

# 1 Einleitung

## 1.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist das einzige bekannte körpereigene Radikal, das als Botenstoff fungiert. Seine Wirkungen sind komplex, da es nicht nur am Ort seiner Entstehung, sondern im Rahmen seiner Halbwertszeit in umliegende Gewebe diffundieren und dort diverse Effekte auslösen kann. Aus diesem Grund wird NO auch als Volumen Neurotransmitter bezeichnet <sup>[1]</sup>. Ruft es in physiologischen Konzentrationen vorwiegend nützliche, regulative und protektive Wirkungen hervor, so wird es bei exzessiver Produktion häufig zum pathogenen Mediator <sup>[2]</sup>. Zudem kann Stickstoffmonoxid mit Sauerstoff bzw. reaktiven Sauerstoffspezies zu zahlreichen verwandten Ionen und Radikalen reagieren, die wiederum andere Wirkungen hervorrufen, die im Falle des Peroxynitrits fatale Folgen haben <sup>[3]</sup>.

### 1.1.1 Die Geschichte von Stickstoffmonoxid

Im Jahre 1980 berichteten *Furchgott und Zawadzki* <sup>[4]</sup> von einer Substanz aus den Endothelzellen, die den vasodilatierenden Effekt des Acetylcholins vermittelt. Sie nannten die Substanz „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF). Sieben Jahre später wurde diese von den Arbeitskreisen *Palmer* <sup>[5]</sup> und *Ignarro* <sup>[6]</sup> fast zeitgleich als Stickstoffmonoxid identifiziert.

1989 wurde die NO-Synthase erstmals beschrieben und Moncada fand Anzeichen von NO im Gehirn <sup>[7]</sup>. 1990 wurde die NO-Synthase erstmals gereinigt und 1991 kloniert <sup>[8]</sup>. Bis 1994 waren alle NO-Synthasen kloniert und gereinigt. 1992 ernannte *Science* NO zum Molekül des Jahres und 1998 erhielten Furchgott, Ignarro und Murad den Nobelpreis für Medizin für ihre Forschung über NO <sup>[9]</sup>.



### 1.1.3 Die Eigenschaften von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist unter Standardbedingungen ein farbloses Gas. Es weist in apolaren Medien eine weitaus bessere Löslichkeit auf, als in Wasser. Dadurch und durch seine geringe Größe ist NO in der Lage, durch Membranen zu diffundieren und sich in Membranen und anderen Lipidphasen anzureichern <sup>[21]</sup>. Stickstoffmonoxid besitzt ein ungepaartes Elektron, weist jedoch trotz seiner paramagnetischen Eigenschaften eine relativ geringe chemische Reaktivität auf <sup>[22]</sup>. Bei den Reaktionspartnern handelt es sich vorwiegend um paramagnetische Verbindungen (molekularer Sauerstoff, Sauerstoffradikalanionen sowie Peroxyradikale) oder Metalle <sup>[21]</sup>.

Die Reaktion von NO mit Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^-$ ) verläuft mit hoher Geschwindigkeit und resultiert in der Bildung von Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), einer sehr reaktiven Sauerstoffspezies.

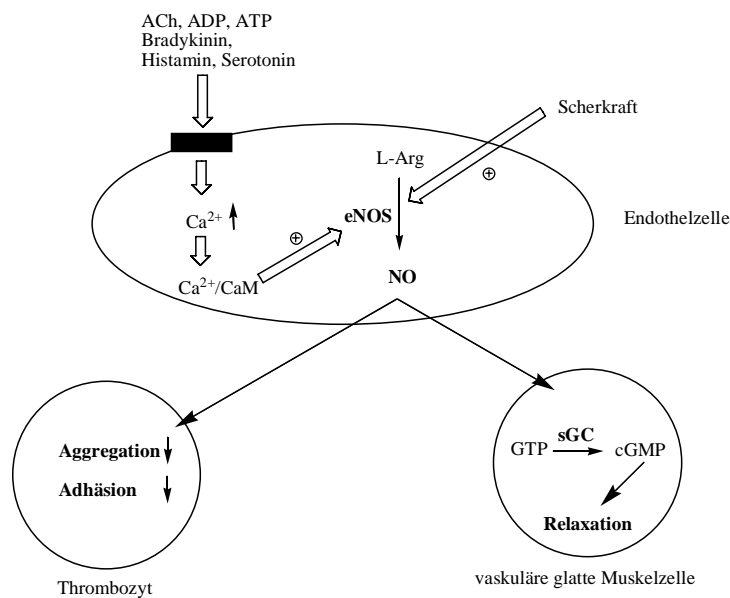
Mit molekularem Sauerstoff reagiert Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid bzw. in wässriger Lösung zu Nitrit und Nitrat <sup>[23]</sup>.

