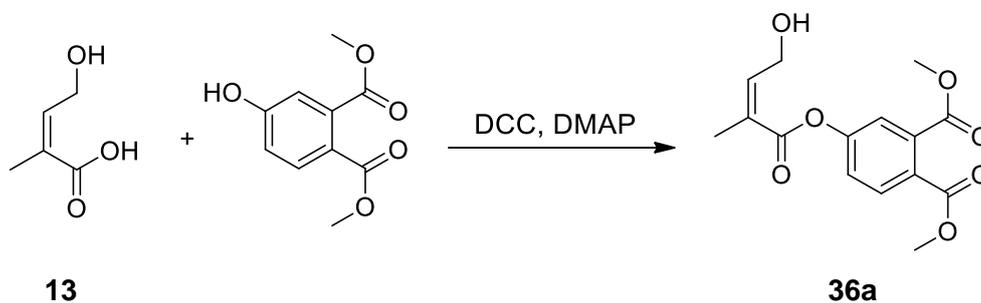
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93 (s, 3H, H-13), 3.90 (s, 3H, H-12), 4.42 (d, J = 5.8 Hz, 2H, H-11), 7.09 (m, 1H, H-4), 7.30 (m, 1H, H-9), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.76 (s, 1H, H-10), 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-8).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

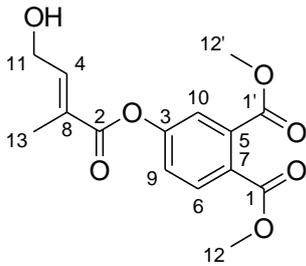
δ = 13.0 (q, C13), 52.5 (q, C12), 59.9 (t, C11), 123.0 (d, C10), 126.5 (d, C9), 127.1 (d, C8), 127.6 (s, C7), 129.6 (d, C6), 131.7 (s, C5), 143.2 (d, C4), 151.0 (s, C3), 166.0 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von 1,2-Dimethyl-4-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enyl)oxy]phthalat (MaBr-22.0)



Nach AVV2 wurden 464 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (4 mmol) mit 841 mg 1,2-Dimethyl-4-hydroxyphthalat (4 mmol) in 20 ml Dichlormethan mit 990 mg DCC (4.8 mmol) und 98 mg DMAP (0.8 mmol) umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (c-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.19) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 560 mg, 1.82 mmol, 45%



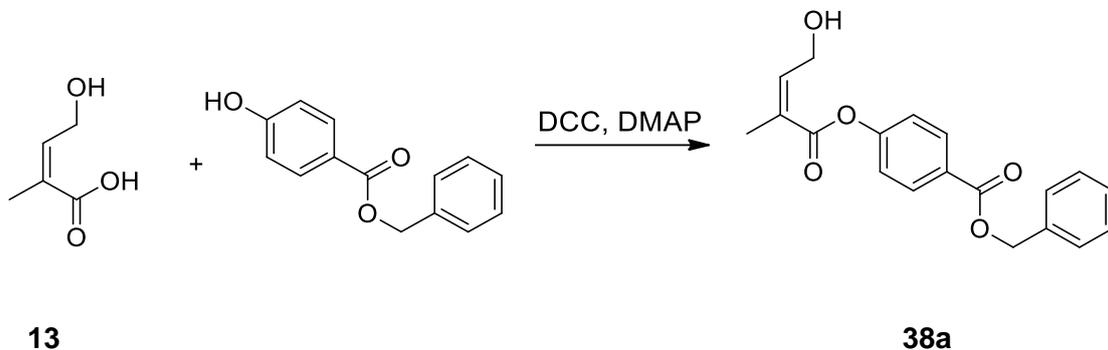
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.91 (d, J = 1.1 Hz, 3H, H-13), 3.88 (s, 6H, H-12 + H-12), 4.40 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 2H, H-11), 7.07 (td, J = 5.8, 1.3 Hz, 1H, H-4), 7.29 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-9), 7.45 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-10), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

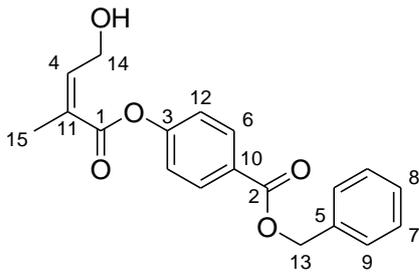
δ = 12.9 (q, C13), 52.9 (q, C12/C12'), 53.0 (q, C12/C12'), 59.9 (t, C11), 122.4 (d, C10), 124.3 (d, C9), 127.2 (s, C8), 128.9 (s, C7), 130.7 (d, C6), 134.0 (s, C5), 143.9 (d, C4), 153.1 (s, C3), 165.4 (s, C2), 167.4 (s, C1/C1'), 167.4 (s, C1/C1').

Synthese von Benzyl-4-[(4-hydroxy-2-methylbut-2-enoyl)oxy]benzoat (MaBr-24.0)



Nach AVV2 wurden 580 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (5 mmol) mit 1.14 g Benzyl-4-hydroxybenzoat (5 mmol) in 20 ml Dichlormethan mithilfe von 1.24 g DCC (5 mmol) und 122 mg DMAP (1 mmol) umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 60:40, R_f = 0.25) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 873 mg, 2.68 mmol, 54%



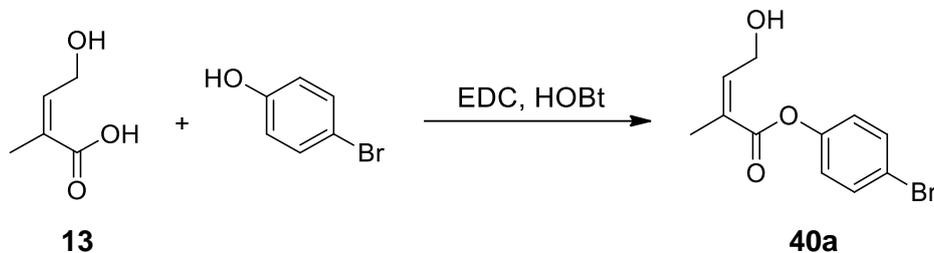
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94 (t, J = 2.1 Hz, 3H, H-15), 4.44 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 2H, H-14), 5.36 (s, 2H, H-13), 7.10 (td, J = 5.9, 1.3 Hz, 1H, H-4), 7.19 (m, 2H, H-12), 7.40 (m, 5H, H-7 + H-8 + H-9), 8.11 (m, 2H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

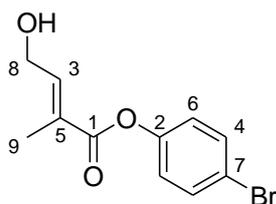
δ = 13.0 (q, C15), 60.0 (t, C14), 67.0 (t, C13), 121.8 (d, C12), 127.7 (s, C10; s, C11), 128.3 (d, C9), 128.5 (d, C8), 128.9 (d, C7), 131.4 (d, C6), 136.1 (s, C5), 143.3 (d, C4), 154.9 (s, C3), 165.6 (s, C2), 165.9 (s, C1).

Synthese von 4-Bromphenyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-32.0)



Nach AVV3 wurden 348 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (3 mmol) mit 512 mg Benzyl-4-hydroxybenzoat (3 mmol), 573 mg HOBt (3.5 mmol) und 543 mg EDC (3.5 mmol) in 15 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach einer Stunde bei 0 °C wurde der Reaktionsansatz für 16 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.31) konnte das Produkt als blass gelbliches Öl isoliert werden.

Ausbeute: 439 mg, 1.62 mmol, 54%



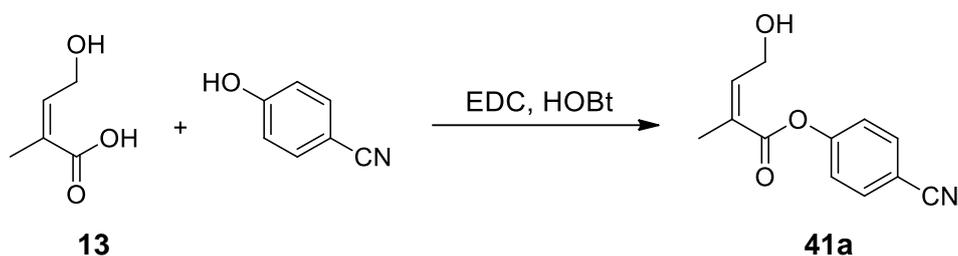
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.95 (d, J = 1.2 Hz, 3H, H-9), 4.43 (dd, J = 5.9, 1.0 Hz, 2H, H-8), 7.05 – 6.97 (m, 2H, H-6), 7.08 (td, J = 5.9, 1.3 Hz, 1H, H-3), δ = 7.55 – 7.47 (m, 2H, H-4).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

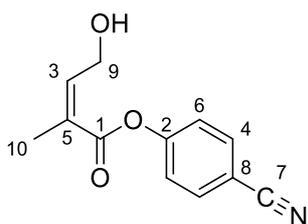
δ = 13.0 (q, C9), 60.0 (t, C8), 119.0 (s, C7), 123.6 (s, C6), 127.8 (s, C5), 132.6 (d, C4), 142.9 (d, C3), 150.1 (s, C2), 165.9 (s, C1).

Synthese von 4-Cyanophenyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-31.0)



Nach AVV2 wurden 348 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonensäure **13** (3 mmol) mit 357 mg 4-Cyanophenol (3 mmol), 573 mg HOBt (3.5 mmol) und 543 mg EDC (3.5 mmol) in 15 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach einer Stunde bei 0 °C wurde der Reaktionsansatz für 18 h bei RT gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (c-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.28) konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 429 mg, 1.98 mmol, 66%



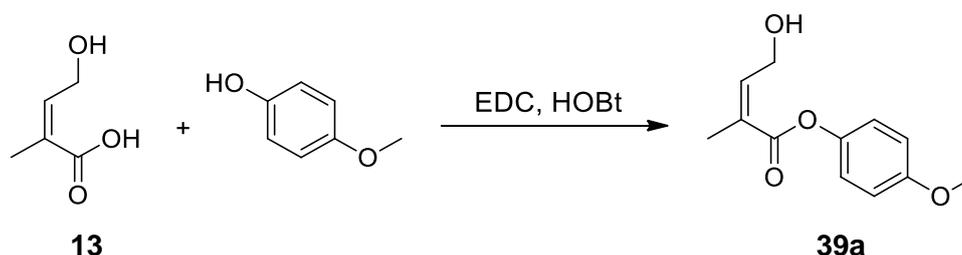
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94 (d, J = 1.2 Hz, 3H, H-10), 4.44 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H-9), 7.10 (m, 1H, H-3), 7.26 (m, 2H, H-6), 7.69 (m, 2H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

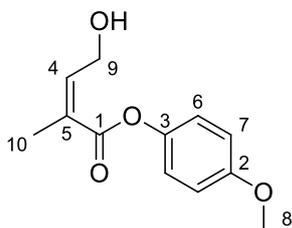
δ = 12.9 (q, C10), 59.8 (t, C9), 109.5 (s, C8), 118.4 (s, C7), 122.9 (d, C6), 127.1 (s, C5), 133.8 (d, C4), 144.0 (d, C3), 154.4 (s, C2), 165.3 (s, C1).

Synthese von 4-Methoxyphenyl-4-hydroxy-2-methylbut-2-enoat (MaBr-29.0)



Nach AVV3 wurden 348 mg der 4-Hydroxy-2-methyl-crotonsäure **13** (3 mmol) mit 357 mg 4-Cyanophenol (3 mmol), 573 mg HOBT (3.5 mmol) und 543 mg EDC (3.5 mmol) in 15 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach einer Stunde bei 0 °C wurde der Reaktionsansatz für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit gesättigter K_2CO_3 -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 50:50, R_f = 0.26) konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute: 482 mg, 2.17 mmol, 72%



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6):

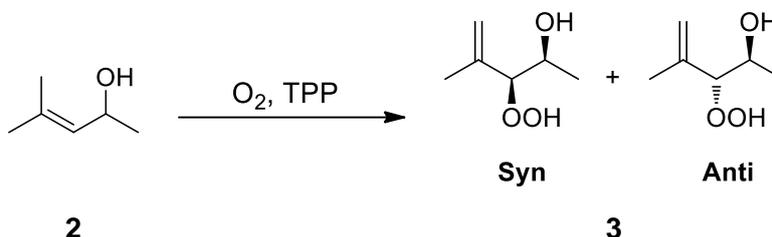
δ = 1.89 (m, 3H, H-10), 3.80 (s, 3H, H-8), 4.37 (d, J = 5.0 Hz, 2H, H-9), 7.03 (m, 5H, H-4 + H-6 + H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Aceton- d_6):

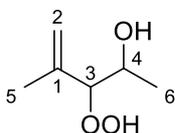
δ = 11.9 (t, C10), 55.0 (t, C9), 58.8 (q, C8), 114.2 (d, C7), 122.5 (d, C6), 126.4 (s, C5), 143.9 (d, C4), 144.7 (s, C3), 157.3 (s, C2), 166.0 (s, C1).

6.2.3.2 Photooxygenierungen

Synthese von 3-Hydroperoxy-4-methylpent-4-en-2-ol (MaBr-1.1)



Nach AAV4 wurden 7.80 g **2** (77.8 mmol) in 80 ml Chloroform (nicht deuteriert) gelöst, mit TPP versetzt und 24 h belichtet. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels unaufgereinigt weiterverwendet (*syn:anti* 89:11).

**Syn:**

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.10 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H-6), 1.73 (s, 3H, H-5), 3.86 (dq, J = 6.4, 8.3 Hz, 1H, H-4), 4.15 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.08 (m, 2H, H-2).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 17.9 (q, C6), 18.8 (q, C5), 67.3 (d, C4), 95.0 (d, C3), 116.7 (t, C2), 141.5 (s, C1).

Anti:

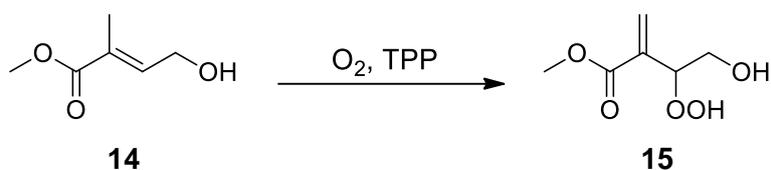
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.21 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H-6), 1.80 (s, 3H, H-5), 3.96 (dq, J = 6.4, 8.3 Hz, 1H, H-4), 4.30 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.12 (m, 2H, H-2).

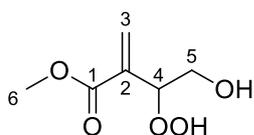
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 18.4 (q, C6), 19.4 (q, C5), 67.2 (d, C4), 92.0 (d, C3), 115.3 (t, C2), 141.2 (s, C1).

Synthese von Methyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylenebutanoat (MaBr-6.0)



Nach AAV4 wurden 300 mg **14** (2.31 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform gelöst, mit TPP versetzt und 14 h belichtet. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.



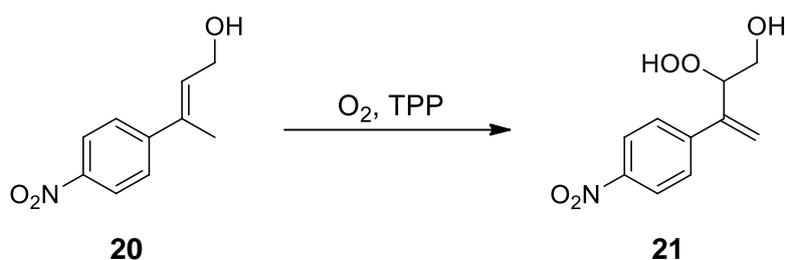
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.66 (dd, J = 12.5, 7.4 Hz, 1H, H-5a), 3.78 (s, 3H, H-6), 3.87 (dd, J = 12.5, 2.9 Hz, 2H, H-5b), 5.02 (dd, J = 7.3, 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.03 (s, 1H, H-3a), 6.46 (s, 1H, H-3b).

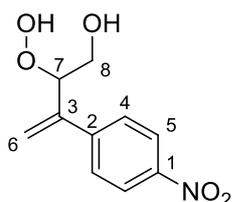
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.3 (q, C6), 62.9 (t, C5), 84.4 (d, C4), 128.5 (t, C3), 135.7 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von 2-Hydroperoxy-3-(4-nitrophenyl)but-3-en-1-ol (MaBr-CS1.2)



Nach AAV4 wurden 0.524 g **20** (2.7 mmol) in Chloroform (nicht deuteriert) gelöst, mit TPP versetzt und 168 h belichtet. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.



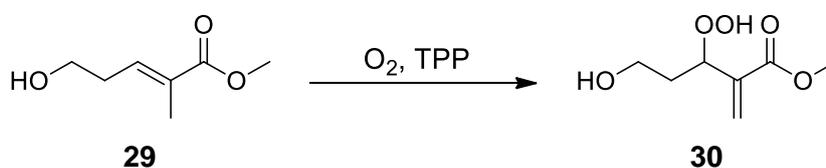
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.73 (m, 2H, H-8), 5.00 (m, H-7), 5.56 (s, 1H, H-6a), 5.61 (s, 1H, H-6b), 7.55 (m, 2H, H-4), 8.12 (m, 2H, H-5).

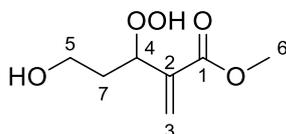
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 63.0 (t, C8), 87.4 (d, C7), 119.5 (t, C6), 123.8 (d, C5), 127.7 (d, C4), 142.7 (s, C3), 145.8 (s, C2), 147.3 (s, C1).

Synthese von Methyl 3-hydroperoxy-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (PR-1.2)



Nach AAV4 wurden 533 mg **29** (3.84 mmol) in 6 ml deuteriertem Chloroform gelöst, mit TPP versetzt und 28 h photooxygeniert. Das Produkt wurde unaufgereinigt weiterverwendet.



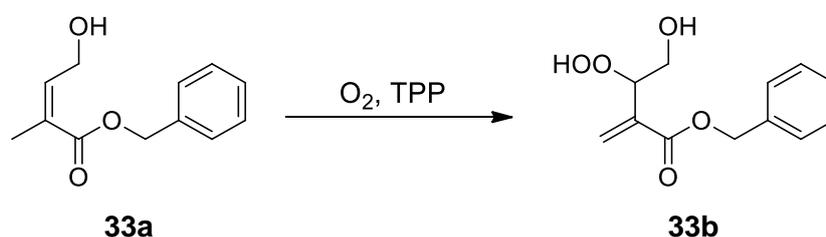
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.86 (m, 2H, H-7), 3.64-3.80 (m, 5H, H-5 + H-6), 4.96 (dd, J = 7.6, 5.3, 1H, H-4), 5.97 (s, 1H, H-3a), 6.37 (s, 1H, H-3b).

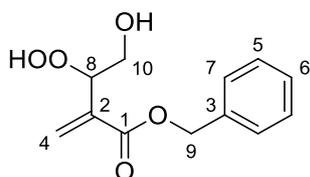
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 35.2 (t, C7), 52.2 (q, C6), 59.6 (t, C5), 81.5 (d, C4), 126.8 (t, C3), 139.3 (s, C2), 166.9 (s, C1).

Synthese von Benzyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylenebutanoat (MaBr-9.1)



Nach AVV4 wurden 238 mg des Alkohols **33a** (1.86 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform für 15 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.



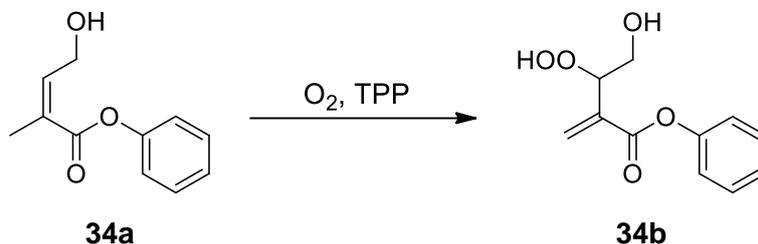
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.70 (m, 1H, H-10a), 3.87 (m, 1H, H-10b), 5.06 (dd, J = 7.0, 2.9 Hz, 1H, H-8), 5.23 (s, 2H, H-9), 6.02 (s, 1H, H-4a), 6.51 (s, 1H, H-4b), 7.39 (d, J = 2.3 Hz, 5H, H-5 + H-6 + H-7).

