

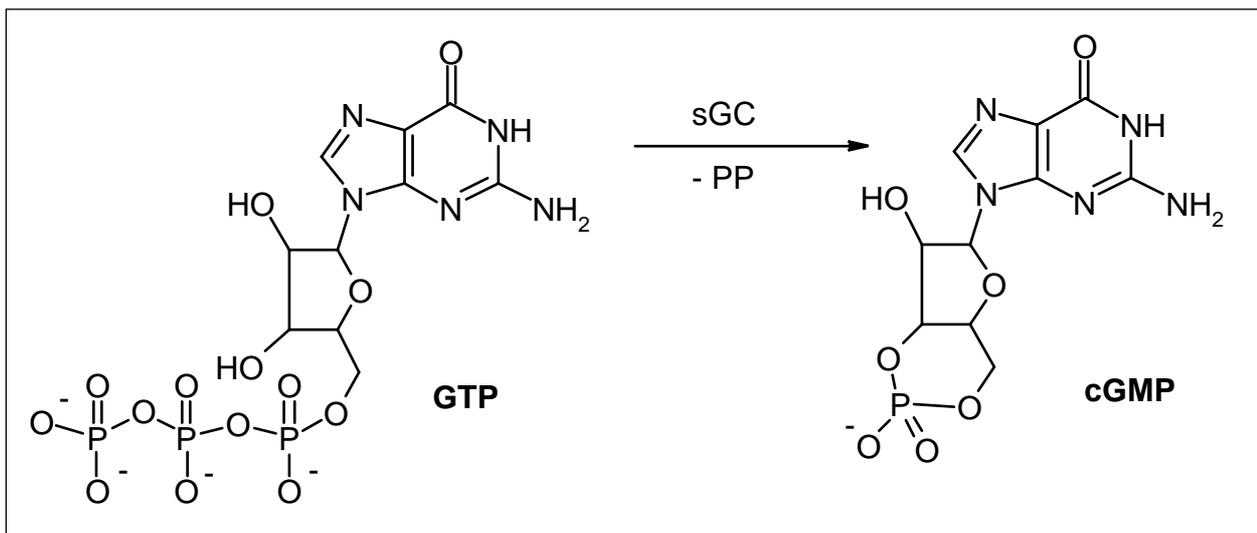
# 1 Einleitung und Problemstellung

Eines der wichtigsten zellulären Übertragungssysteme in Säugerzellen ist das cyclische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). Es bildet zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO) das NO/cGMP-System und spielt als „second messenger“ eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen Prozessen, insbesondere bei der Relaxation von glatten Muskelzellen, der Verminderung der Plättchenadhäsion und -aggregation und der neuronalen Signalübertragung<sup>[1-3]</sup>. Daher dienen Arzneistoffe, die zu einer Steigerung der cGMP-Konzentration in den Zielzellen (Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Thrombozyten) führen, zur Vorbeugung und Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Kardiovaskuläre Erkrankungen wie z.B. Herzinfarkt und Angina pectoris gehören in den westlichen Industrieländern seit Jahrzehnten zu den häufigsten Todesursachen.

Der biologische Effekt von Stickstoffmonoxid wurde 1980 von Furchgott und Sawadzki<sup>[4]</sup> entdeckt. Da die Struktur aufgrund der geringen Halbwertszeit noch ungeklärt war, nannten sie die Substanz „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF). 1987 gelang es Palmer et al.<sup>[5]</sup>, NO über Chemilumineszenzmessungen zu identifizieren. Stickstoffmonoxid, das aus den Endothelzellen durch vasoaktive Substanzen (Acetylcholin, Bradykinin) freigesetzt wird, führt über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels. Die daraus resultierende Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt u.a. eine Vasodilatation und Verminderung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die Effekte des cGMP werden durch cGMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt. Ein NO-Mangel, der u.a. durch funktionseingeschränkte Endothelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen verursacht wird, kann durch Gabe von NO-Donoren (Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat) teilweise oder vollständig ausgeglichen werden. NO-Donoren werden seit Jahren bei der Behandlung von Angina pectoris verwendet. Die Bildung von Nitrat-Toleranzen machte aber die Suche nach NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren unverzichtbar.