Hämproteine weisen eine besonders hohe Affinität zu Stickstoffmonoxid auf <sup>[22]</sup>. So reagiert Oxyhämoglobin sehr schnell mit NO unter Bildung von Methämoglobin und Nitrat <sup>[24]</sup> während aus anderen hämhaltigen Proteinen, z. B. Cytochrom P450-Enzyme, Cytochromoxidase und lösliche Guanylatzyklase, Nitrosyl-Häm-Addukte entstehen.

#### 1.1.3.1 Stickstoffmonoxid im vaskulären System

Stickstoffmonoxid wird bei Bedarf aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase über eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration (siehe Abb. 2 auf Seite 4). Diese erfolgt sowohl über einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum als auch durch die Freisetzung von Kalzium-Ionen aus intrazellulären Speichern. Die Öffnung der entsprechenden Ionenkanäle erfolgt rezeptorvermittelt -d.h. über die Aktivierung zellmembranständiger Rezeptoren durch endogene (ACh, ADP, ATP, Bradykinin, Histamin, Serotonin) oder exogene Mediatoren (Arzneistoffe). Die Scherkraft des strömenden Blutes stellt einen weiteren Stimulator endothelialer NO-Bildung dar <sup>[26]</sup>. Die intrazellulären Kalzium-Ionen binden in Form eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes an die endotheliale NO-Synthase <sup>[25]</sup>. Das gebildete NO diffundiert zu den Zielzellen und bindet dort an das Häm-Eisen der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Zelluläre Wirkorte von NO sind sowohl verschiedene Blutzellen (z.B. Thrombozyten und Granulozyten) als auch die Gefäßwand (glatte Muskelzellen und Endothelzellen). Der resultierende cGMP-Anstieg führt zu einer Hemmung der

Thrombozytenaggregation sowie -adhäsion und bewirkt durch Relaxation vaskulärer glatter Muskelzellen eine Vasodilatation [27]. Neben der Kurzzeitregulation des Vasotonus und der Hämostase ist Stickstoffmonoxid durch seine antiproliferative, antimigrative und antiarteriosklerotische Wirkung zudem entscheidend an der Langzeitvasoprotektion beteiligt [26].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Synthese und Wirkung von Stickstoffmonoxid im Gefäßsystem [nach Schmidt et al.] [26] (ACh: Acetylcholin; eNOS: endotheliale NO-Synthase; CaM: Calmodulin; sGC: lösliche Guanylatcyclase)

### 1.1.3.2 Stickstoffmonoxid im Nervensystem

Stickstoffmonoxid wird im Zentralen Nervensystem die Funktion eines Neurotransmitters zugeschrieben und scheint an der Gedächtnisregulation und am Lernvermögen beteiligt zu sein [25]. Pathologisch spielt NO eine bedeutende Rolle als Mediator bei Migräne und Kopfschmerz [21]. Reaktive Intermediate, als Folge NO-vermittelter oxidativer Prozesse sowie Nitrierungsreaktionen, werden für Proteinmodifikationen, Zellzerstörung und damit einhergehenden neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Besonders Peroxynitrit - gebildet durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxidradikalanionen - wird über die Bildung von Nitrotyrosin in Proteinen sowie Oxidations- und Nitrierungsreaktionen an DNA und Lipiden für neurotoxische Vorgänge verantwortlich gemacht [109] [28]. Die Abtötung benachbarter Neurone beim Schlaganfall und bei cerebraler Ischämie wird als eine Folge überschießender NO-Bildung angesehen. Zudem wird NO mit Morbus Parkinson, Chorea Huntington, sowie zahlreichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [21].

Im peripheren Nervensystem stellt Stickstoffmonoxid einen Mediator von NANC (non-adrenerg, non-cholinerg) Neuronen dar und hat somit Einfluß auf die Motilität der Gastrointestinal-Muskulatur, die Peniserektion sowie auf die Regulation der Nierendurchblutung [25].

