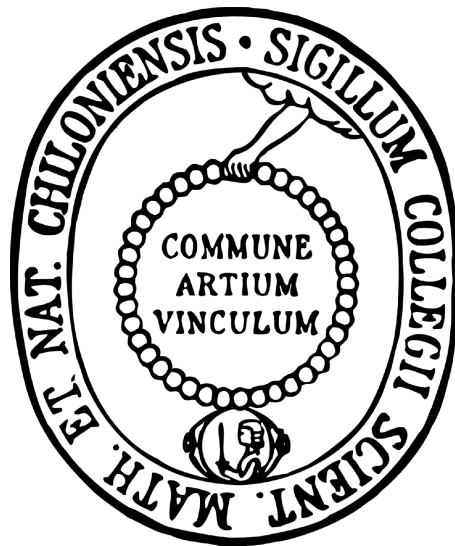


Neue Modulatoren des NO-generierenden Systems



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Nikola Klein
Kiel 2010

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Januar 2010

Zum Druck genehmigt:

21. Januar 2010

Prof. Dr. Lutz Kipp

(Dekan)

Für Stefan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Verzeichnis getesteter Verbindungen	XI

1 Einleitung

1.1	Stickstoffmonoxid (NO).....	1
1.2	Enzymatische Beeinflussung der NO-Konzentration	2
1.2.1	NO-Synthasen (NOS).....	3
1.2.1.1	Aufbau und Funktion.....	3
1.2.1.2	Neuronale NOS (nNOS)	7
1.2.1.3	Endotheliale NOS (eNOS)	8
1.2.1.4	Induzierbare NOS (iNOS).....	9
1.2.1.5	Elektronentransfer durch die NOS	10
1.2.2	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)	11
1.2.3	Arginase.....	12
1.3	Therapeutische Beeinflussung des NO-generierenden Systems	13
1.3.1	Modulatoren der NO-Synthase	13
1.3.1.1	Substrate für die NO-Synthase.....	13
1.3.1.2	Inhibitoren der NOS	15
1.3.2	Modulatoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)	18
1.3.2.1	Aktivatoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH).....	18
1.3.2.2	Inhibitoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase.....	18
1.3.3	Inhibitoren der Arginase	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit	20

2 *In vitro* Biotransformation von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

2.1	Einleitung.....	23
-----	-----------------	----

2.1.1	NO-defiziente Erkrankungen	23
2.1.2	NO-Donoren	24
2.1.2.1	L-Arginin als NO-Donor	25
2.1.2.2	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin als NO-Donor	28
2.1.2.3	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs	29
2.2	Material und Methoden	32
2.2.1	Material	32
2.2.1.1	Chemikalien	32
2.2.1.2	Geräte	32
2.2.1.3	Enzyme	32
2.2.1.3.1	Gewinnung von Schweinelebermikrosomen	33
2.2.1.3.2	Gewinnung von Schweinelebermitochondrien	33
2.2.1.3.3	Isolierung der mikrosomalen NADH Cytochrom b ₅ Reduktase	34
2.2.1.3.4	Isolierung des mikrosomalen Cytochrom b ₅	34
2.2.1.3.5	Gewinnung der äußeren Mitochondrienmembran (OMV)	34
2.2.1.3.6	Gewinnung der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente (mARC)	34
2.2.1.3.7	Gewinnung von humanem Plasma	35
2.2.1.4	Charakterisierung der Enzympräparationen	35
2.2.1.4.1	Bestimmung des Proteingehaltes	35
2.2.1.4.2	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes	35
2.2.1.4.3	Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Gehaltes	35
2.2.2	Analytische Methoden	36
2.2.2.1	HPLC-Analytik der NOHA-Derivate	36
2.2.2.2	HPLC-Analytik von <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -ethoxycarbonyl- <i>N''</i> -[β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]- guanidin	37
2.2.2.3	LC/MS-Analytik	38
2.2.2.4	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methoden	40
2.2.2.5	Stabilitätsprüfung	40
2.2.2.5.1	pH-Stabilität	40
2.2.2.5.2	Oxidative Stabilität	41
2.2.2.6	Inkubation mit unspezifischer Carboxylesterase	41
2.2.2.7	Inkubation mit humanem Plasma	42

2.2.2.8	Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien	42
2.2.2.9	Inkubation mit porciner OMV	42
2.2.2.10	Inkubation mit mARC	43
2.2.2.11	Inkubation von <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -ethoxycarbonyl- <i>N''</i> -[β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]- guanidin mit porciner Carboxylesterase und β -Galactosidase	43
2.2.2.12	Charakterisierung der entstandenen D-Galactose mit Hilfe der Galactose- Dehydrogenase	43
2.3	Ergebnisse und Diskussion	45
2.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methoden.....	45
2.3.2	Stabilitätsprüfung	46
2.3.2.1	pH-Stabilität	46
2.3.2.2	Oxidative Stabilität	51
2.3.3	Inkubation mit porciner Carboxylesterase.....	56
2.3.4	Inkubation mit humanem Plasma	60
2.3.5	Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien	60
2.3.6	Inkubation mit porciner OMV	65
2.3.7	Inkubation mit mARC	65
2.3.8	Inkubation von <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -ethoxycarbonyl- <i>N''</i> -[β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]- guanidin mit porciner Carboxylesterase und β -Galactosidase	66
2.4	Zusammenfassung und Ausblick	68

3 Untersuchung von Inhibitoren der humanen DDAH-1 auf NO-Synthase- hemmende Eigenschaften

3.1	Einleitung und Zielsetzung	72
3.2	Material und Methoden	74
3.2.1	Material	74
3.2.1.1	Chemikalien.....	74
3.2.1.2	Geräte.....	75
3.2.1.3	Enzyme	75
3.2.2	Methoden.....	75

3.2.2.1	Oxyhämoglobin Assay	75
3.2.2.1.1	Herstellung der Oxyhämoglobin-Lösung	75
3.2.2.1.2	Durchführung des Oxyhämoglobin Assays	76
3.2.2.2	Hemmstudien mit humaner DDAH-1	77
3.2.2.3	Erstellung der Modelle des aktiven Zentrums der NOS.....	77
3.3	Ergebnisse und Diskussion	78
3.3.1	N^{δ} -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin (NIO)-Derivate und N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin (NIL).....	78
3.3.2	N^{ω} -substituierte L-Arginin-Derivate	85
3.3.3	N -(2-Methoxyethyl)guanidine.....	89
3.3.4	N -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin	96
3.4	Zusammenfassung und Ausblick	99

4 Charakterisierung der Zersetzung von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP)

4.1	Einleitung und Zielsetzung	102
4.2	Material und Methoden	104
4.2.1	Material	104
4.2.1.1	Chemikalien.....	104
4.2.1.2	Geräte.....	104
4.2.1.3	Synthese von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP)	105
4.2.2	Methoden.....	105
4.2.2.1	Stabilitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie	105
4.2.2.2	Bestimmung der Zersetzungsgeschwindigkeit über HPLC.....	105
4.2.2.3	Strukturaufklärung des Zersetzungsproduktes mittels LC/MS.....	107
4.2.2.4	Isolierung des Zersetzungsproduktes	108
4.3	Ergebnisse und Diskussion	109
4.3.1	Stabilitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie	109
4.3.2	Bestimmung der Zersetzungsgeschwindigkeit über HPLC.....	109
4.3.3	Strukturaufklärung des Zersetzungsproduktes mittels LC/MS-Kopplung.....	110

4.3.4	Isolierung des Zersetzungsproduktes mittels Chromatographie über Kieselgel	113
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	114

5 Hemmung der NO-Synthase (NOS) durch 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB)

5.1	Einleitung und Zielsetzung	116
5.1.1	Oxyhämoglobin Assay	118
5.1.2	Microperoxidase 8 Assay.....	118
5.1.3	Cytochrom <i>c</i> Assay	119
5.1.4	Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS.....	119
5.1.5	Verbrauch von NADPH	120
5.1.6	Calcineurin Assay.....	120
5.1.7	Calmodulin-Bindungsstudie mittels Dansyl-Calmodulin.....	121
5.2	Material und Methoden	122
5.2.1	Material	122
5.2.1.1	Chemikalien.....	122
5.2.1.2	Geräte.....	122
5.2.1.3	Enzyme	123
5.2.2	Methoden.....	123
5.2.3	Synthese von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon	123
5.2.3.1	Zwischenprodukt (4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon).....	123
5.2.3.2	Endprodukt (4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid) .	123
5.2.4	Durchführung des Oxyhämoglobin Assays.....	124
5.2.5	Durchführung des Microperoxidase 8 Assays.....	125
5.2.6	Cytochrom <i>c</i> Assay	125
5.2.6.1	Durchführung des Cytochrom <i>c</i> Assays.....	125
5.2.6.2	Untersuchung des Hemm-Mechanismus mit Hilfe des Cytochrom <i>c</i> Assays	126
5.2.7	Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS.....	127
5.2.8	Bestimmung der NADPH-Oxidations-Aktivität der nNOS	127
5.2.9	Calcineurin Assay.....	128

5.2.10	Calmodulin-Bindungsstudien mittels Dansyl-Calmodulin.....	129
5.2.10.1	Herstellung von Dansyl-Calmodulin.....	129
5.2.10.2	Fluorimetrische Detektion der Interaktion zwischen BDAB und Dansyl-Calmodulin...	129
5.3	Ergebnisse und Diskussion.....	130
5.3.1	Oxyhämoglobin Assay	130
5.3.2	Microperoxidase 8 Assay.....	136
5.3.3	Cytochrom <i>c</i> Assay	138
5.3.3.1	Durchführung des Cytochrom <i>c</i> Assays.....	138
5.3.3.2	Untersuchung des Hemm-Mechanismus mit Hilfe des Cytochrom <i>c</i> Assays	143
5.3.4	Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS.....	144
5.3.5	Verbrauch von NADPH	146
5.3.6	Calcineurin Assay.....	147
5.3.7	Bestimmung der Interaktion zwischen BDAB und Calmodulin mittels Dansyl- Calmodulin.....	148
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	151

6 Neue Butyrophenone mit potentieller neuroleptischer Wirksamkeit

6.1	Einleitung und Zielsetzung.....	155
6.1.1	Schizophrenie	156
6.1.2	Neurochemische Hypothesen	157
6.1.3	Bekannte Neuroleptika	160
6.2	Material und Methoden	162
6.2.1	Material	162
6.2.1.1	Chemikalien.....	162
6.2.1.2	Geräte.....	162
6.2.2	Methoden.....	163
6.2.2.1	4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon (BPPB)	163
6.2.2.2	4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(<i>p</i> -chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]butyrophenon (BCHB)	164

6.2.2.3	Stabilitätsprüfung.....	166
6.2.2.4	HPLC-Methode zur Überprüfung der Stabilität.....	166
6.2.2.5	Rezeptorbindungsstudie	166
6.3	Ergebnisse und Diskussion.....	167
6.3.1	Synthese	167
6.3.1.1	Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon (BPPB)	167
6.3.1.2	Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4(p-chlorphenyl)-4-hydroxy-piperidinyll]- butyrophenon (BCHB)	168
6.3.2	Testung von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB).....	168
6.3.3	Stabilitätsuntersuchung	172
6.3.4	Rezeptorbindungsstudie	172
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	176

7 Zusammenfassung und Ausblick

8 Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

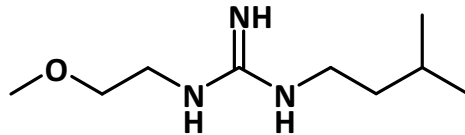
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA)
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
ber.	berechnet
CaM	Calmodulin
CAT-1	<i>cationic amino acid transporter-1</i>
$CDCl_3$	deuteriertes Chloroform
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CYP450	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminotransferase
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMF	Dimethylformamid
$DMSO-d_6$	vollständig deuteriertes Dimethylsulfoxid
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrapyramidalmotorische Störungen
ESI	Elektrosprayionisierung
Et	Ethyl-
FAD	Flavinadenindinukleotid

FMN	Flavinmononukleotid
gef.	gefunden
GTP	Guanosintriphosphat
H ₄ B	Tetrahydrobiopterin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP 90	<i>heat shock protein 90</i>
IC ₅₀	Konzentration für eine halbmaximale Hemmung
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel
L-Arg	L-Arginin
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (<i>mitochondrial amidoxime reducing component</i>)
MDR	<i>multi drug resistance</i>
MHz	Megahertz
MP8	Microperoxidase 8
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMMA	<i>N</i> ^ω -Monomethyl-L-arginin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOHA	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin

NO	<i>nitric oxide</i>
NOS	NO-Synthase
OMV	Äußere Mitochondrienmembran (<i>outer membrane vesicles</i>)
<i>o</i> -Pa	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDMA	symmetrisches $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin
SLMs	Schweinelebermikrosomen
SLMt	Schweinelebermitochondrien
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ν [cm^{-1}]	Wellenzahl

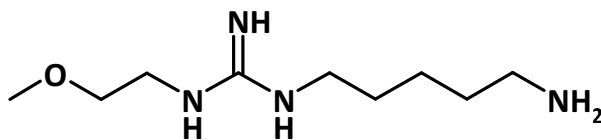
Verzeichnis getesteter Verbindungen

3-MeBuMEG



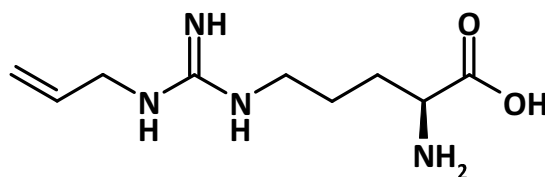
N-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(3-methylbutyl)guanidin

AbMEG



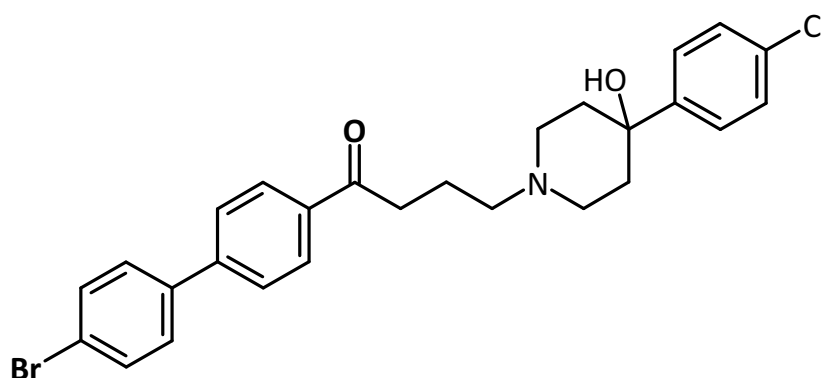
N-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin

Allyl-Arg



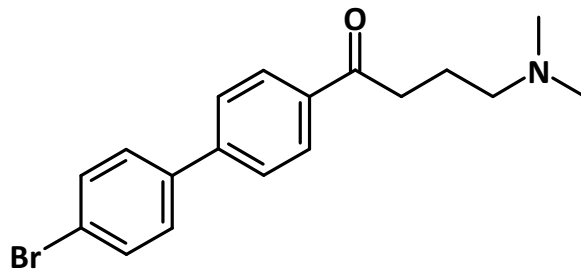
N^ω-Allyl-L-arginin

BCHB



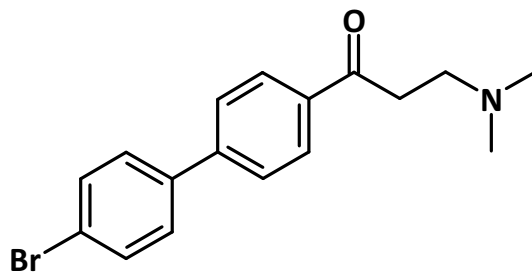
4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidiny]-butyrophenon

BDAB



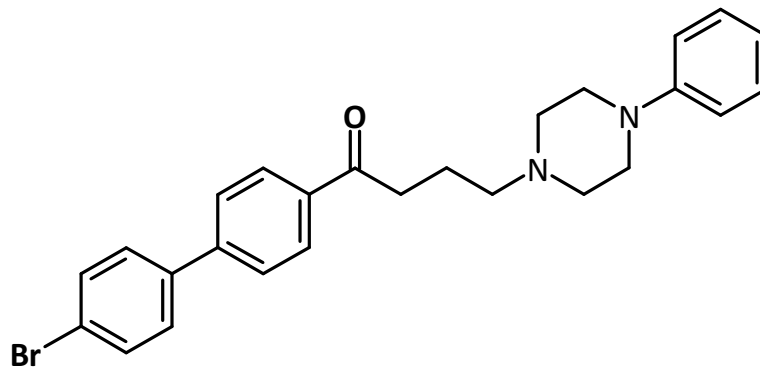
4'-(4-Bromophenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon

BDAP



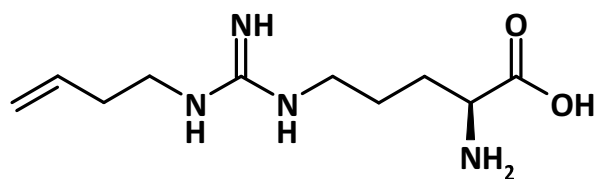
4'-(4-Bromophenyl)-3-dimethylaminopropiophenon

BPPB



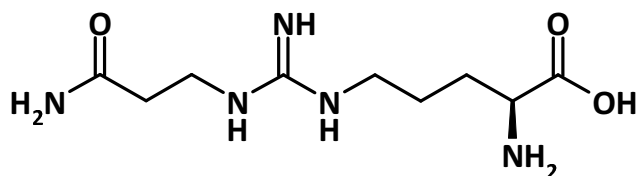
4'-(4''-Bromophenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon

Butenyl-Arg



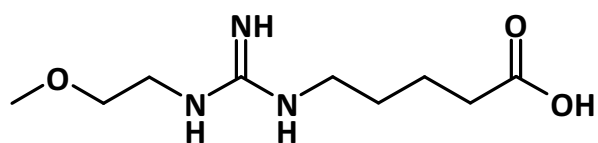
N^{ω} -(But-3-enyl)-L-arginin

Carb-Arg



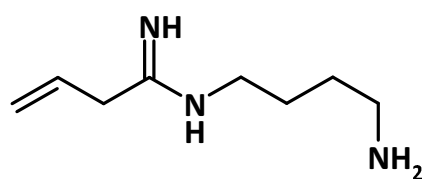
N^{ω} -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin

CbMEG



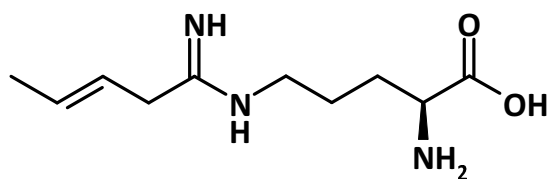
N -(4-Carboxybutyl)- N' -(2-methoxyethyl)guanidin

decVNIO



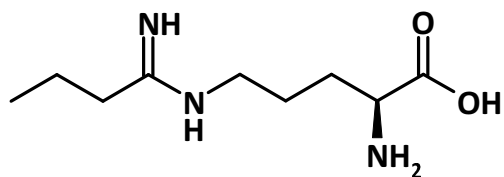
N -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin

ENIPO



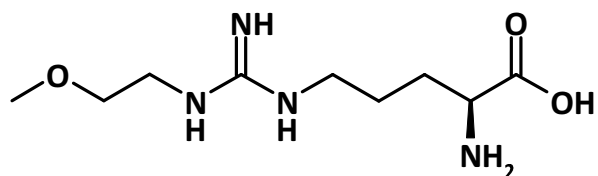
N^{δ} -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin

Ethyl-NIO



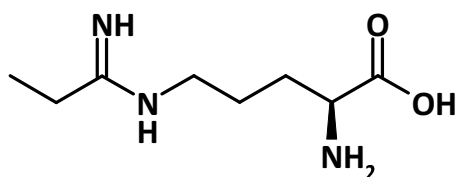
N^δ-(1-Iminobutyl)-L-ornithin

L-257



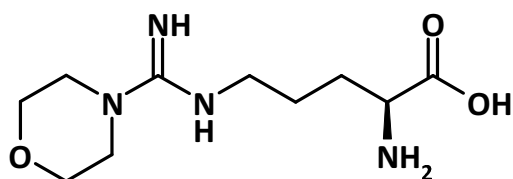
N^ω-(2-Methoxyethyl)-L-arginin

Methyl-NIO



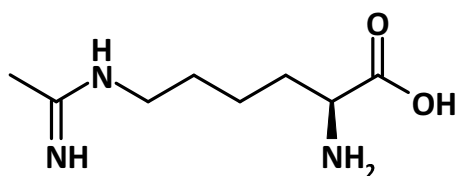
N^δ-(1-Iminopropyl)-L-ornithin

MO-Arg



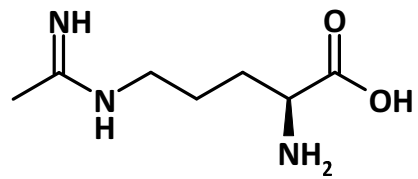
N^δ-[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin

NIL



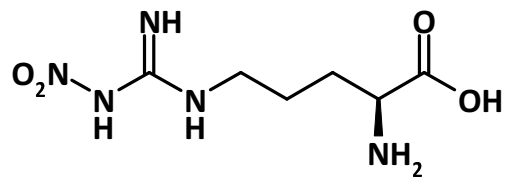
N^ε-(1-Iminoethyl)-L-lysin

NIO



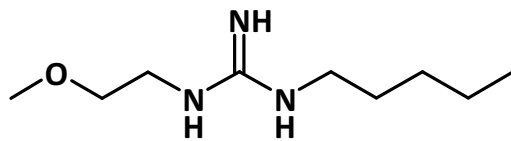
N^δ-(1-Iminoethyl)-L-ornithin

Nitro-Arg



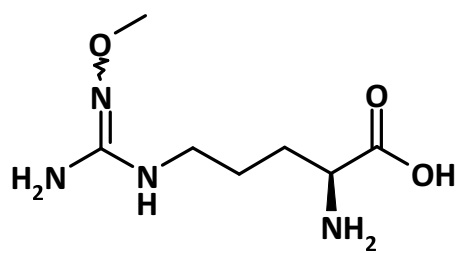
N^ω-Nitro-L-arginin

PenMEG



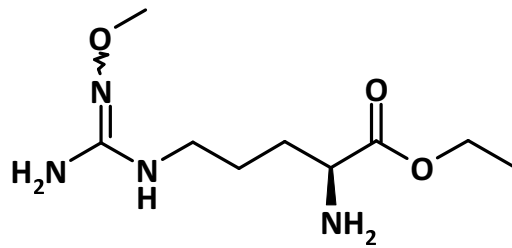
N-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(n-pentyl)guanidin

Prodrug 1



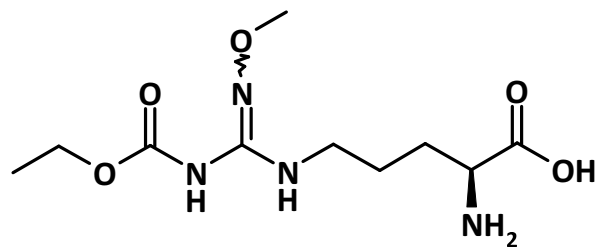
N^ω-Methoxy-L-arginin

Prodrug 2



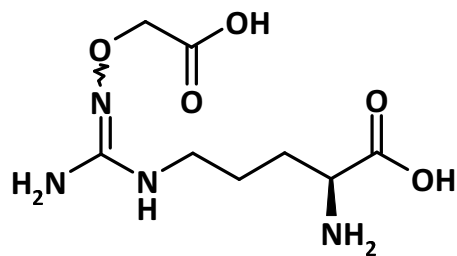
N^{ω} -Methoxy-L-arginin-ethylester

Prodrug 3



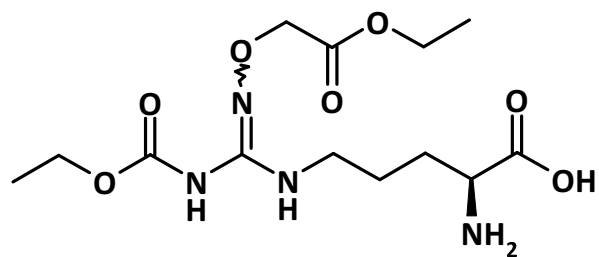
N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega1}$ -methoxy-L-arginin

Prodrug 4



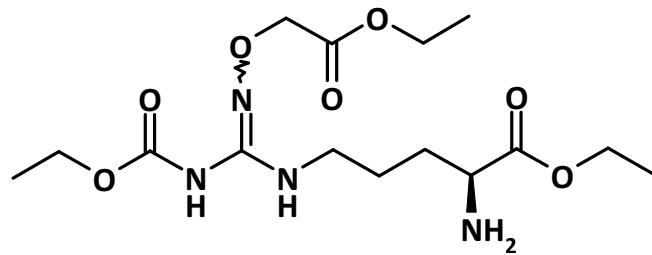
N^{ω} -Carboxymethoxy-L-arginin

Prodrug 5



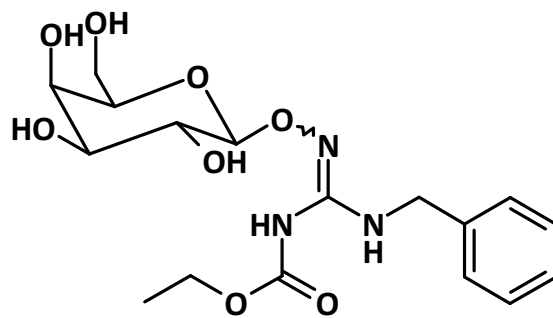
N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega1}$ -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin

Prodrug 6



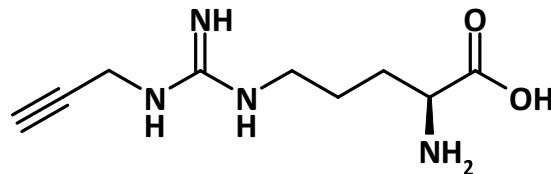
N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(ethoxycarbonyl)methoxy-L-arginin-ethylester

Prodrug 7



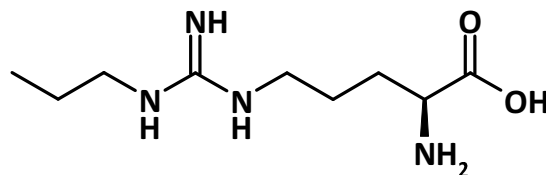
N -Benzyl- N' -ethoxycarbonyl- N'' -[β -D-galactopyranos-1-yl]oxy]-guanidin

Propargyl-Arg



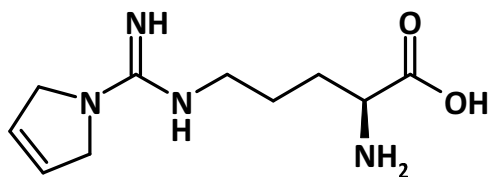
N^{ω} -Propargyl-L-arginin

Propyl-Arg



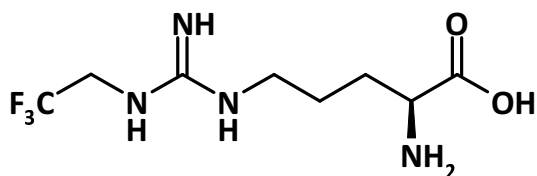
N^{ω} -Propyl-L-arginin

Pyr-Arg



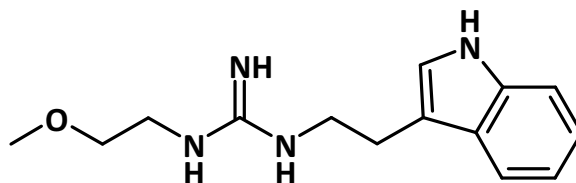
N^{δ} -[(Amino-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin

Tfe-Arg



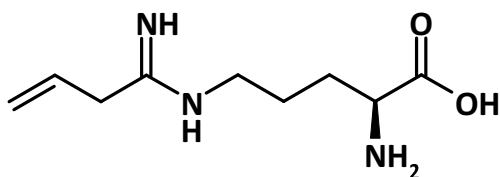
N^{ω} -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin

TryMEG



N -[2-(Indol-3'-yl)ethyl]- N' -(2-methoxyethyl)guanidin

Vinyl-L-NIO



N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

1977 entdeckte Murad das Wirkprinzip von Glyceroltrinitrat, einem Vasodilatator der bereits im 19. Jahrhundert zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt wurde [Scott-Burden, 1999]. Murad konnte zeigen, dass Glyceroltrinitrat Stickstoffmonoxid (NO) freisetzt, welches über eine Aktivierung der Guanylylcyclase eine Relaxation von glatten Muskelzellen vermittelt [Arnold *et al.*, 1977; Katsuki *et al.*, 1977]. Die physiologische Funktion von NO wurde von vielen angezweifelt, da NO zu diesem Zeitpunkt nur als Umweltgift mit toxischer Wirkung auf eine Vielzahl an Makromolekülen bekannt war [Murad, 1999]. 1980 zeigte Furchgott, dass die Endothelium-abhängige Gefäßerweiterung in Folge von Acetylcholin-Gabe durch die Diffusion einer Substanz aus den Endothelzellen in vaskuläre glatte Muskelzellen hervorgerufen wird. Die Identität des Vasodilatators war bisher noch nicht bekannt, so dass dieser „endothelium-derived relaxing factor (EDRF)“ genannt wurde [Furchgott und Zawadzki, 1980]. Im Laufe der Identitätsaufklärung wurde beobachtet, dass die biologische Halbwertszeit des EDRF im Bereich von Sekunden liegt [Rubanyi *et al.*, 1985]. Weiterhin wurde von Ignarro gezeigt, dass EDRF die lösliche Guanylylcyclase in vaskulären glatten Muskelzellen aktiviert [Ignarro *et al.*, 1986]. Diese Entdeckung und die Beobachtung, dass Superoxidanionen EDRF inaktivierten, führte zu der unabhängigen und gleichzeitigen Identifizierung von EDRF als NO durch Furchgott und Ignarro [Ignarro *et al.*, 1986; Rubanyi und Vanhoutte, 1986]. Für diese Entdeckung erhielten Furchgott, Ignarro und Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin [SoRelle, 1998].

NO ist ein gasförmiger Transmitter, der aufgrund seiner Radikaleigenschaften und der damit verbundenen Reaktivität eine sehr kurze Halbwertszeit im Sekundenbereich besitzt [Ignarro, 1996]. So reagiert NO schnell mit Übergangsmetallen zu stabilen NO-Komplexen wie z.B. in Hämproteinen und führt damit zu der Aktivierung der Guanylylcyclase [Wink und Mitchell, 1998]. Liegt NO in einer hohen Konzentration

vor, so reagiert es mit Superoxidradikalanionen zu Peroxynitrit und vermittelt über Oxidation oder Nitrierung zytotoxische Effekte [Davis *et al.*, 2001; Rubbo *et al.*, 1994]. In wässriger Lösung unterliegt NO einer Oxidation durch Sauerstoff zu Nitrit und Nitrat. Trotz der kurzen Halbwertszeit ist eine Diffusion von NO wegen seines lipophilen Charakters durch Biomembranen möglich [Kelm, 1999].

Aufgrund seiner vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen, v.a. im kardiovaskulären System, im Immunsystem oder als Neurotransmitter besitzt die Identifizierung neuer Modulatoren des NO-generierenden Systems eine besondere Bedeutung.

1.2 Enzymatische Beeinflussung der NO-Konzentration

Stickstoffmonoxid wird in Säugetieren vorwiegend durch die NO-Synthase (NOS) gebildet, die die Umwandlung von L-Arginin über das Intermediat N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu L-Citrullin und NO katalysiert [Marletta, 1993; Stuehr und Griffith, 1992]. Eine Reihe von Enzymen greift in diesen Stoffwechsel ein und reguliert die Biosynthese von NO. Sowohl die Arginase, die mit der NO-Synthase um das Substrat L-Arginin konkurriert als auch die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH), die den Abbau der NOS-Hemmstoffe asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) katalysiert, besitzen einen Einfluss auf die Freisetzung von NO und die damit verbundenen physiologischen und pathophysiologischen Effekte [Tran *et al.*, 2003]. Des Weiteren findet eine oxidative Umsetzung von NOHA unter Bildung von NO zum Citrullin ebenso wie eine Reduktion zum L-Arginin statt [Boucher *et al.*, 1992; Clement *et al.*, 2006]. Darüber hinaus spielen regulatorische Effekte von NOHA und NO im NO-Stoffwechsel eine Rolle: NOHA hemmt das Enzym Arginase und verhindert so den Abbau von L-Arginin, NO inhibiert in einem „Feedback“-Mechanismus die DDAH und sorgt so für einen Konzentrationsanstieg der NOS-Inhibitoren ADMA und NMMA [Boucher *et al.*, 1994; Leiper *et al.*, 2002]. Eine Übersicht über die Enzyme und Regulationsmechanismen des NO-generierenden Systems ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

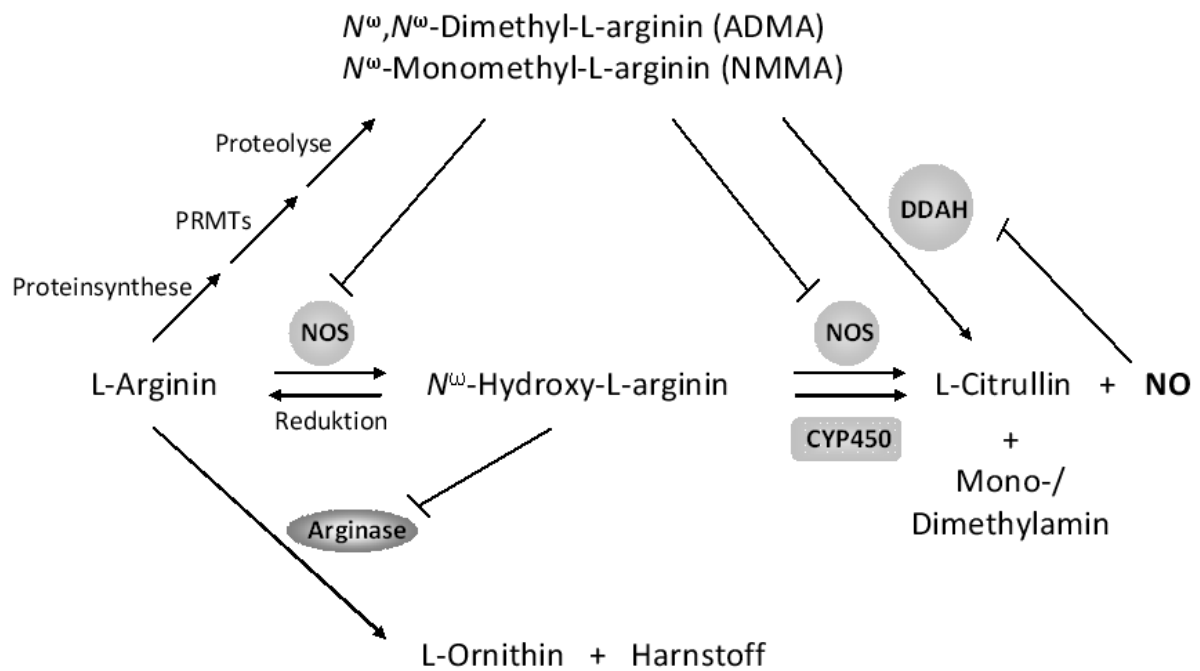


Abb. 1.1: Übersicht über die beteiligten Enzyme und Regulationsmechanismen des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels. CYP450, Cytochrom P450; DDAH, Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase; NOS, NO-Synthase; PRMTs, Protein-Arginin-Methyltransferase.

Im Folgenden werden die einzelnen Enzyme des NO-generierenden Systems vorgestellt.

1.2.1 NO-Synthasen (NOSs)

1.2.1.1 Aufbau und Funktion

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) erfolgt über die NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39). Diese katalysiert die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO über die Zwischenstufe N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (Abb. 1.2) [Marletta, 1993].

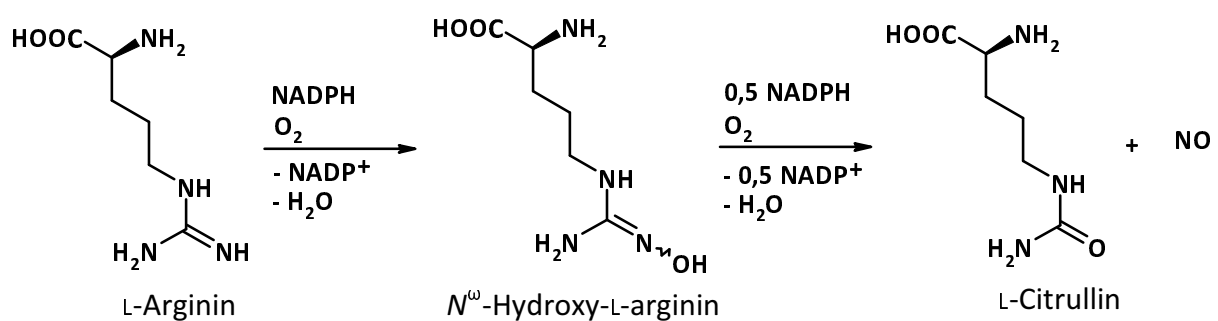


Abb. 1.2: Umsetzung von L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS).

In einem ersten Schritt wird über eine Monooxygenasereaktion ein Sauerstoff unter Hydroxylierung eines der gleichwertigen endständigen Guanidin-Stickstoffe in das Molekül eingebaut. Die Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung des entstandenen N^{ω} -Hydroxy-L-arginin wird anschließend in einem zweiten Schritt oxidativ unter Bildung einer Harnstoffstruktur in L-Citrullin und NO gespalten [Griffith und Stuehr, 1995; Marletta, 1993]. Dieser Schritt entspricht wiederum einer Monooxygenasereaktion, in der neben einem Äquivalent molekularen Sauerstoffs lediglich ein halbes Äquivalent NADPH für die Dreielektronenoxidation benötigt wird [Stuehr *et al.*, 1991].

Bisher sind drei Isoenzyme der NO-Synthase bekannt, die neuronale NOS (nNOS, brain NOS, NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III), deren Benennung nach dem Zelltyp, in dem sie entdeckt wurden, erfolgte, sowie die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) [Stuehr, 1997]. Diese sind Produkte verschiedener Gene und unterscheiden sich in ihrer Lokalisation, Regulation, Inhibitor-Sensitivität und ihren katalytischen Eigenschaften. Innerhalb der humanen Isoenzyme besteht eine Sequenzhomologie von 51 - 57 % [Alderton *et al.*, 2001]. Während die nNOS und eNOS konstitutiv exprimiert und über eine Erhöhung der Calcium-Konzentration innerhalb der Zelle aktiviert werden, erfolgt die Regulation der iNOS auf transkriptioneller Ebene v.a. als Antwort auf inflammatorische und proinflammatorische Mediatoren [Garcin *et al.*, 2004; Roman *et al.*, 2002]. Die Existenz eines weiteren Isoenzym, der mitochondrialen NO-Synthase (mtNOS), wird diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese ein integrales Membranprotein darstellt, das ein Transkript der nNOS, Spleißvariante α ist und myristoyliert sowie phosphoryliert vorliegt [Elfering *et al.*, 2002; Finocchietto *et al.*, 2009].

NOS-Enzyme sind Homodimere und bestehen aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne, die Bindungsstellen für Häm, L-Arginin und Tetrahydrobiopterin (H_4B) besitzt und das aktive Zentrum bildet, sowie einer C-terminalen Reduktase-Domäne, deren Länge zwischen den NOS-Isoenzymen variiert und die Kofaktoren NADPH, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) bindet [Abu-Soud und

Stuehr, 1993; Stuehr *et al.*, 1991]. Für die Dimerisierung ist v.a. das Häm wichtig, das über einen Cystein-Rest an das Enzym gebunden vorliegt [Crane *et al.*, 1998; List *et al.*, 1997]. Während die iNOS zur Dimerisierung weiterhin ein H₄B benötigt, können eNOS und nNOS auch in Abwesenheit von H₄B Dimere bilden, die jedoch durch H₄B stabilisiert werden [Baek *et al.*, 1993; Reif *et al.*, 1999; Venema *et al.*, 1997]. Zusätzlich besitzt die Oxygenase-Domäne der NOS ein zwischen zwei Cystein-Resten tetrahedral koordiniertes Zink-Atom, das ebenfalls, genauso wie eine Anlagerung von L-Arginin, die Dimerisierung stabilisiert [Andrew und Mayer, 1999; Raman *et al.*, 1998]. Die Reduktase-Domäne ist für die Elektronenübertragung vom NADPH zum Häm verantwortlich und zeigt eine hohe Sequenzidentität zu der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Bredt *et al.*, 1991]. In Abbildung 1.3 ist die NO-Synthese schematisch dargestellt.

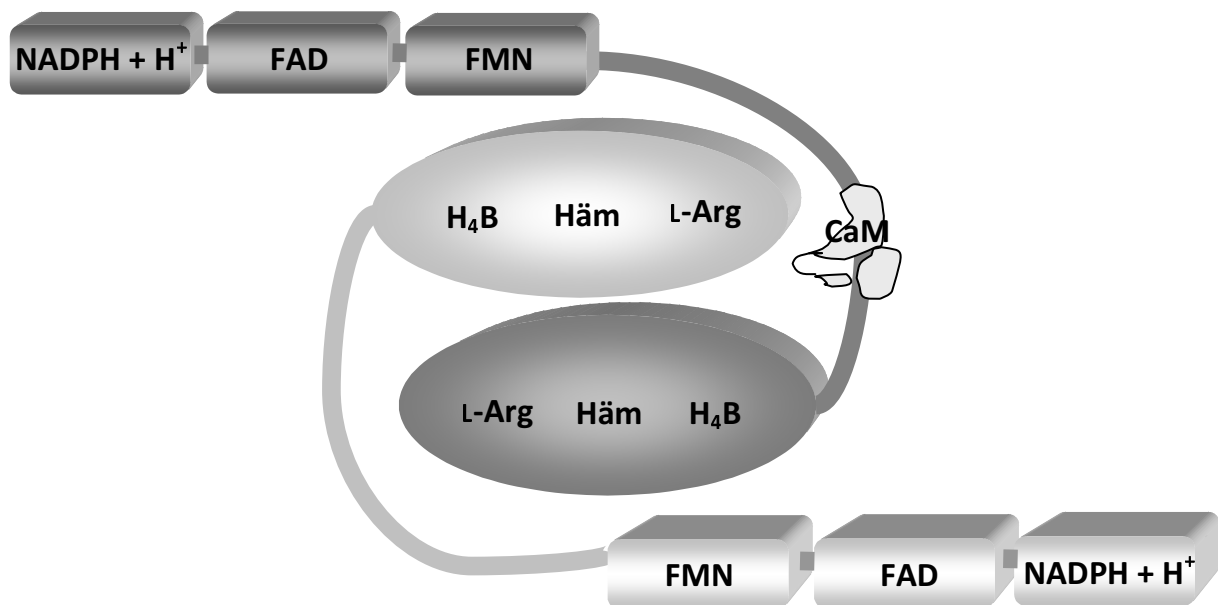


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der NO-Synthase mit gebundenem Calmodulin in Anlehnung an Siddhanta *et al.* (1998). CaM, Calmodulin; FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; H₄B, Tetrahydrobiopterin; L-Arg, L-Arginin; NADPH + H⁺, reduziertes Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat.

Der Elektronenfluss findet über Kreuz statt, so dass Elektronen von der Reduktase-Domäne des einen Monomers auf die Oxygenase-Domäne des anderen Monomers übertragen werden [Panda *et al.*, 2001]. Die essentielle Rolle der Flavin-Cofaktoren der Reduktase-Domäne besteht dabei in der Ermöglichung einer sukzessiven

Übertragung von Elektronen von einem Zwei-Elektronen-Donor (NADPH) zu einem Ein-Elektron-Akzeptor (Häm) durch Bildung eines stabilen Semichinonradikal-Intermediates [Griffith und Stuehr, 1995]. Dadurch werden die Bindung von Sauerstoff und die Oxidation des Substrates an der Oxygenase-Domäne ermöglicht.

Der Elektronentransfer innerhalb der NOS wird bei der nNOS und eNOS über die Bindung von Calmodulin kontrolliert (vgl. Kapitel 1.2.1.5) [Li und Poulos, 2005]. Calmodulin ist ein kleines (17 kDa), saures Protein, das eine Reihe von Zielproteinen aktiviert, darunter beispielsweise die Adenylatcyclase und die Phosphorylase-Kinase [Onek und Smith, 1992]. Die Kristallstruktur von freiem Calmodulin zeigt eine Hantelförmige Gestalt, die vier Calcium-Bindungsstellen besitzt [Babu *et al.*, 1988].

Die Aktivierung der nNOS und eNOS erfolgt über Neurotransmitter und Hormone, wie z.B. Catecholamine, Vasopressin, Serotonin, Acetylcholin, Bradykinin, Glutamat und Histamin sowie hämodynamischen Scherstress, die zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration in der Endothelzelle führen [Andrew und Mayer, 1999; Ayajiki *et al.*, 1996]. Die Anlagerung von Calcium an Calmodulin führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und ermöglicht so die Bindung an die NOS [Meador *et al.*, 1992]. Die iNOS bindet Calmodulin irreversibel bei allen physiologischen Calcium-Konzentrationen und wird durch diese nicht aktiviert [Li und Poulos, 2005]. Neben der Kontrolle über Calmodulin bestehen weitere Regulationsmöglichkeiten für die NOS. Beispielsweise kann NO an das Häm der NOS binden und die NOS-Katalyse so reversibel hemmen. Die Bildung von Eisen-NO-Komplexen entsteht innerhalb von Sekunden nach NO-Synthese. Die Komplexe sind inaktiv und erst durch Dissoziation des NO vom Häm-Eisen kann die Katalyse wieder aufgenommen werden [Alderton *et al.*, 2001].

Liegt eine zu geringe L-Arginin oder H₄B-Konzentration vor, so „entkoppelt“ die NO-Synthase, d.h. statt NO wird Superoxid gebildet. Dieses tritt auch bei Hemmung der NOS durch bestimmte Inhibitoren, wie z.B. NMMA auf [Alderton *et al.*, 2001; Griffith und Stuehr, 1995].

1.2.1.2 Neuronale NOS (nNOS)

Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS-1, Typ 1) wird konstitutiv vor allem im zerebralen neuronalen Gewebe exprimiert, kann jedoch auch peripher im Skelettmuskel, Herzmuskel und in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden, wo NO den Blutfluss und die Muskelkontraktion kontrolliert [Rothe *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999]. Die Aktivierung der nNOS erfolgt durch eine Calcium-abhängige Bindung von Calmodulin an die NOS. Die NO-Bildung dauert Sekunden bis Stunden [Boucher *et al.*, 1999]. Das entstandene NO diffundiert in benachbarte Zellen, aktiviert dort die lösliche Guanylylcyclase über die die vielfältigen NO-Effekte vermittelt werden.

Die nNOS ist sowohl cytosolisch als auch membrangebunden lokalisiert [Hecker *et al.*, 1994]. Eine Beeinflussung der subzellulären Distribution und/oder Aktivität der NOS wird durch eine Vielzahl an Proteinen hervorgerufen, die an die PDZ-Domäne, eine Proteinbindungsstelle am N-Terminus der nNOS, binden. So ist beispielsweise die PDZ-Domäne für die Verankerung der nNOS an der Membran von Neuronen verantwortlich [Alderton *et al.*, 2001]. Genauso wie die eNOS wird die nNOS durch die Bindung an Caveolin (Caveolin 3) gehemmt. Auch eine Phosphorylierung beeinflusst die nNOS-Aktivität. So reduziert die Phosphorylierung von Serin 847 die Aktivität durch Beeinträchtigung der Ca²⁺/Calmodulin-Bindung [Rameau *et al.*, 2004]. Dagegen erhöht eine Phosphorylierung am Serin 1412 die nNOS-Aktivität [Zhou und Zhu, 2009]. Weiterhin wird die nNOS-Aktivität über das Heat shock protein 90 aktiviert, indem dieses die Calmodulin-Bindung an die nNOS erhöht [Song *et al.*, 2001].

Die nNOS ist an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. So wird angenommen, dass die nNOS die Neurogenese in bestimmten Gehirnregionen inhibiert [Matarredona *et al.*, 2005]. Weiterhin ist die nNOS an der Langzeit-Potenzierung beteiligt. Die Hemmung führt zu einer Beeinträchtigung des Lernens und der Erinnerung [Bohme *et al.*, 1993; Rickard und Gibbs, 2003]. Zusätzlich wird die nNOS mit der Entstehung einer Exzitotoxizität, Morbus Parkinson, Morbus

Alzheimer und Migräne in Verbindung gebracht [Arundine und Tymianski, 2003; Eliasson *et al.*, 1999; Gatto *et al.*, 2000; Luth *et al.*, 2001; Neeb und Reuter, 2007; Thorns *et al.*, 1998].

1.2.1.3 Endotheliale NOS (eNOS)

Die endotheliale NOS (eNOS, NOS III, Typ 3) wird hauptsächlich in Endothel-Zellen und Blutplättchen exprimiert, ist allerdings auch in anderen Geweben, wie z.B. Herzmuskelzellen und in bestimmten Hirnregionen zu finden [Dinerman *et al.*, 1994; Harrison, 1997; Moncada *et al.*, 1997]. Die Aktivität der eNOS wird über deren Lokalisation bestimmt. eNOS wird über Myristin- und Palmitin-Gruppen an den Golgi-Apparat gebunden [Ozuyaman *et al.*, 2008]. Über einen vesikulären Transport wird das Enzym zur Plasmamembran transportiert und bindet dort über Caveolin-1, einem integralen Membranprotein, an die Caveolen. Diese Wechselwirkung führt zu einer Inaktivierung der eNOS, da Caveolin-1 bei niedrigen cytosolischen Calcium-Konzentrationen die Bindung von Calmodulin an die eNOS hemmt [Andrew und Mayer, 1999]. Steigt der Calcium-Spiegel, so kann Calmodulin dennoch an die eNOS binden, indem es die eNOS-Caveolin-Interaktion stört. Durch Depalmitoylierung erfolgt eine Translokation in das Cytosol. Eine Phosphorylierung durch Proteinkinase B sowie eine Bindung des Heat shock protein 90 (HSP 90) führen zu einer Aktivierung der eNOS. Durch ein Absinken der Calcium-Konzentration und eine Dephosphorylierung bindet eNOS wieder an die Caveolen und wird dadurch inaktiviert. Es folgt eine Relokation zum Golgi-Apparat, wo es wieder mit Palmitinsäure acyliert wird, um dann zu den Caveolen transportiert zu werden [Ozuyaman *et al.*, 2008]. Die Verankerung mit der Zellmembran ist wichtig für die Kolokation der eNOS mit dem kationischen Aminosäuretransporter CAT-1, der die NOS mit Substrat versorgt [McDonald *et al.*, 1997].

Das von der eNOS freigesetzte NO diffundiert in benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort wie die nNOS die lösliche Guanylylcyclase. Diese setzt Guanosintriphosphat (GTP) zum cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) um, das wiederum Proteinkinasen aktiviert mit der Folge einer Abnahme der zellulären

Calcium-Konzentration und damit verbunden einer Vasodilatation [Ignarro, 1996; Ignarro *et al.*, 1999]. Neben der Beeinflussung des Gefäßtonus besitzt NO cGMP-vermittelt eine Thrombozyten- und Leukozyten-aggregationshemmende Wirkung sowie einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation vaskulärer glatter Muskulatur [Miller und Megson, 2007].

Aufgrund dieser Effekte besitzt die eNOS eine große Bedeutung für die Regulation des kardiovaskulären Systems. Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit ist u.a. an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt, die mit Erkrankungen wie Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Artherosklerose und Diabetes mellitus einhergeht [Yetik-Anacak und Catravas, 2006].

1.2.1.4 Induzierbare NOS (iNOS)

Die induzierbare NOS (iNOS, NOS II, Typ 2) kommt unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Konzentrationen vor [Andrew und Mayer, 1999]. Das Enzym bindet Calmodulin unabhängig vom Calciumspiegel sehr fest und wird durch einen Calcium-Influx in die Zelle nicht aktiviert. Die Regulation erfolgt auf transkriptioneller Ebene [Marletta, 1993]. Die Induktion des iNOS-Gens durch bakterielle Polysaccharide oder pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, Tumornekrose-Faktor oder Interferon γ führt zur Expression des Enzyms in verschiedenen Zelltypen, u.a. in Endothelzellen, kardialen Myozyten und Makrophagen [Balligand *et al.*, 1994; Coleman, 2001; Gross *et al.*, 1991]. Zwischen der Zellaktivierung und der NO-Produktion vergehen durch die benötigte mRNA- und Protein-Synthese mehrere Stunden. Die iNOS synthetisiert deutlich höhere NO-Mengen als die eNOS und nNOS und die NO-Synthese dauert Stunden bis Tage an [Boucher *et al.*, 1999; Marletta, 1993; Nathan, 1992; Stuehr und Marletta, 1987]. Die physiologische Hauptfunktion der iNOS liegt in der Unterstützung des unspezifischen Immunsystems, da das in hohen Konzentrationen gebildete NO schnell zu reaktiven Oxidationsprodukten, wie z.B. Peroxynitrit und Distickstofftrioxid weiterreagiert. Diese sind instabil und können Lipide, Proteine und DNA oxidieren bzw. Thiole und Amine, in hohen Konzentrationen auch DNA nitrosylieren. Weiterhin kann NO direkt

mit eisenhaltigen Enzymen der Atmungskette und DNA-Synthese interagieren [Hallinan *et al.*, 2004]. NO besitzt damit zytostatische und zytotoxische Effekte und kann mikrobielle Erreger, Viren und Tumorzellen zerstören sowie eine Apoptose hervorrufen [Coleman, 2001].

Eine zu hohe oder langanhaltende NO-Bildung durch die iNOS ist jedoch auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt und wird mit dem septischen Schock, rheumatoider Arthritis und *Colitis ulcerosa* in Verbindung gebracht [Hobbs *et al.*, 1999].

1.2.1.5 Elektronentransfer durch die NOS

Der intramolekulare Elektronentransfer der nNOS und eNOS wird durch Calmodulin reguliert. nNOS und eNOS besitzen ein autoinhibitorisches Kontrollelement, bestehend aus ca. 40 Aminosäuren, das die FMN-Domäne im Calmodulin-freien Zustand über ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen an den Reduktase-Komplex bindet, weiterhin regulatorische Bereiche im C-Terminus sowie in der verbindenden Domäne [Garcin *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004; Tiso *et al.*, 2007]. Das autoinhibitorische Kontrollelement unterdrückt den Elektronenfluss, sowohl innerhalb der Reduktase-Domäne als auch den Elektronentransfer nach außen. Die Bindung von Calmodulin an die NO-Synthase führt zu einem Ersatz des autoinhibitorischen Kontrollelementes und ermöglicht so den Elektronentransfer vom FAD Hydrochinon (FADH₂) zum FMN Semichinon (FMNH') und anschließend vom FMN Hydrochinon (FMNH₂) zum Häm der Oxygenase-Domäne [Panda *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 2001]. Die Übertragung von Elektronen vom FMN auf das Häm erfolgt über einen Eingangs (Elektronen-Akzeptor)- und Ausgangs (Elektronen-Donor)-Zustand [Feng *et al.*, 2006]. Im Eingangs-Zustand befindet sich die FMN-Domäne nah am FAD, im Ausgangs-Zustand nah am Häm. Die Bindung von Calmodulin löst den Eingangs-Zustand, so dass die FMN-Domäne zwischen den Redoxpartner FAD und Häm der Oxygenase-Domäne pendeln kann und damit als ein Ein-Elektronen-Shuttle fungiert [Feng und Tollin, 2009]. Kristallstrukturen der intakten nNOS Reduktase-

Domäne, ohne gebundenes Calmodulin, zeigen FMN in direkter Nachbarschaft zum FAD, wie es für die Übertragung von Elektronen vom NADPH über FAD zum FMN während des Eingangs-Zustands benötigt wird. Dabei ist das FMN deutlich ($\sim 70 \text{ \AA}$) vom Häm entfernt, so dass Elektronen nicht auf das Häm transferiert werden können [Garcin *et al.*, 2004]. Diese eingeschränkte Stellung wird durch ein Zusammenspiel von Kontrollelementen im C-Terminus und dem autoinhibitorischen Kontrollelement fixiert. Um Elektronen auf das Häm übertragen zu können, muss sich, vermittelt durch die Bindung von Calmodulin, die FMN-Domäne von der Reduktase-Bindungsstelle lösen und in Richtung des Häm bewegen. Die Bildung des Ausgangs-Zustandes wird ebenfalls durch das autoinhibitorische Kontrollelement stabilisiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [Feng und Tollin, 2009].

1.2.2 Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH, EC 3.5.3.18) setzt N^ω -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin (ADMA), die aus L-Arginin nach posttranslationaler Methylierung von Gewebs-Proteinen durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs, EC 2.1.1.23) und nachfolgender Proteolyse entstehen, zu Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin um [Bedford und Clarke, 2009; McDermott, 1976; Ogawa *et al.*, 1989]. Aufgrund der Tatsache, dass NMMA und ADMA kompetitive Hemmstoffe der NO-Synthase (NOS) sind, spielt die DDAH eine wesentliche Rolle im NO-generierenden System [MacAllister *et al.*, 1996; Vallance *et al.*, 1992]. So wurden auch in mehreren Studien erhöhte ADMA-Konzentrationen bei kardiovaskulären-Erkrankungen beobachtet [Jacobi *et al.*, 2005; Leiper *et al.*, 2007; Zoccali *et al.*, 2001]. Bisher sind zwei humane Isoenzyme bekannt, die DDAH-1 und die DDAH-2, die eine 50%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz besitzen [Frey *et al.*, 2006; Leiper *et al.*, 1999]. Interessanterweise gibt es eine Korrelation in der Expression der Isoenzyme und der NO-Synthase. Die DDAH-1 wird bevorzugt in Gehirn und Niere exprimiert. Gerade im Gehirn ist besonders die nNOS zu finden. Die DDAH-2 wird am stärksten in Herz, Plazenta, Immunzellen und Niere exprimiert. Insbesondere Herz und Niere

repräsentieren Gewebe mit einer hohen eNOS-Aktivität [Leiper *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2000]. Aufgrund dieser Kollokalisierung der verschiedenen Isoenzyme von NOS und DDAH könnte eine isoformspezifische Regulation der NOS durch eine Modulierung der Methylarginin-Konzentration ermöglicht werden [Ogawa *et al.*, 1989; Tran *et al.*, 2003].

1.2.3 Arginase

Die Arginase (EC 3.5.3.1) katalysiert die Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Bisher sind im Menschen zwei Isoenzyme, Arginase I und Arginase II, bekannt, die eine 58 %ige Sequenzidentität aufweisen [Ash, 2004]. Die cytosolische Arginase I wird v.a. in der Leber exprimiert und besitzt dort eine wichtige Funktion im Harnstoffzyklus und damit der Ammoniak-Entgiftung. Die mitochondriale Arginase II ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das in erster Linie für die Bereitstellung von L-Ornithin verantwortlich ist, das für die Biosynthese von Polyaminen, Prolin und Glutamat benötigt wird [Durante *et al.*, 2007]. In vaskulären Endothelzellen liegt überwiegend die Arginase II vor [Morris, 2009]. Neben der Regulation der NO-Synthese wird die Arginase II mit der Entwicklung einer Hyperplasie der Intima und einer vaskulären Steifheit in Folge von Verletzungen und höherem Alter in Verbindung gebracht. Eine Hyperplasie der Intima entsteht durch die vermehrte Synthese von Polyaminen und Prolin, die für die Zellproliferation und Kollagen-Synthese wichtig sind [Durante *et al.*, 2007]. Eine Induktion der Arginase-Expression kann über eine Vielzahl an Verbindungen erfolgen, darunter Lipopolysaccharide, hohe Glucosespiegel und oxidiertes *low density lipoprotein* (LDL) [Buga *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2008; Ryoo *et al.*, 2006]. Weitaus weniger ist über die Unterdrückung der Arginase-Expression bekannt. Nur das Phytoestrogen Genistein und Flavanoide aus der Kakao-Pflanze, sowie Simvastatin werden mit einer Suppression in Verbindung gebracht [Nelin *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2008; Schnorr *et al.*, 2008].

Neben einer gesteigerten Kollagensynthese und Zellproliferation kann eine Erhöhung der Arginase-Aktivität zu einer verminderten Verfügbarkeit von L-Arginin für andere Enzyme wie z.B. der NO-Synthase führen und resultiert in einer reduzierten

NO-Biosynthese und erhöhten Superoxidproduktion sowie einer Modulation der Expression bestimmter Proteine, wie dem kationischen Aminosäuretransporter CAT-1 oder der iNOS [Morris, 2006]. So ist es nicht verwunderlich, dass eine Beteiligung der Arginase an der Entstehung von vaskulären und pulmonalen Erkrankungen, Infektionserkrankungen und Krebs diskutiert wird [Morris, 2009].

1.3 Therapeutische Beeinflussung des NO-generierenden Systems

Aufgrund der vielseitigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von NO ist die gezielte Beeinflussung von NO-vermittelten Effekten eine große Herausforderung. Ermöglicht werden kann diese durch die Modulation der NO-Synthase-, Arginase- und DDAH-Aktivitäten, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Freisetzung von NO besitzen.

1.3.1 Modulatoren der NO-Synthase

Alle drei Isoenzyme der NO-Synthase besitzen wichtige physiologische Funktionen, so dass eine selektive Beeinflussung eines Isoenzym von essentieller Bedeutung ist. Dieses ist jedoch durch die starke Konservierung der aktiven Zentren der Isoenzyme und die strukturelle Ähnlichkeit der Substrat-Bindungsregionen kompliziert [Fischmann *et al.*, 1999; Raman *et al.*, 1998].

1.3.1.1 Substrate für die NO-Synthase

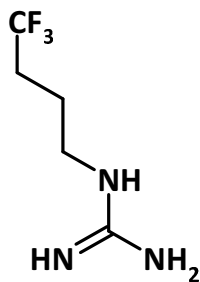
Eine verminderte NO-Bildung durch NO-Synthasen oder ein vermehrter NO-Abbau, durch z.B. oxidative Zustände oder einer erhöhten Aktivität der Arginase können zu einer nicht ausreichenden Verfügbarkeit von NO führen [Berkowitz *et al.*, 2003; Higashi *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009]. Erkrankungen wie z.B. die endotheliale Dysfunktion werden mit einer NO-Insuffizienz in Verbindung gebracht, da die von NO vermittelten Effekte, wie z.B. die Hemmung der Thrombozytenaggregation, wegfallen [Miller und Megson, 2007]. Auch das Immunsystem wird, aufgrund der physiologischen Funktion von NO bei der unspezifischen Immunabwehr, durch eine verringerte NO-Verfügbarkeit beeinträchtigt [Coleman, 2001]. Eine Möglichkeit zur

Behandlung von NO-defizienten Erkrankungen ist eine Gabe von Substraten der NO-Synthase oder NO-Donoren.

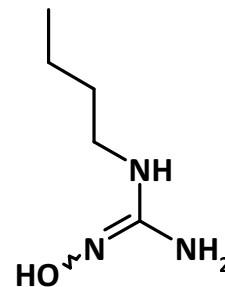
Beispiele für NO-Donoren sind Glyceroltrinitrat oder Molsidomin, die enzymatisch oder nichtenzymatisch NO freisetzen [Wang *et al.*, 2002]. Substrate der NO-Synthase bilden NOS-vermittelt NO [Mansuy und Boucher, 2004].

Bisher konnte noch kein Substrat für die NOS gefunden werden, das eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als das natürliche Substrat L-Arginin. Die meisten Substrate basieren auf L-Arginin oder N^{ω} -Hydroxy-L-arginin. So wurde entdeckt, dass um eine Methylen-Gruppe verlängerte L-Arginin- und NOHA-Derivate (Homo-L-arginin, N^{ω} -Hydroxyhomo-L-Arginin) gute Substrate sind [Moali *et al.*, 2000]. Die iNOS-Aktivität liegt, wenn Homo-L-arginin als Substrat dient, bei etwa 70 % der Aktivität, die mit L-Arginin erreicht wird. Mit N^{ω} -Hydroxy-L-arginin als Substrat kommt die NOS auf eine Restaktivität von ca. 80 % (nNOS), 55 % (iNOS) und 70 % (eNOS) [Mansuy und Boucher, 2004]. Kleine Veränderungen in der L-Arginin und NOHA-Struktur, wie z.B. der Ersatz der Guanidin-Gruppe gegen eine Amidin-Struktur oder der Austausch der α -Amino- oder α -Carboxylfunktion, führen dagegen zu einer Inaktivierung des Enzyms [Grant *et al.*, 1998; Stuehr und Griffith, 1992]. Die Entfernung der gesamten Aminosäurefunktion von NOHA (*N*-Butyl-*N'*-hydroxyguanidin) resultiert jedoch bei Verwendung als NOS-Substrat in einer guten NO-Freisetzungsrates verglichen mit NOHA (nNOS: 65 %, iNOS: 68 %, eNOS: 41 %) [Dijols *et al.*, 2001]. Basierend auf diesem Ergebnis wurden weitere *N*-Alkyl-*N'*-hydroxyguanidine untersucht und *N*-(4,4,4-Trifluorbutyl)-*N*-guanidin, das ein besonders gutes Substrat für die iNOS darstellt, sowie Cyclopropyl-*N*-hydroxyguanidin, das besonders gute Substrateigenschaften für die nNOS besitzt, gefunden [Jia *et al.*, 2003; Mansuy und Boucher, 2004]. Eine weitere Substanz ist das 3-(Trifluormethyl)propylguanidin mit einer Aktivität von 35 % verglichen mit L-Arginin [Dijols *et al.*, 2002]. Auch arylsubstituierte Derivate der NOS zeigen gute Substrateigenschaften. So besitzt *N*-(4-Fluorphenyl)-*N'*hydroxyguanidin 41 % der

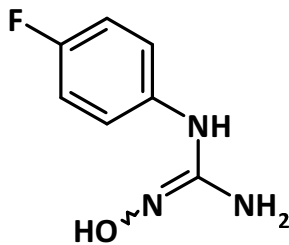
Aktivität von NOHA an der iNOS [Renodon-Corniere *et al.*, 2002]. In Abbildung 1.4 sind die besten bekannten NOS-Substrate gezeigt.