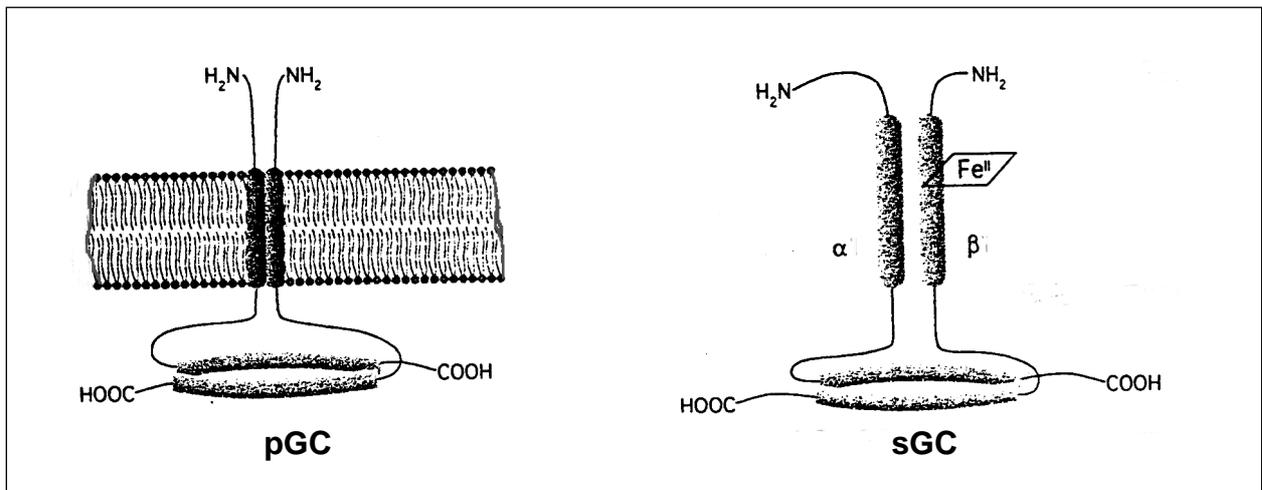
## 1.1 Guanylatcyclasen

Guanylatcyclasen sind seit den sechziger Jahren bekannt und konnten in den meisten Zellen wie z.B. glatten Muskelzellen und Monozyten unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen werden<sup>[2,6]</sup>. Guanylatcyclasen katalysieren die Synthese von cGMP aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Umsetzung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) (PP = Pyrophosphat)

Aufgrund von unterschiedlichen strukturellen Merkmalen werden die Guanylatcyclasen in die membrangebundenen und in die löslichen Formen eingeteilt (siehe Abb. 2 auf Seite 3). Die membrangebundenen oder auch partikulären Guanylatcyclasen (pGC) sind Homodimere, die von natriuretischen Peptiden stimuliert werden. Die löslichen Guanylatcyclasen (sGC) werden von NO aktiviert. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - (73-88 kDa) und einer  $\beta$ -Untereinheit (70-76 kDa) und enthalten pro Heterodimer ein Häm als prosthetische Gruppe<sup>[3]</sup>. Beide Untereinheiten sind für die Katalyse notwendig.



**Abb. 2:** membrangebundene (pGC) und lösliche (sGC) Guanylatcyclase<sup>[11]</sup>

Da in den Thrombozyten nur sGC identifiziert wurden<sup>[7]</sup>, wird ihre Aktivierung näher beschrieben<sup>[3,8-11]</sup>. Das Häm-Gerüst der sGC enthält Eisen als Zentralatom, das vermutlich mit der Aminosäure Histidin 105 (Hist-105) aus dem N-terminalen Rest der  $\beta$ -Untereinheit assoziiert. NO bindet an das Eisenatom, so daß ein hexakoordinierter Komplex entsteht. Dabei wird das Eisenatom aus der Ebene des Porphyrinringes herausgehoben. Die sGC ist jetzt geringfügig stimuliert. Die Histidin-Eisen-Bindung lockert sich. Dadurch bildet sich ein pentakoordinierter Nitrosyl-Eisen-Übergangskomplex aus, der aufgrund der veränderten Konformation zu einer 100- bis 400fachen Aktivierung des Enzyms führt. GTP bindet an die lösliche Guanylatcyclase und wird vermutlich über weitere Metallionen und den Imidazol-Ring des Histidins zum cGMP umgesetzt.