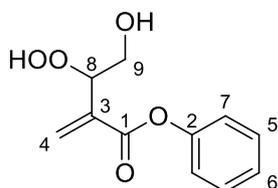
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 63.0 (C10), 67.00 (C9), 84.4 (C8), 128.2 (C7), 128.4 (C6), 128.6 (C5), 129.2 (C4), 135.4 (C3), 135.8 (C2), 165.1 (C1).

Synthese von Phenyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylenebutanoat (MaBr-10.1)



Nach AVV4 wurden 357 mg des Alkohols **42a** (1.86 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform für 23 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.



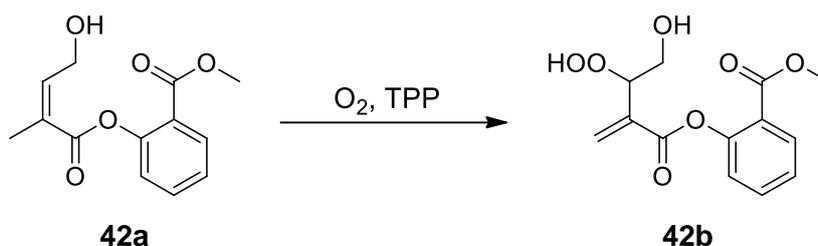
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.74 (dd, J = 12.5, 7.3 Hz, 1H, H-9a), 3.95 (dd, J = 12.5, 2.7 Hz, 1H, H-9b), 5.11 (dd, J = 7.0, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.21 (s, 1H, H-4a), 6.70 (s, 1H, H-4b), 7.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H-7), 7.25 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.40 (dd, J = 10.5, 5.1 Hz, 2H, H-5).

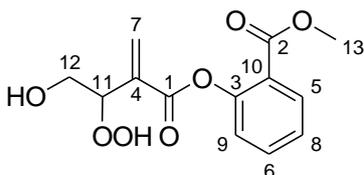
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ = 62.8 (C9), 84.4 (C8), 121.5 (C7), 126.1 (C6), 129.5 (C5), 130.2 (C4), 135.4 (C3), 150.4 (C2), 164.5 (C1).

Synthese von Methyl-2-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylidenebutanoyl)-oxy]benzoat (MaBr-21.3)



Nach AVV4 wurden 543 mg des Alkohols **42a** (2.17 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform für 24 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.



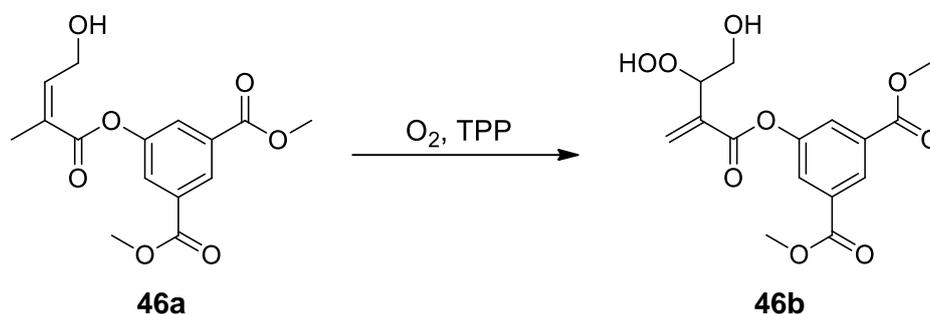
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ = 3.82 (m, 4H, H-13 + H-12a), 3.97 (dd, J = 12.5, 3.1 Hz, 1H, H12b), 5.08 (dd, J = 6.9, 2.8 Hz, 1H, H-11), 6.19 (s, 1H, H-7a), 6.70 (s, 1H, H-7b), 7.14 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.31 (dd, J = 11.1, 4.2 Hz, 1H, H-8), 7.56 (td, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-5), 8.01 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H-6), 10.15 (s, 1H, OOH).

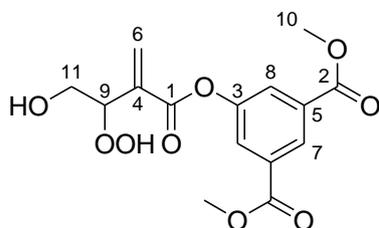
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ = 52.6 (q, C13), 62.7 (t, C12), 84.7 (d, C11), 122.9 (s, C10), 123.9 (d, C9), 126.4 (d, C8), 130.6 (t, C7), 132.0 (d, C6), 134.3 (d, C5), 135.5 (s, C4), 150.5 (s, C3), 164.5 (s, C2), 165.3 (s, C1).

Synthese von 1,3-Dimethyl 5-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-ethylidenebutanoyl)oxy]benzen-1,3-dicarboxylat (MaBr-AM4)



Nach AVV4 wurden 462 mg des Alkohols **46a** (1.50 mmol) in 6 ml deuteriertem Chloroform für 18 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung acetalisiert.



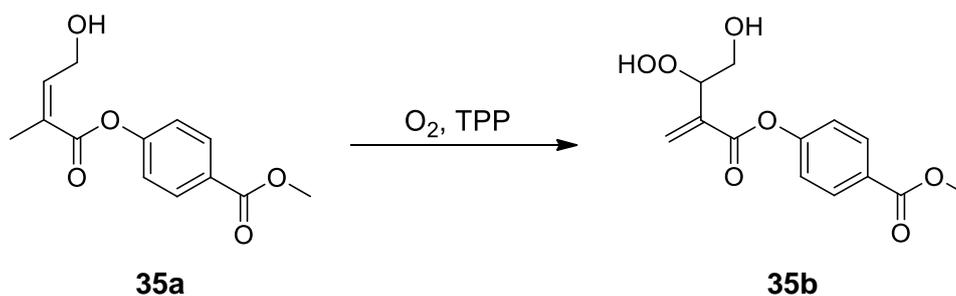
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.77 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H, H-11a), 4.00 – 3.86 (m, 7H, H-10 + H-11a), 5.09 (dd, J = 6.7, 2.6 Hz, 1H, H-9), 6.24 (s, 1H, H-5a), 6.71 (s, 1H, H-5b), 7.96 (d, J = 1.4 Hz, 2H, H-8), 8.52 (s, 1H, H-7).

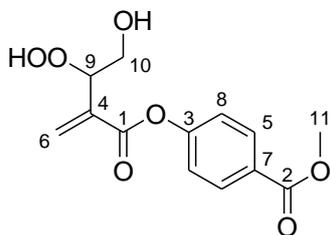
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.8 (t, C11), 62.9 (q, C10), 84.2 (d, C9), 127.3 (d, C8), 128.3 (d, C7), 131.0 (t, C6), 132.1 (s, C5), 135.2 (s, C4), 150.6 (s, C3), 163.9 (s, C2), 165.5 (s, C1).

Synthese von Methyl 4-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylenbutanoyl)oxy]benzoat (MaBr-8.1)



Nach AVV4 wurden 303 mg des Alkohols **35a** (1.21 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform für 13 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung acetalisiert.



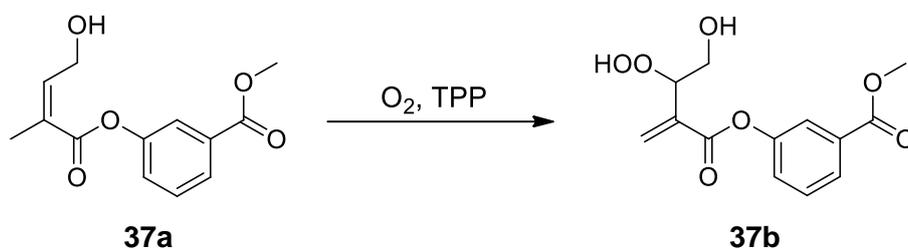
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.74 (dd, J = 12.5, 7.1 Hz, 1H, H-10a), 3.91 (m, 4H, H-10b + H-11), 5.08 (dd, J = 6.7, 2.2 Hz, 1H, H-9), 6.69 (s, 1H, H-6), 6.21 (s, 1H, H-6), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-8), 8.05 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-5).

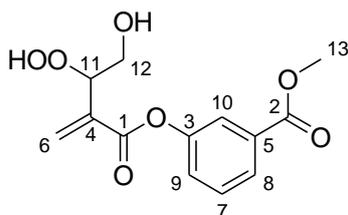
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.3 (q, C11), 62.8 (t, C10), 84.1 (d, C9), 121.6 (d, C8), 127.9 (s, C7), 130.6 (t, C6), 131.2 (d, C5), 135.2 (s, C4), 154.0 (s, C3), 163.7 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von Methyl 3-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylenbutanoyl)oxy]-benzoat (MaBr-17.1)



Nach AVV4 wurden 495 mg des Alkohols **37a** (1.98 mmol) in 5 ml deuteriertem Chloroform für 17 h bei RT bestrahlt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.



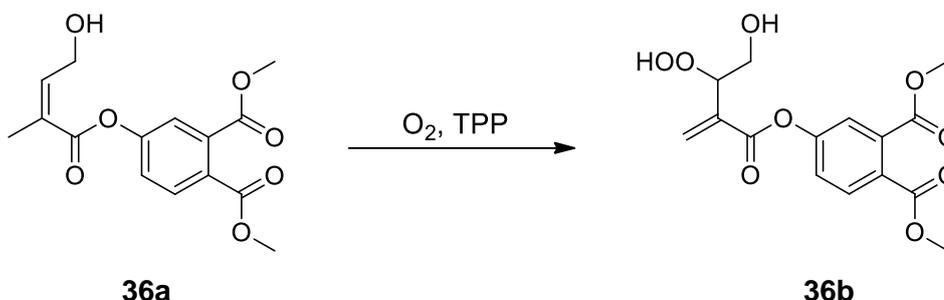
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.73 (dd, J = 12.5, 7.2 Hz, 1H, H-12a), 3.88 (m, 4H, H-13 + H-12b), 5.07 (dd, J = 7.0, 2.6 Hz, 1H, H-11), 6.20 (s, 1H, H-6a), 6.67 (s, 1H, H-6b), 7.30 (m, 1H, H-9), 7.43 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.76 (m, 1H, H-10), 7.89 (m, 1H, H-8).

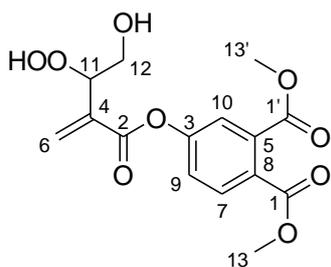
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.5 (q, C13) 62.8 (t, C12), 84.2 (d, C11), 122.9 (d, C10), 126.4 (d, C9), 127.3 (d, C8), 129.7(d, C7), 130.6 (t, C6), 131.7 (s, C5), 135.4 (s, C4), 150.5 (s, C3), 164.2 (s, C2), 166.4 (s, C1).

Synthese von 1,2-Dimethyl-4-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-ethylidenebutanoyl)oxy]phthalat (MaBr-22.1)



Nach AVV4 wurden 471 mg des Alkohols **36a** (1.53 mmol) in 15 ml deuteriertem Chloroform für 14 h bei RT bestrahlt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne Aufreinigung peroxyacetalisiert.



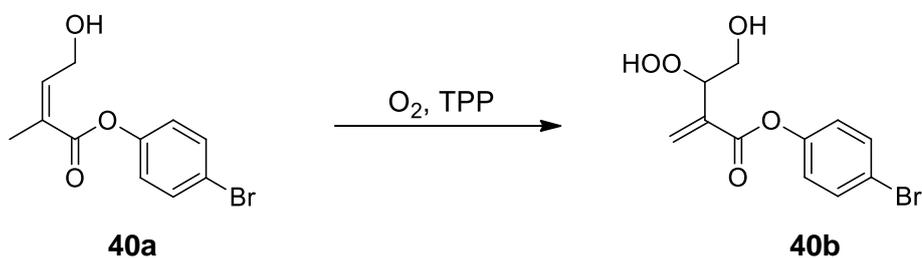
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.71 (dd, J = 12.5, 7.0 Hz, 1H, H-12a), 3.88 (m, 7H, H-13+ H-13' +H12b), 5.03 (dd, J = 6.9, 2.7 Hz, 1H, H-11), 6.20 (s, 1H, H-6a), 6.68 (s, 1H, H-6b), 7.31 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-9), 7.47 (dd, J = 5.4, 2.5 Hz, 1H, H-10), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-7).

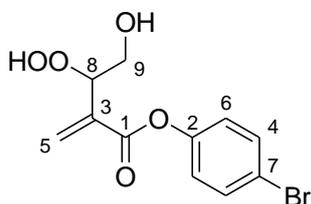
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 53.0 (q, C13/C13'), 53.1 (q, C13/C13'), 62.9 (t, C12), 84.1 (d,C11), 122.4 (d, C10), 124.4 (d, C9), 129.3 (s, C8), 130.8 (d, C7), 131.0 (t, C6), 134.0 (s, C5), 135.2 (s, C4), 152.5 (s, C3), 163.5 (s, C2), 167.3 (s, C1/C1'), 167.4 (s, C1/C1').

**Synthese von 4-Bromphenyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylidenebutanoat
(MaBr-32.1)**



Nach AVV4 wurden 400 mg des Alkohols **40a** (1.48 mmol) in 11 ml deuteriertem Chloroform für 15 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne Aufreinigung peroxyacetalisiert.



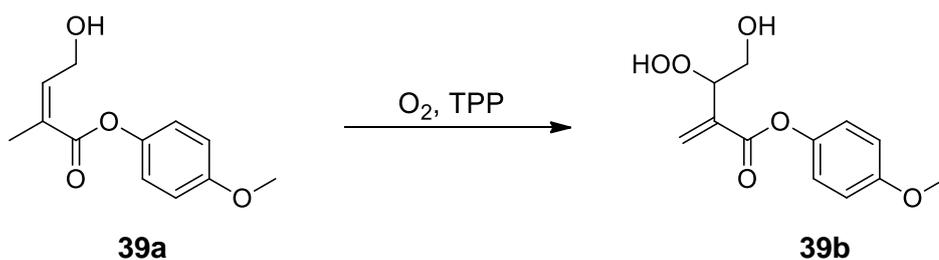
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.70 (dd, J = 12.5, 7.1 Hz, 1H, H-9a), 3.88 (d, J = 11.3 Hz, 1H, H-9b), 5.04 (d, J = 5.9 Hz, 1H, H-8), 6.17 (s, 1H, H-5a) 6.64 (s, 1H, H-5b), 6.96 (m, 2H, H-6), 7.44 (m, 2H, H-4), 10.41 (s, 1H, OOH).

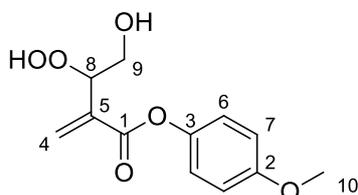
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 62.5 (t, C9), 84.0 (d, C8), 119.1 (s, C7), 123.3 (d, C6), 130.6 (t, C5), 132.5 (d, C4), 135.1 (s, C3), 149.3 (s, C2), 164.0 (s, C1).

**Synthese von 4-Methoxyphenyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylidenebutanoat
(MaBr-29.1)**



Nach AVV4 wurden 400 mg des Alkohols **39a** (1.48 mmol) in 18 ml deuteriertem Chloroform für 14 h bei RT bestrahlt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne Aufreinigung peroxyacetalisiert.



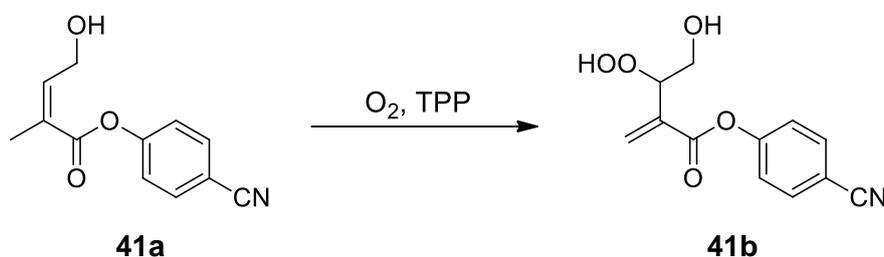
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.73 (m, 1H, H-9a), 3.79 (s, 3H, H-10), 3.94 (dd, J = 12.5, 2.8 Hz, 1H, H-10b), 5.09 (dd, J = 7.0, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.18 (s, 1H, H-4a), 6.67 (s, 1H, H-4b), 6.90 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 2H, H-7), 7.03 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 2H, H-6).

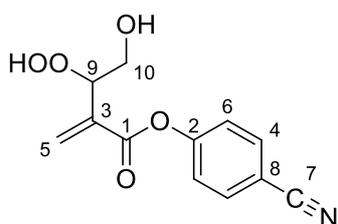
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 55.7 (q, C10), 63.0 (t, C9), 84.4 (d, C8), 114.6 (d, C7), 122.4 (d, C6), 130.0 (s, C5), 135.6 (t, C4), 144.0 (s, C3), 157.5 (s, C2), 164.9 (s, C1).

Synthese von 4-Cyanoxyphenyl-3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylidenebutanoat (MaBr-31.1)



Nach AVV4 wurden 400 mg des Alkohols **41a** (1.84 mmol) in 18 ml deuteriertem Chloroform für 8 h bei RT bestrahlt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne weitere Aufreinigung peroxyacetalisiert.



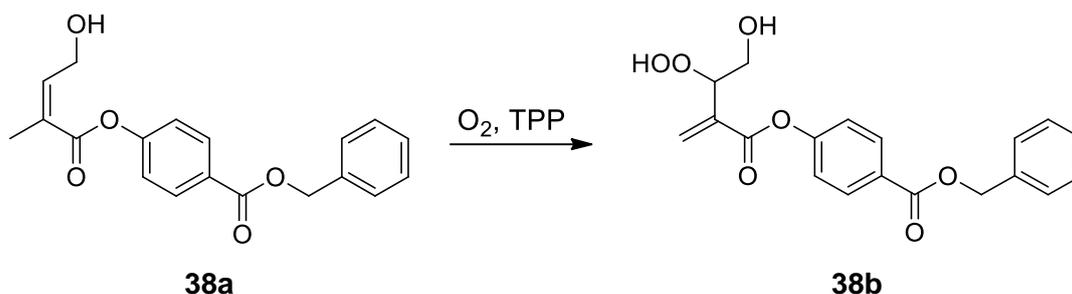
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.67 (dd, J = 12.5, 7.2 Hz, 1H, H-10a), 3.85 (dd, J = 12.5, 2.9 Hz, 1H, H-10b), 4.99 (dd, J = 7.0, 2.6 Hz, 1H, H-9), 6.18 (s, 1H, H-5a), 6.63 (s, 1H, H-5b), 7.17 (m, 2H, H-6), 7.60 (m, 2H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 62.6$ (t, C10), 84.3 (d, C9), 109.6 (s, C8), 118.2 (s, C7), 122.8 (d, C6), 131.2 (t, C5), 133.8 (d, C4), 134.9 (s, C3), 153.6 (s, C2), 163.5 (s, C1).

