

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität
München



Entwicklung eines Assays zur Identifizierung von
Inhibitoren im Präsqualen-Abschnitt der
Cholesterolsynthese

Florian Josef Vetter

aus

München

2018

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. F. Bracher betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 29.08.2018

Florian Vetter

Dissertation eingereicht am 30.08.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Vogeser

Mündliche Prüfung am 22.10.2018

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Bracher für die stets großzügige Unterstützung, engagierte und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank den Mitgliedern der Prüfungskommission. Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Vogeser für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Lars Allmendinger und seinem Team für die Anfertigung der NMR-Spektren bedanken. Weiterer Dank gilt auch der Analytikabteilung im Department Chemie um Herrn Dr. Werner Spahl für die Anfertigung von Massenspektren.

Mein weiterer Dank gilt allen Kolleginnen/Kollegen des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit.

Frau Martina Stadler danke ich für ihre zuverlässige Pflege der HL-60 Zellen und dafür, dass sie stets eine kompetente Ansprechpartnerin bei „zellulären Problemen“ war.

Frau Anna Niedrig danke ich für die rege Beteiligung an einer schönen und angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Den Mitgliedern der Kaffeerrunde im 2. Stock danke ich herzlich für die schöne gemeinsame Zeit, großartige Unterhaltungen und das stets freundschaftliche Verhältnis (Dr. Christoph Müller, Dr. Loisl Plodek, Dr. Lars Allmendinger, Eva Plesch, Benedikt Melzer, Christian Aigner, Martin Untergehrer, Nicho Bartl und Martina Luksch). Ebenso danke ich besonders den restlichen Mitgliedern der Mittagsrunde Alex Kamlah, Bernhard Lohrer, Julia Junker, Katharina Thees.

Meinen Eltern, die mich schon immer in allem unterstützt haben, danke ich von größtem Herzen. Ohne sie hätte ich so manches in meinem Leben nicht erreicht. Auch meinen Geschwistern Sebastian, Korbinian und Veronika möchte ich danken - für eine entspannte Zeit auch abseits der Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Anna, die immer für mich da ist und mich stets moralisch und auch fachlich unterstützt hat.

Danke

Veröffentlichungen

- **F. Vetter**, C. Müller, M. Stöckelhuber, F. Bracher, Determination of coumarin in seasonal bakery products using QuEChERS and GC-MS, *Pharmazie* **2017**, 72 (6), 313-316.
- M. Stöckelhuber, C. Müller, **F. Vetter**, V. Mingo, S. Lötters, N. Wagner, F. Bracher, Determination of Pesticides Adsorbed on Arthropods and Gastropods by a Micro-QuEChERS Approach and GC-MS/MS, *Chromatographia* **2017**, 80 (5), 825-829.
- S. Funke, J. Matilainen, H. Nalenz, K. Bechtold-Peters, H.C. Mahler, **F. Vetter**, C. Müller, F. Bracher, W. Friess, Optimization of the bake-on siliconization of cartridges. Part II: Investigations into burn-in time and temperature, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, 105, 209-222.
- **F. Vetter**, J. Pohl, B. Pohl, F. Bracher, Analysis of cefaclor in novel chocolate-based camouflage capsules, *Pharmazie* **2014**, 69 (5), 455-457.
- C. Müller, **F. Vetter**, E. Richter, F. Bracher, Determination of caffeine, myosmine, and nicotine in chocolate by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Food Sci.* **2014**, 79 (2), 251-255.

(Ergebnisse meiner Masterarbeit)

- Publikation zum neu-entwickelten Assay ist in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines zu Cholesterol	1
1.2	Biosynthese von Cholesterol.....	2
1.3	Pharmakologische Bedeutung des Prä-Squalen-Abschnittes der Cholesterolsynthese.....	6
1.4	Bisherige Assays auf Squalensynthese-Inhibition.....	11
2	Themenstellung	15
3	Methodenentwicklung	21
3.1	Variante A: Bestimmung der Hemmung der Produktion von Squalen.....	21
3.1.1	Synthese von Farnesol-D ₆	21
3.1.2	Auswahl geeigneter Inhibitoren für die biologischen Tests	25
3.1.3	Tests mit SQS-Inhibitor	27
3.1.4	Bestimmung der Aufnahme von Farnesol in HL-60 Zellen.....	32
3.1.5	Fazit zur Variante A.....	35
3.2	Variante B: Akkumulation von Farnesol	36
3.2.1	Synthese weiterer SQS-Inhibitoren.....	36
3.2.2	Einsatz von Phosphatasen / Lösung diverser Detektionsprobleme	38
3.2.3	Tests mit Inhibitoren.....	44
3.2.4	Exkurs: Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	47
3.2.5	Erweiterung des Testsystems auf andere Targetenzyme.....	49
3.2.5.1	Geranylgeranylpyrophosphat	51
3.2.5.2	Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat	53
3.2.5.3	Mevalonat.....	63
3.2.6	Fazit zur Variante B	71
3.3	Validierung.....	72

4	Biologische Testung	81
4.1	Testung publizierter, aber nicht etablierter Inhibitoren	81
4.2	Testung von Inhibitoren aus dem Arbeitskreis	89
4.3	Vereinbarkeit von Post- und Präsqalen-Assay	104
5	Zusammenfassung	105
6	Experimenteller Teil	117
6.1	Geräte und Parameter.....	117
6.2	Arbeitsvorschriften.....	119
6.3	Synthesen.....	125
7	Verzeichnisse	137
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	137
7.2	Zusätzlich bearbeitete Projekte.....	141
7.3	Literaturverzeichnis	144

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Cholesterol

Der menschliche Körper enthält ca. 145 g Cholesterol, welches er zum größten Teil selbst herstellt (ca. 1 g pro Tag). Hauptproduktionsorte sind die Leber und der Darm. Lediglich 10 – 30 % des benötigten Cholesterols resorbiert der Körper aus der Nahrung, abhängig davon, wie hoch der momentane Bedarf ist^{1,2}. Über das Blut verteilt sich das Cholesterol im ganzen Körper; etwa ein Drittel wandert in das Gehirn. Da Cholesterol extrem schlecht wasserlöslich ist, findet der Transport über verschiedene Transportproteine statt, welche ihrer Dichte nach unterteilt werden. Die wichtigsten sind: Low-Density-Lipoprotein (LDL) und High-Density-Lipoprotein (HDL)³.