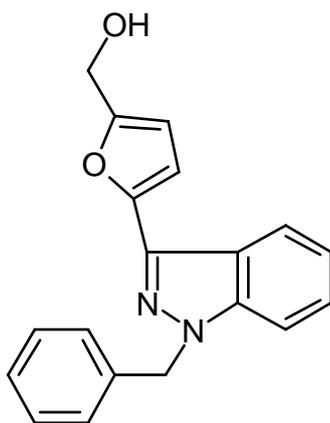
Die Umwandlung vom hexa- zum pentakoordinierten Komplex stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und kann durch die NO-Konzentration beeinflusst werden<sup>[12]</sup>. NO bestimmt somit über seine Konzentration nicht nur, wieviele Enzymmoleküle aktiviert werden sollen, sondern auch wie schnell.

Auch Kohlenmonoxid (CO) bindet an das Eisenatom unter der Bildung eines hexakoordinierten Komplexes und aktiviert die sGC um das Vierfache<sup>[13]</sup>. Das Eisenatom wird dabei ebenfalls aus der Ebene des Porphyrinringes herausgehoben. Eine Spaltung der Eisen-Histidin-Bindung wird nicht registriert.

Die hexa- und pentakoordinierten Komplexe wurden durch UV-spektroskopische Untersuchungen belegt.

Hämfreie lösliche Guanylatcyclasen können durch Protoporphyrin IX stimuliert werden<sup>[9]</sup>.

Ko et al.<sup>[14]</sup> gelang es 1994 erstmals, eine Substanz (**YC-1**) zu synthetisieren, welche die lösliche Guanylatcyclase unabhängig von NO direkt aktiviert. **YC-1**, ein Benzylindazol-Derivat (siehe Abb. 3), führt über eine direkte Erhöhung des cGMP-Spiegels u.a. zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur *in vitro*<sup>[15]</sup>, einer Senkung des Blutdruckes in Ratten<sup>[16]</sup> und einer Hemmung der Thrombozytenaggregation<sup>[17,18]</sup>. Es zeigt auch *in vivo* antithrombotische Eigenschaften<sup>[19]</sup>. **YC-1** (100 µmol/L) oder NO (0.1 µmol/L **DEA/NO**<sup>1</sup>) jeweils einzeln führen in intakten Blutplättchen *in vitro* zu einer ca. 10fachen Steigerung des cGMP-Spiegels. Beide Substanzen zusammen steigern die intrazelluläre cGMP-Konzentration enorm (> 1000fach)<sup>[20]</sup>. Eine 300 µmolare **YC-1**-Lösung erhöht die Aktivität der löslichen Guanylatcyclase um den Faktor 100. Die Kombination aus **YC-1** und NO (100 µmol/L **YC-1** + 10 µmol/L **DEA/NO**) führt zu einer ca. 800fachen Steigerung der sGC-Aktivität<sup>[21]</sup>. Damit zeigt eine Kombination aus **YC-1** und NO überadditive Effekte bei der Steigerung der cGMP-Konzentration sowie der Aktivität der sGC.