Benzyl-4-[(3-hydroperoxy-4-hydroxy-2-methylidenebutanoyl)-oxy]benzoat (MaBr-24.1)



Nach AVV4 wurden 372 mg des Alkohols **38a** (1.14 mmol) in 11 ml deuteriertem Chloroform für 12 h bei RT belichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydroxyhydroperoxid ohne Aufreinigung peroxyacetalisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

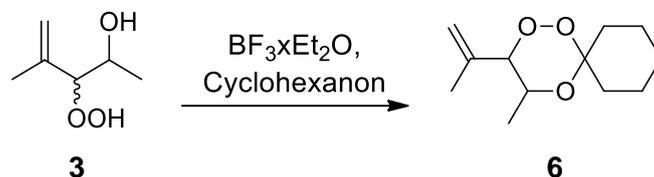
$\delta = 3.75$ (dd, $J = 12.5, 7.0$ Hz, 1H, H-15a), 3.95 (dd, $J = 12.5, 3.0$ Hz, 1H, H-15b), 5.10 (dd, $J = 6.9, 2.6$ Hz, 1H, H-13), 5.36 (s, 2H, H-14), 6.22 (s, 1H, H-7a), 6.71 (s, 1H, H-7b), 7.20 (m, 2H, H-12), 7.40 (m, 5H, H-8 + H-9 + H10), 8.11 (m, 2H, H-6), 9.58 (s, 1H, OOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 63.0$ (t, C15), 67.1 (t, C14), 84.2 (d, C13), 121.8 (d, C12), 128.0 (s, C11), 128.4 (d, C10), 128.5 (d, C9), 128.8 (d, C8), 130.7 (t, C7), 131.5 (d, C6), 135.3 (s, C5), 135.9 (s, C4), 154.3 (s, C3), 163.8 (s, C2), 165.8 (s, C1).

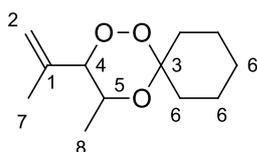
Synthese von 1,2,4-Trioxanen

Synthese von 4-Methyl-3-(prop-1-en-2-yl)-1,2,5-trioxaspiro[5.5]undecan (MaBr-1.2.3)



Nach AAV5 wurden 1.20 g **3** (9.09 mmol) mit 2 g Cyclohexanon (20.4 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan unter $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Katalyse umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (*c*-Hexan/Ethylacetat 97:3, $R_f = 0.60$) und das 1,2,4-Trioxan als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 281 mg, 1.33 mmol, 15%



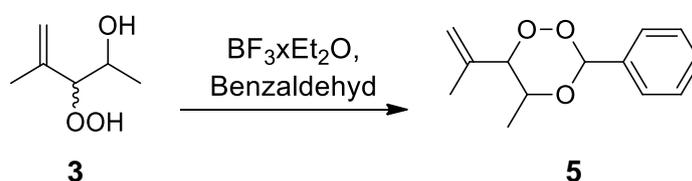
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.07$ (d, 3H, $J = 6.1$ Hz, H-8), 1.35-1.65 (m, 8H, H-6), 1.74 (m, 3H, H-7), 1.95 (m, 1H, H-6), 2.23 (m, 1H, H-6), 4.08 (dq, 1H, $J = 6.1; 9.6$ Hz, H-5), 4.19 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.05 (m, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

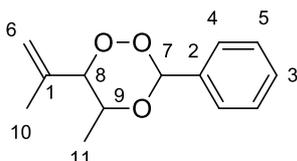
$\delta = 17.3$ (q, C8), 20.0 (q, C7), 22.6 (t, C6), 22.8 (t, C6), 25.9 (t, C6), 29.8 (t, C6), 35.5 (t, C6), 66.0 (d, C5), 89.1 (d, C4), 103.1 (s, C3), 117.9 (t, C2), 139.6 (s, C1).

Synthese von 5-Methyl-3-phenyl-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,4-trioxan (MaBr-1.2.2)



Nach AAV5 wurden 1.20 g **3** (9.09 mmol) mit 1 g Benzaldehyd (9.43 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan unter $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Katalyse umgesetzt. Es entstand ein Diastereomerenmischung (92:8), von dem nur das Hauptdiastereoisomer isoliert wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (*n*-Pentan/Diethylether 98:2, $R_f = 0.70$) und das 1,2,4-Trioxan als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 257 mg, 1.17 mmol, 13%



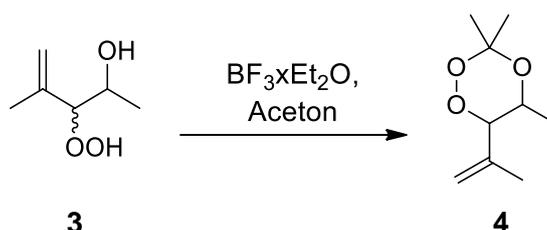
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.30$ (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-11), 1.83 (s, 3H, H-10), 4.10 (dq, $J = 9.1, 6.3$ Hz, 1H, H-9), 4.52 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-8), 5.17 (dd, $J = 6.1, 4.6$ Hz, 2H, H-6), 6.26 (s, 1H, H-7), 7.41 (m, 3H, H-3 + H-5), 7.54 (m, 2H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

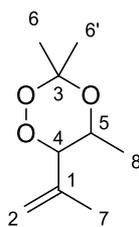
$\delta = 16.5$ (q, C11), 19.8 (q, C10), 73.8 (d, C9), 88.9 (d, C8), 104.2 (d, C7), 118.4 (t, C6), 127.1 (d, C5), 128.4 (d, C4), 129.9 (d, C3), 134.5 (s, C2), 138.6 (s, C1).

Synthese von 3,3,5-Trimethyl-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,4-trioxan (MaBr-1.2.1)



Nach AAV5 wurde 1.00 g **3** (7.58 mmol) mit 6.3 ml Aceton (5 g, 86.2 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan unter $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Katalyse umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (*n*-Pentan/Diethylether 98:2, $R_f = 0.20$) und das 1,2,4-Trioxan als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 22 mg, 0.116 mmol, 0.02%



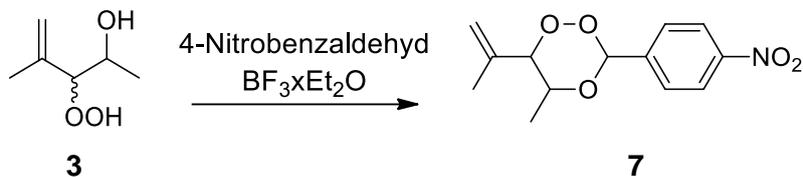
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.07 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H-8), 1.33 (s, 3H, H-6/6'), 1.64 (s, 3H, H-6/6'), 1.75 (s, 3H, H-7), 4.05 (dq, J = 6.1, 9.3 Hz, 1H, H-5), 4.18 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-4), 5.06 (m, 2H, H-2).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 17.0 (q, C8), 19.7 (q, C7), 20.7 (q, C6/C6'), 26.0 (q, C6/C6'), 66.6 (d, C5), 88.8 (d, C4), 102.8 (s, C3), 117.8 (t, C2), 139.3 (s, C1).

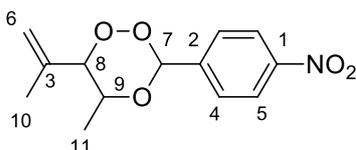
Synthese von 5-Methyl-3-(4-nitrophenyl)-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,4-trioxan (MaBr-1.2.4)



Nach AAV5 wurden 1.50 g **3** (11.3 mmol) mit 1.70 g 4-Nitrobenzaldehyd (11.3 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Der Ansatz wurde für 16 h gerührt. Es entstand ein Diastereomerenmisch von dem nur das Hauptdiastereoisomer isoliert wurde. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 98:2, R_f = 0.50) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 184 mg, 0.69 mmol, 6%

Smp.: 109 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.28 (d, 3H, J = 6.2 Hz, H-11), 1.80 (s, H-10), 4.09 (dq, 1H, J = 6.4; 9.1 Hz, H-9), 4.48 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H-8), 5.15 (m, 2H, H-6), 6.29 (s, 1H, H-7), 7.68 (m, 2H, H-4), 8.22 (m, 2H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

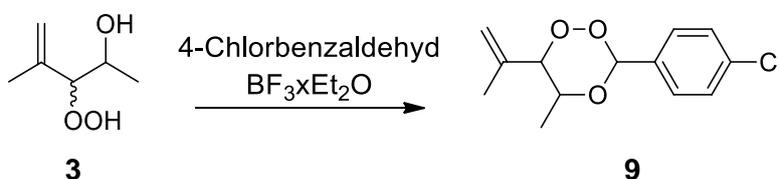
δ = 16.5 (q, C11), 19.9 (q, C10), 74.2 (d, C9), 89.2 (d, C8), 102.5 (d, C7), 118.9 (t, C6), 123.7 (d, C5), 128.2 (d, C4), 138.5 (s, C3), 140.8 (s, C2), 148.7 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 923 (m), 1003 (m), 1070 (m), 1084 (m), 1150 (m), 1328 (m), 1341 (s), 1516 (s), 1606 (w), 1646 (w), 2980 (w).

Elementaranalyse (C₁₃H₁₅NO₅):

Berechnet:	C 58.86	H 5.70	N 5.28
Gefunden:	C 58.88	H 5.69	N 5.29

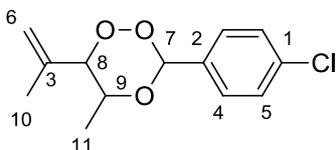
Synthese von 5-Methyl-3-(4-chlor)-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,4-trioxan (MaBr-1.2.5)



Nach AAV5 wurden 1.24 g **3** (9.4 mmol) mit 1.60 g 4-Chlorbenzaldehyd (11.4 mmol) in 30 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Der Ansatz wurde für 16 h gerührt. Es entstand ein Diastereomengemisch von dem nur das Hauptdiastereoisomer isoliert wurde. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (n-Hexan/Ethylacetat 98:2, R_f = 0.70) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 616 mg, 2.42 mmol, 26%

Smp.: 76 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.27 (d, 3H, J = 6.2 Hz, H-11), 1.80 (s, 3H, H-10), 4.06 (dq, 1H, J = 6.4, 9.1 Hz, H-9), 4.48 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H-8), 5.15 (m, 2H, H-6), 6.20 (s, 1H, H-7), 7.41 (m, 4H, H-4 + H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 16.8 (q, C11), 20.0 (q, C10), 74.2 (d, C9), 89.2 (d, C8), 103.6 (d, C7), 118.8 (t, C6), 128.7 (d, C5), 128.8 (d, C4), 133.1 (s, C3), 136.0 (s, C2), 138.8 (s, C1).

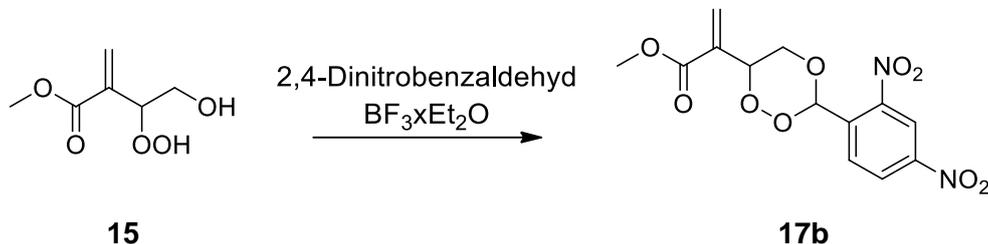
IR: ν (cm⁻¹) = 907 (m), 968 (m), 1014 (m), 1054 (s), 1083 (m), 1369 (w), 1495 (w), 1596 (w), 1643 (w), 2911 (w), 2980 (w).

Elementaranalyse (C₁₃H₁₅ClO₃):

Berechnet: C 61.30 H 5.94

Gefunden: C 61.26 H 5.99

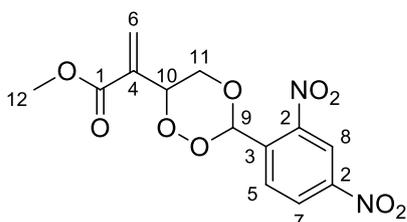
Synthese von Methyl-2-(3-(2,4-dinitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl)acrylat (MaBr-6.1)



Nach AAV5 wurden 201 mg **15** (1.24 mmol) mit 365 mg 2,4-Dinitrobenzaldehyd (1.86 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Der Ansatz wurde für 18 h gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Pentan/Diethylether 60:40, R_f = 0.37) konnte das Produkt als gelblicher Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 23 mg, 0.067 mmol, 7%

Smp.: 108 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.88 (m, 4H, H-11b + H-12), 4.46 (dd, J = 11.6, 2.4 Hz, 1H, H-11b), 5.45 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-10), 5.93 (s, 1H, H-6a), 6.51 (s, 1H, H-6b), 6.88 (s, 1H, H-9), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-5), 8.52 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H-7), 8.80 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

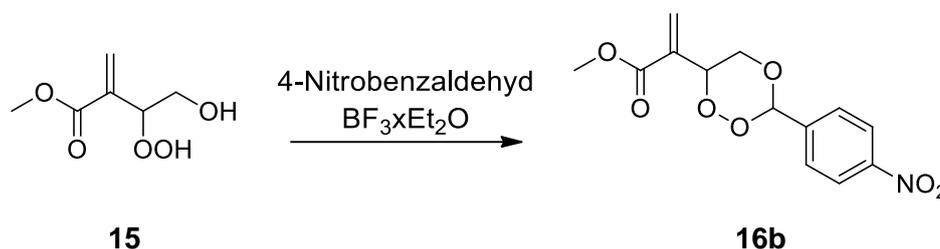
δ = 52.5 (q, C12), 70.3 (t, C11), 77.4 (d, C10), 98.6 (d, C9), 120.0 (d, C8), 127.3 (d, C7), 129.3 (t, C6), 130.4 (d, C5), 133.6 (s, C4), 134.0 (s, C3), 148.4 (s, C2), 148.6 (s, C2), 164.9 (s, C1).

IR: ν (cm^{-1}) = 969 (s), 1052 (s), 1105 (m), 1155 (m), 1270 (s), 1343 (s), 1438 (m), 1530 (s), 1604 (w), 1712 (s), 2953 (w), 3108 (w), 3518 (w).

Elementaranalyse ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_9$):

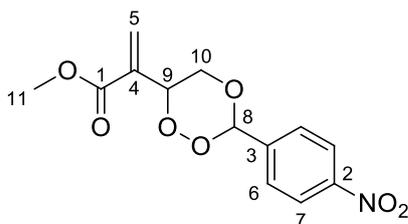
Berechnet:	C 45.89	H 3.55	N 8.23
Gefunden:	C 46.02	H 3.61	N 8.16

Synthese von Methyl-2-(3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl)acrylat (MaBr-AKG7)



Nach AAV5 wurden 200 mg **15** (1.23 mmol) mit 272 mg 2,4-Dinitrobenzaldehyd (1.80 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Der Ansatz wurde für 16 h gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Pentan/ Et_2O 60:40, R_f = 0.33) konnte das Produkt als gelblicher Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 102 mg, 0.344 mmol, 28%



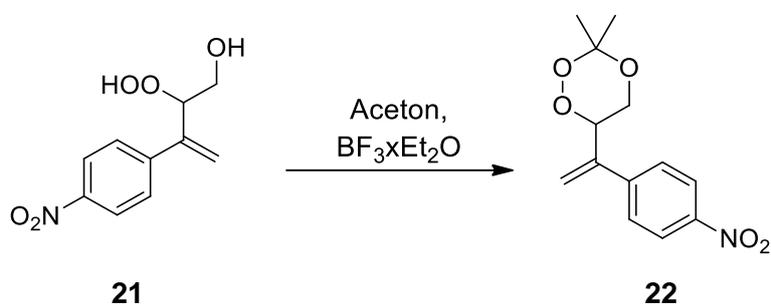
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.84 (m, 4H, H-10a + H-11), 4.44 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-10b), 5.46 (dd, J = 10.1, 1.5 Hz, 1H, H-9), 5.89 (s, 1H, H-5a), 6.26 (s, 1H, H-8), 6.50 (s, 1H, H-5b), 7.71 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-6), 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-7).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃).

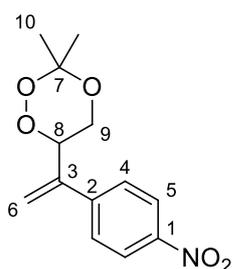
δ = 52.4 (q, C11), 70.0 (t, C10), 77.2 (d, C9), 102.6 (d, C8), 123.6 (d, C7), 128.1 (d, C6), 129.0 (t, C5), 134.4 (s, C4), 140.0 (s, C3), 148.9 (s, C2), 164.7 (s, C1).

Synthese von 3,3-Dimethyl-6-(1-(4-nitrophenyl)vinyl)-1,2,4-trioxan (MaBr-CS1.4)



Nach AAV5 wurden 0.9 g **21** (4 mmol) mit 0.3 g Aceton (5.2 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 75:25, R_f = 0.54) konnte das Produkt als gelbliches Öl isoliert werden.

Ausbeute: 120 mg, 0.45 mmol, 11 %



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.40 (s, 3H, H-10a), 1.64 (s, 3H, H-10b), 3.81 (dd, J = 2.9; 11.9 Hz, 1H, H-9a), 3.97 (dd, J = 11.9, 10 Hz, 1H, H-9b), 5.19 (dd, 1H, J = 2.6; 10.0 Hz, H-8), 5.53 (s, 1H, H-6a), 5.65 (s, 1H, H-6b), 7.55 (m, 2H, H-4), 8.19 (m, 2H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (q, C10a), 25.3 (q, C10b), 62.8 (t, C9), 79.7 (d, C8), 102.8 (s, C7), 120.1 (t, C6), 124.0 (d, C5), 127.5 (d, C4), 141.8 (s, C3), 145.2 (s, C2), 147.5 (s, C1).

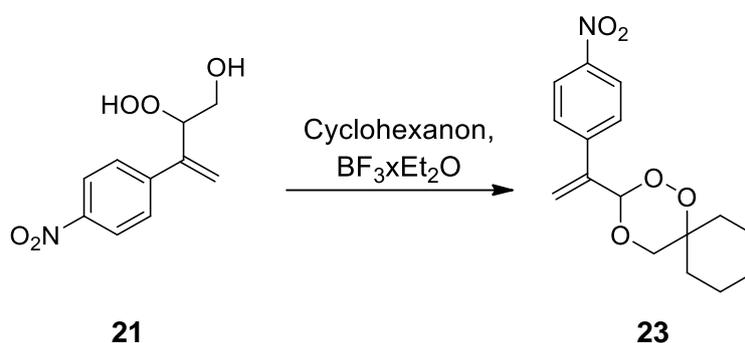
IR: ν (cm⁻¹) = 1046 (m), 1160 (m), 1204 (m), 1344 (s), 1517 (s), 1596 (m), 2875 (w), 2937 (w), 2991 (w).

Elementaranalyse (C₁₃H₁₅NO₅):

Berechnet: C 58.86 H 5.70 N 5.28

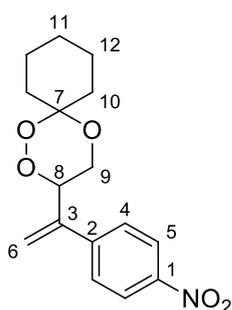
Gefunden: C 59.23 H 5.73 N 5.36

Synthese von 3-(1-(4-Nitrophenyl)vinyl)-1,2,4-trioxaspiro[5.5]undecan (MaBr-CS1.5)



Nach AAV5 wurden 0.9 g **21** (4 mmol) mit 0.49 g Cyclohexanon (5 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 90:10, $R_f = 0.30$) konnte das Produkt als gelbliches Öl isoliert werden.

