

Modulierung der biologischen Eigenschaften von Aspirin durch Bildung eines Bioorganometallderivats**

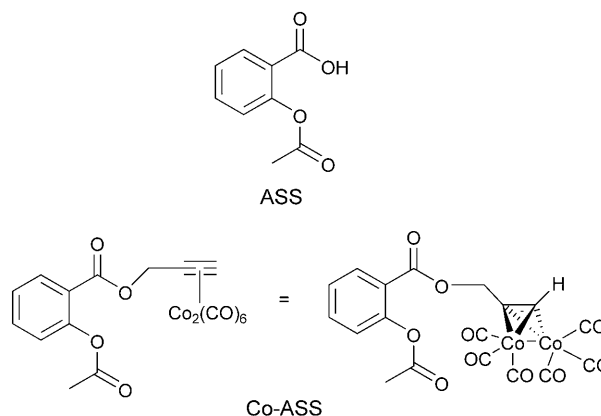
Ingo Ott,* Brigitte Kircher, Christoph P. Bagowski, Danielle H. W. Vlecken, Elisabeth B. Ott, Joanna Will, Kerstin Bendorf, William S. Sheldrick und Ronald Gust

Trotz beachtlicher Fortschritte in der modernen Chemotherapie von Tumoren herrscht nach wie vor ein großer Bedarf an innovativen Antitumorwirkstoffen (Zytostatika). Dies bewirkt ein immenses Interesse an neuen Strategien und Konzepten in der Entwicklung von Zytostatika.

Die meisten der heute verwendeten Arzneistoffe sind rein organische Verbindungen. Stimuliert durch den enormen Erfolg der anorganischen Verbindung Cisplatin in der Tumorthherapie ist jedoch in den letzten Jahren das Interesse an Metallkomplexen stetig gestiegen.^[1–5] Die Bioorganometallchemie ist ein aufstrebendes Forschungsfeld der medizinischen Chemie, das sich das ehrgeizige Ziel gesteckt hat, das therapeutische Potenzial metallorganischer Substanzen zu erkunden.^[6–9] Als Konsequenz unterschiedlicher Koordinationsgeometrien, chemischer Eigenschaften und Reaktivitäten bieten Metallkomplexe ein breites Spektrum an funktionellen Gruppen, die in der Wirkstoffentwicklung nahezu unerforscht sind.

Eine solche funktionelle Gruppe, für die vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer medizinischen Anwendung beschrieben wurden, ist das an Alkine koordinierte Hexacarbonyldicobalt-Fragment $\text{Co}_2(\text{CO})_6$.^[10] So fanden $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ -Derivate von Antiepileptika (z. B. Carbamazepin) als Diagnostika im Metallcarbonylimmunassay (carbonyl metallo immuno assay, CMIA) Verwendung, und Komplexe mit Fructopyranose-, Nucleosid- oder Neuropeptidliganden zeigten vielversprechende biologische Aktivitäten.^[11–14]

Wir identifizierten Alkin-Hexacarbonyldicobalt-Komplexe als stark zellwachstumshemmende Spezies.^[15] Interessanterweise hing die antiproliferative Aktivität der Verbindungen stark von der chemischen Struktur des jeweiligen Alkinliganden ab. Mehrere schwach aktive oder inaktive Komplexe verdeutlichten ferner, dass der Cobaltcluster keine unspezifischen toxischen Effekte hervorruft. In den folgenden Untersuchungen kristallisierte sich der $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ -Komplex eines Prop-2-ynyl-2-acetoxybenzoat-Liganden (Co-ASS), der wiederum ein Derivat von Aspirin (*o*-Acetylsalicylsäure, ASS) ist, als Leitstruktur für diese neue Klasse antiproliferativer Wirkstoffe heraus.