Hauptfunktion von Cholesterol im menschlichen Körper ist die Stabilisierung der Zellmembranen^{3,4}. Nach Einlagerung in die Plasmamembran legt sich Cholesterol zwischen die Fettsäureketten der Phospholipide und verringert an dieser Stelle die Wechselwirkungen der Fettsäureketten untereinander. Je nach Anzahl der Cholesterol-Moleküle wird die Plasmamembran dadurch mehr oder weniger stark flexibel. Zahlenmäßig macht Cholesterol fast die Hälfte aller Membran-Moleküle aus bzw. etwa 20 % der Gesamtmasse⁴. Eine Zellmembran ohne Cholesterol wäre zu rigide und könnte ihre Funktion nicht wahrnehmen. Manche Proteine, die in der Membran lokalisiert sind, benötigen sogar eine direkte Interaktion mit Cholesterol, um funktionieren zu können⁵. Cholesterol ist also ein essentieller Bestandteil der Zellmembran menschlicher Zellen.

Weiterhin stellt Cholesterol den biochemischen Ausgangspunkt für Gallensäuren und viele endokrine Botenstoffe dar: Die Corticoide Cortisol und Aldosteron und die Geschlechtshormone Testosteron, Estradiol, Estriol und Progesteron werden aus Cholesterol hergestellt². 7-Dehydrocholesterol, eine direkte Biosynthesestufe von Cholesterol, ist Ausgangspunkt für die körpereigene Synthese von Vitamin D₃. Ungefähr 500 mg Cholesterol werden jeden Tag in der Leber in Gallensäuren umgewandelt³. Diese sind im Dünndarm dafür verantwortlich, Fette und Cholesterol selbst aus der Nahrung herauszulösen und aufzunehmen.

1.2 Biosynthese von Cholesterol

Die Biosynthese von Cholesterol beginnt mit dem Grundbaustein Essigsäure, das gebunden an Coenzym A als Acetyl-CoA in den Zellen vorliegt^{6,7}. Dieser Thioester wird für viele biochemische Prozesse verwendet – unter anderem für den Aufbau von Fettsäuren und zur Energiegewinnung im Citrat-Zyklus. Die Relevanz des Biomoleküls Acetyl-CoA für die Cholesterolbiosynthese wurde 1951 von Feodor Lynen entdeckt, welcher zusammen mit Konrad Bloch wesentlich an der Aufklärung der Cholesterolbiosynthese beteiligt war. 1964 wurde beiden Forschern dafür der Nobelpreis für Medizin verliehen^{8,9}.

Im ersten Schritt addiert das Enzym Acetyl-CoA-Acetyltransferase in einer katalysierten Claisen-Kondensation ein Acetyl-CoA Molekül an ein weiteres Acetyl-CoA Molekül (Abbildung 1.1). Die HMG-CoA-Synthase transferiert anschließend ein weiteres Acetyl-CoA Molekül und es entsteht der C₆-Körper 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Der nächste Schritt, die Reduktion der Thioester-Gruppe durch die HMG-CoA-Reduktase, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Cholesterolbiosynthese. Hohe Konzentrationen von Farnesol, Lanosterol – zwei Stoffwechselintermediaten der Cholesterolbiosynthese – und Cholesterol selbst hemmen die HMG-CoA-Reduktase und sorgen so für eine Regulierungsmöglichkeit durch negative Rückkopplung. Mevalonat, das Produkt der HMG-CoA-Reduktase vermittelten Reduktion, wird mit Hilfe von Kinasen zweifach phosphoryliert und es entsteht Mevalonatpyrophosphat.

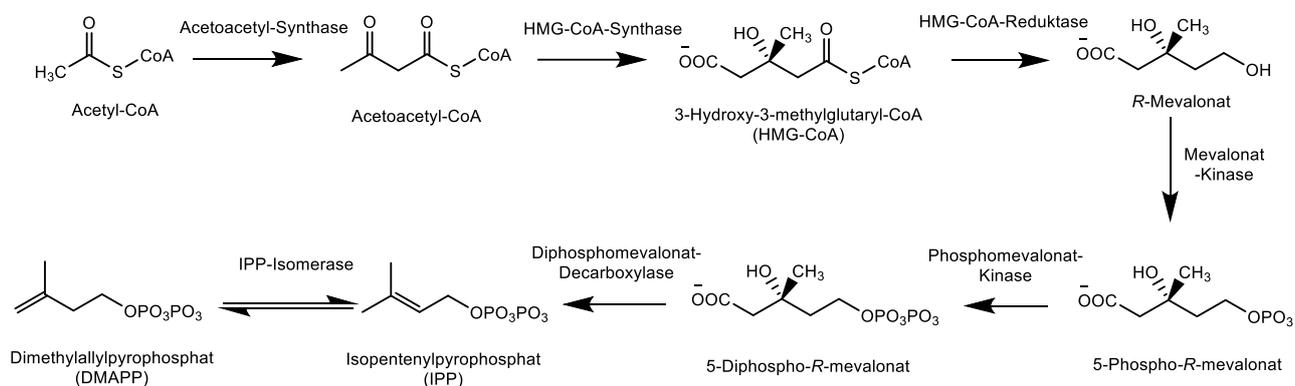


Abbildung 1.1 Mevalonat-Weg

Einleitung

Durch Decarboxylierung entstehen die ersten beiden Isoprenoid-Strukturen (C₅-Körper) Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), welche durch die IPP-Isomerase miteinander im Gleichgewicht stehen. Die Schritte von Acetyl-CoA bis zu den beiden Isoprenoid-Körpern werden auch als „Mevalonat-Weg“ bezeichnet¹.