**YC-1:**

3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-  
1-phenylmethyl-benzo[c]pyrazol

**Abb. 3:** Strukturformel von **YC-1**

Der Wirkmechanismus von **YC-1** ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich greift **YC-1** an eine allosterische Bindungsstelle an und bewirkt über eine Senkung der Dissoziationsgeschwindigkeit der Liganden von dem Häm-Gerüst den überadditiven Effekt<sup>[22]</sup>. Martin et al.<sup>[23]</sup> beschreiben Häm-abhängige und Häm-unabhängige Komponenten bei der Aktivierung der sGC. Die Arbeitsgruppe um Galle<sup>[24]</sup> gibt neben der Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch **YC-1** auch eine Inhibition der verschiedenen Isoformen der Phosphodiesterasen (PDE) an.

1. N,N-Diethylaminodiazennolat-2-oxid; NO wird spontan freigesetzt

## 1.2 Phosphodiesterasen (PDE)

Der Abbau von cyclischen Nucleotiden wie cGMP und cAMP (cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat) wird über Phosphodiesterasen (PDE) reguliert. Derzeit sind 11 verschiedene PDE-Familien bekannt<sup>[25-27]</sup>. In den Thrombozyten befinden sich die PDE vom Typ 2,3 und 5, die über cGMP miteinander in Wechselwirkung stehen (siehe Tabelle 1). Die PDE 5 ist dabei mit der höchsten Konzentration vertreten und katalysiert die Hydrolyse von cGMP zu GMP (Guanosin-5'-monophosphat). Sie reguliert damit über den Abbau von cGMP die Konzentration in den Zellen und die biologische Aktivität von cGMP.

Tab. 1: Phosphodiesterasen vom Typ 2,3 und 5

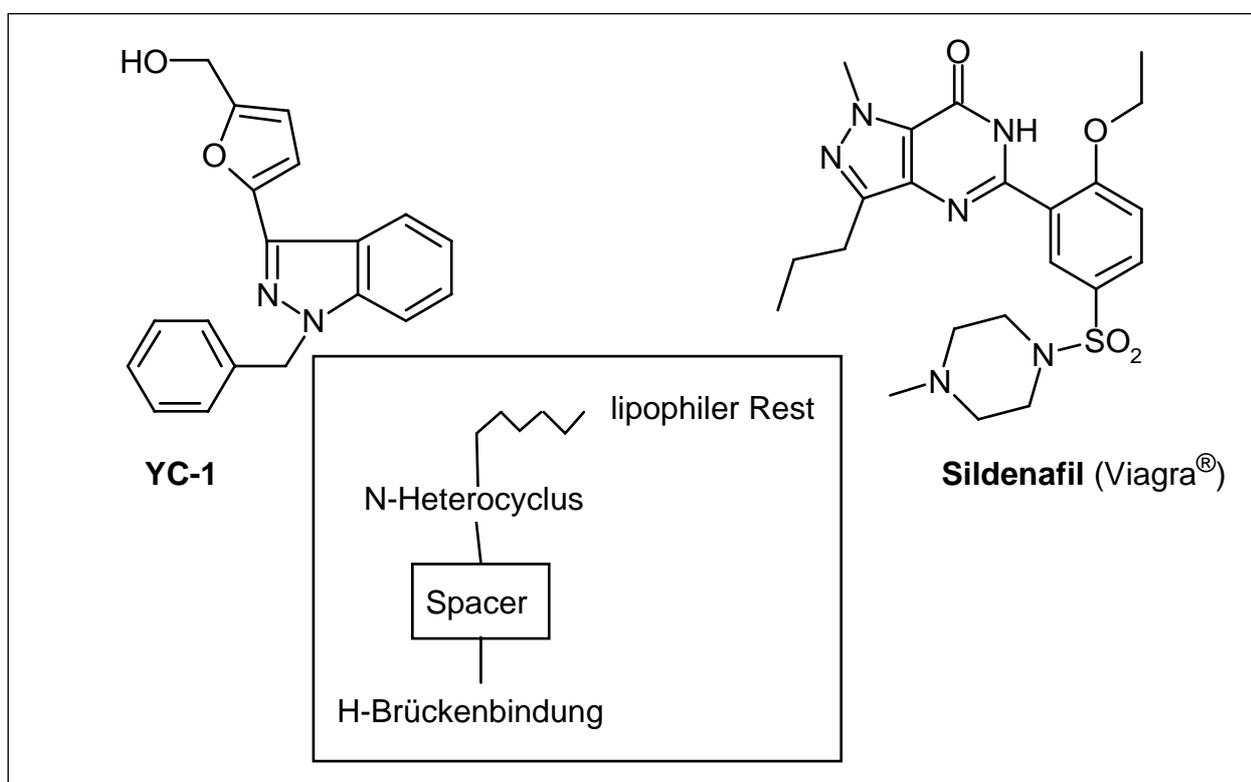
Enzym	Substrat
<b>PDE 2</b> cGMP-stimulierte PDE	cGMP, cAMP
<b>PDE 3</b> cGMP-inhibierte PDE	cAMP
<b>PDE 5</b> cGMP-spezifische PDE	cGMP