[*] Dr. I. Ott, K. Bendorf, Prof. Dr. R. Gust
Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2 + 4, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 308-385-6906
E-Mail: ottingo@zedat.fu-berlin.de

Dr. B. Kircher
Medizinische Universität Innsbruck, Immunobiologie und Stammzelllabor, Universitätsklinik für Innere Medizin V – Schwerpunkte Hämatologie und Onkologie
Anichstraße 35, 6020 Innsbruck (Österreich)
Prof. Dr. C. P. Bagowski, D. H. W. Vlecken, E. B. Ott
Institute of Biology, Department of Integrative Zoology
Universität Leiden, AL Leiden (Niederlande)

Dr. J. Will, Prof. Dr. W. S. Sheldrick
Lehrstuhl für Analytische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)

[**] Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung (Forschergruppe FOR-630) sowie Petra Schumacher, Heike Scheffler, Laura Bertola und Sander Griepma für die Durchführung von Experimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200803347> zu finden.

Erste Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus dieser Verbindung wiesen auf eine Hemmung der Cyclooxygenase-Enzyme COX-1 und COX-2 hin: Co-ASS hemmt die isolierten Enzyme COX-1 und COX-2 stärker als die Stammverbindung Aspirin. Eine bevorzugte Hemmung von COX-1, wie durch Aspirin, konnte bei dem Metallkomplex, der beide Isoenzyme etwa gleich stark hemmt, nicht beobachtet werden.^[16] Weitere Untersuchungen an humanen Blutplättchen bestätigten die Wirkung von Co-ASS an COX-1. Interessanterweise konnte aber keine Hemmung des verwandten Enzyms 12-LOX festgestellt werden.^[12]

Aspirin zählt zur Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), deren pharmakologische Effekte (analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch) auf der Hemmung von Cyclooxygenase-Enzymen beruhen. NSAR haben auch als neuartige Zytostatika Bedeutung gewonnen, zumal klinische Studien einen positiven Effekt für Krebspatienten belegten.^[17] Der exakte Mechanismus der Antitumorwirkung von NSAR wird jedoch noch kontrovers diskutiert.

In verschiedenen Tumorgeweben wird das Isoenzym COX-2 überexprimiert, und es werden erhöhte Spiegel der Cyclooxygenase-Produkte (Prostaglandine) detektiert. Ein Zusammenhang zwischen COX-2-Aktivität und Zellwachstumshemmung durch NSAR konnte jedoch bislang nicht bewiesen werden. Mehrere Prozesse, z. B. Apoptose, Angiogenese oder Wechselwirkungen mit Matrixmetalloproteinasen, die COX-unabhängig oder der COX-Aktivität nachgeschaltet sind, werden für die Erklärung der beobachteten Effekte in Betracht gezogen.^[18] Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht ein einzelner Mechanismus für die Antitumoraktivität von NSAR verantwortlich ist, sondern vermutlich mehrere pharmakologische Effekte involviert sind.

Im Folgenden präsentieren wir Ergebnisse zur Modulation tumorrelevanter biochemischer Eigenschaften von Aspirin durch die Derivatisierung als metallorganischer Hexacarbonyldicobalt-Komplex (Co-ASS). Um die Wirkung von Co-ASS und ASS auf die zelluläre Cyclooxygenase-Aktivität zu ermitteln, wurden die Spiegel des COX-Hauptmetaboliten Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie die COX-2-Genexpression in Arachidonsäure-stimulierten MDA-MB-231-Brustkrebszellen mithilfe von ELISA (enzyme-linked immunoabsorbant assay) bzw. Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) untersucht (Tabelle 1). Sowohl Co-ASS als auch ASS verringerten in der Konzentration von 10 µM die zelluläre PGE₂-Produktion signifikant (jeweils $p < 0.001$). Dies weist darauf hin, dass die Aktivität der Cyclooxygenasen von beiden Substanzen gehemmt wurde. Da bekannt ist, dass die verwendeten MDA-MB-231-Zellen nur niedrige Spiegel des konstitutiv exprimierten Isoenzym COX-1 aufweisen, jedoch über beträchtliche Mengen des induzierbaren Isoenzym COX-2 verfügen, kann die gedrosselte PGE₂-Produktion vorwiegend der Verringerung der COX-2-Aktivität zugeschrieben werden.^[19]

Die Genexpression von COX-2 wurde durch Co-ASS leicht vermindert ($p < 0.05$), mit Aspirin wurde jedoch ein geringer Anstieg beobachtet ($p < 0.05$ bei 1 µM). Somit könnte für beide Substanzen neben einer direkten Wechselwirkung mit dem Zielenzym auch eine Beeinflussung der Expression vorliegen.