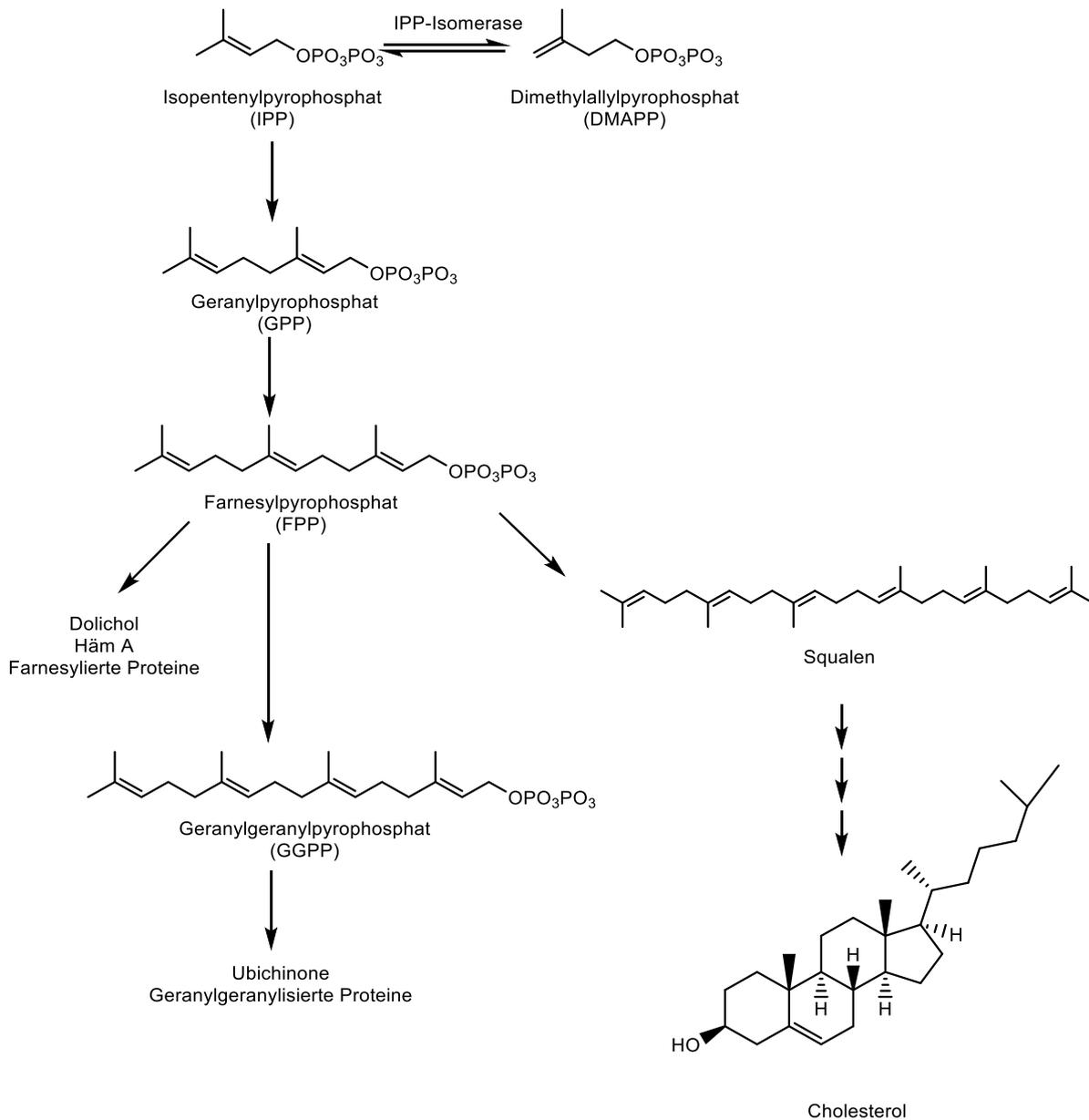


Abbildung 1.2 Isoprenoid-Biosyntheseweg

Zwei IPP-Moleküle und ein Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) werden in zwei Schritten durch dasselbe Enzym (Farnesylpyrophosphatsynthase) über Geranylpyrophosphat (C₁₀) zum C₁₅-Körper (Sesquiterpen) Farnesylpyrophosphat (FPP)

verknüpft. Ab hier verzweigt sich der Stoffwechselweg. Ein Molekül FPP kann mit einem weiteren IPP zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C₂₀) verknüpft werden und beide Isoprenoide (FPP und GGPP) werden zur Prenylierung von Proteinen, einer wichtigen posttranslationalen Modifikation, verwendet¹. Des Weiteren werden Dolichol, Häm A und Ubichinone aus Farnesylpyrophosphat hergestellt. Der größte Teil des FPP wird jedoch zur Biosynthese von Squalen verwendet, welches aus der Schwanz-zu-Schwanz-Kondensation von zwei Molekülen FPP durch das Enzym Squalensynthase entsteht.

Regio- und stereoselektive Oxidation von Squalen durch die Squalenepoxidase liefert Squalenepoxid, welches durch das Enzym Oxidosqualencyclase in einer grandiosen Cyclisierungsreaktion unter Aufbau von 7 Stereozentren zu Lanosterol, dem ersten Molekül mit Steroid-Grundgerüst umgesetzt wird. Dieses Steroid wird durch acht weitere Enzyme schrittweise in Cholesterol umgewandelt (Abbildung 1.3). Für die Reihenfolge, in welcher diese Schritte stattfinden, gibt es zwei Möglichkeiten. Im Bloch-Weg findet die Reduktion der Doppelbindung in der aliphatischen Seitenkette erst am Schluss in der Umsetzung von Desmosterol zu Cholesterol statt. Im zweiten Weg, dem Kandutsch-Russel-Weg, wird die Doppelbindung zuerst reduziert und die weiteren Schritte folgen anschließend. Die Gesamtheit der Biosyntheseschritte bis zum Squalen wird als Prä-Squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese bezeichnet, die Schritte von Squalenepoxid bis zum Cholesterol als Postsqualen-Abschnitt. Während der Prä-Squalen-Abschnitt in den Peroxisomen stattfindet, läuft der Post-Squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese im endoplasmatischen Retikulum ab¹⁰.