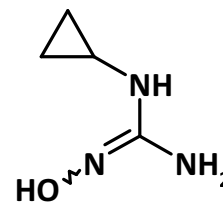
N-(4,4,4-Trifluorbutyl)guanidin



N-Butyl-N'-hydroxyguanidin



N-(4-Fluorphenyl)-N'-hydroxyguanidin



N-Cyclopropyl-N'-hydroxyguanidin

Abb. 1.4: Alternative NO-freisetzende Substrate der NO-Synthase.

1.3.1.2 Inhibitoren der NOS

Eine Überproduktion von NO wird ebenfalls mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht [Coleman, 2001; Gatto *et al.*, 2000; Luth *et al.*, 2001; Neeb und Reuter, 2007]. Daher wurde zur Senkung der NO-Biosynthese in den letzten Jahren eine Vielzahl an NO-Synthase-Hemmstoffen entwickelt. Angesichts der zahlreichen physiologischen Effekte von NO, v.a. von der eNOS im kardiovaskulären System, nimmt die Entwicklung selektiver Inhibitoren einen großen Stellenwert ein [Low, 2005]. So wird die Hemmung der nNOS als mögliche Therapie für Migräne und neurodegenerative Erkrankungen angesehen, während eine iNOS-Inhibition für eine Behandlung der rheumatoiden Arthritis, chronischen Entzündungen und septischem Schock ausgenutzt werden könnte [Hobbs *et al.*, 1999]. Aufgrund der starken Konservierung der aktiven Zentren der Isoenzyme, stellt die Entwicklung selektiver

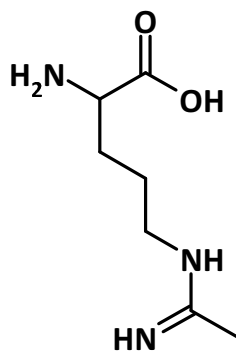
Hemmstoffe allerdings eine große Herausforderung dar [Fischmann *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999]. Bekannte NOS-Inhibitoren besitzen eine große strukturelle Diversität und greifen an verschiedenen Punkten an der NOS an. Eine Unterteilung kann in die folgenden vier Gruppen erfolgen: endogene NOS-Inhibitoren, Substrat-Analoga, Dimerisierungs-Hemmstoffe und Inhibitoren der Kofaktoren [Low, 2005]. Die wichtigsten Vertreter der Gruppen sind in Abbildung 1.5 gezeigt.

Zu den endogenen Inhibitoren gehören NMMA und ADMA, die durch Methylierung von Arginin-Resten in Proteinen und anschließender Proteolyse entstehen [Bedford und Clarke, 2009]. NMMA und ADMA sind kompetitive Hemmstoffe aller drei NOS-Isoenzyme und werden durch die DDAH abgebaut [MacAllister *et al.*, 1996]. Eine therapeutische Möglichkeit zur Beeinflussung der NO-Biosynthese stellt die Hemmung der DDAH dar, da diese einen Anstieg der Konzentration der endogenen Inhibitoren bedingt (vgl. Kapitel 1.3.2.2).

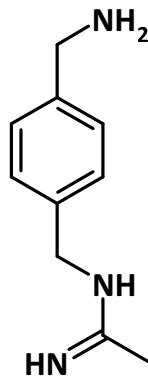
Die größte Gruppe der bekannten NOS-Inhibitoren bilden die Substrat-Analoga. Zu diesen gehören u.a. Aminoguanidin, Amidine (*N*-[3-(Aminomethyl)benzyl]-acetamidin), Aminosäurederivate (*N*^ε-l-Iminoethyl-L-lysin, *N*^δ-(1-Iminoethyl)-L-ornithin, *N*^ω-Nitro-L-arginin) und Isothioharnstoffe (*S*-Ethylisothioharnstoff) [Alderton *et al.*, 2001; Babu und Griffith, 1998; Bretscher *et al.*, 2003; Low, 2005]. Diese sollen kompetitive Inhibitoren der NO-Synthase sein und besitzen zum Teil eine gute Selektivität gegenüber einzelnen Isoenzymen. So stellt *N*-[3-(Aminomethyl)benzyl]acetamidin (1400 W), einen hoch selektiven iNOS-Inhibitor dar und *N*^δ-(1-Iminoethyl)-L-ornithin besitzt eine etwas höhere Affinität zur nNOS als zu eNOS und iNOS [Babu und Griffith, 1998; Low, 2005].

Dimerisierungs-Inhibitoren wurden von McMillan als iNOS-selektive Inhibitoren entwickelt. Die Verbindungen sind Pyrimidinimidazole, die an das Häm im iNOS-Monomer binden, sowohl die L-Arginin- als auch die H₄B-Bindungsstelle blockieren und einen Inhibitor-Monomer-Komplex bilden [McMillan *et al.*, 2000].

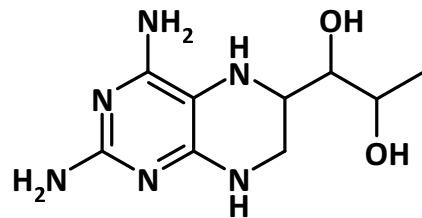
Kofaktor-Inhibitoren umfassen Hemmstoffe von Tetrahydrobiopterin, Häm, Flavinen und Calmodulin [Low, 2005]. Inhibitoren, die an der H₄B-Bindungsstelle angreifen sind Pterinanaloga, wie z.B. 4-Amino-Tetrahydrobiopterin [Werner *et al.*, 1996]. Imidazol-Derivate, wie z.B. Clotrimazol oder Miconazol greifen am Häm an und verdrängen L-Arginin oder hemmen die Dimerisierung. Zu den Hemmstoffen der Flavoproteine zählt Diphenyleniodonium, Calmodulin wird u.a. durch Trifluoperazin gehemmt [Low, 2005; Molnar *et al.*, 1997].



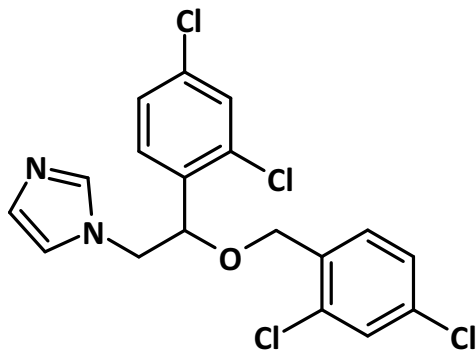
N^δ-(1-Iminoethyl)-L-ornithin



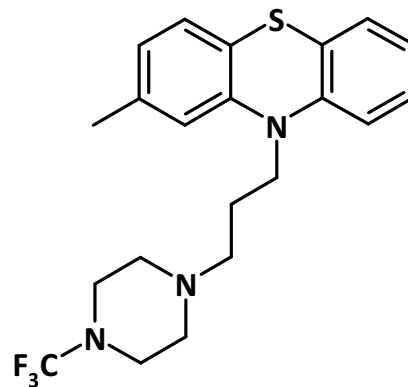
1400 W



4-Amino-Tetrahydrobiopterin



Miconazol



Trifluoperazin

Abb. 1.5: Strukturformeln bekannter NOS-Inhibitoren 1400 W, *N*-[3-(Aminomethyl)benzyl]-acetamidin.

Obwohl die Entwicklung von NO-Hemmstoffen eine Vielzahl an neuen Substanzen hervorgebracht hat, ist bisher kein einziger NOS-Inhibitor als Arzneistoff zugelassen. Dies liegt zum Einen an der fehlenden Selektivität gegenüber NOS-Isoenzymen und anderen Enzymen wie CYP450 und den zwangsläufig damit verbundenen starken

Nebenwirkungen und Interaktionen, zum Anderen aber auch an den unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften der bekannten Verbindungen.

1.3.2 Modulatoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Die DDAH setzt die kompetitiven NOS-Inhibitoren, ADMA und NMMA, um und besitzt so indirekt einen Einfluss auf die NO-Biosynthese. Eine Beeinflussung der DDAH-Aktivität stellt somit eine Therapiemöglichkeit für Erkrankungen dar, die durch zu hohe oder zu niedrige NO-Konzentrationen hervorgerufen werden [Knipp, 2006; Vallance *et al.*, 1992].

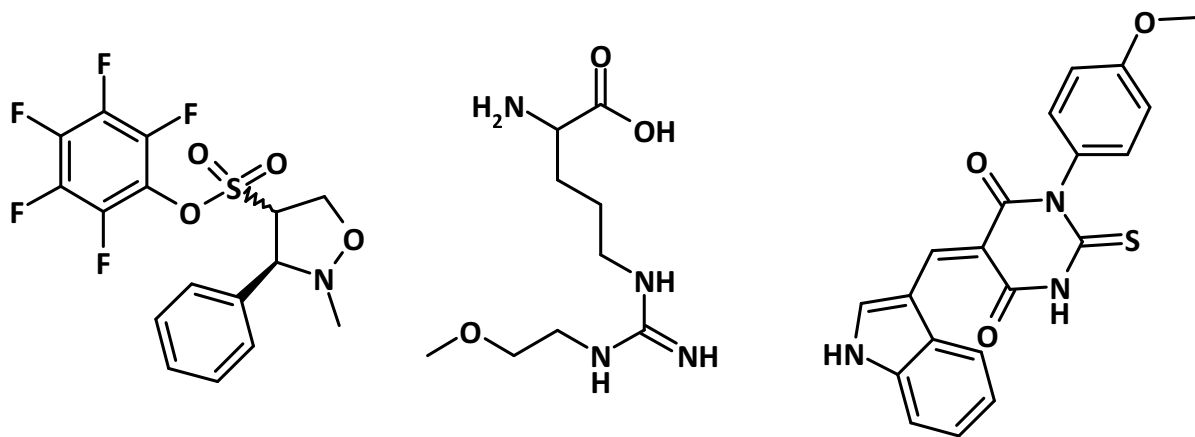
1.3.2.1 Aktivatoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Eine Aktivierung der DDAH ist ein interessanter Therapieansatz zur Behandlung von NO-defizienten Erkrankungen, wie z.B. der endothelialen Dysfunktion, da durch den Abbau der kompetitiven NOS-Inhibitoren ADMA und NMMA eine verstärkte NO-Biosynthese zu erwarten ist [Tran *et al.*, 2003]. Bisher sind keine Aktivatoren der DDAH bekannt. Theoretisch möglich ist eine Steigerung der Expression der DDAH-1 oder eine Beeinflussung von posttranskriptionellen Prozessen und durch allosterische Effektoren [Singh, 2007].

1.3.2.2 Inhibitoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase

Eine Hemmung der DDAH kann bei Erkrankungen, die mit einer NO-Überproduktion einhergehen therapeutisch genutzt werden. Hierzu zählen u.a. Migräne, rheumatoide Arthritis, septischer Schock und neurodegenerative Erkrankungen [Gatto *et al.*, 2000; Hobbs *et al.*, 1999; Neeb und Reuter, 2007].

Bisher sind drei verschiedene Klassen an DDAH-Inhibitoren bekannt: Pentafluorphenylsulfonate [Vallance *et al.*, 2005], L-Arginin-Analoga (z.B. L-257) [Rossiter *et al.*, 2005] und Indolthiobarbitursäure-Derivate (z.B. SR445) [Hartzoulakis *et al.*, 2007]. Alle Inhibitoren sind jedoch eher schwache Hemmstoffe mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich. Die Strukturen ausgesuchter DDAH-Inhibitoren sind in Abbildung 1.6 dargestellt.



n-Pentafluorophenyl-2-methyl-
3-phenylisoxazolidin-4-sulfonate

L-257

SR445

Abb. 1.6: Übersicht über die Strukturen der potentesten DDAH-Inhibitoren.

1.3.3 Inhibitoren der Arginase

In mehreren Studien konnten positive Effekte von Arginase-Inhibitoren z.B. auf die endotheliale Dysfunktion oder Hypertonie erzielt werden, die aus einer Erhöhung der NO-Biosynthese resultierten [Bagnost *et al.*, 2008; Demougeot *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005]. Arginase-Inhibitoren können demnach eine Therapiemöglichkeit für NO-defiziente Erkrankungen wie Hypertonie, Artherosklerose und erektile Dysfunktion darstellen. Ein weiteres potentiell Anwendungsbereich sind Tumorerkrankungen, da die Arginase das für die Polyamin-Synthese wichtige L-Ornithin zur Verfügung stellt [Durante *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2000]. Polyamine werden während der Zellteilung und folglich im schnell proliferierenden Tumorgewebe benötigt [Morris, 2009].

N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), das Intermediat der NOS-Katalyse ist ein potenter, endogener Inhibitor der Arginase, der etwa die gleiche Affinität zur NO-Synthase wie zur Arginase besitzt [Daghigh *et al.*, 1994]. Dieses Intermediat kann vom aktiven Zentrum der NO-Synthase freigesetzt werden und die Arginase hemmen [Hecker *et al.*, 1995]. Neben NOHA sind noch weitere Arginase-Inhibitoren bekannt. Die Strukturen sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

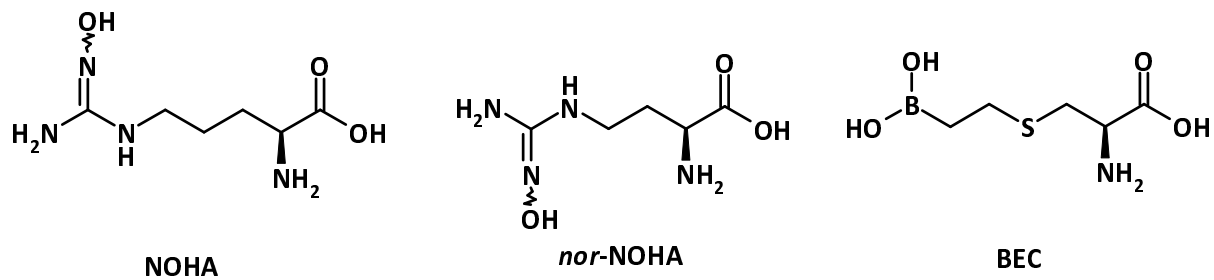


Abb. 1.7: Strukturen bekannter Arginase-Hemmstoffe. NOHA, N^{ω} -Hydroxy-L-arginin; nor-NOHA, N^{ω} -Hydroxy-nor-L-arginin; BEC, *S*-(2-Boronoethyl)-L-cystein.

Alle bekannten Arginase-Hemmstoffe haben gemeinsam, dass sie kompetitiv inhibieren und keine Isoform-Selektivität zeigen [Morris, 2009].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Stickstoffmonoxid besitzt eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Effekte und wird mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht, die sowohl aus einer reduzierten als auch aus einer erhöhten NO-Freisetzung resultieren. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Modulatoren des NO-generierenden Systems identifiziert und untersucht werden, um neue Therapieoptionen zu entwickeln.

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einem NO-Defizit einher. Für die Therapie stehen u.a. NO-Donoren zur Verfügung, die allerdings alle therapie-limitierende Nachteile mit sich bringen. Ein neuer Behandlungsansatz ist die Gabe von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), dem Intermediat der Katalyse der NO-Synthase (NOS), aus dem NO freigesetzt werden kann. Ein Vorteil von NOHA ist die inhibitorische Wirkung auf die Arginase, die mit der NOS um das Substrat L-Arginin konkurriert. Aufgrund seiner mangelhaften pharmakokinetischen Eigenschaften und der Instabilität ist NOHA allerdings für eine orale Applikation als NOS-Substrat nicht geeignet. Aus diesem Grund sollte die Stabilität von NOHA-Prodrugs und einer *O*-glycosylierten Hydroxyguanidin-Modellverbindung im Vergleich zur physiologischen Verbindung NOHA bestimmt werden. Weiterhin sollte die

enzymatische Freisetzung des pharmakologisch aktiven Metaboliten aus den Prodrugs mittels verschiedener Enzymquellen untersucht werden.

Zur Erniedrigung der NO-Synthese kann das Enzym Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase inhibiert werden, das den Abbau der endogenen NO-Hemmstoffe asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) katalysiert. Um Nebenwirkungen zu vermeiden, ist hierbei eine Selektivität gegenüber der NO-Synthase erwünscht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten DDAH-1-Inhibitoren auf deren NOS-hemmende Eigenschaften überprüft werden. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf die Erlangung neuer Erkenntnisse über die Unterschiede der aktiven Zentren von NOS und DDAH-1 gelegt werden, um eine Entwicklung selektiver DDAH-1-Hemmstoffe zu erleichtern. Dafür wurden sowohl L-Arginin-Derivate mit einem N^{ω} -Substituenten als auch die strukturell verwandten N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin- und N -(2-Methoxyethyl)-guanidin-Derivate untersucht.

Weiterhin sollten Verbindungen auf Brombiphenyl-Basis analysiert werden (Abb. 1.8), die in vorherigen Testungen eine gute inhibitorische Wirksamkeit gegenüber NO-Synthasen zeigten. Im Falle von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylamino-propiofenon Hydrochlorid (BDAP) wurde in Vorarbeiten eine Instabilität beobachtet. Daher sollte die Stabilität überprüft und Zersetzungsprodukte, die möglicherweise an der Hemmung beteiligt sind, identifiziert und charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus der NOS-Hemmung ziehen zu können.

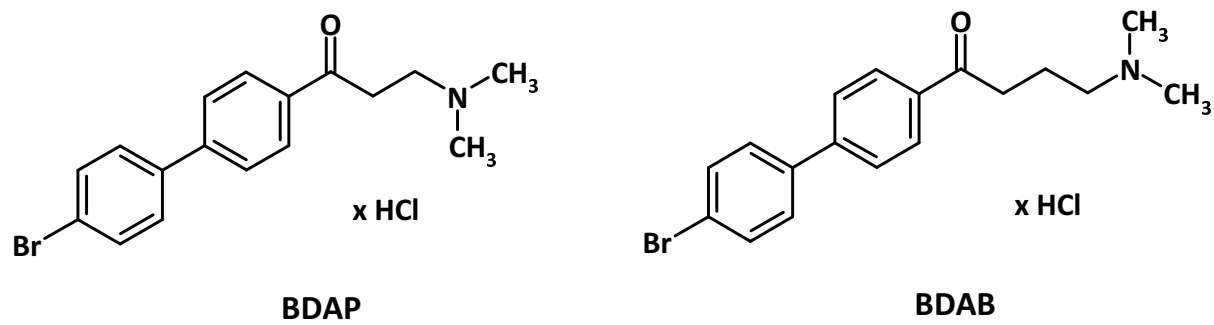


Abb. 1.8: Struktur von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP) und 4'-(4-Bromphenyl)-ω-dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB).

Bei 4'-(4-Bromphenyl)-ω-dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB) wurde keine Instabilität beobachtet. Hier sollte die inhibitorische Wirkung auf die drei NOS-Isoenzyme nNOS, iNOS und eNOS bestimmt und der Wirkungsmechanismus der Verbindung aufgeklärt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu dem Neuroleptikum Haloperidol stellte sich zusätzlich die Frage, ob BDAB antipsychotische Eigenschaften besitzt und ob die Verbindung durch Modifikation in der Kohlenstoff-Seitenkette eine höhere Affinität zu den für die neuroleptische Wirkung verantwortlichen D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren erlangt. Dazu sollten zwei weitere Verbindungen entwickelt und synthetisiert und anschließend vergleichend an den genannten Rezeptoren untersucht werden.

2 *In vitro* Biotransformation von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

2.1 Einleitung

2.1.1 NO-defiziente Erkrankungen

Eine Störung des NO-Guanylylcyclase-Signaltransduktionsweges führt durch seine vielfältigen Angriffspunkte zu einer Reihe von Erkrankungen, darunter die erektile Dysfunktion, Morbus Alzheimer sowie kardiovaskuläre Erkrankungen [Costa und Virag, 2009; de la Torre und Stefano, 2000; Victor *et al.*, 2009]. Gemeinsames pathologisches Korrelat dieser Erkrankungen sind Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktion, die unter dem Terminus der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst und mit der Entwicklung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie z.B. Artherosklerose, Diabetes mellitus oder Hypertonie in Verbindung gebracht werden [Calver *et al.*, 1992a; Calver *et al.*, 1992b; Ludmer *et al.*, 1986].

Hervorgerufen wird die endotheliale Dysfunktion u.a. durch eine verringerte Bioverfügbarkeit von NO. Ursache hierfür kann eine verminderte eNOS-Expression und Aktivität, eine Entkopplung der NO-Synthase durch Substrat- und Cosubstratmangel, eine Inaktivierung von NO durch reaktive Sauerstoffspezies, eine Hemmung der NOS durch eine erhöhte Konzentration an asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), eine erhöhte Arginase-Aktivität und eine reduzierte Sensitivität der vaskulären glatten Muskelzellen für Vasodilatoren sein [Higashi *et al.*, 2009].

Eine verminderte NO-Bildung führt zu einer Vasokonstriktion, einer vermehrten Proliferation glatter Muskelzellen und einer verstärkten Aktivität und Adhäsion von Thrombozyten und inflammatorischen Zellen an geschädigtes vaskuläres Endothel. Eine Beeinträchtigung des Endothels stört den Blutfluss, die Gefäße werden durch Plaques an der Gefäßwand oder damit assoziierten Thrombosen oder Embolien verschlossen. Dieses führt zu Infarkten der zu versorgenden Organe und kann in

einem Myokardinfarkt, Schlaganfall oder einer peripheren Ischämie resultieren [Miller und Megson, 2007].

Aufgrund seiner komplexen Pathophysiologie und multifaktoriellen Ätiologie ist die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen problematisch. Eine Vielzahl an Studien zeigen, dass die meisten Patienten mit einem kardiovaskulären Risikofaktor auch weitere besitzen [Poulter, 1999]. Ein Ansatzpunkt für die Behandlung mehrerer Risikofaktoren ist die Therapie der endothelialen Dysfunktion, da alle Risikofaktoren, wie Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus etc., mit dieser zusammenhängen [Yetik-Anacak und Catravas, 2006]. Die Substitution von NO und damit die Therapie der endothelialen Dysfunktion stellt daher einen interessanten Therapieansatz dar.

2.1.2 NO-Donoren

Die therapeutische Nutzung von NO-Gas ist problematisch und wird nur bei pulmonaler Hypertonie und bei Neugeborenen angewendet, da beim Umgang ein kompletter Ausschluss von Sauerstoff gewährleistet werden muss, um eine Oxidation zu Stickstoffdioxid zu vermeiden [Greenough, 2000; Griffiths und Evans, 2005]. Aufgrund dessen wird zur Verabreichung ein Arzneistoff benötigt, der NO freisetzen kann und das Radikal bis zur Abgabe stabilisiert.

Zu den bereits zugelassenen NO-Donoren gehören die organischen Nitrate. Glyceroltrinitrat und Isosorbidmononitrat werden zur Behandlung der Angina pectoris angewendet. Der genaue Mechanismus der NO-Freisetzung ist bis heute nicht geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass NO enzymatisch und nicht rein chemisch freigesetzt wird [Daiber *et al.*, 2008]. Die wichtigste Limitierung der Therapie, die Entwicklung einer Toleranz nach längerer ununterbrochener Einnahme, die nur durch ein Nitrat-freies Intervall im Therapie-Regime verhindert werden kann, wird der Beteiligung von Enzymen zugeschrieben [Gori und Parker, 2002]. Diese Behandlungspause ist für einige Anginaformen problematisch und soll mit einer endothelialen Dysfunktion und erhöhtem oxidativen Stress assoziiert sein [Sage *et al.*,

2000]. Die häufigste Nebenwirkung der Nitrat-Therapie ist der vasomotorische Kopfschmerz.

Ebenfalls zugelassen ist Molsidomin, welches zur Stoffklasse der Sydnonimine gehört und eine stabile Substanz ist, die unter Lichtschutz bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Molsidomin wird heute als Antihypertensivum eingesetzt. Die Freisetzung von NO erfolgt sowohl über enzymatische als auch nicht-enzymatische Schritte. Da dabei stöchiometrische Mengen an Superoxidanionen entstehen, ist die Bildung von Peroxynitrit unvermeidbar, das zu einer Lipid-Peroxidation von LDL führen kann [Wang *et al.*, 2002].

Ein weiterer klinisch relevanter NO-Donor ist Nitroprussid-Natrium, welches gewebeabhängig unter physiologischen Bedingungen NO freisetzt und zur Senkung des Blutdruckes bei hypertensiven Krisen eingesetzt wird [Grossi und D'Angelo, 2005]. Nachteil dieses Arzneistoffes ist die schlechte orale Bioverfügbarkeit, die eine intravenöse Gabe erforderlich macht, die Empfindlichkeit gegenüber Photolyse, eine schwierige Dosistitration und eine in seltenen Fällen auftretende Cyanid-Vergiftung [Butler *et al.*, 1987].

Neben den oben genannten Arzneistoffen zählen zur Gruppe der NO-Donoren noch Diazeniumdiolate, Furoxane, NO-Hybride mit anderen Arzneistoffen und S-Nitrosothiole, die jedoch bisher keine therapeutische Anwendung finden [Wang *et al.*, 2002].

Alle klinisch relevanten Arzneistoffe bringen einige Nachteile mit sich, so dass die Suche nach neuen NO-Donoren gefordert ist.

2.1.2.1 L-Arginin als NO-Donor

Die natürliche Quelle von Stickstoffmonoxid im Körper ist L-Arginin. Diese semiessentielle Aminosäure wird über die Nahrung aufgenommen sowie über endogene Synthese und den Umbau von körpereigenen Proteinen gewonnen. Für gesunde Erwachsene ist L-Arginin eine nichtessentielle Aminosäure, da diese ihren Bedarf vollständig über die endogene Synthese decken können. Kleinkinder,

Heranwachsende sowie Erwachsene, die unter katabolischem Stress oder einer Fehlfunktion der Niere bzw. des Dünndarms leiden, müssen L-Arginin zusätzlich über die Nahrung aufnehmen [Morris, 2006]. Es wird angenommen, dass aus dem Extrazellulärraum importiertes L-Arginin das bevorzugte Substrat für die NO-Synthese in den Endothelzellen darstellt. Dieses Phänomen wird Arginin-Paradoxon genannt [Bode-Boger *et al.*, 2007].

Etwa 40 % des L-Arginins in der Nahrung werden im Darm durch die intestinale Arginase abgebaut, bevor es in den Blutkreislauf gelangen kann. Neben dem Einbau in Proteine wird L-Arginin ausgiebig metabolisiert und dient als Vorstufe für weitere biologisch wichtige Substanzen wie Harnstoff, Kreatin, Polyamine, L-Prolin, L-Glutamat und Agmatin [Wu und Morris, 1998]. Derartig konkurrierende Stoffwechsellagen limitieren die Bioverfügbarkeit von L-Arginin als Substrat für die NOS.

In zahlreichen Studien zeigte die Gabe von L-Arginin positive Effekte auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine Supplementation verbesserte u.a. die endotheliale Funktion und Insulin-Sensitivität von Typ 2-Diabetikern, führte zu einer Endothel-abhängigen Dilatation bei jungen Erwachsenen mit Hypercholesterolämie und reduzierte bei Rauchern die verstärkte Monozyten-Adhäsion an Endothelzellen [Adams *et al.*, 1997; Clarkson *et al.*, 1996; Lucotti *et al.*, 2009; Lucotti *et al.*, 2006]. Diese Effekte wurden erzielt, obwohl die Michaelis-Menten-Konstante von L-Arginin an der eNOS ($K_m \sim 3 \mu\text{M}$) deutlich unterhalb der Plasmakonzentration (60 – 140 μM) liegt und somit eigentlich genug endogenes L-Arginin als Substrat für die NOS vorliegen sollte. Als Begründung für diesen Effekt wird bei den untersuchten Patienten eine pathologisch erhöhte Konzentration an asymmetrischem N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) diskutiert. ADMA ist ein kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthase. Um diesen endogenen Inhibitor vom aktiven Zentrum zu verdrängen, muss L-Arginin in höherer Konzentration vorliegen [Boger *et al.*, 2003]. Ein erhöhter ADMA-Spiegel tritt z.B. bei Diabetes mellitus Typ 2, Hypercholesterolämie oder einer pulmonalen Hypertonie auf

[Boger *et al.*, 1998; De Gennaro Colonna *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2007]. Darüber hinaus kann ein erhöhter L-Arginin-Bedarf aus einer gesteigerten Aktivität des Enzyms Arginase resultieren. Dieses Enzym baut L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin ab, so dass die NOS mit der Arginase um dasselbe Substrat konkurriert. Die dadurch verminderte NO-Synthese kann zu einer Vielzahl von pathologischen Zuständen führen und wird u.a. mit Hypertonie, Diabetes mellitus oder der erektilen Dysfunktion in Verbindung gebracht [Bivalacqua *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004].

Obwohl die Gabe von L-Arginin in einer großen Anzahl an Studien eine gute Wirksamkeit aufwies, wird der therapeutische Einsatz der Aminosäure nicht uneingeschränkt positiv bewertet. In einigen Studien konnten keine positiven Effekte durch L-Arginin erzielt werden [Blum *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2001]. Wilson *et al.* entdeckten 2007, dass die intestinale Arginase durch Dauergabe von 3 g L-Arginin über sechs Monate induziert wurde und dieses zu einer Toleranzentwicklung durch eine erhöhte präsystemische Elimination führte.

Eine Wirksamkeit wird nach Böger (2008) nur dann erreicht, wenn

- L-Arginin bei peroraler Applikation in hohen Dosen gegeben wird (mindestens 2 - 3 g),
- eine bestehende Beeinträchtigung des endothelialen L-Arginin-NO-Metabolismus durch Supplementation von L-Arginin aufgehoben werden kann, z.B. bei einem erhöhten Arginin-Verlust, einer verstärkten Arginin-Metabolisierung oder einer erhöhten ADMA-Konzentration,
- Patienten keine optimale Arzneimittelbehandlung erhalten und
- die L-Arginin-Supplementation bereits im frühen Krankheitsverlauf, wenn funktionelle Änderungen noch reversibel sind, beginnt.

Nur eine begrenzte Anzahl an Patienten profitieren folglich von einer L-Arginin-Einnahme. Weiterhin wurde eine Studie abgebrochen, da in der Verum-Gruppe sechs Patienten starben (keiner in der Placebo-Gruppe) und zusätzlich kein positiver Nutzen von L-Arginin festgestellt werden konnte [Schulman *et al.*, 2006].

Durch diese Limitierungen ist L-Arginin für die Therapie von NO-defizienten Erkrankungen nur bedingt geeignet, so dass ein Bedarf für die Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten resultiert.

2.1.2.2 N^{ω} -Hydroxy-L-arginin als NO-Donor

N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) ist das natürliche Intermediat der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO durch die NO-Synthase. Neben der Funktion als Substrat für die NOS besitzt NOHA eine potente inhibitorische Wirkung auf die Arginase und bietet so eine interessante Therapiemöglichkeit sowohl für NO-defiziente Erkrankungen als auch Erkrankungen, die durch eine erhöhte Arginase-Aktivität hervorgerufen werden [Singh *et al.*, 2000]. Die Zusammenhänge der beiden Stoffwechselwege sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

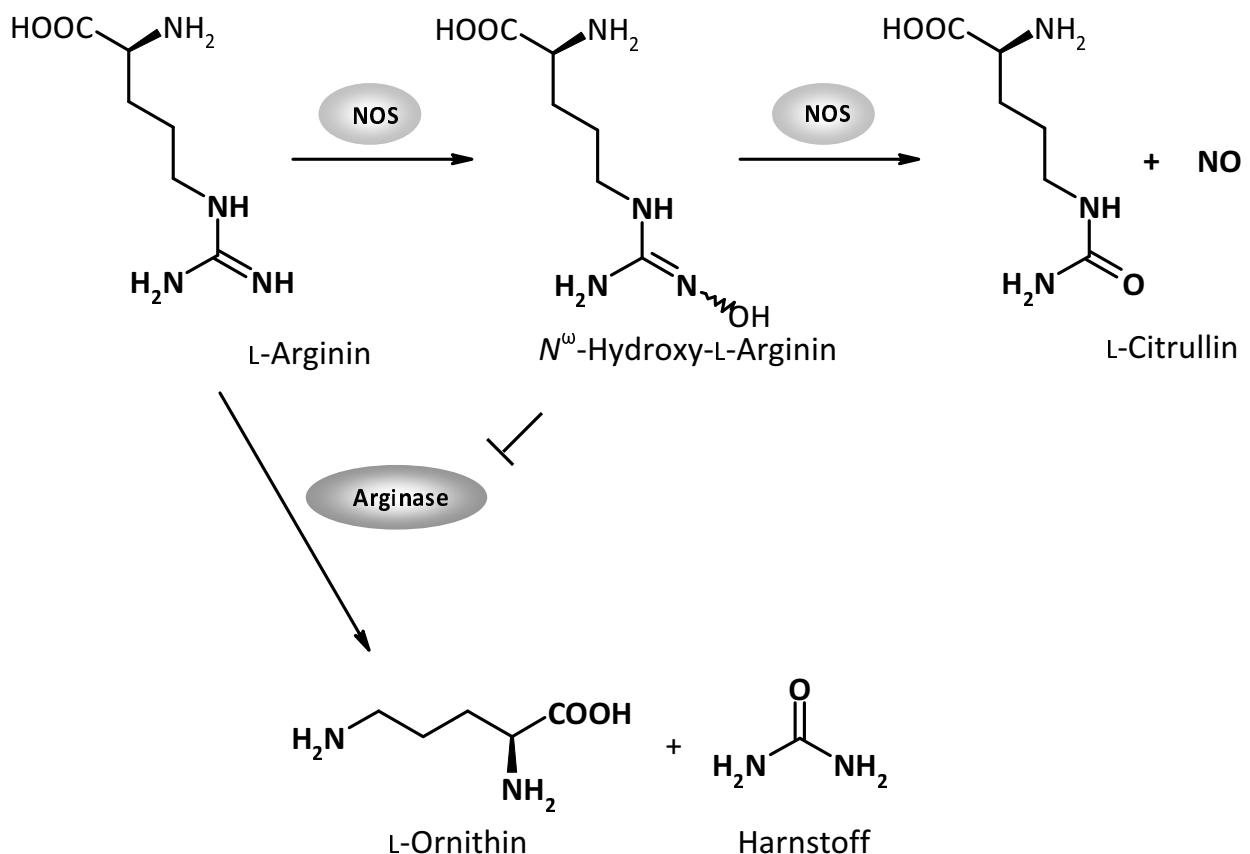


Abb. 2.1: Umsetzung von L-Arginin durch NO-Synthase (NOS) und Arginase.

L-Arginin steht sowohl der NO-Synthase als auch der Arginase als Substrat zur Verfügung. Die NO-Synthase setzt, wie oben beschrieben, L-Arginin zu L-Citrullin und

NO um und erhält damit die vaskuläre Homöostase durch Senkung des Gefäßwiderstandes, der Thrombozytenaggregation und Hemmung von Entzündungsprozessen [Holowatz und Kenney, 2007]. Die Arginase setzt L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin um und kann die Substratverfügbarkeit an der NO-Synthase reduzieren [Berkowitz *et al.*, 2003]. Steht der NOS nicht mehr genügend Substrat zur Verfügung, sinkt die NO-Synthese und die NOS kann entkoppeln. Dieses resultiert in einer Bildung von Sauerstoffradikalen, die wiederum NO inaktivieren, sodass die Entstehung von NO noch weiter reduziert wird. Zusätzlich ist die Arginase an der Entstehung von vaskulären Läsionen beteiligt, da L-Ornithin durch die Ornithin-Decarboxylase zu Polyaminen und durch die Ornithin-Aminotransferase zu L-Pyrrolin-5-carboxylat und nachfolgend zu L-Prolin umgesetzt wird. Polyamine wie Spermin und Spermidin spielen eine integrale Rolle bei der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, L-Prolin ist an der Kollagen-Synthese beteiligt [Durante *et al.*, 2007].

Endotheliale Dysfunktion, Hypertonie, Atherosklerose, erektile Dysfunktion, Tumorerkrankungen und Leishmaniose sind Erkrankungen, die mit einem NO-Defizit und einer erhöhten Arginase-Expression einhergehen, so dass eine Therapie mit einem NO-Donor, der gleichzeitig die Arginase hemmt, von Vorteil ist [Berkowitz *et al.*, 2003; Holowatz und Kenney, 2007; Kropf *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2000; Yang und Ming, 2006].

2.1.2.3 N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs

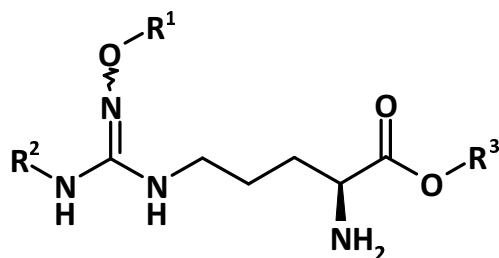
Durch seine Substrateigenschaft an der NOS und seine inhibitorische Wirkung auf die Arginase bietet sich N^{ω} -Hydroxy-L-arginin als eine interessante Alternative für bekannte NO-Donoren an. Allerdings ist die Substanz aufgrund ihrer Instabilität und mangelhaften pharmakokinetischen Eigenschaften nur bedingt als Arzneistoff einsetzbar. Die Hydroxyguanidin-Funktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin ist hydrolyse- und oxidationsempfindlich und sollte daher durch geeignete Substituenten geschützt werden [Cai *et al.*, 2002; Fukuto, 1996].

Aus diesem Grund wurden von Schade (2008) NOHA-Prodrugs synthetisiert, die sich durch eine erhöhte Stabilität auszeichnen, so dass die biologischen Halbwertszeiten nicht durch rein chemische Zersetzungsprozesse begrenzt werden. Hierfür wurden die NOHA-Derivate an der Hydroxyguanidin-Funktion *O*-substituiert [Schade, 2008].

Da NOHA unter physiologischen Bedingungen einen zwitterionischen Charakter besitzt, ist eine passive Diffusion unwahrscheinlich. Aufgrund dessen wurden lipophilere Verbindungen synthetisiert, die nach oraler Applikation passiv Biomembranen passieren könnten. Hierzu wurden die Verbindungen an der Hydroxyguanidin-Funktion carbamoyliert und/oder die freie Carboxy-Funktion verestert [Schade, 2008].

Um Aminosäure-Transporter ausnutzen zu können, wurden zusätzlich Substanzen mit freier Aminosäure-Funktion synthetisiert [Schade, 2008]. Eine Übersicht der NOHA-Prodrugs ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Übersicht über die im Arbeitskreis synthetisierten NOHA-Prodrugs [Schade, 2008].



Prodrug	R ¹	R ²	R ³
1	-CH ₃	H	H
2	-CH ₃	H	-Et
3	-CH ₃	-COOEt	H
4	-CH ₂ COOH	H	H
5	-CH ₂ COOEt	-COOEt	H
6	-CH ₂ COOEt	-COOEt	-Et

Darüber hinaus wurde eine Hydroxyguanidin-Modellverbindung (7) bereitgestellt, die *O*-glycosyliert ist (Abb. 2.2).

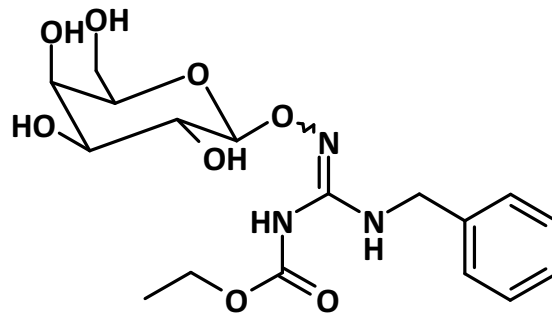


Abb. 2.2: *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N'*-[(β -D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin (7)

Hydroxyguanidine in acetalisch-konjugierter Form können stabiler sein und besitzen den Vorteil, dass sie über Galactosidasen gespalten werden und die abgespaltenen Monosaccharide toxikologisch unbedenklich sind. Des Weiteren können sie über Zucker-Transporter in Zellen aufgenommen werden [Melisi *et al.*, 2006]. Galactose wurde ausgewählt, da Wu *et al.* (2001) in Studien mit Diazeniumdiolaten, an die verschiedene Zucker gebunden wurden, beobachteten, dass das β -Galactose-Konjugat am besten enzymatisch gespalten wurde [Wu, 2001].

Durch diese Modifikationen sollten die Prodrugs eine gegenüber NOHA erhöhte Stabilität und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Stabilität dieser verschiedenen NOHA-Prodrugs sowie der *O*-glycosylierten Hydroxyguanidin-Modellverbindung im Vergleich zur physiologischen Verbindung NOHA. Darüber hinaus sollte die enzymatische Freisetzung des pharmakologisch aktiven Metaboliten aus den Prodrugs untersucht werden. Hierzu sollten verschiedene Enzymquellen, sowohl die teilgereinigten Enzymfraktionen Mikrosomen und Mitochondrien als auch hochgereinigte bzw. rekombinante Enzyme wie Esterasen und mARC eingesetzt werden.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Material

2.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. Methanol für die HPLC-Analytik wurde von Mallinckrodt Baker (Griesheim) erworben. Die *N*^ω-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs sowie *N*-Benzyl-*N*'-ethoxycarbonyl-*N*''-[(β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]guanidin wurden im eigenen Arbeitskreis von Schade synthetisiert und für die Experimente zur Verfügung gestellt [Schade, 2008].

2.2.1.2 Geräte

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) in 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) inkubiert und mit Hilfe eines Vortexers VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und eines IKA-Vibrax-VXR Schüttlers (IKA Labortechnik, Staufen) gemischt. Durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen) erfolgte die Abtrennung der Proteine. pH-Werte wurden mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) eingestellt. Das Fließmittel für die HPLC wurde nach Herstellung über einen Sartorius Membranfilter (0,45 µM) filtriert und mit einem Sonorex Super RK 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast. Die Gewinnung der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen erfolgte mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Braun, Melsungen) und einer Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E (Beckmann, München) sowie einer Ultrazentrifuge L7-65 (Beckmann, München).

2.2.1.3 Enzyme

Die hochgereinigten Enzymfraktionen Cytochrom b₅ und die NADH Cytochrom b₅ Reduktase sowie die aus der Schweineleber gewonnene mitochondriale Amidoxim

Reduzierende Komponente (mARC) wurden im Arbeitskreis Clement gereinigt und von A. Havemeyer zur Verfügung gestellt [Havemeyer *et al.*, 2006].

2.2.1.3.1 Gewinnung von Schweinelebermikrosomen

Die verwendeten Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen, direkt nach Tötung und Ausbluten des Tieres entnommen und in gekühltem 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (1 mM Na_2 -EDTA) gelagert und überführt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (1 mM Na_2 -EDTA) wurden die Leberlappen perfundiert und gewaschen. Nach Zerschneiden des Gewebes und Zerkleinerung im handelsüblichen Fleischwolf wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen 50 mM Phosphatpuffer verdünnt und mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert. Mittels einer differentiellen Ultrazentrifugation erfolgte die weitere Gewinnung entsprechend Literaturangaben [Clement *et al.*, 1996; Omura und Sato, 1964]. Die gewonnenen Mikrosomen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.2 Gewinnung von Schweinelebermitochondrien

Die verwendeten Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen und wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben homogenisiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (250 mM Saccharose, 1 mM Na_2 -EDTA) durchgeführt. Zur Abtrennung von groben Zellfragmenten und Zellkernen wurde die erhaltene Suspension zweimal für 20 Minuten bei 750 *g* zentrifugiert. Nach Vereinigung der Überstände wurden die Mitochondrien durch 20-minütige Zentrifugation bei 7710 *g* abgetrennt. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und für 20 Minuten bei 7350 *g* zentrifugiert. Zum Waschen der Mitochondrien folgten, nach Resuspension des Pellets, Zentrifugationen bei 6450 *g* und 5580 *g* über 20 Minuten. Das 5580 *g* Sediment wurde mit wenig Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert [Clement *et al.*, 2005].

2.2.1.3.3 Isolierung der mikrosomalen NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an Karhan (2002) und Clement *et al.* (2005) aus Schweinelebermikrosomen [Karhan, 2002]. NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde nach einer Hydrophoben Interaktionschromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie an FractogelTM TMAE über eine 5'-AMP-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt [Clement *et al.*, 2005].

2.2.1.3.4 Isolierung des mikrosomalen Cytochrom b_5

Die Isolierung von Cytochrom b_5 aus Schweinelebermikrosomen wurde in Anlehnung an Clement *et al.* (1997) durchgeführt. Hierzu wurde mittels einer Hydrophoben Interaktionschromatographie eine Cytochrom b_5 -reiche Fraktion erhalten, welche nachfolgend über eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose sowie durch Gelfiltration an Sephadex[®] G-25 weiter aufgereinigt wurde [Clement *et al.*, 1997].

2.2.1.3.5 Gewinnung der äußeren Mitochondrienmembran (OMV)

Die Gewinnung der äußeren Mitochondrienmembran erfolgte aus Mitochondrien mittels der Swell-Disruption Methode und wiederholter Dichtegradientenzentrifugation nach Havemeyer [Havemeyer, 2006].

2.2.1.3.6 Gewinnung der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente (mARC)

Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente wurde aus der äußeren Mitochondrienmembran (OMV) von Schweinelebern entsprechend Literaturangaben gewonnen [Havemeyer, 2006; Havemeyer *et al.*, 2006]. Hierfür wurde zur Solubilisation der membranständigen Proteine aus der OMV Zwittergent[®] verwendet. Anschließend erfolgte die chromatographische Aufreinigung über eine Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose. Das Enzym wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.7 Gewinnung von humanem Plasma

Humanes Plasma wurde aus humanem Blut gewonnen, welches über freiwillige Blutspenden am Institut erhalten wurde. Dazu wurde das Vollblut für 20 Minuten bei 2500 g zentrifugiert.

2.2.1.4 Charakterisierung der Enzympräparationen

2.2.1.4.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentrationen der Enzympräparationen wurden nach Smith *et al.* (1985) mittels der BCA-Methode bestimmt. Um störende Begleitsubstanzen in den Puffern zu entfernen, wurden die Proteine vor der Analyse mit Hilfe des Compat-Able™ Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) gefällt. Das Pellet wurde mit BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA) aufgenommen und die Probe bei 562 nm vermessen [Smith *et al.*, 1985]. Mithilfe einer, mit bekannten Konzentrationen an Rinderserumalbumin erstellten Kalibriergerade konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

2.2.1.4.2 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes

Die Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung erfolgte nach Omura und Sato (1964). Hierzu wurde ein Kohlenmonoxid-Differenzspektrum aufgenommen und der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ des Fe(II)-CO-Komplexes für die Berechnung des Cytochrom P450-Gehaltes herangezogen [Omura und Sato, 1964].

2.2.1.4.3 Bestimmung des Cytochrom b_5 -Gehaltes

Zur Bestimmung des Cytochrom b_5 -Gehaltes wurde nach dem Verfahren von Estabrook und Werringloer (1978) ein Differenzspektrum von oxidierten und NADH vermittelter reduzierter Form des Cytochrom b_5 aufgenommen [Estabrook und Werringloer, 1978]. Die resultierende Absorptionsdifferenz zwischen dem ermittelten Absorptionsmaximum ($\sim 426 \text{ nm}$) und -minimum ($\sim 409 \text{ nm}$) wurde berechnet und daraus, unter Berücksichtigung des Absorptionskoeffizienten $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ der reduzierten Form des Cytochrom b_5 , der Cytochrom b_5 -Gehalt ermittelt.

2.2.2 Analytische Methoden

2.2.2.1 HPLC-Analytik der NOHA-Derivate

Die Aminosäuren wurden nach *o*-Phthaldialdehyd (*o*-Pa)-Vorsäulenderivatisierung über eine HPLC-Analytik getrennt. Der Nachweis erfolgte per Fluoreszenz-Detektion.

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters Fluorescence Detector 470 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: Nova-Pak[®] RP-18-Säule 4 µm (150,0 × 4,0 mm, VDS Optilab)
Vorsäule: Phenomenex[®] C18 (4,0 × 3,0 mm, Phenomenex)

Temperatur: 37 °C

Mobile Phase: Eluent A: 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer 78 %
Methanol 22 % (v/v)
Eluent B: Methanol 80 %
Aqua bidest. 20 % (v/v)

Flussrate: 1 ml/min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
12	90	10
25	0	100
27	90	10
35	90	10

Laufzeit: 35 min

Injektionsvolumen: 10 µl

Derivat.- Reagenz: 50 mg *o*-Phthaldialdehyd gelöst in 1 ml Methanol

+ 9 ml 200 mM Kaliumborat-Puffer pH 9,4

+ 53 µl 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Der Autosampler wurde so programmiert, dass 10 µl der Probe mit 14 µl des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt wurden. Nach einer zweiminütigen Reaktionszeit wurde die Probe injiziert.

Detektion: Fluoreszenz: $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$

Retentionszeiten: L-Citrullin: 5,7 ± 0,2 min

NOHA: 7,5 ± 0,2 min

L-Arginin: 9,1 ± 0,2 min

Prodrug 1: 11,7 ± 0,2 min

Prodrug 2: 22,2 ± 0,1 min

Prodrug 3: 19,4 ± 0,1 min

Prodrug 4: 3,5 ± 0,2 min

Prodrug 5: 19,8 ± 0,1 min

Prodrug 6: 21,7 ± 0,5 min

2.2.2.2 HPLC-Analytik von *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]-guanidin

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: Nova-Pak[®] RP-18-Säule 4 µm (150,0 × 4,0 mm, VDS Optilab)

Vorsäule: Phenomenex[®] C18 (4,0 × 3,0 mm, Phenomenex)

Temperatur: 37 °C

Mobile Phase: 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer 72 %

Methanol 28 % (v/v)

Flussrate:	1,0 ml/min
Laufzeit:	20 min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV: 210 nm
Retentionszeit:	Prodrug 7 15,2 ± 0,1 min
	Metabolit 6,3 ± 0,5 min

2.2.2.3 LC/MS-Analytik

Zur Identifizierung der gebildeten Metabolite wurde eine LC/MS-Analytik entwickelt. Die Aminosäuren wurden nach *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung über eine HPLC-Analytik getrennt.

MS:	Esquire LC (Bruker Daltonics, Bremen)
HPLC-Pumpe:	HP Series 1100 Binary Pump G1312A (Hewlett Packard, Waldbronn)
Detektor:	HP 1100 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor:	Rheodyne 7725, 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion
Interface:	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)
Trockentemperatur:	350 °C
Trockengas:	6 l/min
Sprühdruck:	40 psi
Scan:	50 - 650 m/z
Software:	Agilent ChemStation HPLC Aufnahme- und Auswertesoftware (Version A.09.01) Esquire Control (Version 6.14) MS Aufnahmesoftware Data Analysis (Version 3.0) MS Auswertesoftware
Stationäre Phase:	Nova-Pak® RP-18-Säule 5 µm (150 x 4,6 mm, VDS Optilab)

Vorsäule: Phenomenex® C18 (4 x 3,0 mm, Phenomenex)

Temperatur: Raumtemperatur

Mobile Phase: Eluent A: 10 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4,5 78 %
Methanol 22 % (v/v)

Eluent B: Methanol 80 %
Aqua bidest. 20 % (v/v)

Flussrate: 1 ml/min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
10	80	20
11	0	100
20	0	100
21	80	20
30	80	20

Laufzeit: 30 min

Injektionsvolumen: 10 μ l

Derivat.- Reagenz: 50 mg *o*-Phthaldialdehyd gelöst in 1 ml Methanol
+ 9 ml 200 mM Kaliumborat-Puffer pH 9,4
+ 53 μ l 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Vor der manuellen Injektion wurden 10 μ l der Probe mit 14 μ l des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt und eine Reaktionszeit von zwei Minuten eingehalten.

Detektion: UV: 220 nm

Retentionszeiten:	Prodrug 1 :	11,4 ± 0,1 min
	Prodrug 2 :	19,2 ± 0,5 min
	Prodrug 3 :	15,3 ± 0,3 min

2.2.2.4 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methoden

Zur Kalibrierung wurden sechs Konzentrationen (0,25 – 250 µM, Prodrug **2**: 10 µM – 1 mM) von NOHA, L-Arginin sowie von den Prodrugs **1** - **7** in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,3 hergestellt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die Verbindungen in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung eingesetzt und zu 0,3 mg hitzedenaturiertem Schweineleberhomogenat in einem Endvolumen von 125 µl zugesetzt. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden 125 µl Methanol zugegeben, fünf Minuten geschüttelt und für fünf Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden abnehmende Konzentrationen der Verbindungen in Standardinkubationsansätzen vermessen, die jedoch hitzedenaturiertes Enzym enthielten. Die Ansätze wurden, wie für die Wiederfindung beschrieben, weiterbehandelt.

2.2.2.5 Stabilitätsprüfung

2.2.2.5.1 pH-Stabilität

Die pH-Stabilität wurde durch Inkubation der Prodrugs in 10 mM Phosphatpuffer pH 2, pH 7,4 und pH 9 überprüft. Dazu wurden die Prodrugs in einer Konzentration von 250 µM in 125 µl der jeweiligen Puffer gelöst und bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu Beginn und nach 3, 6, 9 und 24 Stunden wurden Proben gezogen und jeweils 125 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zugegeben, um wieder einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Dieses ist für die spätere Detektion wichtig, da das Derivatisierungsreagenz *o*-Pa im Sauren nicht mit den Aminosäuren reagiert. Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen pH-Werten ziehen zu können, sollte der pH-Wert vor der Vermessung gleich sein. In Vortests wurde die Stabilität der

Prodrugs bei pH 7,4 untersucht und gezeigt, dass sich nur wenige Prodrugs bei pH 7,4 zersetzen. Die geringe Zersetzung wurde toleriert, da ein Kompromiss zwischen Stabilität und für die Vorsäulenderivatisierung benötigtem pH-Wert getroffen werden musste. Die Vermessung der Proben erfolgte über HPLC nach den in Kapiteln 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschriebenen Methoden.

2.2.2.5.2 Oxidative Stabilität

Die Bestimmung der oxidativen Stabilität erfolgte nach Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Hierzu wurden die Prodrugs in einer Konzentration von 250 µM in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit jeweils 500 µM Kaliumhexacyanoferrat(III), 500 µM Kupferacetat, 500 µM Peroxynitrit oder 29 mM Wasserstoffperoxid versetzt und bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Zu Beginn, nach zehn Minuten sowie 3, 6, 9 und 24 Stunden wurden Proben genommen, mit Methanol 1:1 verdünnt und sofort per HPLC mittels den in den Kapiteln 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschriebenen Methoden vermessen. In Vortests wurde untersucht, inwieweit die Oxidationsmittel Einfluss auf die Vorsäulenderivatisierung besitzen, da für die Derivatisierung 2-Mercaptoethanol benötigt wird, welches durch Oxidationsmittel oxidiert werden könnte. Die Zugabe an Oxidationsmittel störte die Detektion jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

2.2.2.6 Inkubation mit unspezifischer Carboxylesterase

Die Inkubationsansätze für die Hydrolyse der Prodrugs enthielten 250 µM Prodrug und 2,5 U unspezifische Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber, gelöst in 125 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Nach einer dreiminütigen Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe der Carboxylesterase gestartet und die Ansätze unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden zu Beginn sowie jeweils nach 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten gezogen. Diese wurden mit 125 µl Methanol versetzt, fünf Minuten geschüttelt und anschließend fünf Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC nach den in den Kapiteln 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschriebenen Methoden vermessen.

2.2.2.7 Inkubation mit humanem Plasma

Für die Inkubation mit humanem Plasma wurde das Substrat in einer Konzentration von 250 μM in 125 μl humanem Plasma gelöst. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen. Zu Beginn und nach 120 min wurden die Proben mit 125 μl eiskaltem Methanol versetzt und nach fünfminütigem Schütteln fünf Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels LC/MS nach der in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Methode vermessen.

2.2.2.8 Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardinkubationsansatz mit einem Endvolumen von 250 μl war wie folgt zusammengesetzt: 0,3 mg Protein, 1 mM Substrat und 1 mM NADH oder NADPH in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 (Mitochondrien) oder 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 (Mikrosomen) [Clement und Lopian, 2003]. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates gestartet, nach einer Minute sowie nach 30 und 60 Minuten Proben gezogen und durch Zugabe von eiskaltem Methanol die Reaktion abgestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 U/min abgetrennt. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt und mit der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Methode vermessen.

2.2.2.9 Inkubation mit porciner OMV

Der Standardinkubationsansatz bestand aus 6 μg Protein, 1 mM NADH oder 1 mM NADPH und 500 μM Substrat in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0 in einem Endvolumen von 150 μl . Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Cosubstrat gestartet. Die Inkubation fand unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad statt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl eiskaltem Methanol gestoppt, fünf Minuten geschüttelt und nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10000 U/min der Überstand der HPLC zugeführt. Als

Positivkontrolle wurde Benzamidoxim in einer Konzentration von 500 µM inkubiert und wie oben beschrieben behandelt. Die Positivkontrollen wurden von A. Havemeyer vermessen.

2.2.2.10 Inkubation mit mARC

Die Inkubation fand im Schüttelwasserbad bei 37 °C unter aeroben Bedingungen statt. Der Standardinkubationsansatz setzte sich aus 0,24 µg mARC, 200 pmol Cytochrom b₅, 0,1 U b₅-Reduktase, 500 µM Substrat, 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0 mit einem Endvolumen von 150 µl zusammen. Nach einer Vorinkubation von drei Minuten wurde durch Zugabe von NADH die Reaktion gestartet und nach 30 Minuten mit eiskaltem Methanol abgestoppt. Die Proben wurden anschließend fünf Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 U/min abgetrennt. Der Überstand wurde mittels HPLC nach der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Methode vermessen [Gruenewald *et al.*, 2008].

2.2.2.11 Inkubation von *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]-guanidin mit porciner Carboxylesterase und β-Galactosidase

Die Inkubation wurde unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Ein Ansatz bestand aus 2,5 U porciner Carboxylesterase, 0,5 U β-Galactosidase, 500 µM Substrat, 1 mM MgCl₂ und 10 mM 2-Mercaptoethanol gelöst in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 in einem Endvolumen von 200 µl. Die Reaktion wurde nach dreiminütiger Vorinkubation durch Zugabe des Substrates gestartet und zu Beginn, nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten Proben genommen. Nach Zugabe von 200 µl eiskaltem Methanol wurden die Proben fünf Minuten geschüttelt und nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10000 U/min der Überstand der HPLC zugeführt. Die Vermessung erfolgte nach der in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

2.2.2.12 Charakterisierung der entstandenen D-Galactose mit Hilfe der Galactose-Dehydrogenase

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methoden

Die durchgeführten Kalibrierungen und Wiederfindungen waren für alle untersuchten Verbindungen in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 \geq 0,994$). Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche des resultierenden Peaks der jeweiligen Verbindung. Die ermittelten Wiederfindungen und die Bestimmungsgrenze für die jeweiligen Verbindungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tab. 2.2: Übersicht über die Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungen der Verbindungen.

Verbindung	Bestimmungsgrenze [μM]	Wiederfindung [%]
NOHA	0,05	92
L-Arginin	0,05	180
1	0,05	101
2	10	n.b.
3	0,01	n.b.
4	0,01	97
5	0,01	n.b.
6	0,5	n.b.
7	0,5	n.b.

Die Bestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils drei voneinander unabhängigen Bestimmungen. n.b., nicht bestimmt. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 2.1.

Die hohe Wiederfindung von L-Arginin resultiert wahrscheinlich aus der Freisetzung von L-Arginin aus dem zugegebenen Protein.

2.3.2 Stabilitätsprüfung

2.3.2.1 pH-Stabilität

Durch Inkubation in Phosphatpuffer pH 2, pH 7,4 und pH 9 wurde die Stabilität der Prodrugs bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die meisten Verbindungen über diesen pH-Bereich stabil sind. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

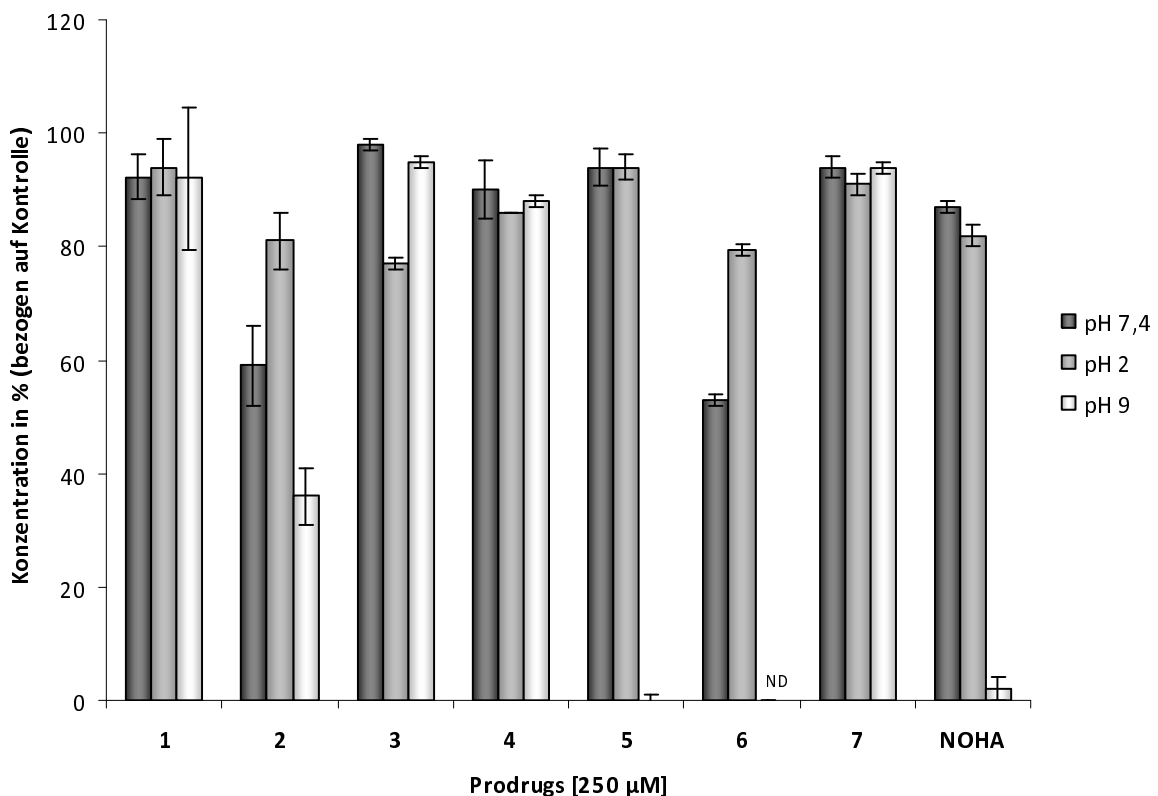


Abb. 2.3: Stabilität der Verbindungen in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4, pH 2 und pH 9 nach 24-stündiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. ND = nicht detektierbar; Kontrolle = Konzentration der Verbindung zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 2.1.

Prodrugs 1, 3, 4 und 7 sind über den gesamten Messzeitraum in allen Medien ausreichend stabil. Die maximale Zersetzung beträgt hier 23 % (Prodrug 3, pH 2) innerhalb von 24 Stunden. Die Stabilität der Ester-Prodrugs und von NOHA ist v.a. im Alkalischen geringer.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, zersetzt sich NOHA im Alkalischen sehr schnell [Fukuto, 1996]. Nach drei-stündiger Inkubation konnten nur noch ca. 20 %, nach 24-stündiger Inkubation nur noch 2 % der Ausgangskonzentration detektiert werden. Bei pH 2 und pH 7,4 ist es über den gesamten Messzeitraum stabil (Abbildung 2.4).

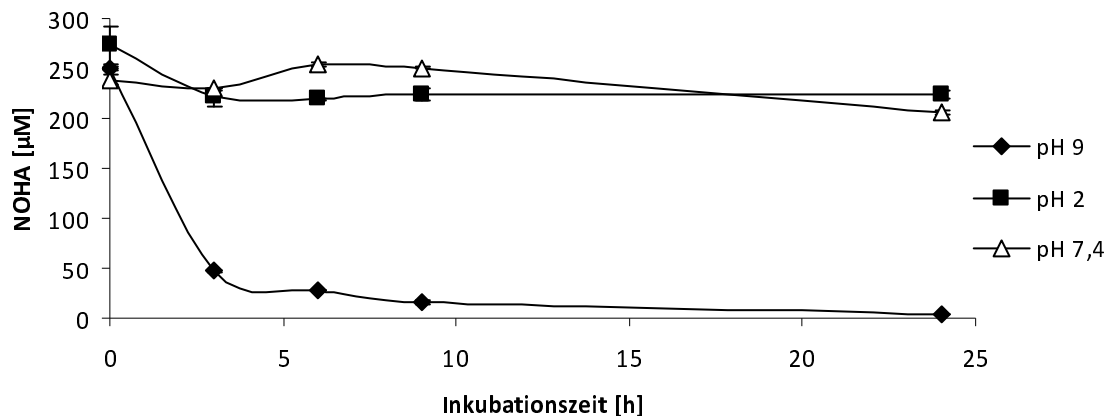


Abb. 2.4: Konzentrationsverlauf von NOHA über 24 Stunden in 10 mM Phosphatpuffer pH 2, pH 9 und pH 7,4 nach Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Prodrug **2** besitzt die höchste Stabilität im Sauren, so dass nach 24-stündiger Inkubation bei pH 2 noch ca. 80 % der Ausgangskonzentration gefunden werden konnte. Da bekannt ist, dass Ester im Basischen hydrolytisch gespalten werden, ist die Instabilität von Prodrug **2** bei pH 9 erwartungsgemäß. Es entsteht Prodrug **1**, welches durch einen Peak bei einer Retentionszeit von 11,7 min eindeutig identifiziert werden konnte. Nach 24-stündiger Inkubation bei pH 7,4 waren noch 59 %, bei pH 9 noch 36 % der Ausgangskonzentration vorhanden. In Abbildung 2.5 ist der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte des Puffermediums auf die Stabilität des Prodrugs **2** in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.