Der Wirkungsmechanismus von Aspirin beruht auf der Acetylierung eines Serinrests im aktiven Zentrum von Cyclooxygenasen und der damit verbundenen Blockade der Oxidation des physiologischen Substrats Arachidonsäure. Um diese Wirkung auf COX-2 näher zu untersuchen, wurden nach Trypsin-verdau erhaltene Peptidfragmente von COX-2, die mit Aspirin oder Co-ASS inkubiert wurde, durch LC/ESI-Tandem-Massenspektrometrie analysiert.^[20] Zu Vergleichszwecken wurde das Enzym auch alleine untersucht. In Übereinstimmung mit Literaturberichten zum Wirkungsmechanismus wurde für ASS ausschließlich die Acetylierung von Ser516 beobachtet.^[21] Überraschenderweise acetylierte Co-ASS

Tabelle 1: Einfluss von Co-ASS und ASS auf verschiedene COX-relevante Parameter.^[a]

	PGE ₂	COX-2	Bcl-2	TGFα	IL-10	MMP-7
Co-ASS 1 µM	81 ± 30	73 ± 16	97 ± 1	82 ± 14	82 ± 17	77 ± 18
Co-ASS 10 µM	34 ± 14	79 ± 19	129 ± 49	83 ± 24	73 ± 16	53 ± 11
Aspirin 1 µM	60 ± 27	125 ± 12	135 ± 55	93 ± 14	90 ± 8	86 ± 14
Aspirin 10 µM	44 ± 29	122 ± 23	127 ± 23	87 ± 26	83 ± 7	73 ± 12

[a] Nach 24 h Exposition. Die Werte sind als Prozentsatz der jeweiligen unbehandelten Kontrollen ± Standardfehler angegeben.

diese Seitenkette nicht. Statt dessen wurde eine Acetylierung der Lysinreste 166, 346, 432 und 598 detektiert (siehe Abbildung 1 und Tabelle 2), was durch die hoch signifikanten SEQUEST-Parameter ($X_{\text{corr}} \geq 3.13$, $\Delta C_n \geq 0.65$, beobachtete/erwartete Ionen $\geq 57\%$, siehe Tabelle 2) bestätigt wird.^[22] Die

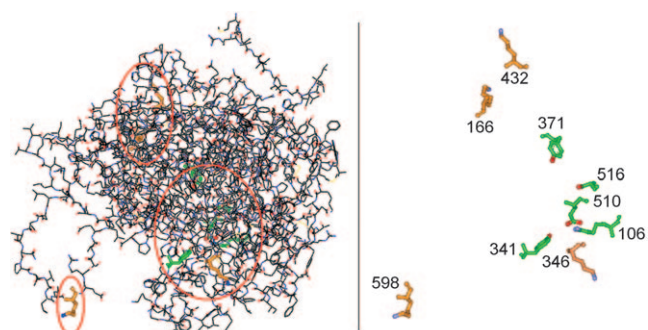


Abbildung 1. Bindung von Co-ASS an COX-2. Die Kohlenstoffatome für die katalytische Aktivität oder Acetylierung durch Co-ASS relevanter Aminosäurereste sind farbig dargestellt (katalytische Aktivität: grün, Co-ASS Acetylierung: orange). Links: Modell von humaner COX-2, Vollansicht; rechts: Vergrößerung relevanter Aminosäurereste (andere Aminosäureseitenketten und das Proteingrundgerüst sind nicht abgebildet, die Hämgruppe des aktiven Zentrums ist im verwendeten Modell nicht enthalten). Die Abbildungen wurden mit ViewerLight 4.2 (Accelrys) auf der Grundlage des RCSB-Proteindatenbankeintrags 1v0x^[31] (www.pdb.org) erstellt.

Tabelle 2: Acetylierungsstellen (@) in COX-2, ermittelt durch ESI-Tandem-Massenspektrometrie.