Einleitung

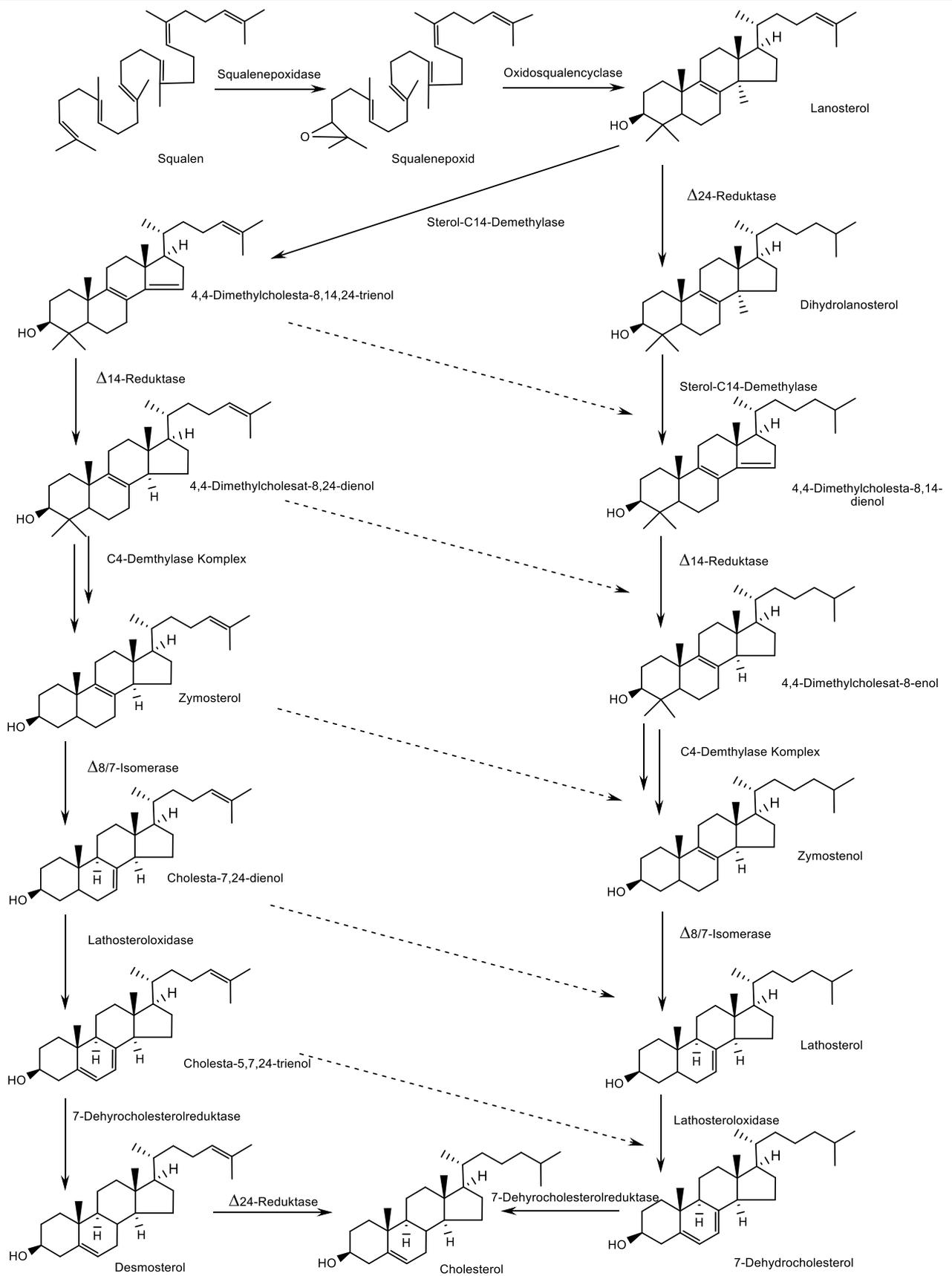


Abbildung 1.3 Überblick über den Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese¹¹

1.3 Pharmakologische Bedeutung des Präqualen-Abschnittes der Cholesterolsynthese

Wird ein beliebiges Enzym innerhalb der Cholesterolsynthese gehemmt, sinkt letztendlich auch der Gehalt an neu gebildeten Cholesterol. Dies kann aus gesundheitlichen Aspekten wünschenswert sein, da ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse und einem erhöhten Cholesterolspiegel existiert. Die Korrelation wird heutzutage noch weiter präzisiert, indem zwischen den verschiedenen Transportformen von Cholesterol unterschieden wird. Als Risiko für Herzinsuffizienz und Herzinfarkt gelten LDL-Werte von über 100 mg/dL, je nach familiärer Disposition und anderen Risikofaktoren. Hohe HDL-Werte wiederum gelten als Risiko senkend (ab 40-60 mg/dL)¹². Da es bisher aber nicht möglich ist, das Verhältnis von LDL zu HDL gezielt zu beeinflussen, werden immer noch Arzneistoffe eingesetzt, welche den Cholesterolspiegel insgesamt senken, wodurch als Folge auch der LDL-Gehalt sinkt. Verwendet werden dazu heutzutage fast ausschließlich die sogenannten Statine (z. B. Atorvastatin, Abbildung 1.4), welche HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren sind¹³. Da die HMG-CoA Reduktase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym innerhalb des gesamten Stoffwechselweges ist, schlägt diese Enzymhemmung, obwohl sie an einer sehr frühen Stelle der gesamten Biosynthese erfolgt, durch auf die Konzentration des Endprodukt des Biosynthese-Weges, das Cholesterol. Als Nebeneffekt wird allerdings auch die Biosynthese sämtlicher anderer Produkte des Isoprenoid-Stoffwechsels gehemmt, also von Dolichol, Ubichinonen, Häm A, etc. Auch die beiden Prenyl-Transferasen FTase und GGTase zur Modifikation von Proteinen können nicht mehr weiter mit den entsprechenden Isoprenoiden versorgt werden.

Um diese Probleme zu umgehen, wurden als geplante Alternative zu Statinen Squalensynthase (SQS)-Inhibitoren entwickelt, welche erst nach dem biochemischen Verzweigungspunkt (Farnesylpyrophosphat) angreifen (siehe Abb. 1.2). Theoretisch sollten solche Wirkstoffe weiterhin den Cholesterolspiegel senken, aber weniger Nebenwirkungen verursachen als die Statine¹⁴. Studien an Zellen, Mäusen und Affen zeigen tatsächlich für diese Inhibitoren im Vergleich zu den etablierten Statinen ein größeres Potential LDL-Cholesterol zu senken, zusammen mit einer besseren Verträglichkeit^{15,16}. Bisher schaffte es jedoch nur ein Wirkstoff aus dieser Klasse in die Phase III von klinischen Studien: Lapaquistat (TAK-475, Abbildung 1.4) von Takeda Pharma. Es konnte eine effektive Cholesterol-Senkung erreicht werden, aber eine

beobachtete Hepatotoxizität der Substanz (zwei Fälle auf über 5100 Probanden) sorgte für den vorzeitigen Abbruch der Studie. Diese Nebenwirkung wird allerdings Lapaquistat als einzelnen Wirkstoff und nicht der gesamten Wirkstoffklasse angelastet, weshalb die Firma weitere Forschung auf dem Gebiet der SQS-Inhibitoren angekündigt hat. Abgesehen davon wurde der Wirkstoff gut vertragen¹⁷.

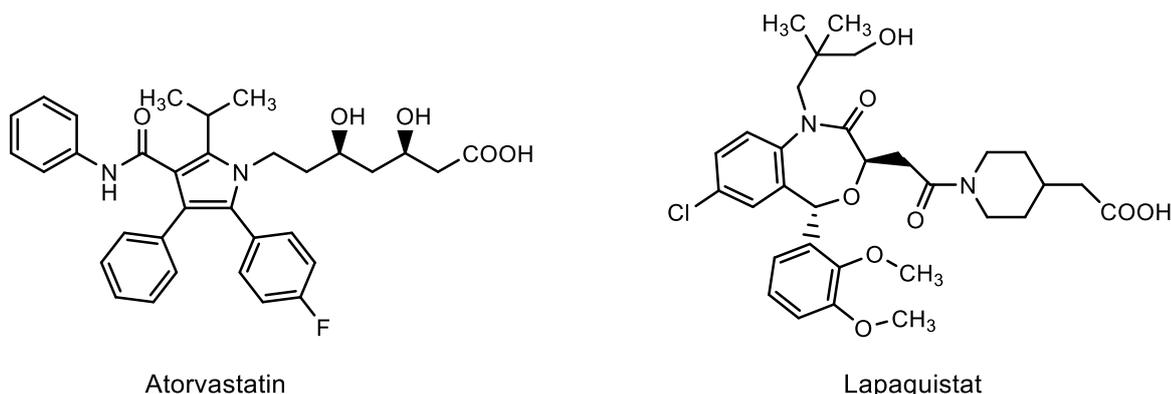


Abbildung 1.4 Strukturformel eines Statins (Atorvastatin) und von Lapaquistat (TAK-475)