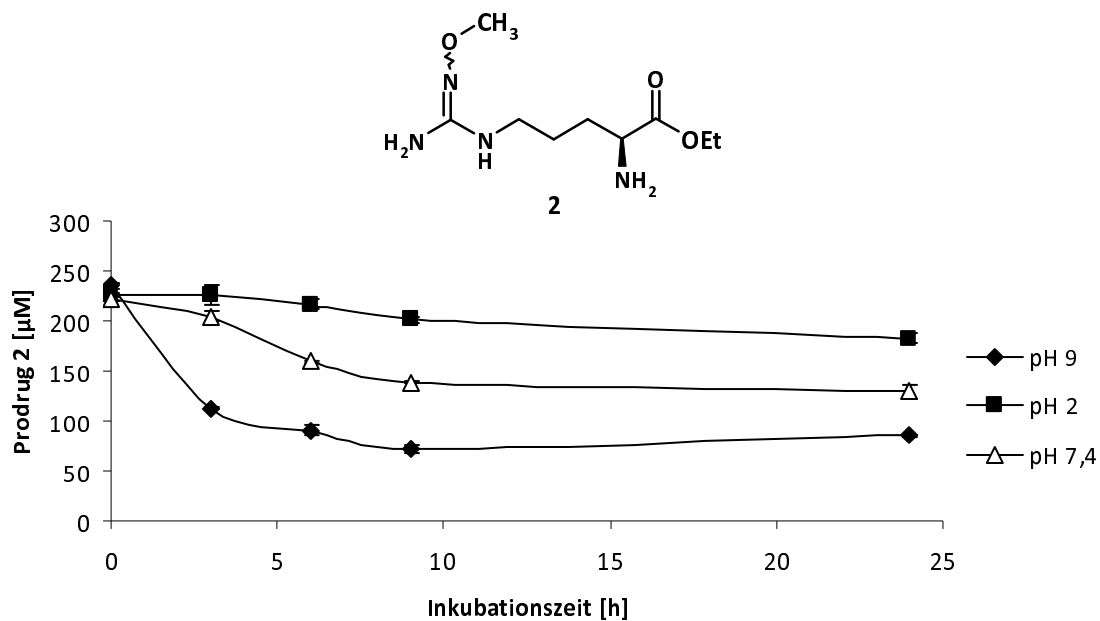


Abb. 2.5: Konzentrationsverlauf von Prodrug 2 über 24 Stunden in 10 mM Phosphatpuffer pH 2, pH 9 und pH 7,4 nach Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 2.5 zu entnehmen ist, zeigt sich, dass die Zersetzung bereits innerhalb der ersten zehn Stunden erfolgt und sich dann nicht mehr signifikant ändert.

Prodrug 5 besitzt eine hervorragende Stabilität bei pH 2 und pH 7,4. Bei pH 9 zersetzt sich das Prodrug aufgrund der Spaltung der Esterfunktion sehr schnell und vollständig (Abb. 2.6). Prodrug 6 zeigt eine ähnliche Instabilität wie Prodrug 2. Die Stabilität ist auch hier bei pH 2 am größten, bei der sich nur ca. 15 % des Prodrugs innerhalb einer 24-stündigen Inkubation zersetzt. Wurde das Prodrug bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert, so konnten nach 24 Stunden noch 53 % der Ausgangskonzentration detektiert werden. Die Instabilität im alkalischen Medium ist abermals auf die Esterspaltung zurückzuführen (Abb. 2.6).

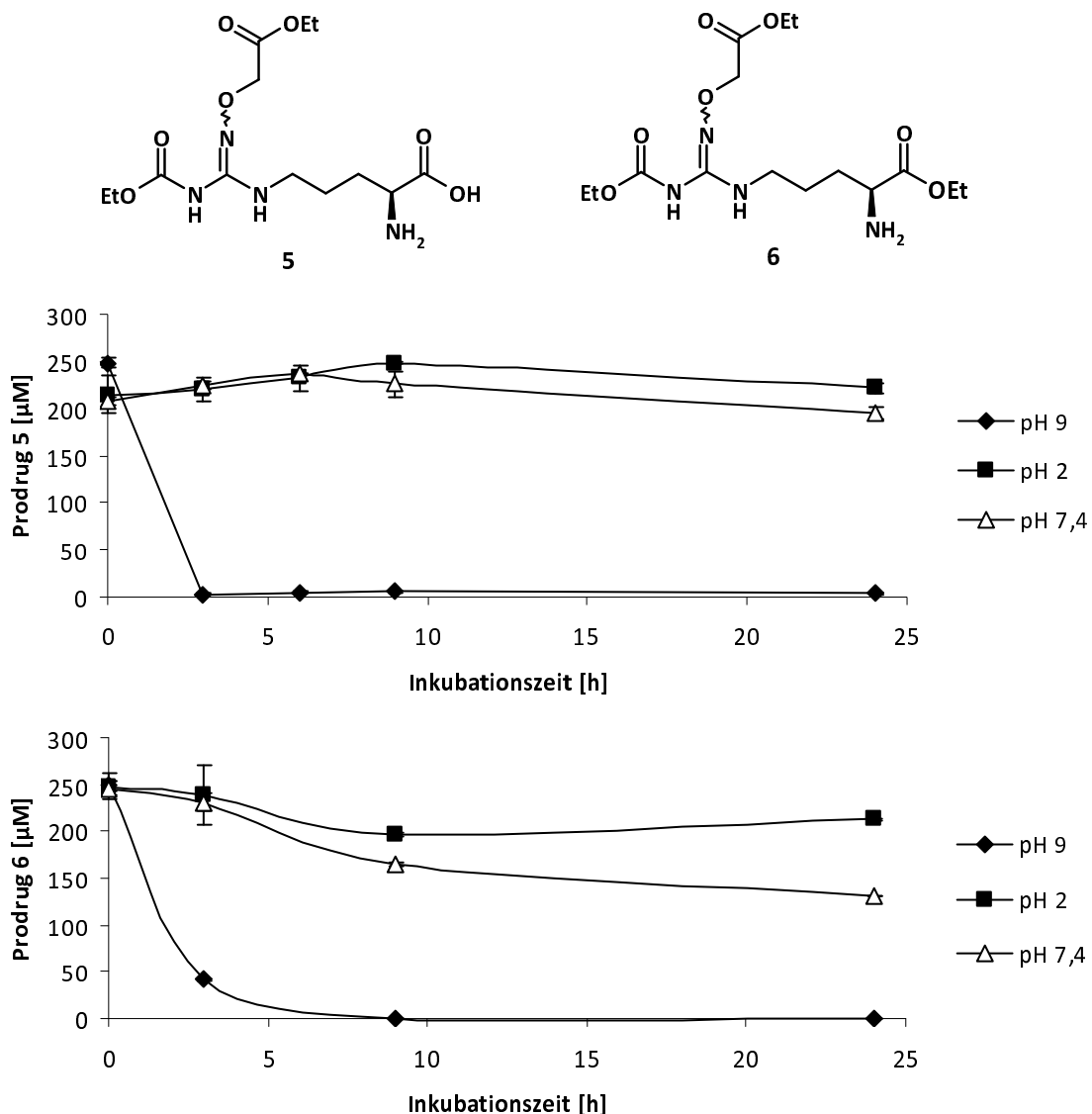


Abb. 2.6: Konzentrationsverlauf der Prodrugs 5 und 6 über 24 Stunden in 10 mM Phosphatpuffer pH 2, pH 9 und pH 7,4 nach Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebene Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 2.7 dargestellt, zersetzt sich Prodrug 6 durch Esterspaltung zu Prodrug 5 und einer unidentifizierten Verbindung, die einen Peak bei 18,8 min aufweist. Auch bei der Stabilitätsuntersuchung von Prodrug 5 konnte dieser Peak detektiert werden.

Es liegt nahe, dass sich das unbekannte Zersetzungsprodukt durch die Spaltung des Esters an der Carboxymethylgruppe gebildet hat. Diese These stützt auch die Beobachtung, dass bei der Umsetzung von beiden Verbindungen mit unspezifischen

Carboxylesterasen im Chromatogramm der HPLC-Analytik ein Peak mit derselben Retentionszeit entsteht (vgl. Kap. 2.3.3). Da jedoch kein Standard für diese Verbindung zur Verfügung stand und die Bestimmung über Massenspektrometrie aufgrund der Instabilität des Metaboliten nicht möglich war, konnte die Identität nicht eindeutig geklärt werden.

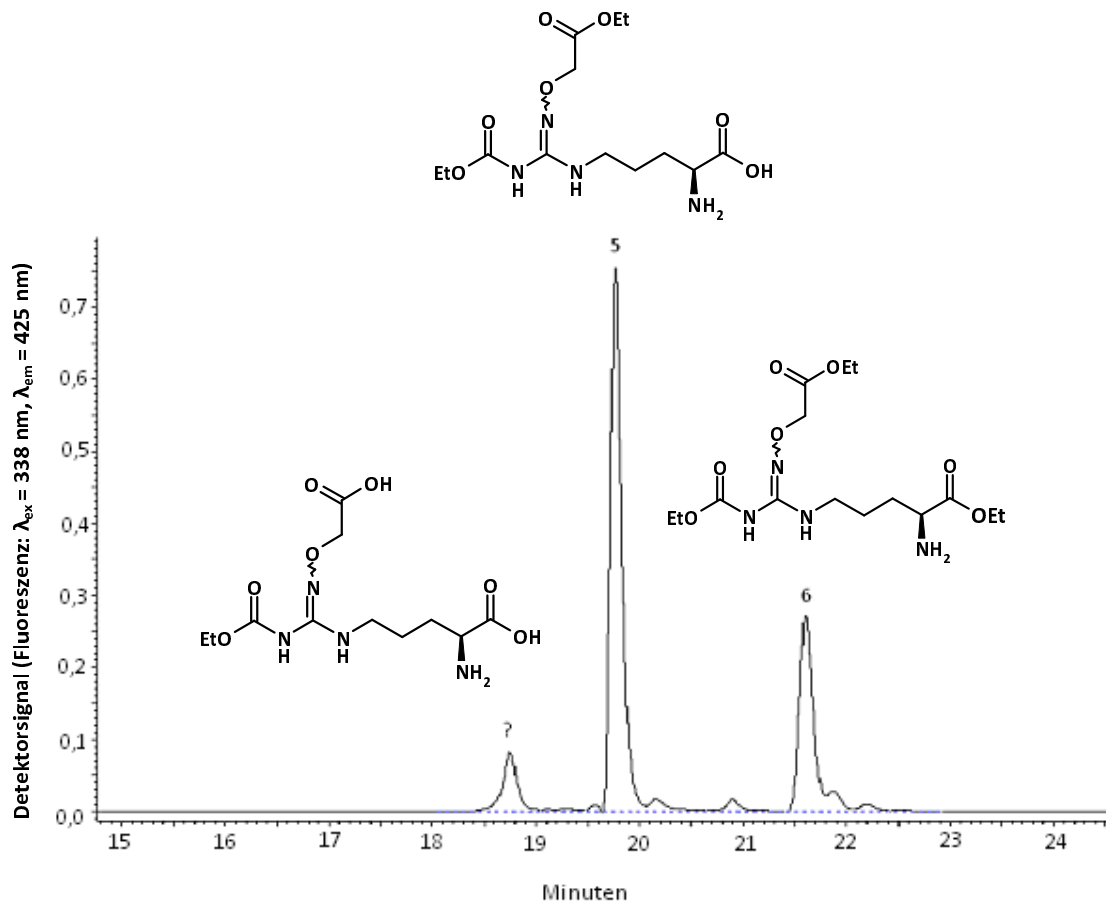


Abb. 2.7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm nach Inkubation des Prodrugs **6** in Phosphatpuffer pH 9 bei 37 °C. Die Trennung über HPLC wurde mit der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Methode durchgeführt. ? = unbekanntes Zersetzungsprodukt.

Der Carbamat-Rest in Prodrug **3** wird durch keine der gewählten Bedingungen gespalten.

Durch die *O*-Substitution konnte die Stabilität im Vergleich mit NOHA deutlich gesteigert werden. Bemerkenswerterweise sind die Prodrugs **1**, **3** und **4** über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden in allen untersuchten Medien stabil, während sich NOHA sehr schnell im Basischen zersetzt. Erstaunlich ist die hohe

Stabilität der *O*-glycosylierten Hydroxyguanidin-Modellverbindung (Prodrug **7**) bei pH 2, da Acetale normalerweise im Sauren sehr schnell gespalten werden. Erwartungsgemäß werden die einfachen Carbonsäureester im Basischen gespalten. Da mit pH 9 jedoch eine extreme Bedingung gewählt wurde, die physiologisch kaum erreicht wird und der Messzeitraum mit 24 Stunden sehr lang ist, besitzt die Instabilität im Alkalischen keine große Bedeutung, da bei oraler Gabe trotzdem ausreichend hohe Konzentrationen des Prodrugs absorbiert werden sollten. Auffällig ist die Labilität der Esterfunktion in der α -Aminosäure-Gruppe bei Prodrug **2** und **6**, die für eine Weiterentwicklung berücksichtigt werden sollte.

2.3.2.2 Oxidative Stabilität

Das Ungleichgewicht zwischen der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Inaktivierung dieser durch antioxidative Mechanismen wird oxidativer Stress genannt. Dieser tritt bei einer Reihe von Krankheiten auf und spielt eine zentrale Rolle für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und damit für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen [Higashi *et al.*, 2009].

ROS, wie das Superoxid-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikal, entstehen durch eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität, die Freisetzung von Eisen- und Kupfer-Ionen, durch Metalloproteine, durch den Abfluss von Elektronen aus der mitochondrialen Elektronen-Transportkette sowie eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidoreduktase [Grisham und Granger, 1989; Valko *et al.*, 2005; Webster und Nunn, 1988].

Werden die reaktiven Sauerstoffradikale nicht durch antioxidative Mechanismen inaktiviert, so führen sie zu einer Schädigung von zellulären Membranen und beeinflussen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, so dass Adhäsionsproteine und pro-inflammatorische Zytokine vermehrt exprimiert werden. Weiterhin sind ROS in der Lage, direkt mit NO zu reagieren, wodurch die gefäßprotektiven Wirkungen von NO vermindert werden und zusätzlich das zytotoxische Peroxynitrit entsteht

[Szabo *et al.*, 2007]. Darüber hinaus könnten ROS mit NOHA interagieren, da diese Verbindung eine oxidationsempfindliche *N*-Hydroxyguanidin-Funktion besitzt [Fukuto, 1996]. Bei Gabe von NOHA als NO-Donor kann die Verbindung möglicherweise sehr schnell durch ROS inaktiviert werden. Daher wären Oxidationsunempfindlichere Verbindungen für eine Therapie vorzuziehen.

Um die Oxidationsneigung der NOHA-Derivate zu überprüfen und mit NOHA zu vergleichen, wurden die Prodrugs in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit den Oxidationsmitteln Kaliumhexacyanoferrat(III), Kupfer(II)-acetat oder Wasserstoffperoxid über 24 Stunden inkubiert und die Flächen der resultierenden Peaks gemessen. In Abbildung 2.8 sind die Ergebnisse dargestellt.

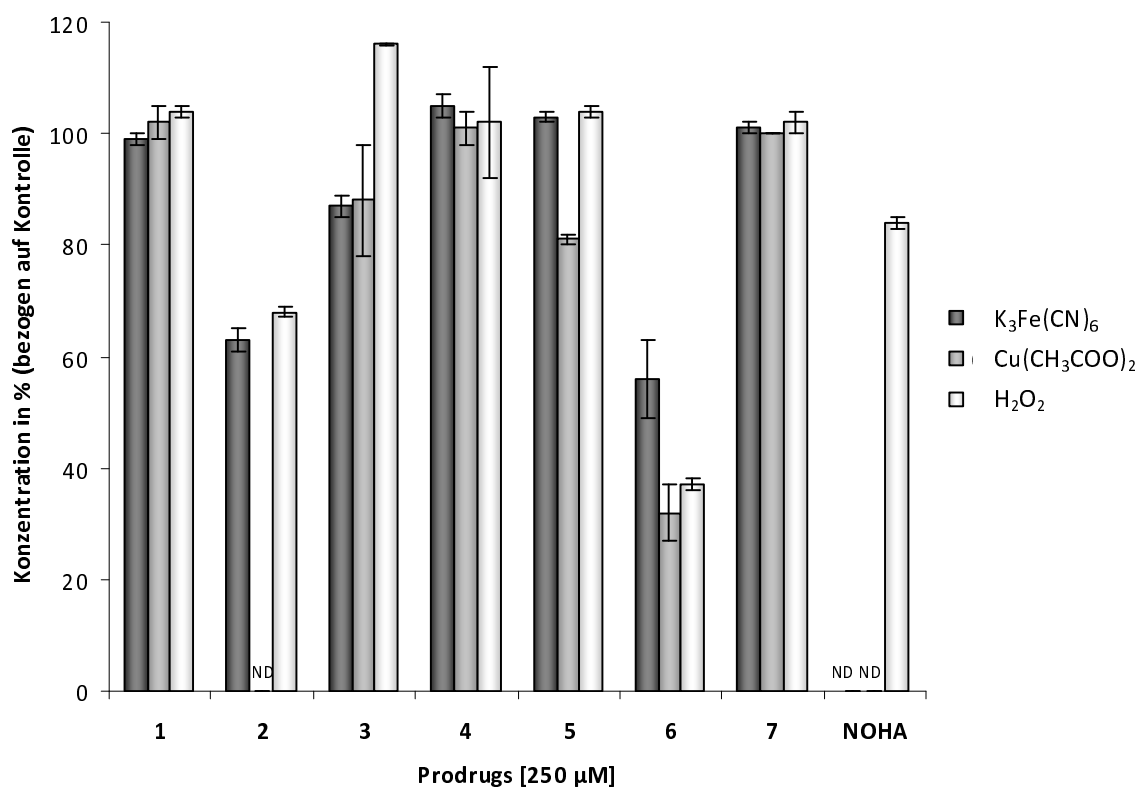


Abb. 2.8: Stabilität der Prodrugs in 500 μ M Kaliumhexacyanoferrat(III), 500 μ M Kupfer(II)-acetat und 2,9 mM Wasserstoffperoxid nach 24 Stunden im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. Kontrolle = Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden; ND = nicht detektierbar. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 2.1.

Es zeigte sich, dass NOHA, wie bereits in der Literatur beschrieben, sehr schnell oxidiert wird [Fukuto *et al.*, 1993]. Schon nach zehn-minütiger Inkubation bei 37 °C mit 500 μ M Kaliumhexacyanoferrat(III) konnte NOHA nicht mehr detektiert werden. Die Oxidation mittels Kupfer(II)-acetat fand zwar langsamer statt, jedoch war auch hier nach 24 Stunden die Substanz nicht mehr detektierbar. Bei der Inkubation mit Wasserstoffperoxid konnte noch 84 % der Ausgangskonzentration gemessen werden (Abb. 2.9), was in etwa der Stabilität bei einfacher Inkubation bei pH 7,4 entspricht.

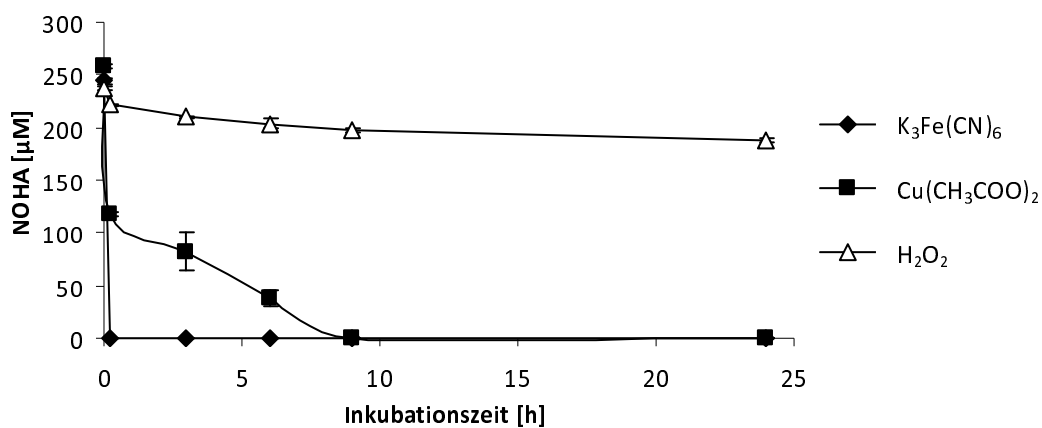


Abb. 2.9: Konzentrationsverlauf von NOHA über 24 Stunden nach Inkubation in 500 μ M Kaliumhexacyanoferrat(III), 500 μ M Kupfer(II)-acetat und 2,9 mM Wasserstoffperoxid im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Prodrug **2** zersetzte sich in 500 μ M Kupfer(II)-acetat vollständig innerhalb von 24 Stunden, in 500 μ M Kaliumhexacyanoferrat(III) und 2,9 mM Wasserstoffperoxid konnten noch 63 % bzw. 68 % der Ausgangskonzentrationen detektiert werden (Abb. 2.10). Prodrug **6** zersetzte sich zu 56 % in Kaliumhexacyanoferrat, 32 % in Kupferacetat und 37 % in Wasserstoffperoxid der Ausgangskonzentration (Abb. 2.10). Zur richtigen Interpretation der Werte sollten jedoch die Stabilitätsdaten aus Kapitel 2.3.2.1 beachtet werden. Beim Vergleich ist erkennbar, dass eine Zersetzung der Verbindung auf ca. 60 % bereits ohne Zugabe von Oxidationsmitteln in Phosphatpuffer pH 7,4 stattfindet. Oxidativer Abbau findet von Prodrug **2** in

Gegenwart von Kupfer(II)-acetat statt, Prodrug **6** zeigt nur eine leichte Instabilität bei Zugabe von Kupfer(II)-acetat und Wasserstoffperoxid.

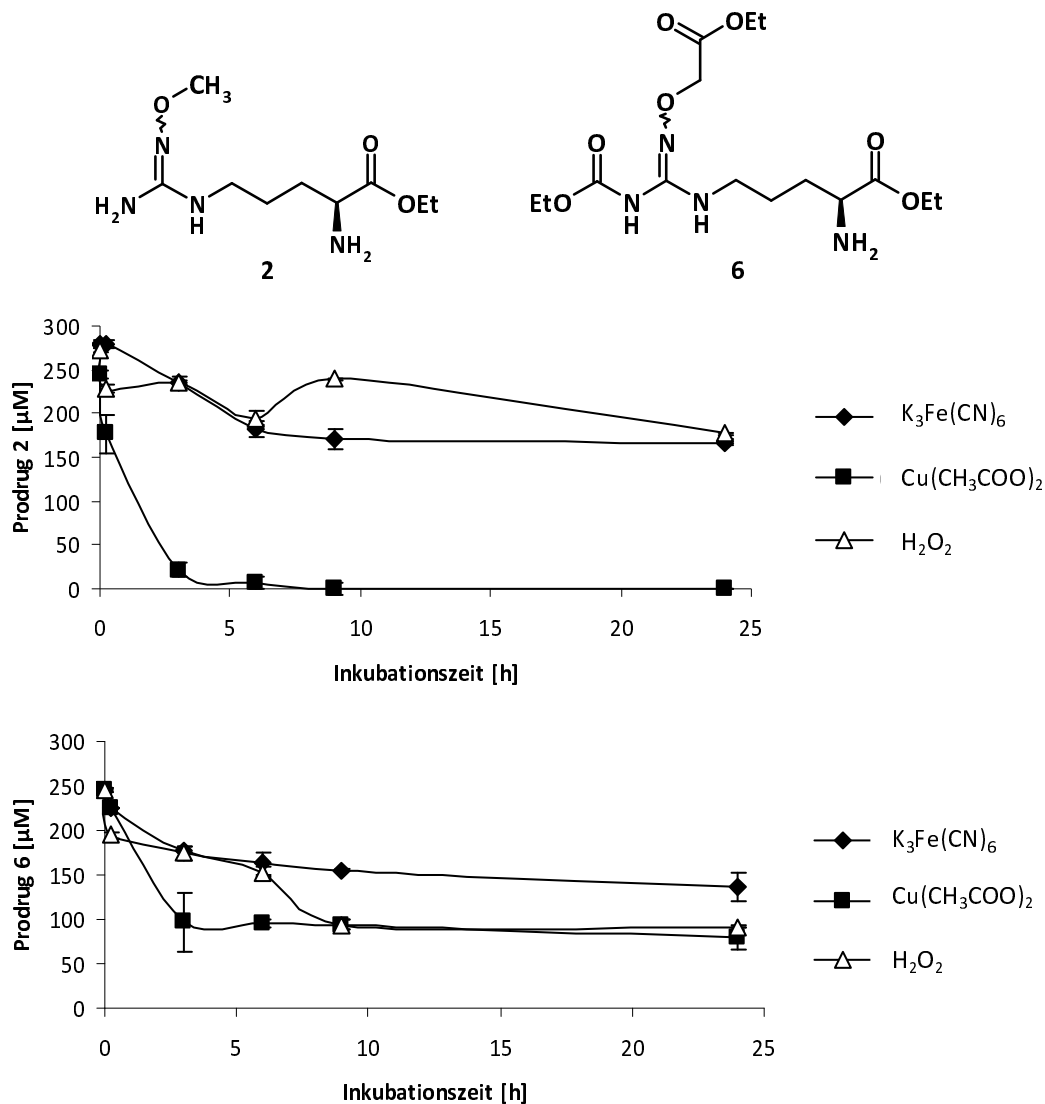


Abb. 2.10: Konzentrationsverlauf der Prodrugs **2** und **6** über 24 Stunden nach Inkubation in $500 \mu\text{M}$ Kaliumhexacyanoferrat(III), $500 \mu\text{M}$ Kupfer(II)-acetat und $2,9 \text{ mM}$ Wasserstoffperoxid im Schüttelwasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Insgesamt zeigte sich, dass alle NOHA-Derivate sowie die *O*-glycosylierte Hydroxyguanidin-Modellverbindung deutlich stabiler gegen oxidativen Abbau sind als NOHA. Die Prodrugs **1**, **3**, **4**, **5** und **7** blieben, gerade im Vergleich zur simplen Inkubation bei pH 7,4 ohne Oxidationsmittel, über den gesamten Messzeitraum unter

allen Bedingungen relativ stabil. Prodrug **2** und **6** scheinen anfällig gegenüber Oxidationsmitteln zu sein. Besonders auffällig war hier die Labilität gegenüber Kupfer(II)-acetat. Verantwortlich dafür scheint der einfache Carbonsäureester der α -Aminosäurefunktion zu sein.

Um die Stabilität von NOHA und den Prodrugs gegenüber einem physiologischen Oxidationsmittel zu überprüfen, wurden die Verbindungen mit Peroxynitrit inkubiert. Die Ergebnisse der Inkubation der Verbindungen in Gegenwart von 500 μ M Peroxynitrit über 24 Stunden bestätigten die Stabilität der Prodrugs **1**, **3**, **4** und **7**, die über den gesamten Messzeitraum stabil blieben. Im Gegensatz dazu zersetzten sich sowohl NOHA als auch die Verbindungen **2**, **5** und **6** stark (Tabelle 2.3).

Tab 2.3: Stabilität von NOHA und den Prodrugs in Gegenwart von 500 μ M Peroxynitrit nach 24 Stunden im Schüttelwasserbad bei 37 °C.

Verbindung	Konzentration in % von Ausgangskonzentration
NOHA	39 \pm 6
1	100 \pm 5
2	65 \pm 2
3	98 \pm 3
4	99 \pm 7
5	39 \pm 2
6	23 \pm 1
7	94 \pm 1

Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie in Kapitel 2.2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 2.1.

Auch hier liegt die Zersetzung von Prodrug **2** im Rahmen der Instabilität bei pH 7,4.

2.3.3 Inkubation mit porciner Carboxylesterase

Zur Freisetzung der Wirkform aus den Prodrugs wurden die Prodrugs mit porciner, unspezifischer Carboxylesterase über 150 Minuten bei 37 °C umgesetzt. Mit Hilfe der Esterase sollten sowohl die Ester als auch die Carbamat-Funktion gespalten werden.

Wie aus Abbildung 2.11 ersichtlich ist, nimmt bei der Inkubation des Ester-Prodrugs **2** mit 2,5 U unspezifischer Carboxylesterase die Bildung der Säure **1** über den Messzeitraum zu, die Geschwindigkeit verringert sich mit der Zeit.

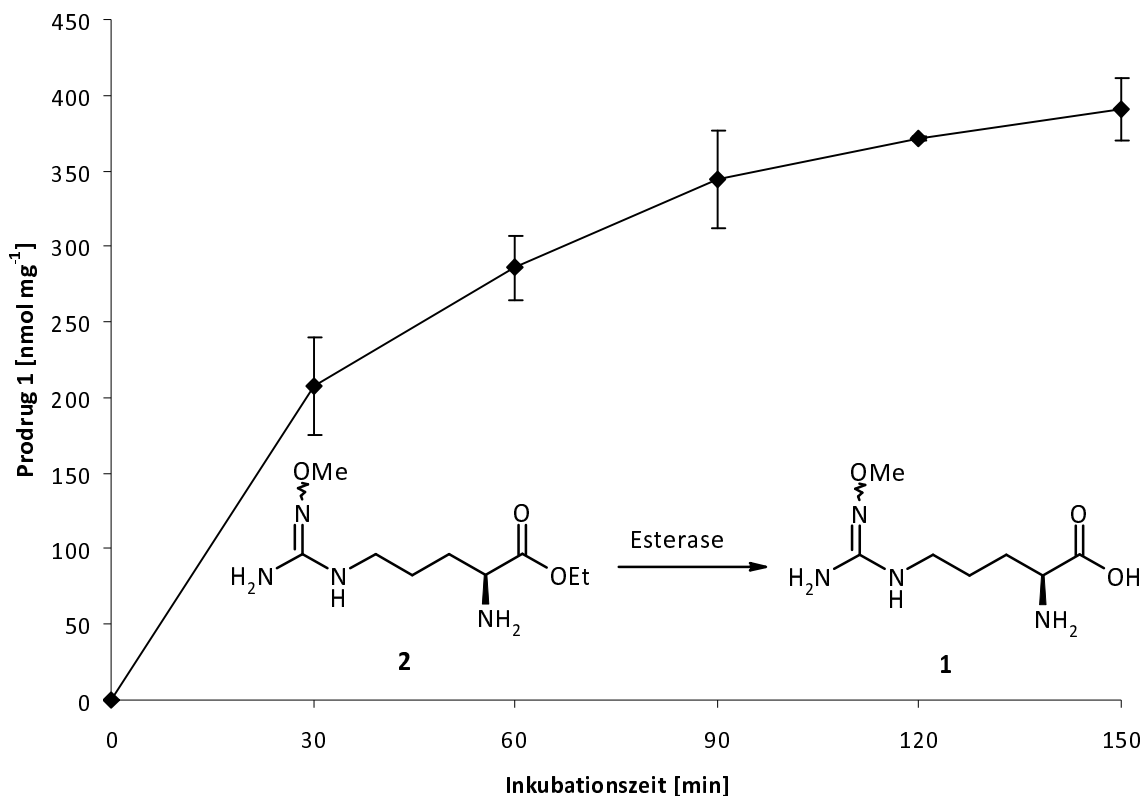


Abb. 2.11: Umsetzung von Prodrug **2** zu Prodrug **1** mit 2,5 U porciner, unspezifischer Carboxylesterase. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Umsetzungsrate wurde zu $21,9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ berechnet. Die Entstehung von Prodrug **1** durch nichtenzymatische Hydrolyse wurde bei der Aktivitätsbestimmung nicht berücksichtigt.

Neben Prodrug **2** wurden auch die Prodrugs **3**, **5** und **6** mit 2,5 U Esterase bis zu 150 Minuten inkubiert. In Abbildung 2.12 ist die erwartete Freisetzung von Prodrug **1** aus Prodrug **3** dargestellt.

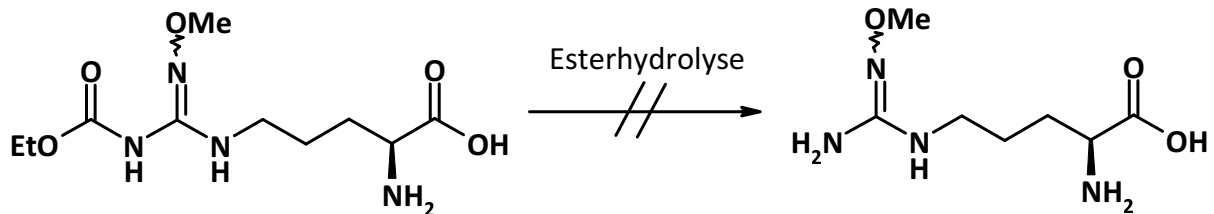


Abb. 2.12: Erwartete Freisetzung von Prodrug 1 aus Prodrug 3 durch Carbamat-Spaltung.

Entgegen der Annahme wurde Prodrug **3** durch unspezifische Carboxylesterasen nicht gespalten. Zwar werden einige Amide durch Esterasen hydrolytisch gespalten, die Geschwindigkeiten sind aber oft sehr langsam und ungenügend [Simplicio *et al.*, 2008]. Offensichtlich werden nur Carbamate einfacher Amide, wie z.B. Molsidomin ausreichend umgesetzt [Nishikawa *et al.*, 1982]. Carbamate von Guanidinen scheinen hingegen stabil zu sein.

Prodrug **5** besitzt eine Ester- sowie eine Carbamat-Funktion, die durch Esterasen gespalten werden könnten. In Abb. 2.13 sind potentielle Metabolite gezeigt.

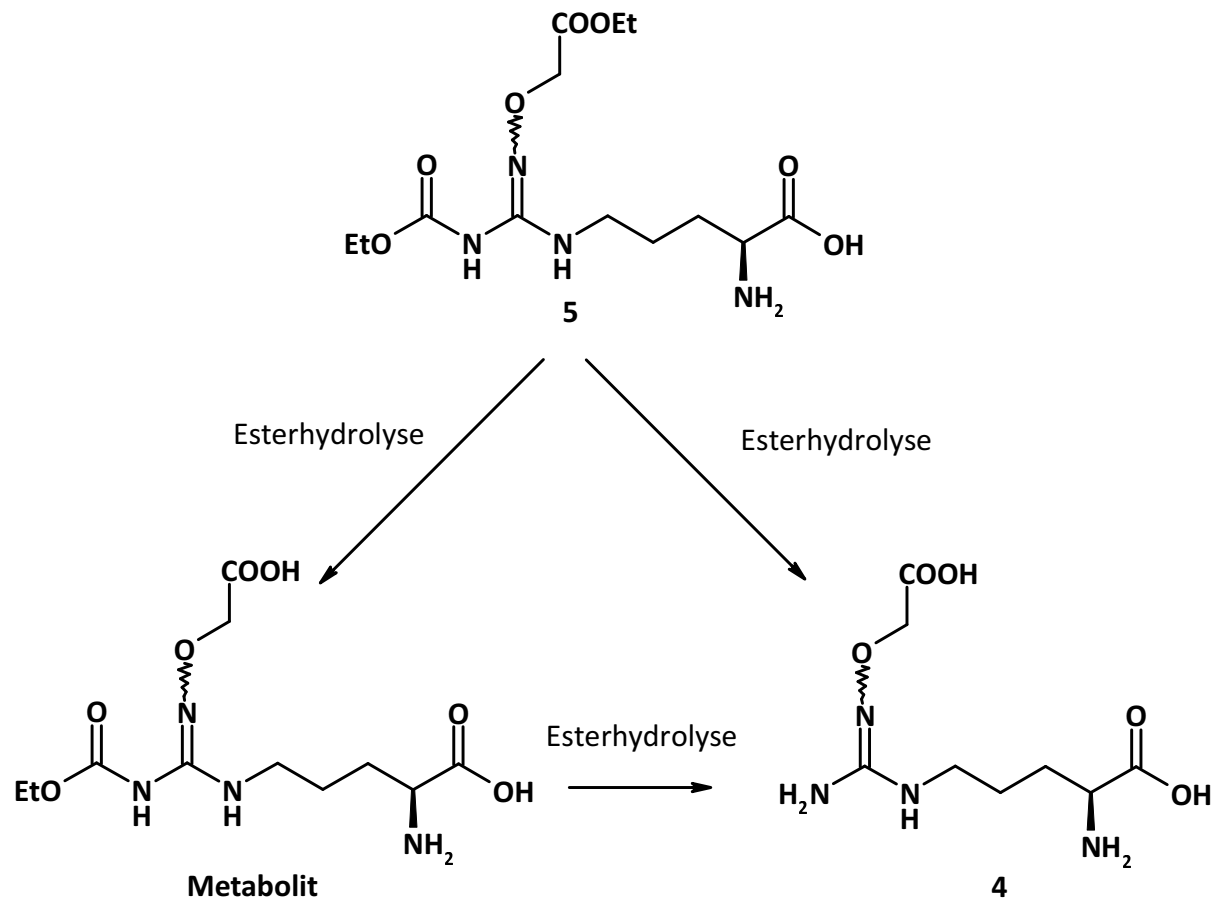


Abb. 2.13: Spaltung von Prodrug 5 durch Esterasen in Prodrug 4 und einen weiteren Metaboliten.

Es zeigte sich, dass das Prodrug durch Esterasen nicht in Prodrug 4 gespalten wurde. Stattdessen entstand ein weiterer Peak bei 18,8 min, der ohne vorhandenen Standard nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Eine Bestimmung über Massenspektrometrie war aufgrund der Instabilität des Metaboliten nicht möglich. Es ist anzunehmen, dass analog zu den Ergebnissen aus den Stabilitäts- und Oxidationsuntersuchungen, nur der Ester gespalten wird, es jedoch zu keiner Spaltung des Carbamates kommt (vgl. Kapitel 2.3.2.1). Wie aus Abbildung 2.14 zu entnehmen ist, verläuft die Umsetzung von Prodrug 5 zu dem unbekanntem Metaboliten über 150 Minuten linear.

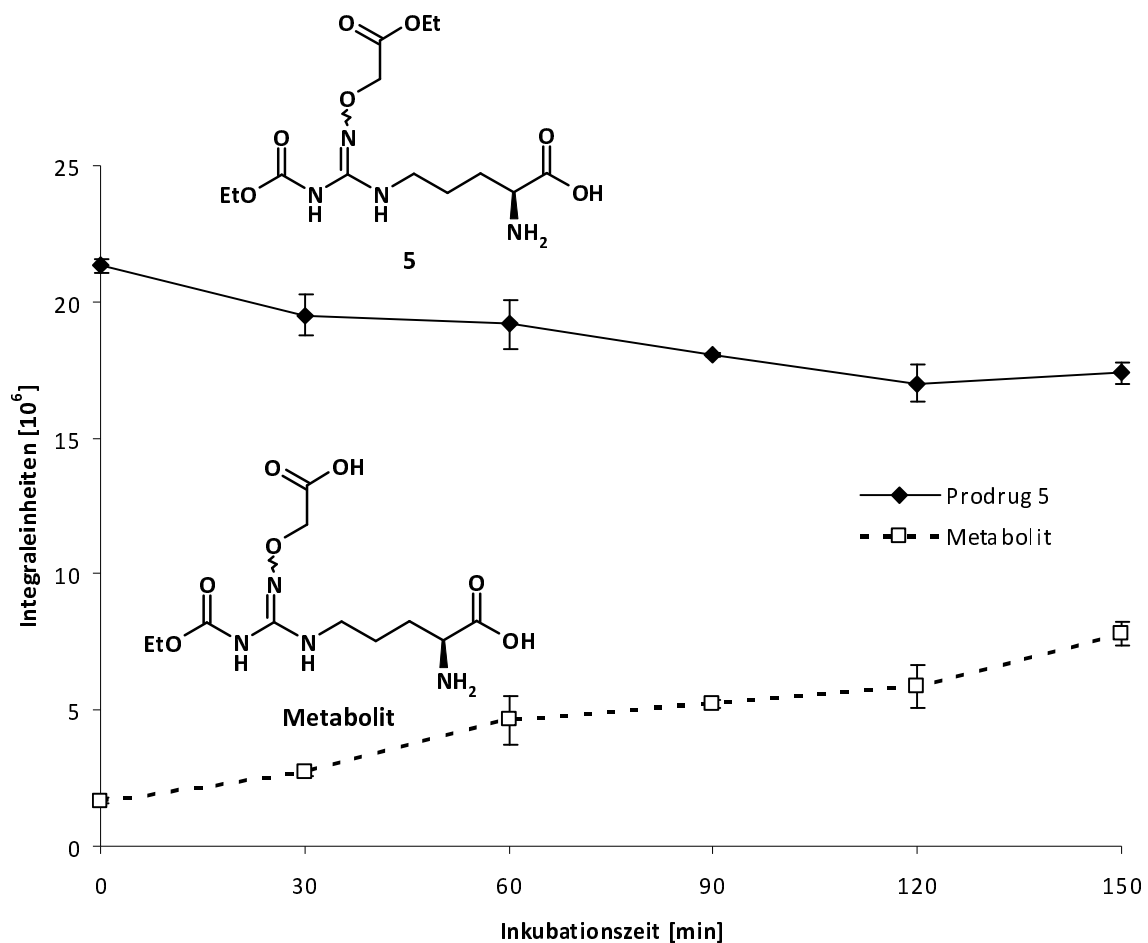


Abb. 2.14: Spaltung von Prodrug 5 durch Esterasen zu einem unbekanntem Metaboliten. Der Ezymassay wurde wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Prodrug 6 wird ebenfalls durch Esterasen gespalten. Hier entsteht neben Prodrug 5 eine Verbindung, die bei der gleichen Retentionszeit eluiert wie das Zersetzungsprodukt bei den Stabilitätsprüfungen. Die Umsetzungsraten sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Der Ester an der Carboxymethyl-Funktion wird langsamer gespalten als der Ester der Carboxy-Funktion der Aminosäure.

Tab. 2.4: Spezifische Aktivität der Esterspaltung der Prodrugs 2, 3, 5, 6 und 7 durch die unspezifische, porcine Carboxylesterase.

Prodrug	Spezifische Aktivität [nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹]
2	21,9 ± 1,7
3	ND
5	5,8 ± 0,6*
6	16,4 ± 8,1*
7	ND

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. ND = nicht detektierbar; *Spezifische Aktivität wurde auf Basis der Konzentrationsabnahme der Ausgangsverbindung berechnet. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 2.1.

2.3.4 Inkubation mit humanem Plasma

Die Proben wurden mittels LC/MS vermessen, da die im Plasma vorhandenen freien Aminosäuren mit dem Vorsäulenderivatisierungs-Reagenz reagieren und so eine Trennung erschweren.

Prodrug **2** wurde mit einer Umsetzungsrate von $0,51 \pm 0,02 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ zu Prodrug **1** gespalten. Eine Umsetzung von Prodrug **3** konnte nicht detektiert werden. Diese blieb über den gesamten Messzeitraum von 120 Minuten stabil.

2.3.5 Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien

Um zu überprüfen, ob neben der Esterspaltung eine weitere Umsetzung durch *O*-Desalkylierung zu NOHA stattfindet, wurden die Prodrugs **1**, **2** und **4** mit Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien umgesetzt und die entstandenen Metabolite mittels der in Kapitel 2.2.2.1 aufgeführten HPLC-Analytik quantifiziert. Ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

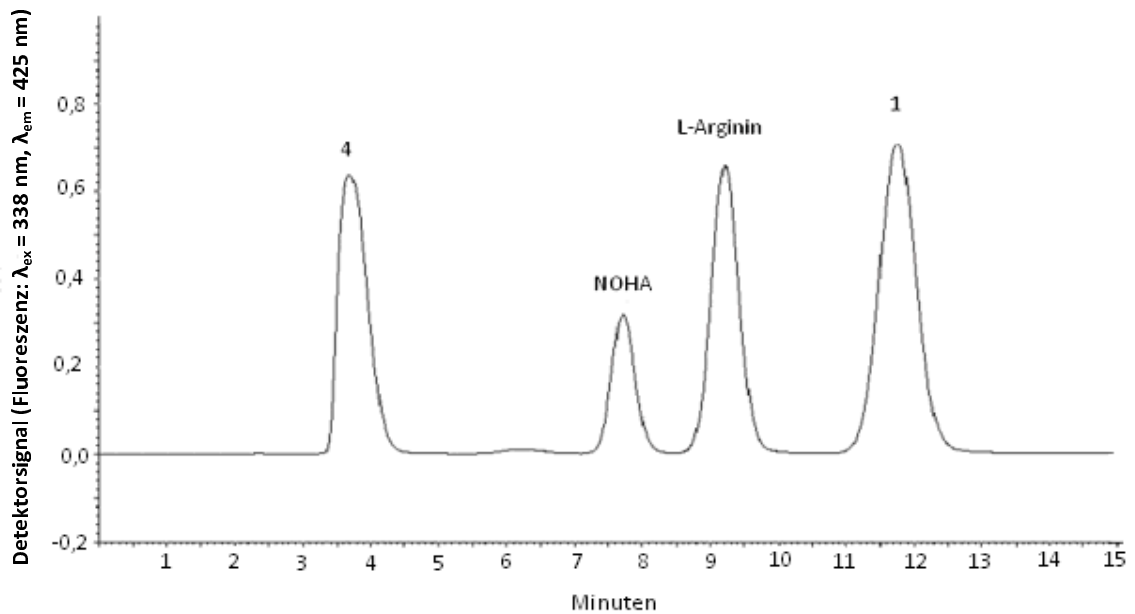


Abb. 2.15: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Prodrug 1, 4, NOHA und L-Arginin.

Es wurde erwartet, dass die Enzyme über eine *O*-Desalkylierung Prodrug 1 und 4 zu N^{ω} -Hydroxy-L-arginin umsetzen. In Abbildung 2.16 sind die möglichen Metabolite L-Arginin und NOHA gezeigt.

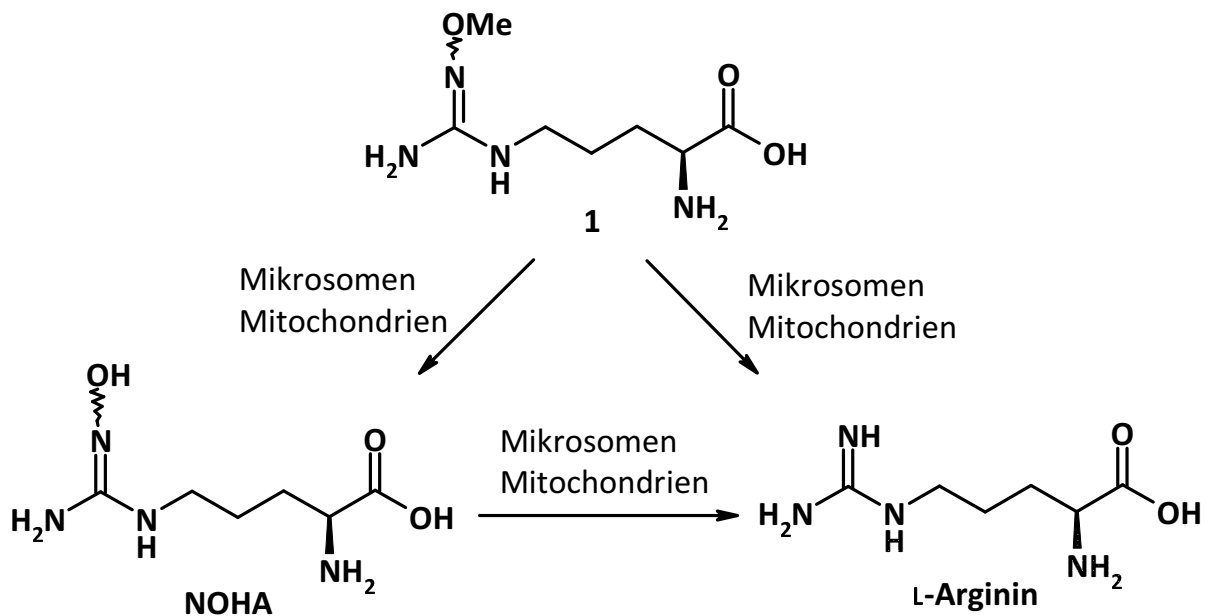


Abb. 2.16: Umsetzung von Prodrug 1 zu NOHA oder L-Arginin.

NOHA selbst wird durch Mikrosomen und Mitochondrien zu L-Arginin reduziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Reduktion von NOHA durch Schweinelebermikrosomen bestimmt. Mit NADH als Kofaktor ergab sich eine spezifische Aktivität von $3,0 \pm 0,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, mit NADPH eine spezifische Aktivität von $1,4 \pm 0,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Ergebnisse der Umsetzung von Prodrug 1 durch porcine Lebermikrosomen und -mitochondrien sind in Abbildung 2.17 aufgeführt.

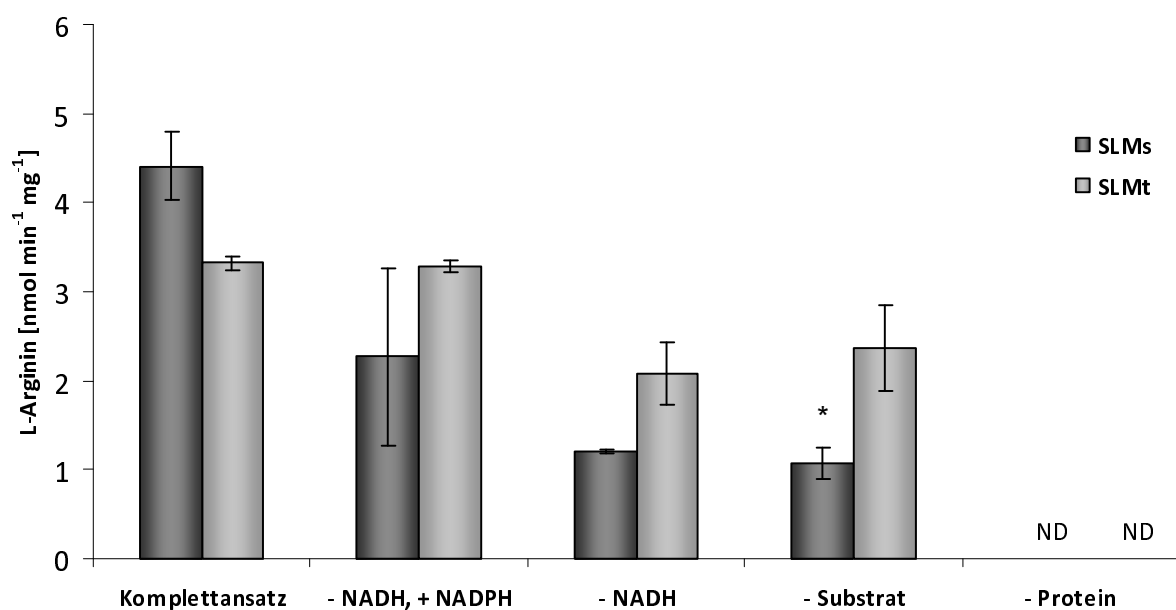


Abb. 2.17: *In vitro* Umsetzung von Prodrug 1 durch Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Statistisch signifikanter Unterschied gegenüber Komplettansatz (SLMs) ($p < 0,007$, Student's *t*-Test). SLMs, Schweinelebermikrosomen; SLMt, Schweinelebermitochondrien; ND = nicht detektierbar.

Prodrug 1 wurde sowohl durch Schweinelebermikrosomen als auch durch Schweinelebermitochondrien zu L-Arginin umgesetzt. Allerdings ist hier zu beachten, dass auch ohne Substrat, nur durch Protein, hohe L-Arginin-Konzentrationen detektiert wurden. Zieht man diese von der Umsetzung von Prodrug 1 zu L-Arginin ab, so erhält man deutlich geringere Umsetzungsraten. Die korrigierten Umsetzungsraten sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Wurde die enzymatische Reaktion durch sehr schnelles Abkühlen auf Trockeneis abgestoppt und anschließend 20 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert, konnte die Freisetzung von L-Arginin aus dem zugegebenen Protein etwas gesenkt werden (vgl. Kapitel 2.3.1). Die in Tabelle 2.5 angegebenen Aktivitäten änderten sich dadurch jedoch nicht.

Tab. 2.5: Korrigierte spezifische Aktivitäten von Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien für die Umsetzung von Prodrug 1 zu L-Arginin.

Enzymquelle	Inkubationsbedingungen	spezifische Aktivität [nmol L-Arginin · min ⁻¹ · mg ⁻¹]
Schweinelebermikrosomen	Komplettansatz	3,34 ± 1,70
	- NADH, + NADPH	1,20 ± 0,99
	- NADH	0,14 ± 0,02
	- Protein	ND
Schweinelebermitochondrien	Komplettansatz	0,95 ± 0,08
	- NADH, + NADPH	0,91 ± 0,06
	- NADH	ND
	- Protein	ND

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. ND = nicht detektierbar.

NOHA konnte unter keinen Inkubationsbedingungen detektiert werden.

Die Umsetzungsraten von Prodrug 4 durch Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien sind in Abbildung 2.18 dargestellt.

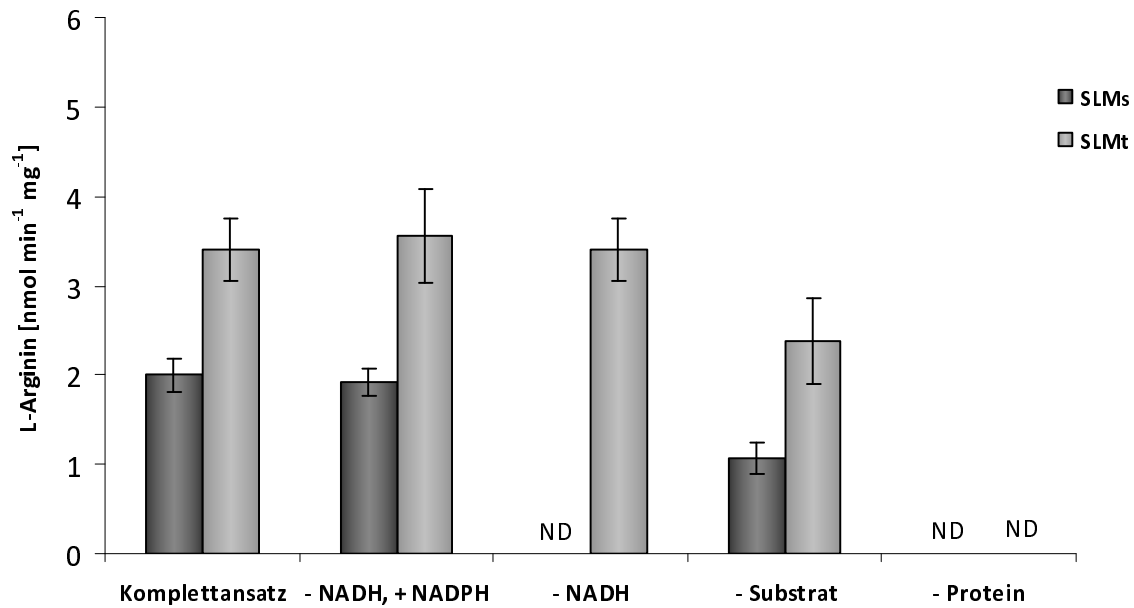


Abb. 2.18: *In vitro* Umsetzung von Prodrug 4 durch Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. SLMs, Schweinelebermikrosomen; SLMt, Schweinelebermitochondrien; ND = nicht detektierbar.

Es konnte nur L-Arginin und nicht NOHA detektiert werden. Weiterhin konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der L-Arginin-Entstehung bei Umsetzung von Prodrug 4 und bei dem Ansatz ohne Substrat bestimmt werden. Zieht man die Umsetzung im Ansatz ohne Substrat von den errechneten Aktivitäten ab, so erhält man die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Werte.

Tab. 2.6: Korrigierte spezifische Aktivitäten von Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien für die Umsetzung von Prodrug 4 zu L-Arginin.

Enzymquelle	Inkubationsbedingungen	spezifische Aktivität [nmol L-Arginin · min ⁻¹ · mg ⁻¹]
Schweinelebermikrosomen	Komplettansatz	ND
	- NADH, + NADPH	ND
	- NADH	ND
	- Protein	ND
Schweinelebermitochondrien	Komplettansatz	1,04 ± 0,35
	- NADH, + NADPH	1,19 ± 0,53
	- NADH	1,49 ± 0,85
	- Protein	ND

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. ND = nicht detektierbar.

Prodrug **2** wurde weder durch Schweinelebermikrosomen noch durch Schweinelebermitochondrien zu L-Arginin oder NOHA umgesetzt.

2.3.6 Inkubation mit porciner OMV

Bei den Inkubationen von den Prodrugs **1**, **2** und **5** mit porciner OMV konnte keine Umsetzung zu L-Arginin und NOHA detektiert werden.

2.3.7 Inkubation mit mARC

Verbindungen **1**, **2** und **5** wurden durch mARC nicht zu L-Arginin und NOHA umgesetzt.

2.3.8 Inkubation von *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-[β-D-galactopyranos-1-yl]oxy]-guanidin mit porciner Carboxylesterase und β-Galactosidase

Prodrug **7** wurde mit Carboxylesterase und β-Galactosidase in Kombination sowie nur mit Carboxylesterase bzw. β-Galactosidase umgesetzt. Ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Während bei der Inkubation mit β-Galactosidase ein weiterer Peak nach 6,3 Minuten detektiert werden konnte, setzte die Esterase die Verbindung nicht um. Das Carbamat wurde somit durch Zugabe von Esterase nicht gespalten.

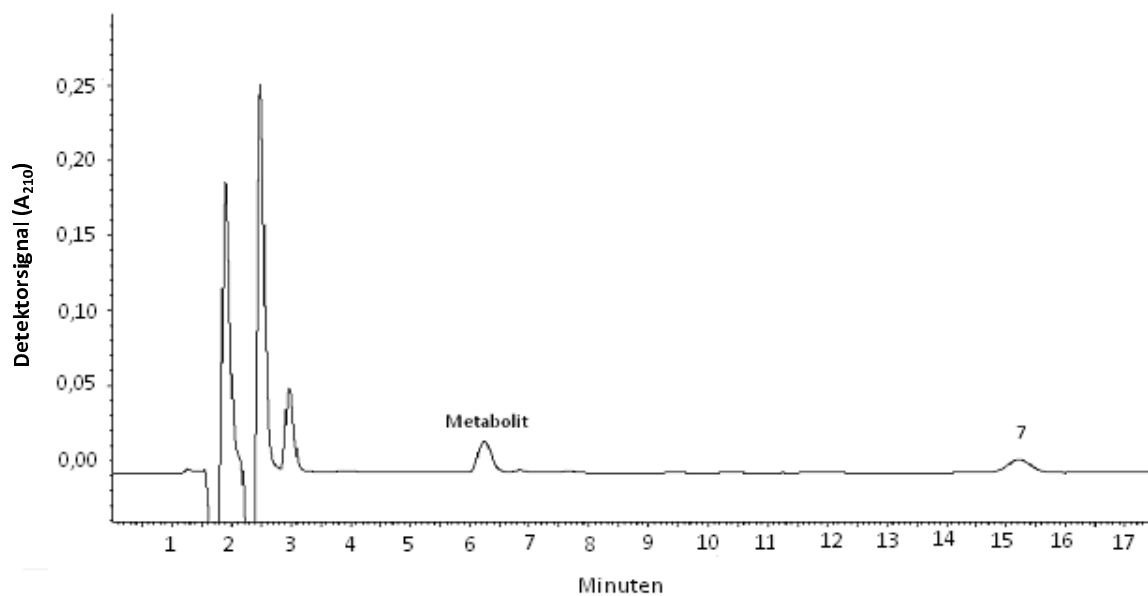


Abb. 2.19: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Prodrug **7** und einem unbekannten Metaboliten. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 2.2.2.11 beschrieben durchgeführt. Die HPLC-Analytik wurde, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, durchgeführt.

Für die Bestimmung des Metaboliten war kein Referenzstandard vorhanden, sodass die Identität mittels HPLC nicht eindeutig geklärt werden konnte. Auffällig war jedoch, dass sich die Flächen der beiden Peaks über die Zeit immer zu einem konstanten Wert ergänzten. Wird für die Bestimmung der Konzentration des Metaboliten die Kalibriergerade von Prodrug **7** herangezogen, so errechnet sich die Aktivität der β-Galactosidase bezogen auf die Umsetzung des Prodrugs **7** zu $15,7 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Wird die Aktivität über die Konzentrationsabnahme von Prodrug **7** berechnet, so ergibt sich derselbe Wert. Da die Identität des Metaboliten

jedoch nicht eindeutig geklärt ist, besitzt diese berechnete Aktivität nur eingeschränkte Aussagefähigkeit. Es liegt aber nahe, dass die β -Galactosidase Galactose vom Molekül abspaltet und der Metabolit einen ähnlichen Extinktionskoeffizienten besitzt wie die Ausgangsverbindung, da Galactose selbst kein UV-Licht absorbiert. Um diese These zu überprüfen, wurde mittels Galactose-Dehydrogenase die Konzentration der entstehenden D-Galactose bestimmt.

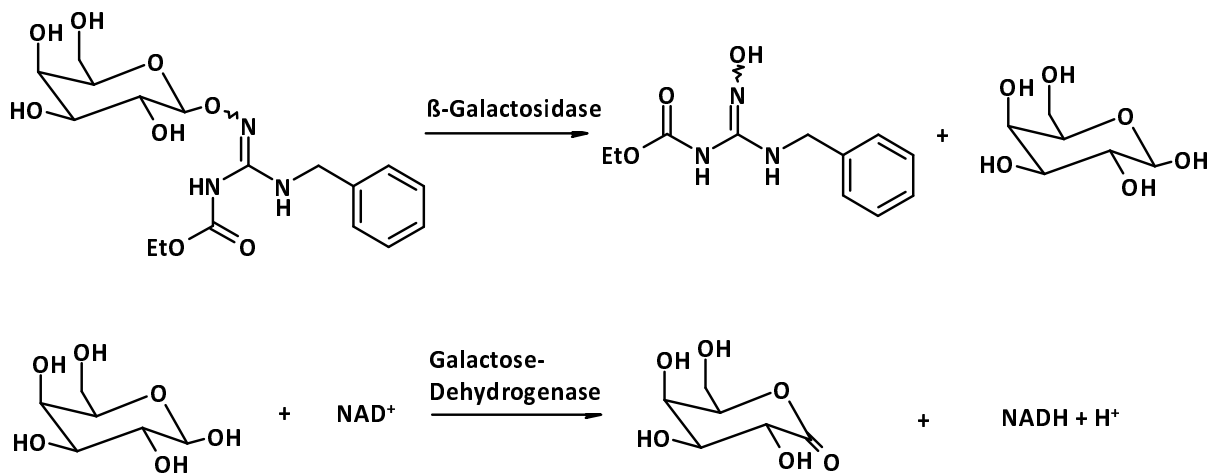


Abb. 2.20: Umsetzung von Prodrug 7 mit β -Galactosidase und nachfolgender Bestimmung der freigesetzten Galactose-Konzentration durch Oxidation mittels Galactose-Dehydrogenase. Das entstehende $NADH + H^+$ wird bei 340 nm photometrisch bestimmt.

Hierzu wurde die bei der Umsetzung freigewordene Galactose mittels Galactose-Dehydrogenase oxidiert. Die bei der Reaktion entstandene Menge an $NADH + H^+$ kann photometrisch bei 340 nm vermessen werden (Abbildung 2.20). Um Umsetzungsraten bestimmen zu können, muss die Abspaltung der Galactose durch die β -Galactosidase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Da die Umsetzung der Galactose mittels der Galactose-Dehydrogenase jedoch recht langsam abläuft, muss die Messreaktion gestoppt werden. Dazu wurde Phosphatpuffer pH 8,6 zugegeben. Bei diesem pH-Wert ist die verwendete β -Galactosidase inaktiv. Um dieses zu überprüfen wurde die Reaktion zu Beginn und nach 10, 20 und 30 Minuten mittels Umpufferung abgestoppt und die entstandene Galactose, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Entstehung von $NADH + H^+$ wurde bis zum Stillstand der Reaktion gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.21 dargestellt.

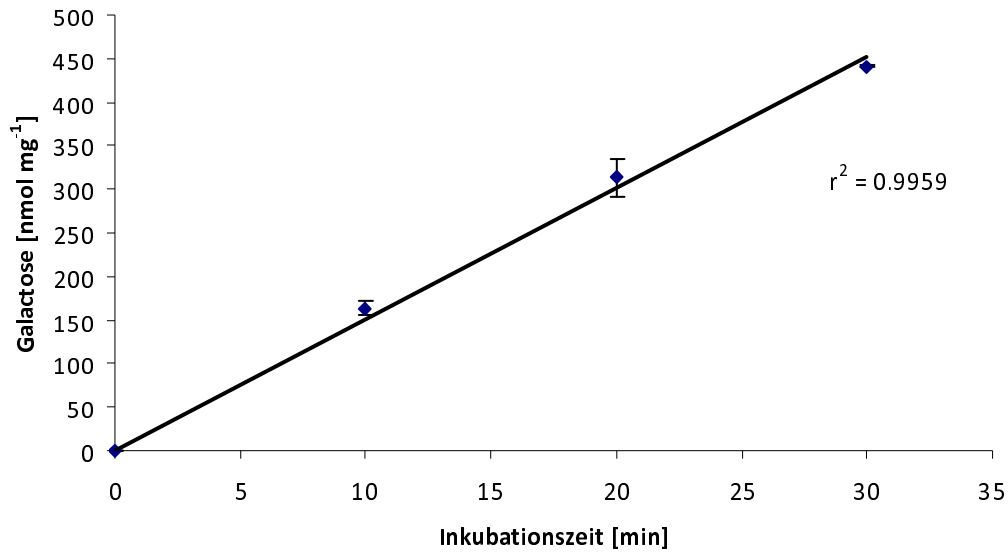


Abb. 2.21: Umsetzung von Prodrug 7 mit β -Galactosidase, Abstoppen der Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten durch Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8,6, Umsetzung der entstandenen Galactose durch Galactose-Dehydrogenase und anschließende Detektion durch Bestimmung der NADH-Konzentration.

Durch den linearen Verlauf der Gerade kann davon ausgegangen werden, dass ein Abstoppen durch Erhöhung des pH-Wertes möglich ist. Daraufhin wurde die Aktivität der β -Galactosidase über diese Methode zu $17,7 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ bestimmt.