### **1.1.3.3 Stickstoffmonoxid im Immunsystem**

Die Synthese von Stickstoffmonoxid als Mechanismus der unspezifischen Immunabwehr erfolgt erst nach Induktion der Genexpression durch inflammatorische Agentien. Nach dieser Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase sind Makrophagen und Granulozyten in der Lage, große Mengen an NO zu produzieren. Stickstoffmonoxid gelangt durch Diffusion in die umliegenden Gewebe und führt dort durch Reaktion mit den Eisen-Schwefel-Zentren wichtiger Makromoleküle [29] zur Abtötung von Bakterien, Pilzen, Viren und weiteren Pathogenen [30] [31].

Die proliferationshemmende und zytotoxische Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Tumorzellen läßt sich auf die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase zurückführen [32].

Bei inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen wird die iNOS langfristig induziert. Das in hohen Konzentrationen freigesetzte NO trägt dann zur Symptomatik bei. Auf diese Weise ist NO u.a. an der Entstehung von osteo-und rheumatoider Arthritis, entzündlicher Darmentzündungen wie Colitis ulcerosa, Asthma, multipler Sklerose, Morbus Alzheimer, Meningitis und Abstoßung von Transplantaten beteiligt [34][35][36][37][38].

Beim sogenannten septischen Schock, der durch Zirkulation großer Mengen gram-negativer Bakterien in der Blutbahn ausgelöst wird, kommt es durch die anwesenden Endotoxine zu einer starken Induktion der iNOS-Expression, u. a. in Endothel-und vaskulären glatten Muskelzellen. Das Resultat der überschießenden NO-Produktion ist eine massive Vasodilatation im gesamten Blutgefäßsystem, welche mit einem massiven Blutdruckabfall verbunden ist. Dieser kann zum Multi-Organversagen oder gar zum Tode führen [33].

## 1.2 NO-Synthasen

Es gibt drei Isoformen der NOS. Die einzelnen Isoenzyme unterscheiden sich in ihrer chromosomalen Lokalisation, Aminosäuresequenz, Kinetik, Regulation sowie funktionellen Bedeutung voneinander (Tabelle 1). Die konstitutiven Isoformen bNOS (nNOS; NOS I) und eNOS (NOS III) werden hauptsächlich in ihrer Aktivität, das induzierbare Isoenzym (iNOS; NOS II) in seiner Expression reguliert. Die Aktivität der konstitutiven Isoformen wird durch die Menge an intrazel-

**Tab. 1:** Zusammenstellung der Isoformen der NO-Synthasen nach Kervin et al. <sup>[21]</sup> Schmidt et al. <sup>[2]</sup> und Pfeiffer et al. <sup>[26]</sup>

	<b>bNOS</b>	<b>eNOS</b>	<b>iNOS</b>
Herkunft	Gehirn	Endothel	Makrophagen
Zellen	Neuronen Bronchien neutrophile Granulozyten Niere (Macula densa) Skelettmuskel	Endothelzellen Thrombozyten Kardiomyozyten	glatte Muskelzellen Makrophagen Granulozyten Hepatozyten Endothelzellen Megakaryozyten Kardiomyozyten
Anzahl der Aminosäuren	1433	1203	1153
Molekulargewicht	160 kDa	134 kDa	130 kDa
Expression	konstitutiv zum Teil induzierbar	konstitutiv zum Teil induzierbar (Scherstreß)	induzierbar
Aktivierung	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin	Cytokine Endotoxin Lipopolysacharide Ca <sup>2+</sup> unabhängig
Freisetzung von NO	picomolare Mengen	picomolare Mengen	nanomolare Mengen

lulärem  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuert, da nur durch eine ausreichende Konzentration die Bindung von Calmodulin an die Enzyme stattfindet. Die nicht konstitutive iNOS ist von dieser Regulation nicht betroffen, da Calmodulin eine deutlich höhere Affinität zur Bindungsstelle in der iNOS besitzt. Somit ist diese Bindung Kalzium-unabhängig und damit die Enzymaktivität kaum regelbar [21][42]. Zellen, die iNOS enthalten, produzieren somit kontinuierlich Stickstoffmonoxid [43].

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Aktivität ist eine negative Rückkopplung. Vermutlich bindet NO bei hohen Konzentrationen an das zweiwertige Häm-Eisen und hemmt so die NO-Produktion [38].

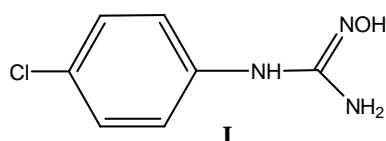
Die Homologie zwischen den humanen Isoenzymen beträgt 51-57% [44].