Auch die Stoffwechselintermediate Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat haben eine herausragende Bedeutung, da sie in einer posttranslatorischen Modifikation an Proteine gebunden werden können. Etwa 2 % aller Proteine des Menschen besitzen die entsprechende Aminosäuren-Codierung, um von den Prenyltransferasen erfasst zu werden¹⁸. Eine dieser Zielstrukturen ist die Ras-Familie, welche große Bedeutung in der intrazellulären Signaltransduktion und somit, sofern diese gestört ist, auch in der Entstehung von Tumoren hat. Daher werden Farnesyltransferase (FTase)-Inhibitoren zurzeit als potentielle Krebsmedikamente diskutiert. James et al. und Bolick et al. fanden heraus, dass Inhibitoren der Farnesyltransferase die Proliferation entarteter Zellen hemmen und in voll ausgebildeten Krebszellen Apoptose einleiten können^{19,20}. Es wurden bereits erste FTase-Inhibitoren in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit gegen Krebs, hauptsächlich myeloische Leukämie untersucht, z. B. SCH66336 (Phase II, Lonafarnib, Abbildung 1.5)²¹, BMS-214662 (Phase I, Abbildung 1.5)²² und R115777 (Phase II, Tipifarnib, Abbildung 1.5)²³. Dabei zeigte sich eine eher mäßige Wirksamkeit bei geringer Toxizität. Die Autoren schlagen daher eine Kombination mit konventionellen Zytostatika und die Entwicklung selektiverer Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) vor. Im Jahr 2014 konnte für SQS-Inhibitoren ebenfalls das Potential aufgezeigt werden, das Wachstum von Krebszellen und deren Metastasen zu hemmen,

nachdem ein Zusammenhang zwischen Squalensynthese-Aktivität und tumorbegünstigenden Proteinen gefunden wurde²⁴. Auch bei HMG-Reduktase-Inhibitoren konnten Hinweise auf eine Reduktion von krebsrelevanten Proteinen, vermutlich durch die indirekte Hemmung von Prenylierungen, festgestellt werden. Doch bei den Konzentrationen, welche für einen therapeutischen Effekt in der Krebsbehandlung nötig sind, sind Statine zu toxisch, um als Medikament eingesetzt zu werden²⁵.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Inhibitoren der Farnesyltransferase und der Squalensynthese im Vorteil gegenüber den üblichen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren sind, da sie besser verträglich sind. Zwar hemmen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auch indirekt die Prenylierung von Proteinen und die Produktion von Squalen. Aber nachdem sie so früh im Stoffwechselweg angreifen, werden auch die anderen Isoprenoid-Produkte gehemmt (Häm, Dolichol, Ubiquinone), wodurch wiederum Nebenwirkungen entstehen können. Weiterhin wird durch das Abschneiden des Isoprenoid-Nachschubes nach Hemmung der HMG-CoA-Reduktase sowohl die Prenylierung mit Farnesylpyrophosphat als auch mit Geranylgeranylpyrophosphat unselektiv gehemmt. Als Grund für die relativ gute Verträglichkeit von FTase-Inhibitoren wird vermutet, dass die weiterhin stattfindende Geranylgeranylierung den Ausfall der Farnesyl-Protein Modifikation ausgleichen kann. Entartete, mutierte Zellen überexprimieren dagegen vor allem farnesylierbare Proteine, wodurch sie besonders anfällig gegenüber FTIs sind im Vergleich zu nicht-mutierten Zellen²⁶.

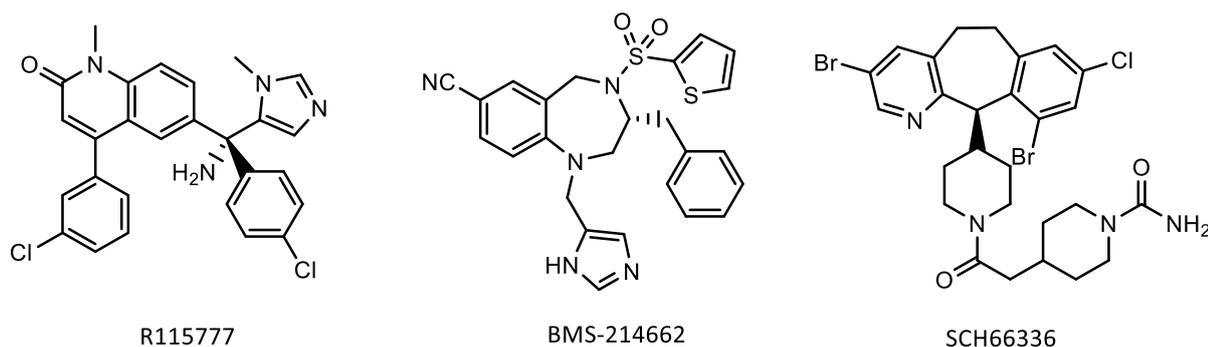


Abbildung 1.5 Strukturen der Farnesyltransferase-Inhibitoren R115777, BMS-214662, SCH66336 (Lonafarnib)

Um die Jahrtausendwende wurde begonnen, den Einfluss einer Modulation der Cholesterolsynthese auf das Vorkommen und Fortschreiten der Alzheimer Krankheit

zu untersuchen. Im Jahr 2000 beobachtete Wolozin in einer epidemiologischen Studie eine geringere Inzidenz von Alzheimer bei Patienten, die mit Statinen therapiert wurden²⁷. Weitere in-vitro und in-vivo Versuche bestätigten, dass eine Hemmung der HMG-CoA mit einer Verminderung von β -Amyloid Plaques und einer erhöhten α -Sekretase-Aktivität einhergeht^{28,29}. In bisherigen klinischen Studien konnte die Anwendung von Statinen aber noch nicht überzeugen, obwohl positive Effekte beobachtet wurden^{30,31}. Eine weitere Möglichkeit, den Abbau von Amyloid Plaques zu fördern, ist der Einsatz von Squalensynthase-Inhibitoren. Kojro et al. konnten 2010 in zellulären Assays zeigen, dass der SQS-Inhibitor Saragossasäure A einen vergleichbaren Effekt auf die α -Sekretase wie das Statin Lovastatin erzielt³². Neben dem Cholesterolspiegel spielt auch die Prenylierung von Proteinen bzw. deren Hemmung eine Rolle in der Pathogenese von Alzheimer^{33,34,35}. Daher wäre es interessant, geeignete HMG-CoA-Reduktase-, SQS- und Prenyltransferase-Inhibitoren zu kombinieren. Statine könnten zwar theoretisch sowohl den Sterolstoffwechsel als auch Proteinprenylierungen auf einen Schlag hemmen, doch ihre Toxizität verhindert den Einsatz der dafür erforderlichen Dosen. Um Proteinprenylierungen über eine HMG-CoA-Reduktase-Inhibition zu beeinflussen, müsste die Reduktase nahezu vollständig gehemmt werden. Dieser Effekt wird mit den für eine Statin-Therapie üblichen, niedrigeren Dosen nicht erreicht, weshalb Prenyltransferase-Inhibitoren die bessere Alternative zur Hemmung von Proteinprenylierungen sind³².