2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten NOHA-Derivate sowie eine Hydroxyguanidin-Modellverbindung auf Stabilität und Bioaktivierung durch verschiedene Enzymquellen untersucht werden. NOHA selbst ist für eine Gabe als oraler NO-Donor ungeeignet, da es ungenügende Arzneistoffqualitäten besitzt. So bedingt v.a. die Hydroxyguanidin-Funktion eine Instabilität gegenüber Hydrolyse und Oxidation [Fukuto, 1996]. Zum anderen ist eine freie Diffusion von NOHA durch die polaren Gruppen nicht möglich. Daher wurden im Arbeitskreis Clement Prodrug-Derivate von NOHA synthetisiert, die diesen physikochemischen und pharmakokinetischen Nachteilen v.a. durch *O*- und *N*-Substitution der Hydroxyguanidin-Funktion entgegen wirken sollten [Schade, 2008].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die hydrolytische und oxidative Stabilität dieser Prodrugs untersucht werden. Zusätzlich sollte analysiert werden, inwieweit NOHA aus dem Prodrug durch verschiedene Enzymquellen freigesetzt wird.

Die pH-Stabilität der Prodrugs ist gegenüber NOHA deutlich erhöht. Während sich NOHA im Basischen in kurzer Zeit vollständig zersetzt, konnte durch die Galactosylierung, die *O*-Methylierung und *O*-Carboxymethylierung kein, oder nur ein geringer Abbau bei den NOHA-Derivaten und der Modellverbindung beobachtet werden. Veresterte Prodrugs zeigen erwartungsgemäß eine Instabilität im Basischen, während sie im Sauren die größte Stabilität besitzen. Bei pH 7,4 war nur ein leichter Abbau festzustellen. Da mit pH 9 ein sehr extremer pH-Wert gewählt wurde, der physiologisch in dem für die Arzneistoff-Absorption wichtigen Bereich des Gastrointestinal-Traktes kaum erreicht wird, ist die Instabilität der Ester-Prodrugs vernachlässigbar. Viel wichtiger ist die Stabilität bei pH 2 und pH 7,4 bei denen alle Prodrugs eine ausreichende Stabilität besitzen.

Ein ähnliches Bild zeigten die Prodrugs bei Inkubation mit verschiedenen Oxidationsmitteln. Auch hier erhöhten die Substituenten an der Hydroxyguanidin-Funktion die Stabilität deutlich, während sich NOHA sofort in 500 μ M Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung und sehr schnell in 500 μ M Kupferacetat-Lösung und 500 μ M Peroxynitrit-Lösung zersetzt. Da die Oxidationsmittel in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst waren, lag die Zersetzung der getesteten Substanzen im Rahmen der überprüften pH-Stabilitäten, sodass nur bei einer Verbindung ein Effekt der Oxidationsmittel zu erkennen war. Somit konnte sowohl eine erhöhte pH- als auch oxidative Stabilität bewiesen werden.

Die Umsetzungen der Prodrugs mit unspezifischer Carboxylesterase und humanem Plasma zeigten, dass die Ester gespalten wurden, während die Carbamate sowohl hydrolytisch als auch enzymatisch zu stabil sind und somit die freien Verbindungen nicht entstehen.

Eine Umsetzung der Verbindungen mit Schweinelebermikrosomen, -mitochondrien, OMV und mARC zu NOHA konnte nicht beobachtet werden. Dafür wurde eine leichte Umsetzung durch Schweinelebermikrosomen und –mitochondrien von Prodrug **1** zu L-Arginin detektiert. Inwieweit entstandenes NOHA durch die Enzymquellen sofort reduziert wurde und so nicht detektiert werden konnte bleibt offen, da auch eine Spaltung der N-O-Bindung unter Umgehung von NOHA als Zwischenstufe vorstellbar ist.

Wurde der Enzymassay mit Methanol abgestoppt, so wurde aus dem Protein Arginin freigesetzt und anschließend detektiert. Durch Abstoppen mittels schnellen Abkühlens auf Trockeneis und verlängerter Zentrifugationszeit, konnte die Freisetzung von L-Arginin reduziert werden. Die Umsetzungsrate wurde durch diese Modifikation jedoch nicht beeinflusst.

Prodrug **7** wurde durch β -Galactosidase gespalten, sodass die Hydroxyl-Funktion freigesetzt werden konnte. Allerdings erfolgte keine Spaltung des Carbamates.

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass durch *O*- und *N*-Substitution Hydroxyguanidine stabilisiert werden können. Esterderivate werden leicht durch Esterasen gespalten, besitzen jedoch wie erwartet eine etwas verringerte oxidative und hydrolytische Stabilität. Auffällig ist die Labilität der Esterfunktion in der α -Aminosäure-Gruppe bei Prodrug **2** und **6**, die für eine Weiterentwicklung berücksichtigt werden sollte.

Im Gegensatz dazu sind Carbamate zwar sehr stabil, werden aber nicht durch Esterasen gespalten, so dass der aktive Metabolit nicht freigesetzt wird. Daher sind diese für die Erhöhung der Lipophilie als Substituenten nicht geeignet. Erstaunlich ist die hohe Stabilität der *O*-glycosylierten Hydroxyguanidin-Modellverbindung (Prodrug **7**) bei pH 2, da Acetale normalerweise im Sauren sehr schnell gespalten werden. Durch die erhöhte Stabilität, die mögliche Aufnahme über Zucker-Transporter und die Spaltung durch β -Galactosidase, ist die *O*-Glycosylierung ein erfolgsversprechendes Prinzip. Dagegen wird NOHA bei den *O*-methylierten und *O*-carboxymethylierten Verbindungen durch die verwendeten Enzymquellen *in vitro*

nicht freigesetzt. Trotzdem ist eine Spaltung der Prodrugs *in vivo* möglich und wird in folgenden Arbeiten untersucht werden.

3 Untersuchung von Inhibitoren der humanen DDAH-1 auf NO-Synthase-hemmende Eigenschaften

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Methylarginine N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA), N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (SDMA) entstehen aus L-Arginin nach posttranslationaler Methylierung von Gewebs-Proteinen und nachfolgender Proteolyse [Bedford und Clarke, 2009]. NMMA und ADMA, jedoch nicht SDMA, sind kompetitive Hemmstoffe der NO-Synthase (NOS) [MacAllister *et al.*, 1996; Vallance *et al.*, 1992]. Während SDMA überwiegend renal ausgeschieden wird, werden NMMA und ADMA v.a. über die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin abgebaut [McDermott, 1976; Ogawa *et al.*, 1989]. Bisher sind zwei humane Isoenzyme bekannt, die DDAH-1 und die DDAH-2 [Leiper *et al.*, 1999]. Interessanterweise gibt es eine Korrelation in der Expression der Isoenzyme und der NO-Synthase. Die DDAH-1 wird bevorzugt in Gehirn und Niere exprimiert. Gerade im Gehirn ist besonders die nNOS zu finden. Die DDAH-2 wird am stärksten in Herz, Plazenta, Immunzellen und Niere exprimiert. Insbesondere Herz und Niere repräsentieren Gewebe mit einer hohen eNOS-Aktivität [Leiper *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2000]. Aufgrund dieser Kollokalisierung der verschiedenen Isoenzyme von NOS und DDAH könnte eine isoformspezifische Regulation der NOS durch eine Modulierung der Methylarginin-Konzentration möglich werden [Ogawa *et al.*, 1989; Tran *et al.*, 2003]. Hierbei wäre eine selektive Hemmung der DDAH-1 wünschenswert, da bei Erkrankungen mit pathologisch erhöhter NO-Konzentration oftmals die nNOS beteiligt ist [Di Giacomo *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2009]. Eine Hemmung der DDAH-2 und somit der eNOS ist dagegen aufgrund ihrer Bedeutung für das kardiovaskuläre System unerwünscht.

Aus Kristallstrukturen und Ergebnissen aus Hemmstudien lassen sich für die DDAH Leitlinien für die Inhibitor-Entwicklung ableiten [Frey *et al.*, 2006; Rossiter *et al.*, 2005]. Sowohl die α -Carboxyl- als auch die α -Aminofunktion sind bei Arginin-

analogen Inhibitoren an Wasserstoffbrückenbindungen mit dem aktiven Zentrum beteiligt, weshalb diese unverzichtbar erscheinen. Weiterhin sollte das N^δ -Atom unsubstituiert vorliegen, da die davon ausgehende Wasserstoffbrückenbindung zum Enzym essentiell für die Affinität ist [Kotthaus, 2008]. Außerdem sollte einer der beiden N^ω -Atome keine Substituenten tragen, da die Bindungstasche zu klein ist und zusätzlich wichtige Wasserstoffbrückenbindungen wegfallen. Größeren Spielraum erlaubt die Substitution am zweiten N^ω -Atom, der deutlich größer sein kann und die Verbindung in eine, verglichen mit dem natürlichen Substrat, andere Orientierung im aktiven Zentrum zwingt [Leiper *et al.*, 2007; Rossiter *et al.*, 2005].

Die Entwicklung DDAH-selektiver Hemmstoffe ist eine Herausforderung, da sich die aktiven Zentren der DDAH und der NOS sehr ähneln [Wang *et al.*, 2009]. Eine selektive Hemmung der DDAH ist erwünscht, da darüber eine gewebsspezifische Hemmung der NO-Synthase möglich sein soll. Weiterhin wird angenommen, dass die ADMA- und NMMA-Konzentrationen nicht so weit ansteigen, dass die NOS-Hemmung 30 % überschreitet, so dass eine erwünschte NOS-Restaktivität bestehen bleibt [Vallance und Leiper, 2002]. In Studien mit L-Arginin und L-Arginin-Analoga, die an einem N^ω -Atom substituiert sind, wurde entdeckt, dass, wie bei der DDAH, für eine Bindung an die NOS ein Guanidin-Stickstoff unsubstituiert vorliegen muss [Griffith und Kilbourn, 1997; Griffith und Stuehr, 1995; Hibbs *et al.*, 1987]. Dieser unsubstituierte Stickstoff bindet an eine distale, vom Häm mehr als 4 Å entfernte Tasche, die sterisch eingeschränkt ist, so dass kein weiterer Substituent Platz findet [Tierney *et al.*, 1999]. Ein Glutamat-Rest des Enzyms bildet sowohl zu diesem Guanidin-Stickstoff als auch zum N^δ -Atom Wasserstoffbrücken aus. Des Weiteren besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem unsubstituierten N^ω -Stickstoff und der Carbonylfunktion eines Tryptophans [Babu *et al.*, 1999]. Ein substituiertes Stickstoff bindet an eine proximale Tasche nahe dem Häm. Mono- oder Dimethylierungen wie beim ADMA, aber auch ein Propyl-Rest können in dieser Bindungsregion untergebracht werden [Li und Poulos, 2005]. Größere Reste werden aber anscheinend, im Gegensatz zur DDAH, nicht vom Enzym akzeptiert, so dass hier

eine Möglichkeit zur Entwicklung selektiver DDAH-1-Hemmstoffe besteht [Bretscher *et al.*, 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten DDAH-1-Inhibitoren, die zuvor von Schade synthetisiert und von Kotthaus an der DDAH-1 getestet wurden, auf deren NOS-hemmende Eigenschaften überprüft werden [Kotthaus, 2008; Schade, 2008]. Hierbei sollten neue Erkenntnisse über die Unterschiede der aktiven Zentren von NOS und DDAH-1 erlangt werden, um eine Entwicklung selektiver DDAH-1-Hemmstoffe zu erleichtern. Dafür wurden sowohl L-Arginin-Derivate mit einem N^{ω} -Substituenten als auch die strukturell verwandten N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin- und N -(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivate untersucht.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Material

3.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen. NIO (N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin) und Methyl-NIO (N^{δ} -(1-Iminopropyl)-L-ornithin) waren kommerziell bei Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) erhältlich. NADPH wurde von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen. Vinyl-L-NIO (N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin), N^{ω} -Propyl-L-arginin, NIL (N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin) und Tetrahydrobiopterin (H_4B) wurden von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erhalten. Alle N^{ω} -substituierten L-Arginine, mit Ausnahme von N^{ω} -Nitro-L-arginin und N^{ω} -Propyl-L-arginin, sowie die N -(2-Methoxyethyl)guanidine und N -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO) wurden von Schade im Arbeitskreis Clement synthetisiert [Schade, 2008]. ENIPO (N^{δ} -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin) und Ethyl-L-NIO (N^{δ} -(1-Iminobutyl)-L-ornithin) wurden über Bogar Laboratories LLC (Alpharetta, USA) erworben.

3.2.1.2 Geräte

Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Proben wurden in 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) mit Hilfe des Schüttelwasserbades GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Zur photometrischen Vermessung der Proben in den UV-Einmalküvetten (Plastibrand®, Brand, Wertheim) wurde ein Cary 50 UV-VIS-Spektralphotometer (Varian, Darmstadt) eingesetzt.

3.2.1.3 Enzyme

Bovine, rekombinante eNOS sowie rekombinante, murine nNOS wurden von Cayman Chemicals bezogen. Rekombinante, murine iNOS wurde über Sigma Aldrich bezogen. Die humane DDAH-1 (hDDAH-1) wurde von Kotthaus exprimiert und aufgereinigt [Kotthaus *et al.*, 2008].

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Oxyhämoglobin Assay

3.2.2.1.1 Herstellung der Oxyhämoglobin-Lösung

Zur Herstellung nach Larfars und Gyllenhammar (1995) wurden 250 mg Hämoglobin in 15 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Unter Rühren wurde 5 Minuten Sauerstoff eingeleitet und nachfolgend ein dreimolarer Überschuss an Natriumdithionit zugegeben. Die Reduktion des Hämoglobin-Eisens konnte durch den Farbwechsel von braunrot zu dunkelrot beobachtet werden. Anschließend wurde erneut unter Rühren 25 Minuten lang Sauerstoff eingeleitet. Die erneute Farbänderung zu hellrot zeigt die Bildung von Oxyhämoglobin an [Larfars und Gyllenhammar, 1995].

Um oxidiertes Dithionit, evtl. noch vorhandenes Hämoglobin und Methämoglobin abzutrennen, wurde die Lösung über eine Sephadex G25-Säule gegeben, mit 50 mM

Phosphatpuffer (pH 7,4) eluiert und anschließend ein Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 300 nm – 600 nm aufgenommen, um die oxyhämoglobinhaltigen Fraktionen zu bestimmen [Larfars und Gyllenhammar, 1995]. Verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 415 nm zu 413 nm, deutet dieses auf einen zu hohen Methämoglobingehalt hin. Fraktionen mit einer hohen Methämoglobin-Konzentration wurden verworfen, die restlichen Fraktionen gepoolt und bei -20 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der Oxyhämoglobin-Konzentration wurde die Absorption bei 560 nm, 576 nm und 630 nm bestimmt und die Konzentration über folgende Formel berechnet [Benesch *et al.*, 1973]:

$$\text{Konzentration HbO}_2 \text{ in } \mu\text{M} = [1,013 (A_{576}) - 0,3269 (A_{630}) - 0,7353 (A_{560})] 100$$

Problematisch für die spätere Messung ist der schlecht reproduzierbare Extinktionskoeffizient für die Absorptionsänderung bei 401 nm, da Oxyhämoglobin selbst bei dieser Wellenlänge beträchtlich absorbiert [Hevel und Marletta, 1994]. Der molare Absorptionskoeffizient wurde daher vor der Messung bestimmt, indem fünf Oxyhämoglobin-Konzentrationen (0,07 μM – 1,41 μM) mit einer konstanten Konzentration an MAHMA-NONOat (4 μM), einem spontanen NO-Donor, umgesetzt werden. Die gemessene Absorptionsänderung bei 401 nm wurde anschließend um die Absorption am isosbestischen Punkt bei 411 nm bereinigt.

3.2.2.1.2 Durchführung des Oxyhämoglobin Assays

Für jedes Isoenzym wurden ein Blindwert ohne Enzym, ein Kontrollwert ohne Inhibitorzusatz und zwei Testansätze mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors (100 μM , 1 mM) in jeweils drei voneinander unabhängigen Ansätzen vermessen. Die Hemmung der nNOS und eNOS konnte in identischer Assay-Zusammensetzung bestimmt werden. Aufgrund der fehlenden Ca^{2+} /Calmodulin-Abhängigkeit wurde die Assay-Zusammensetzung für die Bestimmung der iNOS-Hemmung variiert.

Die NO-Bestimmung wurde in Anlehnung an Hevel und Marletta durchgeführt [Hevel und Marletta, 1994]. Der Standard-Ansatz mit einem Volumen von 125 µl besaß folgende Zusammensetzung:

1 mM L-Arginin, 100 µM NADPH, 10 µM H₄B, 5 µM Oxyhämoglobin, 1 mM CaCl₂ (nNOS/eNOS), 10 µg/ml Calmodulin (nNOS/eNOS), 1 mM MgCl₂ (iNOS), 100 mM HEPES (pH 7,5), NO-Synthase (nNOS: 0,32 U/125 µl; iNOS: 1,47 U/125 µl; eNOS: 0,25 U/125 µl).

L-Arginin, NADPH, H₄B, gegebenenfalls CaCl₂ und Calmodulin oder MgCl₂ in HEPES-Puffer wurden im Photometer auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurde Oxyhämoglobin zugegeben und ein Referenzspektrum aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der NO-Synthase gestartet und die Absorptionsänderung bei 401 nm über 3 Minuten bei 37 °C gemessen. Als interner Standard wurde die Absorption am isosbestischen Punkt bei 411 nm bestimmt und von der Absorption bei 401 nm abgezogen.

3.2.2.2 Hemmstudien mit humaner DDAH-1

Die Hemmstudien wurden von Kotthaus durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Daten wurden der Dissertation von Kotthaus [Kotthaus, 2008] entnommen.

3.2.2.3 Erstellung der Modelle des aktiven Zentrums der NOS

Mit Hilfe des Programms MOLOC wurden Computer-gestützte Docking-Studien durch Lunk durchgeführt [Lunk, Dissertation in Vorbereitung]. Die Modelle wurden anhand von in der Protein Datenbank (PDB) veröffentlichten Kristallstrukturen erstellt. Dafür wurden Liganden in das rigide Protein gedockt und polare Interaktionen berechnet.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 N^δ -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin (NIO)-Derivate und N^ϵ -(1-Iminoethyl)-L-lysin (NIL)

N^δ -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate sind literaturbekannte, stark wirksame NOS-Hemmstoffe, die sich von dem natürlichen Substrat L-Arginin dadurch unterscheiden, dass ein endständiger Stickstoff der Guanidin-Funktion durch Kohlenstoff bzw. Kohlenstoff-Ketten unterschiedlicher Länge ersetzt ist [Babu *et al.*, 1999; Babu und Griffith, 1998; Bretscher *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen auf die drei NOS Isoenzyme nNOS, iNOS und eNOS mittels des Oxyhämoglobin Assays untersucht werden, um Aussagen über die Selektivität gegenüber der hDDAH-1 treffen zu können.

Der Oxyhämoglobin-Assay beruht auf der äquimolaren Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin (HbO₂) zu Nitrat und Methämoglobin [Feelisch und Noack, 1987; Murphy und Noack, 1994].

Setzt sich Sauerstoff an das zweiwertige Eisen des Hämoglobins, so kommt es nachfolgend zu einem Eielektronentransfer vom Eisen(II) zum Sauerstoff unter Bildung eines Superoxidradikalanions und eines oxidierten Eisen(III). Obwohl NO eine höhere Affinität zum Hämoglobin besitzt als das Superoxidradikalanion, verdrängt es dieses nicht, sondern reagiert mit diesem zu Peroxynitrit. Das Peroxynitrit lagert sich zu Nitrat um und wird unter Lösung der Bindung des Sauerstoffs zum Methämoglobin freigesetzt [Feelisch, 1988].

Da die Oxidation von Oxyhämoglobin stöchiometrisch mit NO ist und schneller abläuft als die Reaktion zwischen Sauerstoff und NO, kann diese Reaktion zur Quantifizierung von gebildetem NO verwendet werden. Weiterhin besitzen Methämoglobin und Oxyhämoglobin unterschiedliche Absorptionsmaxima, was analytisch ausgenutzt werden kann [Hevel und Marletta, 1994]. Während Oxyhämoglobin Absorptionsmaxima bei 415 nm, 540 nm und 576 nm aufweist, liegen

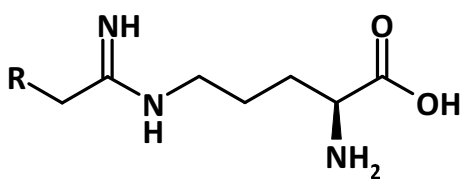
die Absorptionsmaxima von Methämoglobin bei 401 nm, 500 nm und 630 nm [Benesch *et al.*, 1973; Feelisch und Noack, 1987]. Dabei liegen die isosbestischen Punkte bei 411 nm, 523 nm und 590 nm. Die größte Oxyhämoglobin-Absorption findet man bei 415 nm (Soret-Bande), die größte vom Methämoglobin bei 401 nm. Letzterer eignet sich besonders gut zur Messung der Methämoglobin-Konzentration und damit zur Bestimmung der Enzymaktivität [Kelm *et al.*, 1997].


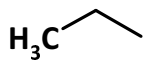
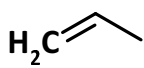
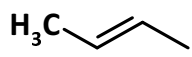
Da die Absorptionsänderungen im Vergleich zu den absoluten Absorptionswerten von Oxyhämoglobin und Methämoglobin relativ gering sind und Messfehler durch Autoxidation von Oxyhämoglobin verhindert werden sollten, wurden Differenzspektren zwischen 350 nm und 500 nm aufgenommen und die Absorptionsänderung pro Minute zwischen 411 nm (isosbestischer Punkt) und 401 nm (Absorptionsmaximum Methämoglobin) berechnet [Feelisch und Noack, 1987].

In früheren Arbeiten wurde im Gegensatz dazu nicht die Absorptionsänderung am absoluten Absorptionsmaximum gemessen, sondern die Differenz zwischen 576 nm und 590 nm (isosbestischer Punkt) [Bluhm, 2004]. Die Begründung lag darin, dass der Peak bei 415 nm durch die Absorption von NADPH überlagert wird, welches für die Inkubation nötig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine geringere NADPH-Konzentration gewählt, infolgedessen diese Störung nicht beobachtet und somit die Messung im Wellenlängenbereich der Soret-Bande durchgeführt wurde.

Mit Hilfe des Oxyhämoglobin-Assays sollte die Hemmung von BDAB auf die Isoenzyme der NOS untersucht werden.

Die Formeln der getesteten Verbindungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Übersicht über die untersuchten N^δ -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate.


Substanz	R
NIO	H
Methyl-NIO	
Ethyl-NIO	
Vinyl-NIO	
ENIPO	

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, kann ein N^ω -Atom des Liganden substituiert vorliegen, ohne dass ein Affinitätsverlust zur NOS auftritt [Babu und Griffith, 1998]. Die Größe des Substituenten ist hierbei bedeutend, da in vorhergehenden Studien von Babu *et al.* sowie Bretscher *et al.* gezeigt wurde, dass zwar Verbindungen mit Ethyl- und Propylsubstituenten noch moderate Inhibitoren sind, Derivate mit Butyl-Substituenten jedoch die NOS, insbesondere die iNOS, nur wenig hemmen [Babu *et al.*, 1999; Bretscher *et al.*, 2003]. Basierend auf diesen Studien wird angenommen, dass die Bindungsregion für den substituierten Amidin-Kohlenstoff eine Substituenten-Kettenlänge von vier Kohlenstoffen noch toleriert.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden NIO-Derivate mit verlängerter Seitenkette untersucht. Beim N^5 -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin (ENIPO) handelt es sich um das um eine Methylgruppe verlängerte N^5 -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithin (Vinyl-NIO). Hier stellte sich die Frage, ob die Doppelbindung die Affinität zum Enzym erhöht und inwieweit die Länge des Restes für eine Bindung an die NOS problematisch sein kann.

Um den Einfluss einer Verlängerung der Seitenkette zu untersuchen, wurde die inhibitorische Wirkung von N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin (NIL) auf die NOS analysiert. Diese Verbindung, die einen zusätzlichen Kohlenstoff in der Aminosäure-Seitenkette besitzt, ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

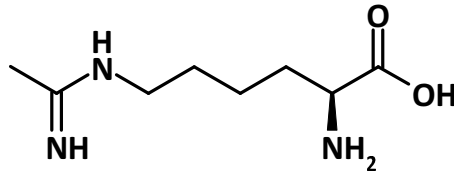


Abb. 3.1 Struktur von N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin (NIL)

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien der untersuchten Verbindungen an den NOS-Isoenzymen und der hDDAH-1 sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Inhibitorische Wirkung der untersuchten L-Ornithin-Derivate sowie NIL an den drei Isoenzymen der NOS im Vergleich zur hDDAH-1.

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1 mM [%]			
	nNOS	iNOS	eNOS	nNOS	iNOS	eNOS	hDDAH-1
NIO	75 \pm 4	84 \pm 3	80 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1	24 \pm 3
Methyl-NIO	77 \pm 2	72 \pm 2	20 \pm 3	100 \pm 1	100 \pm 1	85 \pm 6	65 \pm 8
Ethyl-NIO	34 \pm 8*	80 \pm 3	20 \pm 6*	100 \pm 1	100 \pm 1	54 \pm 3	78 \pm 7
Vinyl-NIO	94 \pm 3'	84 \pm 1	45 \pm 2'	100 \pm 1	100 \pm 1	88 \pm 3	97 \pm 3
ENIPO	12 \pm 11 [#]	6 \pm 2 [#]	27 \pm 8 [#]	70 \pm 8	21 \pm 11	36 \pm 1	73 \pm 8
NIL	30 \pm 9*	100 \pm 1	35 \pm 10*	90 \pm 1	100 \pm 1	56 \pm 3	13 \pm 8

Die Testung an der hDDAH-1 wurde von Kotthaus durchgeführt [Kotthaus, 2008]. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei separaten Inkubationen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur NIO-vermittelten Hemmung des jeweiligen Enzyms ($p < 0,005$, Student's t-Test). [#]Statistisch signifikanter Unterschied zur Vinyl-NIO-vermittelten Hemmung des jeweiligen Enzyms ($p < 0,05$, Student's t-Test). 'Statistisch signifikanter Unterschied zur Ethyl-NIO-vermittelten Hemmung des jeweiligen Enzyms ($p < 0,05$, Student's t-Test). Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 3.1. h, human.

Wie bereits erwartet und in der Literatur beschrieben, nimmt die Affinität mit steigender Länge der Seitenkette zur nNOS und eNOS signifikant ($p < 0,005$) ab [Babu *et al.*, 1999]. Die Affinität zur iNOS ist nicht beeinflusst. Gleichzeitig steigt die Hemmung an der hDDAH-1 [Kotthaus *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009]. Eine Verlängerung der Seitenkette des Amidins führt damit zu einer reduzierten Affinität zum aktiven Zentrum der NOS. Wie in der Literatur beschrieben wird die NOS durch alkylierte Amidine mit einer Alkylkettenlänge von zwei bis fünf Kohlenstoffatomen, einschließlich des sp^2 -hybridisierten Amidin-Kohlenstoffs, gehemmt, während ein potenter DDAH-1-Hemmstoff eine Länge des Alkylsubstituenten von drei bis sechs

Kohlenstoffen benötigt [Kotthaus *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009]. Dieses begründet sich darin, dass das aktive Zentrum der DDAH-1 größer ist als das der NOS und zusätzlich eine Verformung von Protein-Resten und gebundenem Inhibitor zulässt. Daher kann durch die Wahl einer geeigneten Alkylkettenlänge eine Selektivität zur NOS bzw. zur DDAH-1 erreicht werden [Wang *et al.*, 2009].

Die Einführung einer Doppelbindung führt zu einer signifikant ($p < 0,005$) erhöhten Hemmung der nNOS und eNOS durch Vinyl-NIO im Vergleich zu Ethyl-NIO. Auch die DDAH-1 wird dadurch stärker gehemmt. Die Affinitätsabnahme durch Verlängerung der Seitenkette erklärt die signifikant ($p < 0,05$) verringerte inhibitorische Wirkung von ENIPO auf die NOS im Vergleich zum kürzeren Vinyl-NIO. In Übereinstimmung mit der Literatur sinken die Hemmwerte deutlich [Bretscher *et al.*, 2003]. Einen Erklärungsansatz hierfür liefert die Kristallstruktur der NOS komplexiert mit ENIPO (Abb. 3.2), die sterische Konflikte, dargestellt durch durchgezogene Linien, zwischen der endständigen Methylgruppe und sowohl Valin 567 als auch Phenylalanin 584, die die hydrophobe Tasche bilden, zeigt. Diese erklären die verringerte Affinität von ENIPO zum aktiven Zentrum der NOS [Bretscher *et al.*, 2003].

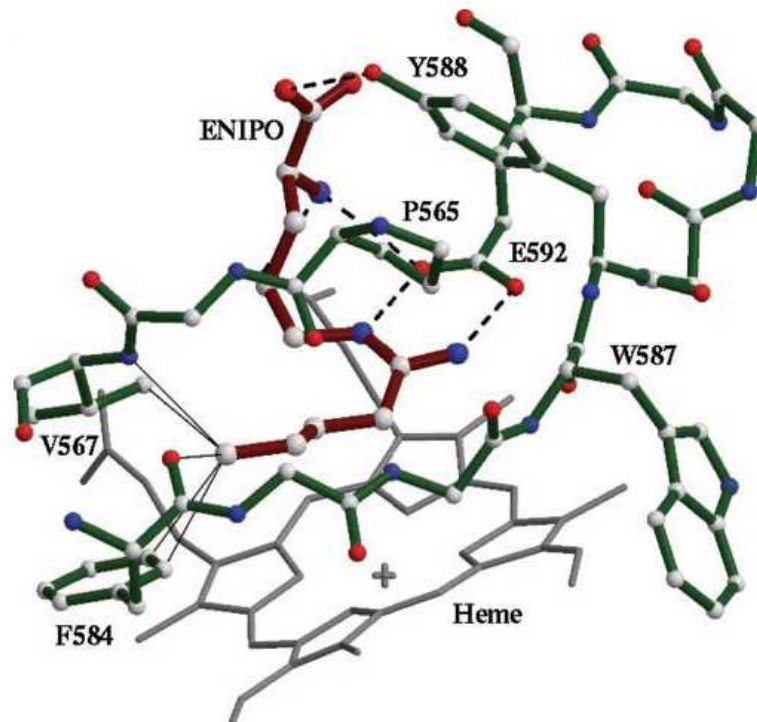


Abb. 3.2: Modell des aktiven Zentrums der murinen nNOS komplexiert mit ENIPO [Bretscher *et al.*, 2003]. Mit Erlaubnis der American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Gestrichelte Linie, Wasserstoffbrückenbindung; durchgezogene Linie, sterischer Konflikt zwischen Ligand und Rezeptor.

Der Vergleich der DDAH-Hemmung durch ENIPO und Vinyl-NIO zeigt ebenfalls eine niedrigere Affinität der verlängerten Verbindung ENIPO, die aber deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei der NOS.

Die Verlängerung des Rückgrates um ein Kohlenstoffatom bei NIL führt zu einer signifikant ($p < 0,005$) schwächeren Hemmung von nNOS und eNOS, während die iNOS durch diese Modifikation nicht beeinflusst wird. Möglicherweise bindet sich NIL ähnlich wie Homoarginin an die NOS, indem es durch starke Interaktionen zwischen dem Enzym und der Aminosäuregruppe sowie der Guanidin-Funktion in einer Arginin-ähnlichen Position gebunden wird. Die längere CH_2 -Kette bildet eine Ausbuchtung und führt durch diese Konformationsänderung zu einer verringerten Bindungsaffinität [Bretscher *et al.*, 2003]. Die Affinität zur hDDAH-1 wird durch die Verlängerung des Rückgrates deutlich reduziert.

3.3.2 N^ω -substituierte L-Arginin-Derivate

Um den Einfluss der Reste der im Kapitel 3.3.1 untersuchten Ornithin-Verbindungen auf Basis von L-Arginin zu analysieren, wurde die inhibitorische Potenz von L-Arginin-Derivaten mit N^ω -Alkyl- und N^ω -Alkenyl-Substituenten bestimmt. Die Strukturen der untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Übersicht über die untersuchten N^ω -substituierten L-Arginin-Derivate.

Substanz	R^1	R^2
Nitro-Arg		H
Propargyl-Arg		H
Allyl-Arg		H
Propyl-Arg		H
Tfe-Arg		H
Pyr-Arg		H
Carb-Arg		H
L-257		H
Mo-Arg		H
Butenyl-Arg		H

Zur Untersuchung des Effektes von Mehrfachbindungen auf die Affinität zu DDAH-1 und NOS-Isoformen, wurden N^ω -Propyl-L-arginin (Propyl-Arg), N^ω -Allyl-L-arginin (Allyl-Arg) und N^ω -Propargyl-L-arginin (Propargyl-Arg) sowie N^ω -(But-3-enyl)-L-arginin getestet.

N^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257) ist der derzeit potenteste bekannte DDAH-Hemmstoff, der gleichzeitig eine sehr geringe Affinität zur NO-Synthase zeigt, was über die Länge der Seitenkette erklärt werden kann, da die NOS nur einen Guanidin-Substituenten mit einer maximalen Länge von drei Kohlenstoffatomen toleriert [Babu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002; Rossiter *et al.*, 2005]. Es wird diskutiert, dass die hohe Affinität zur DDAH durch die freien Elektronenpaare am Sauerstoff des Ethers zustande kommt, die möglicherweise mit polaren Gruppen des Enzyms interagieren. Um diese Annahmen zu überprüfen, wurde die inhibitorische Wirkung von N^ω -Nitro-L-arginin (Nitro-Arg) und N^ω -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin (Carb-Arg) mit freien Elektronenpaaren im N^ω -Substituenten auf die DDAH-1 untersucht und die Selektivität gegenüber den NOS-Isoenzyme bestimmt. Während Nitro-Arg problemlos im aktiven Zentrum der NOS untergebracht werden könnte, ist der Carbamoyl-Rest des Carb-Arg wahrscheinlich zu lang, um fest gebunden zu werden, so dass die Affinität der Verbindung zur NOS gering sein sollte.

Als eine weitere Variante der N^ω -Substitution wurde ein zyklisches Derivat sowohl vom N^ω -Allyl-L-arginin (N^δ -[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin, MO-Arg) als auch vom L-257 (N^δ -[(Amino-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin, Pyr-Arg) auf deren inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der NOS untersucht. Beide besitzen entweder π -Elektronen oder ein freies Elektronenpaar, mit denen eine erhöhte Affinität zum aktiven Zentrum der DDAH-1 erreicht werden sollte.

Um die Hemmwirkung von Verbindungen ohne Doppelbindungen zu untersuchen, wurde die inhibitorische Wirksamkeit von N^ω -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin (Tfe-Arg) auf die NOS-Isoenzyme bestimmt.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien der untersuchten Verbindungen an den NOS-Isoenzymen und der hDDAH-1 sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: : *Inhibitorische Wirkung der untersuchten L-Arginin-Derivate sowie NIL an den drei Isoenzymen der NOS im Vergleich zur hDDAH-1.*

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1mM [%]			
	nNOS	iNOS	eNOS	nNOS	iNOS	eNOS	hDDAH-1
Nitro-Arg	100 \pm 1	91 \pm 8	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1	6 \pm 4
Propargyl-Arg	71 \pm 3	58 \pm 4*	20 \pm 4	100 \pm 1	100 \pm 1	87 \pm 2*	83 \pm 7
Allyl-Arg	68 \pm 2	30 \pm 8*	21 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 1	75 \pm 5*	70 \pm 3
Propyl-Arg	68 \pm 3	-4 \pm 3	15 \pm 10	100 \pm 1	2 \pm 15	55 \pm 6	60 \pm 6
Tfe-Arg	17 \pm 4	-6 \pm 9	15 \pm 1	34 \pm 4	23 \pm 6	30 \pm 6	41 \pm 1
Pyr-Arg	13 \pm 2	36 \pm 9	11 \pm 6	23 \pm 7	52 \pm 2	32 \pm 3	10 \pm 4
Carb-Arg	11 \pm 5	0 \pm 7	15 \pm 10	14 \pm 4	30 \pm 6	37 \pm 6	43 \pm 2
L-257	4 \pm 12	0 \pm 13	4 \pm 7	12 \pm 8	0 \pm 13	10 \pm 5	89 \pm 2
Mo-Arg	-4 \pm 9	3 \pm 2	5 \pm 7	17 \pm 5	22 \pm 6	15 \pm 11	23 \pm 3
Butenyl-Arg	-13 \pm 11	-1 \pm 3	16 \pm 5	14 \pm 4	40 \pm 8	35 \pm 5	71 \pm 3

Die Testung an der hDDAH-1 wurde von Kotthaus durchgeführt [Kotthaus, 2008]. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei separaten Inkubationen. Negative Werte bedeuten eine Aktivierung der NOS. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Propyl-Arg-vermittelten Hemmung des jeweiligen Enzyms (iNOS: $p < 0,005$, eNOS: $p < 0,02$, Student's t-Test). Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 3.3.

Die Einführung von ungesättigten Bindungen erhöht die Affinität der Verbindungen sowohl zur hDDAH-1 als auch zur NOS. Wie in der Literatur beschrieben, ist N^{ω} -Propyl-L-Arginin ein selektiver Inhibitor für die nNOS [Fedorov *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1997]. Die iNOS wird durch die Verbindung in einer Konzentration von 100 μ M nicht und bei 1 mM nur sehr gering gehemmt. Die Hemmung der eNOS liegt etwas

höher als bei der iNOS, jedoch noch deutlich unterhalb der Hemmwerte an der nNOS. Diese Selektivität wird durch die Einführung der Doppel- bzw. Dreifachbindung in Allyl- bzw. Propargyl-Arg weitgehend aufgehoben, da dadurch die Affinität der Verbindungen zur iNOS ($p < 0,005$) und bei einer 1 mM Konzentration auch zur eNOS ($p < 0,02$) signifikant erhöht wird [Zhang *et al.*, 1997]. Auf die starke inhibitorische Wirkung an der nNOS besitzt die Einführung von Mehrfachbindungen jedoch keinen signifikanten Einfluss.

Die Einführung der freien Elektronenpaare in den N^ω -Substituenten von Nitro-Arg und Carb-Arg führten zu keiner ausgeprägten Hemmung der hDDAH-1. Nitro-Arg ist bereits in einer Konzentration von 100 μM ein hoch potenter NOS-Inhibitor und zeigt eine ausgeprägte Selektivität gegenüber der hDDAH-1. Carb-Arg führt zu einer moderaten Hemmung der DDAH und weist, wahrscheinlich aufgrund seiner Kettenlänge, nur einen marginal hemmenden Effekt auf die NOS auf [Babu *et al.*, 1999]. Die Hemmwirkung von Carb-Arg ist jedoch zu gering, um diese Struktur als therapeutisch nutzbaren selektiven DDAH-Hemmstoff weiterzuverfolgen.

Die zyklischen Derivate MO-Arg und Pyr-Arg zeigen lediglich eine geringe inhibitorische Wirkung, sowohl auf die DDAH-1 als auch auf die NOS, möglicherweise hervorgerufen durch einen Verlust an Rotationsfreiheit des N^ω -Substituenten durch die Zyklisierung bzw. durch die Größe des Restes im aktiven Zentrum der NOS.

Auch Tfe-Arg besitzt nur einen schwach inhibitorischen Effekt, sowohl auf die Isoenzyme der NOS als auch auf die DDAH-1. Anscheinend sind hydrophobe Wechselwirkungen als alleiniger Grund nicht entscheidend für die Bindung an die Enzyme [Kotthaus *et al.*, 2008].

Die Verbindung mit der höchsten Selektivität neben L-257 ist N^ω -(But-3-enyl)-L-arginin (Butenyl-Arg). Die Hemmung aller NOS-Isoenzyme ist gering, während die Substanz eine moderate bis gute Wirksamkeit an der hDDAH-1 zeigt. Auch hier führt die Verlängerung der Kette des Substituenten zu einer starken Reduktion der Affinität zur NOS, während die hDDAH-1-hemmende Wirkung bestehen bleibt.

3.3.3 *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, ist N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257) der derzeit potenteste hDDAH-1-Hemmstoff mit gleichzeitig hoher Selektivität gegenüber der NOS [Rossiter *et al.*, 2005]. Wie in der Literatur beschrieben und anhand der unter 3.3.2 gezeigten Ergebnisse belegt, resultiert diese Selektivität wahrscheinlich aus der Länge des N^{ω} -Substituenten, da die NOS nur Reste bis zu einer Länge von drei Kohlenstoffatomen an einem N^{ω} -Atom toleriert [Babu *et al.*, 1999]. Daher sollte die Hemmwirkung von *N*-(2-Methoxyethyl)guanidinen an der NOS untersucht werden, die zwar den gleichen N^{ω} -Substituenten wie L-257 enthalten, jedoch in ihrer Aminosäure-Hauptkette modifiziert sind, um eine Optimierung der inhibitorischen Wirkung bei gleicher oder höherer Selektivität zu erreichen. Die Strukturen der untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5: Übersicht über die untersuchten N-(2-Methoxyethyl)guanidine.

Substanz	R
L-257	
TryMEG	
3-MeBuMEG	
PenMEG	
CbMEG	
AbMEG	

Die Einführung eines Indol-Ringes bei TryMEG (*N*-[2-(Indol-3'-yl)ethyl]-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin) beruht auf der Untersuchung der Hemmwirkung von Indolthiobarbitursäure-Derivaten an der DDAH von *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*DDAH). In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich der Indol-Ring an eine Stelle der DDAH anlagert, an der normalerweise die Aminosäure-Hauptkette bindet [Hartzoulakis *et al.*, 2007]. Obwohl die Sequenzidentität zwischen der Säugetier- und bakteriellen DDAH relativ gering ist, ähneln sich die aktiven Zentren, so dass

Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand vergleichbar sind [Frey *et al.*, 2006]. Daher könnte TryMEG eine hemmende Wirkung auf die hDDAH-1 besitzen.

Daneben wurden *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivate ohne Aminosäurefunktion oder mit entweder α -Carboxyl- oder α -Aminofunktion untersucht, um die Bedeutung der α -Carboxyl- bzw. α -Aminofunktion für den inhibitorischen Effekt zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien der untersuchten Verbindungen an den NOS-Isoenzymen und der hDDAH-1 sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Inhibitorische Wirkung der untersuchten *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine an den drei Isoenzymen der NOS im Vergleich zur hDDAH-1.

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1mM [%]			
	nNOS	iNOS	eNOS	nNOS	iNOS	eNOS	hDDAH-1
L-257	4 \pm 12	0 \pm 13	4 \pm 7	12 \pm 8	0 \pm 13	10 \pm 5	89 \pm 2
TryMEG	19 \pm 10	7 \pm 5	12 \pm 5	6 \pm 6	15 \pm 1	17 \pm 1	19 \pm 3
3-MeBuMEG	5 \pm 6	-5 \pm 3	14 \pm 2	-10 \pm 1	4 \pm 12	19 \pm 10	25 \pm 6
PenMEG	-1 \pm 8	8 \pm 6	-5 \pm 1	-17 \pm 8	21 \pm 4	-1 \pm 4	11 \pm 9
CbMEG	-2 \pm 5	-3 \pm 2	4 \pm 9	5 \pm 4	2 \pm 6	13 \pm 4	42 \pm 6
AbMEG	-5 \pm 9	-4 \pm 10	4 \pm 6	-15 \pm 8	2 \pm 6	13 \pm 4	80 \pm 5

Die Testung an der hDDAH-1 wurde von Kotthaus durchgeführt [Kotthaus, 2008]. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei separaten Inkubationen. Negative Werte bedeuten eine Aktivierung der NOS. Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 3.5.

Alle *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine zeigen nur eine geringe Hemmung der NO-Synthase, möglicherweise bedingt durch das Fehlen einer intakten Aminosäurefunktion, die für die Bindung an die NO-Synthase wichtig sein könnte, sowie durch die Länge der *N*^w-Substituentenkette. Allerdings sinkt auch bei den meisten Verbindungen die Affinität zur hDDAH-1. So wird der Verlust der α -Carboxyl- und der α -Aminofunktion bei *N*-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(*n*-pentyl)guanidin (PenMEG) nicht

toleriert und resultiert in einer sehr geringen Hemmung der hDDAH-1. Durch Einführung einer verzweigten Alkylkette bei *N*-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(3-methylbutyl)guanidin (3-MeBuMEG) wird die DDAH etwas stärker gehemmt, so dass eine Verzweigung einen Entwicklungsansatz darstellen kann. Wird ein Indol-Rest eingeführt (TryMEG), so besitzt die Verbindung einen sehr geringen inhibitorischen Effekt sowohl auf die hDDAH-1 als auch auf die NOS. Der Verlust der α -Aminofunktion (*N*-(4-Carboxybutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin, CbMEG) senkt die inhibitorische Wirkung an der hDDAH-1 deutlich.

Demgegenüber besitzt *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG), eine Verbindung ohne α -Carboxylfunktion, einen, im Vergleich zum L-257, nur etwas geringeren inhibitorischen Effekt auf die hDDAH-1. Gleichzeitig hemmt AbMEG die NOS nicht, sodass hier ein aussichtsreicher Kandidat für die Arzneistoff-Entwicklung mit guter inhibitorischer Wirkung und ausgeprägter Selektivität für die hDDAH-1 vorliegt.

Zur Aufklärung der Bindung von AbMEG an das aktive Zentrum der NOS wurde ein Modell des aktiven Zentrums der nNOS komplexiert mit AbMEG sowie ein Modell komplexiert mit Nitro-Arginin und AbMEG von Lunk im Arbeitskreis Clement erstellt (Abb. 3.3) [Lunk, Dissertation in Vorbereitung].

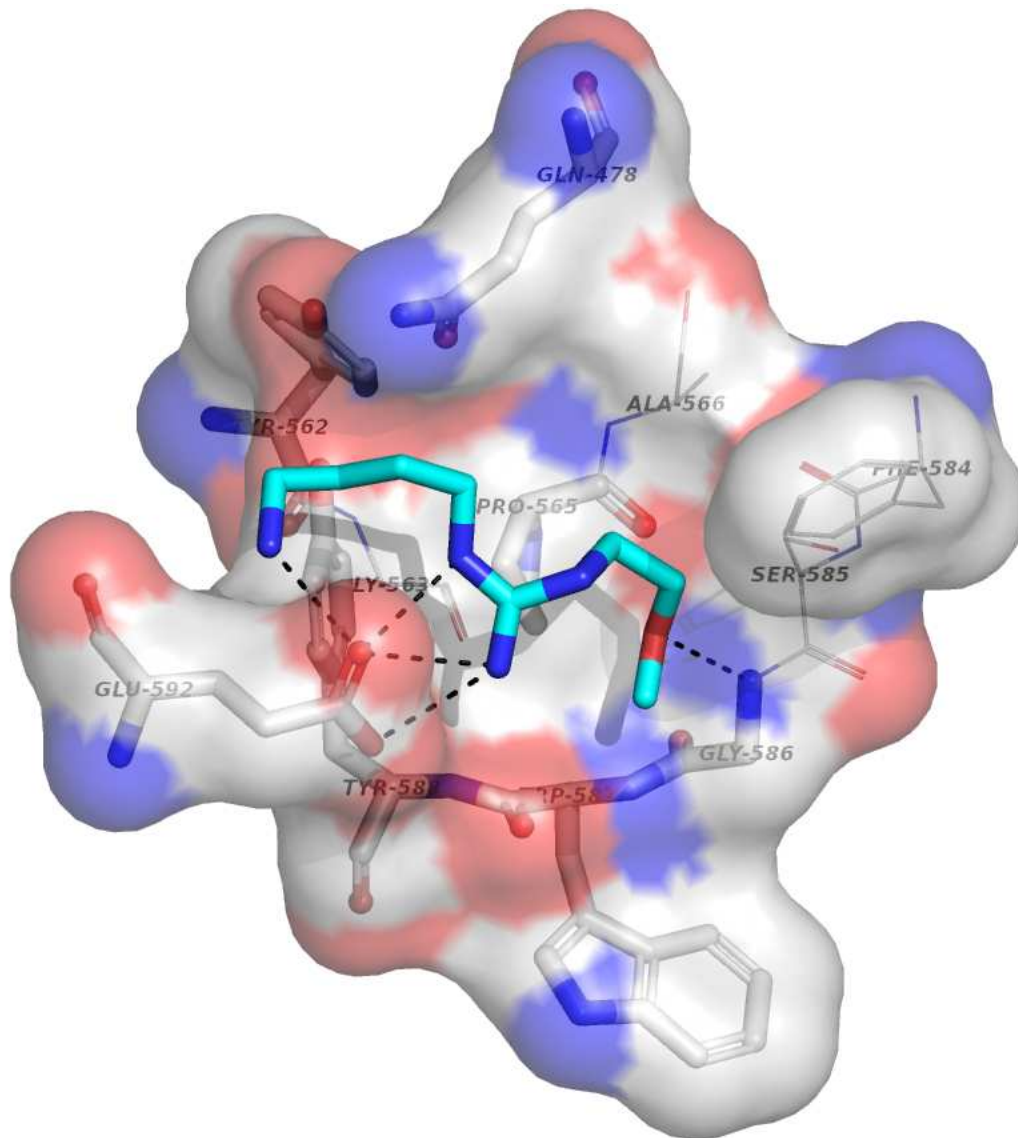


Abb. 3.3: Modell des aktiven Zentrums der nNOS komplexiert mit AbMEG. Das Modell wurde von Lunk im Arbeitskreis Clement auf Basis der Kristallstruktur 1K2R (Protein Datenbank) entwickelt. Gestrichelte Linien, Wasserstoffbrückenbindungen.

AbMEG wird in eine gekrümmte Position mit zwei Ausbuchtungen gezwungen und bildet so nur noch fünf Wasserstoffbrückenbindungen aus: Eine zwischen dem Stickstoff der Peptidbindung des Glycin 586 und dem Sauerstoff der Methoxyfunktion (3,0 Å), zwei zwischen der Carboxyl-Gruppe des Glutamat 592 und der α -Aminofunktion (3,0 Å) sowie dem N^{δ} -Atom (2,8 Å), des Weiteren zwei zum unsubstituierten Stickstoff der Guanidin-Funktion (2,9 Å; 3,0 Å).

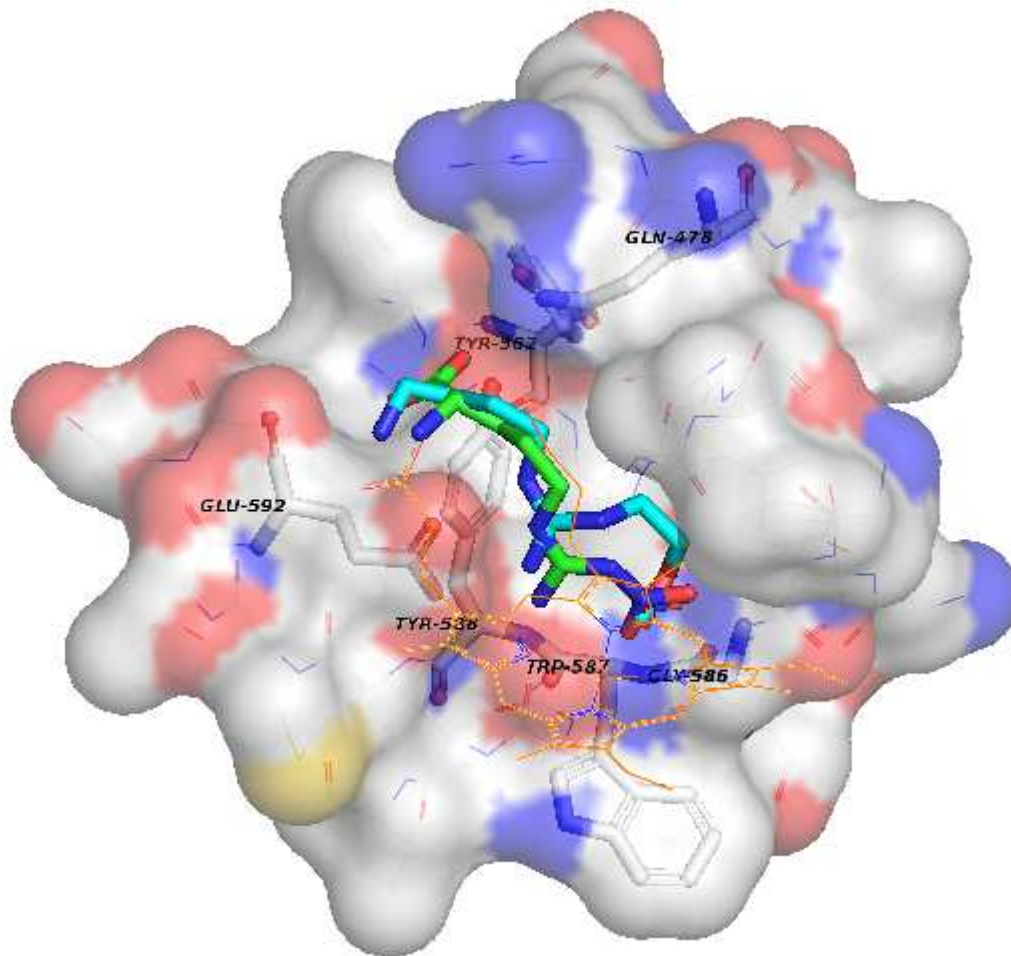


Abb. 3.4: Modell des aktiven Zentrums der nNOS komplexiert mit AbMEG und Nitro-Arg. Das Modell wurde von Lunk im Arbeitskreis Clement auf Basis der Kristallstruktur 1K2R (Protein Datenbank) entwickelt. Gestrichelte Linien, Wasserstoffbrückenbindungen.

Der Vergleich der Bindung von AbMEG und Nitro-Arg an die NOS (Abb. 3.4) gibt Anhaltspunkten für die Gründe der fehlenden Affinität. Während Nitro-Arg in einer relativ gestreckten Konformation in das aktive Zentrum passt und zehn Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym ausbilden kann, wird AbMEG in eine sterisch ungünstige Position gezwungen und kann durch die fehlende Carboxylfunktion drei Wasserstoffbrückenbindungen nicht eingehen.

Um die Affinität von AbMEG zur hDDAH-1 zu untersuchen, wurde in computer-gestützten Docking-Studien von Lunk ein Modell der hDDAH-1, komplexiert mit AbMEG erstellt. Das Modell ist in Abbildung 3.5 gezeigt [Lunk, Dissertation in Vorbereitung].

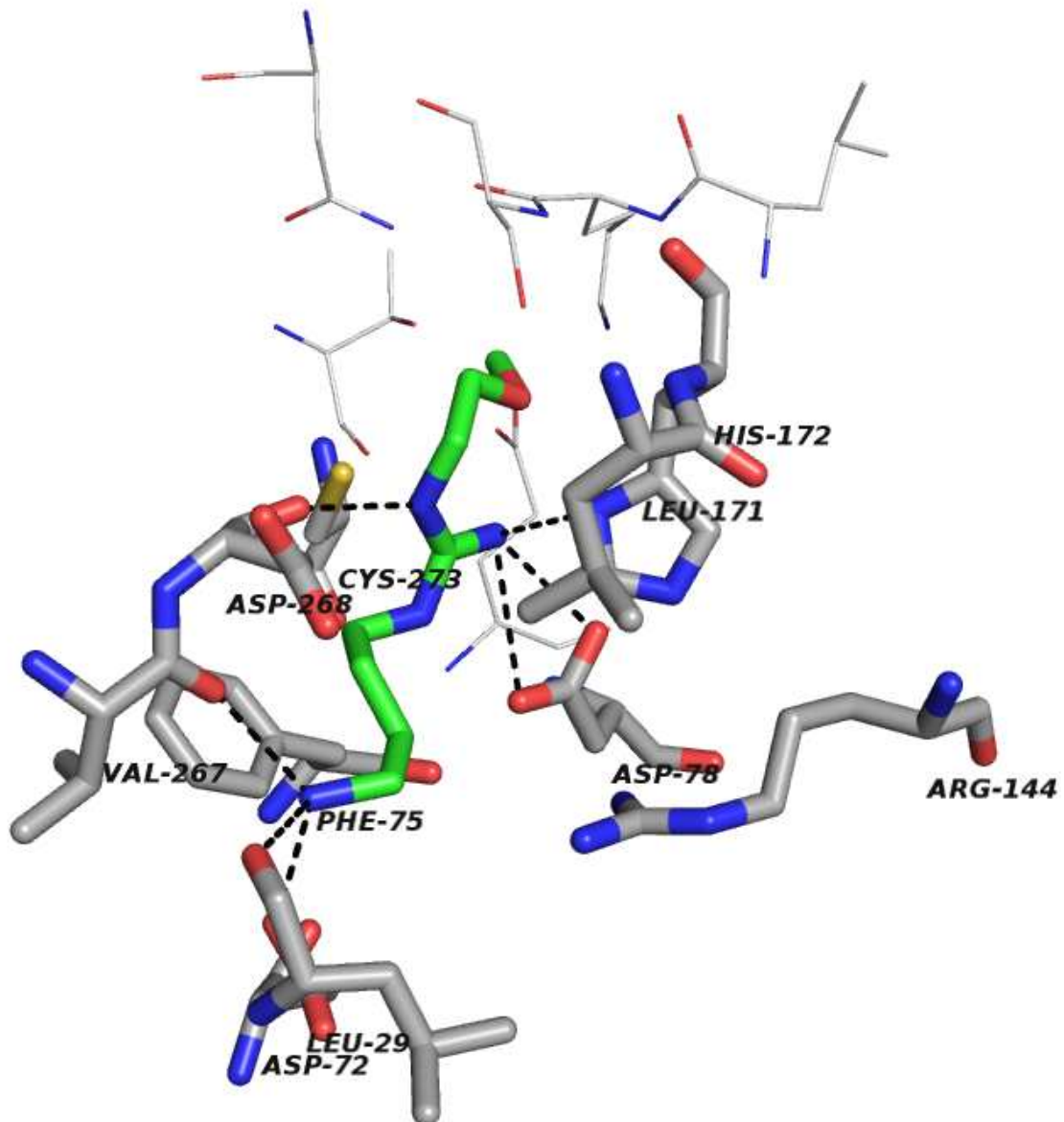


Abb. 3.5: Modell des aktiven Zentrums der hDDAH-1 mit gebundenem AbMEG. Das Modell wurde von Lunk im Arbeitskreis Clement entwickelt. Gestrichelte Linien, Wasserstoffbrückenbindungen.

AbMEG bindet in einer gestreckten Konformation an die hDDAH-1 und bildet sieben Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym aus. Der Vergleich dieses Modells mit der Kristallstruktur der DDAH mit kokristallisiertem Citrullin im aktiven Zentrum zeigt, dass AbMEG, genauso wie Citrullin, eine Wasserstoffbrücke zum Aspartat 72, sowie jeweils eine Bindung zu den Sauerstoffatomen der Peptidbindungen der Aminosäuren Leucin 29 und Valin 267 eingeht [Leiper *et al.*, 2007]. Aspartat 78 interagiert mit dem unsubstituierten N^{ω} -Atom. Dieses bildet eine weitere

Wasserstoffbrücke mit Histidin 172 aus. Diese Anlagerung im aktiven Zentrum wird durch eine weitere Wasserstoffbrücke vom substituierten N^{ω} -Atom zum Aspartat 268 stabilisiert. Die Hauptkette wird des Weiteren durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phenylalanin 75 und Leucin 171 im aktiven Zentrum orientiert [Frey *et al.*, 2006]. Der voluminöse Substituent des N^{ω} -Atoms findet im aktiven Zentrum genug Platz, so dass der Ligand in einer sterisch günstigen Konformation an das Enzym binden kann. Durch den Wegfall der Carboxylfunktion gehen, verglichen mit Citrullin, allerdings drei Wechselwirkungen, zwei mit dem Arginin 144 und eine mit dem Arginin 97, verloren, so dass eine deutlich geringere Affinität als beim L-257 zur DDAH zu erwarten wäre. Die Kristallstruktur der hDDAH-1 mit L-257 im aktiven Zentrum zeigt jedoch, dass die Anlagerung eine andere Orientierung des Arginins 144 zur Folge hat, so dass auch L-257 zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylfunktion und dem Arginin 144 nicht ausbilden kann. Dadurch verliert die Carboxylfunktion an Bedeutung für die Bindung an das Enzym und führt zu einer nur etwas reduzierten inhibitorischen Wirkung von AbMEG im Vergleich mit L-257.

Trotz dieser etwas geringeren Hemmung der DDAH-1 durch AbMEG besitzt die Verbindung ein interessantes Entwicklungspotential, da AbMEG gegenüber L-257 den großen Vorteil einer besseren Arzneistoffqualität besitzt. Durch das Fehlen der unter physiologischen Bedingungen geladenen Carboxylfunktion ist bei oraler Gabe eine erhöhte Resorption durch passive Diffusion zu erwarten, zumal wenn es gelingt die Guanidinfunktion in ein Prodrug zu überführen.

3.3.4 *N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin

Wie in Kapitel 3.3.3 gezeigt, verringert eine Decarboxylierung von L-257 die inhibitorische Wirkung an der DDAH-1 nur geringfügig bei gleich bleibend hervorragender Selektivität gegenüber der NOS. Um einen, im Vergleich zu L-257, noch potenteren Inhibitor mit Selektivität gegenüber der NOS zu erhalten, wurde ein Vinyl-NIO-Analogon ohne α -Carboxylfunktion getestet (*N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin, decVNIO; Abb. 3.6).

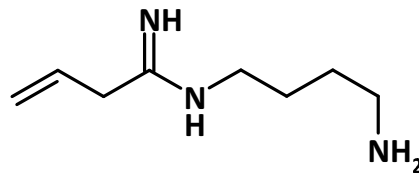


Abb. 3.6 Struktur von N-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO).

Vinyl-NIO diente als Ausgangsstruktur, da diese Verbindung der stärkste bekannte Inhibitor der hDDAH-1 ist [Kotthaus *et al.*, 2008]. Allerdings ist sie auch ein höchst potenter Hemmstoff der NOS, so dass die Erhöhung der Selektivität gegenüber der NOS durch eine Modifikation der Substanz das wichtigste Ziel war.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Selektivität anhand der inhibitorischen Wirkung an der NOS überprüft werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.7 Inhibitorische Wirkung des untersuchten N-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO) an den drei Isoenzymen der NOS im Vergleich zur hDDAH-1.

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1 mM [%]			
	nNOS	iNOS	eNOS	nNOS	iNOS	eNOS	hDDAH-1
VNIO	94 \pm 3	84 \pm 1	45 \pm 2	100 \pm 1	100 \pm 1	88 \pm 3	97 \pm 3
decVNIO	83 \pm 1*	77 \pm 3*	51 \pm 2	99 \pm 1	100 \pm 1	56 \pm 8*	40 \pm 6

Die Testung an der hDDAH-1 wurde von Kotthaus durchgeführt [Kotthaus, 2008]. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei separaten Inkubationen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur VNIO-vermittelten Hemmung des jeweiligen Enzyms (nNOS: $p < 0,01$, iNOS: $p < 0,008$; 1 mM, eNOS: $p < 0,03$, Student's t-Test). Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.6.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, wird die hDDAH-1 deutlich schlechter von decVNIO gehemmt als durch Vinyl-NIO. Trotz der fehlenden Carboxylfunktion besitzt decVNIO eine ausgeprägte Affinität zur NO-Synthase, die jedoch im Vergleich mit VNIO signifikant erniedrigt ist. In Abbildung 3.7 sind zwei Modelle der nNOS mit jeweils decVNIO oder VNIO gebunden an das aktive Zentrum dargestellt.