Die PDE 5 ist ein Homodimer mit einer Molekularmasse von 190 kDa. In jeder Untereinheit befinden sich N-terminal in der regulatorischen Domain zwei allosterische cGMP-Bindungsstellen und eine Phosphorylierungsstelle (Serin92). In der katalytischen Domain, im Carboxy-Terminus liegen die cGMP-katalytische Bindungsstelle und zwei Zn<sup>2+</sup>-Bindungsmotive<sup>[28-30]</sup>. Das cGMP bindet an die katalytische Seite und erhöht darüber die Bindung von cGMP an die allosterischen Bindungsstellen, die für die Regulierung der Katalyse nötig sind. Bei hohen cGMP-Konzentrationen wird die Phosphorylierungsstelle durch die Aktivierung der allosterischen Bindungsstellen freigelegt und über eine cGMP-abhängige Proteinkinase-katalysierte Phosphorylierung am Serin92 die PDE 5 zusätzlich aktiviert. Die physiologische Bedeutung dieser negativen Feedbackschleife ist noch nicht vollständig geklärt<sup>[30]</sup>.

Die Hemmung der PDE 5 durch Substanzen wie **Zaprinast** führt über die Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Derzeit sind die drei Inhibitoren der PDE 5 **Sildenafil** (Viagra<sup>®</sup>), **Tadalafil** (Cialis<sup>®</sup>) und **Vardenafil** (Levitra<sup>®</sup>) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt. Sie bewirken eine Relaxation der Schwellkörpermuskulatur im Penis.

### 1.3 Zielsetzung

Nach Vergleich von sGC-Aktivatoren wie **YC-1** und PDE-5-Inhibitoren (**Zaprinast**, **Sildenafil** (Viagra<sup>®</sup>)) konnte aufgrund von Strukturverwandtschaften ein Arbeitsschema entwickelt werden, um Substanzen darzustellen, die beide Enzyme beeinflussen (siehe Abb. 4). Im Zentrum steht ein stickstoffreicher Heterocyclus, der mit einem lipophilen Rest (Aromat oder Alkyl-Gruppen) substituiert ist. Außerdem ist das Ringsystem über einen Spacer mit einem H-Brücken-Donor/-Akzeptor verbunden.



**Abb. 4:** Arbeitsschema zur Entwicklung von gemischten sGC-Aktivatoren/PDE 5-Inhibitoren

Ziel dieser Arbeit war es, Substanzen mit Purin-Grundkörper nach dem in Abb. 4 angegebenen Schema zu synthetisieren und auf ihre antiaggregatorischen (*in vitro*) und antithrombotischen (*in vivo*) Eigenschaften zu testen. Die Substanzen sollten über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels, die durch Aktivierung der sGC und/oder Hemmung der PDE 5 ausgelöst werden kann, die Thrombozytenaggregation hemmen. Die Benzyl-Gruppe sollte dabei als lipophiler Rest eingebunden werden. Methylen-Gruppen und benzoide Aromaten sollten überwiegend als Spacer fungieren. Die Wasserstoffbrückenbildung sollte durch Einbringen von Hydroxy-, Ether-, Amino-Gruppen oder basischen Heterocyclen ermöglicht werden.