Mit den Bisphosphonaten nimmt eine weitere große Wirkstoffgruppe Einfluss auf den Präqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese. Die stickstoffhaltigen Bisphosphonate (Alendronsäure, Ibandronsäure), auch als „Bisphosphonate der 2. Generation“ bezeichnet, stellen eine wichtige Säule in der Therapie der Osteoporose dar. Sie hemmen vor allem die Farnesylpyrophosphat-Synthase^{36,37,38}, in gewissem Ausmaß auch die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase³⁹. Der für die Bisphosphonat-Wirkung ausschlagende Effekt ist jedoch nicht die Senkung des Cholesterolspiegels, sondern die Hemmung der Geranylgeranylierung von Proteinen (Rho, Rac, Cdc 42)^{40,41}. Dies erfolgt indirekt durch die Hemmung der FPP-Synthase, wodurch nicht mehr genügend Geranylgeranylpyrophosphat für die Proteinmodifikationen gebildet werden kann. Zwar sind einige Bisphosphonate gleichzeitig auch direkte Geranylgeranyltransferase Inhibitoren, jedoch ist die Hemmung nur schwach im Vergleich zu ihrer Haupthemmung der FPP-Synthase⁴².

Doch nicht nur in gesunden und in Krebs-Zellen finden Proteinprenylierungen statt; auch Viren nutzen Prenylierungen. Das Hepatitis-D-Virus (HDV) lässt sich von der befallenen Wirtszelle das virale „Large Delta Antigen“ (LHDAg) farnesylieren, welches notwendig ist, um neue Viruspartikel zu bilden⁴³. Ausgehend von diesem Ansatz infizierten Bordier et al. Hepatozyten mit HDV und gaben gleichzeitig den Farnesyltransferase Hemmer FTI-277 (Abbildung 1.6) hinzu. Das Resultat war eine Hemmung der Viruspartikelproduktion und eine Reduzierung der Gesamt-Virusmenge⁴⁴. 2015 bewies eine Phase 2-Studie von Koh et al. eine signifikante Reduktion der Viruslast am Menschen nach Gabe FT-Inhibitors Lonafarnib (Abbildung 1.5)⁴⁵. Park et al. fanden heraus, dass die Vermehrung von Hepatitis-C-Viren (HCV) abhängig von Farnesyltransferasen ist. Auch hier beeinträchtigte ein siRNA-vermittelter Knock-Down des FT-Gens (FDFT1) die Fähigkeit der Viren, sich innerhalb der Wirtszelle zu replizieren und der Einsatz des FT-Inhibitors YM-53601 (Abbildung 1.6) verhinderte die Produktion weiterer Viren innerhalb von Zellen⁴⁶.

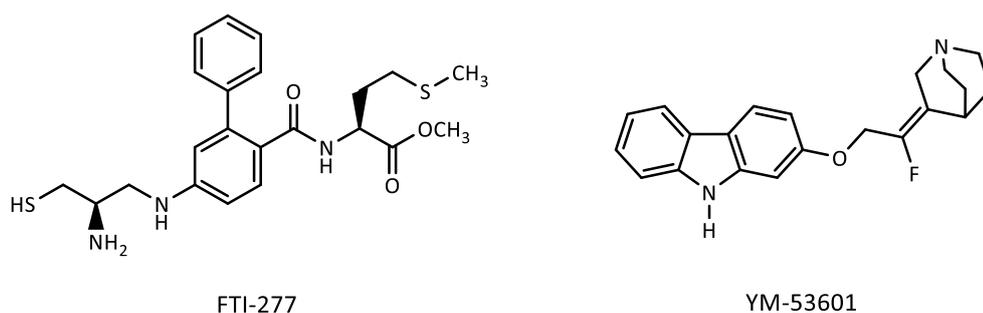


Abbildung 1.6 Strukturformel des Farnesyltransferase-Inhibitors FTI-277 und des Squalensynthase-Inhibitors YM-53601

Bei der Chagas-Krankheit befällt der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi* über den Biss der Raubwanze den Menschen. Unbehandelt kann die Chagas-Krankheit bei bis zu 10 % der Betroffenen tödlich enden. 2004 setzten Urbina et al. erfolgreich die beiden Squalensynthase-Inhibitoren E5700 und ER-119884 (Abbildung 1.7) gegen den Parasiten *in vitro* und *in vivo* ein⁴⁷. Es folgten weitere Studien von Sealey-Cardona et al. (2007)⁴⁸ und Shang et al. (2014)⁴⁹ zur Entwicklung selektiver Inhibitoren der Squalensynthase von *T. cruzi*, um bei einer Therapie keine Nebenwirkungen durch unselektive Hemmung an der Wirts-SQS zu verursachen.

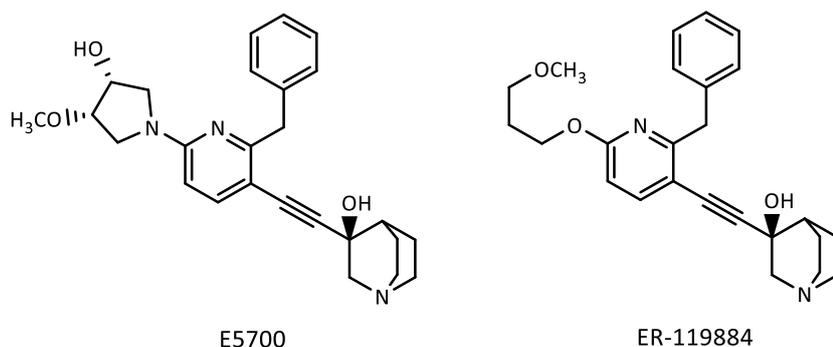


Abbildung 1.7 Strukturformeln der Squalensynthase-Inhibitoren E5700 und ER-119884

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Prä-Squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese im Zusammenhang mit verschiedensten Erkrankungen pharmakologisch höchst interessant ist. Es lohnt sich daher, Bemühungen in die Entwicklung neuer, selektiver und starker Inhibitoren zu investieren. Grundvoraussetzung für eine effektive Wirkstoffentwicklung ist natürlich, dass aussagekräftige Assays zur Charakterisierung neuer Wirkstoffkandidaten zur Verfügung stehen.