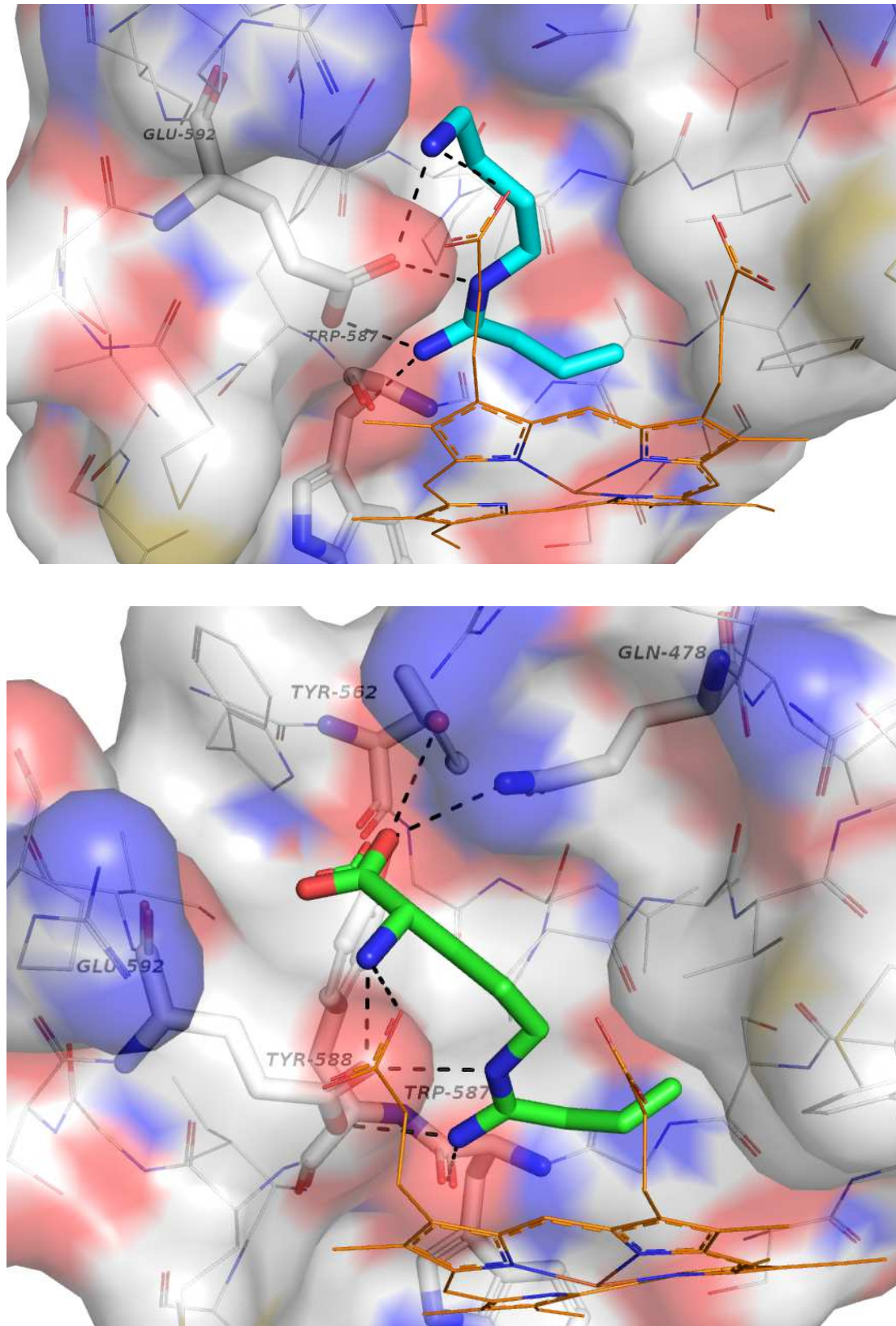


Abb. 3.7: Modell des aktiven Zentrums der nNOS mit gebundenem decVNIIO (oben) und VNIIO (unten). Das Modell wurde von Lunk im Arbeitskreis Clement auf Basis der Kristallstruktur 1MMW (Protein Datenbank) entwickelt. Gestrichelte Linien, Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Hemmung der NOS wird durch Decarboxylierung von Vinyl-NIO nur wenig reduziert. Der Vergleich der Modelle des aktiven Zentrums gedockt mit entweder decVNIO oder VNIO zeigt, dass decVNIO zwar genauso wie VNIO sowohl zum Glutamin 592 drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet als auch zum Häm und Tryptophan 587 jeweils eine. Allerdings kann decVNIO aufgrund der fehlenden Carboxylfunktion nicht mit Glutamin 478 und Tyrosin 562 interagieren, so dass darüber die verringerte Affinität erklärbar ist. Anscheinend senkt eine Decarboxylierung die Affinität zur NOS zwar etwas, weitaus wichtiger scheint jedoch die Kettenlänge am substituierten N^{ω} -Atom für die Selektivität zu sein.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Hyperaktivität der nNOS ist an vielen pathophysiologische Vorgängen wie z.B. Migräne oder neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt [Babu *et al.*, 1999; Bretscher *et al.*, 2003]. Da die weiteren Isoenzyme der NOS, eNOS und iNOS, physiologische Funktionen innerhalb des kardiovaskulären Systems bzw. dem Immunsystem besitzen, ist eine selektive Hemmung der nNOS wünschenswert [Di Giacomo *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2009]. Aufgrund der starken Konservierung des aktiven Zentrums ist jedoch eine Inhibierung einzelner Isoenzyme schwierig [Li und Poulos, 2005]. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Selektivität gegenüber der iNOS und eNOS ist eine indirekte Hemmung über die hDDAH-1, die mit der nNOS kolokalisiert ist. Die hDDAH-1 baut die kompetitiven NOS-Inhibitoren N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) ab, sodass bei einer Hemmung die Konzentration der physiologischen Inhibitoren ansteigt [Tran *et al.*, 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verbindungen, die von Schade synthetisiert und von Kotthaus an der hDDAH-1 getestet wurden, auf Selektivität gegenüber der NOS überprüft [Kotthaus, 2008; Schade, 2008]. Als besonders erfolgsversprechend gelten hier potente DDAH-1-Hemmstoffe ohne inhibierende Wirkung auf die NO-Synthase,

da dadurch eine selektive, geringere Hemmung der NOS erwartet wird [Vallance und Leiper, 2002].

Innerhalb der durchgeführten Studien wurde eine Vielzahl an Verbindungen an den drei Isoenzymen der NOS getestet. Einige zeigten keine Selektivität gegenüber der NO-Synthase oder keine ausreichende inhibitorische Wirkung auf die DDAH-1. Trotzdem konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden, die eine rationale Wirkstoffentwicklung erleichtern. Anzumerken ist hierbei, dass einige vorgestellte Ergebnisse von Wang *et al.* zeitgleich während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermittelt und veröffentlicht wurden [Wang *et al.*, 2009].

Eine Verlängerung des Alkylsubstituenten am Amidin der N^{δ} -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate bzw. Guanidin der L-Argininverbindungen senkt die Affinität zur NO-Synthase deutlich und erhöht dabei die inhibitorische Wirkung auf die hDDAH-1. So sinkt die hemmende Potenz vom NIO zum Ethyl-NIO an der NOS signifikant, derweil die DDAH-Inhibition zunimmt. Eine weitere Verlängerung der Alkylkette wie beim Butenyl-Arginin wird von der nNOS nicht weiter toleriert und verringert die Affinität der Verbindung signifikant, bei guter Wirksamkeit an der hDDAH-1.

In Anlehnung an den potentesten bekannten hDDAH-1-Hemmstoff mit hoher Selektivität gegenüber der NOS, L-257, wurden *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine untersucht. Diese enthalten zwar den gleichen N^{ω} -Substituenten wie L-257, sind jedoch in ihrer Aminosäure-Hauptkette modifiziert, um eine Optimierung der Hemmpotenz bei gleicher oder verbesserter Selektivität zu erreichen. Ein aussichtsreicher Kandidat für die Arzneistoff-Entwicklung wurde hier mit AbMEG (*N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin), einer Verbindung ohne α -Carboxylfunktion, entdeckt, die eine nur etwas geringere Hemmwirkung als L-257 auf die hDDAH-1 besitzt und die NOS nicht hemmt. Verglichen mit dem L-257 besitzt diese Verbindung durch den Wegfall der polaren Carboxylfunktion günstigere pharmakokinetische Eigenschaften. Über die Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von decVNIO (*N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin), einem Vinyl-NIO-Analogen

ohne α -Carboxylfunktion, an der NOS konnte gezeigt werden, dass die Selektivität von AbMEG gegenüber der NOS jedoch weniger auf das Fehlen der Carboxylfunktion zurückzuführen ist, als auf die Länge des Guanidin-Substituenten, der mit vier Atomen zu lang ist. Mittels eines von Lunk entwickelten Modells der nNOS mit AbMEG im aktiven Zentrum konnte gezeigt werden, dass AbMEG zwei Ausbuchtungen ausbildet und so in eine sterisch ungünstige Position gezwungen wird. Weiterhin kann die Verbindung durch die fehlende Carboxylfunktion drei Wasserstoffbrückenbindungen nicht eingehen.

Um einen erfolgsversprechenden Arzneistoff zu erhalten, sollte die inhibitorische Wirkung an der hDDAH-1 deutlich erhöht werden. Dies könnte z.B. durch die Einführung von π -Elektronen oder freien Elektronenpaaren realisiert werden, die anscheinend die Affinität zur DDAH erhöhen, weiterhin durch eine Verzweigung wie beim 3-MeBuMEG. Zur Erhaltung der Selektivität gegenüber der NOS sollten große Reste als Guanidin- bzw. Amidin-Substituenten eingeführt werden.

Um eine selektive Hemmung der eNOS gegenüber der nNOS und iNOS durch die Inhibierung der DDAH-1 zu gewährleisten, ist es weiterhin wichtig, dass die Hemmstoffe der DDAH-1 die DDAH-2 nicht inhibieren. Daher sollen in weiterführenden Arbeiten die Wirkung der Hemmstoffe auf die DDAH-2 untersucht werden, um Aussagen über die Selektivität der indirekten NOS-Hemmung treffen zu können.

4 Charakterisierung der Zersetzung von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP)

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiger Transmitter, der durch die NO-Synthase gebildet wird und an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Zuständen beteiligt ist. So besitzt er sowohl im Immunsystem als auch im zentralen Nervensystem und endothelialen System eine wichtige Funktion. Eine erhöhte NO-Freisetzung wird mit Erkrankungen wie z.B. Migräne, Morbus Parkinson und Alzheimer, rheumatoider Arthritis und septischem Schock in Verbindung gebracht [Bingham, 2002; Dawson und Dawson, 1998; Hobbs *et al.*, 1999; Neeb und Reuter, 2007; Olesen, 2008]. Aufgrund der Beteiligung von NO an einer Reihe von pathophysiologischen Mechanismen ist die Entwicklung von NO-Synthase-Inhibitoren aus pharmazeutischer Sicht ein attraktives Forschungsgebiet.

Zu diesem Zweck wurde im Arbeitskreis eine neue Strukturklasse von NO-Synthase-Inhibitoren, Pyrido[1,2-*a*]pyrimidine, entwickelt, die zum Teil eine gute Hemmwirkung mit IC₅₀-Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich zeigten [Bluhm *et al.*, 2009]. Beispielhaft ist ein Pyrido[1,2-*a*]pyrimidin mit Brombiphenylrest in Abb. 4.1 dargestellt, welches für die nNOS einen IC₅₀-Wert von 59 µM aufweist.

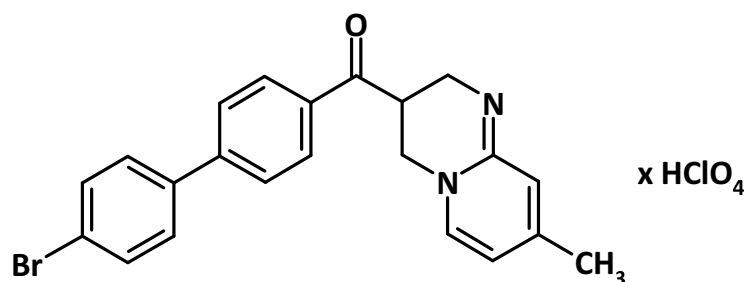


Abb. 4.1: Struktur von 3-[4'-(4''-Bromphenyl)benzoyl]-3,4-dihydro-8-methyl-2H-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin Hydroperchlorat.

Da als Syntheseausgangprodukte 2-Aminopyridine eingesetzt werden, welche selber literaturbekannte Hemmstoffe der NO-Synthase sind wurden

Reinheitsuntersuchungen durchgeführt, um auszuschließen, dass die Hemmwirkung auf noch vorhandenes Edukt zurückzuführen ist [Boer *et al.*, 2000; Faraci *et al.*, 1996]. Im Rahmen dieser Reinheitsuntersuchungen stellte sich die *p*-Brombiphenyl-Enonmannichbase (Abb. 4.2) mit einem IC₅₀-Wert von 73 µM (nNOS) als wirksam heraus [Bluhm, 2004].

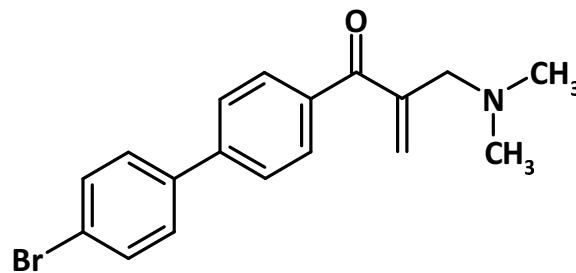


Abb. 4.2: Struktur der *p*-Brombiphenyl-Enonmannichbase.

Diese Verbindungsklasse ist jedoch chemisch sehr instabil, da sich das reaktive α,β -ungesättigte Keton leicht mit Nucleophilen, wie z.B. SH-Gruppen von Proteinen, umsetzt. Infolgedessen wurden von Bluhm Verbindungen ohne diese Doppelbindung synthetisiert (Abb. 4.3) und mittels Nitrit-Assay an der humanen nNOS charakterisiert [Bluhm, 2004].

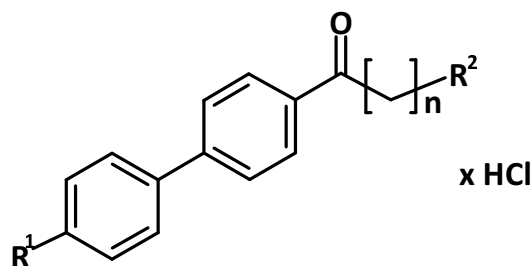


Abb. 4.3: Struktur der synthetisierten Mannichbasen; R¹: Br, F, Cl; R²: N(CH₃)₂, Piperidinyl, Morpholinyl, n = 1-3 [Bluhm, 2004].

Als wirksamste Verbindung stellte sich das 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP; Abb. 4.4) heraus. Der IC₅₀-Wert wurde mit Hilfe des Nitrit-Assays an der humanen nNOS bestimmt und lag bei 61 µM. Diese Verbindung zeigte also eine annähernd gleiche Wirksamkeit wie die *p*-Brombiphenyl-Enonmannichbase [Bluhm, 2004].

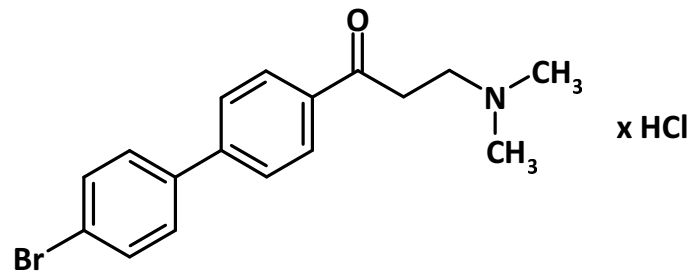


Abb. 4.4: Struktur von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP).

Bei der Charakterisierung von BDAP wurde im Rahmen dieser Arbeit in Vortests ein unbekannter Peak im HPLC-Chromatogramm detektiert, der immer bei Substratzugabe auftrat (Daten nicht gezeigt). Daher lag die Vermutung nahe, dass sich das 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP) zersetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Stabilität überprüft und ein mögliches Zersetzungsprodukt identifiziert werden.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Material

4.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Merck oder Roth bezogen. Acetonitril für die HPLC-Analytik wurde von Mallinckrodt Baker (Griesheim) erhalten. Sowohl die DC-Fertigplatten (Kieselgel, Polygram SIL G/UV₂₅₄ 0,25 mm) als auch MN Kieselgel 60 für die Säulen-Chromatographie wurden über die Firma Macherey-Nagel (Düren) bezogen.

4.2.1.2 Geräte

Die Proben wurden in 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. pH-Werte wurden mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ

Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) eingestellt. Das Fließmittel für die HPLC wurde nach Herstellung über einen Sartorius Membranfilter (0,45 µM) filtriert und mit einem Sonorex Super RK 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast. Zur Lyophilisation wurde die Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 (Fa. Christ GmbH) verwendet.

4.2.1.3 Synthese von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP)

4.2.2 Methoden

4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP) wurde, wie von Friedrich beschrieben, synthetisiert [Friedrich, 2007]. Dazu wurden 10 mmol 4'-(4-Bromphenyl)acetophenon, 20 mmol Paraformaldehyd und 20 mmol Dimethylammoniumchlorid mit 20 mmol konzentrierter Salzsäure versetzt, mit 8 ml Propanol überschichtet und fünf Stunden unter Rückfluss gekocht. Im Anschluss wurden in den noch heißen Ansatz 32 ml Ethanol gegeben. Die Mannichbase kristallisierte als Niederschlag aus. Nach Umkristallisation aus Aceton/Ethanol konnte das reine Produkt erhalten werden. Es stimmte in allen spektroskopischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften mit den Literaturdaten von Friedrich (2007) überein.

4.2.2.1 Stabilitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie

Zur Überprüfung der Stabilität im pH-Bereich von pH 2 bis pH 9 wurde die Verbindung in etwas Methanol gelöst und dann mit Salzsäure (pH 2), 50 mM Ameisensäure/Formiat-Puffer (pH 3), 50 mM Essigsäure/Acetat-Puffer (pH 4, pH 5), 50 mM Phosphatpuffer (pH 6, pH 7, pH 8) oder 50 mM Borat-Puffer (pH 9) sowie *Aqua bidest.* verdünnt. Die Zersetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie über 24 Stunden beobachtet. Als Fließmittel diente Dichlormethan/Methanol (9:1).

4.2.2.2 Bestimmung der Zersetzungsgeschwindigkeit über HPLC

BDAP wurde in etwas Methanol gelöst und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt. Anschließend wurde in drei voneinander unabhängigen Ansätzen die Zersetzungsgeschwindigkeit mit Hilfe der folgenden HPLC-Methode ermittelt.

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 2487 Dual UV Detector und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: Symmetry C18, 5 µm (4,6 × 250 mm; Waters)

Vorsäule: Phenomenex C18 (4,0 × 3,0 mm)

Temperatur: Raumtemperatur (nicht thermostatisiert)

Mobile Phase: Eluent A: Ameisensäure 0,1 % (v/v)

Eluent B: Acetonitril

Flussrate: 1 ml/min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	68	32
6	68	32
11	50	50
15	50	50
17	68	32
25	68	32

Laufzeit: 25 min

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: λ = 295 nm

Retentionszeiten: BDAP: 4,2 ± 0,1 min

Zersetzungsprodukt: 11,8 ± 0,4 min

Die Ergebnisse wurden mit Sigma-Plot 8.0 (San Jose, USA) ausgewertet.

4.2.2.3 Strukturaufklärung des Zersetzungsproduktes mittels LC/MS

Zur Identifizierung des gebildeten Zersetzungsproduktes wurde BDAP in etwas Methanol gelöst und mit *Aqua bidest.* zu einer 100 µM Lösung verdünnt. Nach 24 Stunden wurde die Probe mittels LC/MS vermessen. Dazu wurde das folgende System verwendet:

HPLC-Pumpe:	HP Series 1100 Binary Pump G1312A
Entgaser:	HP Degasser G 1322A
Detektor:	HP 1100 VWD UV/VIS Detektor
Injektor:	Rheodyne 7725 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion
Massenspektrometer:	Esquire-LC (Bruker, Bremen)
Ionisation:	Elektrosprayionisierung (ESI)
Trockentemperatur:	200 °C
Trockengas:	6,5 l/min
Sprühdruck:	12 psi
Scan:	50 - 1000 m/z
Software:	Agilent ChemStation HPLC Aufnahme- und Auswertesoftware (Version A.09.01) Esquire Control (Version 6.14) MS Aufnahmesoftware Data Analysis (Version 3.0) MS Auswertesoftware
Stationäre Phase:	Symmetry C18, 5 µm (4,6 × 250 mm; Waters) Vorsäule: Guard Pak C18 (4,0 × 3,0 mm; Waters)
Temperatur:	Raumtemperatur
Mobile Phase:	Eluent A: Ameisensäure 0,1 % (v/v)

Eluent B: Acetonitril

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	68	32
6	68	32
11	50	50
15	50	50
17	68	32
25	68	32

Flussrate: 1 ml/min

Laufzeit: 25 min

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: $\lambda = 295 \text{ nm}$

Retentionszeiten: BDAP: 5,3 ± 0,5 min

Zersetzungsprodukt: 14,2 ± 0,3 min

4.2.2.4 Isolierung des Zersetzungsproduktes

BDAP wurde in Methanol angelöst und mit *Aqua bidest.* verdünnt. Nach 24 Stunden wurde die Probe lyophilisiert, mit Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgenommen und über eine Normalphase chromatographisch gereinigt. Die Fraktion des gewünschten Zersetzungsproduktes wurde mit einem Rotationsverdampfer im Vakuum einkonzentriert und anschließend mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Stabilitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie

Bei vorhergehenden Untersuchungen zur Metabolisierung von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid (BDAP) wurde ein unbekannter Peak im HPLC-Chromatogramm festgestellt, der auch ohne Zugabe von Enzymquelle auftrat. Daher wurde angenommen, dass sich die Verbindung zeitabhängig zersetzt. Um die Zersetzungsbedingungen zu bestimmen, wurde die Verbindung in Puffern mit verschiedenen pH-Werten gelöst und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen, die über Dünnschichtchromatographie analysiert wurden. Es konnte festgestellt werden, dass BDAP im Sauren unterhalb pH 4 über 24 Stunden stabil ist, während sich die Verbindung bei pH 5 nach zwei Stunden stark zersetzt. Ab pH 6 ist eine sofortige Zersetzung zu beobachten. Der R_f -Wert für BDAP lag bei 0,69, der R_f -Wert für das Zersetzungsprodukt bei 0,45.

4.3.2 Bestimmung der Zersetzungsgeschwindigkeit über HPLC

Die Mannichbase wurde in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Stündlich wurde eine Probe entnommen und per HPLC vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung Abb. 4.5 dargestellt.

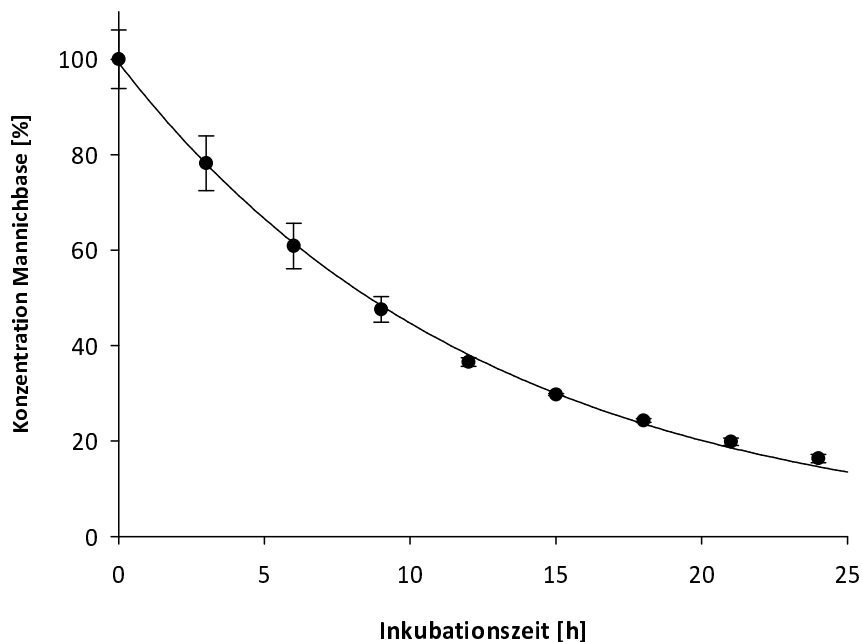


Abb. 4.5: Zersetzung von BDAP über 24 Stunden. Der Graph wurde über Sigma Plot 8.0 erstellt ($r^2 = 0,999$). Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Verbindung zersetzt sich bei pH 7,4 deutlich innerhalb eines Tages. Nach neun Stunden sind nur noch 48 % der Ausgangsverbindung vorhanden, nach 24 Stunden nur noch ca. 20 %.

Die beste Anpassung der Daten erfolgt nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, da die Reaktion, wie die Stabilitätsdaten zeigen (vgl. Kapitel 4.3.1), basenkatalysiert verläuft und somit nur dann, wenn die Verbindung unprotoniert vorliegt [Mollica *et al.*, 1970].

4.3.3 Strukturaufklärung des Zersetzungsproduktes mittels LC/MS-Kopplung

Um die Struktur des Zersetzungsproduktes aufzuklären, wurde BDAP in Methanol gelöst und mit *Aqua bidest.* verdünnt. Nach 24 Stunden wurden die Produkte mittels LC/MS-Kopplung analysiert. Der erste Peak nach 5,4 min entsprach mit einem m/z 332-Peak und einem M+2-Peak dem 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon. Weiterhin trat ein zweiter Peak mit einem m/z 620-

Peak nach 14,3 min auf, der, wie in Abbildung 4.6 dargestellt, durch seinen M+2- und M+4-Peak das charakteristische Isotopen-Muster von zwei Brom-Atomen im Molekül zeigte. Aufgrund dieses Massenspektrums ist die Entstehung eines Dimers nach der Zersetzung wahrscheinlich.

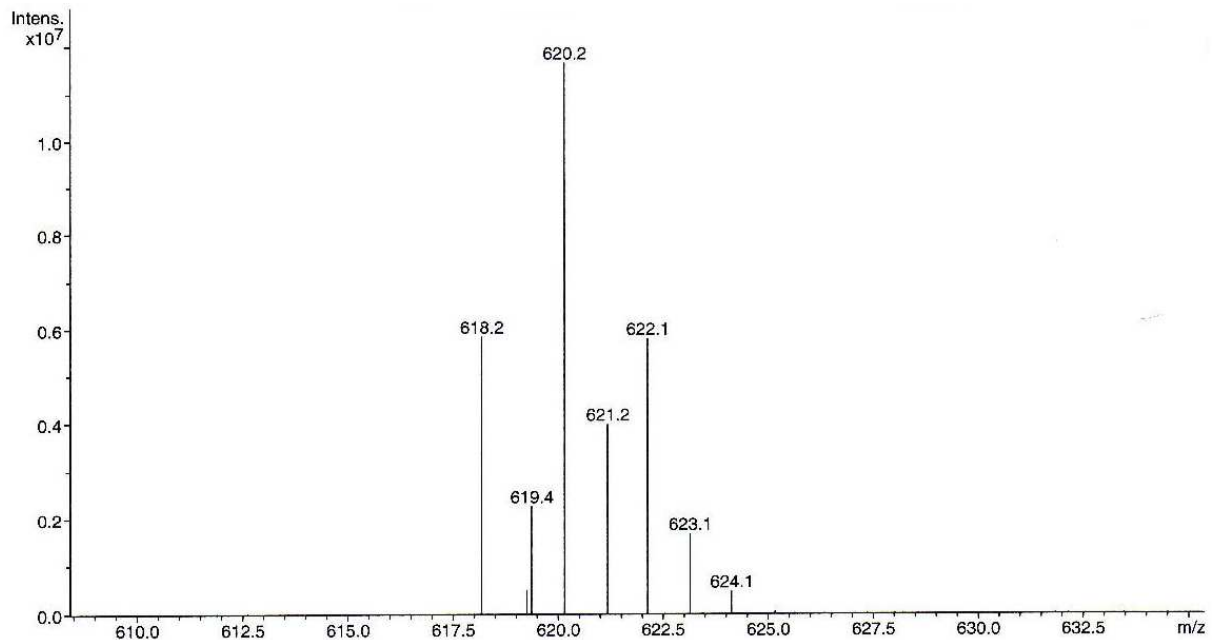


Abb. 4.6: Massenspektrum des 14,3 min-Peaks des Zersetzungsproduktes abzüglich des Untergrundspektrums.

Angenommen wird, dass das Dimer durch eine Desaminierung der Mannichbase und anschließender Michael-Addition an ein zweites Molekül der Mannichbase entsteht (Abb. 4.7). Nur die deprotonierte Form unterliegt einer Elimination [Mollica *et al.*, 1970]. Das entstehende α,β -ungesättigte Keton ist ein guter Michael-Akzeptor, sodass anschließend eine Michael-Addition der nucleophilen Mannichbase an dieses stattfinden kann [Davioud-Charvet *et al.*, 2003; Dimmock *et al.*, 1998; Portoghese *et al.*, 1989].

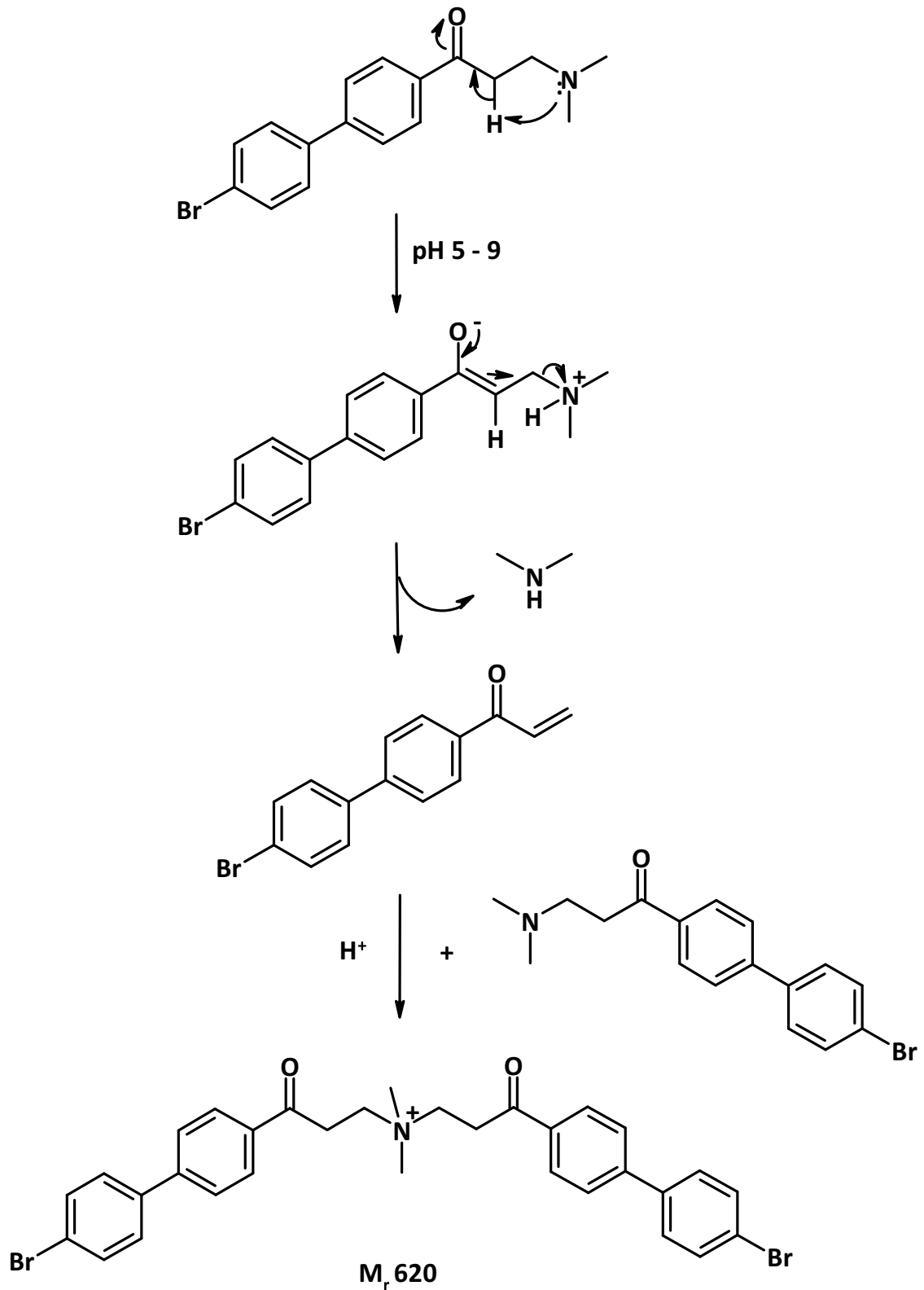


Abb. 4.7: Postulierter Mechanismus der Desaminierung von 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon und anschließende Michael-Addition der nukleophilen Mannichbase an das Zerfallsprodukt.

4.3.4 Isolierung des Zersetzungsproduktes mittels Chromatographie über Kieselgel

Um das Zersetzungsprodukt zu isolieren, wurde nach einer 24-stündigen Inkubation von BDAP in *Aqua bidest.* die Lösung im Vakuum eingeeengt, in Dichlormethan/Methanol (9:1) gelöst und über Kieselgel chromatographisch gereinigt. Die Fraktion des Zersetzungsproduktes wurde schonend getrocknet und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Das Spektrum im Bereich zwischen 8,5 ppm und 5,7 ppm ist in Abb. 4.8 dargestellt.

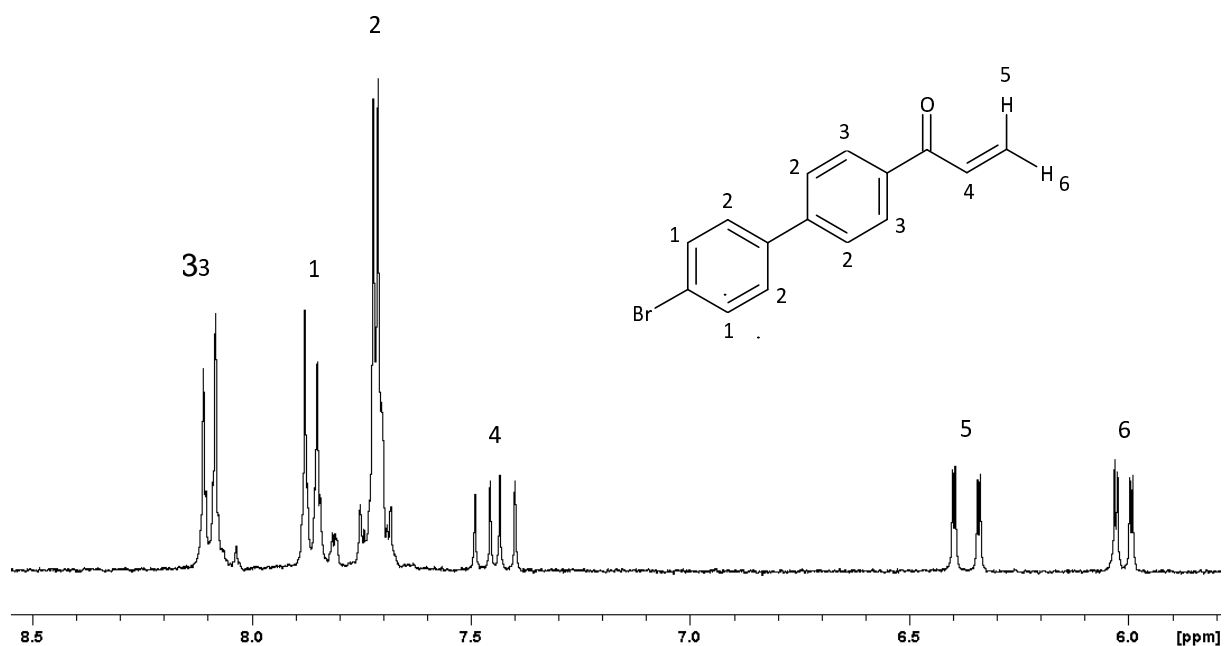


Abb. 4.8: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Zersetzungsproduktes (in DMSO-d_6 , 300 MHz).

Das unter 4.3.3 beschriebene Dimer konnte nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde das α,β -ungesättigte Keton detektiert (Abb. 4.8). Im Bereich zwischen 7,7 ppm und 8,1 ppm liegen die Signale der Aromaten. Charakteristisch für das α,β -ungesättigte Keton sind die Signale bei $\delta = 7,4$ ppm, 6,4 ppm und 6,0 ppm. Das Signal bei $\delta = 7,4$ ppm (1H, dd, $^3J = 10,5 \text{ Hz}_{\text{cis}}$, $^3J = 14,0 \text{ Hz}_{\text{trans}}$) entsteht durch den einzelnen Wasserstoff (H 4) neben der Carbonylfunktion. Dieser befindet sich in Nachbarschaft zu den Wasserstoffatomen H 5 und H 6, welche magnetisch nicht äquivalent sind. H 5 und H 6 wirken unabhängig auf H 4 ein, so dass das Duplett in ein weiteres Duplett gespalten wird. Da *trans*-Kopplungen größere Kopplungskonstanten besitzen als *cis*-Kopplungen, wird die 3J -Kopplung mit 14 Hz durch das *trans*-ständige

Wasserstoffatom hervorgerufen, während die 3J -Kopplung mit einer Kopplungskonstante von 10,5 Hz durch den *cis*-ständigen Wasserstoff bedingt wird.

Die Signale bei $\delta = 6,4$ ppm und $\delta = 6,0$ ppm können den Wasserstoffatome H 5 und H 6 zugeordnet werden. Beide Signale liegen als Duplett vom Duplett vor, da die Wasserstoffatome sowohl geminal als auch vicinal koppeln. Die räumliche Nähe des Wasserstoffatoms H 5 zur Carbonylfunktion sorgt für eine Tieffeld-Verschiebung, so dass diesem das Signal bei $\delta = 6,4$ ppm (1 H, dd, $^2J = 1,8$ Hz, $^3J = 17,0$ Hz) zuzuordnen ist. Die größere Kopplungskonstante für die 3J -Kopplung, verglichen mit dem Signal bei $\delta = 6$ ppm (1 H, dd, $^2J = 1,8$ Hz, $^3J = 10,5$ Hz), bestätigt diese *trans*-Stellung zum H 4.

Durch das ^1H -NMR-Spektrum ist das Auftreten des α,β -ungesättigten Ketons eindeutig bewiesen. Ungeklärt bleibt jedoch, warum das durch die Massenspektrometrie identifizierte Dimer nicht isoliert werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Dimer nur unter aciden Bedingungen bei Kontakt mit der Ameisensäure im Fließmittel entsteht. Dieses konnte präparativ jedoch nicht gezeigt werden. Eine zweite Möglichkeit ist, dass sich das Dimer bei der Chromatographie über Kieselgel zersetzt [Gul *et al.*, 2002]. Da sich die R_f -Werte des Zersetzungsflecks vor und nach der chromatographischen Reinigung jedoch nicht unterscheiden und der Fleck nicht schlierte, ist eine Zersetzung des Dimers unwahrscheinlich. Möglicherweise ist das Dimer ein reines Phänomen der Massenspektrometrie.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon (BDAP) wurde im Arbeitskreis als wirksamer NO-Synthase-Inhibitor entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit ist in Vorversuchen die mangelhafte Stabilität der Substanz aufgefallen. In weiterführenden Studien wurde beobachtet, dass die Verbindung im Sauren bis pH 4 stabil ist, während BDAP bei höheren pH-Werten einer sehr raschen Zersetzung unterliegt. Nur 50 % der Verbindung konnten nach neun-stündiger Inkubation bei

pH 7,4 noch detektiert werden, nach 24 Stunden waren nur noch 20 % der Ausgangskonzentration vorhanden. Die Verwendung der Massenspektrometrie zur Identifizierung des Zersetzungsproduktes gab Anhaltspunkte für eine Dimerisierung der Substanz unter Bildung einer quartären Ammoniumverbindung. Basierend auf diesen Ergebnissen wird angenommen, dass es sich bei der Zersetzung um eine Desaminierung von BDAP handelt. Die entstehende α,β -ungesättigte Carbonylverbindung ist ein guter Michael-Akzeptor, an den sich das unzersetzte BDAP addieren kann. Eine chromatographische Aufreinigung und anschließende Identifizierung mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigten den angenommenen Zersetzungsweg, indem das Zwischenprodukt, die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, eindeutig identifiziert werden konnte. Inwieweit darüber hinaus eine Dimerisierung im Fließmittel der HPLC unter aciden Bedingungen entsteht, die Bildung des Dimers ein reines Massenspektrometrie-Phänomen ist oder sich das Dimer auf der Chromatographie-Säule zersetzt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Bekannt ist jedoch, dass α,β -ungesättigte Ketone alkylierendes Potential besitzen und toxisch wirken, indem sie kovalent an biologisch wichtige Nukleophile binden [Gul *et al.*, 2002; Yarbrough und Schultz, 2007]. Inwieweit die NO-Synthase durch eine Addition des α,β -ungesättigten Ketons an Thiole des Enzyms inaktiviert oder die Hemmung des Enzyms nur durch BDAP bedingt wird, bleibt zu klären. Für einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung pathologisch erhöhter NO-Konzentrationen ist 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon jedoch durch diese Instabilität und der damit verbundenen Toxizität nicht geeignet.

5 Hemmung der NO-Synthase (NOS) durch 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB)

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, wurde im Arbeitskreis Clement die Mannichbase 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon (BDAP) als NO-Synthase-Hemmstoff entwickelt [Bluhm, 2004]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen belegen aber, dass BDAP chemisch instabil ist und basenkatalysiert nach Spaltung der Dimethylaminogruppe eine Doppelbindung in α -Stellung zur Carbonylfunktion ausbildet. Diese konjugierte Doppelbindung ist sehr reaktiv und addiert sich irreversibel an Nucleophile, so dass die Verbindung für eine pharmazeutische Anwendung nicht geeignet erscheint (vgl. Kap. 4) [Gul *et al.*, 2002; Yarbrough und Schultz, 2007]. Infolgedessen wurde auf 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB) übergegangen, das bereits durch Buß (2005) erfolgreich an der nNOS getestet wurde ($IC_{50} = 100 \mu\text{M}$) [Buß, 2005]. Die Struktur der Verbindung ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

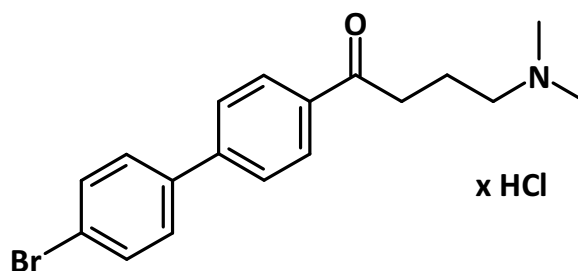


Abb. 5.1: Struktur von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB).

Die Seitenkette von BDAB ist im Vergleich zum BDAP um eine Methylen-Gruppe verlängert, so dass sich bei einer Desaminierung die Doppelbindung nicht in Konjugation zur Carbonylfunktion ausbilden kann. Durch diese Modifikation erhöht sich die Stabilität der Verbindung deutlich, so dass für BDAB in Stabilitätstests über 24 Stunden bei unterschiedlichen pH-Werten keine Zersetzungsreaktionen beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes erfolgte für BDAB über den Nitrit-Assay. Verbindungen, die in unserem Arbeitskreis über diesen Assay getestet wurden, ergaben im Vergleich zur Literatur höhere IC_{50} -Werte [Bluhm *et al.*, 2009]. Daher sollte die Hemmung über eine weitere Methode, dem Oxyhämoglobin-Assay, bestimmt werden, um die Vergleichbarkeit mit literaturbekannten Werten zu gewährleisten. Weiterhin sollte der Angriffsort der Verbindung und damit der Wirkmechanismus an der NOS untersucht werden.

Die NOS besteht, wie in Kapitel 1.2.1.1 beschrieben, aus einer Oxygenase und einer Reduktase-Domäne. Die Oxygenase-Domäne besitzt Bindungsstellen für Tetrahydrobiopterin sowie Häm und ist für die Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin verantwortlich. Die Reduktase-Domäne beinhaltet Bindungsstellen für reduziertes NADPH, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) und ist u.a. für die Elektronenbereitstellung während der Reaktion zuständig. Ein NOS-Inhibitor kann sowohl an der Oxygenase-Domäne als auch an der Reduktase-Domäne angreifen. Abbildung 5.2 skizziert mögliche Targets an der NO-Synthase und zeigt spektrophotometrische Methoden zur Untersuchung des jeweiligen Angriffsorts des Inhibitors auf.

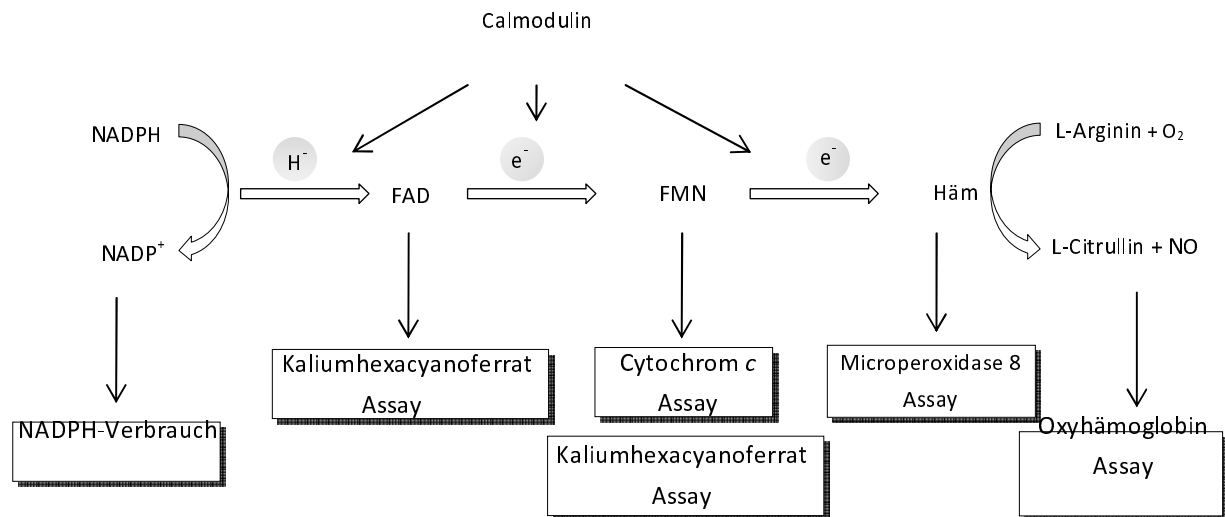


Abb. 5.2: Übersicht möglicher Zielstrukturen eines NO-Synthase-Inhibitors und spektrophotometrische Methoden zur Untersuchung des Angriffsortes (modifiziert nach Spratt *et al.*, 2007). FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; NADPH, Nikotinamidenindinukleotidphosphat.

Viele Inhibitoren wie z.B. die Arginin-Derivate greifen am katalytischen Zentrum, an der Oxygenase-Domäne an und verdrängen das natürliche Substrat L-Arginin [Babu und Griffith, 1998; Zhang *et al.*, 1997]. Weitere Hemmstoffe inhibieren Tetrahydrobiopterin, das u.a. für die Dimerisierung des Enzyms verantwortlich ist und auch eine Redoxfunktion bei der Umsetzung von L-Arginin spielen soll [Klatt *et al.*, 1993; Raman *et al.*, 1998]. Neben diesen Targets können Inhibitoren auch an der Reduktase-Domäne den Elektronenfluss zur Oxygenase-Domäne unterbinden und so die Aktivität des Enzyms negativ beeinflussen. An welcher Stelle BDAB ansetzt, sollte im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden. Die für die Untersuchung des Effektes von BDAB auf die NO-Synthase verwendeten Methoden werden im Folgenden kurz erklärt.

5.1.1 Oxyhämoglobin Assay

Der Oxyhämoglobin Assay wurde in Kapitel 3.3.1 ausführlich beschrieben.

5.1.2 Microperoxidase 8 Assay

Microperoxidase 8 (MP8) ist ein Häm-Oktapeptid und wird durch proteolytischen Abbau von Cytochrom *c* erhalten. Das Peptidfragment ist über zwei Cystein-Reste

mittels Thioether-Brücken an ein Häm *c* kovalent gebunden. Dieses kleine Molekül entspricht den minimalen Anforderungen eines „Häm-Modells“ [Lombardi *et al.*, 2001]. Als proximaler Ligand dient Histidin und obwohl die NOS Cystein als proximalen Liganden besitzt, wurde Microperoxidase 8 bereits für Affinitätsstudien an der NOS verwendet [Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001].

Die sechste Koordinationsstelle der Microperoxidase 8 ist frei, so dass sich hier Liganden anlagern können. Diese Bindung führt zu einer Änderung im sichtbaren Spektrum durch den Übergang des Häm-Eisens vom high-spin- in den low-spin-Zustand [Lombardi *et al.*, 2001].

Der Microperoxidase 8 Assay sollte zur Bestimmung der Affinität von BDAB zum Häm der NO-Synthase durchgeführt werden.

5.1.3 Cytochrom *c* Assay

Cytochrom *c* ist ein kleines Protein, das als prosthetische Gruppe ein Häm *c* besitzt. Dieses ist über zwei Thioether-Brücken an zwei Cystein-Reste im Protein gebunden. Das zentrale Eisen(III)-Ion (Fe^{3+}) ist oktaedrisch komplexiert über koordinative Bindungen zu den vier Stickstoff-Atomen (äquatorial) der Pyrrole im Porphyrin und axial zu zwei Stickstoff-Atomen zweier Histidin-Reste im Protein [Bertini *et al.*, 2006].

Cytochrom *c* dient als Elektronen-Akzeptor und kann durch das FMN der Reduktase-Domäne der NOS reduziert werden. Diese Reduktion kann spektralphotometrisch bei 550 nm beobachtet werden und dient der Überprüfung der Reduktase-Aktivität der NOS [Roman *et al.*, 2000].

Mittels des Cytochrom *c*-Assays sollte die Hemmung des Elektronentransfers an der FMN-Bindungsstelle der Reduktase-Domäne durch BDAB bestimmt werden.

5.1.4 Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS

Kaliumhexacyanoferrat(III) dient genauso wie Cytochrom *c* als Elektronen-Akzeptor und kann Elektronen von der Reduktase-Domäne der NOS empfangen. Dabei können diese Elektronen nicht nur vom FMN auf die Verbindung übertragen werden, sondern

auch vom FAD. Dieses unterscheidet Kaliumhexacyanoferrat vom Cytochrom *c*, das Elektronen nur vom FMN aufnimmt [Roman *et al.*, 2000; Vermilion und Coon, 1978]. Bei der Reaktion entsteht aus dem roten Kaliumhexacyanoferrat(III) das gelbe Kaliumhexacyanoferrat(II). Diese Reduktion kann spektrophotometrisch bei 420 nm verfolgt werden.

Auch der Kaliumhexacyanoferrat(III) Assay diene zur Bestimmung der Elektronentransfer-Hemmung durch BDAB. Allerdings wird durch diesen Assay neben dem Elektronentransfer durch FMN auch die Elektronen-Weiterleitung durch FAD mitbestimmt.

5.1.5 Verbrauch von NADPH

Wie bei Mayer *et al.* beschrieben, ist der NADPH-Verbrauch der konstitutiven NO-Synthasen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig [Mayer *et al.*, 1991]. Die Bindung eines Substrates hingegen ist keine Voraussetzung für den Elektronen-Transfer und damit einen Verbrauch von NADPH [Abu-Soud und Stuehr, 1993].

Ist die Bindung von Calmodulin z.B. durch einen Calmodulin-Inhibitor an die NO-Synthase beeinträchtigt, so führt dies zu einer Reduktion des NADPH-Verbrauchs. Auf diese Weise kann der Effekt eines Calmodulin-Hemmstoffs detektiert werden.

5.1.6 Calcineurin Assay

Um zu überprüfen, inwieweit BDAB weitere Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Enzyme hemmt, wurde der Calcineurin Assay nach Pallen und Wang mittels des Testkits der Firma Promega durchgeführt [Pallen und Wang, 1983]. Der Test beruht auf der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin. Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abb. 5.3 gezeigt.

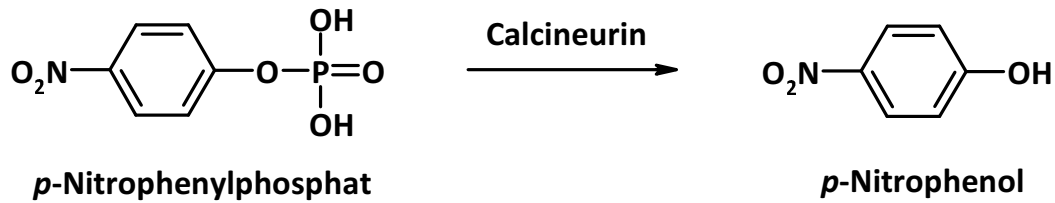


Abb. 5.3 Dephosphorylierung von *p*-Nitrophenylphosphat durch Calcineurin.

Calcineurin spaltet hydrolytisch die Phosphorsäureesterfunktion im *p*-Nitrophenylphosphat wobei *p*-Nitrophenol frei wird, welches bei 410 nm spektrophotometrisch vermessen werden kann. Da Calcineurin Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig ist, stimuliert die Zugabe von Calcium und Calmodulin die Phosphatase-Aktivität des Enzyms. Wird Calcium gegen Nickel ausgetauscht, so kann die Enzymaktivität weiter gesteigert werden [Pallen und Wang, 1984].

5.1.7 Calmodulin-Bindungsstudie mittels Dansyl-Calmodulin

Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Fluorophors Dansyl, sein Fluoreszenzmaximum und seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Solvathülle zu ändern [Johnson und Wittenauer, 1983]. Wird Dansylchlorid bei pH 9 selektiv an basische Aminosäuren, z.B. Lysin des Calmodulins gekoppelt, so kommt es bei Bindung von Calcium oder anderen Verbindungen zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt entsteht durch die Konformationsänderung des Calmodulins einhergehend mit der Änderung der Hydrophobie der Umgebung der Dansylgruppe und damit einer Änderung der Solvathülle des Fluorophors [Kincaid *et al.*, 1982]. Abbildung 5.4 stellt die Bindung zwischen Dansylchlorid und einem Lysin-Rest von Calmodulin dar.

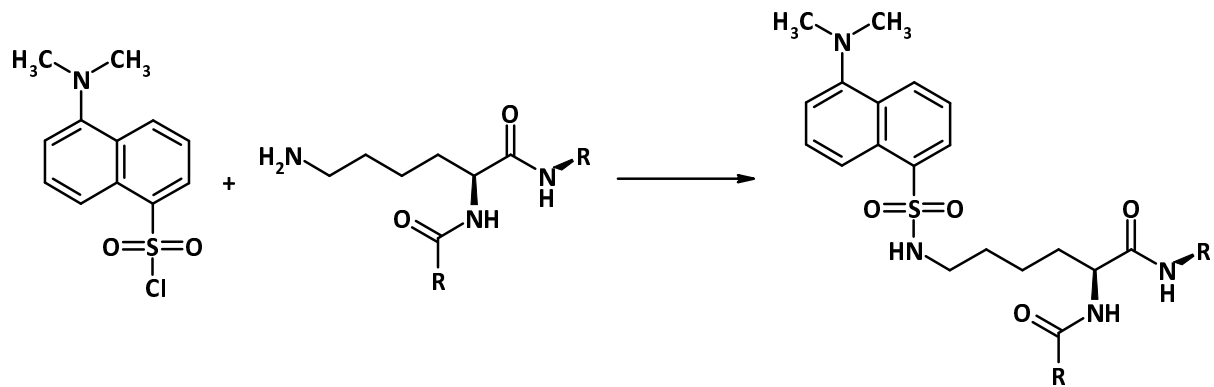


Abb 5.4: Bindung von Dansylchlorid an ein Lysin-Rest des Calmodulins. $R = \text{Protein}$.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Material

5.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen. Tetrahydrobiopterin (H_4B) und MAHMA-NONOat wurden von der Firma Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erworben. Die Herstellung der Oxyhämoglobin-Lösung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.1.1 beschrieben.

5.2.1.2 Geräte

Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Proben wurden in 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) mit Hilfe des Schüttelwasserbades GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Zur photometrischen Vermessung der Proben in UV-Einmalküvetten (Plastibrand, Brand, Wertheim) wurde ein Cary 50 UV-VIS-Spektralphotometer (Varian, Darmstadt) verwendet. Die fluorimetrischen Messungen wurden an einem Perkin Elmer LS 50 B Lumineszenz Spektrometer (Waltham, USA) durchgeführt.

5.2.1.3 Enzyme

Die rekombinanten Enzyme nNOS (murin), iNOS (murin) und eNOS (bovin), sowie das Calmodulin aus Rinderhirn wurden von der Firma Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erworben. Sowohl die nNOS (human) als auch die eNOS (human) wurden über Prof. Mayer (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich) bezogen. Die Bestimmung der Calcineurin-Aktivität wurde mit Hilfe eines Testkits der Firma Promega (Mannheim) durchgeführt.

5.2.2 Methoden

5.2.3 Synthese von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon

5.2.3.1 Zwischenprodukt (4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon)

4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon wurde in Anlehnung an Friedrich (2007) synthetisiert. Die Synthese folgt einer Vorschrift von Traxler *et al.* [Traxler *et al.*, 1995]. Hierfür werden 12,9 mmol 4-Brombiphenyl, 15,5 mmol Aluminiumchlorid und 12,9 mmol 4-Chlorbutyrylchlorid mit Dichlormethan überschichtet und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird auf Eis gegeben und etwas konzentrierte Salzsäure hinzugefügt. Nach Ausschütteln mit Dichlormethan wird die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Im Anschluss erfolgt eine Umkristallisation des Rückstandes aus Cyclohexan/Ethylacetat. Die Verbindung entspricht in allen spektroskopischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften den Literaturangaben [Friedrich, 2007].

5.2.3.2 Endprodukt (4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid)

1,5 mmol des sauberen 4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenons werden nach Friedrich (2007) mit einem Äquivalent Natriumiodid in 5 ml Ethylmethylketon bei 90 °C für eineinhalb Stunden gerührt. Die Lösung wird abrotiert und mit 6 mmol Dimethylamin sowie 30 ml Ethanol versetzt. Nach vierstündigem Rühren bei 90 °C

werden erneut 6 mmol Dimethylamin zugegeben und acht Stunden bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird mittels eines Rotationsverdampfers entfernt und der Rückstand aus Cyclohexan/Ethylacetat umkristallisiert. Die Verbindung entspricht in allen spektroskopischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften den Literaturangaben [Friedrich, 2007].

5.2.4 Durchführung des Oxyhämoglobin Assays

Für jedes Isoenzym wurden ein Blindwert ohne Enzym, ein Kontrollwert ohne Inhibitorzusatz und fünf verschiedene Konzentrationen in drei voneinander unabhängigen Ansätzen vermessen. Die Hemmung der nNOS und eNOS konnte in identischer Assay-Zusammensetzung bestimmt werden. Aufgrund der fehlenden Ca^{2+} /Calmodulin-Abhängigkeit wurde die Assay-Zusammensetzung für die Bestimmung der iNOS-Hemmung variiert.

Die NO-Bestimmung wurde in Anlehnung an Hevel und Marletta (1994) durchgeführt. Der Standard-Ansatz mit einem Volumen von 125 μl besaß folgende Zusammensetzung:

1 mM L-Arginin, 100 μM NADPH, 10 μM H_4B , 5 μM Oxyhämoglobin, 1 mM CaCl_2 (nNOS/eNOS), 10 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin (nNOS/eNOS), 1 mM MgCl_2 (iNOS), 100 mM HEPES (pH 7,5), NO-Synthase (nNOS: 0,32 U/125 μl ; iNOS: 1,47 U/125 μl ; eNOS: 0,25 U/125 μl).

L-Arginin, NADPH, H_4B , ggf. CaCl_2 und Calmodulin oder MgCl_2 in HEPES-Puffer wurden im Photometer auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurde Oxyhämoglobin zugegeben und ein Referenzspektrum aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen der NO-Synthase gestartet und die Absorptionsänderung bei 401 nm über 3 Minuten bei 37 °C gemessen. Als interner Standard wurde die Absorption am isosbestischen Punkt bei 411 nm bestimmt und von der Absorption bei 401 nm abgezogen.

5.2.5 Durchführung des Microperoxidase 8 Assays

Als Lösungsmittel für MP8 diene 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4, (75 %, v/v) mit Methanol (25 %, v/v). Durch den Lösungsmittelzusatz wird eine monomere Lösung erhalten, da MP8 dazu neigt in wässriger Lösung zu aggregieren [Lombardi *et al.*, 2001].

Die MP8-Gehaltsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Hierzu wurde MP8 in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit einem 25 %igen Methanol-Zusatz (v/v) gelöst und die Absorption bei 397 nm (Soret-Bande) ermittelt. Zur Berechnung des Gehaltes wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 157 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde gelegt [Aron *et al.*, 1986]. Diese Lösung wurde mit 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einem 25 %igen Methanol-Zusatz (v/v) auf einen MP8-Gehalt von 1 μM eingestellt.

Für die Spektren wurden 200 μl Microperoxidase 8-Lösung sowohl in die Proben- als auch die Referenzküvette vorgelegt und das erste Spektrum aufgenommen. BDAB wurde in DMSO gelöst und der MP8-Lösung in mehreren Schritten zugegeben. Die Wirkstoffkonzentration im Ansatz stieg dabei von 5 μM auf 1043 μM .

In die Referenzküvette wurde jeweils das gleiche Volumen an DMSO zugegeben. Nach jeder Zugabe in die Küvetten wurde ein Differenzspektrum gegen die Referenzküvette zwischen 300 nm und 500 nm aufgenommen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_s wird der Kehrwert der Absorptionsdifferenz zwischen Minimum und Maximum ($1/A(\lambda_{\text{max}} - \lambda_{\text{min}})$) gegen den Kehrwert der Konzentration des zugegebenen Liganden ($1/[\text{Ligand}]$) aufgetragen und aus den Diagrammen die spektrale Dissoziationskonstante K_s bestimmt [Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001].

Als Positivkontrolle wurde Imidazol vermessen.

5.2.6 Cytochrom c Assay

5.2.6.1 Durchführung des Cytochrom c Assays

Um den Einfluss von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB) auf die Reduktase-Aktivität der drei NOS-Isoenzyme zu überprüfen, wurden pro Isoenzym eine Kontrolle sowie Ansätze mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen in drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen vermessen.

Der Enzymassay setzte sich wie folgt zusammen:

1 mM CaCl₂, 10 μ g/ml Calmodulin (ggf.), 100 μ M NADPH, 40 μ M Cytochrom *c* in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5.

BDAB wurde in einem Methanol/HEPES-Gemisch (80 %/20 %, v/v) gelöst und mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 verdünnt. Der Hemmstoff wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Dabei lag die Endkonzentration an Methanol in den Küvetten unter 1 %. Zur Bestimmung der Reduktase-Aktivität wurden 6 Proben in drei unabhängigen Versuchen vermessen: eine Kontrolle, ein Ansatz mit 50 μ M Inhibitor und ein Ansatz mit 100 μ M Inhibitor, jeweils mit und ohne Calmodulin [Martasek *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 2000; Sheta *et al.*, 1994]. Der Assay wurde in einem Probenvolumen von 125 μ l durchgeführt.

Die durch die Reduktion von Cytochrom *c* hervorgerufene Absorptionzunahme wurde nach Starten der Reaktion durch Zugabe der NOS bei 550 nm über eine Messzeit von 60 Sekunden bei Raumtemperatur verfolgt [Roman *et al.*, 2000].

5.2.6.2 Untersuchung des Hemm-Mechanismus mit Hilfe des Cytochrom *c* Assays

Zur Aufklärung des Hemm-Mechanismus wurde die Messung wie in Kapitel 5.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde Calmodulin in der Stammlösung weggelassen und in unterschiedlichen Konzentrationen (0 μ g/ml – 150 μ g/ml) separat zugegeben. Das Probenvolumen betrug auch hier 125 μ l. Für die Hemmstudie wurden zwei Ansätze, einmal mit 50 μ M Inhibitor und einmal ohne Inhibitor, mit jeweils acht unterschiedlichen Calmodulin-Konzentrationen in drei voneinander unabhängigen

Versuchen vermessen. Die Enzymaktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten für Cytochrom *c* von $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet [Sheta *et al.*, 1994].

5.2.7 Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS

Die Bestimmung der Reduktase-Aktivität der NOS mittels Kaliumhexacyanoferrat(III) erfolgte spektrophotometrisch nach Roman *et al.* [Roman *et al.*, 2000]. Der Enzymassay setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

1 mM CaCl_2 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin (ggf.), 100 μM NADPH, 100 μM Kaliumhexacyanoferrat(III) in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5.

BDAB wurde in einem Methanol/HEPES-Gemisch (80 %/20 %) gelöst und mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 verdünnt. Der Hemmstoff wurde in einer Konzentration von 50 μM zugegeben. Dabei lag die Endkonzentration an Methanol in den Küvetten unter 1 %. Zur Bestimmung der Reduktase-Aktivität wurden vier Proben in drei unabhängigen Versuchen vermessen: eine Kontrolle, eine Negativkontrolle ohne Calmodulin, ein Ansatz mit 50 μM Inhibitor mit Calmodulin und ein Ansatz mit 50 μM Inhibitor ohne Calmodulin. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von NOS wurde die Absorptionzunahme bei 420 nm eine Minute bei Raumtemperatur gemessen. Die Enzymaktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten für Kaliumhexacyanoferrat(II) von $1,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet [Roman *et al.*, 2000].

5.2.8 Bestimmung der NADPH-Oxidations-Aktivität der nNOS

Für die Bestimmung der NADPH-Oxidations-Aktivität der nNOS wurden fünf verschiedene Proben in drei voneinander unabhängigen Versuchen vermessen: eine Kontrolle, drei Proben mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen und eine Probe ohne Calmodulin.

Der Enzymassay setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

1 mM CaCl_2 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin (ggf.), 100 μM NADPH in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5.

BDAB wurde in einem Methanol/HEPES-Gemisch (80 %/20 %, v/v) gelöst und mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 verdünnt. Der Hemmstoff wurde in einer Konzentration von 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M zugegeben. Dabei lag die Endkonzentration an Methanol in der Küvette unter 1 %. Das Probenvolumen betrug 125 μ l. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von NOS wurde die Absorptionsabnahme über eine Messzeit von einer Minute bei 340 nm und Raumtemperatur verfolgt. Die Enzymaktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten für NADPH von 6,3 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ berechnet [Klatt *et al.*, 1993].

5.2.9 Calcineurin Assay

Zur Durchführung des Tests wurden sieben Proben in voneinander unabhängigen Versuchen dreifach vermessen: eine Kontrolle, eine Kontrolle ohne Enzym, eine Negativkontrolle ohne Ni^{2+} /Calmodulin und vier Proben mit Inhibitor (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M).

BDAB wurde in Methanol gelöst und mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 verdünnt. Der Enzymassay setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

20 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM NiCl_2 (ggf.), 10 μ g/ml Calmodulin (ggf.).

Von dieser Lösung wurden 95 μ l (bei Ansätzen mit Inhibitor 94 μ l) in 96-well-plates vorgelegt, ggf. 1 μ l Inhibitor-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und 10 Minuten bei 30 °C im Photometer vorgewärmt. Calcineurin wurde mit einem Verdünnungspuffer aus 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin und 50 mM Tris-HCl pH 7,4 auf eine Konzentration von 0,045 U/ μ l verdünnt und 5 μ l hiervon in die vorgewärmten well-plates für die Messung mit Enzym gegeben (Endkonzentration pro Ansatz: 2,25 mU/ μ l). Anschließend wurde die Absorption bei 410 nm genau 15 Minuten bei 30 °C gemessen. Alle Ergebnisse wurden um die nicht-enzymatische Umsatzrate von *p*-Nitrophenylphosphat zu *p*-Nitrophenol (Vergleichsabsorption bei 410 nm) bereinigt. Die Enzymaktivität wurde über die nachfolgende Formel berechnet:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\text{Assayvolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times (\text{Probenabsorption} - \text{Vergleichsabsorption})}{\text{Enzymvolumen} \times \text{Reaktionszeit} \times \text{Extinktionskoeffizient} \times \text{Schichtdicke}}$$

Die Enzymaktivität wird in nmol Phosphat $\text{min}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$ angegeben. Das Gesamtvolumen des Assays entsprach 100 μl . Das Enzym wurde 1:1 verdünnt und in einem Enzymvolumen von 5 μl zum Ansatz gegeben. Die Reaktion wurde 15 Minuten lang bei 410 nm vermessen, der Extinktionskoeffizient für *p*-Nitrophenol bei pH 7,4 beträgt 17,5/cm [nmol/ μl] und die Weglänge des Lichtes 0,32 cm.