Ausbeute: 276 mg, 0.90 mmol, 23 %



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.40-1.70 (m, 8H, H-10 + H-12), 1.98 (m, 1H, H-11), 2.16 (m, 1H, H-11), 3.79 (dd, $J = 3.0; 12.0$ Hz, 1H, H-9a), 4.00 (dd, $J = 10.1, 11.8$, 1H, H-9b), 5.20 (dd, $J = 2.4; 9.9$ Hz, 1H, H-8), 5.53 (s, 1H, H-6a), 5.65 (s, 1H, H-6b), 7.56 (m, 2H, H-4), 8.20 (m, 2H, H-5).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

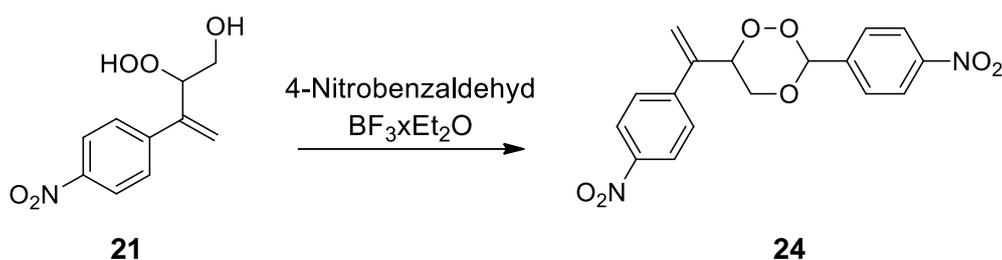
δ = 22.4 (t, C12), 25.6 (C11), 29.2 (t, C10a), 34.5 (t, C10b), 62.1 (t, C9), 79.8 (d, C8), 103.0 (s, C7), 120.1 (t, C6), 124.0 (d, C5), 127.5 (d, C4), 142.0 (s, C3), 145.2 (s, C2), 147.6 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 921 (s), 936 (s), 1097 (s), 1156 (m), 1346 (s), 1447 (m), 1512 (s), 1595 (m), 2858 (m), 3075 (w), 3106 (w).

Elementaranalyse (C₁₆H₁₉NO₅):

Berechnet:	C 62.94	H 6.27	N 4.59
Gefunden:	C 62.81	H 6.23	N 4.61

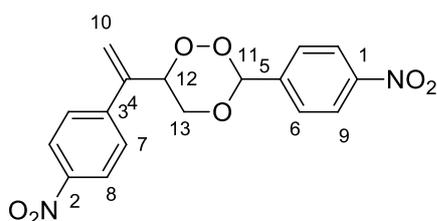
Synthese von 3-(4-Nitrophenyl)-6-(1-(4-nitrophenyl)vinyl)-1,2,4-trioxan (MaBr-CS1.3)



Nach AAV5 wurden 0.61 g **21** (2.7 mmol) mit 0.83 g 4-Nitrobenzaldehyd (5.5 mmol) in 30 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 75:25, R_f = 0.46) konnte das Produkt als gelblicher Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 29 mg, 0,08 mmol, 2 %

Smp.: 135 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 4.04 (m, 1H, H-13a), 4.29 (dd, J = 2.4; 11.7 Hz, 1H, H-13b), 5.46 (dd, J = 1.9; 10.2 Hz, 1H, H-12), 5.58 (s, 1H, H-10a), 5.73 (s, 1H, H-10b), 6.28 (s, 1H, H-11), 7.53 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-7), 7.62 (2, J = 8.7 Hz, 2H, H-6), 8.23 (m, 4H, H-8 + H-9).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

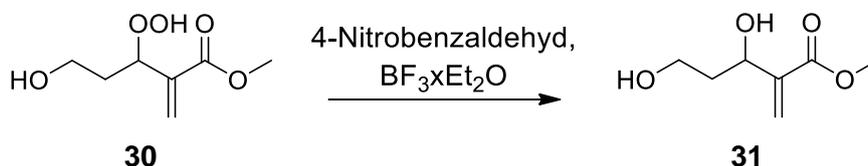
δ = 69.1 (t, C13), 80.3 (d, C12), 102.6 (d, C11), 121.0 (t, C10), 123.8 (d, C9), 124.1 (d, C8), 127.5 (d, C7), 128.2 (d, C6), 140.0 (s, C5), 140.9 (s, C4), 144.7 (s, C3), 147.7 (s, C2), 148.9 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1049 (m), 1107 (m), 1219 (w), 1344 (s), 1518 (s), 1596 (m), 3111 (w).

Elementaranalyse (C₁₇H₁₄N₂O₇):

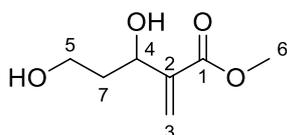
Berechnet:	C 56.99	H 3.94	N 7.82
Gefunden:	C 56.94	H 4.06	N 7.67

Synthese von Methyl 3,5-dihydroxy-2-methylenpentanoat (PR-1.3)



1.93 g des Hydrohydroperoxids **30** (10.9 mmol) wurden mit 16.5 ml Dimethylsulfid (13.9 g, 223 mmol) versetzt, ohne vorher das zur Belichtung genutzte Chloroform zu entfernen. Nach 18 h bei RT wurde das Produkt bei vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (c-Hexan/Ethylacetat 40:60, R_f = 0.30) und das Produkt als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 397 mg, 2.25 mmol, 21 %

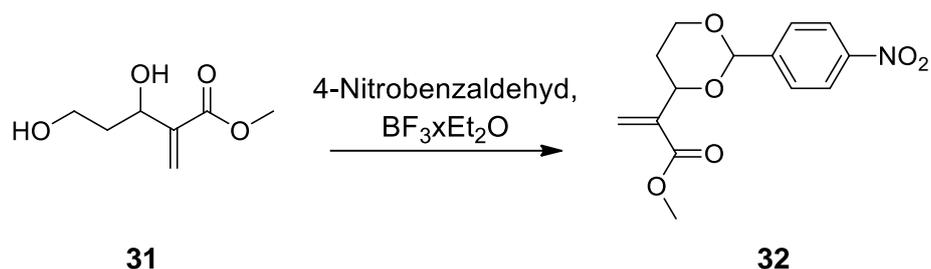


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 1.66 (m, 1H, H-7), 1.84 (m, 1H, H-7), 3.68 (m, 5H, H-5 + H-6), 4.61 (dd, J = 3.1; 8.5 Hz, 1H, H-4), 5.86 (s, 1H, H-3a), 6.19 (s, 1H, H-3b).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

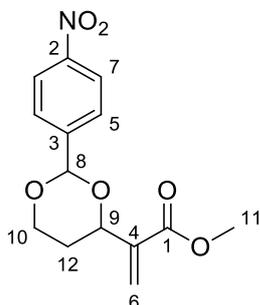
δ = 37.7 (t, C7), 51.9 (q, C6), 60.5 (t, C5), 69.6 (d, C4), 125.1 (t, C3), 142.5 (s, C2), 166.8 (s, C1).

Synthese von Methyl-2-(2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxan-4-yl)acrylat (PR-1.4)

Nach AAV5 wurden 711 mg des Diols **31** (4.00 mmol) und 737 mg 4-Nitrobenzaldehyd (4.80 mmol) in 38 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 75:25, $R_f = 0.45$) konnte das Produkt als gelblicher Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 346 mg, 1.18 mmol, 49 %

Smp.: 99 °C



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.72$ (dd, $J = 12.0, 4.7$ Hz, 1H, H-12a), 1.86 (t, $J = 21.2$ Hz, 1H, H-12b), 3.72 (s, 3H, H-11), 4.01 (t, $J = 11.8$ Hz, 1H, H-10a), 4.24 (dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz, 1H, H-10b), 4.73 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-9), 5.64 (s, 1H, H-8), 5.95 (s, 1H, H-6a), 6.28 (s, 1H, H-6b), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-5), 8.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

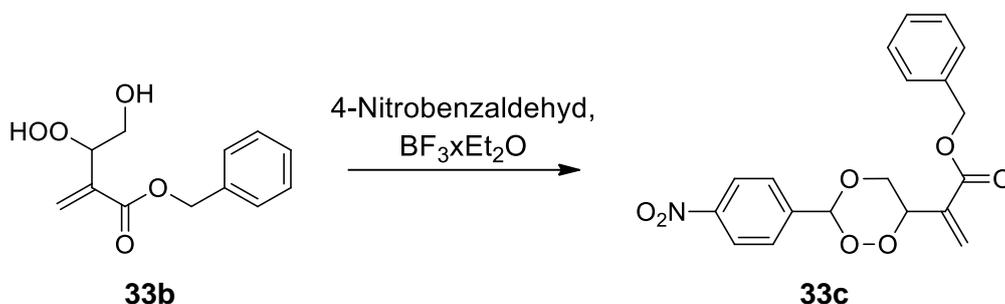
$\delta = 31.9$ (t, C12), 52.1 (q, C11), 67.3 (t, C10), 75.0 (d, C9), 99.8 (d, C8), 123.5 (d, C7), 125.8 (t, C6), 127.3 (d, C5), 140.1 (s, C4), 145.0 (s, C3), 148.2 (s, C2), 165.8 (s, C1).

IR: ν (cm^{-1}) = 1031 (s), 1093 (s), 1118 (s), 1215 (s), 1273 (m), 1292 (m), 1345 (s), 1437 (m), 1520 (s), 1607 (m), 1630 (m), 1933 (w), 2858 (w), 2951 (w).

Elementaranalyse (C₁₄H₁₅NO₆):

Berechnet:	C 57.34	H 5.16	N 4.78
Gefunden:	C 57.08	H 5.25	N 4.67

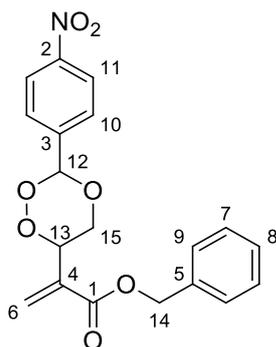
Synthese von Benzyl-2-(3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl)acrylat (MaBr-9.2)



Nach AAV5 wurden 275 mg des Hydroperoxids **33b** (1.15 mmol) und 227 mg 4-Nitrobenzaldehyd (1.50 mmol) in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit BF₃·Et₂O versetzt. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (n-Hexan/Ethylacetat 80:20, R_f = 0.43) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 64 mg, 0.172 mmol, 15%

Smp.: 115 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.84 (t, J = 10.8 Hz, 1H, H-15a), 4.43 (dd, J = 11.6, 2.2 Hz, 1H, H-15b), 5.26 (s, 2H, H-14), 5.47 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H-13), 5.90 (s, 1H, H-6a), 6.25 (s, 1H, H-12), 6.53 (s, 1H, H-6b), 7.39 (m, 5H, H-7 + H-8 + H-9), 7.70 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-10), 8.25 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-11).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

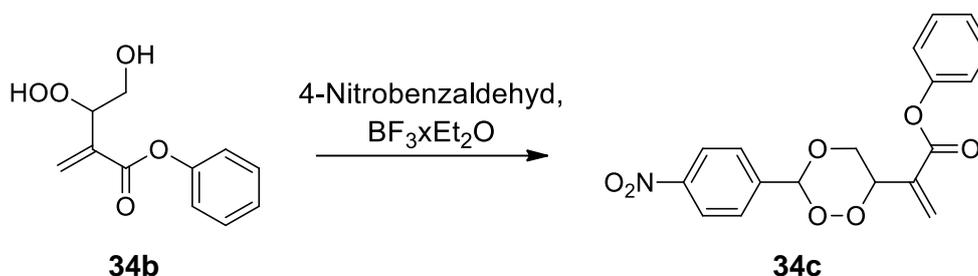
δ = 67.2 (t, C15), 70.1 (t, C14), 77.2 (d, C13), 102.6 (d, C12), 123.6 (d, C11), 128.1 (d, C10), 128.3 (d, C9), 128.6 (d, C8), 128.7 (d, C7), 129.3 (t, C6), 134.5 (s, C5), 135.4 (s, C4), 140.0 (s, C3), 148.9 (s, C2), 164.0 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1011 (s), 1059 (s), 1170 (m), 1277 (s), 1351 (s), 1449 (w), 1526 (s), 1610 (w), 1700 (s), 2888 (w), 3091 (w), 3117 (w).

Elementaranalyse (C₁₉H₁₇NO₇):

Berechnet:	C 61.45	H 4.61	N 3.77
Gefunden:	C 61.64	H 4.59	N 3.62

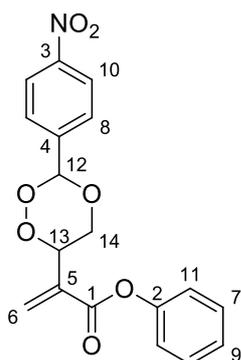
Synthese von Phenyl-2-(3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl)acrylat (MaBr-10.2)



Nach AAV5 wurden 416 mg des Hydroperoxids **34b** (1.86 mmol) und 350 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2.32 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*n*-Hexan/Ethylacetat 80:20, R_f = 0.30) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 127 mg, 0.357 mmol, 19%

Smp.: 133 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.84 (dd, J = 11.4, 10.3 Hz, 1H, H-14a), 4.43 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-14b), 5.47 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H, H-13), 5.99 (s, 1H, H-6a), 6.20 (s, 1H, H-12), 6.65 (s, 1H, H-6b), 7.06 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H-11), 7.19 (dd, J = 10.0, 4.7 Hz, 1H, H-9), 7.34 (dd, J = 10.7, 5.0 Hz, 2H, H-11), 7.63 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-8), 8.17 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-10).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

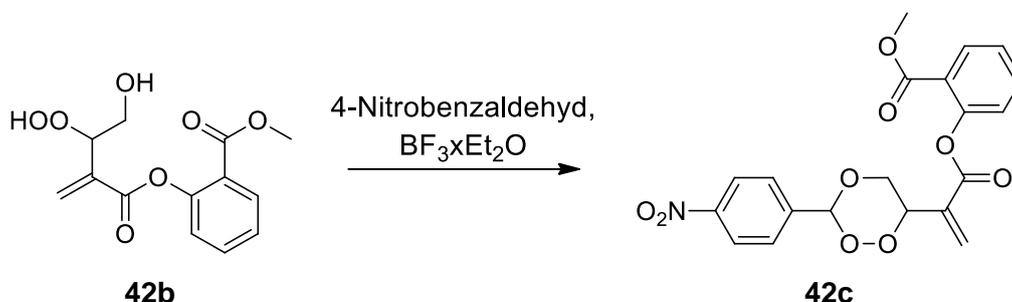
δ = 70.0 (t, C14), 77.2 (d, C13), 102.6 (d, C12), 121.4 (d, C11), 123.6 (d, C10), 126.3 (d, C9), 128.2 (d, C8), 129.6 (d, C7), 130.6 (t, C6), 134.2 (s, C5), 139.9 (s, C4), 148.9 (s, C3), 150.3 (s, C2), 162.8 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1057 (s), 1163 (m), 1196 (m), 1270 (m), 1481 (w), 1524 (s), 1718 (s), 2856 (w), 2924 (w).

Elementaranalyse (C₁₈H₁₅NO₇):

Berechnet:	C 60.50	H 4.23	N 3.92
Gefunden:	C 60.76	H 4.48	N 3.82

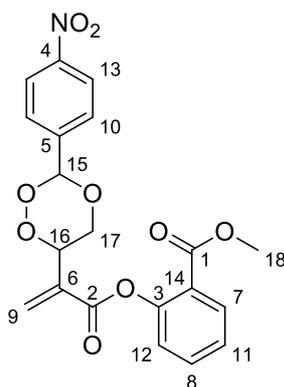
Synthese von Methyl-2-((2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoyl)oxy)benzoate (MaBr-21.4)



Nach AAV5 wurden 612 mg des Hydroperoxids **42b** (2.17 mmol) und 399 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2.64 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit BF₃·Et₂O versetzt. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (c-Hexan/Ethylacetat 75:25, R_f = 0.29) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 256 mg, 0.616 mmol, 28%

Smp.: 123 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.85 (s, 3H, H-18), 3.95 (dd, J = 11.6, 10.2 Hz, 1H, H-17a), 4.61 (dd, J = 11.6, 2.5 Hz, 1H, H-17b), 5.58 (dd, J = 10.1, 1.7 Hz, 1H, H-16), 6.09 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H-9a), 6.30 (s, 1H, H-15), 6.75 (s, 1H, H-9b), 7.17 (dd, J = 8.1, 1.0 Hz, 1H, H-12), 7.36 (td, J = 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-11), 7.61 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-7), 7.71 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-10), 8.06 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H-8), 8.25 (m, 2H, H-13).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 164.7 (s, C1), 163.2 (s, C2), 150.4 (s, C3), 149.0 (s, C4), 140.2 (s, C5), 134.3 (s, C6; d, C7), 132.1 (d, C8), 130.8 (t, C9), 128.3 (d, C10), 126.6 (d, C11), 123.8 (d, C12; d, C13), 123.0 (s, C14), 102.8 (d, C15), 77.5 (d, C16), 70.3 (t, C17), 52.5 (q, C18).

IR: ν (cm⁻¹) = 904 (s), 1052 (s), 1259 (s), 1347 (s), 1523 (s), 1606 (m), 1718 (s), 2254 (w), 2862 (w), 2951 (w).

HMRS (ESI, C₂₀H₁₇NO₉):

Berechnet: 438.0796 [M+Na]⁺

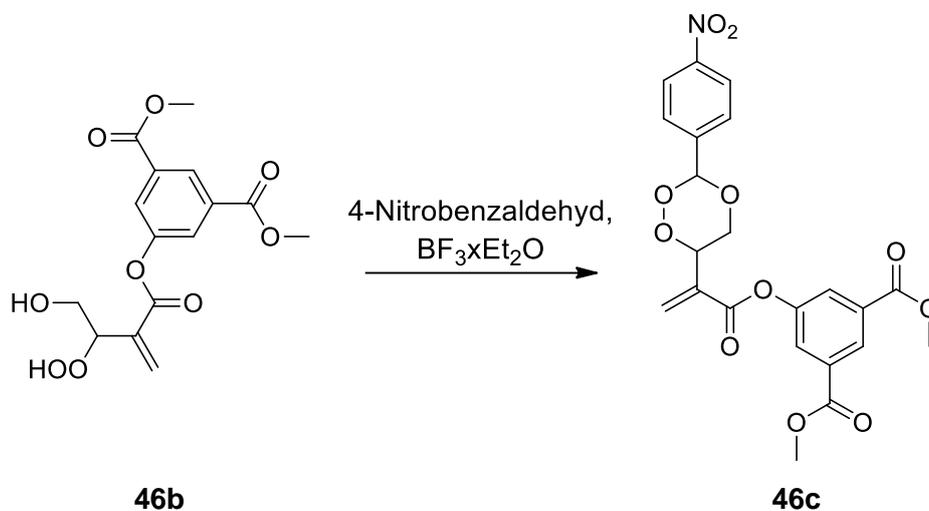
Gefunden: 438.0798

Elementaranalyse (C₂₀H₁₇NO₉):

Berechnet: C 57.83 H 4.13 N 3.37

Gefunden: C 57.73 H 4.14 N 3.34

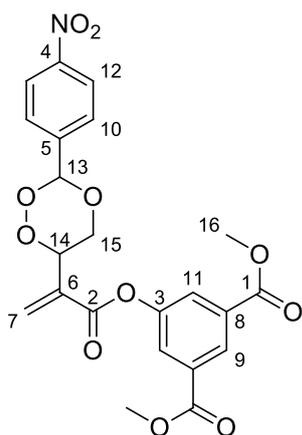
Synthese von 1,3-Dimethyl-5-({2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoyl}oxy)benzen-1,3-dicarboxylat (MaBr-AM18)



Nach AAV5 wurden 510 mg des Hydroperoxids **46b** (1.50 mmol) und 340 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2.30 mmol) in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde mit einer katalytischen Menge $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 66:33, $R_f = 0.32$) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 221 mg, 0.467 mmol, 31%

Smp.: 155 °C



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 3.92$ (m, 7H, H-16 + H-15a), 4.49 (m, 1H, H-15b), 5.53 (m, 1H, H-14), 6.13 (s, 1H, H-7a), 6.28 (s, 1H, H-13), 6.76 (s, 1H, H-7b), 7.68 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-10), 8.01 (s, 2H, H-11), 8.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-12), 8.58 (s, 1H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 52.8$ (q, C16), 70.0 (t, C15), 77.2 (d, C14), 102.8 (d, C13), 123.8 (d, C12), 127.1 (d, C11), 128.3 (d, C10), 128.5 (d, C9), 131.7 (s, C8), 132.3 (t, C7), 133.8 (s, C6), 134.0 (s, C5), 149.0 (s, C4), 150.4 (s, C3), 162.5 (s, C2), 165.3 (s, C1).

IR: ν (cm^{-1}) = 1335 (s), 1436 (m), 1524 (s), 1600 (w), 1720 (s), 3363 (w).