Peptidsequenz	Stelle	Ladung	SEQUEST-Parameter			Ionen ^[a]
			X_{corr}	ΔC_n	Sp	
COX-2 + Aspirin						
K.PRPDAIFGETMVEVGAPFS@LK.G	S516	3	4.75	0.73	1257.9	32/80
COX-2 + Co-ASS						
K.QLPDSNIVEIK@LLLR.R	K166	2	4.80	0.79	1284.7	21/28
L.PDSNIVEIK@LLLR.R	K166	2	3.13	0.75	1253.7	17/24
K.LK@FDELLFNK.Q	K346	2	3.80	0.65	658.2	15/20
V.PPAVQK@VSQASIDQSR.Q	K432	2	3.13	0.72	771.6	17/30
R.SGLDDINPTVLLK@ER.S	K598	2	4.27	0.70	822.7	18/28

[a] Beobachtete/mögliche b⁺- und y⁺-Ionen, die durch Spaltung von Peptidbindungen C(O)-N(H) entstehen.^[32]

genannten Lysinreste waren weder in unbehandelter COX-2 noch nach Inkubation mit ASS acetyliert.

Von den beobachteten Acetylierungsstellen ist Lys346 nahe dem Eingangskanal zum aktiven Zentrum des Enzyms gelegen. Der Abstand des Seitenketten-Stickstoffatoms von Lys346 zu den Seitenketten-Stickstoffatomen von Arg106, das zusammen mit Arg499 und Glu510 einen Eingangskanal zur Bindestelle bildet, beträgt lediglich 16.5 Å. Während Lys589 relativ weit vom aktiven Zentrum entfernt ist, befinden sich Lys166 und Lys432 nahe bei einer über Tyr371 gelegenen Hämgruppe. Tyr371 wiederum ist am Elektronentransfer zwischen dem physiologischen Substrat Arachidonsäure und der Hämgruppe beteiligt.

In Analogie zur etablierten pharmakologischen Wirkung von Aspirin (Acetylierung von Ser516 des Enzyms) weisen diese Ergebnisse nun darauf hin, dass die Wirkung von Co-ASS auf der Acetylierung mehrerer Lysinseitenketten beruhen könnte. Vermutlich dürfte dabei eine Blockade des Eingangs zum aktiven Zentrum, wie sie auch von anderen NSAR bekannt ist, oder eine Wechselwirkung mit dem Elektronentransfermechanismus des Enzyms von hoher Relevanz sein.^[21] In diesem Zusammenhang sollte auch darauf hingewiesen werden, dass die kovalenten Modifikationen vermutlich zu einer irreversiblen Hemmung der Enzymfunktion führen dürften, wie es auch bei der Wechselwirkung von ASS mit Cyclooxygenasen der Fall ist.

Viele der COX-2-Aktivität nachgeschaltete oder von ihr unabhängige NSAR-Effekte sind für die Antitumorwirksamkeit von NSAR von großer Bedeutung. Darunter spielen vor allem die Regulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, von Caspasen, des Tumorstoffwechsels TGF α (tumor growth factor α), von Interleukin-10 (IL-10) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine tragende Rolle.^[18]

Wir konnten keinen signifikanten Einfluss von Co-ASS und ASS auf den Bcl-2- und TGF α -Stoffwechsel feststellen. Durch Inkubation mit 10 μ M beider Wirkstoffe wurden jedoch die IL-10-Spiegel etwas gesenkt ($p < 0.05$). Interessanterweise wurde die Caspase-3-Aktivität durch Co-ASS drastisch gesteigert, während ASS in denselben Konzentrationen keine Wirkung zeigte (siehe Abbildung 2). Vermutlich sind somit auf Caspaseaktivierung beruhende (aber vom Bcl-

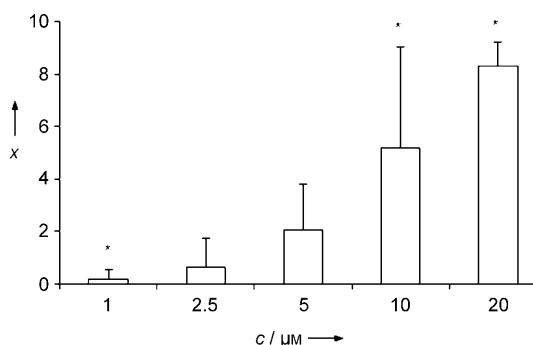


Abbildung 2. Einfluss von Co-ASS auf die Aktivität von Caspase-3 nach 24 h in MDA-MB-231-Zellen. Die x-fache Induktion der Caspaseaktivität behandelter Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur ist wiedergegeben ($n = 3$). n = Zahl der Versuche.