5.2.10 Calmodulin-Bindungsstudien mittels Dansyl-Calmodulin

5.2.10.1 Herstellung von Dansyl-Calmodulin

Dansyl-Calmodulin wurde nach Kincaid *et al.* hergestellt [Kincaid *et al.*, 1982]. Dazu wurden 0,5 mg Calmodulin in 10 mM NaHCO_3 -Lösung pH 10,0 mit 10 μl einer 6 mM Dansylchlorid-Lösung in Aceton bei 30 $^\circ\text{C}$ für 90 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurde gründlich gegen das 500fache Volumen des Standard-Fluoreszenzpuffers bestehend aus 25 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 100 μM EGTA in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 bei 4 $^\circ\text{C}$ dialysiert. Der Standard-Fluoreszenzpuffer wurde dabei dreimal gewechselt.

Um die Umsetzung zu Dansyl-Calmodulin zu überprüfen, wurde nach der Dialyse ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Nach erfolgreicher Dansylierung konnte ein Peak bei 340 nm gemessen werden [Leclerc *et al.*, 1999].

5.2.10.2 Fluorimetrische Detektion der Interaktion zwischen BDAB und Dansyl-Calmodulin

Zur Messung wurde Dansyl-Calmodulin in Standard-Fluoreszenzpuffer vorgelegt, CaCl_2 so zugegeben, dass die Konzentration im Ansatz 200 μM betrug und anschließend 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid, gelöst in Methanol, sukzessiv bis zu einer Endkonzentration von 244 μM hinzu gegeben.

Die Fluoreszenzmessung wurde bei Raumtemperatur in Standardfluoreszenzpuffer durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 340 nm und es wurde ein

Emissionsspektrum zwischen 450 nm und 600 nm aufgenommen. Die Spaltbreite wurde auf 6 nm eingestellt [Kincaid *et al.*, 1982].

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Oxyhämoglobin Assay

Die Oxyhämoglobin-Konzentration ließ sich durch Vermessen von fünf unterschiedlichen Verdünnungen (1:30, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100) über die in Kapitel 5.2.4.1 genannte Formel berechnen. Es wurde eine Konzentration von $216 \pm 16 \mu\text{M}$ bestimmt.

Die Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten für die Messwellenlänge 401 nm - 411 nm wurde wie in Kapitel 5.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde die Zunahme der Absorptionsdifferenz zwischen den beiden Wellenlängen pro Minute gegen die eingesetzte Oxyhämoglobin-Konzentration aufgetragen und der Absorptionskoeffizient über die Steigung der Geraden ermittelt (Abb. 5.5). Für die vermessene Oxyhämoglobin-Lösung wurde ein $\Delta\epsilon_{(401 \text{ nm} - 411 \text{ nm})}$ von $42,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.

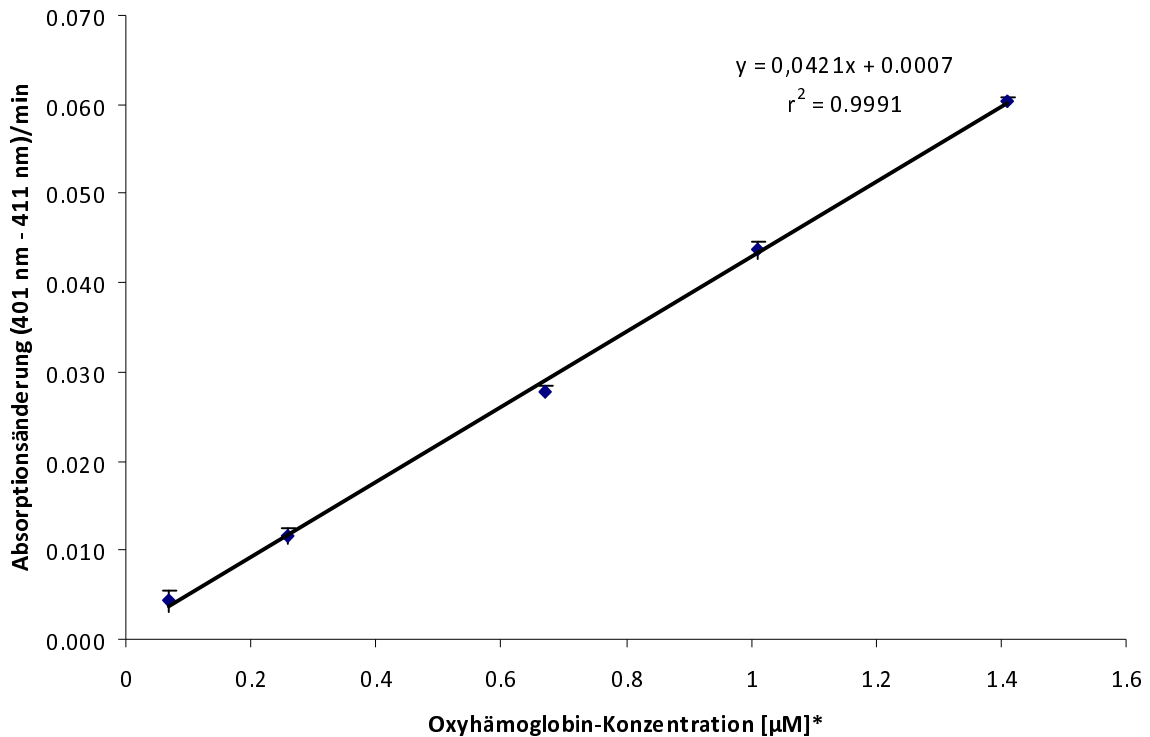


Abb. 5.5: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten durch Reaktion von Oxyhämoglobin mit MAHMA-NONOat zu Methämoglobin. Die Bestimmung wurde wie in Kapitel 5.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Die Entstehung von Methämoglobin wurde gemessen.

Die Studien zur Hemmung der NOS-Isoenzyme nNOS (human), nNOS (Ratte), eNOS (human) und iNOS (Maus) durch 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid wurden wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

Die Graphen und die IC_{50} -Werte wurden mit Hilfe des Programms Sigma Plot[®] über die folgende Funktion berechnet:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{n_H}}$$

min = minimaler Wert

max = maximaler Wert

EC_{50} = halbmaximaler Wert

n_H = Hill-Koeffizient

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.6 bis 5.9 dargestellt.

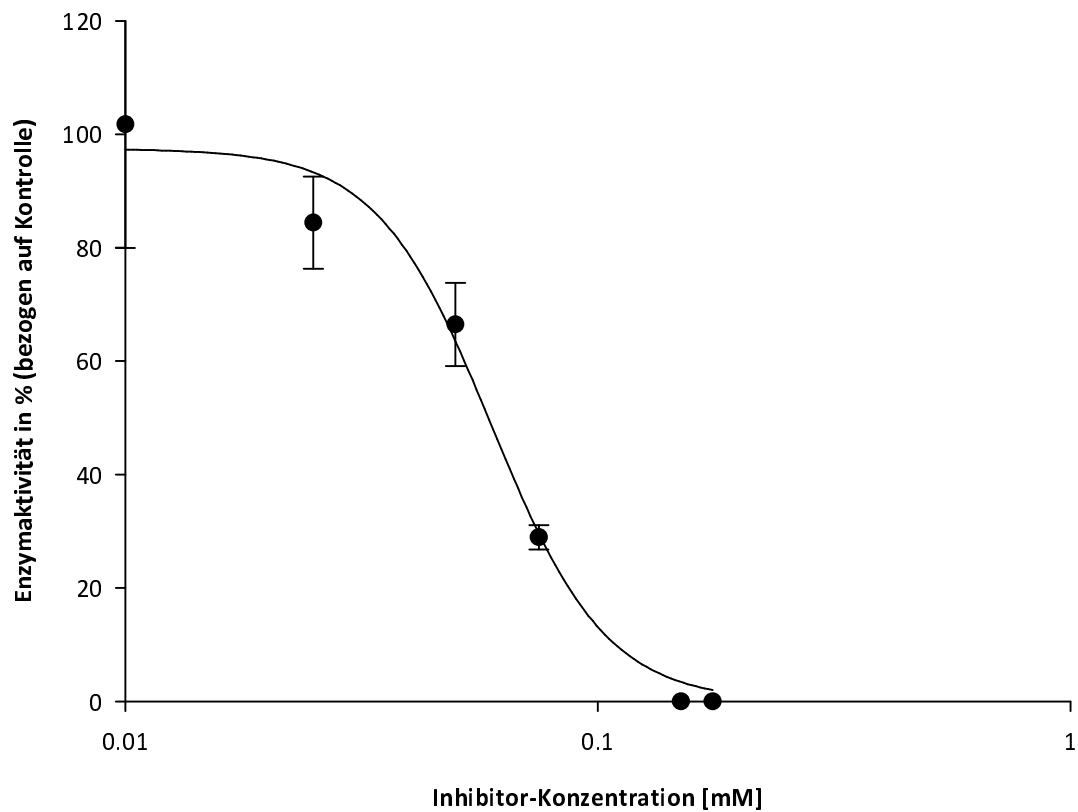


Abb. 5.6: Hemmung der Enzymaktivität der nNOS (human) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $75,1 \pm 3,3 \text{ nmol Methämoglobin mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Der IC_{50} -Wert wurde über die oben genannte Formel mittels Sigma Plot berechnet und lag bei $60 \pm 7 \text{ }\mu\text{M}$ ($r^2 = 0,989$).

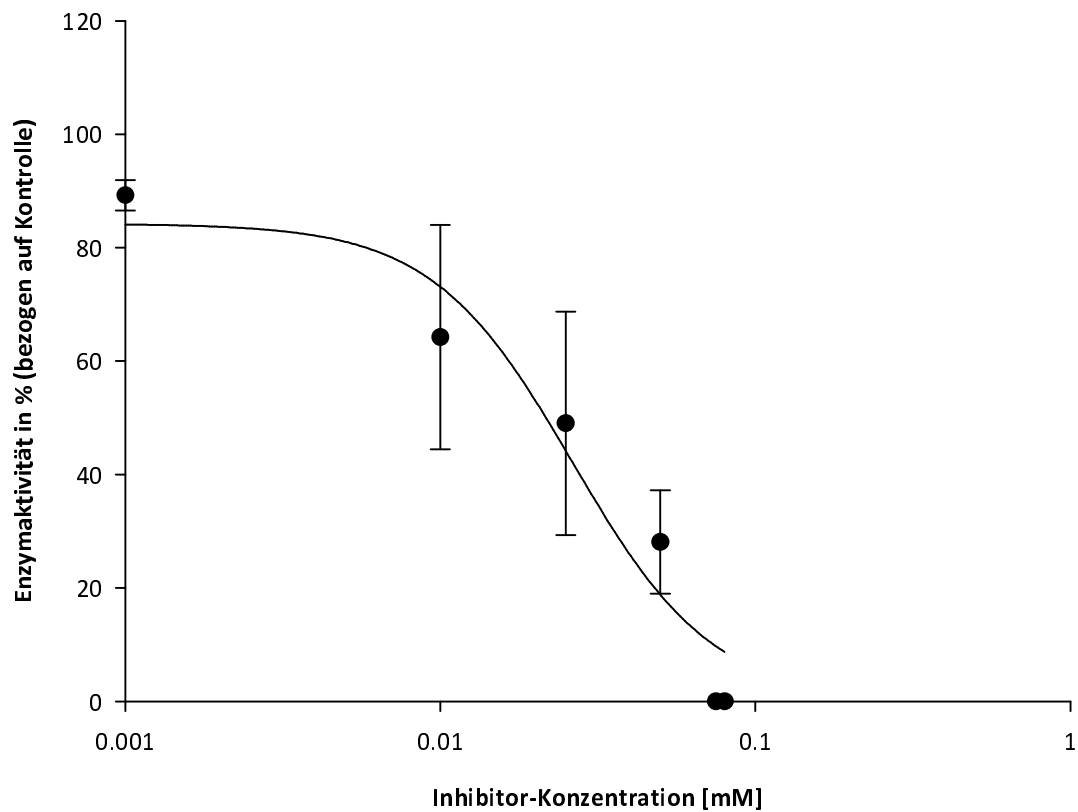


Abb. 5.7: Hemmung der Enzymaktivität der nNOS (murin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $62,7 \pm 8,6 \text{ nmol Methämoglobin mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Der IC_{50} -Wert, berechnet über die oben genannte Formel mittels Sigma Plot, lag bei $26 \pm 14 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0,940$).

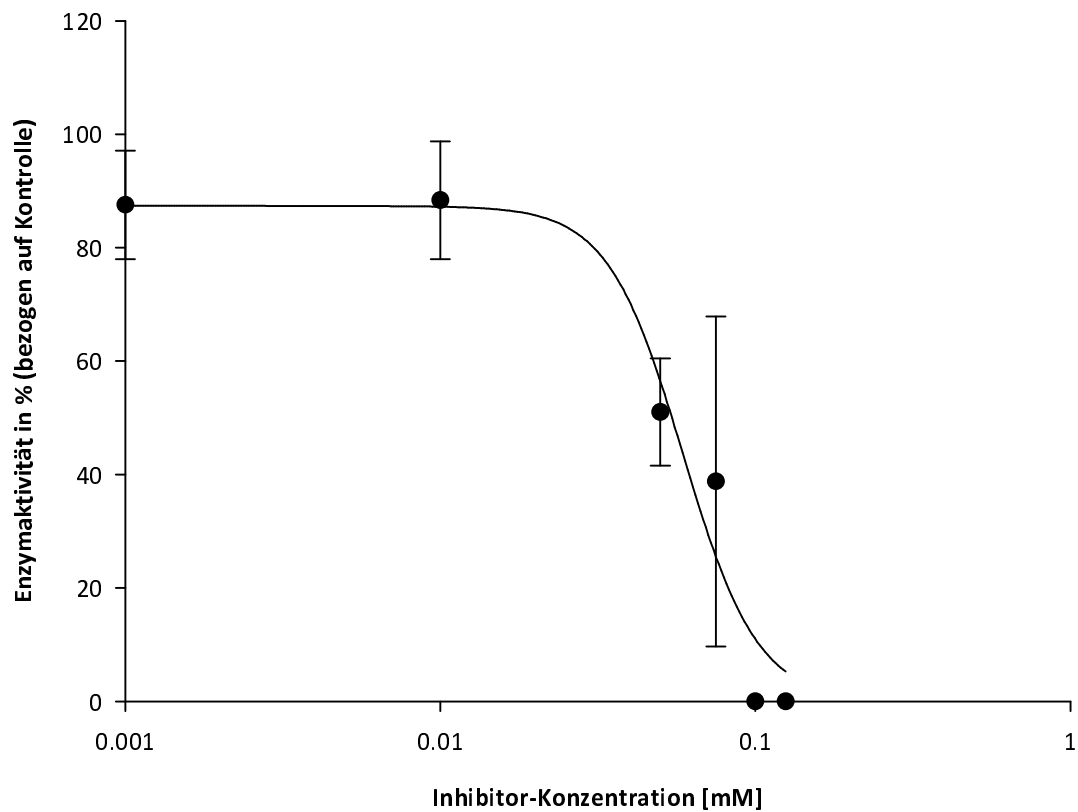


Abb. 5.8: Hemmung der Enzymaktivität der eNOS (human) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $46,3 \pm 4,9 \text{ nmol Methämoglobin mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Der IC_{50} -Wert wurde über die oben genannte Formel mittels Sigma Plot berechnet und lag bei $59 \pm 7 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0,955$).

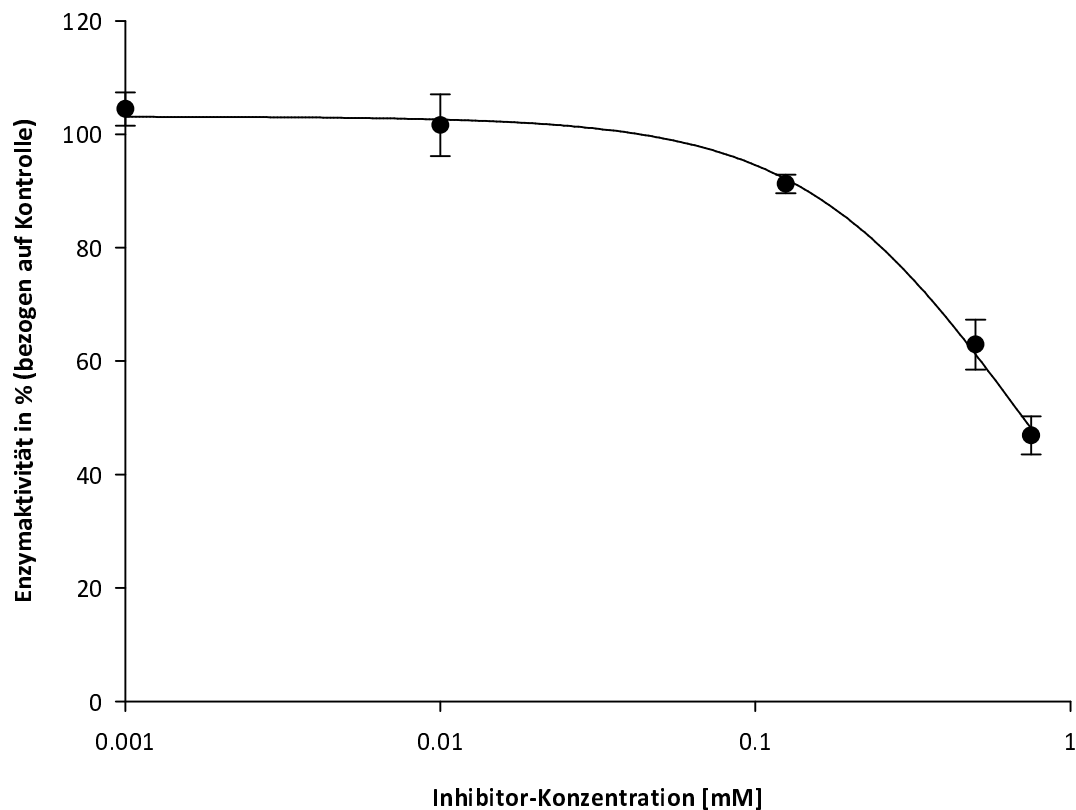


Abb. 5.9: Hemmung der Enzymaktivität der iNOS (murin), durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $7,9 \pm 0,2 \text{ nmol Methämoglobin mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Eine höhere Konzentration an BDAB konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht zur Hemmung der iNOS eingesetzt werden. Der IC_{50} -Wert wurde über die oben genannte Formel mittels Sigma Plot berechnet und lag bei $676 \pm 3 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0,997$).

Wie aus den IC_{50} -Werten der getesteten Isoenzyme ersichtlich ist, hemmt 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid selektiv die humane und murine nNOS sowie die humane eNOS mit IC_{50} -Werten von $60 \mu\text{M}$, $26 \mu\text{M}$ und $59 \mu\text{M}$. Vergleicht man diese Werte mit dem ermittelten IC_{50} -Wert der iNOS, Maus, von $675,5 \mu\text{M}$ so liegt dieser Wert um mehr als Faktor zehn über den anderen. Die iNOS wird folglich durch BDAB wesentlich schwächer gehemmt.

Bisher zeigte sich eine Entwicklung isoform-spezifischer NOS-Inhibitoren als schwierig, da alle drei Isoenzyme eine starke Konservierung ihrer aktiven Zentren

zeigen und eine hohe strukturelle Ähnlichkeit in direkter Nachbarschaft zur Substrat-Bindungsstelle besitzen [Salerno *et al.*, 2002]. Jedoch konnte in Kristallisations-Studien an der Oxygenase-Domäne durch Fedorov *et al.* (2003) gezeigt werden, dass das aktive Zentrum der murinen iNOS um 13 Å kleiner ist als das der nNOS (Ratte), bzw. 8.4 Å kleiner ist als das der bovinen eNOS. Der verringerte Platz im aktiven Zentrum der iNOS ist auf einen Asparagin-Rest (Asn-364) zurückzuführen, der mit einer Carbonyl-Funktion des Protein-Rückgrates interagiert. Die nNOS und eNOS besitzen an dieser Stelle einen Serin-Rest (Ser-585/356), der im Falle der eNOS eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Histidin-Rest (His-216) eingeht. Der Asparagin-Rest im katalytischen Zentrum der iNOS verhindert eine Bindung von Inhibitoren mit großen oder unflexiblen Gruppen an dieser Stelle, welche daher eher die nNOS und eNOS hemmen [Fedorov *et al.*, 2003]. Auch bei den humanen Isoformen finden sich diese Sequenz-Unterschiede, so dass auch hier eine ähnliche Selektivität von BDAB zu erwarten sein könnte.

Neben einer verringerten Affinität zum aktiven Zentrum der iNOS könnte eine Hemmung der Calmodulin-Bindung an die NO-Synthase der Grund für die Isoformspezifität sein, da die konstitutiven NO-Synthasen nNOS und eNOS im Gegensatz zur iNOS Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig sind. Ein Angriff am Calmodulin würde den Elektronentransfer zwischen der Reduktase- und Oxygenase-Domäne der nNOS und der eNOS verhindern und so die NO-Bildung stören [Venema *et al.*, 1996].

5.3.2 Microperoxidase 8 Assay

Um erste Anhaltspunkte für den Angriffsort von BDAB an der NOS zu erhalten, wurde mittels des Microperoxidase 8 Assays die Affinität der Verbindung zum Häm überprüft.

Wie das Differenzspektrum in Abbildung 5.10 zeigt, verschob sich das Absorptionsmaximum bei 397 nm unter Zugabe von Imidazol auf 410 nm. Es entstand ein Minimum bei 394 nm. Die Verschiebung des Absorptionsspektrums deutet auf eine Konversion des high-spin-Zustands zum low-spin-Zustand des Häm-Eisens hin.

Dieses begründet sich in der Anlagerung des Imidazols als sechsten Koordinationspartner an das Häm.

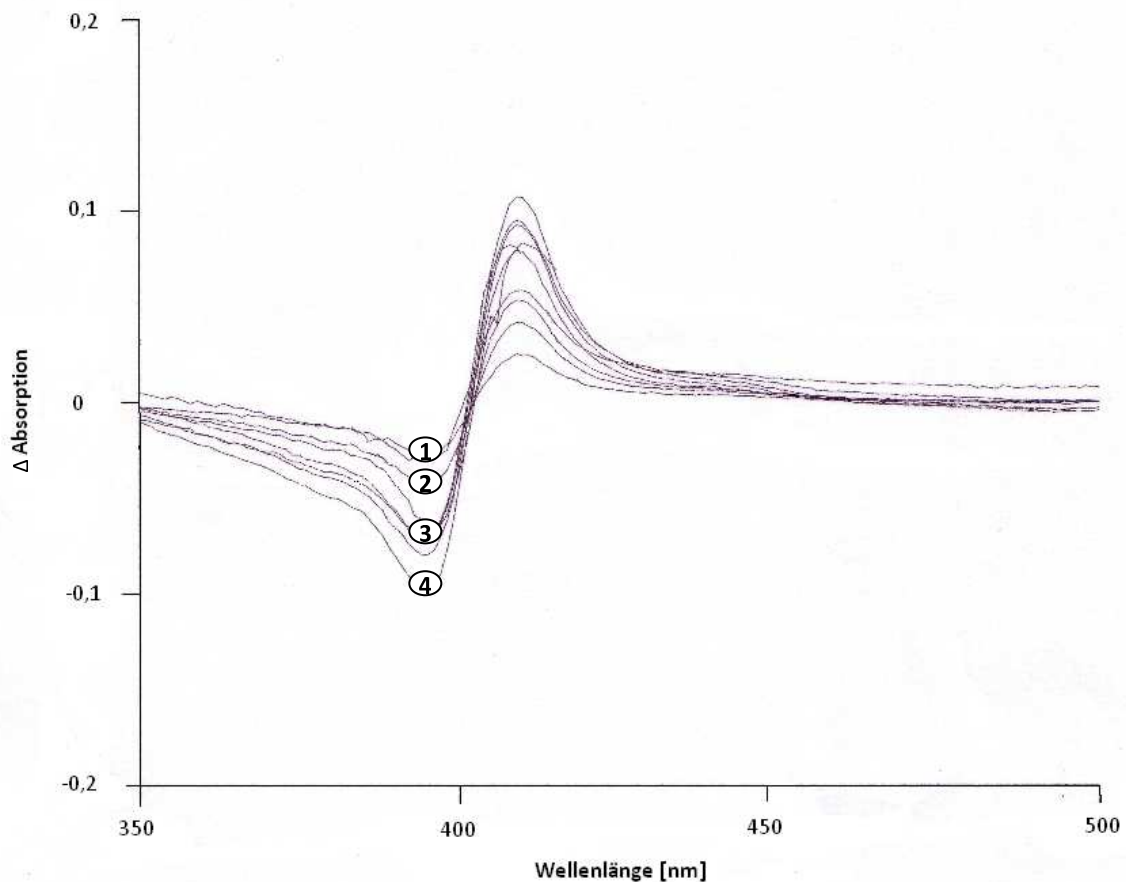


Abb. 5-10: Differenzspektrum nach sukzessiver Zugabe von Imidazol zu einer MP8-Lösung. Der Assay wurde wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben durchgeführt. ①= 5 μ M, ②= 24 μ M, ③= 91 μ M, ④= 1043 μ M Imidazol.

Bei der Affinitätsbestimmung von Imidazol zum Häm der Microperoxidase 8 wurde die Dissoziationskonstante K_s zu $17 \pm 2 \mu\text{M}$ bestimmt (Literatur: 26 μM [Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001]). Im Gegensatz dazu blieb das Absorptionsspektrum bei Zugabe von BDAB bis zu einer Konzentration von 1043 μM unverändert. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht eingesetzt werden.

Basierend auf dem unveränderten Spektrum bei Wirkstoff-Zugabe bis zu einer Konzentration von ca. 1 mM kann davon ausgegangen werden, dass BDAB keine oder nur eine sehr geringe Affinität zum Häm der NOS besitzt. Die Hemmung der

NO-Synthasen ist daher nicht über eine Anlagerung an das Häm und nachfolgender Verdrängung des Substrats zu erklären.

5.3.3 Cytochrom *c* Assay

5.3.3.1 Durchführung des Cytochrom *c* Assays

Einen weiteren möglichen Angriffspunkt von BDAB an der NOS stellt Calmodulin dar. Nur durch eine Anlagerung von Calmodulin an das Enzym ist ein Elektronentransfer innerhalb des Enzyms zum Häm möglich. Wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben ist der Cytochrom *c* Assay eine Möglichkeit zur Überprüfung der Reduktase-Aktivität. Für die Cytochrom *c*-Reduktion ist Calmodulin ein nichtessentieller Aktivator, da er für eine Aktivität zwar nicht benötigt wird, jedoch die Bildung von reduziertem Produkt vervielfacht [Roman *et al.*, 2000]. Die Ergebnisse des durchgeführten Assays an der nNOS sind in Abbildung 5.11 dargestellt.

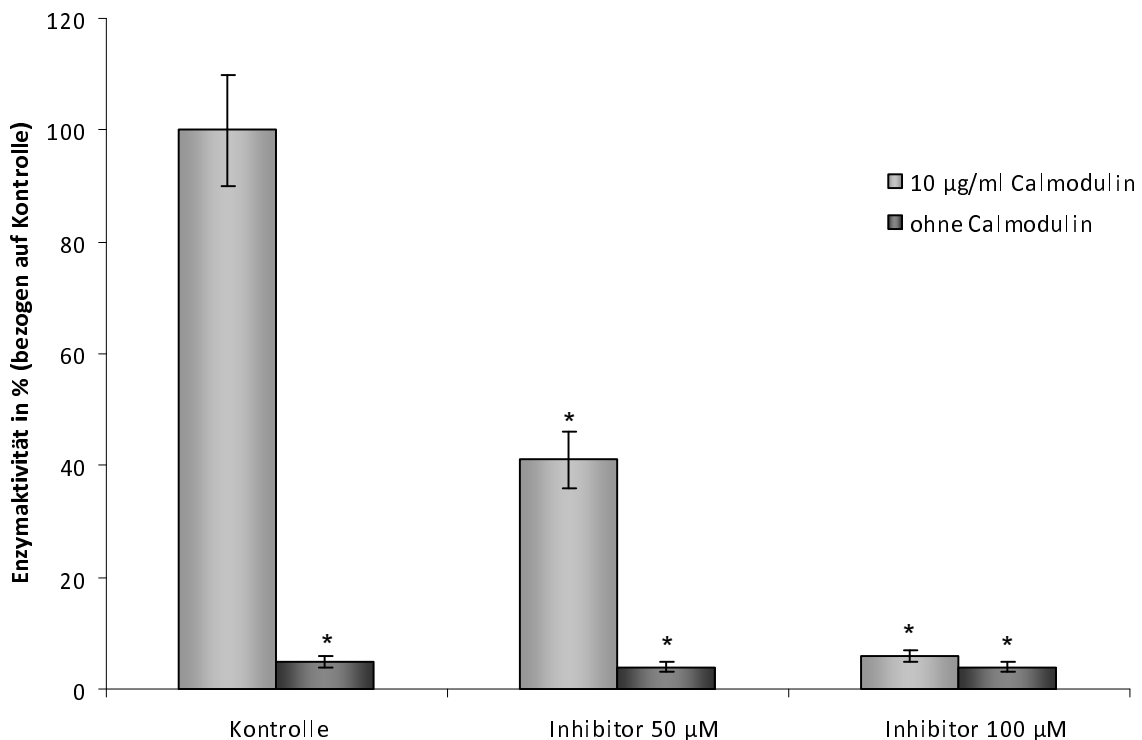


Abb. 5.11: Hemmung der Reduktion von Cytochrom *c* mittels nNOS (murin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $1394 \pm 140 \mu\text{mol Cytochrom } c \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle mit Calmodulin sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,005$, Student's *t*-Test).

Durch Hinzufügen von Calmodulin konnte bei der Kontrolle eine Zunahme der NOS-Reduktase-Aktivität um den Faktor 20 detektiert werden (Literatur: zehnfach [Roman und Masters, 2006], mehr als 20fach [Wolff *et al.*, 1993]). Der Zusatz von Inhibitor führte bei Anwesenheit von Calmodulin zu einer signifikanten Hemmung ($p < 0,005$) der Cytochrom *c*-Reduktion durch die murine nNOS. Bereits bei einer Inhibitor-Konzentration von 50 μM betrug die Reduktase-Aktivität 41 % der Ausgangsaktivität, bei Zugabe von 100 μM lag sie mit 6 % nur noch knapp über der Reduktase-Aktivität ohne Calmodulin. Wurde der Assay ohne Calmodulin durchgeführt, so konnte keine signifikante inhibitorische Wirksamkeit durch BDAB beobachtet werden. Ein Angriff von BDAB am Calmodulin liegt somit nahe.

Der Cytochrom *c* Assay wurde ebenfalls mit der eNOS und iNOS durchgeführt. Die Ergebnisse für die eNOS sind in Abbildung 5.12 gezeigt.

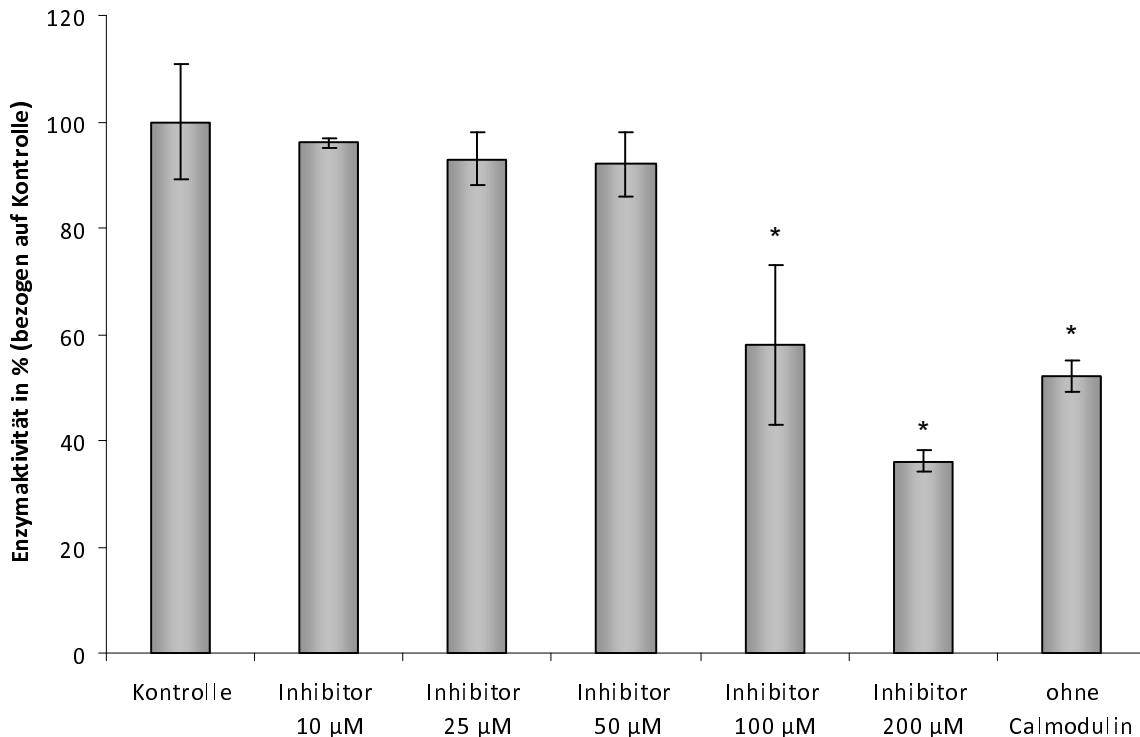


Abb. 5.12: Hemmung der Reduktion von Cytochrom c mittels eNOS (bovin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $703,3 \pm 74,8 \text{ nmol Cytochrom c mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle mit Calmodulin sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,04$, Student's t-Test).

Die Hemmung der Reduktase-Aktivität der bovinen eNOS durch 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid ist nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei der murinen nNOS. Erst bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM ist eine signifikante Hemmung ($p < 0,4$) auf 58 % der Ausgangs-Reduktase-Aktivität zu erkennen. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an das Enzym die Aktivität nur um den Faktor zwei (Literatur: Faktor drei [Roman *et al.*, 2000]) und damit nicht ganz so stark steigert wie bei der nNOS. Die Zugabe von Inhibitor in einer Konzentration von 100 μM führt zu einer reduzierten Reduktase-Aktivität, die nicht signifikant über der Aktivität ohne Calmodulin liegt. Die Zugabe von 200 μM BDAB führt zu einer weiteren Erniedrigung der Reduktase-Aktivität, die signifikant gegenüber der Aktivität ohne Calmodulin-Zusatz ist. Diese Hemmung lässt noch einen weiteren Angriffsort von BDAB an der eNOS vermuten.

Vergleicht man die Gesamtaktivität der nNOS und eNOS, ist eine geringere Reduktase-Aktivität für Cytochrom *c* der eNOS zu erkennen. Diese kann durch die unterschiedliche Kontrolle der Reduktase-Domänen durch Calmodulin erklärt werden. Cytochrom *c* akzeptiert Elektronen bevorzugt von vollständig reduziertem FMN (FMNH₂). In der eNOS werden Elektronen sehr schnell vom NADPH auf das FAD übertragen, so dass FADH₂ entsteht. Der Elektronentransfer auf das FMN findet im Vergleich zur nNOS jedoch langsamer statt. Die Bindung von Ca²⁺/Calmodulin an die eNOS führt zu einer schnelleren Reduktion von FAD und einem beschleunigten intramolekularen Elektronentransfer zwischen FAD und FMN, jedoch ist die Geschwindigkeit verglichen mit der nNOS langsamer [Roman *et al.*, 2000]. Durch diese langsamere Geschwindigkeit lässt sich die verminderte Reduktase-Aktivität für Cytochrom *c* der eNOS gegenüber der nNOS erklären. Da Calmodulin die Elektronentransfer-Geschwindigkeit innerhalb der eNOS nicht so stark erhöht wie bei der nNOS, wirkt sich die Beeinflussung von Calmodulin durch Hemmstoffe bei der eNOS nicht so stark aus.

Die Ergebnisse der Bestimmung der iNOS-Reduktase-Aktivität sind in Abbildung 5.13 gezeigt.

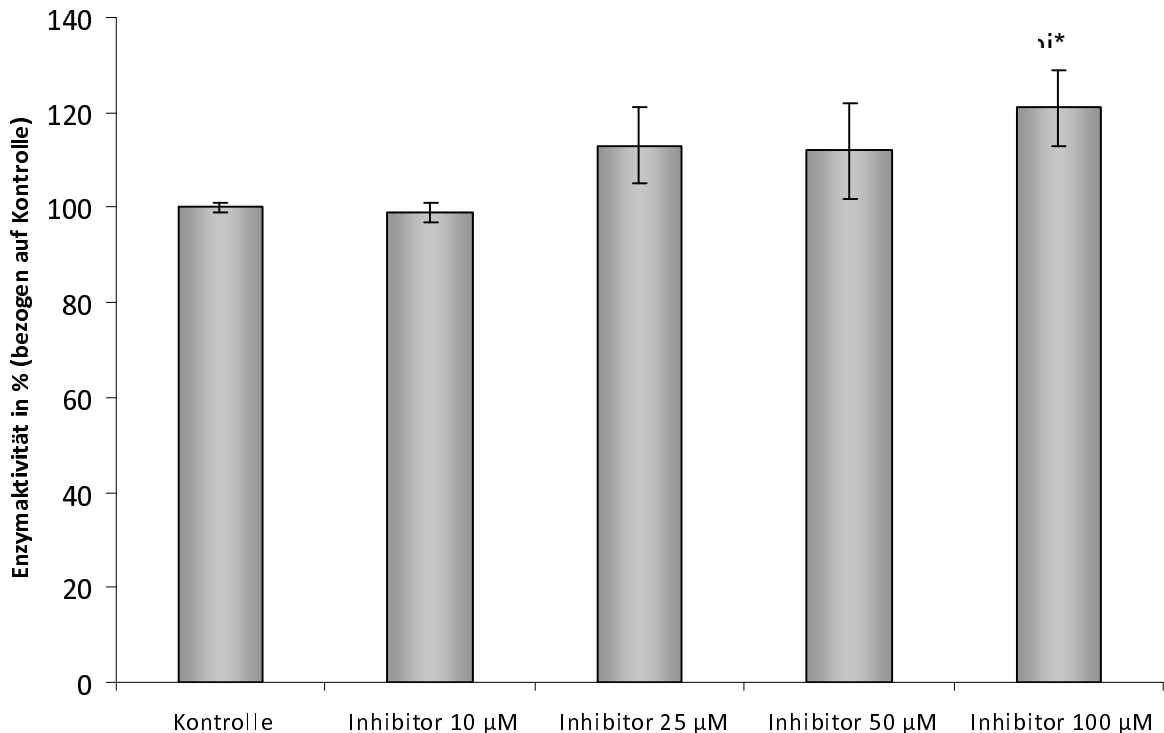


Abb. 5.13: Beeinflussung der Reduktion von Cytochrom *c* mittels iNOS (murin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $167,5 \pm 1,2 \text{ nmol Cytochrom } c \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,03$, Student's *t*-Test).

Die Reduktion von Cytochrom *c* durch die iNOS wird durch Zugabe von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid nicht gehemmt, stattdessen erkennt man bei Zugabe steigender Konzentrationen an Substanz eine Zunahme der Reduktase-Aktivität, die im Falle der höchsten Konzentration von 100 μ M signifikant ($p < 0,03$) gegenüber der Kontrolle ist.

Newton *et al.* entwickelten 1998 rekombinante nNOS und iNOS, mit und ohne Calmodulin-Bindungsstelle und bestimmten die Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen. Die Reduktase-Aktivität des Wildtyps der nNOS nahm bei Zugabe von EDTA/EGTA rapide ab, die nNOS ohne Calmodulin-Bindungsstelle besaß nur eine geringe Aktivität. Im Gegensatz dazu stellten sie fest, dass die Aktivität der iNOS leicht zunimmt, wenn kein Calmodulin an das Enzym

gebunden ist. Diese Aktivitätszunahme wird über inhibitorische sterische oder elektrostatische Effekte durch gebundenes Calmodulin an der iNOS erklärt [Newton *et al.*, 1998]. Auf Grundlage dieser Daten ist es möglich, dass durch BDAB Calmodulin schlechter an die NOS binden kann und dadurch dieser hemmende Effekt wegfällt.

Vergleicht man die Ergebnisse des Oxyhämoglobin Assays mit denen des Cytochrom *c* Assays, so erkennt man klare Parallelen. Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden in beiden Assays gehemmt. Die iNOS wird im Oxyhämoglobin Assay erst bei wesentlich höheren Konzentrationen inhibiert als die beiden konstitutiven Isoenzyme und im Cytochrom *c* Assay kommt es eher zu einer Erhöhung der Reduktase-Aktivität durch 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon HCl.

Dieses lässt die Reduktase-Domäne und genauer das Calmodulin als Angriffsort vermuten. Wie bereits in Kapitel 1.2.1.1 beschrieben sind die konstitutiven NOS-Isoenzyme Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig, d.h. sie benötigen für den Elektronentransfer vom FMN auf das Häm, bzw. auf Elektronenakzeptoren wie Cytochrom *c*, Calcium und Calmodulin [Abu-Soud und Stuehr, 1993]. Fehlen diese, so können Reduktionsäquivalente innerhalb der Reduktase-Domäne nur wesentlich langsamer übertragen werden. Der Elektronentransfer zum Häm findet ohne die Bindung von Calmodulin nicht mehr statt [Craig *et al.*, 2002]. Die iNOS ist dagegen Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängig, so dass ein Calmodulin-Antagonist keine Wirkung auf diese zeigt.

5.3.3.2 Untersuchung des Hemm-Mechanismus mit Hilfe des Cytochrom *c* Assays

Um zu bestimmen, inwieweit die Hemmung von der Calmodulin-Konzentration abhängig ist, wurde der Hemm-Mechanismus, wie in Kapitel 5.2.6.2 beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

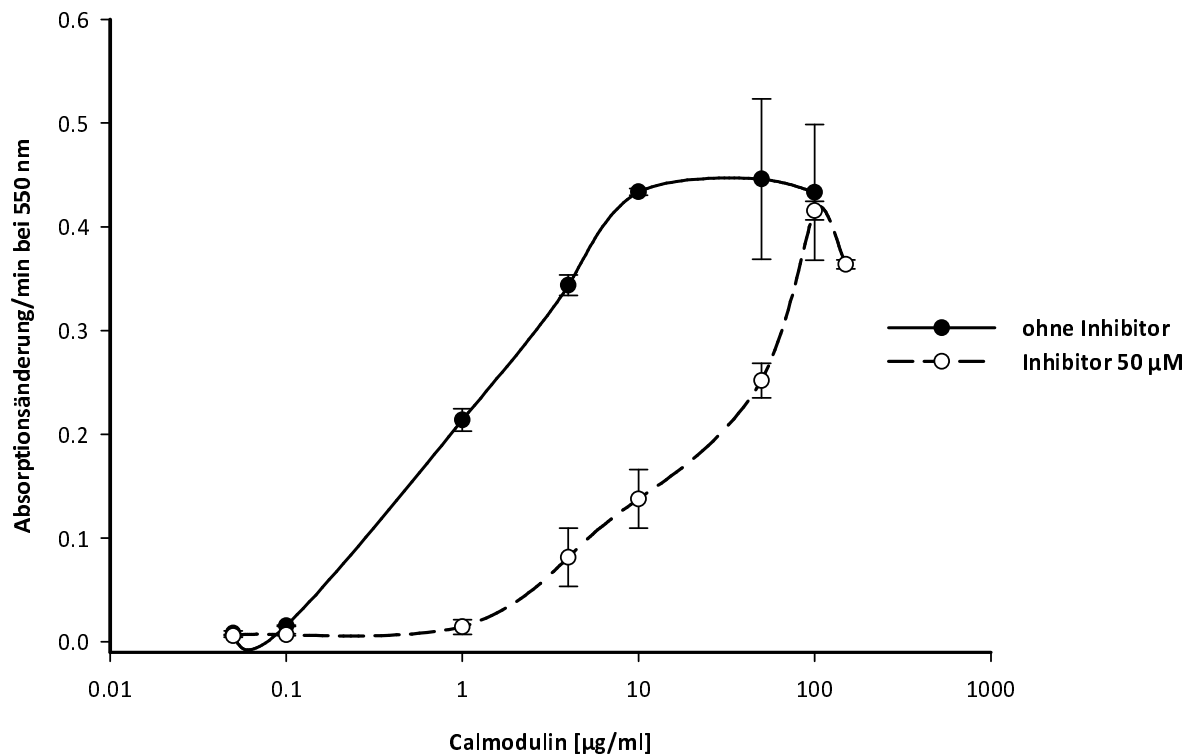


Abb. 5.14: Bestimmung des Hemm-Mechanismus von BDAB an der nNOS (murin). Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Absorptionsänderungen/min sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Durch Zugabe von höheren Konzentrationen an Calmodulin kann die Hemmwirkung von BDAB aufgehoben werden. Bei einer Calmodulin-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ wird die NOS durch 50 μM Inhibitor nicht mehr gehemmt. Es ist daher von einer kompetitiven Hemmung mit Angriff am Calmodulin auszugehen.

5.3.4 Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) durch NOS

Kaliumhexacyanoferrat(III) ist ein künstlicher Elektronenakzeptor, der Elektronen von der Reduktase-Domäne der NO-Synthase aufnimmt. Diese Reduktion kann spektrophotometrisch beobachtet werden. Im Unterschied zum Cytochrom c akzeptiert Kaliumhexacyanoferrat die Elektronen jedoch nicht nur vom FMN, sondern auch vom FAD [Roman *et al.*, 2000]. Die Resultate des Assays sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

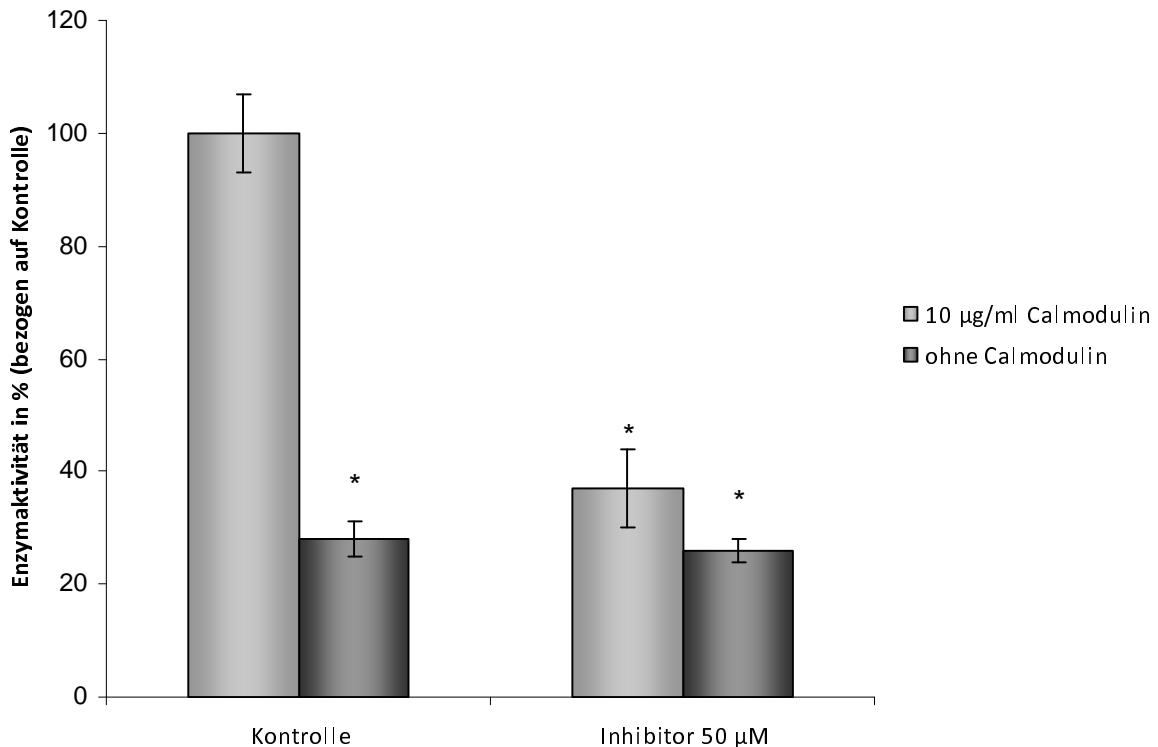


Abb. 5.15: Hemmung der Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat mittels nNOS (bovin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $2410 \pm 8 \text{ nmol Kaliumhexacyanoferrat mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. *Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,005$, Student's t-Test).

Die Reduktase-Aktivität der NOS gegenüber Kaliumhexacyanoferrat(III) ist fast doppelt so hoch wie für Cytochrom c. Durch Zugabe von Calmodulin ist die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat durch die nNOS um den Faktor 3,6 gesteigert (Literatur: Faktor drei [Roman *et al.*, 2000]). Sowohl die erhöhte Aktivität gegenüber der Cytochrom c-Reduktion als auch die geringere Steigerung der Reduktase-Aktivität durch Zugabe von Calmodulin lassen sich darüber erklären, dass das Molekül nicht nur vom FMN, sondern auch vom FAD Elektronen akzeptiert [Nishino *et al.*, 2007].

Wird 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid in einer Konzentration von 50 μM zugefügt, sinkt die Reduktase-Aktivität des Ansatzes mit Calmodulin signifikant ($p < 0,005$) auf 37 % der Ausgangsaktivität ab. Wurde der Assay ohne Calmodulin durchgeführt, so konnte keine signifikante inhibitorische Wirksamkeit durch BDAB beobachtet werden. Auch diese Ergebnisse belegen die

Beteiligung von Calmodulin am Hemm-Mechanismus und deuten auf eine Behinderung des intramolekularen Elektronentransfers hin.

5.3.5 Verbrauch von NADPH

Der Verbrauch von NADPH durch die NO-Synthase ist Calmodulin-abhängig, jedoch unabhängig von der Anwesenheit von L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin [Mayer *et al.*, 1991; Wolff *et al.*, 1993]. Daher ist die spektrophotometrische Messung des NADPH-Verbrauchs durch die NOS ein zusätzlicher Test auf einen gestörten Elektronenfluss durch die Reduktase-Domäne. Die Ergebnisse des Assays sind in Abbildung 5.16 gezeigt.

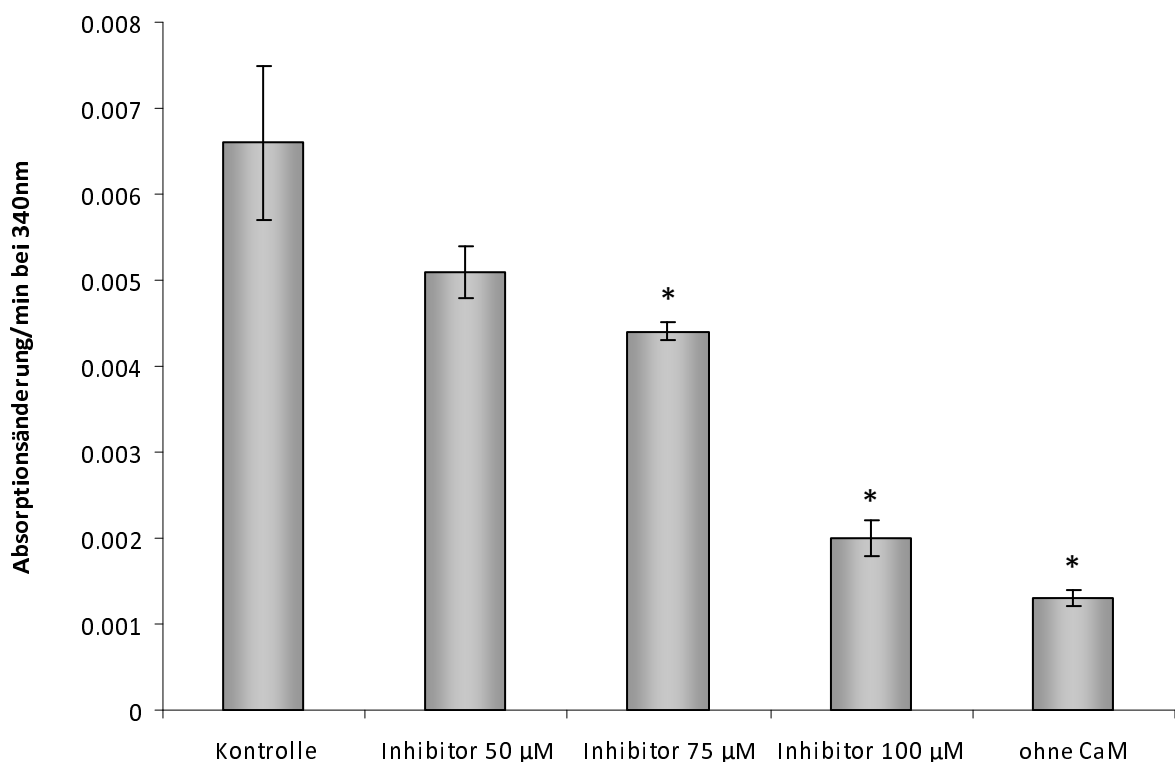


Abb. 5.16: Hemmung der Oxidation von NADPH mittels nNOS (bovin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.8 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $145,3 \pm 6,3 \text{ nmol NADP}^+ \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. CaM, Calmodulin; *statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,04$, Student's t-Test).

Ohne Calmodulin beträgt die Oxidationsrate von NADPH ca. 20 % des Kontrollwertes. Reduktionsäquivalente werden vom NADPH in wesentlich geringerem Ausmaß auf die nNOS übertragen. Damit kann die literaturbekannte Calmodulin-vermittelte, verstärkte NADPH-Oxidation und Übertragung von Elektronen auf die Reduktase-Domäne gezeigt werden [Klatt *et al.*, 1993]. Bei Zugabe von 100 μ M BDAB sinkt diese Oxidations-Aktivität der NOS signifikant ($p < 0,04$) auf noch ca. 30 % der Kontrolle ab und liegt nur noch knapp über der Oxidase-Aktivität der NOS ohne Calmodulin. Die Tatsache, dass die Calmodulin-vermittelte Verbesserung des Elektronentransportes durch Zugabe von 100 μ M BDAB nahezu aufgehoben werden kann, belegt, dass eine Hemmung der NOS-Aktivität über die Reduktase-Domäne erfolgen muss.

Alle drei Assays, die Cytochrom *c*-Reduktion, Kaliumhexacyanoferrat-Reduktion und NADPH-Oxidation, führen zu dem gleichen Ergebnis und belegen einen Angriff an der Reduktase-Domäne der NOS. Der intramolekulare Elektronentransfer wird durch Zugabe von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid gehemmt, sehr wahrscheinlich über einen Angriff am Calmodulin.

5.3.6 Calcineurin Assay

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung ob die NOS durch eine Interaktion von BDAB mit Calmodulin zustande kommt, ist die Untersuchung der inhibierenden Eigenschaften von BDAB gegenüber anderen Calmodulin-abhängigen Enzymen.

Neben der NO-Synthase gibt es eine Vielzahl an Calmodulin-abhängigen Enzymen, darunter die Proteinkinase II, Leichte Myosinkettenkinase und Calcineurin [Huang *et al.*, 1994]. Die erhaltenen Daten zur Hemmung von Calcineurin sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

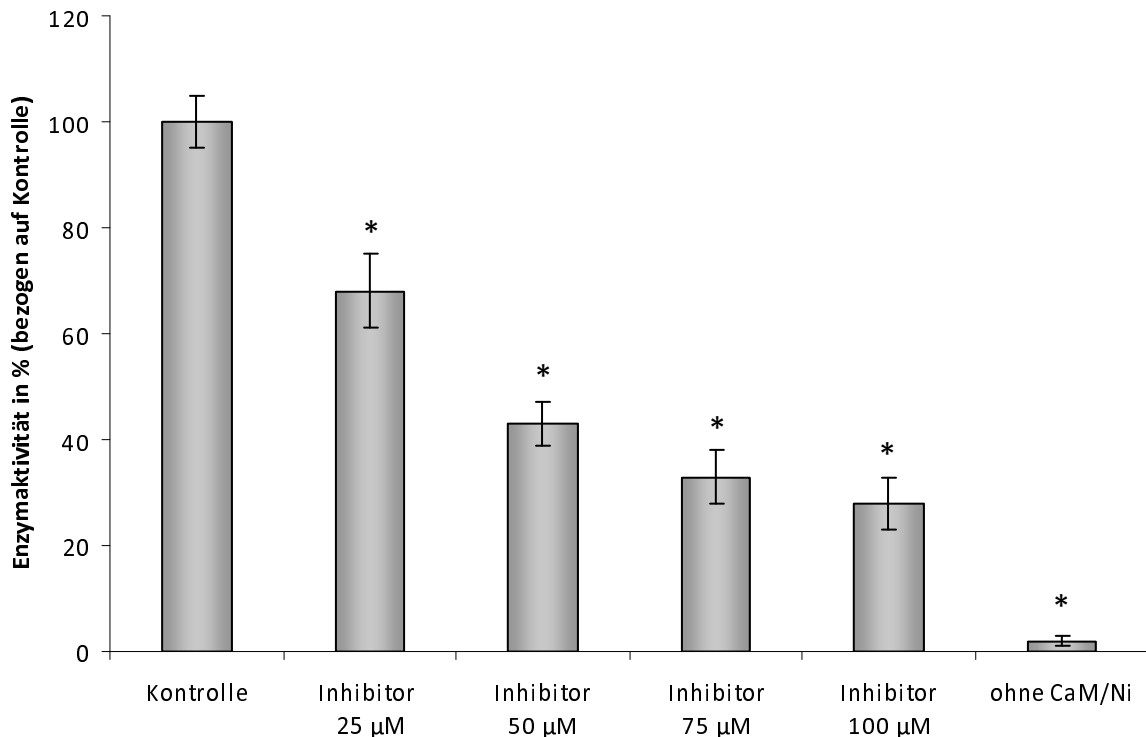


Abb. 5.17: Hemmung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin (bovin) durch BDAB. Der Enzymassay wurde wie in Kapitel 5.2.9 beschrieben durchgeführt. Die Gesamtaktivität betrug $73 \pm 4 \text{ pmol Phosphat min}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Kontrolle sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen. CaM, Calmodulin; Ni, Nickelchlorid; *statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Calmodulin-Zusatz ($p < 0,03$, Student's t-Test).

Calcineurin wird durch Zugabe von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid signifikant, konzentrationsabhängig gehemmt. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM besitzt Calcineurin nur noch eine Phosphatase-Aktivität von 28 % bezogen auf die Aktivität der Positivkontrolle. Die Interaktion von BDAB mit Calmodulin konnte damit indirekt gezeigt werden.

5.3.7 Bestimmung der Interaktion zwischen BDAB und Calmodulin mittels Dansyl-Calmodulin

Um die Bindung von BDAB an das Calmodulin direkt zu bestimmen, wurde Dansyl-Calmodulin hergestellt und die Fluoreszenz-Emissions-Spektren nach sukzessiver Zugabe des Inhibitors aufgenommen. Ein charakteristisches Spektrum ist in Abbildung 5.18 gezeigt.

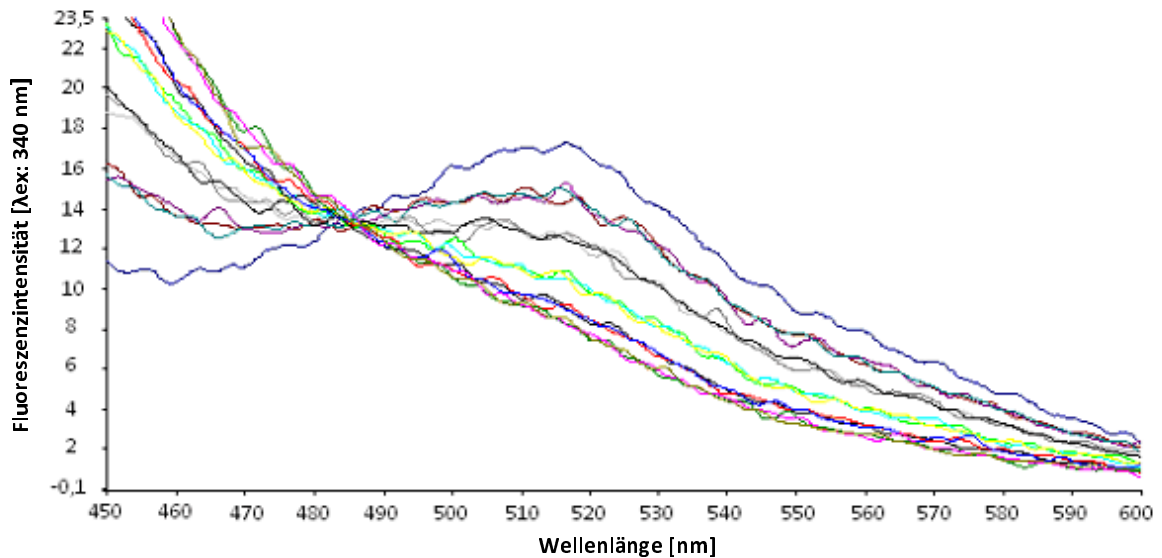


Abb. 5.18: Fluoreszenz-Spektrum von Dansyl-Calmodulin nach Zugabe ansteigender Konzentrationen an BDAB. Das Fluoreszenz-Spektrum wurde wie in Kapitel 5.2.10 beschrieben aufgenommen.

Die Zugabe des Inhibitors führte zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität des Dansyl-Calmodulins bei 515 nm. Es wird hierbei angenommen, dass BDAB an Dansyl-Calmodulin bindet und diese Bindung zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zu einer Modifikation der Solvathülle des Fluorophors führt. Diese Veränderung der Solvathülle führt zu einer verringerten Fluoreszenzintensität [Kincaid *et al.*, 1982]. Die erhaltenen Ergebnisse belegen die direkte Interaktion zwischen BDAB und Calmodulin.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen einen Angriff von BDAB an Calmodulin, einhergehend mit einer Beeinflussung des Elektronentransfers innerhalb des Enzyms.

Der strukturelle Vergleich mit bekannten Calmodulin-Antagonisten führte zu der Entwicklung typischer Strukturmerkmale [Klumpp und Schultz, 1985]. Danach besitzen Calmodulin-Antagonisten einen großen hydrophoben Bereich, bestehend aus zwei miteinander verbundenen aromatischen Ringen und einer Amin-Seitenkette, die vom Ringsystem durch mindestens drei Kohlenstoff-Atome getrennt ist. Substituenten an den Aromaten, die die Hydrophobizität erhöhen, führen zu einer

Wirkungssteigerung [Weiss *et al.*, 1982]. BDAB besitzt exakt diese Eigenschaften und gliedert sich so in die Reihe der bekannten Calmodulin-Antagonisten ein.

Eine pharmazeutische Nutzung dieses Effektes ist allerdings problematisch, da eine Vielzahl an Enzymen, wie z.B. die Adenylatcyclase oder die Phosphorylase-Kinase, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig sind [Onek und Smith, 1992]. Trotzdem sind bekannte Calmodulin-Antagonisten zugelassen, deren Wirksamkeit jedoch nicht direkt auf einen Angriff am Calmodulin zurückzuführen ist. Dazu zählen Neuroleptika, wie z.B. Chlorpromazin, das Lokalanästhetikum Tetracain oder das Antihypertonikum Propranolol [Volpi *et al.*, 1981]. Inwieweit die Calmodulin-hemmende Eigenschaft der Verbindungen an den Haupt- oder den Nebenwirkungen beteiligt ist, bleibt bisher ungeklärt.

Diskutiert wird jedoch eine positive Wirkung von Calmodulin-Inhibitoren gegen die *multi drug resistance* (MDR) von Tumorzellen gegenüber einer Anzahl an Chemotherapeutika [Zhu *et al.*, 2005]. Diese Resistenz wird auf eine Überexpression von P-Glycoproteinen zurückgeführt, die aktiv Arzneistoffe aus der Krebszelle ausschleusen. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Calmodulin-Inhibitoren, wie z.B. Phenothiazin oder Trifluoperazin, den P-Glycoprotein-vermittelten Efflux hemmen [Molnar *et al.*, 1997; Sehested *et al.*, 1989]. Zurzeit sind noch keine Calmodulin-Hemmstoffe aufgrund ihrer intrinsischen Toxizität *in vivo* gegen MDR zugelassen [Robert und Jarry, 2003]. Daher ist die Entwicklung von potenten und selektiven P-Glykoprotein-Inhibitoren eine Hauptaufgabe der Forschung in diesem Gebiet. Eine interessante Frage wäre in diesem Zusammenhang, ob BDAB P-Glykoprotein hemmt und Vorteile gegenüber den bekannten Verbindungen besitzt. Diese ist in weiteren Arbeiten zu klären.

Neben der potentiellen Wirkung gegen MDR, liegt auch eine Wirksamkeit von BDAB gegen Bakterien nahe, da Prokaryoten Calmodulin-ähnliche Proteine besitzen, die an zahlreichen Funktionen beteiligt sind. So hemmen Phenothiazin und Trifluoperazin die Sporenbildung von *Bacillus subtilis* [Onek und Smith, 1992]. Weiterhin verhindern Calmodulin-Antagonisten die Resistenz von *Staphylococcus aureus*, die durch ein

Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiges Efflux-System hervorgerufen wird [Mohtar *et al.*, 2009]. Auch die Virulenz des *Bacillus anthracis* kann möglicherweise gesenkt werden, da sich im Toxin des Bakteriums der Ödem-Faktor, eine Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase, befindet, die Ödeme hervorruft [Taha *et al.*, 2009].