1.4 Bisherige Assays auf Squalensynthase-Inhibition

Um Inhibitoren zu entwickeln, wird ein Testsystem benötigt, mit welchem festgestellt werden kann, welches Enzym wie stark gehemmt wird. Für diese Testsysteme gibt es zwei grundlegende Ansätze: Man kann entweder die interessierenden Enzyme isolieren und *in vitro* die Inhibition durch die Testsubstanzen messen, oder man analysiert die Inhibition in metabolisch aktiven, lebenden Organismen. Im letzteren Fall können entweder Zellkulturen oder lebende Tiere verwendet werden (*in vivo*). Tierversuche werden aufgrund ihrer Kosten, des Aufwandes für ihre Genehmigung und aus ethischen Gründen in der Forschung jedoch nur in fortgeschrittenen Studien verwendet. Erst wenn ein Inhibitor bereits identifiziert und erste toxikologische und pharmakokinetische Daten bekannt sind, macht es Sinn, das jeweilige Molekül einem Versuch an höheren lebenden Wesen zu unterziehen.

Den ersten enzymatischen Test auf Inhibition der Squalensynthase haben 1988 C. D. Poulter et al. entwickelt⁵⁰. Hierbei wurde statt des isolierten Enzyms ein Mikrosomen-

Extrakt verwendet, welcher mit ^{14}C -Farnesylpyrophosphat und den potentiellen Inhibitor inkubiert wurde. Anschließend wurde das Metabolitengemisch mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Farnesol- und Squalen-Banden mit einem Szintillationszähler vermessen. Über das Verhältnis der Menge von enzymatisch produziertem Squalen zu seinem Präkursor Farnesol kann das Ausmaß der Inhibition der Squalensynthese quantifiziert werden. 1993 entwickelte Zhang einen enzymatischen Assay zur Detektion der Inhibition der Geranylgeranylsynthese und der Squalensynthese, welcher erstmals ohne radioaktive Isotope auskam⁵¹. Zur Detektion der Isoprenoide wurde dafür die LC-MS verwendet. Allerdings musste jedes Enzym einzeln gemessen werden, wodurch die Identifizierung des Zielenzyms bei unbekanntem Inhibitoren mühsam wird.

Die Inhibitorwirkung mithilfe des isolierten Enzyms zu charakterisieren, hat Vor- und Nachteile. Versuche an isolierten Enzymen zeigen zuverlässig eine Inhibition des Zielenzyms an, unabhängig von anderen Einflüssen wie Membrangängigkeit der Testsubstanz, Stoffwechsel der Zelle oder simultane Hemmung anderer Enzyme. Sobald ein Inhibitor das Enzym kompetitiv oder irreversibel hemmt, sinkt die Umsetzung zum Produkt der enzymatischen Reaktion im Vergleich zur Kontrolle ab. Im Gegenzug lassen sich diese Ergebnisse nicht immer problemlos auf lebende Organismen übertragen. Es besteht die Möglichkeit, dass der Inhibitor zu schnell verstoffwechselt wird, gar nicht erst durch die Zellmembran zum Zielenzym gelangt oder zu toxisch für die Zellen oder das Lebewesen ist. Die gemessenen Werte sind für das analysierte Enzym zwar korrekt, therapeutisch aber oft irrelevant.

Bei zellulären und *in-vivo* Testsystemen gibt es eine Reihe dieser Nachteile nicht. Potentielle Inhibitoren werden direkt auf die Zellen gegeben und eine Inhibition kann nur gemessen werden, wenn die Moleküle in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen und innerhalb der Zellen an den Zielort zu gelangen. Auch erste Informationen über die Toxizität lassen sich durch Beobachtung des Zellwachstums (bzw. dessen Beeinträchtigung) gewinnen. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich durch geeignete Analytik die Hemmung mehrerer Enzyme simultan analysieren lässt. Durch solche Multi-enzym-Assays können unbekannte und nicht-spezifische Inhibitoren schneller und umfassender charakterisiert werden. So kann auch vermieden werden, dass Substanzen als Inhibitoren eines bestimmten Enzyms publiziert (und von anderen Forschern im guten Glauben verwendet) werden, obwohl sie in Wirklichkeit mehrere Enzyme des interessierenden Stoffwechselweges hemmen. Der Nachteil eines solchen Assays ist, dass

bei Substanzen, die mehrere Enzyme eines Stoffwechselweges hemmen, häufig nur der Effekt auf das erste dieser Enzyme zu beobachten ist, weil durch diese Hemmung die Substrate für die späteren Targetenzyme entzogen werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass bei einem negativen Ergebnis nicht klar ist, weshalb keine Aktivität zu beobachten war. Wenn das Molekül eigentlich das Zielenzym hemmen könnte, dort aber aus pharmakokinetischen Gründen nicht angelangt, zeigt das zelluläre Testsystem ebenfalls keinen Treffer an – auch wenn das Molekül das isolierte Enzym durchaus hemmt und durch leichte Abwandlung in seiner Struktur interessant werden könnte.

Den ersten *in vivo* Assay für den Prä-Squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese entwickelten 1988 E. Bruenger und H. C. Rilling⁵². Sie quantifizierten IPP und FPP in Mäusen, indem sie die Isoprenoide aus Leberextrakten der Mäuse mittels Festphasenextraktion (SPE) isolierten und aufreinigten. Die Detektion durch einen Szintillationszähler erfolgte nach enzymatischer Kopplung von radioaktiven Substraten an die isolierten Isoprenoide. Einen ähnlichen Assay publizierten F. McTaggart et al. 1996⁵³. Hierbei wurde untersucht, welchen Einfluss die Squalensynthese Inhibitoren 3-(Biphenyl-4-yl)quinuclidin und 3-(Biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidin auf die Isoprenoidspiegel von Isopentenylpyrophosphat, Geranylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat in Mäuseleber hat. Es wurde radioisotopenmarkiertes Mevalonat an die Mäuse verfüttert und die Isoprenoide nach Aufarbeitung mit einem Szintillationszähler quantifiziert. Ebenfalls 1996 entwickelte R. K. Keller den ersten Assay zur Quantifizierung von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, welcher ohne Einsatz von radioaktiven Isotopen und Szintillationszähler auskommt, sondern stattdessen HPLC-UV verwendet⁵⁴. Nachteil dieser Methode ist, dass immer noch mit Mäuseleber gearbeitet wird und somit mit jedem Experiment lebende Mäuse in einem Tierversuch eingesetzt werden. 2003 analysierte L. Song den Farnesylpyrophosphatgehalt in einem zellulären Testsystem genmodifizierter Hefezellen mittels GC-MS⁵⁵. 2008 publizierten Hennemann et al. einen Assay basierend auf HepG2 Zellen, welcher acht verschiedene Intermediate des Mevalonat- und Isoprenoid-Stoffwechsels abdeckt⁵⁶. Da die Detektion mittels LC-MS erfolgte, mussten die verschiedenen Phosphatester nicht gespalten werden und konnten direkt analysiert werden. Eine besondere Erwähnung verdient der Farnesylpyrophosphat- und Geranylgeranylpyrophosphat-Assay von Tong aus dem Jahr 2005⁵⁷. Dies ist der erste zelluläre Assay, welcher in der Lage ist, die Isoprenoide FPP und GGPP in ihren sehr niedrigen physiologischen, nicht-akkumulierten Konzentrationen zu detektieren. Durch