HMRS (ESI, $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_{11}$):

Berechnet: 496.0850 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

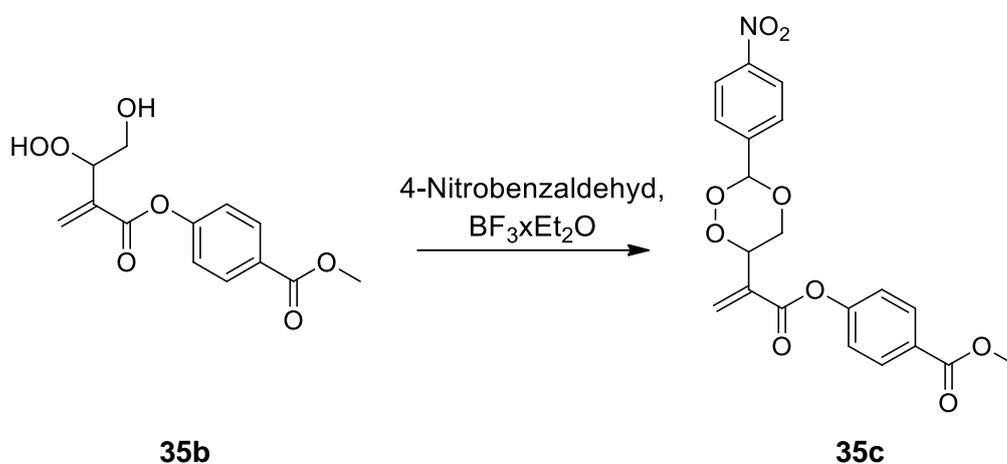
Gefunden: 496.0853

Elementaranalyse ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_{11}$):

Berechnet: C 55.82 H 4.05 N 2.96

Gefunden: C 56.82 H 4.54 N 2.63

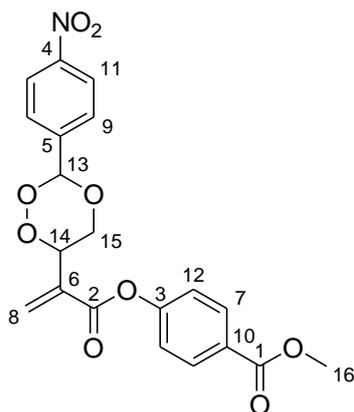
Synthese von Methyl-4-({2-[3-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]acryloyl}oxy)-benzoat (MaBr-8.2)



Nach AAV5 wurde eine Lösung von 347 mg des Hydroperoxids **35b** (1.21 mmol) und 277 mg 4-Nitrobenzaldehyd (1.50 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 70:30, $R_f = 0.30$) lieferte das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 113 mg, 0.272 mmol, 22%

Smp.: 139 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.93 (m, 4H, H-16 + H-15a), 4.50 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-15b), 5.53 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H, H-14), 6.11 (s, 1H, H-8a), 6.28 (s, 1H, H-13), 6.74 (s, 1H, H-8b), 7.23 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-12), 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-9), 8.10 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-7), 8.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-11).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.4 (q, C16), 70.1 (t, C15), 77.2 (d, C14), 102.8 (d, C13), 121.6 (d, C12), 123.8 (d, C11), 128.3 (s, C9 + C10), 131.4 (t, C8), 131.4 (d, C7), 134.0 (s, C6), 140.0 (s, C5), 149.0 (s, C4), 153.9 (s, C3), 162.4 (s, C2), 166.3 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1049 (s), 1203 (m), 1347 (m), 1522 (m), 1602 (w), 1721 (s), 2889 (w), 2960 (w).

HMRS (ESI, C₂₀H₁₇NO₉):

Berechnet: 438.0796 [M+Na]⁺

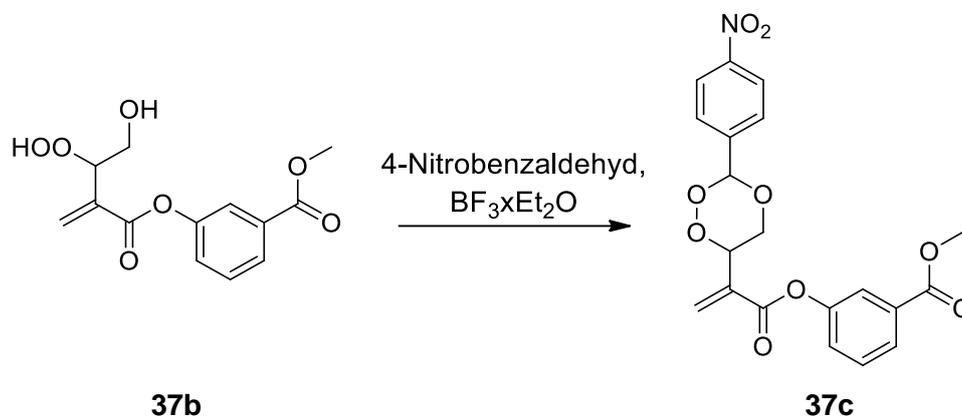
Gefunden: 438.0800

Elementaranalyse (C₂₀H₁₇NO₉):

Berechnet: C 57.83 H 4.13 N 3.37

Gefunden: C 58.05 H 4.40 N 3.22

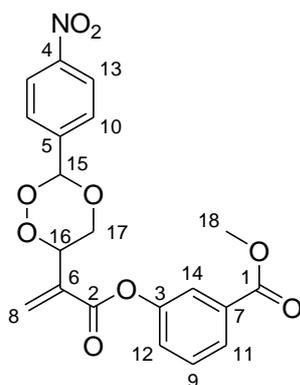
Synthese von Methyl-3-({2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoyl}-oxy)benzoat (MaBr-17.2)



Nach AAV5 wurden 559 mg des Hydroperoxids **37c** (1.98 mmol) und 380 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2.50 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 70:30, $R_f = 0.45$) lieferte das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 175 mg, 0.421 mmol, 21%

Smp.: 113 °C



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 3.87$ (m, 4H, H-18 + H-17a), 4.50 (m, 1H, H-17b), 5.54 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-16), 6.11 (s, 1H, H-8a), 6.29 (s, 1H, H-15), 6.75 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-8b), 7.36 (dd, $J = 8.1, 0.8$ Hz, 1H, H-12), 7.50 (td, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-9), 7.71 (m, 2H, H-10), 7.82 (s, 1H, H-14), 7.96 (dd, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H, H-11), 8.25 (dd, $J = 8.7, 1.5$ Hz, 2H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 52.6$ (q, C18), 70.1 (t, C17), 77.3 (d, C16), 102.8 (d, C15), 122.8 (d, C14), 123.8 (d, C13), 126.2 (d, C12), 127.6 (d, C11), 128.3 (d, C10), 129.8 (d, C9), 131.2 (t, C8), 132.0 (s, C7), 134.1 (s, C6), 140.0 (s, C5), 149.1 (s, C4), 150.4 (s, C3), 162.7 (s, C2), 166.1 (s, C1).

IR: ν (cm^{-1}) = 1131 (s), 1236 (m), 1446 (m), 1521 (m), 1589 (w), 1610 (w), 1632 (w), 1719 (s), 1745 (m).

HMRS (ESI, $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_9$):

Berechnet: 438.0796 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

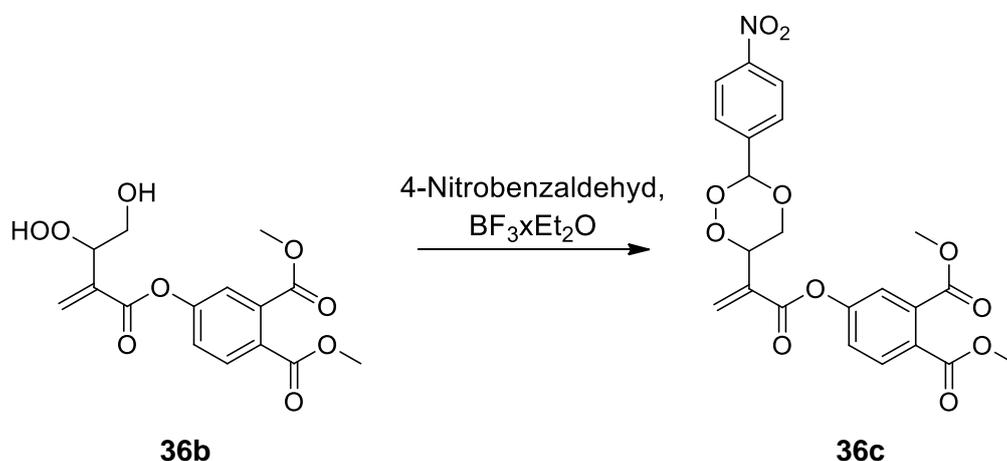
Gefunden: 438.0799

Elementaranalyse ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_9$):

Berechnet: C 57.83 H 4.13 N 3.37

Gefunden: C 57.58 H 4.18 N 3.34

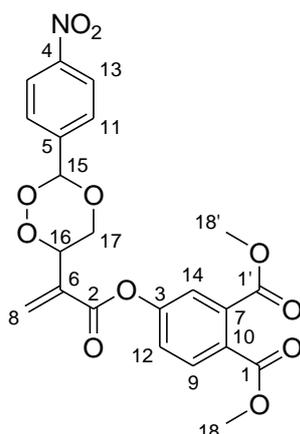
Synthese von 1,2-Dimethyl-4-({2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoyl}oxy)phthalat (MaBr-22.2)



Nach AAV5 wurden 529 mg des Hydroperoxids **36b** (1.53 mmol) und 272 mg 4-Nitrobenzaldehyd (1.80 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wurde mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung (*c*-Hexan/Ethylacetat 60:40, $R_f = 0.30$) wurde das Produkt als farblosen Feststoff isoliert.

Ausbeute: 56 mg, 0.118 mmol, 8%

Smp.: 113 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.93 (m, 7H, H-18 + H-18' + H-17a), 4.48 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-17b), 5.51 (dd, J = 10.2, 2.0 Hz, 1H, H-16), 6.12 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H-8a), 6.27 (s, 1H, H-15), 6.74 (s, 1H, H-8b), 7.35 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H-12), 7.51 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-14), 7.69 (m, 2H, H-11), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-9), 8.25 (m, 2H, H-13).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 52.9 (q, C18/C18'), 53.0 (q, C18/C18'), 70.0 (t, C17), 77.1 (d, C16), 102.8 (d, C15), 122.2 (d, C14), 123.8 (d, C13), 124.2 (d, C12), 128.3 (d, C11), 129.7 (s, C10), 130.8 (d, C9), 131.7 (t, C8), 133.8 (s, C7), 134.1 (s, C6), 140.0 (s, C5), 149.0 (s, C4), 152.2 (s, C3), 162.2 (s, C2), 167.1 (s, C1+C1').

IR: ν (cm⁻¹) = 1118 (s), 1203 (m), 1259 (s), 1347 (s), 1434 (m), 1524 (s), 1606 (w), 1725 (s), 2359 (w), 2952 (w), 3478 (w).

HMRS (ESI, C₂₂H₁₉NO₁₁):

Berechnet: 496.0850 [M+Na]⁺

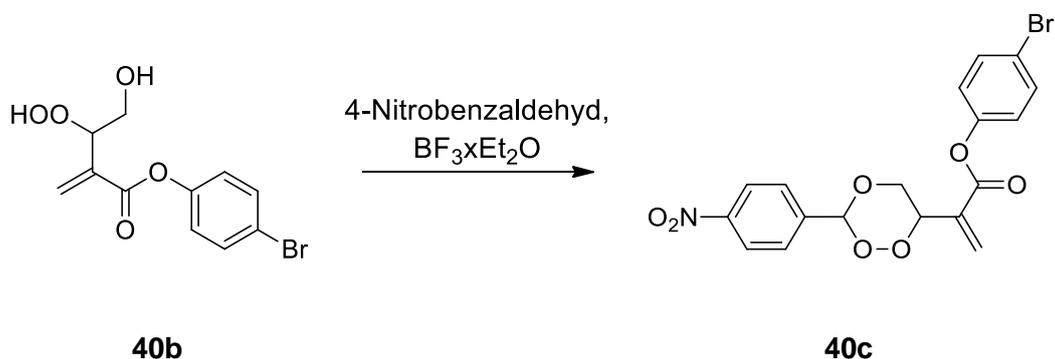
Gefunden: 496.0851

Elementaranalyse (C₂₂H₁₉NO₁₁):

Berechnet: C 55.82 H 4.05 N 2.96

Gefunden: C 55.87 H 4.17 N 2.90

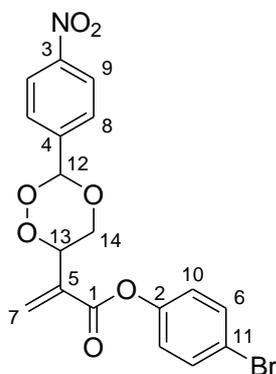
Synthese von 4-Bromphenyl-2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoat (MaBr-32.2)



Nach AAV5 wurde 449 mg des Hydroperoxids **40b** (1.48 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 272 mg 4-Nitrobenzaldehyd (1.80 mmol) und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dazu gegeben. Die Lösung wurde für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung (*n*-Hexan/Ethylacetat 70:30, $R_f = 0.29$) wurde das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 98 mg, 0.225 mmol, 15%

Smp.: 115 °C



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 3.92$ (dd, $J = 11.5, 10.2$ Hz, 1H, H-14a), 4.49 (dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, 1H, H-14b), 5.52 (dd, $J = 10.1, 1.7$ Hz, 1H, C-13), 6.09 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H-7a), 6.28 (s, 1H, H-12), 6.72 (s, 1H, H-7b), 7.04 (m, 2H, H-10), 7.53 (m, 2H, H-6), 7.71 (m, 2H, H-8), 8.25 (m, 2H, H-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 70.1$ (t, C14), 77.3 (d, C13), 102.8 (d, C12), 119.6 (s, C11), 123.4 (d, C10), 123.8 (d, C9), 128.3 (d, C8), 131.2 (t, C7), 132.8 (d, C6), 134.1 (s, C5), 140.0 (s, C4), 149.1 (s, C3), 149.4 (s, C2), 162.6 (s, C1).

IR: ν (cm^{-1}) = 1052 (s), 1197 (s), 1347 (s), 1481 (s), 1521 (s), 1608 (w), 1732 (m), 2352 (w), 2853 (w), 2913 (w), 3081 (w), 3111 (w).

HMRS (ESI, $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrNO}_7$):

Berechnet: 457.9846 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

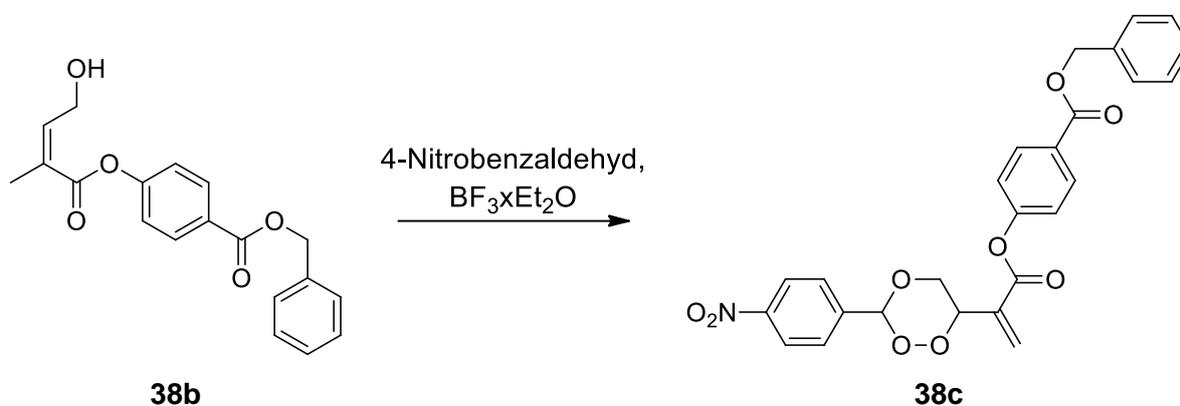
Gefunden: 457.9850

Elementaranalyse ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrNO}_7$):

Berechnet: C 49.56 H 3.23 N 3.21

Gefunden: C 49.47 H 3.34 N 3.14

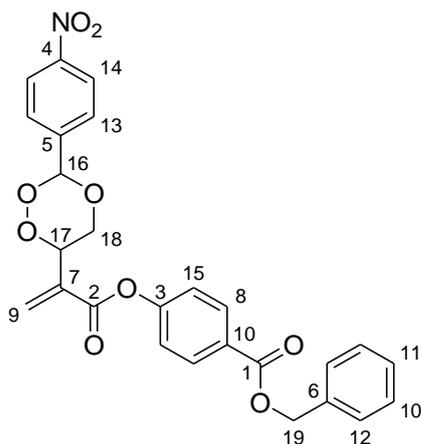
Synthese von Benzyl-4-({2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoyl}-oxy)benzoat (MaBr-24.2)



Nach AAV5 wurde 409 mg des Hydroperoxids **38b** (1.14 mmol) und 172 mg 4-Nitrobenzaldehyd (1.14 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dazugegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (Dichlormethan/Methanol 99:1, $R_f = 0.50$) lieferte das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 170 mg, 0.346 mmol, 30%

Smp.: 108 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.93 (dd, J = 11.4, 10.2 Hz, 1H, H-18a), 4.51 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-18b), 5.38 (s, 2H, H-19), 5.54 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H, H-17), 6.12 (d, J = 0.6 Hz, 1H, H-9a), 6.29 (s, 1H, H-16), 6.75 (s, 1H, H-9b), 7.23 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-15), 7.41 (m, 5H, H-10 + H-11 + H-12), 7.71 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-13), 8.15 (m, 2H, H-8), 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-14).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 67.1 (t, C19), 70.1 (t, C18), 77.2 (d, C17), 102.8 (d, C16), 121.7 (d, C15), 123.8 (d, C14), 128.3 (d, C13), 128.4 (s, C12), 128.5 (d, C11), 128.8 (s, C10), 131.4 (t, C9), 131.6 (d, C8), 134.1 (s, C7), 136.0 (s, C6), 140.0 (s, C5), 149.1 (s, C4), 154.1 (s, C3), 162.4 (s, C2), 165.6 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1051 (s), 1104 (s), 1262 (s), 1346 (s), 1453 (m), 1522 (s), 1602 (m), 1716 (s), 2863 (w), 2916 (w), 3027 (w), 3111 (w).