Besonders interessant ist die Beobachtung von Gusarev *et al.*, dass gram-positive Bakterien einen NO-vermittelten zytoprotektiven Mechanismus besitzen, der eine wichtige Funktion in der Adaption von Pathogenen an oxidativen Stress, hervorgerufen durch das Immunsystem, einnimmt. So hemmt NO die Fenton-Reaktion, die auf der Interaktion von zellulärem freiem Eisen mit Wasserstoffperoxid beruht und zu einer Schädigung der bakteriellen DNA durch gebildete Hydroxyl-Radikale führt. Zusätzlich aktiviert NO die Katalase, die Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzt. Dadurch erhalten Bakterien genug Zeit für die *de novo*-Synthese von Proteinen, die für den Schutz als Antwort auf oxidativen Stress gebildet werden [Gusarov und Nudler, 2005; Shatalin *et al.*, 2008]. Durch eine Hemmung der bakteriellen NO-Synthese könnte dieser Schutzmechanismus aufgehoben werden und zu einer verminderten bakteriellen Resistenz gegenüber oxidativem Stress führen. Eine NOS-Inhibierung könnte weiterhin die NO-vermittelte Resistenz von Bakterien gegen ein breites Spektrum von Antibiotika reduzieren, da viele bakterizide Antibiotika, wie z.B. Lactame, Aminoglycoside und Quinolone, u.a. über eine Förderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wirken. Zusätzlich kann NO teilweise selbst mit Antibiotika reagieren und diese inaktivieren [Gusarov *et al.*, 2009]. Da *Staphylococcus aureus* eine NO-Synthase exprimiert, die Calmodulin als Kofaktor benötigt, ist die Bestimmung der antibiotischen Eigenschaften von BDAB eine äußerst interessante Option, diese Substanz weiter zu verfolgen [Hong *et al.*, 2003].

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid wurde im Arbeitskreis zur Hemmung der NO-Synthase entwickelt und zeigte im Nitrit-Assay

eine gute Hemmpotenz mit einem IC_{50} -Wert von 100 μ M [Bluhm, 2004]. Da der verwendete Assay im Vergleich zur Literatur höhere IC_{50} -Werte lieferte, wurde ein neues Testsystem, der Oxyhämoglobin Assay, für die Untersuchung aller NOS-Isoenzyme eingeführt. Mit Hilfe dieses Assays wurden die IC_{50} -Werte zu 60 μ M (nNOS, human), 26 μ M (nNOS, Ratte), 46 μ M (eNOS, human) und 676 μ M (iNOS, Maus) bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen damit eine selektive Hemmung der konstitutiven NO-Synthasen, nNOS und eNOS, gegenüber der iNOS um den Faktor zehn.

Das aktive Zentrum der NO-Synthase ist stark konserviert, so dass eine Entwicklung Isoform-spezifischer Inhibitoren eine Herausforderung darstellt [Fischmann *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999]. Eine Selektivität gegenüber der iNOS kann trotzdem erzielt werden, da das katalytische Zentrum der murinen iNOS 13 Å kleiner ist als das der nNOS (Ratte), bzw. 8.4 Å kleiner ist als das der bovinen eNOS [Fedorov *et al.*, 2003]. Daher besteht die Möglichkeit, dass Verbindungen mit großen, rigiden Gruppen nicht an die iNOS binden. Weiterhin unterscheiden sich die konstitutiven NO-Synthasen von der iNOS dadurch, dass sie Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig sind. nNOS und eNOS können nur durch die Bindung eines Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes Elektronen von der Reduktase-Domäne auf die Oxygenase-Domäne übertragen und somit die nötigen Reduktionsäquivalente für die NO-Bildung liefern. Die iNOS bindet Calmodulin schon bei sehr niedrigen Konzentrationen und wird als Calmodulin-unabhängig angesehen. Ein Angriff am Calmodulin hemmt somit nur die eNOS und nNOS.

Um den Hemm-Mechanismus aufzuklären wurde die Beeinflussung potentieller Angriffsorte von BDAB an der NOS untersucht. Hierzu wurde zum einen die Affinität der Verbindung zum Häm mit Hilfe des Microperoxidase 8-Assays getestet. Bis zu einer Konzentration von 1 mM beeinflusste die Zugabe von BDAB das aufgenommene Absorptionsspektrum nicht, so dass eine Bindung an das Häm bis zu dieser Konzentration ausgeschlossen werden kann. Da aufgrund dieses Ergebnisses ein Angriff am aktiven Zentrum des Enzyms unwahrscheinlich erscheint, wurde ein Angriff des Inhibitors am Calmodulin überprüft. Dazu wurden die künstlichen

Elektronenakzeptoren Cytochrom *c* und Kaliumhexacyanoferrat(III) verwendet, die über FMN (Cytochrom *c*) bzw. FMN und FAD (Kaliumhexacyanoferrat(III)) Reduktionsäquivalente aufnehmen. Weiterhin wurde der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige NADPH-Verbrauch der NO-Synthase getestet.

Bei der Reduktion von Cytochrom *c* zeigte sich, dass die nNOS und eNOS durch BDAB in ihrer Reduktions-Aktivität inhibiert, die iNOS jedoch nicht negativ beeinflusst wurde. Ihre Aktivität wurde sogar signifikant gesteigert, möglicherweise durch Aufhebung eines hemmenden sterischen Effektes durch gebundenes Calmodulin. Zur Untersuchung des Hemm-Mechanismus wurde bei einer konstanten Konzentration an Inhibitor die Calmodulin-Konzentration variiert und die Reduktion von Cytochrom *c* beobachtet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass BDAB ein zu Calmodulin kompetitiver Hemmstoff an der nNOS darstellt, da die Hemmwirkung durch Erhöhung der Calmodulin-Konzentration im Assay aufgehoben werden konnte. Auch im Kaliumhexacyanoferrat-Assay wurde die Reduktions-Aktivität der nNOS gehemmt. Die anschließend durchgeführte Bestimmung des NADPH-Verbrauchs der NOS bei Zugabe von BDAB zeigte ebenfalls einen konzentrationsabhängig verminderten Verbrauch bei Zugabe von BDAB. Die Resultate aller durchgeführten Assays deuten auf eine Beeinflussung des Elektronentransfers innerhalb der NO-Synthase hin. Ein Angriff am Calmodulin ist wahrscheinlich.

Zur Überprüfung dieser These wurde die Hemmung von BDAB auf die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins, einem weiteren Calmodulin-abhängigen Enzym, überprüft. Auch hier konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung des Enzyms beobachtet werden. Um den direkten Effekt des Hemmstoffes auf Calmodulin detektieren zu können, wurde weiterhin Dansyl-Calmodulin hergestellt und Fluoreszenz-Emissionsspektren nach Zugabe von BDAB aufgenommen. Die konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 515 nm belegte direkt eine Interaktion des Inhibitors mit Dansyl-Calmodulin. Die Bindung von BDAB an das Dansyl-Calmodulin führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zu einer Modifikation

der Umgebung des Fluorophors. Da die Fluoreszenzintensität des Fluorophors von der Solvathülle abhängig ist, führt die Bindung von BDAB zu einer Herabsetzung der Fluoreszenzintensität.

Anhand der erhaltenen Resultate konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Hemmung der NO-Synthase über einen Angriff von BDAB am Calmodulin hervorgerufen wird. Ob diese Wirksamkeit pharmazeutisch genutzt werden kann ist unklar, da viele humane Enzyme Calmodulin-abhängig sind. Einige bekannte Calmodulin-Inhibitoren zeigen eine Wirksamkeit gegen Multi Drug Resistance von Krebszellen, da sie P-Glycoprotein und damit den aktiven Transport von Chemotherapeutika aus der Zelle hemmen. Bisher wurde für diese Indikation noch kein Arzneistoff zugelassen, da die bekannten Verbindungen eine hohe Toxizität aufweisen. Inwieweit BDAB das P-Glycoprotein hemmt ist eine interessante Frage und könnte Bestandteil weiterer Arbeiten werden. Weiterhin wird eine Wirksamkeit Calmodulin-inhibierender Substanzen gegen Sporenbildung, Resistenz und Virulenz von Bakterien diskutiert. Auch hier bleibt zu klären, inwieweit BDAB diese Eigenschaften besitzt.

6 Neue Butyrophenone mit potentieller neuroleptischer Wirksamkeit

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hemmwirkung von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB) auf die drei Isoenzyme der NO-Synthase (NOS), nNOS, iNOS und eNOS, bestimmt und eine selektive Hemmung von nNOS und eNOS gegenüber der iNOS festgestellt (vgl. Kapitel 5). Diese Selektivität konnte eindeutig auf einen inhibitorischen Effekt der Verbindung gegenüber Calmodulin zurückgeführt werden, welches die Aktivität der nNOS und eNOS, jedoch nicht der iNOS, reguliert.

Eine Vielzahl an zugelassenen Medikamenten sind bekannte Calmodulin-Antagonisten, darunter das Butyrophenon Haloperidol, ein Neuroleptikum [Roufogalis *et al.*, 1983]. Die Strukturen von BDAB und Haloperidol sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

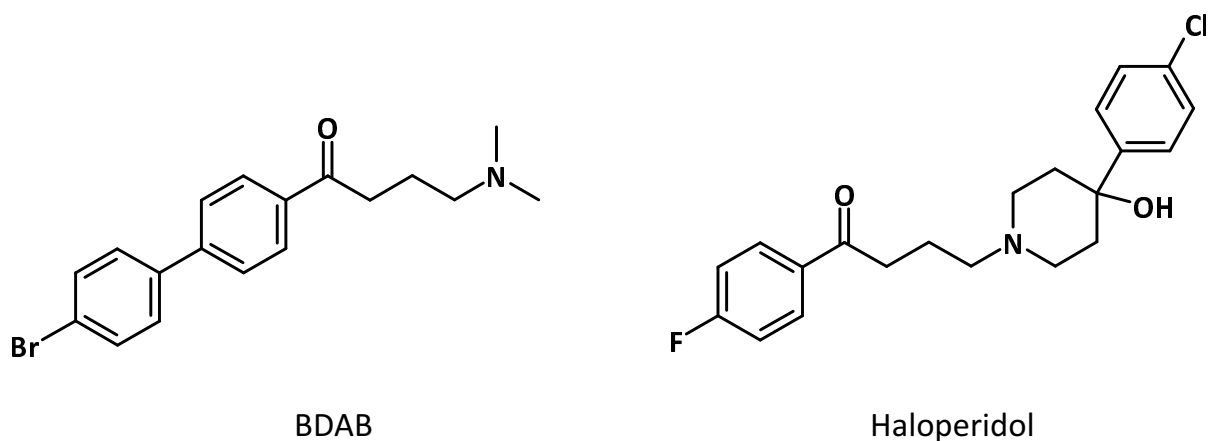


Abb. 6.1: Struktur von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB) und Haloperidol.

Beide Verbindungen besitzen einen aromatischen Rest, der über eine Carbonylfunktion und eine Kohlenstoffkette mit vier Kohlenstoff-Atomen mit einem Stickstoff verbunden ist. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit von BDAB und Haloperidol stellt sich die Frage, inwieweit auch BDAB antipsychotische Eigenschaften besitzt.

6.1.1 Schizophrenie

Schizophrenie ist eine tiefgreifende psychiatrische Erkrankung, die schwere Auswirkungen auf betroffene Patienten und deren Angehörige besitzt und etwa 0,7 % der Weltbevölkerung betrifft [Saha *et al.*, 2005]. Das Erkrankungsrisiko ist für Frauen und Männer gleichermaßen hoch, jedoch treten klinische Symptome bei Männern im Allgemeinen im frühen Erwachsenenalter zwischen 15 und 45 Jahren auf und damit fünf bis sieben Jahre früher als bei Frauen [Gross, 1997; Hafner *et al.*, 1998].

Obwohl noch kein Konsens über die essentiellen Kriterien für die Diagnose einer Schizophrenie erreicht wurde, besteht Übereinstimmung über die generellen klinischen Merkmale dieser Erkrankung [Tandon *et al.*, 2009]. Schizophrenie ist eine sehr heterogene Erkrankung und wird über eine Vielzahl von Symptomen charakterisiert, darunter Positivsymptome, Negativsymptome, kognitive Defizite und Störungen der Organisation, Befindlichkeit und Psychomotorik [Rowley *et al.*, 2001]. Positivsymptome schließen Wahnvorstellungen und Halluzinationen ein, während ein Abstumpfen bzw. ein Verlust von Emotionen und Antrieb als Negativsymptome bezeichnet werden [van Os und Kapur, 2009]. Eine Desorganisation von logischen, progressiven und zielführenden Denkprozessen kann auftreten [Tandon *et al.*, 2009]. Weiterhin ist eine Beeinflussung der Gemütsverfassung möglich. Sowohl Depressionen als auch eine verstärkte emotionale Erregung in Verbindung mit Positivsymptomen treten oft in Erscheinung [Buckley *et al.*, 2009].

Über die Ursache der Erkrankung ist bekannt, dass es zu einer strukturellen Veränderung bestimmter Gehirnbereiche kommt, darunter u.a. eine Abnahme der grauen Substanz bzw. eine Vergrößerung der Ventrikel [Daniel *et al.*, 1991; Konick und Friedman, 2001; Lawrie und Abukmeil, 1998]. Die Entstehung dieser strukturellen Veränderung ist nicht geklärt. Neben einer genetischen Komponente spielen auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle [Tandon *et al.*, 2008]. So erhöht eine Virusinfektion oder eine Mangelernährung der Mutter vor der Geburt genauso das Risiko für das Kind, wie Geburtskomplikationen, eine Wintergeburt, Kindheitstraumen, Kopfverletzungen und Cannabis-Missbrauch

[Brown, 2006; Brown und Susser, 2008; David und Prince, 2005; Davies *et al.*, 2003; Geddes und Lawrie, 1995; Morgan und Fisher, 2007; Semple *et al.*, 2005].

6.1.2 Neurochemische Hypothesen

Ein rationales Wirkstoffdesign ist aufgrund der unbekannten Ursache der Schizophrenie problematisch. Daher wurden verschiedene Evidenz-basierte neurochemische Hypothesen entwickelt, die eine Arzneistoffentwicklung ermöglichen sollen.

Eine dieser Hypothesen geht von einer Störung des dopaminergen Systems aus. Diese basiert auf der Beobachtung, dass Dopamin-Agonisten, wie z.B. Amphetamine, Psychosen auslösen können und Dopamin-Antagonisten antipsychotisch wirksam sind [Laruelle *et al.*, 1996]. Weiterhin wurde über neurochemische, bildgebende Verfahren während einer akuten Psychose eine verstärkte Dopamin-Synthese und -Freisetzung sowie eine erhöhte Dopamin-Konzentration im synaptischen Spalt nachgewiesen [Laruelle *et al.*, 1996; Strange, 2008; van Os und Kapur, 2009]. Positivsymptome werden durch eine Hyperaktivität des mesolimbischen dopaminergen Systems hervorgerufen. Für die Entstehung von Negativsymptomen soll jedoch eine Hypoaktivität des mesocorticalen dopaminergen Systems verantwortlich sein [Davis *et al.*, 1991; Grace, 1991; Guillin *et al.*, 2007].

Dopamin wirkt über fünf transmembranäre, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in zwei Unterklassen eingeteilt werden. Die D₁- und D₅-Rezeptoren gehören zur D₁-Familie und aktivieren die Adenylatcyclase. Die D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren werden der D₂-Familie zugeordnet, die die Adenylatcyclase inhibiert [Kebabian und Calne, 1979]. Der D₂-Rezeptor besitzt zwei Isoformen. Der D_{2short}-Rezeptor wird als Autorezeptor v.a. in dopaminergen Neuronen exprimiert, während der D_{2long}-Rezeptor in erster Linie postsynaptisch lokalisiert ist [Jomphe *et al.*, 2006].

Nicht alle Dopamin-Rezeptoren werden mit der Entstehung der Schizophrenie in Verbindung gebracht. Sowohl der D₁- als auch der D₅-Rezeptor scheinen an der Ausbildung von Positivsymptomen unbeteiligt zu sein [Horacek, 2000]. Jedoch gibt es

Anzeichen dafür, dass die Aktivierung des D₁-Rezeptors eine positive Wirkung auf kognitive Defizite besitzt [McLean *et al.*, 2009]. Der D₂-Rezeptor ist involviert in der Entwicklung von Positivsymptomen, da eine zu starke Hemmung des Rezeptors (Rezeptor-Besatz > 80 %) zu extrapyramidalmotorischen Störungen (EPS) führt [Farde *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2009; Strange, 2008]. Da viele Neuroleptika nicht nur an den D₂-Rezeptor binden, sondern auch eine hohe Affinität zu D₃- und D₄-Rezeptoren besitzen, wird angenommen, dass die Hemmung dieser Rezeptoren ebenfalls an der neuroleptischen Wirksamkeit beteiligt ist [Joyce und Millan, 2005]. Diese Vermutung basiert u.a. darauf, dass Clozapin eine höhere Affinität zum D₄- als zum D₂-Rezeptor besitzt und diese Hemmung folglich zum einzigartigen klinischen Profil dieses Arzneistoffes beiträgt [Rowley *et al.*, 2001]. Ein weiterer Aspekt stellt die anatomische Verteilung der Rezeptoren dar. Der D₂-Rezeptor ist in allen Gehirnbereichen zu finden. Mesolimbische D₂-Rezeptoren sind für die Entwicklung von Positivsymptomen, nigrostriatale für die Entstehung von EPS verantwortlich [Reynolds, 2004]. Im Gegensatz dazu befinden sich D₃- und D₄-Rezeptoren bevorzugt im mesolimbischen System, so dass bei einer Hemmung der Rezeptoren ein neuroleptischer Effekt ohne Auftreten von EPS zu erwarten ist [Gurevich und Joyce, 1999; Joyce und Millan, 2005; Matsumoto *et al.*, 1995].

Eine weitere Hypothese postuliert, dass Abnormalitäten im serotoninergen System zur Pathophysiologie der Schizophrenie beitragen. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, dass mehrere Serotonin-Rezeptoragonisten, wie z.B. Mescaline oder Lysergsäure Diethylamid, Halluzinationen hervorrufen [Rowley *et al.*, 2001]. Ein zusätzlicher Hinweis auf eine Beteiligung des serotoninergen Systems gibt die exzellente Wirksamkeit des Neuroleptikums Clozapin, das eine deutlich höhere Affinität zum 5-HT₂-Rezeptor besitzt als zum D₂-Rezeptor [Roth *et al.*, 2004]. Eine Reihe atypischer Neuroleptika zeigt ebenfalls eine hohe Affinität zum 5-HT₂-Rezeptor. Inwieweit jedoch eine alleinige Hemmung dieses Rezeptors *per se* eine antipsychotische Wirksamkeit vermittelt, ist bis heute nicht geklärt [Bishara und Taylor, 2008]. Bekannt ist allerdings, dass sowohl der 5-HT_{1A}- als auch der

5-HT_{2A}-Rezeptor direkt mit der dopaminergen Neurotransmission interagieren. Die Zusammenhänge zwischen den beiden Systemen und deren Beeinflussung durch Neuroleptika sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

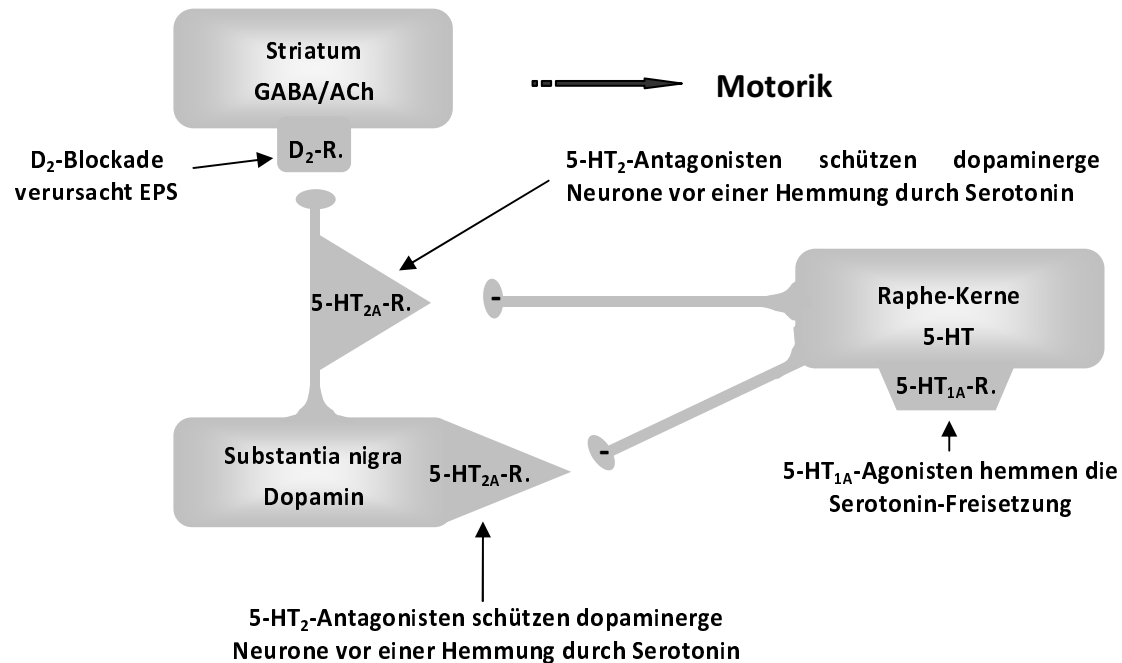


Abb. 6.2: Zusammenspiel des dopaminergen und serotonergen Systems und deren Beeinflussung durch Neuroleptika in Anlehnung an Horáček (2003). GABA, γ -Aminobuttersäure; Ach, Acetylcholin; D₂-R., Dopamin₂-Rezeptor; 5-HT_{1A}-R., 5-Hydroxytryptamin_{1A}-Rezeptor; 5-HT_{2A}-R., 5-Hydroxytryptamin_{2A}-Rezeptor.

Die Serotonin-Dopamin-Interaktion scheint sehr wichtig für das niedrige EPS-Risiko atypischer Antipsychotika zu sein. Serotonin aus Neuronen in den Raphe-Kernen hemmt die Freisetzung von Dopamin über somatodendritische und axodendritische 5-HT_{2A}-Rezeptoren an den dopaminergen Neuronen [Kim *et al.*, 2009]. 5-HT_{1A}-Agonisten inhibieren über den Autorezeptor die Freisetzung von Serotonin und sorgen so, genauso wie 5-HT_{2A}-Antagonisten, für eine Aufhebung der Hemmung und folglich für eine verstärkte Freisetzung von Dopamin. Dadurch können Neuroleptika mit D₂- und 5-HT_{2A}-inhibierender bzw. 5-HT_{1A}-agonistischer Wirkung nicht nur die Dopamin-Aktivität erniedrigen, sondern auch erhöhen und damit eine absolute Blockade durch reinen D₂-Antagonismus aufheben [Horacek, 2000; Kim *et al.*, 2009].

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass eine Unterfunktion von glutamatergen Neuronen im ZNS an der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt ist [Kim *et al.*, 2009]. Diese These beruht zum Einen auf der Beobachtung, dass bei schizophrenen Patienten die Glutamat-Konzentration in der cerebrospinalen Flüssigkeit erniedrigt ist, zum Anderen darauf, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Ketamin, schizophrenie-ähnliche Symptome hervorrufen [Kim *et al.*, 1980; Rowley *et al.*, 2001].

Neben Effekten auf das dopaminerge, serotoninerge und glutamaterge System beeinflussen Neuroleptika eine Reihe anderer Rezeptoren, darunter muscarinerge, histaminerge und adrenerge Rezeptoren. Die Hemmung dieser Rezeptoren wird mit Nebenwirkungen wie Sedierung, Gewichtszunahme (H_1 -Rezeptor), Mundtrockenheit (M_1 -Rezeptor) oder orthostatischer Dysregulation (α_1 -Rezeptor) in Verbindung gebracht [Horacek, 2000; Kim *et al.*, 2009]. Inwieweit Agonisten zu einer therapeutischen Wirksamkeit beitragen können, bleibt zu klären.

Sicher ist jedoch, dass eine Wirksamkeit gegen Schizophrenie nicht über die Beeinflussung eines Rezeptors erreicht wird, sondern die wirksamsten Neuroleptika, wie z.B. Clozapin hoch komplexe pharmakologische Profile besitzen [Biedermann und Fleischhacker, 2009; Roth *et al.*, 2004].

6.1.3 Bekannte Neuroleptika

Chlorpromazin ist das erste zugelassene Neuroleptikum [Kurland, 1955]. Seit seiner Einführung in den 1950er Jahren wurden eine Reihe weiterer Neuroleptika entwickelt, darunter Haloperidol, Fluspirilen und Levomepromazin, die alle eine inhibitorische Wirkung auf den D_2 -Rezeptor besitzen [Creese *et al.*, 1976]. Diese Wirkstoffe haben gemeinsam, dass sie eine potente Wirksamkeit gegenüber den Positivsymptomen zeigen, jedoch nur einen geringen Effekt auf die Negativsymptome und kognitiven Defizite besitzen, weiterhin EPS auslösen und die Serum-Prolaktin-Konzentration erhöhen können [Bishara und Taylor, 2008; Peacock *et al.*, 1996]. Aufgrund des ähnlichen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils werden diese

Arzneistoffe in die Klasse der typischen Neuroleptika eingeordnet [van Os und Kapur, 2009].

Clozapin wurde kurz nach Chlorpromazin entdeckt und gilt als erstes Neuroleptikum der Klasse der atypischen Neuroleptika. Dieser Wirkstoff besitzt ein komplexes Wirkungsspektrum und ist selbst bei der therapieresistenten Schizophrenie, die bei ca. einem Drittel der Patienten auftritt, wirksam [van Os und Kapur, 2009]. Ein weiterer Vorteil ist, dass Clozapin kaum EPS auslöst und den Prolaktinspiegel nicht beeinflusst [Kane *et al.*, 1981; Peacock *et al.*, 1996]. Ein breiter Einsatz ist jedoch nicht möglich, da der Wirkstoff bei etwa 1% der Patienten eine lebensgefährliche Agranulozytose auslöst [Amsler *et al.*, 1977]. In dem Bestreben atypische Antipsychotika mit einer Clozapin-ähnlichen Wirksamkeit und verbessertem Nebenwirkungsprofil zu entwickeln, wurden weitere Wirkstoffe, wie z.B. das Olanzapin, Amisulprid und Risperidon entdeckt [Agid *et al.*, 2008]. Alle atypischen Neuroleptika hemmen, wie die typischen Neuroleptika, den D₂-Rezeptor, die meisten besitzen allerdings auch eine Affinität zu anderen Rezeptoren, besonders zum 5-HT_{2A}-Rezeptor [Stockmeier *et al.*, 1993]. Dadurch sollen diese Arzneistoffe stärker als die typischen Neuroleptika gegen Negativsymptome und Depressionen wirken, sowie die Lebensqualität erhöhen und zusätzlich ein geringeres Risiko für die Entstehung von EPS besitzen. Obwohl atypische Neuroleptika eine gute Wirksamkeit gegen Positivsymptome besitzen und EPS bei einer Therapie deutlich seltener auftreten, erfüllen diese nicht die an sie gestellten Ansprüche, da Negativsymptome und kognitive Defizite nur wenig beeinflusst werden [Agid *et al.*, 2008; Leucht *et al.*, 2009]. Des Weiteren verursachen atypische Neuroleptika metabolische Nebenwirkungen wie z.B. Gewichtszunahme sowie erhöhte Triglycerin- und Cholesterol-Spiegel [van Os und Kapur, 2009].

Da bei der Therapie mit bekannten Wirkstoffen ein großer Anteil an Patienten nicht auf die Medikation anspricht, starke Nebenwirkungen auftreten und Negativsymptome nur ungenügend behandelt werden können, ist eine Entwicklung von neuen Wirkstoffen wünschenswert.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Material

6.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin wurde von Alfa Aesar erworben. 4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon wurde nach der Vorschrift von Friedrich (2007) synthetisiert. Dichlormethan, das für die Synthese und Chromatographie verwendet wurde, wurde vor Gebrauch destilliert. Methanol wurde in HPLC-Qualität (Mallinckrodt Baker, Griesheim) eingesetzt.

6.2.1.2 Geräte

NMR-Spektren wurden mit dem Kernresonanzspektrometer ARX 300 (Bruker, Rheinstetten) aufgenommen. Die Messfrequenz betrug beim ^1H -NMR 300,13 MHz, beim ^{13}C -NMR 75,47 MHz. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (TMS). Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, dd = Duplett vom Duplett, t = Triplett, dt = Duplett vom Triplett, qn = Quintett, m = Multiplett, 2J = geminale Kopplungskonstante, 3J = vicinale Kopplungskonstante. Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Massenspektrometrische Bestimmungen wurden mit einem Hewlett-Packard MS-Engine 5989A-Massenspektrometer aufgenommen.

Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific, SMP3 bestimmt. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgte unkorrigiert.

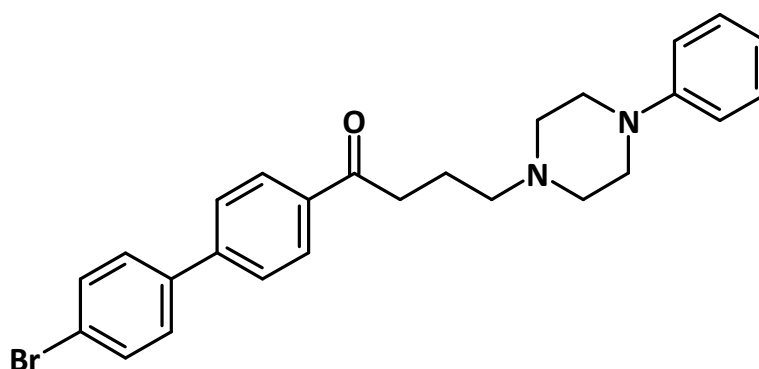
Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Polygram SIL G/UV₂₅₄ 0,2 mm (Macherey und Nagel) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm.

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde das Perkin-Elmer 16 PC FT-IR Gerät verwendet.

Die Elementaranalysen wurden im Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an einem CHNS Analysator (HEKAtech, Wegberg) durchgeführt.

6.2.2 Methoden

6.2.2.1 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon (BPPB)



Es werden 500 mg 4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon (1,5 mmol), 686 μ l Phenylpiperazin (4,5 mmol), 207 mg Kaliumcarbonat (1,5 mmol) und Kaliumiodid als Katalysator in 10 ml Dimethylformamid zwölf Stunden unter Rückfluss gerührt. Der Ansatz wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand einer Säulenchromatographie über Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 9:1) unterzogen. Die produkthaltigen Fraktionen werden am Rotationsverdampfers einkonzentriert und der Rückstand aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 40 %

DC: $R_f = 0,83$ (Dichlormethan/Methanol 9:1)

Schmelzpunkt: 172 °C

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3423, 2987, 1693, 1610, 1503, 1005, 810.

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

$\delta/\text{ppm} = 1,94$ (qn, $^3J = 6,1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$); $2,42$ (t, $^3J = 6,1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); $2,54$ (t, $^3J = 2,9$ Hz, 4H, $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{N}$); $2,96$ (t, $^3J = 6,1$ Hz, 2H, $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); $3,06$ (t, $^3J = 3,0$ Hz, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{N}-\text{Ar}$); $6,77$ (t, $^3J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H); $6,84$ (t, $^3J = 7,8$ Hz, 2H, Ar-H); $7,17$ (m, 2H, Ar-H); $7,4$ (m, 2H, Ar-H); $7,52$ (m, 2H, Ar-H); $7,56$ (m, 2H, Ar-H); $7,97$ (m, 2H, Ar-H).

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

$\delta/\text{ppm} = 21,6$ ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$); $36,3$ ($-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); $49,0$ ($2 \times \text{N}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{N}$); $53,1$ ($2 \times \text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{N}$); $57,7$ ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); $116,0$ ($3 \times \text{Ar-CH}$); $119,6$ ($2 \times \text{Ar-CH}$); $122,6$ (Ar-C); $127,0$ ($2 \times \text{Ar-CH}$); $128,8$ ($2 \times \text{Ar-CH}$); $129,1$ ($2 \times \text{Ar-CH}$); $132,1$ ($2 \times \text{Ar-CH}$); $136,2$ (Ar-C); $138,8$ (Ar-C); $144,3$ (Ar-C); $151,32$ (Ar-C); $199,5$ (CO).

MS (ESI):

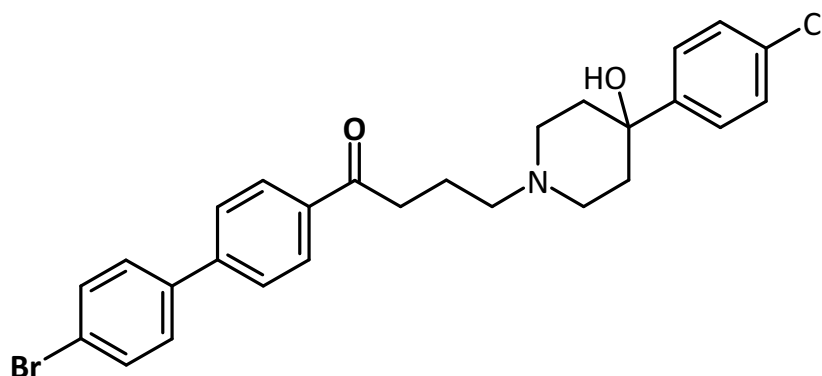
$m/z = 466$ [$\text{M} + \text{H}^+$, $^{81}\text{Br}/^{13}\text{C}$], 465 [$\text{M} + \text{H}^+$, ^{81}Br], 464 [$\text{M} + \text{H}^+$, $^{79}\text{Br}/^{13}\text{C}$], 463 [$\text{M} + \text{H}^+$, ^{79}Br].

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O} \cdot 0,2 \text{ HCl}$ (470,72):

Ber.	C 66,55 %	H 5,79 %	N 5,95 %
Gef.	C 66,57 %	H 5,78 %	N 5,54 %

6.2.2.2 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]-butyrophenon (BCHB)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Kretschmar *et al.* (1985) [Kretschmar, 1985]:



Es werden 400 mg 4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon (1,2 mmol), 212 mg 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin (1,0 mmol), 366 mg Kaliumcarbonat (2 mmol) und Kaliumiodid als Katalysator in 5 ml Toluol 24 Stunden unter Rückfluss gerührt. Die Feststoffe werden abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das reine Produkt wird durch Umkristallisation aus Ethanol erhalten.

Ausbeute: 60 %

DC: $R_f = 0,9$ (Dichlormethan/Methanol 9:1)

Schmelzpunkt: 191,6 °C

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3452, 3154, 1685, 1610, 1497, 1413, 1030, 810.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 1,45$ (dd, $^2J_{ae} = 2$ Hz, $^3J_{ae} = 12,0$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-C, equatorial); 1,66 (dt, $^3J_{ae} = 4$ Hz, $^3J_{aa} = 12,0$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-C, axial); 1,85 (qn, $^3J = 6,8$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 2,30 (dt, $^3J_{ae} = 2,0$ Hz, $^3J_{aa} = 6,1$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-C, axial); 2,36 (t, $^3J = 6,9$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 2,57 (dd, $^2J_{ae} = 2,0$ Hz, $^3J_{ae} = 12,1$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-C, equatorial); 3,0 (s, 1H, -OH); 3,02 (t, $^3J = 6,9$ Hz, 2H, CO-CH₂-); 7,26-7,36 (m, 4H, Ar-H); 7,68 (s, 4H, Ar-H); 7,82 (m, 2H, Ar-H); 8,06 (m, 2H, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , TMS):

$\delta/\text{ppm} = 22,1$ (-CH₂-CH₂-CH₂-); 35,7 (CO-CH₂); 38,7 (2 \times N-CH₂-CH₂-C); 48,8 (2 \times N-CH₂-CH₂-C); 57,23 (-CH₂-CH₂-CH₂-); 69,5 (C-OH); 121,8 (Ar-C); 126,7 (3 \times Ar-CH); 127,6 (2 \times Ar-CH); 128,7 (2 \times Ar-CH); 128,9 (2 \times Ar-CH); 130,6 (Ar-C); 131,9 (2 \times Ar-CH); 136,3 (Ar-C); 138,1 (Ar-C); 142,7 (Ar-C); 149,2 (Ar-C); 199,2 (CO).

MS (ESI):

$m/z = 516$ [M + H⁺, $^{81}\text{Br}/^{37}\text{Cl}$], 515 [$^{81}\text{Br}/^{37}\text{Cl}$], 514 [M + H⁺, $^{81}\text{Br}/^{35}\text{Cl}$, $^{79}\text{Br}/^{37}\text{Cl}$], 513 [$^{79}\text{Br}/^{37}\text{Cl}$], 512 [M + H⁺, $^{79}\text{Br}/^{35}\text{Cl}$].

$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{BrClNO}_2 \cdot 0,7 \text{ HCl}$ (538,4):

Ber. C 60,64 % H 5,20 % N 2,62 %

Gef. C 60,53 % H 5,08 % N 2,64 %

6.2.2.3 Stabilitätsprüfung

BPPB und BCHB wurden in Aceton angelöst und mit jeweils 0,1 M Salzsäure pH 1, *Aqua bidest.*, 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 50 mM Boratpuffer pH 9 zu einer 1 mM Lösung verdünnt. Diese Lösungen wurden bei 37 °C inkubiert, nach 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten Proben genommen und per HPLC mit der in Kapitel 6.2.2.4 beschriebenen Methode vermessen.

6.2.2.4 HPLC-Methode zur Überprüfung der Stabilität

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 2487 Dual UV Detector und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: Purospher® STAR RP-18 endcapped; 3 µM (4 × 55 mm; Merck)

Temperatur: Raumtemperatur (nicht thermostatisiert)

Mobile Phase: Eluent A: Essigsäure 0,1 % / Methanol (50:50, v/v) 50 %

Eluent B: Acetonitril 50 %

Flussrate: 1 ml/min

Laufzeit: 15 min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: BPPB: $\lambda = 250 \text{ nm}$

BCHB: $\lambda = 260 \text{ nm}$

Retentionszeiten: BPPB: $4,0 \pm 0,5 \text{ min}$

BCHB $4,6 \pm 0,5 \text{ min}$

6.2.2.5 Rezeptorbindungsstudie

Die Rezeptorbindungsstudien wurden von H. Hübner am Pharmazeutischen Institut der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt [Bettinetti *et al.*, 2002]. Dazu wurden die Verdrängung von [³H]Spiperon durch BDAB, BPPB und BCHB von humanen D_{2long}⁻, D_{2short}⁻, D₃⁻ und D₄-Rezeptoren bestimmt, die in Ovarialzellen chinesischer Hamster exprimiert wurden. Für die Bestimmung der D₁-Rezeptor-Affinität wurden porcine, striatale Membranen und der Radioligand [³H]SCH 23990 verwendet. Weiterhin wurde die Verdrängung von [³H]WAY600135 durch die drei Verbindungen vom porcinen 5-HT_{1A}-Rezeptor, die Verdrängung von [³H]Ketanserin vom porcinen 5-HT₂-Rezeptoren sowie die Verdrängung von [³H]-Prazosin vom porcinen α₁-Rezeptor untersucht.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Synthese

6.3.1.1 Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)-ω-(4-phenylpiperazinyl)-butyrophenon (BPPB)

Die Verbindung konnte in einem Schritt durch Umsetzung von 4'-(4-Bromphenyl)-ω-chlorbutyrophenon mit einem dreifachen Überschuss an Phenylpiperazin in Anwesenheit von Kaliumcarbonat sowie dem Katalysator Kaliumiodid in Dimethylformamid synthetisiert werden. Die Reaktion ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

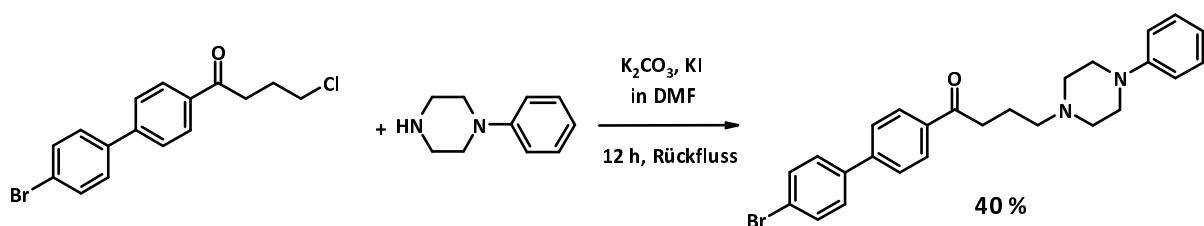


Abb. 6.3: Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)-ω-(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon.

Das reine Endprodukt wurde durch chromatographische Aufreinigung über Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 9:1) und anschließender Umkristallisation aus Cyclohexan gewonnen. Der Ersatz von DMF durch Dioxan bzw. Ethanol führte zu einer deutlich

verringerten Umsetzung. Auch durch den Austausch von Kaliumcarbonat gegen Diisopropylethylamin konnte die Ausbeute von 40 % nicht erhöht werden.

6.3.1.2 Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]-butyrophenon (BCHB)

Die Umsetzung von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -chlorbutyrophenon mit 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin in Toluol unter Zusatz von Kaliumcarbonat und Kaliumiodid führte nach 24-stündigem Rühren unter Rückfluss und anschließender Umkristallisation aus Ethanol zum reinen Produkt (Abb. 6.4).

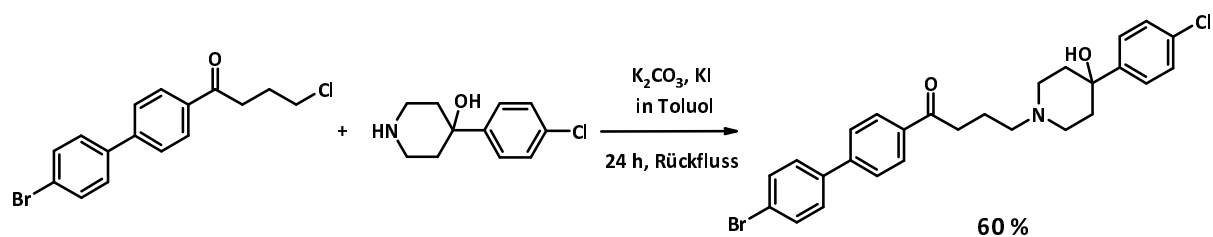


Abb. 6.4: Synthese von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]-butyrophenon.

Wurden die Edukte in Anlehnung an Saify *et al.* in Ethanol gelöst und acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt, so konnte keine Umsetzung zum Produkt beobachtet werden [Saify *et al.*, 2005].

6.3.2 Testung von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB)

Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Neuroleptikum Haloperidol (vgl. Kapitel 6.1), wurde die Affinität von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB) zu dopaminergen, serotoninergen und adrenergen Rezeptoren untersucht, die an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt sein sollen. Für eine neuroleptische Wirksamkeit ist die Hemmung des D_2 -, D_3 - und D_4 -Rezeptors wichtig [Joyce und Millan, 2005; Kim *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 1995]. Die Affinität zum D_2 -Rezeptor sollte jedoch nicht zu hoch sein, da eine vollständige Blockade der nigrostriatalen, dopaminergen Transmission zu einer Ausbildung von extrapyramidalmotorischen Störungen führt [Strange, 2008]. Da

sowohl der D₃- als auch der D₄-Rezeptor bevorzugt im mesolimbischen Bereich des Gehirns lokalisiert ist, wird eine Hemmung mit einer neuroleptischen Wirksamkeit ohne Ausbildung von EPS in Verbindung gebracht [Joyce und Millan, 2005; Matsumoto *et al.*, 1995]. Auch eine Inhibierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors ist aufgrund des damit verbundenen geringeren EPS-Risikos erwünscht (vgl. Kapitel 6.1.2) [Horacek, 2000]. Dagegen sollten weder der D₁-Rezeptor, aufgrund der damit verbundenen Beeinflussung von kognitiven Funktionen, noch der 5-HT_{1A}-Rezeptor gehemmt werden [McLean *et al.*, 2009]. Eine Inhibierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors führt zu einer verminderten Dopamin-Freisetzung aus dem nigrostriatalen dopaminergen System und steigert so das Risiko einer EPS-Ausbildung (vgl. Kapitel 6.1.2). Des Weiteren werden viele Nebenwirkungen von Neuroleptika, wie z.B. Sedierung und Reflextachykardie, auf eine Hemmung des α_1 -Rezeptors zurückgeführt, so dass eine möglichst geringe Affinität zu diesem erwünscht ist [Kim *et al.*, 2009].

Die Rezeptorbindungsstudie wurde von H. Hübner am Pharmazeutischen Institut der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen mittels eines Radioaktivitäts-Assays an verschiedenen Rezeptoren durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindungsstudie sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tab. 6.1: Ergebnisse der Bindungsstudie von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon (BDAB) an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren sowie am α_1 -Rezeptor.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
pD ₁	5900 ± 3253*
hD _{2long}	22500 ± 4950*
hD _{2short}	89500 ± 14849*
hD ₃	2300 ± 141*
hD ₄	140 ± 28
p5-HT _{1A}	106 ± 21
p5-HT _{2A}	975 ± 318*
pα ₁	4150 ± 636*

Die Untersuchungen wurden durch H. Hübner am Pharmazeutischen Institut Erlangen durchgeführt. Die ermittelten K_i-Werte in nM sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils zwei voneinander unabhängigen Versuchen, die dreifach bestimmt wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied sowohl zum D₄- als auch zum 5-HT_{1A}-Rezeptor ($p < 0,02$, Student's t-Test). p, porcin; h, human.

BDAB zeigt eine hohe Affinität zum humanen D₄- Rezeptor sowie zum porcinen 5-HT_{1A}-Rezeptor, während die Verbindung am D₁-, D₂-, D₃-, 5-HT_{2A} und α₁-Rezeptor signifikant ($p < 0,02$) höhere K_i-Werte aufweist. Werden die K_i-Werte mit literaturbekannten Daten von Haloperidol verglichen, so fällt die insgesamt geringere Affinität zu dem D₂-, D₄-, und 5-HT_{2A}- Rezeptor auf (Haloperidol: D₂ = 0,5 nM, D₄ = 10,3 nM, 5-HT_{2A} = 20 nM [Roth *et al.*, 1995]). Aufgrund dieser Ergebnisse sollten Verbindungen entwickelt werden, die stärker an D₂-, D₃- und D₄- sowie 5-HT_{2A}- Rezeptoren binden.

Die strukturelle Entwicklung basierte auf dem Pharmakophormodell für den D₂- und D₄-Rezeptor von Boström *et al.* [Bostrom *et al.*, 2000]. Das Pharmakophormodell mit BDAB ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Schizophrenie wurde von Boström *et al.* (2000) ein ligandenbasiertes pharmakophores Modell für den D₂- und D₄-Rezeptor entwickelt. Dieses Modell

bietet die Möglichkeit einer Computer-gestützten Wirkstoffentwicklung. Durch Konformations-Analyse wurde die bevorzugte Konformation von bekannten Liganden, die an dieselbe Stelle des Proteins binden, bestimmt und die Liganden dann übereinandergelagert. Aus dieser Übereinanderlagerung wurden anschließend gemeinsame chemische Merkmale bestimmt und daraus ein Pharmakophormodell entwickelt [Bostrom *et al.*, 2000]. Das Pharmakophormodell ist in Abbildung 6.5 dargestellt

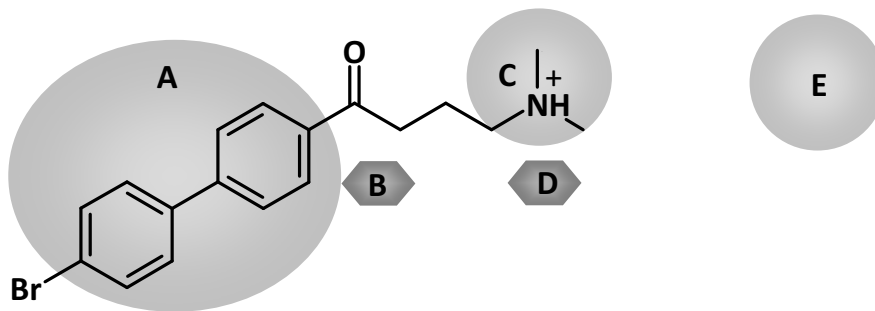


Abb. 6.5: D₂-/D₄-Pharmakophormodell in Anlehnung an Boström *et al.* (2000) mit BDAB. A, aromatisches Ringsystem; B, Rezeptor-essentieller Bereich; C, Ammonium-Stickstoff; D, Wasserstoffbrückenakzeptor von Rezeptor; E, aromatisches Ringsystem.

Die pharmakophoren Elemente A und E stellen aromatische Ringe des Liganden dar. B ist ein Rezeptor-essentieller Bereich, d.h. Substituenten des Liganden in diesem Bereich reduzieren die Affinität des Liganden zum Rezeptor. C ist ein Ammonium-Stickstoff, dessen Wasserstoff in Richtung eines Wasserstoffbrückenakzeptors (D) des Rezeptors zeigt.

BDAB entspricht teilweise den Anforderungen, die aus dem Pharmakophormodell für Liganden des D₂- und D₄-Rezeptors abgeleitet werden. Die Verbindung besitzt ein aromatisches Ringsystem (A), das durch einen unsubstituierten Spacer mit einem Ammonium-Stickstoff (C) verbunden ist und ragt nicht in den Rezeptor-essentiellen Bereich (B) ein. Allerdings fehlt ein zusätzliches aromatisches Ringsystem (E), das die Affinität zu den Rezeptoren weiter erhöht [Bostrom *et al.*, 2000]. Daher wurde 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon (BPPB) synthetisiert, welches statt der Dimethylamino-Funktion einen Phenylpiperazin-Rest besitzt. Durch

den zusätzlichen Aromaten sollte eine erhöhte Affinität zum D₂- und D₄-Rezeptor erreicht werden.

Weiterhin wurde 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]-butyrophenon (BCHB) synthetisiert. Durch Einführung des 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin-Restes sollte zum Einen eine gesteigerte Affinität zum D₂- und D₄-Rezeptor durch den zusätzlichen Aromaten erreicht werden, zum Anderen sollte eine Hydroxyl-Funktion eingeführt werden, da Sikazwe *et al.* gezeigt haben, dass dieser Rest eine Wasserstoffbrückenbindung zum D₂-Rezeptor ausbilden kann und damit die Affinität zum Rezeptor deutlich erhöht [Sikazwe *et al.*, 2004].

6.3.3 Stabilitätsuntersuchung

Zur Überprüfung der Stabilität wurden BPPB und BCHB in Medien mit verschiedenen pH-Werten gelöst, über 120 Minuten in regelmäßigen Abständen Proben gezogen und per HPLC nach der in Kapitel 6.2.2.4 beschriebenen Methode vermessen. Innerhalb des Messzeitraums bleiben beide Verbindungen sowohl in 0,1 M Salzsäure pH 1 als auch *Aqua bidest.*, 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 50 mM Boratpuffer pH 9 stabil.

6.3.4 Rezeptorbindungsstudie

BPPB und BCHB wurden von H. Hübner am Pharmazeutischen Institut der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen mittels eines Radioaktivitäts-Assays an verschiedenen Rezeptoren getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6.2 und 6.3 dargestellt.

Tab. 6.2: Ergebnisse der Bindungsstudie von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)butyrophenon (BPPB) an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren sowie am α_1 -Rezeptor.

Rezeptor	BPPB K _i -Wert [nM]
pD ₁	14000 ± 1633* [#]
hD _{2long}	64500 ± 41645* [#]
hD _{2short}	25000 ± 11136* [#]
hD ₃	12 ± 5 [#]
hD ₄	60 ± 18*
p5-HT _{1a}	40000 ± 2828* [#]
p5-HT _{2A}	2350 ± 636* [#]
p α_1	95 ± 29*

Die Untersuchung wurden durch H. Hübner am Pharmazeutischen Institut Erlangen durchgeführt. p, porcin; h, human. Die ermittelten K_i-Werte in nM sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils zwei voneinander unabhängigen Versuchen, die dreifach bestimmt wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zum D₃-Rezeptor ($p < 0,03$, Student's t-Test). [#]Statistisch signifikanter Unterschied zum D₄-Rezeptor ($p < 0,03$, Student's t-Test). p, porcin; h, human.

Durch die Einführung des Phenylpiperazin-Restes im BPPB wird die Affinität sowohl zum D₃- als auch zum D₄-Rezeptor im Vergleich zum BDAB signifikant ($p < 0,02$) gesteigert. Die K_i-Werte für beide Rezeptoren liegen, mit Ausnahme des K_i-Wertes für den α_1 -Rezeptor, signifikant ($p < 0,03$) unterhalb der restlichen Werte. Durch die erhöhte Affinität zu den beiden Rezeptoren könnte eine neuroleptische Wirkung ohne Ausbildung von EPS erreicht werden [Joyce und Millan, 2005; Matsumoto *et al.*, 1995]. Zusätzlich sinkt die Affinität zum D₁-Rezeptor, sowie zum 5-HT_{1A}-Rezeptor im Vergleich zu BDAB signifikant ($p < 0,02$), so dass das Risiko für Nebenwirkungen wie kognitive Defizite oder EPS weiter abnimmt [Horacek, 2000; McLean *et al.*, 2009]. Die Affinitätserniedrigung zu den D₂- und 5-HT₂-Rezeptoren ist hingegen unerwünscht, da

eine moderate Bindung an den D₂-Rezeptor für die antipsychotische Wirksamkeit wichtig ist und eine Hemmung des 5-HT_{2A}-Rezeptors mit einem geringeren EPS-Risiko in Verbindung gebracht wird [Horacek, 2000; Kim *et al.*, 2009]. Weiterhin unerwünscht ist die Hemmung des α₁-Rezeptors, die signifikant (p < 0,005) zugenommen hat, da dieser Rezeptor mit Nebenwirkungen wie z.B. einer Sedierung in Verbindung gebracht wird [Kim *et al.*, 2009]. Insgesamt hat sich jedoch das pharmakologische Spektrum verbessert, da die Affinität durch die Einführung des Phenylpiperazin-Restes zu den, für die Wirkung wichtigen D₃- und D₄-Rezeptoren zugenommen hat. Inwieweit diese Hemmung für einen neuroleptischen Effekt ausreicht, bleibt in *in vivo*-Studien zu klären.

BCHB zeigt dagegen eine statistisch signifikante, selektive Hemmung der D₂- und des D₃-Rezeptors gegenüber dem D₁-, D₄-, 5-HT_{1A}-, 5-HT₂ und α₁-Rezeptor (Tabelle 6.3).

Tab. 6.3: Ergebnisse der Bindungsstudie von 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxypiperidinyl]butyrophenon (BCHB) an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren sowie am α_1 -Rezeptor.

Rezeptor	BCHB K_i -Wert [nM]
pD ₁	7425 \pm 2791* [#]
hD _{2long}	174 \pm 75*
hD _{2short}	98 \pm 29
hD ₃	56 \pm 23 [#]
hD ₄	1980 \pm 1247* [#]
p5-HT _{1a}	25000 \pm 2828* [#]
p5-HT ₂	8700 \pm 424* [#]
p α_1	2950 \pm 705* [#]

Die Untersuchung wurden durch H. Hübner am Pharmazeutischen Institut, Erlangen durchgeführt. p, porcin; h, human. Die ermittelten K_i -Werte in nM sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils zwei voneinander unabhängigen Versuchen, die dreifach bestimmt wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zum D₃-Rezeptor ($p < 0,03$, Student's t-Test). [#]Statistisch signifikanter Unterschied zum D_{2long}-Rezeptor ($p < 0,03$, Student's t-Test). 'Statistisch signifikanter Unterschied zum D_{2short}-Rezeptor ($p < 0,03$, Student's t-Test). p, porcin; h, human.

Durch die Einführung der Hydroxylfunktion konnte die Affinität zu den D₂-Rezeptoren im Vergleich mit BDAB stark erhöht werden ($p < 0,005$), allerdings liegen die ermittelten K_i -Werte immer noch deutlich über denen des Haloperidols. Dieses ist positiv zu bewerten, da eine zu starke Hemmung des D₂-Rezeptors zu extrapyramidal-motorischen Störungen führt [Strange, 2008]. Die neuroleptische Wirksamkeit wird durch die Hemmung des D₃-Rezeptors unterstützt [Joyce und Millan, 2005]. Allerdings besitzt die Verbindung eine verringerte Affinität zum D₄-Rezeptor, der ebenfalls an der neuroleptischen Wirksamkeit beteiligt ist. Auch durch die Einführung eines 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin-Restes konnte das

pharmakologische Profil im Vergleich mit BDAB durch die erhöhte Affinität zu den D₂-Rezeptoren sowie dem D₃-Rezeptor, die für die neuroleptische Wirksamkeit verantwortlich sind, verbessert werden. Weiterhin ist durch die geringe Affinität der Verbindung zu den D₁-, 5-HT_{1A} und α_1 -Rezeptoren ein reduziertes Risiko für Nebenwirkungen zu erwarten.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylamino-butyrophenon (BDAB) zu dem Neuroleptikum Haloperidol stellte sich die Frage, inwieweit BDAB eine antipsychotische Wirksamkeit besitzt. Daher wurde durch Hübner am Pharmazeutischen Institut der Universität in Erlangen die Affinität der Verbindung zu dopaminergen, serotoninen und adrenergen Rezeptoren bestimmt, die entweder für die Entstehung von Negativ- und Positivsymptomen verantwortlich (D₁, D₂, D₃, D₄-Rezeptoren) oder an der Ausbildung von Nebenwirkungen durch bekannte Neuroleptika beteiligt sind (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, α_1) [Horacek, 2000; Joyce und Millan, 2005; Kim *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 2009; Williams und Castner, 2006]. Bei der Rezeptorbindungsstudie zeigte BDAB eine statistisch signifikante, selektive Hemmung des D₄- und 5-HT_{1A}-Rezeptors. Eine Inhibierung des D₄-Rezeptors ist erwünscht, da dieser mesolimbisch lokalisiert ist und eine Hemmung mit einer neuroleptischen Wirksamkeit ohne Auftreten von extrapyramidal-motorischen Störungen in Verbindung gebracht wird [Matsumoto *et al.*, 1995]. Der Vergleich mit den K_i-Werten des Haloperidols zeigte jedoch die deutlich niedrigere Affinität des BDAB zu den für eine neuroleptische Wirksamkeit essentiellen D₂-, D₄- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren [Roth *et al.*, 1995]. Infolge dessen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Verbindungen, 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)-butyrophenon (BPPB) und 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxy-piperidinyl]butyrophenon (BCHB) erfolgreich synthetisiert. Durch Einführung eines zusätzlichen aromatischen Restes gemäß dem Pharmakophormodell von Boström *et al.* (2000) sollte eine erhöhte Affinität zu den D₂- und D₄-Rezeptoren erreicht werden. BCHB besitzt außerdem eine Hydroxyl-Funktion als weitere

Interaktionsmöglichkeit für den D₂-Rezeptor, so dass eine gesteigerte Affinität resultieren sollte. Die Verbindungen BCHB und BPPB zeigten eine hohe Stabilität in Medien mit verschiedenen pH-Werten (pH 1 – pH 9).

Es stellte sich heraus, dass die Affinität zum D₃- und D₄-Rezeptor durch die Einführung eines Phenylpiperazin-Restes tatsächlich signifikant ($p < 0,02$) gesteigert werden konnte. Die Verbindung zeigte eine selektive Hemmung der D₃- und D₄-Rezeptoren gegenüber dem D₁-, D_{2long}-, D_{2short}-, 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor, allerdings nicht gegenüber dem α_1 -Rezeptor, der im Vergleich mit BDAB stärker gehemmt wurde. Diese Selektivität ist einerseits positiv zu bewerten, da sowohl der D₁- als auch der 5-HT_{1A}-Rezeptor aufgrund der damit verbundenen Nebenwirkungen, wie z.B. kognitive Defizite und eine Verstärkung des EPS-Risikos, nicht gehemmt werden sollte. Andererseits ist die Affinität von BPPB am D₂-Rezeptor weiterhin zu gering, um an einer neuroleptischen Wirksamkeit beteiligt zu sein. Eine stärkere Hemmung des 5-HT_{2A}-Rezeptors aufgrund der Erniedrigung des EPS-Risikos wäre ebenso wünschenswert wie eine weniger starke Beteiligungung des α_1 -Rezeptors.

Durch die Einführung eines 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin-Restes konnte die Affinität zu den, für die neuroleptische Wirkung verantwortlichen D₂- und D₃-Rezeptoren im Vergleich zu BDAB signifikant gesteigert werden. Die Hemmung des D₂-Rezeptors ist darüber hinaus deutlich geringer als die mit Haloperidol, so dass die Gefahr des Auftretens von extrapyramidalmotorischen Störungen vermindert sein sollte. Der D₁-Rezeptor, 5-HT_{1A}-Rezeptor und α_1 -Rezeptor werden nicht gehemmt. Dieses ist im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen positiv zu bewerten.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass der Austausch der Dimethylamino-Gruppe durch Reste mit einem aromatischen Ring die Affinität zu D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren erhöht und Substanzen mit interessantem pharmakologischen Profil erhalten werden konnten. Jedoch ist eine abschließende Beurteilung der Eignung als Arzneistoffkandidat aufgrund der fehlenden Struktur-Wirkungsbeziehung allein nicht möglich. Sie würden aber eine Durchführung von *in vivo* Studien an Tieren rechtfertigen, um die neuroleptische Potenz beurteilen zu können.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch Umsetzung von L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS) gebildet und ist an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Sowohl eine Hypoaktivität als auch eine Hyperaktivität der NOS wird mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Daher ist eine gezielte Beeinflussung bestimmter NO-vermittelter Effekte erwünscht, um eine selektive Wirkung zu erreichen.

N-Hydroxy-L-arginin (NOHA) ist das natürliche Intermediat der NO-Katalyse und als NO-Donor geeignet, da aus diesem NO freigesetzt werden kann. Ein Vorteil dieser Verbindung ist seine inhibitorische Wirksamkeit auf das Enzym Arginase, das Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin umsetzt und bei pathologisch erhöhter Enzymaktivität zu einer verringerten Substratverfügbarkeit für die NOS führen kann. Für eine orale Gabe ist NOHA aufgrund seiner oxidativen und hydrolytischen Instabilität, sowie seiner Polarität ungeeignet. Daher wurden von Schade NOHA-Prodrugs synthetisiert, deren Hydroxyguanidinfunktion durch *O*-Methylierung und *O*-Carboxymethylierung zur Erhöhung der Stabilität geschützt wurden und deren Lipophilie durch Veresterung der Carboxylfunktion und Carbamoylierung der Guanidin-Amino-Funktion gesteigert wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität dieser NOHA-Prodrugs sowie die enzymatische Freisetzung der pharmakologisch aktiven Metabolite untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die oxidative und hydrolytische Stabilität durch den Schutz der Hydroxyguanidin-Struktur im Vergleich zu NOHA deutlich erhöht wurde. Nur Ester zeigten eine Instabilität im Basischen. Weiterhin wurde gezeigt, dass Ester durch unspezifische Carboxylesterase und humanes Plasma gespalten werden, während Carbamate sowohl hydrolytisch als auch enzymatisch zu stabil waren, sodass die freien Verbindungen nicht detektiert werden konnten. Eine Umsetzung der Verbindungen mit Schweinelebermikrosomen, -mitochondrien, OMV und mARC zu NOHA erfolgte nicht. Dafür wurde eine geringe Umsetzung durch Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien von

N^{ω} -Methoxy-L-arginin (Prodrug **1**) zu L-Arginin detektiert. Inwieweit entstandenes NOHA durch die Enzymquellen sofort weiter zum Arginin reduziert wurde und sich so der Detektion entzog, konnte nicht abschließend geklärt werden. Zusätzlich wurde eine von Schade synthetisierte *O*-glycosylierte, *N*-carbamoylierte Hydroxyguanidin-Modellverbindung auf Stabilität und enzymatische Freisetzung des pharmakologisch aktiven Metaboliten untersucht. Es wurde angenommen, dass die Einführung einer Galactose die Stabilität erhöht und die Aufnahme über einen Zucker-Transporter ermöglicht. Die Verbindung wurde durch β -Galactosidase gespalten, sodass die Hydroxyl-Funktion freigelegt werden konnte. Allerdings zeigte sich auch hier das Carbamat zu stabil, um gespalten zu werden. Eine Freisetzung des aktiven Metaboliten NOHA aus den *O*-methylierten und *O*-carboxymethylierten Prodrugs konnte mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Biotransformationsstudien nicht gezeigt werden. Dennoch ist eine Freisetzung von NOHA *in vivo* nicht auszuschließen. Daher können zur Verifizierung *in vivo*-Studien hilfreich sein.