NO-Synthasen setzen sich aus einer C-terminalen Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne zusammen [40]. In katalytisch aktiver Form liegen alle drei Isoenzyme als homodimere Proteine vor. Die Reduktase-Domäne enthält Bindungsstellen für die Cofaktoren NADPH, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN). Die Oxygenase-Domäne enthält Bindungsstellen für den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (THB;  $\text{BH}_4$ ) [46], Häm und das Substrat L-Arginin [45]. Domänen werden durch die Bindungsstelle für Calmodulin verbunden [41].

NO-Synthasen sind die einzigen bisher bekannten  $\text{BH}_4$ -abhängigen Häm-Eisen-Enzyme [2].  $\text{BH}_4$  stellt einen essentiellen Cofaktor für beide Katalyseschritte der Stickstoffmonoxid-Produktion dar, wobei seine Rolle noch nicht umfassend geklärt ist.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

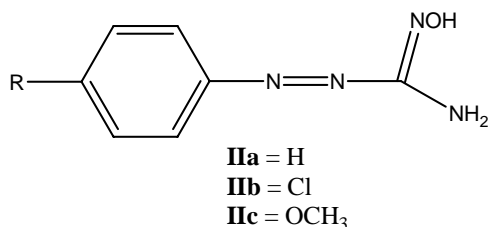
Die NO-Synthasen stellen sehr spezifische Enzyme dar. Es sollten in dieser Arbeit Substrate für die NO-Synthase gefunden werden. Der Ausgangspunkt für diese Versuche war eine Arbeit aus der Gruppe von Mansuy *et al.* [105]. Dort wird das N-Hydroxyguanidin **I** als Substrat von NO-Synthasen beschrieben.



**Abb. 3:** 4-Chlorphenyl-N-hydroxyguanidin

Dieser Stoff und Derivate sollten synthetisiert- und in verschiedenen *in vivo* und *in vitro*-Testmodellen auf NO-abhängige biologische Effekte (Thrombozytenaggregation, Blutdrucksenkung) getestet werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob eine Bevorzugung der Verbindung **I** für einzelne Isoenzyme der NO-Synthasen vorliegt.

Außerdem erscheint der Ansatz von Rehse *et al.* [58] interessant, Arylazoamidoxime (**II**) im gleichen Zusammenhang zu testen. Die Strukturen der beiden Verbindungsklassen sind ähnlich und somit könnten ähnliche pharmakologische Eigenschaften vorliegen. Besonders Verbindung **IIb** zeigt eine langanhaltende Senkung des Blutdrucks einer spontan hypertensiven Ratte. Dieser Effekt könnte auf freigesetztes NO zurückzuführen sein. Bisher wurde allerdings nur gezeigt,



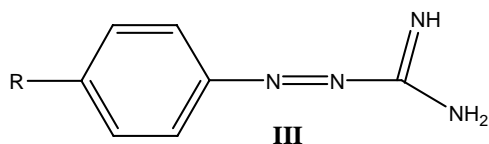
**Abb. 4:** Arylazoamidoxime aus [58].

dass unspezifische P450-Enzyme Stickstoffmonoxid aus diesen Verbindungen freisetzen können [70]. Es sollten weitere Arylazoamidoxime hergestellt, deren Wirkungen mit *in vivo* und *in*



*in vitro*-Testmodellen getestet und deren Stickstoffmonoxid-Freisetzung mit NO-Synthasen untersucht werden.

Verbindungen von Typ **II** unterliegen im menschlichen Körper wie alle Arzneistoffe der Biotransformation. Es wurde bisher nicht untersucht, ob und wie schnell eine Reduktion durch Cytochrom P450-Enzyme zu Arylazoamidinen stattfindet. Diese Untersuchungen sollten mit verschiedenen Enzymquellen durchgeführt werden. Dazu sollte eine HPLC-Methode entworfen werden. Als Vergleichssubstanzen für die Analytik mußten daher die analogen Arylazoamidine einiger Arylazoamidoxime (**III**) synthetisiert werden. Auch diese Verbindungen sollten zusätzlich in verschiedenen *in vivo* und *in vitro*-Testmodellen auf eigene Wirkungen getestet werden.



**Abb. 5:** Arylazoamidine vom Typ III

Neben der Untersuchung auf Substrateigenschaften für die NO-Synthasen, sollten die Stoffe auch auf Ihre Fähigkeit als Aktivatoren oder Hemmstoffe der NO-Synthasen untersucht werden.