HMRS (ESI, C₂₆H₂₁NO₉):

Berechnet: 514.1109 [M+Na]⁺

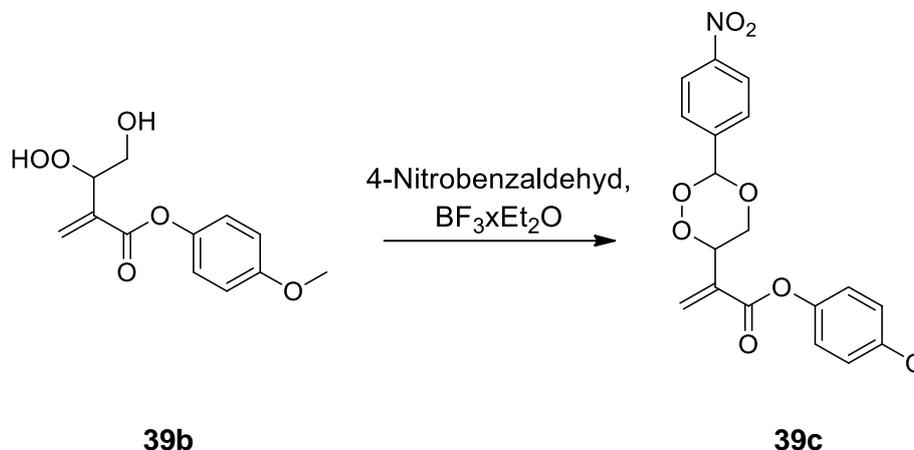
Gefunden: 514.1114

Elementaranalyse (C₂₆H₂₁NO₉):

Berechnet: C 63.54 H 4.31 N 2.85

Gefunden: C 63.59 H 4.41 N 2.79

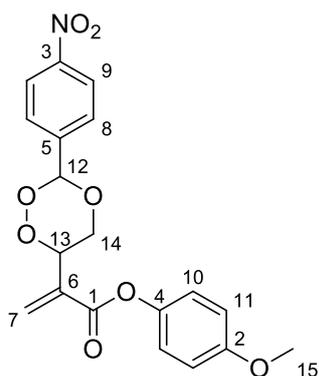
Synthese von 4-Methoxyphenyl-2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoat (MaBr-29.2)



Nach AAV5 wurde eine Lösung von 430 mg des Hydroperoxids **39b** (1.69 mmol) und 302 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2 mmol) in 15 ml trockenem Dichlormethan mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (c-Hexan/Ethylacetat 70:30, $R_f = 0.33$) lieferte das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 108 mg, 0.280 mmol, 17%

Smp.: 138 °C



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 3.80$ (s, 3H, H-15), 3.92 (dd, $J = 11.4, 10.2$ Hz, 1H, H-14a), 4.50 (dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, 1H, H-14b), 5.54 (dd, $J = 10.1, 1.8$ Hz, 1H, H-13), 6.05 (s, 1H, H-7a), 6.28 (s, 1H, H-12), 6.70 (s, 1H, H-7b), 6.92 (m, 2H, H-11), 7.05 (m, 2H, H-10), 7.70 (m, 2H, H-8), 8.24 (m, 2H, H-9).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

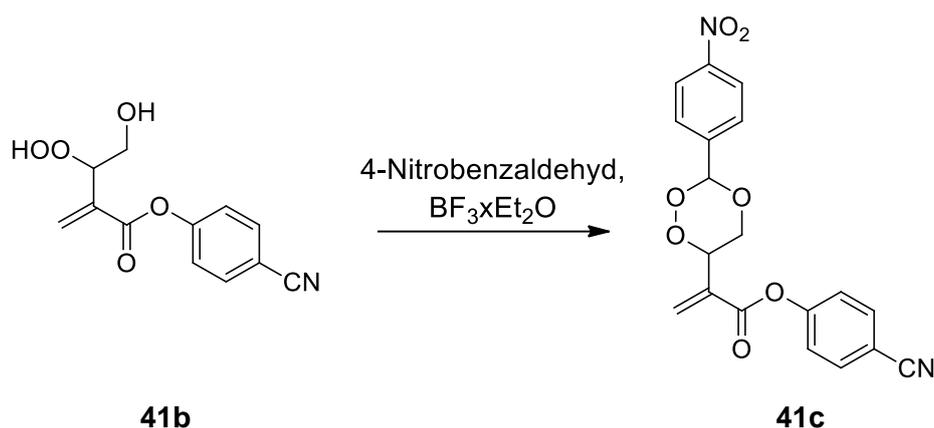
δ = 163.1 (s, C1), 157.6 (s, C2), 148.9 (s, C3), 143.7 (s, C4), 140.0 (s, C5), 134.3 (s, C6), 130.4 (t, C7), 128.2 (d, C8), 123.6 (d, C9), 122.2 (d, C10), 114.6 (d, C11), 102.6 (d, C12), 77.5 (d, C13), 77.2 (t, C14), 55.6 (q, C15).

IR: ν (cm⁻¹) = 1052 (s), 1133(m), 1190 (s), 1245 (m), 1346 (s), 1503 (s), 1521 (s), 1607 (s), 1727 (m), 2918 (w), 3360 (w, breit).

Elementaranalyse (C₁₉H₁₇NO₈):

Berechnet:	C 58.92	H 4.42	N 3.62
Gefunden:	C 59.12	H 4.52	N 3.58

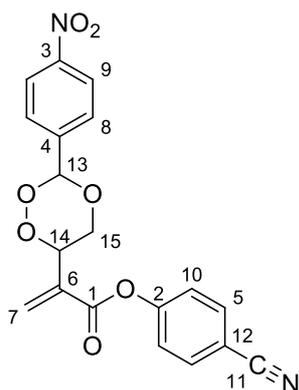
Synthese von 4-Cyanoxyphenyl-2-[3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]prop-2-enoat (MaBr-31.2)



Nach AAV5 wurde eine Lösung von 459 mg des Hydroperoxids **41b** (1.84 mmol) und 302 mg 4-Nitrobenzaldehyd (2 mmol) in 15 ml trockenem Dichlormethan mit BF₃·Et₂O versetzt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung (c-Hexan/Ethylacetat 70:30, R_f = 0.25) lieferte das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 143 mg, 0.374 mmol, 20%

Smp.: 144 °C



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.96 (dd, J = 11.5, 10.2 Hz, 1H, H-15a), 4.50 (dd, J = 11.5, 2.6 Hz, 1H, H-15b), 5.54 (dd, J = 10.2, 1.7 Hz, 1H, H-14), 6.17 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-7a), 6.31 (s, 2H, H-13), 6.78 (s, 1H, H-7b), 7.31 (m, 2H, H10), 7.74 (m, 4H, H-5 + H-8), 8.27 (m, 2H, H-9).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 69.8 (t, C15), 77.0 (d, C14), 102.7 (d, C13), 110.3 (s, C12), 118.0 (s, C11), 122.7 (d, C10), 123.7 (d, C9), 128.2 (d, C8), 131.8 (t, C7), 133.6 (s, C6), 133.8 (d, C5), 139.8 (s, C4), 148.9 (s, C3), 153.5 (s, C2), 162.0 (s, C1).

IR: ν (cm⁻¹) = 1051 (s), 1126 (m), 1167 (s), 1207 (s), 1262 (m), 1347 (s), 1523 (s), 1600 (m), 1736 (m), 2227 (w), 2853 (w), 2918 (w), 3106 (w), 3449 (w breit).

Elementaranalyse (C₁₉H₁₄N₂O₇):

Berechnet:	C 59.69	H 3.69	N 7.33
Gefunden:	C 59.24	H 3.91	N 6.98

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. M. Gottesman, "Mechanisms of cancer drug resistance", *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615-627.
- [2] C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, "Cancer drug resistance: an evolving paradigm", *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714-726.
- [3] G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, S. Sarkar, "Drug resistance in cancer: an overview", *Cancers* **2014**, *6*, 1769-1792.
- [4] K. Yonesaka, K. Zejnullahu, I. Okamoto, T. Satoh, F. Cappuzzo, J. Souglakos, D. Ercan, A. Rogers, M. Roncalli, M. Takeda, Y. Fujisaka, J. Philips, T. Shimizu, O. Maenishi, Y. Cho, J. Sun, A. Destro, K. Taira, K. Takeda, T. Okabe, J. Swanson, H. Itoh, M. Takada, E. Lifshits, K. Okuno, J. A. Engelman, R. A. Shivdasani, K. Nishio, M. Fukuoka, M. Varella-Garcia, K. Nakagawa, P. A. Jänne, "Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab", *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 99ra86.
- [5] D. Hughes, D. I. Andersson, "Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms", *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 459-471.
- [6] N. L. Komarova, C. R. Boland, "Cancer: Calculated treatment", *Nature* **2013**, *499*, 291-292.
- [7] M. F. Ullah, "Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy", *Asian Pac. J. Cancer P.* **2008**, *9*, 1-6.
- [8] R. Krishna, L. D. Mayer, "Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs", *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265-283.
- [9] a) R. J. Kathawala, P. Gupta, C. R. Ashby Jr., Z.-S. Chen, "The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade", *Drug Resist. Update.* **2015**, *18*, 1-17; b) L. D. Cripe, H. Uno, E. M. Paietta, M. R. Litzow, R. P. Ketterling, J. M. Bennett, J. M. Rowe, H. M. Lazarus, S. Luger, M. S. Tallman, "Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999", *Blood* **2010**, *116*, 4077-4085; c) P. Ruff, D. A. Vorobiof, J. P. Jordaan, G. S. Demetriou, S. D. Moodley, A. L. Nosworthy, I. D. Werner, J. Raats, L. J. Burgess, "A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen", *Cancer Chemoth. Pharm.* **2009**, *64*, 763-768.
- [10] G. Zhao, X. Wang, "Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase", *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1461-1471.
- [11] P. Ruzza, A. Rosato, C. R. Rossi, M. Floreani, L. Quintieri, "Glutathione transferases as targets for cancer therapy", *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 763-777.
- [12] P. G. Board, D. Menon, "Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology", *BBA-Gen. Subjects* **2013**, *1830*, 3267-3288.
- [13] a) J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey, "Glutathione transferases", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *45*, 51-88; b) H. Hebert, C. Jegerschöld, "The structure of membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione

- metabolism as determined by electron crystallography", *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2007**, *17*, 396-404.
- [14] R. da Fonseca, W. Johnson, S. O'Brien, V. Vasconcelos, A. Antunes, "Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases", *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 281.
- [15] M. K. Tahir, B. Mannervik, "Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase", *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1048-1051.
- [16] D. F. A. R. Dourado, P. A. Fernandes, B. Mannervik, M. J. Ramos, "Glutathione Transferase: New Model for Glutathione Activation" *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9591-9598.
- [17] S. Singh, "Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death", *Cancer Chemoth. Pharm.* **2015**, *75*, 1-15.
- [18] P. Terrier, A. J. Townsend, J. M. Coindre, T. J. Triche, K. H. Cowan, "An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue", *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 845-853.
- [19] Y. Shiratori, Y. Soma, H. Maruyama, S. Sato, A. Takano, K. Sato, "Immunohistochemical detection of the placental form of glutathione S-transferase in dysplastic and neoplastic human uterine cervix lesions", *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6806-6809.
- [20] D. Townsend, K. Tew, "Immunohistochemical detection of the placental form of glutathione S-transferase in dysplastic and neoplastic human uterine cervix lesions", *Am. J. Pharmacogenomics* **2003**, *3*, 157-172.
- [21] C. M. Maugard, J. Charrier, A. Pitard, L. Champion, O. Akande, L. Pleasants, F. Ali-Osman, "Genetic polymorphism at the glutathione S-transferase (GST) P1 locus is a breast cancer risk modifier", *Int. J. Cancer* **2001**, *91*, 334-339.
- [22] U. M. Hegazy, K. Tars, U. Hellman, B. Mannervik, "Modulating catalytic activity by unnatural amino acid residues in a GSH-binding loop of GST P1-1", *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 811-826.
- [23] A. J. Oakley, M. L. Bello, A. Battistoni, G. Ricci, J. Rossjohn, H. O. Villar, M. W. Parker, "The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution", *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 84-100.
- [24] K. D. Tew, A. Monks, L. Barone, D. Rosser, G. Akerman, J. A. Montali, J. B. Wheatley, D. E. Schmidt, "Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program", *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 149-159.
- [25] a) J. Cairns, C. Wright, A. R. Cattan, A. G. Hall, B. J. Cantwell, A. L. Harris, C. H. Horne, "Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas", *J. Pathol.* **1992**, *166*, 19-25; b) D. F. Zeng, J. Zhang, L. D. Zhu, P. Y. Kong, J. P. Li, X. Zhang, W. Xu, J. L. Wang, X. G. Pen, P. Wang, S. H. Liu, "Analysis of drug resistance-associated proteins expressions of patients with the recurrent of acute leukemia via protein microarray technology", *Eur. Rev. Med Pharmacol. Sci.* **2014**, *18*, 537-543; c) E. Kolwijck, P. L. M. Zusterzeel, H. M. J. Roelofs, J. C. Hendriks, W. H. M. Peters, L. F. A. G. Massuger, "GSTP1-1 in Ovarian Cyst Fluid and Disease Outcome of Patients With Ovarian Cancer", *Cancer Epidem. Biomar.* **2009**, *18*, 2176-2181; d) K. L. Tan, L. Jankova, C. Chan, C. L. S. Fung, C. Clarke, B. P. C. Lin, G. Robertson,

- M. Molloy, P. H. Chapuis, L. Bokey, O. F. Dent, S. J. Clarke, "Clinicopathological correlates and prognostic significance of glutathione S-transferase Pi expression in 468 patients after potentially curative resection of node-positive colonic cancer", *Histopathology* **2011**, *59*, 1057-1070; e) P. P. Grimminger, M. K. H. Maus, P. M. Schneider, R. Metzger, A. H. Hölscher, H. Sugita, P. V. Danenberg, H. Alakus, J. Brabender, "Glutathione S-transferase PI (GST-PI) mRNA expression and DNA methylation is involved in the pathogenesis and prognosis of NSCLC", *Lung Cancer* **2012**, *78*, 87-91.
- [26] T. Miyake, T. Nakayama, Y. Naoi, N. Yamamoto, Y. Otani, S. J. Kim, K. Shimazu, A. Shimomura, N. Maruyama, Y. Tamaki, S. Noguchi, "GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer", *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 913-920.
- [27] K. Suk, "Proteomic Analysis of Glioma Chemoresistance" *Cur. Neuropharmacol.* **2012**, *10*, 72-79.
- [28] M. Geng, L. Wang, X. Chen, R. Cao, P. Li, "The association between chemosensitivity and Pgp, GST- π and Topo II expression in gastric cancer", *Diagn. Pathol.* **2013**, *8*, 198-198.
- [29] M. O'Brien, G. D. Kruh, K. D. Tew, "The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance", *J. Pharm. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 480-487.
- [30] a) H. W. Lo, G. R. Antoun, F. Ali-Osman, "The human glutathione S-transferase P1 protein is phosphorylated and its metabolic function enhanced by the Ser/Thr protein kinases, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C, in glioblastoma cells", *Cancer Res.* **2004**, *64*, 9131-9138; b) T. Okamura, S. Singh, J. Buolamwini, T. Haystead, H. Friedman, D. Bigner, F. Ali-Osman, "Tyrosine phosphorylation of the human glutathione S-transferase P1 by epidermal growth factor receptor", *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16979-16989.
- [31] a) V. Adler, Z. Yin, S. Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K. D. Tew, M. R. Pincus, M. Sardana, C. J. Henderson, C. R. Wolf, R. J. Davis, Z. Ronai, "Regulation of JNK signaling by GSTp", *EMBO J.* **1999**, *18*, 1321-1334; b) T. Okamura, G. Antoun, S. T. Keir, H. Friedman, D. D. Bigner, F. Ali-Osman, "Phosphorylation of GSTP1 by EGFR Promotes Formation of the Inhibitory GSTP1-JNK Complex and Suppresses JNK Downstream Signaling and Apoptosis in Brain Tumor Cells", *J. Biol. Chem.* **2015**; c) A. De Luca, L. Federici, M. De Canio, L. Stella, A. M. Caccuri, "New Insights into the Mechanism of JNK1 Inhibition by Glutathione Transferase P1-1", *Biochemistry* **2012**, *51*, 7304-7312.
- [32] J. Cui, M. Zhang, Y.-q. Zhang, Z.-h. Xu, "JNK pathway: diseases and therapeutic potential", *Acta Pharmacol. Sin.* **2007**, *28*, 601-608.
- [33] a) M. Kappelmann, A. Bosserhoff, S. Kuphal, "AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma", *Eur. J. Cell Biol.* **2014**, *93*, 76-81; b) K. D. Tew, Y. Manevich, C. Grek, Y. Xiong, J. Uys, D. M. Townsend, "The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer", *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 299-313.
- [34] C. Tournier, "The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer", *Genes & Cancer* **2013**, *4*, 397-400.
- [35] Y. Wu, Y. Fan, B. Xue, L. Luo, J. Shen, S. Zhang, Y. Jiang, Z. Yin, "Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals", *Oncogene* **2006**, *25*, 5787-5800.
- [36] A. De Luca, G. Mei, N. Rosato, E. Nicolai, L. Federici, C. Palumbo, A. Pastore, M. Serra, A. M. Caccuri, "The fine-tuning of TRAF2-GSTP1-1 interaction: effect

- of ligand binding and in situ detection of the complex", *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1015.
- [37] S. Zhou, Y. C. Lien, T. Shuvaeva, K. DeBolt, S. I. Feinstein, A. B. Fisher, "Functional interaction of glutathione S-transferase pi and peroxiredoxin 6 in intact cells", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 401-407.
- [38] J. Koh, J. Liu, F. Ali-Osman, "A physical complex between TGM2 and GSTP1 confers cisplatin resistance in glioma cells: Functional mapping of the interaction domain", *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2693.
- [39] X. Kou, N. Chen, Z. Feng, L. Luo, Z. Yin, "GSTP1 negatively regulates Stat3 activation in epidermal growth factor signaling", *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 1053-1057.
- [40] I. Sekine, J. D. Minna, K. Nishio, T. Tamura, N. Saijo, "A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer", *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1*, 31-37.
- [41] B. D. Rose, "Diuretics", *Kidney Int.* **1991**, *39*, 336-352.
- [42] J. T. Ahokas, F. A. Nicholls, P. J. Ravenscroft, B. T. Emmerson, "Inhibition of purified rat liver glutathione S-transferase isozymes by diuretic drugs", *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 2157-2161.
- [43] J. H. T. M. Ploemen, B. van Ommen, P. J. van Bladeren, "Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate", *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 1631-1635.
- [44] a) S. Awasthi, S. K. Srivastava, F. Ahmad, H. Ahmad, G. A. S. Ansari, "Interactions of glutathione S-transferase- π with ethacrynic acid and its glutathione conjugate", *BBA-Protein Struct. M.*, **1993**, *1164*, 173-178; b) A. J. Oakley, J. Rossjohn, M. Lo Bello, A. M. Caccuri, G. Federici, M. W. Parker, "The Three-Dimensional Structure of the Human Pi Class Glutathione Transferase P1-1 in Complex with the Inhibitor Ethacrynic Acid and Its Glutathione Conjugate", *Biochemistry* **1997**, *36*, 576-585; c) A. J. Oakley, M. Lo Bello, A. P. Mazzetti, G. Federici, M. W. Parker, "The glutathione conjugate of ethacrynic acid can bind to human pi class glutathione transferase P1-1 in two different modes", *FEBS Lett.* **1997**, *419*, 32-36.
- [45] a) K. D. Tew, A. M. Bomber, S. J. Hoffman, "Ethacrynic Acid and Piriprost as Enhancers of Cytotoxicity in Drug Resistant and Sensitive Cell Lines", *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3622-3625; b) R. Nagourney, J. Messenger, D. Kern, L. Weisenthal, "Enhancement of anthracycline and alkylator cytotoxicity by ethacrynic acid in primary cultures of human tissues", *Cancer Chemoth. Pharm.* **1990**, *26*, 318-322.
- [46] X. Yang, G. Liu, H. Li, Y. Zhang, D. Song, C. Li, R. Wang, B. Liu, W. Liang, Y. Jing, G. Zhao, "Novel oxadiazole analogues derived from ethacrynic acid: design, synthesis, and structure-activity relationships in inhibiting the activity of glutathione S-transferase P1-1 and cancer cell proliferation", *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1015-1022.
- [47] M. H. Lyttle, M. D. Hocker, H. C. Hui, C. G. Caldwell, D. T. Aaron, A. Engqvist-Goldstein, J. E. Flatgaard, K. E. Bauer, "Isoenzyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis", *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 189-194.
- [48] A. S. Morgan, K. D. Tew, L. M. Kauvar, F. J. Ciaccio, "Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines", *Cancer Chemoth. Pharm.* **1996**, *37*, 363-370.
- [49] L. Tentori, A. S. Dorio, E. Mazzon, A. Muzi, A. Sau, S. Cuzzocrea, P. Vernole, G. Federici, A. M. Caccuri, G. Graziani, "The glutathione transferase inhibitor 6-(7-

- nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma", *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 1219-1230.
- [50] G. Filomeni, P. Turella, M. L. Dupuis, O. Forini, M. R. Ciriolo, M. Cianfriglia, S. Pezzola, G. Federici, A. M. Caccuri, "6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer", *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 371-379.
- [51] M. M. Alparslan, Ö. Daniş, "In Vitro Inhibition of Human Placental Glutathione S-Transferase by 3-Arylcoumarin Derivatives", *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, *348*, 635-642.
- [52] J. J. van Zanden, O. Ben Hamman, M. L. van Iersel, S. Boeren, N. H. Cnubben, M. Lo Bello, J. Vervoort, P. J. van Bladeren, I. M. Rietjens, "Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin", *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *145*, 139-148.
- [53] D. M. de Oliveira, M. T. de Farias, A. L. Teles, M. C. Dos Santos Junior, M. D. de Cerqueira, R. M. Lima, R. S. El-Bacha, "8-Methoxypsoralen is a competitive inhibitor of glutathione S-transferase P1-1", *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 308.
- [54] I. Quesada-Soriano, A. Primavera, J. M. Casas-Solvas, R. Tellez-Sanz, C. Baron, A. Vargas-Berenguel, M. Lo Bello, L. Garcia-Fuentes, "Identifying and characterizing binding sites on the irreversible inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by S-thiocarbamoylation", *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1594-1604.
- [55] a) R. I. M. van Haften, C. T. A. Evelo, G. R. M. M. Haenen, A. Bast, "α-Tocopherol Inhibits Human Glutathione S-Transferase π", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 631-633; b) Y. Musdal, U. M. Hegazy, Y. Aksoy, B. Mannervik, "FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1", *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *205*, 53-62; c) W. Wang, C. Q. Xia, N. Liu, L. S. Gan, J. Zheng, "Mechanistic study of potentiation of chemotherapy by a haloenol lactone derivative in vitro", *Cancer Chemoth. Pharm.* **2008**, *62*, 117-122.
- [56] M. H. Lyttle, A. Satyam, M. D. Hocker, K. E. Bauer, C. G. Caldwell, H. C. Hui, A. S. Morgan, A. Mergia, L. M. Kauvar, "Glutathione-S-transferase Activates Novel Alkylating Agents", *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1501-1507.
- [57] a) L. V. Sequist, P. M. Fidias, J. S. Temel, T. Kolevska, M. S. Rabin, R. V. Boccia, H. A. Burris, R. J. Belt, M. S. Huberman, O. Melnyk, G. M. Mills, C. W. Englund, D. C. Caldwell, J. G. Keck, L. Meng, M. Jones, G. L. Brown, M. J. Edelman, T. J. Lynch, "Phase 1-2a multicenter dose-ranging study of canfosfamide in combination with carboplatin and paclitaxel as first-line therapy for patients with advanced non-small cell lung cancer", *J. Thorac. Oncol* **2009**, *4*, 1389-1396; b) J. J. Kavanagh, D. M. Gershenson, H. Choi, L. Lewis, K. Patel, G. L. Brown, A. Garcia, D. R. Spriggs, "Multi-institutional phase 2 study of TLK286 (TELCYTA, a glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analog prodrug) in patients with platinum and paclitaxel refractory or resistant ovarian cancer", *Int. J. Gynecol. Cancer* **2005**, *15*, 593-600; c) L. S. Rosen, J. Brown, B. Laxa, L. Boulos, L. Reiswig, W. D. Henner, R. T. Lum, S. R. Schow, C. A. Maack, J. G. Keck, J. C. Mascavage, J. A. Dombroski, R. F. Gomez, G. L. Brown, "Phase I study of TLK286 (glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analogue) in advanced refractory solid malignancies", *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1628-1638; d) I. Vergote, N. J. Finkler, J. B. Hall, O. Melnyk, R. P. Edwards, M. Jones, J. G. Keck, L. Meng, G. L. Brown, E. M. Rankin, J. J. Burke, R. V. Boccia, C. D. Runowicz, P. G. Rose, "Randomized phase III study of canfosfamide in combination with pegylated liposomal doxorubicin compared with pegylated

- liposomal doxorubicin alone in platinum-resistant ovarian cancer", *Int. J. Gynecol. Cancer* **2010**, *20*, 772-780.
- [58] P. J. O'Dwyer, F. LaCreta, S. Nash, P. W. Tinsley, R. Schilder, M. L. Clapper, K. D. Tew, L. Panting, S. Litwin, R. L. Comis, "Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid", *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6059-6065.
- [59] F. P. Lacreata, J. M. Brennan, S. L. Nash, R. L. Comis, K. D. Tew, P. J. O'Dwyer, "Pharmacokinetics and bioavailability study of ethacrynic acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer", *J. Pharm. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 1186-1191.
- [60] A. Raza, N. Galili, S. E. Smith, J. Godwin, R. V. Boccia, H. Myint, D. Mahadevan, D. Mulford, M. Rarick, G. L. Brown, D. Schaar, S. Faderl, R. S. Komrokji, A. F. List, M. Sekeres, "A phase 2 randomized multicenter study of 2 extended dosing schedules of oral ezatiostat in low to intermediate-1 risk myelodysplastic syndrome", *Cancer* **2012**, *118*, 2138-2147.
- [61] R. D. Slack, A. M. Jacobine, G. H. Posner, "Antimalarial peroxides: advances in drug discovery and design", *MedChemComm* **2012**, *3*, 281-297.
- [62] N. Klonis, D. J. Creek, L. Tilley, "Iron and heme metabolism in Plasmodium falciparum and the mechanism of action of artemisinins", *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 722-727.
- [63] P. Coghi, N. Basilico, D. Taramelli, W. C. Chan, R. K. Haynes, D. Monti, "Interaction of artemisinins with oxyhemoglobin Hb-FeII, Hb-FeII, carboxyHb-FeII, heme-FeII, and carboxyheme FeII: significance for mode of action and implications for therapy of cerebral malaria", *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2045-2053.
- [64] E. Esu, E. E. Effa, O. N. Opie, A. Uwaoma, M. M. Meremikwu, "Artemether for severe malaria", *Cochrane Reviews* **2014**, *9*.
- [65] a) G. Schmid, W. Hofheinz, "Total synthesis of qinghaosu", *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 624-625; b) M. A. Corsello, N. K. Garg, "Synthetic chemistry fuels interdisciplinary approaches to the production of artemisinin", *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 359-366.
- [66] J. Turconi, F. Griolet, R. Guevel, G. Odon, R. Villa, A. Geatti, M. Hvala, K. Rossen, R. Göller, A. Burgard, "Semisynthetic Artemisinin, the Chemical Path to Industrial Production", *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 417-422.
- [67] W. E. Ho, H. Y. Peh, T. K. Chan, W. S. F. Wong, "Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial", *Pharmacol. Therapeu.* **2014**, *142*, 126-139.
- [68] a) A. Hamacher-Brady, H. A. Stein, S. Turschner, I. Toegel, R. Mora, N. Jennewein, T. Efferth, R. Eils, N. R. Brady, "Artesunate Activates Mitochondrial Apoptosis in Breast Cancer Cells via Iron-catalyzed Lysosomal Reactive Oxygen Species Production" *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6587-6601; b) S. Zhang, G. S. Gerhard, "Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target", *PLoS One* **2009**, *4*; c) A. E. Mercer, I. M. Copple, J. L. Maggs, P. M. O'Neill, B. K. Park, "The Role of Heme and the Mitochondrion in the Chemical and Molecular Mechanisms of Mammalian Cell Death Induced by the Artemisinin Antimalarials", *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 987-996.
- [69] a) T. G. Berger, D. Dieckmann, T. Efferth, E. S. Schultz, J. O. Funk, A. Baur, G. Schuler, "Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma – first experiences", *Oncol. Rep.* **2005**, *14*, 1599-1603; b) N. P. Singh, V. K. Panwar, "Case Report of a Pituitary Macroadenoma Treated With Artemether", *Integr. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 391-394.

- [70] T. Ericsson, A. Blank, C. von Hagens, M. Ashton, A. Abelo, "Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin during long-term oral administration of artesunate to patients with metastatic breast cancer", *Eur. J. Clin Pharmacol.* **2014**, *70*, 1453-1463.
- [71] a) A. Das, "Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds", *Ann. Med. Health Sci. Res.* **2015**, *5*, 93-102; b) J. A. Willoughby, S. N. Sundar, M. Cheung, A. S. Tin, J. Modiano, G. L. Firestone, "Artemisinin Blocks Prostate Cancer Growth and Cell Cycle Progression by Disrupting Sp1 Interactions with the Cyclin-dependent Kinase-4 (CDK4) Promoter and Inhibiting CDK4 Gene Expression", *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2203-2213; c) L. Steinbruck, G. Pereira, T. Efferth, "Effects of artesunate on cytokinesis and G(2)/M cell cycle progression of tumour cells and budding yeast", *Cancer Genom. Proteom.* **2010**, *7*, 337-346; d) S.-J. Wang, B. Sun, Z.-X. Cheng, H.-X. Zhou, Y. Gao, R. Kong, H. Chen, H.-C. Jiang, S.-H. Pan, D.-B. Xue, X.-W. Bai, "Dihydroartemisinin inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by targeting the NF- κ B pathway", *Cancer Chemoth. Pharm.* **2011**, *68*, 1421-1430; e) M. Wartenberg, S. Wolf, P. Budde, F. Grunheck, H. Acker, J. Hescheler, G. Wartenberg, H. Sauer, "The Antimalaria Agent Artemisinin Exerts Antiangiogenic Effects in Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies", *Lab. Invest.* **2003**, *83*, 1647-1655.
- [72] T. Efferth, M. Davey, A. Olbrich, G. Rucker, E. Gebhart, R. Davey, "Activity of Drugs from Traditional Chinese Medicine toward Sensitive and MDR1- or MRP1-Overexpressing Multidrug-Resistant Human CCRF-CEM Leukemia Cells", *Blood Cells Mol. Dis.* **2002**, *28*, 160-168.
- [73] T. Efferth, A. Sauerbrey, A. Olbrich, E. Gebhart, P. Rauch, H. O. Weber, J. G. Hengstler, M.-E. Halatsch, M. Volm, K. D. Tew, D. D. Ross, J. O. Funk, "Molecular Modes of Action of Artesunate in Tumor Cell Lines", *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 382-394.
- [74] S. Mukanganyama, M. Widersten, Y. S. Naik, B. Mannervik, J. A. Hasler, "Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance", *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 700-705.
- [75] N. Terzic, D. Opsenica, D. Milic, B. Tinant, K. S. Smith, W. K. Milhous, B. A. Solaja, "Deoxycholic acid-derived tetraoxane antimalarials and antiproliferatives", *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5118-5127.
- [76] A. Niesen, A. Barthel, R. Kluge, A. Kowitzsch, D. Strohl, S. Schwarz, R. Csuk, "Antitumoractive endoperoxides from triterpenes", *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2009**, *342*, 569-576.
- [77] M. I. Hossain, M. Świtalska, W. Peng, M. Takashima, N. Wang, M. Kaiser, J. Wietrzyk, S. Dan, T. Yamori, T. Inokuchi, "Design, synthesis, and in vitro cancer cell growth inhibition evaluation and antimalarial testing of trioxanes installed in cyclic 2-enoate substructures", *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 294-309.
- [78] P. Zhu, B. M. Tong, R. Wang, J. P. Chen, S. Foo, H. C. Chong, X. L. Wang, G. Y. Ang, S. Chiba, N. S. Tan, "Nox4-dependent ROS modulation by amino endoperoxides to induce apoptosis in cancer cells", *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e552.
- [79] W. Adam, A. Rios, "Perhydrolysis of epoxides", *Chem. Commun.* **1971**, 822-823.
- [80] P. H. Dussault, D. R. Davies, "Synthesis of 1,2-dioxanes, 1,2,4-trioxanes, and 1,2,4-trioxepanes via cyclizations of unsaturated hydroperoxyacetals", *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 463-466.
- [81] a) A. J. Bloodworth, T. Hagen, K. A. Johnson, I. LeNoir, C. Moussy, "Versatility of the cyclo-oxymercuration route to 1,2,4-trioxanes", *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*,

- 635-638; b) A. J. Bloodworth, A. Shah, "Synthesis of 1,2,4-trioxanes via intramolecular oxymercuration", *Chem. Commun.* **1991**, 947-948.
- [82] A. J. Bloodworth, A. Shah, "A halogenocyclisation route to 1,2,4-trioxanes", *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6643-6646.
- [83] H. Yamamoto, M. Akutagawa, H. Aoyama, Y. Omote, "Synthesis and reactions of 5-arylamino-1,2,4-trioxans", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2300-2303.
- [84] P. M. O'Neill, S. Hindley, M. D. Pugh, J. Davies, P. G. Bray, B. K. Park, D. S. Kapu, S. A. Ward, P. A. Stocks, "Co(thd)₂: a superior catalyst for aerobic epoxidation and hydroperoxysilylation of unactivated alkenes: application to the synthesis of spiro-1,2,4-trioxanes", *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8135-8138.
- [85] C. Singh, "Preparation of β -hydroxyhydroperoxides by photooxygenation of allylic alcohols and their elaboration into 1,2,4-trioxanes", *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6901-6902.
- [86] L. B. Harding, W. A. Goddard, "The mechanism of the ene reaction of singlet oxygen with olefins", *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 439-449.
- [87] C. Schweitzer, R. Schmidt, "Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen", *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685-1758.
- [88] a) A. Greer, "Christopher Foote's Discovery of the Role of Singlet Oxygen [¹O₂ (¹ Δ_g)] in Photosensitized Oxidation Reactions", *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 797-804; b) P. Lechtken, "Singulett-Sauerstoff", *Chem. unserer Zeit* **1974**, *8*, 11-16.
- [89] J. Zhao, W. Wu, J. Sun, S. Guo, "Triplet photosensitizers: from molecular design to applications", *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5323-5351.
- [90] A. Raabe, "Synthese neuer antimalariaaktiver Verbindungen: Bicyclische Perorthoester mit 1,2,4-Trioxanstruktur und Addukte aus natürlichem Artemisinin mit Peroxidverbindungen", Ph.D. Thesis, University of Cologne (Cologne), **2008**.
- [91] G. O. Schenck, "Zur Theorie der photosensibilisierten Reaktion mit molekularem Sauerstoff", *Naturwissenschaften* **1948**, *35*, 28-29.
- [92] M. Stratakis, M. Orfanopoulos, "Regioselectivity in the Ene Reaction of Singlet Oxygen with Alkenes", *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1595-1615.
- [93] M. Prein, W. Adam, "Die Schenck-En-Reaktion: eine diastereoselektive Oxyfunktionalisierung mit Singulett-Sauerstoff für präparative Anwendungen", *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 519-538.
- [94] A. O. Terent'ev, D. A. Borisov, V. A. Vil', V. M. Dembitsky, "Synthesis of five- and six-membered cyclic organic peroxides: Key transformations into peroxide ring-retaining products", *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 34-114.
- [95] a) A. G. Griesbeck, D. Blunk, T. T. El-Idreesy, A. Raabe, "Bicyclic Peroxides and Perorthoesters with 1,2,4-Trioxane Structures", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8883-8886; b) A. G. Griesbeck, V. Schlundt, J. M. Neudörfl, "Functionalized polar 1,2,4-trioxanes as building blocks by singlet oxygenation of 4-hydroxy tiglic acid using the solvent deuterium isotope trick", *RSC Adv.* **2013**, *3*, 7265-7270; c) C. Singh, N. Gupta, S. K. Puri, "Geraniol-derived 1,2,4-trioxanes with potent in-vivo antimalarial activity", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3447-3450; d) C. Singh, N. C. Srivastav, S. K. Puri, "Synthesis and antimalarial activity of 6-cycloalkylvinyl substituted 1,2,4-trioxanes", *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5745-5752; e) A. Griesbeck, L.-O. Höinck, J. Lex, J. Neudörfl, D. Blunk, T. El-Idreesy, "1,2,5,10,11,14-Hexaoxadispiro[5.2.5.2]hexadecanes: Novel Spirofused Bis-Trioxane Peroxides", *Molecules* **2008**, *13*, 1743.

- [96] T. T. El-Idreesy, "Photooxygenation of Allylic Alcohols in Polymer Matrices - Synthesis of New Antimalarial Peroxides", Ph.D. Thesis, University of Cologne (Cologne), **2005**.
- [97] E. Dalcanale, F. Montanari, "Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide", *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 567-569.
- [98] S. Sillner, "Synthesewege zu neuen Malariatherapeutika: Peroxid-Dyaden aus Artemisininderivaten und Terpen-Endoperoxiden", Ph.D. Thesis, University of Cologne (Cologne), **2014**.
- [99] A. G. Griesbeck, L.-O. Hönck, J. M. Neudörfl, "Synthesis of spiroannulated and 3-arylated 1,2,4-trioxanes from mesitylol and methyl 4-hydroxytiglate by photooxygenation and peroxyacetalization", *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, No. 61.
- [100] C. Singh, H. Malik, S. K. Puri, "Orally Active 1,2,4-Trioxanes: Synthesis and Antimalarial Assessment of a New Series of 9-Functionalized 3-(1-Arylvinyl)-1,2,5-trioxaspiro[5.5]undecanes against Multi-Drug-Resistant Plasmodium yoelii nigeriensis in Mice", *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2794-2803.
- [101] K. Ando, K. Yamada, "Highly E-selective solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction catalyzed by DBU", *Green Chem.* **2011**, *13*, 1143-1146.
- [102] a) F.-X. Felpin, K. Miqueu, J.-M. Sotiropoulos, E. Fouquet, O. Ibarguren, J. Laudien, "Room-Temperature, Ligand- and Base-Free Heck Reactions of Aryl Diazonium Salts at Low Palladium Loading: Sustainable Preparation of Substituted Stilbene Derivatives", *Chem. Eur J.* **2010**, *16*, 5191-5204; b) B. B. Snider, G. B. Phillips, "Ethylaluminum dichloride catalyzed ene reactions of aldehydes with nonnucleophilic alkenes", *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 464-469.
- [103] V. Schlundt, "Singulett-Sauerstoff Reaktionen zur Synthese von neuen biologisch aktiven 1,2,4-Trioxansäuren, Amiden und Estern und weiteren cyclischen Peroxiden sowie von Photocage-Verbindungen", Ph.D Thesis, University of Cologne (Cologne), **2013**.
- [104] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, "Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation", *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130-7139.
- [105] R. H. Kolm, G. Stenberg, M. Widersten, B. Mannervik, "High-Level Bacterial Expression of Human Glutathione Transferase P1-1 Encoded by Semisynthetic DNA", *PREP* **1995**, *6*, 265-271.
- [106] W. P. Janzen, "Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art", *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1162-1170.
- [107] a) K. M. Ivanetich, R. D. Goold, "A rapid equilibrium random sequential bi-bi mechanism for human placental glutathione S-transferase", *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *998*, 7-13; b) A. E. Thumser, K. M. Ivanetich, "Kinetic mechanism of human erythrocyte acidic isoenzyme rho", *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1203*, 115-120.
- [108] F. Ali-Osman, O. Akande, G. Antoun, J.-X. Mao, J. Buolamwini, "Molecular Cloning, Characterization, and Expression in Escherichia coli of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-Transferase Pi Gene Variants: Evidence for Differential Catalytic Activity of the Encoded Proteins", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10004-10012.
- [109] T. Ertan-Bolelli, Y. Musdal, K. Bolelli, S. Yilmaz, Y. Aksoy, I. Yildiz, E. Aki-Yalcin, I. Yalcin, "Synthesis and Biological Evaluation of 2-Substituted-5-(4-nitrophenylsulfonamido)benzoxazoles as Human GST P1-1 Inhibitors, and Description of the Binding Site Features", *ChemMedChem* **2014**, *9*, 984-992.