2-Stoffwechsel unabhängige) Apoptoseereignisse für die biologische Aktivität des CO₂(CO)₆-Komplexes relevant.

Beide Substanzen verminderten signifikant die Spiegel von MMP-7, wobei die Wirkung für Co-ASS deutlicher ausgeprägt war als für ASS ($p < 0.05$ für Co-ASS in beiden Konzentrationen und $p < 0.05$ für ASS bei 10 μ M). Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, zumal MMP-7 relevant für die Metastasierung von Gastrointestinal- und Endometriumskarzinomen ist.^[23] Der Einfluss von NSAR auf die Metastasierung und Blutgefäßneubildung von Tumoren ist hinlänglich bekannt, und antiangiogene Effekte diverser NSAR wurden beschrieben. PGE₂ gilt als wichtiger Botenstoff, der die Angiogenese reguliert, und die Hemmung seiner Entstehung wurde mit antiangiogenen Effekten in Verbindung gebracht.^[18]

Um die Hemmung der Angiogenese durch Co-ASS und ASS eingehender zu untersuchen, wählten wir den Zebrafisch (*Danio rerio*), da dieser etablierte Modellorganismus ideale Voraussetzungen zur Analyse der Angiogenese und der Gefäßentwicklung in vivo bietet (Abbildung 3).^[24,25] Die geringe

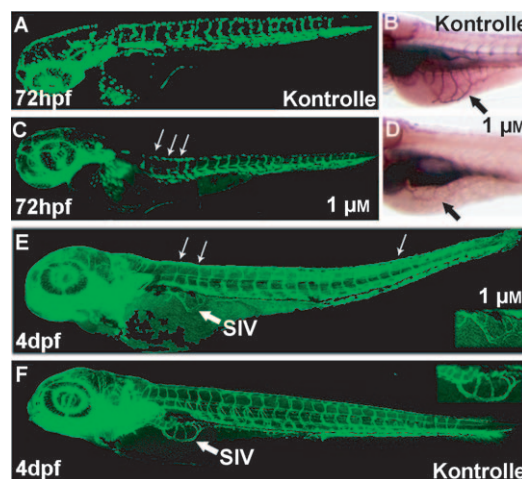


Abbildung 3. Auswirkung von Co-ASS auf die Blutgefäßneubildung in Zebrafischembryos. Laterale Ansicht von Embryos 72 h nach der Befruchtung (72 hpf; hours post fertilization) und 4 Tage nach der Befruchtung (4 dpf; days post fertilization) sind abgebildet. A) unbehandelter Kontrollembryo 72 hpf, C) Co-ASS behandelter Embryo. B, D) Nahansichten der Blutgefäße nach Alkalische-Phosphatase-Färbung im Kontrollembryo (B) und im Co-ASS-behandelten Embryo (D). E, F) Kontrollembryo (E) und Co-ASS behandelter Embryo 4 dpf (F); der Einschub zeigt die subintestinale Vene, dünne weiße Pfeile kennzeichnen die beschädigten oder fehlenden dorsalen longitudinalen anastomotischen Gefäße (DLAV); ASS (1 μ M) wurde als Kontrolle verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen von Tg:flil1/eGFP-Zebrafischen (A, C, E und F) wurden mit konfokaler Lasermikroskopie erhalten. Die Embryos in (B) und (D) wurden nach Alkalische-Phosphatase-Färbung stereomikroskopisch untersucht. Siehe die Hintergrundinformationen für Details.