Insbesondere eine Hyperaktivität eines NOS-Isoenzym, der neuronalen NOS, ist an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Da die weiteren Isoenzyme der NOS, eNOS und iNOS, physiologische Funktionen innerhalb des kardiovaskulären Systems bzw. des Immunsystems besitzen, ist eine selektive Hemmung der nNOS erwünscht. Dieses kann u.a. durch eine selektive Hemmung der hDDAH-1 erreicht werden, die mit der nNOS kolokalisiert ist und die kompetitiven NOS-Inhibitoren N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und asymmetrisches N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) abbaut. Über die Hemmung der DDAH soll eine geringere, gewebspezifische Hemmung der NO-Synthase möglich sein, da angenommen wird, dass die ADMA- und NMMA-Konzentrationen nicht so weit ansteigen, dass die NOS-Hemmung 30 % überschreitet. Als besonders erfolgsversprechend gelten hier potente DDAH-1-Hemmstoffe ohne inhibierende Wirkung auf die NO-Synthase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verbindungen, die von Schade synthetisiert und von Kotthaus an der hDDAH-1 getestet wurden, auf Selektivität gegenüber der NOS mittels des

Oxyhämoglobin-Assays überprüft. Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen zeigten einige keine Selektivität gegenüber der NO-Synthase oder keine ausreichende inhibitorische Wirkung auf die DDAH-1. Ein aussichtsreicher Kandidat für die Arzneistoffentwicklung konnte jedoch mit *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG) gefunden werden. AbMEG wurde in Anlehnung an den derzeit potentesten bekannten DDAH-1-Hemmstoff mit hoher Selektivität gegenüber der NOS, L-257, entwickelt und besitzt keine Aminosäurestruktur durch fehlende α -Carboxylfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass AbMEG die DDAH-1 fast ebenso potent inhibiert wie L-257 und dabei die NOS-Aktivität nicht beeinflusst. Verglichen mit L-257 besitzt diese Verbindung durch das Fehlen der polaren Carboxylfunktion günstigere pharmakokinetische Eigenschaften. Über die Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von decVNIO (*N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin), einem Vinyl-NIO-Analogon ohne α -Carboxylfunktion, an der NOS konnte gezeigt werden, dass die Selektivität von AbMEG gegenüber der NOS jedoch weniger auf das Fehlen der Carboxylfunktion, sondern auf die Länge des Guanidin-Substituenten zurückzuführen ist, der mit vier Atomen zu lang ist. Mittels eines von Lunk entwickelten Modells der nNOS mit AbMEG im aktiven Zentrum konnte gezeigt werden, dass AbMEG bei der Bindung an die NOS in eine sterisch ungünstige Position gezwungen wird und durch die fehlende Carboxylfunktion drei Wasserstoffbrückenbindungen nicht eingehen kann. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse ermöglichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die den Weg für eine rationale Wirkstoffentwicklung ebnen. So führt eine Verlängerung des Alkylsubstituenten am Amidin der N^{δ} -(Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate bzw. Guanidin der L-Argininverbindungen zu einer Affinitätsverringerung zur NO-Synthase, erhöht dabei jedoch die inhibitorische Wirkung auf die hDDAH-1. Eine Seitenkette mit vier Atomen am Guanidin des L-Arginins wird von der NOS nicht mehr toleriert, während die DDAH-1 weiter gehemmt wird. Die Entwicklung eines erfolgsversprechenden Arzneistoffs erfordert eine deutlich erhöhte inhibitorische Wirksamkeit an der hDDAH-1. Dies könnte z.B. durch die Einführung von

π -Elektronen oder freien Elektronenpaaren realisiert werden, die anscheinend die Affinität zur DDAH erhöhen. Zur Erhaltung der Selektivität gegenüber der NOS sollten große Reste als Guanidin- bzw. Amidin-Substituenten eingeführt werden.

4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon (BDAP) wurde im Arbeitskreis Clement als wirksamer NO-Synthase-Inhibitor entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit fiel die mangelhafte Stabilität der Substanz in Medien mit einem pH-Wert über pH 4 auf. So konnten nach 24-stündiger Inkubation bei pH 7 nur noch 20 % der Ausgangskonzentration detektiert werden. Unter Zuhilfenahme massenspektrometrischer Methoden zur Identifizierung des entstandenen Zersetzungsproduktes konnten Anhaltspunkte für eine Dimerisierung der Verbindung unter Bildung einer quartären Ammoniumverbindung gewonnen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass zunächst eine Desaminierung von BDAP stattgefunden hat. Die dabei entstehende α,β -ungesättigte Carbonylverbindung stellt einen guten Michael-Akzeptor dar, an den sich weiteres unzersetztes BDAP addieren kann. Mittels chromatographischer Aufreinigung und anschließender Identifizierung über $^1\text{H-NMR}$ konnten der angenommene Zersetzungsweg bestätigt werden, indem das Zwischenprodukt, die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, eindeutig identifiziert werden konnte. Inwieweit darüber hinaus eine Dimerisierung im Fließmittel der HPLC unter aciden Bedingungen entsteht, die Bildung des Dimers ein reines Massenspektrometrie-Phänomen ist oder sich das Dimer auf der Chromatographie-Säule zersetzt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Bekannt ist jedoch, dass α,β -ungesättigte Ketone alkylierendes Potential besitzen und toxisch wirken, indem sie kovalent an biologisch wichtige Nukleophile binden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass die Verbindung für einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung pathologisch erhöhter NO-Konzentrationen -entgegen früherer Annahmen- nicht geeignet ist.

Aufgrund der mangelnden Stabilität von BDAP wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das um eine Methylengruppe verlängerte 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB) für weitere Untersuchungen

verwendet. Dieses wurde ebenfalls im Arbeitskreis Clement zur Hemmung der NO-Synthase entwickelt. Untersuchungen an der NO-Synthase mit Hilfe des Oxyhämoglobin-Assays konnten zeigen, dass BDAB selektiv die nNOS und eNOS inhibiert, jedoch nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf die iNOS besitzt. Um die Ursache für diese Selektivität und damit den Hemm-Mechanismus aufzuklären, wurden potentielle Angriffsorte von BDAB an der NOS untersucht. Ein Angriff am Häm der Oxygenase-Domäne und damit an das aktive Zentrum des Enzyms konnte mittels des Microperoxidase 8-Assays ausgeschlossen werden. Im Anschluss wurde ein Angriff des Inhibitors am Calmodulin, welches die Aktivität der nNOS und eNOS, nicht jedoch der iNOS reguliert, überprüft. Dazu wurde mittels der Reduktion künstlicher Elektronenakzeptoren sowie über den NADPH-Verbrauch der NOS die Reduktase-Aktivität der NO-Synthase bei Zugabe von BDAB untersucht. Die Ergebnisse aller Assays zeigten, dass die Reduktase-Aktivität der nNOS und eNOS durch BDAB reduziert wird, während die iNOS unbeeinflusst bleibt. Weiterhin wurde gezeigt, dass BDAB ein kompetitiver Hemmstoff an der nNOS und eNOS ist, da die inhibitorische Wirkung durch Zugabe von Calmodulin aufgehoben werden konnte. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen, die eine Beeinflussung des Elektronentransfers der Reduktasedomäne durch BDAB belegen, wurde auf einen Angriff am Calmodulin geschlossen. Zur Überprüfung dieser These wurde der Einfluss von BDAB auf die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins, einem weiteren Calmodulin-abhängigen Enzym, überprüft. Auch hier konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung des Enzyms beobachtet werden. Zur Detektion des direkten Effekts des Inhibitors auf Calmodulin, wurde Dansyl-Calmodulin hergestellt und Fluoreszenz-Emissionsspektren nach Zugabe von BDAB aufgenommen. Die konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 515 nm belegte die direkte Interaktion des Inhibitors mit Dansyl-Calmodulin. Die erhaltenen Resultate belegen, dass die Hemmung der NO-Synthase über einen Angriff von BDAB am Calmodulin hervorgerufen wird. Calmodulin als pharmakologisches Target ist aufgrund der Vielzahl an humanen Calmodulin-

abhängigen Enzymen und der damit fehlenden Selektivität problematisch. Es wurde beobachtet, dass Chemotherapeutika, die aufgrund einer Multi Drug Resistance von Krebszellen unwirksam sind, ihre Wirksamkeit durch gleichzeitige Gabe von Calmodulin-Inhibitoren zurückerlangen, da diese P-Glycoprotein und damit den aktiven Transport von Chemotherapeutika aus der Zelle hemmen. Bisher wurde für diese Indikation noch kein Arzneistoff zugelassen, da die bekannten Calmodulin-Inhibitoren eine hohe Toxizität aufweisen. Inwieweit BDAB zu einer Hemmung von P-Glycoprotein führt, ist eine interessante Frage und könnte in weiteren Arbeiten behandelt werden. Weiterhin wird eine Wirksamkeit Calmodulin-inhibierender Substanzen gegen Sporenbildung, Resistenz und Virulenz von Bakterien diskutiert. Auch hier bleibt zu klären, inwieweit BDAB diese Eigenschaften besitzt.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von 4'-(4-Bromphenyl)- ω -dimethylamino-butyrophenon (BDAB) zu dem Neuroleptikum Haloperidol stellte sich die Frage, inwieweit BDAB ebenfalls antipsychotisch wirksam ist. In Rezeptorbindungsstudien, die durch Hübner am Pharmazeutischen Institut der Universität in Erlangen durchgeführt wurden, wurde die Affinität der Verbindung zu dopaminergen, serotoninergen und adrenergen Rezeptoren bestimmt. BDAB zeigte dabei eine statistisch signifikante, selektive Hemmung des D_4 - und 5-HT_{1A} -Rezeptors. Eine Inhibierung des D_4 -Rezeptors ist erwünscht, da dieser mesolimbisch lokalisiert ist und eine Hemmung mit einer neuroleptischen Wirksamkeit ohne Auftreten von extrapyramidal-motorischen Störungen in Verbindung gebracht wird. Der Vergleich mit den K_i -Werten des Haloperidols zeigte jedoch darüber hinaus die deutlich niedrigere Affinität des BDAB zu den D_2 -, D_4 - und 5-HT_{2A} -Rezeptoren. Infolgedessen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Verbindungen, 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -(4-phenylpiperazinyl)-butyrophenon (BPPB) und 4'-(4''-Bromphenyl)- ω -[4-(*p*-chlorphenyl)-4-hydroxy-piperidinyl]butyrophenon (BCHB) erfolgreich synthetisiert, die durch einen zusätzlichen aromatischen Rest eine erhöhte Affinität zu den D_2 -, D_3 - und D_4 -Rezeptoren aufweisen sollten. BCHP besitzt außerdem eine Hydroxyl-Funktion, die mit dem D_2 -Rezeptor interagieren kann. Die Verbindungen zeigten eine hohe

Stabilität in Medien mit verschiedenen pH-Werten (pH 1 – pH 9). Bei den Rezeptorbindungsstudien von BPPB stellte sich heraus, dass die Affinität zum D₃- und D₄-Rezeptor durch die Einführung eines Phenylpiperazin-Restes tatsächlich signifikant ($p < 0,02$) gesteigert werden konnte. Die Verbindung zeigte eine selektive Hemmung der D₃- und D₄-Rezeptoren gegenüber dem D₁-, D_{2long}-, D_{2short}-, 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor, allerdings nicht gegenüber dem α_1 -Rezeptor, der im Vergleich zu BDAB stärker gehemmt wurde. Diese Selektivität ist einerseits positiv zu bewerten, da sowohl der D₁- als auch der 5-HT_{1A}-Rezeptor aufgrund der damit verbundenen Nebenwirkungen nicht gehemmt werden sollte. Andererseits ist die Affinität von BPPB am D₂-Rezeptor zu gering, um an einer neuroleptischen Wirksamkeit beteiligt zu sein und die Hemmung des 5-HT_{2A}-Rezeptors sollte aufgrund einer Erniedrigung des EPS-Risikos stärker ausfallen, wohingegen der α_1 -Rezeptor nicht beeinflusst werden sollte. Durch die Einführung eines 4-(*p*-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin-Restes konnte die Affinität zu den, für die neuroleptische Wirkung verantwortlichen D₂- und D₃-Rezeptoren signifikant gesenkt werden. Die Hemmung ist, verglichen mit Haloperidol, deutlich geringer, so dass die Gefahr des Auftretens von extrapyramidalmotorischen Störungen vermindert sein sollte. Der D₁-Rezeptor, 5-HT_{1A}-Rezeptor und α_1 -Rezeptor wird nicht gehemmt. Dieses ist im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen positiv zu bewerten. Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass durch einen Austausch der Dimethylamino-Gruppe durch Reste mit einem aromatischen Ring die Affinität zu D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren erhöht werden konnte. Das erhaltene Profil der Verbindungen ist bislang einzigartig und rechtfertigt, insbesondere aufgrund der fehlenden Kenntnis über die Ursache von Schizophrenie, weiterführende Untersuchungen.

8 Literaturverzeichnis

- Abu-Soud, H.M., Stuehr, D.J. 1993. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10769-72
- Adams, M.R., Jessup, W., Celermajer, D.S. 1997. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J Am Coll Cardiol* **29**:491-7
- Agid, O., Kapur, S., Remington, G. 2008. Emerging drugs for schizophrenia. *Expert Opin Emerg Drugs* **13**:479-95
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**:593-615
- Amsler, H.A., Teerenhovi, L., Barth, E., Harjula, K., Vuopio, P. 1977. Agranulocytosis in patients treated with clozapine. A study of the Finnish epidemic. *Acta Psychiatr Scand* **56**:241-8
- Andrew, P.J., Mayer, B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**:521-31
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:3203-7
- Aron, J., Baldwin, D.A., Marques, H.M., Pratt, J.M., Adams, P.A. 1986. Hemes and hemoproteins. 1: Preparation and analysis of the heme-containing octapeptide (microperoxidase-8) and identification of the monomeric form in aqueous solution. *J Inorg Biochem* **27**:227-43
- Arundine, M., Tymianski, M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**:325-37
- Ash, D.E. 2004. Structure and function of arginases. *J Nutr* **134**:2760S-2764S; discussion 2765S-2767S
- Ayajiki, K., Kindermann, M., Hecker, M., Fleming, I., Busse, R. 1996. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* **78**:750-8
- Babu, B.R., Frey, C., Griffith, O.W. 1999. L-arginine binding to nitric-oxide synthase. The role of H-bonds to the nonreactive guanidinium nitrogens. *J Biol Chem* **274**:25218-26

- Babu, B.R., Griffith, O.W. 1998. N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **273**:8882-9
- Babu, Y.S., Bugg, C.E., Cook, W.J. 1988. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **204**:191-204
- Baek, K.J., Thiel, B.A., Lucas, S., Stuehr, D.J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem* **268**:21120-9
- Bagnost, T., Berthelot, A., Bouhaddi, M., Laurant, P., Andre, C., Guillaume, Y., Demougeot, C. 2008. Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* **26**:1110-8
- Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W.W., Pimental, D., Malinski, T.A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C.J., Davidoff, A.J., Kelly, R.A., et al. 1994. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* **269**:27580-8
- Bedford, M.T., Clarke, S.G. 2009. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**:1-13
- Benesch, R.E., Benesch, R., Yung, S. 1973. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal Biochem* **55**:245-8
- Berkowitz, D.E., White, R., Li, D., Minhas, K.M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A.A., Nyhan, D., Champion, H.C., Hare, J.M. 2003. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* **108**:2000-6
- Bertini, I., Cavallaro, G., Rosato, A. 2006. Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem Rev* **106**:90-115
- Bettinetti, L., Schlotter, K., Hubner, H., Gmeiner, P. 2002. Interactive SAR studies: rational discovery of super-potent and highly selective dopamine D3 receptor antagonists and partial agonists. *J Med Chem* **45**:4594-7
- Biedermann, F., Fleischhacker, W.W. 2009. Antipsychotics in the early stage of development. *Curr Opin Psychiatry* **22**:326-30
- Bingham, C.O., 3rd. 2002. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl* **65**:3-9

- Bishara, D., Taylor, D. 2008. Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability. *Drugs* **68**:2269-92
- Bivalacqua, T.J., Hellstrom, W.J., Kadowitz, P.J., Champion, H.C. 2001. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* **283**:923-7
- Bluhm, U. 2004. Entwicklung von Aktivatoren und Inhibitoren der NO-Synthase. *Dissertation Kiel*
- Bluhm, U., Boucher, J.L., Buss, U., Clement, B., Friedrich, F., Girreser, U., Heber, D., Lam, T., Lepoivre, M., Rostaie-Gerylow, M., Wolschendorf, U. 2009. Synthesis and evaluation of pyrido[1,2-a]pyrimidines as inhibitors of nitric oxide synthases. *Eur J Med Chem* **44**:2877-87
- Blum, A., Hathaway, L., Mincemoyer, R., Schenke, W.H., Kirby, M., Csako, G., Waclawiw, M.A., Panza, J.A., Cannon, R.O., 3rd. 2000. Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* **101**:2160-4
- Bode-Boger, S.M., Scalera, F., Ignarro, L.J. 2007. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* **114**:295-306
- Boer, R., Ulrich, W.R., Klein, T., Mirau, B., Haas, S., Baur, I. 2000. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* **58**:1026-34
- Boger, R.H. 2008. L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**:55-61
- Boger, R.H., Bode-Boger, S.M., Kienke, S., Stan, A.C., Nafe, R., Frolich, J.C. 1998. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **136**:67-77
- Boger, R.H., Vallance, P., Cooke, J.P. 2003. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl* **4**:1-3
- Bohme, G.A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J.M., Doble, A., Blanchard, J.C. 1993. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9191-4
- Bostrom, J., Gundertoft, K., Liljeforsa, T. 2000. A pharmacophore model for dopamine D4 receptor antagonists. *J Comput Aided Mol Des* **14**:769-86

- Boucher, J.L., Custot, J., Vadon, S., Delaforge, M., Lepoivre, M., Tenu, J.P., Yapo, A., Mansuy, D. 1994. N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **203**:1614-21
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y., Mansuy, D. 1992. Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:880-6
- Boucher, J.L., Moali, C., Tenu, J.P. 1999. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* **55**:1015-28
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Snyder, S.H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**:714-8
- Bretscher, L.E., Li, H., Poulos, T.L., Griffith, O.W. 2003. Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N⁵-(iminoalkyl)- and N⁵-(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem* **278**:46789-97
- Brown, A.S. 2006. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* **32**:200-2
- Brown, A.S., Susser, E.S. 2008. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull* **34**:1054-63
- Buckley, P.F., Miller, B.J., Lehrer, D.S., Castle, D.J. 2009. Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull* **35**:383-402
- Buga, G.M., Singh, R., Pervin, S., Rogers, N.E., Schmitz, D.A., Jenkinson, C.P., Cederbaum, S.D., Ignarro, L.J. 1996. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* **271**:H1988-98
- Buß, U. 2005. Untersuchung von Pyrido[1,2-]pyrimidinen und strukturverwandten Verbindungen als Hemmstoffe der NO-Synthasen. *Dissertation Kiel*
- Butler, A.R., Glidewell, C., McGinnis, J., Bisset, W.I. 1987. Further investigations regarding the toxicity of sodium nitroprusside. *Clin Chem* **33**:490-2
- Cai, T., Xian, M., Wang, P.G. 2002. Electrochemical and peroxidase oxidation study of N'-hydroxyguanidine derivatives as NO donors. *Bioorg Med Chem Lett* **12**:1507-10

- Calver, A., Collier, J., Moncada, S., Vallance, P. 1992a. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* **10**:1025-31
- Calver, A., Collier, J., Vallance, P. 1992b. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* **90**:2548-54
- Clarkson, P., Adams, M.R., Powe, A.J., Donald, A.E., McCredie, R., Robinson, J., McCarthy, S.N., Keech, A., Celermajer, D.S., Deanfield, J.E. 1996. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* **97**:1989-94
- Clement, B., Demesmaeker, M., Linne, S. 1996. Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* **9**:682-8
- Clement, B., Kunze, T., Heberling, S. 2006. Reduction of Nomega-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:869-73
- Clement, B., Lomb, R., Moller, W. 1997. Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **272**:19615-20
- Clement, B., Lopian, K. 2003. Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* **31**:645-51
- Clement, B., Mau, S., Deters, S., Havemeyer, A. 2005. Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2s)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **33**:1740-7
- Coleman, J.W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* **1**:1397-406
- Cortizo, L., Santana, L., Ravina, E., Orallo, F., Fontenla, J.A., Castro, E., Calleja, J.M., de Ceballos, M.L. 1991. Synthesis and antidopaminergic activity of some 3-(aminomethyl)tetralones as analogues of butyrophenone. *J Med Chem* **34**:2242-7
- Costa, C., Virag, R. 2009. The endothelial-erectile dysfunction connection: an essential update. *J Sex Med* **6**:2390-404

- Craig, D.H., Chapman, S.K., Daff, S. 2002. Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *J Biol Chem* **277**:33987-94
- Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A. 1998. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **279**:2121-6
- Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H. 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* **192**:481-3
- Daghigh, F., Fukuto, J.M., Ash, D.E. 1994. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **202**:174-80
- Daiber, A., Wenzel, P., Oelze, M., Munzel, T. 2008. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol* **97**:12-20
- Daniel, D.G., Goldberg, T.E., Gibbons, R.D., Weinberger, D.R. 1991. Lack of a bimodal distribution of ventricular size in schizophrenia: a Gaussian mixture analysis of 1056 cases and controls. *Biol Psychiatry* **30**:887-903
- David, A.S., Prince, M. 2005. Psychosis following head injury: a critical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76 Suppl 1**:i53-60
- Davies, G., Welham, J., Chant, D., Torrey, E.F., McGrath, J. 2003. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* **29**:587-93
- Davioud-Charvet, E., McLeish, M.J., Veine, D.M., Giegel, D., Arscott, L.D., Andricopulo, A.D., Becker, K., Muller, S., Schirmer, R.H., Williams, C.H., Jr., Kenyon, G.L. 2003. Mechanism-based inactivation of thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich bases. Implication for cytotoxicity. *Biochemistry* **42**:13319-30
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., Davidson, M. 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* **148**:1474-86
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., Murad, F. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:203-36
- Dawson, V.L., Dawson, T.M. 1998. Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res* **118**:215-29

- De Gennaro Colonna, V., Bianchi, M., Pascale, V., Ferrario, P., Morelli, F., Pascale, W., Tomasoni, L., Turiel, M. 2009. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit* **15**:RA91-101
- de la Torre, J.C., Stefano, G.B. 2000. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res Brain Res Rev* **34**:119-36
- Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Berthelot, A. 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **23**:971-8
- Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Salerno, L., Cardile, V., Guerrera, F., Siracusa, M.A., Avitabile, M., Vanella, A. 2003. Novel inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:486-90
- Dijols, S., Boucher, J.L., Lepoivre, M., Lefevre-Groboillot, D., Moreau, M., Frapart, Y., Rekka, E., Meade, A.L., Stuehr, D.J., Mansuy, D. 2002. First non-alpha-amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* **41**:9286-92
- Dijols, S., Perollier, C., Lefevre-Groboillot, D., Pethe, S., Attias, R., Boucher, J.L., Stuehr, D.J., Mansuy, D. 2001. Oxidation of N(omega)-hydroxyarginine analogues by NO-synthase: the simple, non amino acid N-butyl N'-hydroxyguanidine is almost as efficient an NO precursor as N(omega)-hydroxyarginine. *J Med Chem* **44**:3199-202
- Dimmock, J.R., Vashishtha, S.C., Quail, J.W., Pugazhenti, U., Zimpel, Z., Sudom, A.M., Allen, T.M., Kao, G.Y., Balzarini, J., De Clercq, E. 1998. 4-(beta-Arylvinyl)-3-(beta-arylvinyloxy)-1-ethyl-4-piperidinols and related compounds: a novel class of cytotoxic and anticancer agents. *J Med Chem* **41**:4012-20
- Dinerman, J.L., Dawson, T.M., Schell, M.J., Snowman, A., Snyder, S.H. 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4214-8
- Durante, W., Johnson, F.K., Johnson, R.A. 2007. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**:906-11
- Elfering, S.L., Sarkela, T.M., Giulivi, C. 2002. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **277**:38079-86
- Eliasson, M.J., Huang, Z., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M.E., Snyder, S.H., Moskowitz, M.A. 1999. Neuronal nitric oxide synthase activation and

- peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* **19**:5910-8
- Estabrook, R.W., Werringloer, J. 1978. The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* **52**:212-20
- Faraci, W.S., Nagel, A.A., Verdries, K.A., Vincent, L.A., Xu, H., Nichols, L.E., Labasi, J.M., Salter, E.D., Pettipher, E.R. 1996. 2-Amino-4-methylpyridine as a potent inhibitor of inducible NO synthase activity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **119**:1101-8
- Farde, L., Nordstrom, A.L., Wiesel, F.A., Pauli, S., Halldin, C., Sedvall, G. 1992. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* **49**:538-44
- Fedorov, R., Hartmann, E., Ghosh, D.K., Schlichting, I. 2003. Structural basis for the specificity of the nitric-oxide synthase inhibitors W1400 and Nomega-propyl-L-Arg for the inducible and neuronal isoforms. *J Biol Chem* **278**:45818-25
- Feelisch, M. 1988. Experimentelle Untersuchungen zum intrazellulären Wirkungsmechanismus der Nitrovasodilatoren und der endothelabhängigen Gefäßregulation. *Dissertation Düsseldorf*
- Feelisch, M., Noack, E.A. 1987. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* **139**:19-30
- Feng, C., Tollin, G. 2009. Regulation of interdomain electron transfer in the NOS output state for NO production. *Dalton Trans*:6692-700
- Feng, C., Tollin, G., Holliday, M.A., Thomas, C., Salerno, J.C., Enemark, J.H., Ghosh, D.K. 2006. Intraprotein electron transfer in a two-domain construct of neuronal nitric oxide synthase: the output state in nitric oxide formation. *Biochemistry* **45**:6354-62
- Finocchietto, P.V., Franco, M.C., Holod, S., Gonzalez, A.S., Converso, D.P., Arciuch, V.G., Serra, M.P., Poderoso, J.J., Carreras, M.C. 2009. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**:1020-8
- Fischmann, T.O., Hruza, A., Niu, X.D., Fossetta, J.D., Lunn, C.A., Dolphin, E., Prongay, A.J., Reichert, P., Lundell, D.J., Narula, S.K., Weber, P.C. 1999. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* **6**:233-42

- Frey, D., Braun, O., Briand, C., Vasak, M., Grutter, M.G. 2006. Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure* **14**:901-11
- Friedrich, F. 2007. Synthese von Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitoren. *Dissertation Kiel*
- Fukuto, J.M. 1996. Chemistry of N-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol* **268**:365-75
- Fukuto, J.M., Stuehr, D.J., Feldman, P.L., Bova, M.P., Wong, P. 1993. Peracid oxidation of an N-hydroxyguanidine compound: a chemical model for the oxidation of N omega-hydroxyl-L-arginine by nitric oxide synthase. *J Med Chem* **36**:2666-70
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-6
- Garcin, E.D., Bruns, C.M., Lloyd, S.J., Hosfield, D.J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D.J., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. 2004. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **279**:37918-27
- Gatto, E.M., Riobo, N.A., Carreras, M.C., Chernavsky, A., Rubio, A., Satz, M.L., Poderoso, J.J. 2000. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* **4**:534-9
- Geddes, J.R., Lawrie, S.M. 1995. Obstetric complications and schizophrenia: a meta-analysis. *Br J Psychiatry* **167**:786-93
- Gori, T., Parker, J.D. 2002. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. *Circulation* **106**:2510-3
- Grace, A.A. 1991. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* **41**:1-24
- Grant, S.K., Green, B.G., Stiffey-Wilusz, J., Durette, P.L., Shah, S.K., Kozarich, J.W. 1998. Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry* **37**:4174-80
- Greenough, A. 2000. Inhaled nitric oxide in the neonatal period. *Expert Opin Investig Drugs* **9**:1601-9
- Griffith, O.W., Kilbourn, R.G. 1997. Design of nitric oxide synthase inhibitors and their use to reverse hypotension associated with cancer immunotherapy. *Adv Enzyme Regul* **37**:171-94
- Griffith, O.W., Stuehr, D.J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**:707-36

- Griffiths, M.J., Evans, T.W. 2005. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med* **353**:2683-95
- Grisham, M.B., Granger, D.N. 1989. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med* **10**:71-81
- Gross, G. 1997. The onset of schizophrenia. *Schizophr Res* **28**:187-98
- Gross, S.S., Jaffe, E.A., Levi, R., Kilbourn, R.G. 1991. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **178**:823-9
- Grossi, L., D'Angelo, S. 2005. Sodium nitroprusside: mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. *J Med Chem* **48**:2622-6
- Gruenewald, S., Wahl, B., Bittner, F., Hungeling, H., Kanzow, S., Kotthaus, J., Schwering, U., Mendel, R.R., Clement, B. 2008. The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem* **51**:8173-7
- Guillin, O., Abi-Dargham, A., Laruelle, M. 2007. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* **78**:1-39
- Gul, H.I., Gul, M., Erciyas, E. 2002. Syntheses and stability studies of some Mannich bases of acetophenones and evaluation of their cytotoxicity against Jurkat cells. *Arzneimittelforschung* **52**:628-35
- Gurevich, E.V., Joyce, J.N. 1999. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* **20**:60-80
- Gusarov, I., Nudler, E. 2005. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13855-60
- Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., Nudler, E. 2009. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**:1380-4
- Hafner, H., an der Heiden, W., Behrens, S., Gattaz, W.F., Hambrecht, M., Loffler, W., Maurer, K., Munk-Jorgensen, P., Nowotny, B., Riecher-Rossler, A., Stein, A. 1998. Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophr Bull* **24**:99-113
- Hallinan, E.A., Hagen, T.J., Bergmanis, A., Moore, W.M., Jerome, G.M., Spangler, D.P., Stevens, A.M., Shieh, H.S., Manning, P.T., Pitzele, B.S. 2004. 5-Fluorinated L-

- lysine analogues as selective induced nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* **47**:900-6
- Harrison, D.G. 1997. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**:2153-7
- Hartzoulakis, B., Rossiter, S., Gill, H., O'Hara, B., Steinke, E., Gane, P.J., Hurtado-Guerrero, R., Leiper, J.M., Vallance, P., Rust, J.M., Selwood, D.L. 2007. Discovery of inhibitors of the penten superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:3953-6
- Havemeyer, A. 2006. Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems. *Dissertation Kiel*
- Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R., Kunze, T., Clement, B. 2006. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **281**:34796-802
- Hecker, M., Mulsch, A., Busse, R. 1994. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* **62**:1524-9
- Hecker, M., Schott, C., Bucher, B., Busse, R., Stoclet, J.C. 1995. Increase in serum NG-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* **275**:R1-3
- Hevel, J.M., Marletta, M.A. 1994. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* **233**:250-8
- Hibbs, J.B., Jr., Vavrin, Z., Taintor, R.R. 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* **138**:550-65
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., Kihara, Y. 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* **73**:411-8
- Hobbs, A.J., Higgs, A., Moncada, S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:191-220
- Holowatz, L.A., Kenney, W.L. 2007. Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive humans. *J Physiol* **581**:863-72
- Hong, I.S., Kim, Y.K., Choi, W.S., Seo, D.W., Yoon, J.W., Han, J.W., Lee, H.Y., Lee, H.W. 2003. Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **222**:177-82

- Horacek, J. 2000. Novel antipsychotics and extrapyramidal side effects. Theory and reality. *Pharmacopsychiatry* **33 Suppl 1**:34-42
- Huang, S., Carlson, G.M., Cheung, W.Y. 1994. Calmodulin-dependent enzymes undergo a protein-induced conformational change that is associated with their interactions with calmodulin. *J Biol Chem* **269**:7631-8
- Igarashi, J., Li, H., Jamal, J., Ji, H., Fang, J., Lawton, G.R., Silverman, R.B., Poulos, T.L. 2009. Crystal structures of constitutive nitric oxide synthases in complex with de novo designed inhibitors. *J Med Chem* **52**:2060-6
- Ignarro, L.J. 1996. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* **55**:S2-5
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C. 1999. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**:879-86
- Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., Kadowitz, P.J. 1986. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* **237**:893-900
- Jacobi, J., Sydow, K., von Degenfeld, G., Zhang, Y., Dayoub, H., Wang, B., Patterson, A.J., Kimoto, M., Blau, H.M., Cooke, J.P. 2005. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* **111**:1431-8
- Jia, Q., Cai, T., Huang, M., Li, H., Xian, M., Poulos, T.L., Wang, P.G. 2003. Isoform-selective substrates of nitric oxide synthase. *J Med Chem* **46**:2271-4
- Johnson, F.K., Johnson, R.A., Peyton, K.J., Durante, W. 2005. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**:R1057-62
- Johnson, J.D., Wittenauer, L.A. 1983. A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands. *Biochem J* **211**:473-9
- Jomphe, C., Tiberi, M., Trudeau, L.E. 2006. Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* **50**:595-605
- Jones, R.J., Smith, S.M., Gao, Y.T., DeMay, B.S., Mann, K.J., Salerno, K.M., Salerno, J.C. 2004. The function of the small insertion in the hinge subdomain in the control of constitutive mammalian nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* **279**:36876-83
- Joyce, J.N., Millan, M.J. 2005. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today* **10**:917-25

- Kane, J.M., Cooper, T.B., Sachar, E.J., Halpern, F.S., Bailine, S. 1981. Clozapine: plasma levels and prolactin response. *Psychopharmacology (Berl)* **73**:184-7
- Karhan, W. 2002. Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. *Dissertation Kiel*
- Katsuki, S., Arnold, W.P., Murad, F. 1977. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* **3**:239-47
- Kebabian, J.W., Calne, D.B. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**:93-6
- Kelm, M. 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* **1411**:273-89
- Kelm, M., Dahmann, R., Wink, D., Feelisch, M. 1997. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction. *J Biol Chem* **272**:9922-32
- Kim, D.H., Maneen, M.J., Stahl, S.M. 2009. Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia. *Neurotherapeutics* **6**:78-85
- Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B. 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* **20**:379-82
- Kincaid, R.L., Vaughan, M., Osborne, J.C., Jr., Tkachuk, V.A. 1982. Ca²⁺-dependent interaction of 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl-calmodulin with cyclic nucleotide phosphodiesterase, calcineurin, and troponin I. *J Biol Chem* **257**:10638-43
- Klatt, P., Schmidt, K., Uray, G., Mayer, B. 1993. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J Biol Chem* **268**:14781-7
- Klumpp, S., Schultz, J. 1985. [Calcium and calmodulin]. *Pharm Unserer Zeit* **14**:19-26
- Knipp, M. 2006. How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. *ChemBiochem* **7**:879-89
- Konick, L.C., Friedman, L. 2001. Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **49**:28-38

- Kotthaus, J. 2008. Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems. *Dissertation Kiel*
- Kotthaus, J., Schade, D., Muschick, N., Beitz, E., Clement, B. 2008. Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads. *Bioorg Med Chem* **16**:10205-9
- Kretschmar, E., Laban, G., Meisel, P., Lohmann, D., Kirsten, W. 1985. Preparation of 1-[γ -(4-φλυοροβενζοψλ)-προπψλ]-4-(chlorophenyl)-4-piperidinol. *Patent DD 240202*
- Kropf, P., Fuentes, J.M., Fahnrich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M., Muller, I. 2005. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *Faseb J* **19**:1000-2
- Kurland, A.A. 1955. Chlorpromazine in the treatment of schizophrenia; a study of 75 cases. *J Nerv Ment Dis* **121**:321-9
- Larfars, G., Gyllenhammar, H. 1995. Measurement of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. A real-time, continuous assay of nitric oxide release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods* **184**:53-62
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Gil, R., D'Souza, C.D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Krystal, J.H., Charney, D.S., Innis, R.B. 1996. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9235-40
- Lawrie, S.M., Abukmeil, S.S. 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* **172**:110-20
- Leclerc, E., Corti, C., Schmid, H., Vetter, S., James, P., Carafoli, E. 1999. Serine/threonine phosphorylation of calmodulin modulates its interaction with the binding domains of target enzymes. *Biochem J* **344 Pt 2**:403-11
- Lefevre-Groboillot, D., Dijols, S., Boucher, J.L., Mahy, J.P., Ricoux, R., Desbois, A., Zimmermann, J.L., Mansuy, D. 2001. N-hydroxyguanidines as new heme ligands: UV-visible, EPR, and resonance Raman studies of the interaction of various compounds bearing a C=NOH function with microperoxidase-8. *Biochemistry* **40**:9909-17

- Leiper, J., Murray-Rust, J., McDonald, N., Vallance, P. 2002. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13527-32
- Leiper, J., Nandi, M., Torondel, B., Murray-Rust, J., Malaki, M., O'Hara, B., Rossiter, S., Anthony, S., Madhani, M., Selwood, D., Smith, C., Wojciak-Stothard, B., Rudiger, A., Stidwill, R., McDonald, N.Q., Vallance, P. 2007. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* **13**:198-203
- Leiper, J.M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R.J., Charles, I.G., Whitley, G.S., Vallance, P. 1999. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* **343 Pt 1**:209-14
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., Davis, J.M. 2009. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* **373**:31-41
- Li, H., Poulos, T.L. 2005. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* **99**:293-305
- Li, H., Raman, C.S., Glaser, C.B., Blasko, E., Young, T.A., Parkinson, J.F., Whitlow, M., Poulos, T.L. 1999. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **274**:21276-84
- Li, H., Shimizu, H., Flinspach, M., Jamal, J., Yang, W., Xian, M., Cai, T., Wen, E.Z., Jia, Q., Wang, P.G., Poulos, T.L. 2002. The novel binding mode of N-alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis. *Biochemistry* **41**:13868-75
- List, B.M., Klosch, B., Volker, C., Gorren, A.C., Sessa, W.C., Werner, E.R., Kukovetz, W.R., Schmidt, K., Mayer, B. 1997. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J* **323 (Pt 1)**:159-65
- Lombardi, A., Nastri, F., Pavone, V. 2001. Peptide-based heme-protein models. *Chem Rev* **101**:3165-89
- Low, S.Y. 2005. Application of pharmaceuticals to nitric oxide. *Mol Aspects Med* **26**:97-138

- Lucotti, P., Monti, L., Setola, E., La Canna, G., Castiglioni, A., Rossodivita, A., Pala, M.G., Formica, F., Paolini, G., Catapano, A.L., Bosi, E., Alfieri, O., Piatti, P. 2009. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. *Metabolism*
- Lucotti, P., Setola, E., Monti, L.D., Galluccio, E., Costa, S., Sandoli, E.P., Fermo, I., Rabaiotti, G., Gatti, R., Piatti, P. 2006. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**:E906-12
- Ludmer, P.L., Selwyn, A.P., Shook, T.L., Wayne, R.R., Mudge, G.H., Alexander, R.W., Ganz, P. 1986. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **315**:1046-51
- Luth, H.J., Holzer, M., Gartner, U., Staufenbiel, M., Arendt, T. 2001. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res* **913**:57-67
- MacAllister, R.J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., Russell, R.J., Hodson, H., Whitley, G.S., Vallance, P. 1996. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* **119**:1533-40
- Mansuy, D., Boucher, J.L. 2004. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* **37**:1105-21
- Marletta, M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**:12231-4
- Martasek, P., Miller, R.T., Roman, L.J., Shea, T., Masters, B.S. 1999. Assay of isoforms of Escherichia coli-expressed nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* **301**:70-8
- Matarredona, E.R., Murillo-Carretero, M., Moreno-Lopez, B., Estrada, C. 2005. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* **49**:355-66
- Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., Tasaki, Y., Yamaguchi, T. 1995. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **29**:157-62
- Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., Bohme, E. 1991. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett* **288**:187-91

- McDermott, J.R. 1976. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* **154**:179-84
- McDonald, K.K., Zharikov, S., Block, E.R., Kilberg, M.S. 1997. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* **272**:31213-6
- McLean, S.L., Idris, N.F., Woolley, M.L., Neill, J.C. 2009. D(1)-like receptor activation improves PCP-induced cognitive deficits in animal models: Implications for mechanisms of improved cognitive function in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**:440-50
- McMillan, K., Adler, M., Auld, D.S., Baldwin, J.J., Blasko, E., Browne, L.J., Chelsky, D., Davey, D., Dolle, R.E., Eagen, K.A., Erickson, S., Feldman, R.I., Glaser, C.B., Mallari, C., Morrissey, M.M., Ohlmeyer, M.H., Pan, G., Parkinson, J.F., Phillips, G.B., Polokoff, M.A., Sigal, N.H., Vergona, R., Whitlow, M., Young, T.A., Devlin, J.J. 2000. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1506-11
- Meador, W.E., Means, A.R., Quioco, F.A. 1992. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* **257**:1251-5
- Melisi, D., Secondo, A., Montoro, P., Piacente, S., Rimoli, M.G., Minale, M., de Caprariis, P., Annunziato, L. 2006. Galactosyl derivatives of L-arginine and D-arginine: synthesis, stability, cell permeation, and nitric oxide production in pituitary GH3 cells. *J Med Chem* **49**:4826-33
- Miller, M.R., Borthwick, S.J., Shaw, C.A., McLean, S.G., McClure, D., Mills, N.L., Duffin, R., Donaldson, K., Megson, I.L., Hadoke, P.W., Newby, D.E. 2009. Direct impairment of vascular function by diesel exhaust particulate through reduced bioavailability of endothelium-derived nitric oxide induced by superoxide free radicals. *Environ Health Perspect* **117**:611-6
- Miller, M.R., Megson, I.L. 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* **151**:305-21
- Moali, C., Brollo, M., Custot, J., Sari, M.A., Boucher, J.L., Stuehr, D.J., Mansuy, D. 2000. Recognition of alpha-amino acids bearing various C=NOH functions by nitric oxide synthase and arginase involves very different structural determinants. *Biochemistry* **39**:8208-18
- Mohtar, M., Johari, S.A., Li, A.R., Isa, M.M., Mustafa, S., Ali, A.M., Basri, D.F. 2009. Inhibitory and resistance-modifying potential of plant-based alkaloids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Microbiol* **59**:181-6

- Mollica, J.A., Smith, J.B., Nunes, I.M., Govan, H.K. 1970. Kinetics of the decomposition of a Mannich base. *J Pharm Sci* **59**:1770-4
- Molnar, J., Hever, A., Fakla, I., Fischer, J., Ocsovski, I., Aszalos, A. 1997. Inhibition of the transport function of membrane proteins by some substituted phenothiazines in E. coli and multidrug resistant tumor cells. *Anticancer Res* **17**:481-6
- Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R. 1997. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* **49**:137-42
- Morgan, C., Fisher, H. 2007. Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review. *Schizophr Bull* **33**:3-10
- Morris, S.M., Jr. 2006. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* **83**:508S-512S
- Morris, S.M., Jr. 2009. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* **157**:922-30
- Murad, F. 1999. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* **19**:133-54
- Murphy, M.E., Noack, E. 1994. Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* **233**:240-50
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* **6**:3051-64
- Neeb, L., Reuter, U. 2007. Nitric oxide in migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6**:258-64
- Nelin, L.D., Chicoine, L.G., Reber, K.M., English, B.K., Young, T.L., Liu, Y. 2005. Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**:394-401
- Newton, D.C., Montgomery, H.J., Guillemette, J.G. 1998. The reductase domain of the human inducible nitric oxide synthase is fully active in the absence of bound calmodulin. *Arch Biochem Biophys* **359**:249-57
- Nishikawa, M., Kanamori, M., Hidaka, H. 1982. Inhibition of platelet aggregation and stimulation of guanylate cyclase by an antianginal agent molsidomine and its metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* **220**:183-90
- Nishino, Y., Yamamoto, K., Kimura, S., Kikuchi, A., Shiro, Y., Iyanagi, T. 2007. Mechanistic studies on the intramolecular one-electron transfer between the two flavins in the human endothelial NOS reductase domain. *Arch Biochem Biophys* **465**:254-65

- Ogawa, T., Kimoto, M., Sasaoka, K. 1989. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* **264**:10205-9
- Olesen, J. 2008. The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol Ther* **120**:157-71
- Omura, T., Sato, R. 1964. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* **239**:2379-85
- Onek, L.A., Smith, R.J. 1992. Calmodulin and calcium mediated regulation in prokaryotes. *J Gen Microbiol* **138**:1039-49
- Ozuyaman, B., Grau, M., Kelm, M., Merx, M.W., Kleinbongard, P. 2008. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* **14**:314-22
- Pallen, C.J., Wang, J.H. 1983. Calmodulin-stimulated dephosphorylation of p-nitrophenyl phosphate and free phosphotyrosine by calcineurin. *J Biol Chem* **258**:8550-3
- Pallen, C.J., Wang, J.H. 1984. Regulation of calcineurin by metal ions. Mechanism of activation by Ni²⁺ and an enhanced response to Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* **259**:6134-41
- Panda, K., Adak, S., Konas, D., Sharma, M., Stuehr, D.J. 2004. A conserved aspartate (Asp-1393) regulates NADPH reduction of neuronal nitric-oxide synthase: implications for catalysis. *J Biol Chem* **279**:18323-33
- Panda, K., Ghosh, S., Stuehr, D.J. 2001. Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer. *J Biol Chem* **276**:23349-56
- Peacock, L., Solgaard, T., Lublin, H., Gerlach, J. 1996. Clozapine versus typical antipsychotics. A retro- and prospective study of extrapyramidal side effects. *Psychopharmacology (Berl)* **124**:188-96
- Portoghese, P.S., Kedziora, G.S., Larson, D.L., Bernard, B.K., Hall, R.L. 1989. Reactivity of glutathione with alpha, beta-unsaturated ketone flavouring substances. *Food Chem Toxicol* **27**:773-6
- Poulter, N. 1999. Coronary heart disease is a multifactorial disease. *Am J Hypertens* **12**:92S-95S
- Raman, C.S., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B.S., Poulos, T.L. 1998. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **95**:939-50

- Rameau, G.A., Chiu, L.Y., Ziff, E.B. 2004. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **279**:14307-14
- Reif, A., Frohlich, L.G., Kotsonis, P., Frey, A., Bommel, H.M., Wink, D.A., Pfeleiderer, W., Schmidt, H.H. 1999. Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. *J Biol Chem* **274**:24921-9
- Renodon-Corniere, A., Dijols, S., Perollier, C., Lefevre-Groboillot, D., Boucher, J.L., Attias, R., Sari, M.A., Stuehr, D., Mansuy, D. 2002. N-Aryl N'-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure-activity relationship. *J Med Chem* **45**:944-54
- Reynolds, G.P. 2004. Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol* **18**:340-5
- Rickard, N.S., Gibbs, M.E. 2003. Effects of nitric oxide inhibition on avoidance learning in the chick are lateralized and localized. *Neurobiol Learn Mem* **79**:252-6
- Robert, J., Jarry, C. 2003. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* **46**:4805-17
- Roman, L.J., Martasek, P., Masters, B.S. 2002. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem Rev* **102**:1179-90
- Roman, L.J., Martasek, P., Miller, R.T., Harris, D.E., de La Garza, M.A., Shea, T.M., Kim, J.J., Masters, B.S. 2000. The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *J Biol Chem* **275**:29225-32
- Roman, L.J., Masters, B.S. 2006. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. *J Biol Chem* **281**:23111-8
- Romero, M.J., Platt, D.H., Tawfik, H.E., Labazi, M., El-Remessy, A.B., Bartoli, M., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W. 2008. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* **102**:95-102
- Rossiter, S., Smith, C.L., Malaki, M., Nandi, M., Gill, H., Leiper, J.M., Vallance, P., Selwood, D.L. 2005. Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem* **48**:4670-8
- Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroeze, W.K. 2004. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* **3**:353-9

- Roth, B.L., Tandra, S., Burgess, L.H., Sibley, D.R., Meltzer, H.Y. 1995. D4 dopamine receptor binding affinity does not distinguish between typical and atypical antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* **120**:365-8
- Rothe, F., Langnaese, K., Wolf, G. 2005. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study. *Nitric Oxide* **13**:21-35
- Roufogalis, B.D., Minocherhomjee, A.M., Al-Jobore, A. 1983. Pharmacological antagonism of calmodulin. *Can J Biochem Cell Biol* **61**:927-33
- Rowley, M., Bristow, L.J., Hutson, P.H. 2001. Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia. *J Med Chem* **44**:477-501
- Rubanyi, G.M., Lorenz, R.R., Vanhoutte, P.M. 1985. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol* **249**:H95-101
- Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M. 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**:H822-7
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* **269**:26066-75
- Ryoo, S., Lemmon, C.A., Soucy, K.G., Gupta, G., White, A.R., Nyhan, D., Shoukas, A., Romer, L.H., Berkowitz, D.E. 2006. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res* **99**:951-60
- Sage, P.R., de la Lande, I.S., Stafford, I., Bennett, C.L., Phillipov, G., Stubberfield, J., Horowitz, J.D. 2000. Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion. *Circulation* **102**:2810-5
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med* **2**:e141
- Saify, Z.S., Mushtaq, N., Khan, K.M., Perveen, S., Shah, S.T., Abdel-Jalil, R.J., Fecker, M., Voelter, W. 2005. Synthesis and pharmacological activity of 4-(4'-(chlorophenyl)-4-hydroxypiperidine) derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **53**:64-6
- Sakai, Y., Masuda, H., Kihara, K., Kurosaki, E., Yamauchi, Y., Azuma, H. 2004. Involvement of increased arginase activity in impaired cavernous relaxation with aging in the rabbit. *J Urol* **172**:369-73

- Salerno, L., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Romeo, G., Siracusa, M.A. 2002. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* **8**:177-200
- Sasaki, A., Doi, S., Mizutani, S., Azuma, H. 2007. Roles of accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, and attenuated nitric oxide synthase activity in endothelial cells for pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**:L1480-7
- Schade, D. 2008. Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine. . *Dissertation Kiel*
- Schnorr, O., Brossette, T., Momma, T.Y., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Schroeter, H., Sies, H. 2008. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys* **476**:211-5
- Schulman, S.P., Becker, L.C., Kass, D.A., Champion, H.C., Terrin, M.L., Forman, S., Ernst, K.V., Kelemen, M.D., Townsend, S.N., Capriotti, A., Hare, J.M., Gerstenblith, G. 2006. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *Jama* **295**:58-64
- Schwarz, P.M., Kleinert, H., Forstermann, U. 1999. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:2584-90
- Scott-Burden, T. 1999. Nitric oxide leads to prized NObility: background to the work of Ferid Murad. *Tex Heart Inst J* **26**:1-5
- Sehested, M., Jensen, P.B., Skovsgaard, T., Bindslev, N., Demant, E.J., Friche, E., Vindelov, L. 1989. Inhibition of vincristine binding to plasma membrane vesicles from daunorubicin-resistant Ehrlich ascites cells by multidrug resistance modulators. *Br J Cancer* **60**:809-14
- Semple, D.M., McIntosh, A.M., Lawrie, S.M. 2005. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol* **19**:187-94
- Shatalin, K., Gusarov, I., Avetisova, E., Shatalina, Y., McQuade, L.E., Lippard, S.J., Nudler, E. 2008. Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:1009-13
- Sheta, E.A., McMillan, K., Masters, B.S. 1994. Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**:15147-53
- Siddhanta, U., Presta, A., Fan, B., Wolan, D., Rousseau, D.L., Stuehr, D.J. 1998. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between

- flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem* **273**:18950-8
- Sikazwe, D.M., Li, S., Mardenborough, L., Cody, V., Roth, B.L., Ablordeppey, S.Y. 2004. Haloperidol: towards further understanding of the structural contributions of its pharmacophoric elements at D2-like receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **14**:5739-42
- Simplicio, A.L., Clancy, J.M., Gilmer, J.F. 2008. Prodrugs for amines. *Molecules* **13**:519-47
- Singh, J.P. 2007. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis. *Curr Opin Investig Drugs* **8**:736-41
- Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S., Chaudhuri, G. 2000. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res* **60**:3305-12
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85
- Song, Y., Zweier, J.L., Xia, Y. 2001. Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding. *Biochem J* **355**:357-60
- SoRelle, R. 1998. Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation* **98**:2365-6
- Spratt, D.E., Taiakina, V., Guillemette, J.G. 2007. Calcium-deficient calmodulin binding and activation of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1774**:1351-8
- Stockmeier, C.A., DiCarlo, J.J., Zhang, Y., Thompson, P., Meltzer, H.Y. 1993. Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of serotonin₂ and dopamine₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:1374-84
- Strange, P.G. 2008. Antipsychotic drug action: antagonism, inverse agonism or partial agonism. *Trends Pharmacol Sci* **29**:314-21
- Stuehr, D.J. 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:339-59

- Stuehr, D.J., Griffith, O.W. 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **65**:287-346
- Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L., Wiseman, J. 1991. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **266**:6259-63
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A. 1987. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* **47**:5590-4
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**:662-80
- Taha, H.M., Schmidt, J., Gottle, M., Suryanarayana, S., Shen, Y., Tang, W.J., Gille, A., Geduhn, J., Konig, B., Dove, S., Seifert, R. 2009. Molecular analysis of the interaction of anthrax adenyl cyclase toxin, edema factor, with 2'(3')-O-(N-(methyl)anthraniloyl)-substituted purine and pyrimidine nucleotides. *Mol Pharmacol* **75**:693-703
- Tandon, R., Keshavan, M.S., Nasrallah, H.A. 2008. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* **102**:1-18
- Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S. 2009. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* **110**:1-23
- Thorns, V., Hansen, L., Masliah, E. 1998. nNOS expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **150**:14-20
- Tierney, D.L., Huang, H., Martasek, P., Masters, B.S., Silverman, R.B., Hoffman, B.M. 1999. ENDOR spectroscopic evidence for the position and structure of NG-hydroxy-L-arginine bound to holo-neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* **38**:3704-10
- Tiso, M., Tejero, J., Panda, K., Aulak, K.S., Stuehr, D.J. 2007. Versatile regulation of neuronal nitric oxide synthase by specific regions of its C-terminal tail. *Biochemistry* **46**:14418-28
- Tran, C.T., Fox, M.F., Vallance, P., Leiper, J.M. 2000. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* **68**:101-5
- Tran, C.T., Leiper, J.M., Vallance, P. 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* **4**:33-40

- Traxler, P., Trinks, U., Buchdunger, E., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Regenass, U., Rosel, J., Lydon, N. 1995. [(Alkylamino)methyl]acrylophenones: potent and selective inhibitors of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *J Med Chem* **38**:2441-8
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**:1161-208
- Vallance, P., Bush, H.D., Mok, B.J., Hurtado-Guerrero, R., Gill, H., Rossiter, S., Wilden, J.D., Caddick, S. 2005. Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates. *Chem Commun (Camb)*:5563-5
- Vallance, P., Leiper, J. 2002. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* **1**:939-50
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**:572-5
- van Os, J., Kapur, S. 2009. Schizophrenia. *Lancet* **374**:635-45
- Venema, R.C., Ju, H., Zou, R., Ryan, J.W., Venema, V.J. 1997. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* **272**:1276-82
- Venema, R.C., Sayegh, H.S., Kent, J.D., Harrison, D.G. 1996. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* **271**:6435-40
- Vermilion, J.L., Coon, M.J. 1978. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* **253**:8812-9
- Victor, V.M., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K., Hernandez-Mijares, A. 2009. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* **15**:2988-3002
- Volpi, M., Sha'afi, R.I., Feinstein, M.B. 1981. Antagonism of calmodulin by local anesthetics. Inhibition of calmodulin-stimulated calcium transport of erythrocyte inside-out membrane vesicles. *Mol Pharmacol* **20**:363-70
- Walker, H.A., McGing, E., Fisher, I., Boger, R.H., Bode-Boger, S.M., Jackson, G., Ritter, J.M., Chowienczyk, P.J. 2001. Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina: lack of effect of oral L-arginine on endothelial function, oxidative stress and exercise performance. *J Am Coll Cardiol* **38**:499-505

- Wang, P.G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., Janczuk, A.J. 2002. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* **102**:1091-134
- Wang, Y., Monzingo, A.F., Hu, S., Schaller, T.H., Robertus, J.D., Fast, W. 2009. Developing Dual and Specific Inhibitors of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase-1 and Nitric Oxide Synthase: Toward a Targeted Polypharmacology To Control Nitric Oxide. *Biochemistry* **48**:8624-35
- Webster, N.R., Nunn, J.F. 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* **60**:98-108
- Weiss, B., Prozialeck, W.C., Wallace, T.L. 1982. Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications. *Biochem Pharmacol* **31**:2217-26
- Werner, E.R., Pitters, E., Schmidt, K., Wachter, H., Werner-Felmayer, G., Mayer, B. 1996. Identification of the 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin as a dihydropteridine reductase inhibitor and a potent pteridine antagonist of rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J* **320 (Pt 1)**:193-6
- Williams, G.V., Castner, S.A. 2006. Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* **139**:263-76
- Wilson, A.M., Harada, R., Nair, N., Balasubramanian, N., Cooke, J.P. 2007. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* **116**:188-95
- Wink, D.A., Mitchell, J.B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **25**:434-56
- Wolff, D.J., Datto, G.A., Samatovicz, R.A., Tempsick, R.A. 1993. Calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. Mechanism of inhibition by imidazole and phenylimidazoles. *J Biol Chem* **268**:9425-9
- Wu, G., Morris, S.M., Jr. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336 (Pt 1)**:1-17
- Wu, X., Tang, X., Xian, M., Wang, P.G. 2001. Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron letters* **42**:3779-82
- Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M., Bretz, D.S., Becker, L.C. 1999. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:657-62
- Xu, W., Kaneko, F.T., Zheng, S., Comhair, S.A., Janocha, A.J., Goggans, T., Thunnissen, F.B., Farver, C., Hazen, S.L., Jennings, C., Dweik, R.A., Arroliga, A.C., Erzurum,

- S.C. 2004. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *Faseb J* **18**:1746-8
- Yang, Z., Ming, X.F. 2006. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* **8**:54-9
- Yarbrough, J.W., Schultz, T.W. 2007. Abiotic sulfhydryl reactivity: a predictor of aquatic toxicity for carbonyl-containing alpha,beta-unsaturated compounds. *Chem Res Toxicol* **20**:558-62
- Yetik-Anacak, G., Catravas, J.D. 2006. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* **45**:268-76
- Zhang, H.Q., Fast, W., Marletta, M.A., Martasek, P., Silverman, R.B. 1997. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J Med Chem* **40**:3869-70
- Zhou, L., Zhu, D.Y. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **20**:223-30
- Zhu, H.J., Wang, J.S., Guo, Q.L., Jiang, Y., Liu, G.Q. 2005. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance in K562 cell line by a novel synthetic calmodulin inhibitor, E6. *Biol Pharm Bull* **28**:1974-8
- Zoccali, C., Bode-Boger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Fermo, I., Frolich, J., Boger, R. 2001. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* **358**:2113-7

Danksagung

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Clement sehr herzlich bedanken.

Bei Anja, Birte, Jürke, Thomas Behrendt und Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze bedanke ich mich für die unkomplizierte und sehr unterhaltsame Zusammenarbeit bei der Betreuung des 6. Semesters.

Dennis, Jürke und Tessie, vielen Dank für Eure unermüdliche Fehlersuche und die konstruktive Kritik beim tagelangen Korrekturlesen.

Herrn Dr. Ulrich Girreser und Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze möchte ich für die vielen wertvollen Tipps und Hilfestellungen danken.

Dennis danke ich dafür, dass er mich ständig motiviert und jederzeit mit Rat und Tat unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an Sven, ohne dessen Tipps ich an der HPLC verloren gewesen wäre sowie an Petra für Ihre Hilfe bei der Durchführung von Enzymassays und die Bereitstellung der Enzymquellen. Bei Melissa möchte ich mich für die Aufnahme und die Hilfe beim Auswerten der NMR-Spektren bedanken. Herrn Dr. Harald Hübner danke ich für die Durchführung der Rezeptorbindungsstudien.

Antje, Britta, Christiane, Helen, Ina, Judith, Meike, Nina, Petra und Tessie danke ich für die Hilfe in allen Lebenslagen und die vielen schönen Stunden innerhalb und ausserhalb des Instituts.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Sanja und Helen für die ausgelassene Zeit in Wien und bei Dennis, Ina, Joscha und Jürke für den Französisch-Unterricht und die Strandabende in Nizza.

Christina, Dana, Doro, Helen, Sanja und Ulrike möchte ich für die lustigen Nachmittage im 4. Stock danken.

Meike, Helen und Tessie, Ihr seid einfach die besten Bürokolleginnen!

Allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen danke ich für die schöne Zeit am Pharmazeutischen Institut und in Sehlendorf.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die immer für mich da sind und mir diesen Weg ermöglicht haben. Ich bin Euch sehr dankbar!

Zuletzt möchte ich meinem Mann für seine Geduld, sein Verständnis und seine immerwährende Unterstützung danken. Du stehst jederzeit an meiner Seite. Vielen Dank!

Erklärung zu § 9 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Arbeit wurde - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt.

Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Muschick, N., Clement, B.

4-Bromophenyl- ω -dimethylaminobutyrophenone-HCl, a novel inhibitor of nitric oxide synthases

Poster, XXth International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC) 2008, Wien, Österreich

Schade, D., Kotthaus, J., Muschick, N., Clement, B.

Prodrug design for the potent physiological NO-precursor N^{ω} -hydroxy-L-arginine (NOHA)

Short communication, PharmSciFair 2009, Nizza, Frankreich

Kotthaus, J., Schade, D., Muschick, N., Beitz, E., Clement, B.

Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads.

Bioorg Med Chem 2008, 16:10205-9

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, im Januar 2010

Nikola Klein

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Nikola Christine Klein (geb. Muschick)
Geburtsdatum	15. September 1979
Geburtsort	Mainz
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1985 – 1989	Grundschule Budenheim
1989 – 1995	Gymnasium Gonsenheim, Mainz
1995 – 1998	Humboldt-Schule, Wiesbaden
06/1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1998 – 11/2002	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
01/2003 – 06/2003	Boehringer Ingelheim GmbH & Co. KG, Pharmazie-Praktikantin
07/2003 – 12/2003	Airport-Apotheke, Hamburg, Pharmazie-Praktikantin
02/2004	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit

02/2004 – 09/2004	Airport-Apotheke, Hamburg, Apothekerin
10/2004 – 10/2005	Asche Chiesi GmbH, Hamburg, Referentin der Arzneimittelzulassung und Qualitätssicherung
11/2005 – 01/2006	Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München, Coordinator Regulatory Affairs
02/2006 – 04/2006	Rathaus-Apotheke, Mainz, Apothekerin

Promotion und Weiterbildung

seit 05/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Abteilung Pharmazeutische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Clement
11/2004 – 10/2006	Wirtschaftsakademie Deutscher Apotheker, Abschluss als Praktischer Betriebswirt für die Pharmazie
04/2007 – heute	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik, Abschluss voraussichtlich im April 2010

Stickstoffmonoxid (NO) besitzt eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Effekte und wird mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht, die sowohl aus einer reduzierten als auch aus einer erhöhten NO-Freisetzung resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenartige Prodrugs von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA), dem natürlichen Intermediat der NO-Synthase(NOS)-Katalyse, als potenzielle NO-Donoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die NOHA-Prodrugs eine im Vergleich zu NOHA deutlich verbesserte hydrolytische und oxidative Stabilität besitzen. Eine Umsetzung der Prodrugs mit verschiedenen Enzymquellen zu NOHA konnte nicht gezeigt werden, dafür erfolgte eine Umsetzung durch Schweinelebermikrosomen und -mitochondrien zu L-Arginin.

Eine Möglichkeit zur indirekten Hemmung der NOS ist die selektive Inhibierung der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Verbindungen auf NOS-Hemmung getestet und mit *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin ein potenter und gegenüber den NOS-Isoenzymen selektiver DDAH-Inhibitor gefunden, der ein aussichtsreicher Kandidat für die Arzneistoffentwicklung darstellt.

Eine weitere Möglichkeit zur Senkung der NO-Synthese ist die direkte Hemmung der NOS. Der im Arbeitskreis Clement entwickelte NOS-Inhibitor 4'-(4-Bromphenyl)-3-dimethylaminopropiophenon Hydrochlorid zeigte im Rahmen dieser Arbeit eine Instabilität, die auf eine Desaminierung der Verbindung zurückzuführen ist. Die entstehende α,β -ungesättigte Carbonylverbindung besitzt alkylierendes Potential. Daher wurde das um eine Methylengruppe verlängerte 4-Bromphenyl- ω -dimethylaminobutyrophenon Hydrochlorid (BDAB) entwickelt, das die nNOS und eNOS, jedoch nicht die iNOS hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Selektivität durch den Angriff der Verbindung an Calmodulin entsteht und so der Elektronentransfer über die Reduktasedomäne beeinflusst wird. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von BDAB zu Haloperidol wurde weiterhin die Affinität von BDAB im Arbeitskreis Gmeiner zu dopaminergen, serotoninergen und adrenergen Rezeptoren getestet. BDAB zeigte eine selektive Hemmung des D₄- und 5-HT_{1A}-Rezeptors, die allerdings relativ schwach ausfiel. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Verbindungen, deren Dimethylamingruppe gegen aromatische Ringe ausgetauscht wurden, synthetisiert, die eine erhöhte Affinität zeigten. Das erhaltene Profil der Verbindungen ist bislang einzigartig und rechtfertigt weiterführende Untersuchungen.

Nitric oxide possesses a number of physiological and pathophysiological effects and is linked to a multiplicity of diseases, which can result from a decreased or elevated NO-liberation. Within the scope of this study, heterogenous prodrugs of *N*^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA), the natural intermediate of NO-synthases (NOS) catalysis, were analysed as potential NO-donor drugs. It was shown that NOHA-prodrugs exhibit an improved hydrolytic and oxidative stability compared to NOHA. No conversion of the prodrugs to NOHA could be observed with several enzymes tested. However, pig liver microsomes and mitochondria catalysed the reaction to L-arginine.

An opportunity to indirectly decrease high NO-concentration is the selective inhibition of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH). Within this study a number of compounds were analysed for NOS-inhibition. *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidine, a potent DDAH-inhibitor with selectivity over NOSs, was found to be a promising lead for the development of even more potent compounds.

Another opportunity to decrease the NO-synthesis is the direct inhibition of NOS. The NOS-inhibitor 4'-(4-bromophenyl)-3-dimethylaminopropiophenone hydrochloride, developed in the research group Clement, was analysed and showed instability that was due to the deamination of the compound. The resulting α,β -unsaturated carbonyl compound possesses alkylating potential. Therefore a derivative elongated by a methylene group, 4-bromophenyl- ω -dimethylaminobutyrophenon hydrochloride (BDAB), was synthesised, that inhibits nNOS and eNOS, but not iNOS. It was shown that this selectivity results from the attack of the compound on calmodulin preventing the electron transfer by the reductase domain. Since BDAB is structurally similar to Haloperidol, the affinity of BDAB to dopaminergic, serotonergic and adrenergic receptors was tested in the research group Gmeiner. BDAB showed selective, but weak inhibition of D₄- and 5-HT_{1A}-receptors. Based on these results, two additional compounds whose dimethylamino groups were exchanged with aromatic rings, were synthesised and displayed a stronger affinity. To date, the obtained profiles of these compounds are unique and justify further studies.

, Clement 2005 Schweineleber,

Kretschmar et al 1985 Galactose

[Clement *et al.*, 2005]

[Siddhanta *et al.*, 1998]

[Newton *et al.*, 1998]. Karhan W Dissertation

[Wilson *et al.*, 2007]

[Spratt *et al.*, 2007] [Mayer *et al.*, 1991]

[Pallen und Wang, 1983]

[Pallen und Wang, 1983]

[Boger, 2008] [Kincaid *et al.*, 1982]

[Clement *et al.*, 1997]

[Smith *et al.*, 1985] [Traxler *et al.*, 1995]

[Estabrook und Werringloer, 1978] [Hevel und Marletta, 1994]

[Roman *et al.*, 2000]

[Fedorov *et al.*, 2003]

[Cortizo *et al.*, 1991]