- [110] N. Hiller, K. Fritz-Wolf, M. Deponde, W. Wende, H. Zimmermann, K. Becker, "Plasmodium falciparum glutathione S-transferase-Structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition", *Protein Sci.* **2006**, *15*, 281-289.
- [111] a) M. Pietsch, M. Gütschow, "Synthesis of Tricyclic 1,3-Oxazin-4-ones and Kinetic Analysis of Cholesterol Esterase and Acetylcholinesterase Inhibition", *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8270-8288; b) I. H. Segel, "Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems", John Wiley & Sons, New York, **1993**, pp. 161–226.
- [112] B. Y. Feng, B. K. Shoichet, "A Detergent-Based Assay for the Detection of Promiscuous Inhibitors", *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 550-553.
- [113] a) H. Lineweaver, D. Burk, "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666; b) M. Dixon, "The determination of enzyme inhibitor constants", *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [114] A. Cornish-Bowden, "A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors", *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143-144.
- [115] a) R. G. Junqueira, E. Silva, M. Mares-Guia, "Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines" *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1992**, *25*, 873-887; b) C. M. Diniz, L. P. Xavier, M. M. Santoro and A. F. S. Figueiredo, "Competitive Parabolic Inhibition of Rat Tissue Kallikrein by Aprotinin", *Curr. Enzym. Inhib.* **2009**, *5*, 163-170.
- [116] Y. Cheng, W. H. Prusoff, "Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction", *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [117] J. M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador, "Glutathione in Cancer Biology and Therapy", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2006**, *43*, 143-181.
- [118] a) F. D. Perperopoulou, P. G. Tsoungas, T. N. Thireou, V. E. Rinotas, E. K. Douni, E. E. Eliopoulos, N. E. Labrou, Y. D. Clonis, "2,2' -Dihydroxybenzophenones and their carbonyl N-analogues as inhibitor scaffolds for MDR-involved human glutathione transferase isoenzyme A1-1", *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3957-3970; b) I. Cacciatore, A. M. Caccuri, A. Cocco, F. De Maria, A. Di Stefano, G. Luisi, F. Pinnen, G. Ricci, P. Sozio, P. Turella, "Potent isozyme-selective inhibition of human glutathione S-transferase A1-1 by a novel glutathione S-conjugate", *Amino Acids* **2005**, *29*, 255-261.
- [119] J. D. Rowe, E. Nieves, I. Listowsky, "Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera", *Biochem. J.* **1997**, *325*, 481-486.
- [120] T. C. Shea, S. L. Kelley, W. D. Henner, "Identification of an Anionic Form of Glutathione Transferase Present in Many Human Tumors and Human Tumor Cell Lines", *Cancer Res.* **1988**, *48*, 527-533.
- [121] L. M. Mayr, D. Bojanic, "Novel trends in high-throughput screening", *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 580-588.
- [122] D. Rotili, A. De Luca, D. Tarantino, S. Pezzola, M. Forgione, B. Morozzo della Rocca, M. Falconi, A. Mai, A. M. Caccuri, "Synthesis and structure–activity relationship of new cytotoxic agents targeting human glutathione-S-transferases", *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 156-171.
- [123] N. Mathew, M. Kalyanasundaram, K. Balaraman, "Glutathione S-transferase (GST) inhibitors", *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 431-444.

- [124] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, H. R. H. Patel, "Basic principles of real-time quantitative PCR", *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, *5*, 209-219.
- [125] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes", *Genome Biol.* **2002**, *3*, Epub.
- [126] S. A. Bustin, V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, C. T. Wittwer, "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments", *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611-622.
- [127] B. Kozera, M. Rapacz, "Reference genes in real-time PCR", *J. Appl. Genet.* **2013**, *54*, 391-406.
- [128] R. B. Page, A. J. Stromberg, "Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments", *Scientific World J.* **2011**, *11*, 1383-1393.
- [129] a) S. A. Bustin, T. Nolan, "Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction", *J. Biomol. Tech* **2004**, *15*, 155-166;
b) O. Suslov, D. A. Steindler, "PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency", *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e181;
c) J. H. Schefe, K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger, H. Funke-Kaiser, "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula", *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 901-910.
- [130] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, G. M. Hutchins, "Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination", *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 1463-1467.
- [131] J. Fogh, J. M. Fogh, T. Orfeo, "One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice", *J. Natl. Cancer Inst.* **1977**, *59*, 221-226.
- [132] E. V. Gaffney, "A cell line (HBL-100) established from human breast milk", *Cell Tissue Res.* **1982**, *227*, 563-568.
- [133] J. B. Faust, T. C. Meeker, "Amplification and Expression of the bcl-1 Gene in Human Solid Tumor Cell Lines", *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2460-2463.
- [134] B. R. Brinkley, P. T. Beall, L. J. Wible, M. L. Mace, D. S. Turner, R. M. Cailleau, "Variations in Cell Form and Cytoskeleton in Human Breast Carcinoma Cells in Vitro", *Cancer Res.* **1980**, *40*, 3118-3129.
- [135] M. A. Savanur, S. M. Eligar, R. Pujari, C. Chen, P. Mahajan, A. Borges, P. Shastry, A. Ingle, R. D. Kalraiya, B. M. Swamy, J. M. Rhodes, L.-G. Yu, S. R. Inamdar, "Sclerotium rolfsii Lectin Induces Stronger Inhibition of Proliferation in Human Breast Cancer Cells than Normal Human Mammary Epithelial Cells by Induction of Cell Apoptosis", *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110107.
- [136] H. Bark, C.-H. Choi, "PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF- κ B", *Cancer Chemoth. Pharm.* **2010**, *65*, 1131-1136.
- [137] M. Nistér, T. A. Libermann, C. Betsholtz, M. Pettersson, L. Claesson-Welsh, C.-H. Heldin, J. Schlessinger, B. Westermark, "Expression of Messenger RNAs for Platelet-derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- α and Their Receptors in Human Malignant Glioma Cell Lines", *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3910-3918.

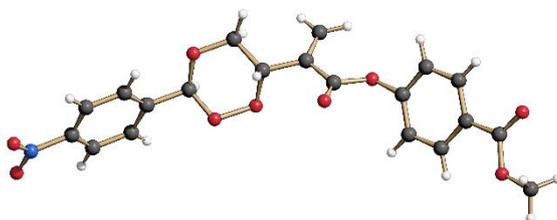
- [138] S. J. Busch, R. L. Barnhart, G. A. Martin, M. A. Flanagan, R. L. Jackson, "Differential regulation of hepatic triglyceride lipase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene expression in a human hepatoma cell line, HepG2", *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 22474-22479.
- [139] R. Gallagher, S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscelli, R. Gallo, "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia", *Blood* **1979**, 54, 713-733.
- [140] A. Weiss, R. L. Wiskocil, J. D. Stobo, "The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level", *J. Immunol.* **1984**, 133, 123-128.
- [141] L. Šebestová, R. Havelek, M. Řezáčová, J. Honzíček, Z. Kročová, J. Vinklárek, "Study of antitumor effect of selected vanadium and molybdenum organometallic complexes in human leukemic T-cells", *Chem. Biol. Interact.* **2015**, 242, 61-70.
- [142] E. P. Browne, E. C. Punska, S. Lenington, C. N. Otis, D. L. Anderton, K. F. Arcaro, "Increased promoter methylation in exfoliated breast epithelial cells in women with a previous breast biopsy", *Epigenetics* **2011**, 6, 1425-1435.
- [143] Y. Otani, T. Miyake, N. Kagara, M. Shimoda, Y. Naoi, N. Maruyama, A. Shimomura, K. Shimazu, S. J. Kim, S. Noguchi, "BRCA1 promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor for BRCA1-methylated breast cancer", *Cancer Sci.* **2014**, 105, 1369-1376.
- [144] C. Saint-Ruf, B. Malfoy, S. Scholl, B. Zafrani, B. Dutrillaux, "GST pi gene is frequently coamplified with INT2 and HSTF1 proto-oncogenes in human breast cancers", *Oncogene* **1991**, 6, 403-406.
- [145] X. Hu, S. C. Juneja, N. J. Maihle, M. P. Cleary, "Leptin-A Growth Factor in Normal and Malignant Breast Cells and for Normal Mammary Gland Development", *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, 94, 1704-1711.
- [146] J. Wang, J. Zhang, L. Zhang, L. Zhao, S. Fan, Z. Yang, F. Gao, Y. Kong, G. G. Xiao, Q. Wang, "Expression of P-gp, MRP, LRP, GST-pi and TopoIIalpha and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines", *Oncol. Rep.* **2011**, 26, 1081-1089.
- [147] R. Zhang, K. A. Kang, M. J. Piao, K. C. Kim, J. Zheng, C. W. Yao, J. W. Cha, Y. H. Maeng, W. Y. Chang, P. G. Moon, M. C. Baek, J. W. Hyun, "Epigenetic alterations are involved in the overexpression of glutathione S-transferase pi-1 in human colorectal cancers", *Int. J. Oncol.* **2014**, 45, 1275-1283.
- [148] X. Shi, S. Wu, Y. Yang, L. Tang, Y. Wang, J. Dong, B. Lu, G. Jiang, W. Zhao, "AQP5 silencing suppresses p38 MAPK signaling and improves drug resistance in colon cancer cells", *Tumour Biol.* **2014**, 35, 7035-7045.
- [149] a) J. Yao, M. Chang, Y. Li, E. Pisha, X. Liu, D. Yao, E. C. Elguindi, S. Y. Blond, J. L. Bolton, "Inhibition of Cellular Enzymes by Equine Catechol Estrogens in Human Breast Cancer Cells: Specificity for Glutathione S-Transferase P1-1", *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 935-942; b) R. Wang, C. Li, D. Song, G. Zhao, L. Zhao, Y. Jing, "Ethacrynic acid butyl-ester induces apoptosis in leukemia cells through a hydrogen peroxide mediated pathway independent of glutathione S-transferase P1-1 inhibition", *Cancer Res.* **2007**, 67, 7856-7864.
- [150] a) Z. Wang, S. Liang, X. Lian, L. Liu, S. Zhao, Q. Xuan, L. Guo, H. Liu, Y. Yang, T. Dong, Y. Liu, Z. Liu, Q. Zhang, "Identification of proteins responsible for adriamycin resistance in breast cancer cells using proteomics analysis", *Sci. Rep.* **2015**, 5, No. 9301; b) J. Alander, K. Johansson, V. D. Heuser, H. Farebo, J.

- Jarvliden, H. Abe, A. Shibata, M. Ito, Y. Ito, R. Morgenstern, "Characterization of a new fluorogenic substrate for microsomal glutathione transferase 1", *Anal. Biochem.* **2009**, *390*, 52-56.
- [151] F. Al-Ejeh, P. T. Simpson, J. M. Sanus, K. Klein, M. Kalimutho, W. Shi, M. Miranda, J. Kutasovic, A. Raghavendra, J. Madore, L. Reid, L. Krause, G. Chenevix-Trench, S. R. Lakhani, K. K. Khanna, "Meta-analysis of the global gene expression profile of triple-negative breast cancer identifies genes for the prognostication and treatment of aggressive breast cancer", *Oncogenesis* **2014**, *3*, e100.
- [152] A. Helenius, K. Simons, "Solubilization of membranes by detergents", *BBA-Rev. Biomem.* **1975**, *415*, 29-79.
- [153] D. Schubert, K. Boss, H. J. Dorst, J. Flossdorf, G. Pappert, "The nature of the stable noncovalent dimers of band 3 protein from erythrocyte membranes in solutions of Triton X-100", *FEBS Lett.* **1983**, *163*, 81-84.
- [154] K. Johansson, K. Åhlen, R. Rinaldi, K. Sahlander, A. Siritantikorn, R. Morgenstern, "Microsomal glutathione transferase 1 in anticancer drug resistance", *Carcinogenesis* **2006**, *28*, 465-470.
- [155] a) L. E. Limbird, P. D. Meyts, R. J. Lefkowitz, " β -Adrenergic receptors: Evidence for negative cooperativity", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *64*, 1160-1168; b) H. Abeliovich, "An Empirical Extremum Principle for the Hill Coefficient in Ligand-Protein Interactions Showing Negative Cooperativity", *Biophys. J.* **2005**, *89*, 76-79.
- [156] Y. Fujikawa, F. Morisaki, A. Ogura, K. Morohashi, S. Enya, R. Niwa, S. Goto, H. Kojima, T. Okabe, T. Nagano, H. Inoue, "A practical fluorogenic substrate for high-throughput screening of glutathione S-transferase inhibitors", *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11459-11462.
- [157] N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari, C. Domenicotti, "Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance", *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 10.
- [158] A. Chatterjee, "Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity?", *Nutrients* **2013**, *5*, 525-542.
- [159] S. Aizawa, K. Ookawa, T. Kudo, J. Asano, M. Hayakari, S. Tsuchida, "Characterization of cell death induced by ethacrynic acid in a human colon cancer cell line DLD-1 and suppression by N-acetyl-L-cysteine", *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 886-893.
- [160] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, "A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases", *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55-68.
- [161] P. Augustijns, A. D'Hulst, J. Van Daele, R. Kinget, "Transport of artemisinin and sodium artesunate in Caco-2 intestinal epithelial cells", *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 577-579.
- [162] Y. Fujikawa, Y. Urano, T. Komatsu, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai, H. Inoue, T. Nagano, "Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione S-transferase and application for activity imaging in living cells", *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14533-14543.
- [163] J. Zhang, A. Shibata, M. Ito, S. Shuto, Y. Ito, B. Mannervik, H. Abe, R. Morgenstern, "Synthesis and Characterization of a Series of Highly Fluorogenic Substrates for Glutathione Transferases, a General Strategy", *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14109-14119.

- [164] M. Bräutigam, N. Teusch, T. Schenk, M. Sheikh, R. Z. Aricioglu, S. H. Borowski, J. M. Neudörfl, U. Baumann, A. G. Griesbeck, M. Pietsch, "Selective inhibitors of glutathione transferase P1 with trioxane structure as anticancer agents", *ChemMedChem* **2015**, *10*, 629-639.
- [165] G. U. Marten, T. Gelbrich, H. Ritter, A. M. Schmidt, "A Magneto-responsive Drug Delivery System via β -Cyclodextrin Functionalized Magnetic Polymer Brushes", *IEEE Trans. Magn.* **2013**, *49*, 364-372.
- [166] a) O. F. Kuzu, F. D. Nguyen, M. A. Noory, A. Sharma, "Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research", *Cancer Growth Metastasis* **2015**, *8*, 81-94; b) A. S. Bobbs, J. M. Cole, K. D. Cowden Dahl, "Emerging and Evolving Ovarian Cancer Animal Models", *Cancer Growth Metastasis* **2015**, *8*, 29-36; c) E. Marangoni, M. F. Poupon, "Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development", *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, *26*, 556-561.
- [167] K. A. Johnson, R. S. Goody, "The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper", *Biochemistry* **2011**, *50*, 8264-8269.
- [168] I. H. Segel, "Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems", John Wiley & Sons, New York, **1993**.
- [169] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [170] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [171] S. Bustin, "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays", *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, *25*, 169-193.
- [172] D. Peng, M. Razvi, H. Chen, K. Washington, A. Roessner, R. Schneider-Stock, W. El-Rifai, "DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class Glutathione-S-Transferases and Glutathione Peroxidases in Barrett's adenocarcinoma", *Gut* **2009**, *58*, 5-15.
- [173] K. Gross-Steinmeyer, P. L. Stapleton, F. Liu, J. H. Tracy, T. K. Bammler, S. D. Quigley, F. M. Farin, D. R. Buhler, S. H. Safe, S. C. Strom, D. L. Eaton, "Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes", *Xenobiotica* **2004**, *34*, 619-632.
- [174] S. T. C. Eey, M. J. Lear, "A Bismuth(III)-Catalyzed Friedel-Crafts Cyclization and Stereocontrolled Organocatalytic Approach to (-)-Platensimycin", *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5510-5513.

8 Anhang

8.1 Kristalldaten



Kristalldaten	Methyl 4-((2-[3-(4-Nitrophenyl)-1,2,4-trioxan-6-yl]acryloyl)oxy)benzoat 35c	
Formel	C ₂₀ H ₁₇ NO ₉	
Molmasse	415.35 g/mol	
Messtemperatur	100 K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Orthorhombisch	
Raumgruppe	Pbca	
Elementarzelle	a = 10.0669(5) Å	α = 90
	b = 9.2847(4) Å	β = 90°
	c = 40.516(2) Å	γ = 90°
Volumen	3787.0(3) Å ³	
Dichte	1.457 mg/m ³	
Kristallgröße	0.3 x 0.15 x .07 mm ³	
Zellbesetzung	8	
Absorptionskoeffizient	0.117 mm ⁻¹	
F(000)	1728	
Index-Bereich	-12 ≤ h ≤ 12, -11 ≤ k ≤ 11, -45 ≤ l ≤ 51	
Gemessene Reflexe	21648	
Unabhängige Reflexe	4125 [R(int) = 0.0503]	
Daten / Restraints / Parameter	4125 / 0 / 272	
Qualität des Modells bezüglich F²	1.035	
Finale R-Indizes [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0407, wR2 = 0.1045	
R-Indizes (Alle Daten)	R1 = 0.0746, wR2 = 0.1236	
Restelektronendichte	0.158 und -0.246 e.Å ⁻³	

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Axel G. Griesbeck betreut worden.

Maria Bräutigam

30. November 2015

Teilpublikationen:

"Synthetic Organic photochemistry – Grown up and applicable for life sciences" Axel G. Griesbeck, Maria Bräutigam, Sebastian Hanft, Margarethe Kleczka, Sabrina Molitor, Melissa Reckenthäler und Sarah Sillner, *European Photochemical Society Newsletter* **2013**, 12-22.

"Selective Inhibitors of Glutathione Transferase P1 with Trioxane Structure as Anti-cancer Agents" Maria Bräutigam, Nicole Teusch, Tobias Schenk, Miriam Sheikh, Rocky Z. Aricioglu, Swantje H. Borowski, Jörg-Martin Neudörfl, Ulrich Baumann, Axel G. Griesbeck und Markus Pietsch, *ChemMedChem* **2015**, 10, 629-639.

"Model studies on peroxidic glutathione transferase (GST) inhibitors: C5-methylated 1,2,4-trioxanes with C6-acrylate side chains" Axel G. Griesbeck, Andreas Maaßen, Maria Bräutigam und Markus Pietsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 4349-4352.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anschrift: Maria Bräutigam
Zülpicher Straße 58c
50674 Köln

Geburtsdatum 05. Oktober 1987

Geburtsort Dormagen, NRW

Familienstand ledig

Schulbildung

1993 – 1997 KGS Berrenrather Straße, Köln, NRW

1997 – 2006 Freiherr-vom-Stein-Gynasium, Rösrath, NRW

- Abschluss: Abitur

Akademischer Werdegang

10/2006 – 10/2008 Pharmaziestudentin an der Universität zu Düsseldorf

- Abschluss: 1. Staatsexamen

10/2008 – 10/2010 Pharmaziestudentin an der Universität zu Freiburg

- Abschluss: 2. Staatsexamen

11/2010 – 04/2011 Diplomarbeit bei European ScreeningPoint, Hamburg

- Abschluss: Diplom

Seit 06/2012 Doktorandin am Department für Chemie der Universität zu Köln, dem Institut für Pharmakologie der Uniklinik Köln und dem Institut für Angewandte Naturwissenschaften der Technischen Hochschule Köln und Mitglied im Graduiertenkolleg für Pharmakologie und angewandte Therapie der Uniklinik Köln und Bayer HealthCare

Studienbegleitende Praktika

05/2011 – 11/2011 Pharmaziepraktikantin in der Eichenblatt-Apotheke, Hamburg

- Abschluss: 3. Staatsexamen
- Approbation zur Apothekerin 2012

Konferenzteilnahmen

- | | |
|---------|--|
| 03/2014 | GdCH 24. Lecture Conference on Photochemistry, Köln <ul style="list-style-type: none">• Mitglied des Organisationskomitee |
| 05/2014 | GTC Europe Drug Discover Drug Summit, Berlin <ul style="list-style-type: none">• Freiwillige Helferin |
| 09/2014 | GdCh Frontiers in Medicinal Chemistry, Tübingen <ul style="list-style-type: none">• Poster Präsentation: Novel inhibitors of glutathione transferase P1 as anticancer agents |
| 12/2015 | PACIFICHEM, Honolulu, Hawaii <ul style="list-style-type: none">• Talk: Selective inhibitors of GSTP1 with 1,2,4-trioxane structure as anticancer agents |