Größe, die Fruchtbarkeit, die Entwicklung außerhalb des Mutterleibs und die optische Transparenz des Embryos sind große Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen. Zur Beobachtung der Gefäßentwicklung ist ein Albino-Stamm besonders gut geeignet. Da der Embryo sehr klein ist, kann er genug Sauerstoff durch passive Diffusion erhalten, sodass

seine Entwicklung über mehrere Tage ohne jegliche Blutzirkulation beobachtet werden kann. Neben diesen Vorteilen ist die Gefäßanatomie des sich entwickelnden Zebrafischs ausgezeichnet dokumentiert.^[26]

Cyclooxygenasen werden im sich entwickelnden Zebrafisch exprimiert, und die Relevanz dieser Enzyme für die Gefäßbildung wurde beschrieben.^[27–29] Wir behandelten Zebrafischembryos und Zebrafischlarven mit Co-ASS oder ASS und erfassten die Effekte mit zwei unabhängigen Methoden: Die Methode 1 beruht auf der fehlenden Pigmentierung der Albino-Zebrafischembryos. Die Gefäßentwicklung kann hier durch Alkalische-Phosphatase-Färbung und Stereomikroskopie sichtbar gemacht werden.^[24] Bei Methode 2 wird die transgene Zebrafischlinie Tg:flil1/eGFP verwendet, die im Unterschied zu Methode 1 eine Beobachtung der Angiogenese in Echtzeit ermöglicht.^[25] Tg:flil1/eGFP-Embryos und Larven exprimieren das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP) unter Kontrolle eines frühen endothelialen Promotors und weisen somit ein grün fluoreszierendes Gefäßsystem auf, das mit konfokaler Lasermikroskopie oder hochauflösender Stereo fluoreszenzmikroskopie untersucht werden kann.

Unsere Daten zeigen, dass die mit Co-ASS behandelten Embryos schwere Defekte in der Vaskularisierung und Angiogenese aufweisen (verminderte Ausbildung oder Fehlen von intersegmentalen Gefäßen und dorsalen longitudinalen anastomotischen Gefäßen (DLAVs) sowie reduzierten subintestinalen Venen). Somit fehlten mehrere Gefäße bei den mit Co-ASS behandelten Zebrafischembryos, jedoch nicht in der Kontrollgruppe. Detaillierte Angaben zu den beobachteten Gefäßschäden und zur Gefäßanatomie des Zebrafisches finden sich in den Hintergrundinformationen. Im Unterschied zu Co-ASS zeigte Aspirin in den gleichen Konzentrationen keine nennenswerten Effekte.

Die Modifizierung als metallorganisches Derivat führte zu einer signifikanten Modulierung der biologischen Eigenschaften des etablierten NSAR Aspirin. Während grundlegende pharmakologische Effekte (z.B. die Reduzierung der zellulären PGE₂-Produktion) im Wesentlichen unverändert blieben, wurden mehrere der COX-Aktivität nachgeschaltete oder von ihr unabhängige Stoffwechselwege signifikant beeinflusst. So hemmt das metallorganische Derivat zusätzlich die Angiogenese (nachgewiesen durch die verminderte Blutgefäßneubildung im sich entwickelnden Zebrafischembryo), es vermindert die Spiegel von MMP-7 stärker als ASS, und es induziert die Caspase-3-Aktivität drastisch.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass antiangiogene und antimetastatische Eigenschaften auch bei anderen Metallkomplexen festgestellt wurden (etwa bei dem Rutheniumkomplex NAMI-A, der zurzeit klinische Tests durchläuft). Solche Komplexe weisen ein hohes Potenzial für die Entwicklung von neuartigen Medikamenten auf, die Tumore durch Störung der Nährstoffzufuhr aushungern könnten.^[30] Es kann vermutet werden, dass die beobachteten COX-unabhängigen Effekte auch für andere Co₂(CO)₆-Derivate, für die schon antiproliferative Effekte beschrieben wurden, zutreffen könnten.^[12–14]

Die unterschiedlichen pharmakologischen Merkmale von Co-ASS und ASS könnten die Folge einer veränderten

Wechselwirkung mit dem Zielenzym COX-2 sein, das von Co-ASS an mehreren Lysinseitenketten acetyliert wird. Von den beobachteten Acetylierungsstellen dürfte Lys346 für die Enzyminhibition am wichtigsten sein.

Die hier präsentierten Ergebnisse illustrieren ein wichtiges Konzept der Wirkstoffentwicklung in der medizinischen Bioorganometallchemie: Pharmakologische Eigenschaften etablierter Wirkstoffe können durch eine veränderte Rezeptorwechselwirkung moduliert werden, die wiederum die Folge des Vorliegens eines metallorganischen Fragments ist.

Eingegangen am 10. Juli 2008,

veränderte Fassung am 16. Oktober 2008

Online veröffentlicht am 29. Dezember 2008

Stichwörter: Angiogenese · Aspirin · Bioorganometallchemie · Cobalt · Cyclooxygenase

- [1] E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 287–292.
- [2] P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 197–206.
- [3] T. W. Hambley, *Science* **2007**, *318*, 1392–1393.
- [4] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Dalton Trans.* **2008**, 183–194.
- [5] I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 117–126.
- [6] U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1534–1537; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504–1507.
- [7] „Medicinal Organometallic Chemistry“: G. Jaouen, P. J. Dyson in *Comprehensive Organometallic Chemistry III*, Vol. 12 (Hrsg.: D. O'Hare), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 445–464.
- [8] „Bioorganometallic Chemistry“: N. Metzler-Nolte in *Comprehensive Organometallic Chemistry III*, Vol. 1 (Hrsg.: G. Parkin), Elsevier, Amsterdam, **2006**, S. 883–920.
- [9] N. Metzler-Nolte, *Chimia* **2007**, *61*, 736–741.
- [10] I. Ott, B. Kircher, R. Dembinski, R. Gust, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2008**, *18*, 327–337.
- [11] A. Varenne, A. Vessieres, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1995**, *186*, 195–204.
- [12] I. Ott, T. Koch, H. Shorafa, Z. Bai, D. Poeckel, D. Steinhilber, R. Gust, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2282–2286.
- [13] C. D. Sergeant, I. Ott, A. Sniady, S. Meneni, R. Gust, A. L. Rheingold, R. Dembinski, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 73–80.
- [14] M. A. Neukamm, A. Pinto, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **2008**, 232–234.
- [15] K. Schmidt, M. Jung, R. Keilitz, B. Schnurr, R. Gust, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 6–16.
- [16] I. Ott, B. Kircher, P. Schumacher, K. Schmidt, T. Wiglenda, R. Gust, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 622–629.
- [17] C. M. Ulrich, J. Bigler, J. D. Potter, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 130–140.
- [18] J. B. Meric, S. Rottey, K. Olaussen, J. C. Soria, D. Khayat, O. Rixe, J. P. Spano, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2006**, *59*, 51–64.
- [19] X. H. Liu, D. P. Rose, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5125–5127.
- [20] D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683–5690.
- [21] A. L. Blobaum, L. J. Marnett, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1425–1441.
- [22] D. L. Tab, J. K. Eng, J. R. Yates in *Proteome Research: Mass Spectrometry* (Hrsg.: P. James), Springer, Heidelberg, **2001**, S. 125–142.
- [23] T. Shiomi, Y. Okada, *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 145–152.
- [24] H. Habeck, J. Odenthal, B. Walderich, H. Maischein, S. Schulte-Merker, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1405–1412.

- [25] N. D. Lawson, B. M. Weinstein, *Dev. Biol.* **2002**, 248, 307–318.
 - [26] S. Isogai, M. Horiguchi, B. M. Weinstein, *Dev. Biol.* **2001**, 230, 278–301.
 - [27] T. Grosser, S. Yussuff, E. Cheskis, M. A. Pack, G. A. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 8418–8423.
 - [28] Y. I. Cha, L. Solnica-Krezel, R. N. Dubois, *Dev. Biol.* **2006**, 289, 263–272.
 - [29] Y. I. Cha, S. H. Kim, L. Solnica-Krezel, R. N. Dubois, *Dev. Biol.* **2005**, 282, 274–283.
 - [30] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 993–998.
 - [31] S. Mahanta, P. K. Sarma, A. K. Buragohain, RCSB-Proteindatenbank (www.pdb.org, Nr. 1v0x).
 - [32] P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, 11, 601.
-