Einsatz von Prenyltransferasen werden die beiden Isoprenoide auf fluoreszenzmarkierte Polypeptide übertragen, mittels HPLC getrennt und mit einem gekoppelten Fluoreszenzdetektor analysiert.

2 Themenstellung

Die Cholesterolsynthese und ihre Inhibitoren spielten im Arbeitskreis Bracher schon lange eine große Rolle. Auf der einen Seite wurden viele verschiedene, selektive Inhibitoren für den Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese synthetisiert, unter anderem MGI-39, der erste selektive Inhibitor der Lathosteroloxidase⁵⁸. Auf der anderen Seite wurde ein geeignetes Testsystem entwickelt, um neu synthetisierte Moleküle auf ihre Wirkung auf die Cholesterolsynthese zu erforschen⁵⁹. Dieser zelluläre Assay basiert auf HL-60 Zellen (humane Leukämiezellen) und der Analyse der durch den Inhibitor verursachten Änderung im Sterolmuster der Zellen (Akkumulation spezieller Intermediate der Cholesterolsynthese mittels GC-MS). Zur Probenaufarbeitung dient vor allem eine Flüssig-Flüssig-Extraktion und eine dispersive Festphasenextraktion (dSPE). Je nach Art und Menge des/der akkumulierten Metaboliten kann man auf das gehemmte Enzym (bzw. mehrere Enzyme) schließen, da sich im Idealfall jeweils das Substrat des entsprechenden Enzyms akkumuliert. Um die Hemmung zu quantifizieren, wird ein IC_{50} -Wert bezogen auf den Gesamt-Cholesterolgehalt berechnet. Dazu werden die Zellen mit isotoopenmarkiertem, nicht radioaktivem Acetat (^{13}C -Acetat) gefüttert. Wenn die Zellen nach 24 h geerntet werden, ist eine gewisse Menge an isotoopenmarkiertem Cholesterol entstanden. Falls zusätzlich ein Hemmstoff eines Enzyms der Cholesterolsynthese dazugegeben wurde, sinkt die Menge an isotoopenmarkiertem, also neu synthetisiertem Cholesterol ab und je stärker diese Konzentration absinkt, desto stärker ist auch der Inhibitor. Dieser Aufwand ist deshalb nötig, weil Cholesterol als essentieller Bestandteil der Zellmembran auch schon vor der Inkubation mit dem Inhibitor im Zellextrakt zu finden ist. Dieser Assay erfasst aber nur Enzyme des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterolsynthese.

Bei Substanzen aus der Dissertation von Annette Wolfgardt, die als Inhibitoren der Oxidosqualencyclase (OSC) geplant waren, ergaben sich jedoch auffällige Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Testungen in dem beschriebenen zellulären Assay und in einem enzymatischen Assay (Tabelle 2.1). Auf der einen Seite zeigten die besten Substanzen eine sehr starke Hemmung der Gesamt-Cholesterolsynthese mit IC_{50} -Werten zwischen 0,011 - 0,172 μ M. Als einzig gehemmtes Enzym des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterolsynthese wurde in dem zellulären Assay die Oxidosqualencyclase (OSC) identifiziert. In einer Kooperation mit Prof. Balliano (Universität Turin, Italien) wurden zusätzlich die Substanzen in einem enzymatischen

Themenstellung

Testsystem an der isolierten OSC getestet. Dabei wurde ein Zellhomogenisat aus Hefezellen, welche die humane OSC exprimieren, und radiomarkiertes 2,3-Oxidosqualen als Substrat verwendet. Dieser Assay erfasst also ausschließlich die Wirkung der Substanzen auf das Enzym OSC.

Die Testung am isolierten Enzym liefert normalerweise „wahre“ Werte, weil die Substanz nicht durch die Zellmembran dringen muss und toxische Nebeneffekte oder Nebenreaktionen keine Rolle spielen. Im zellulären Assay des AK Bracher kann ein selektiver Inhibitor des gleichen Enzyms einen vergleichbaren IC_{50} -Wert liefern, sofern die Substanz voll membrangängig ist und der Hemmeffekt bis auf die Gesamtbiosyntheserate von Cholesterol durchschlägt. Beispiele hierfür sind die Verbindungen AW-152, MK2-64 und MK2-90 aus Tabelle 2.1, die somit als selektive Inhibitoren der OSC identifiziert waren.

Verbindung	IC_{50} im zellulären Assay (μ M bezogen auf Hemmung der Cholesterolbiosynthese)	IC_{50} im enzymatischen Assay (μ M an der OSC)
AW93	0,011	2,3
AW98	0,097	2,7
AW111	0,14	4,22
AW124	0,172	5,01
AW138	0,017	2,5
AW152	0,26	0,51
AW166	0,125	1,25
MK2-44	0,68	5,28
MK2-64	1,1	2,06
MK2-86	0,37	10
MK2-87	2,14	2,51
MK2-89	1,32	8,51
MK2-90	1,29	2,06

Tabelle 2.1 Ausgewählte OSC-Inhibitoren aus dem AK Bracher und ihre Hemmung der Cholesterolbiosynthese (im Ganzzell-Assay) bzw. des Enzyms Oxidosqualencyclase (OSC) in vitro.

Bei den Verbindungen AW93 und AW138 liegt der IC_{50} -Wert im zellulären Assay jedoch um den Faktor 209 bzw. 147 niedriger als im enzymatischen Assay an der OSC. Dies ist sehr ungewöhnlich, da wie oben erwähnt, im zellulären Assay als einziges Zielenzym die OSC identifiziert wurde. (Abbildung 2.1).

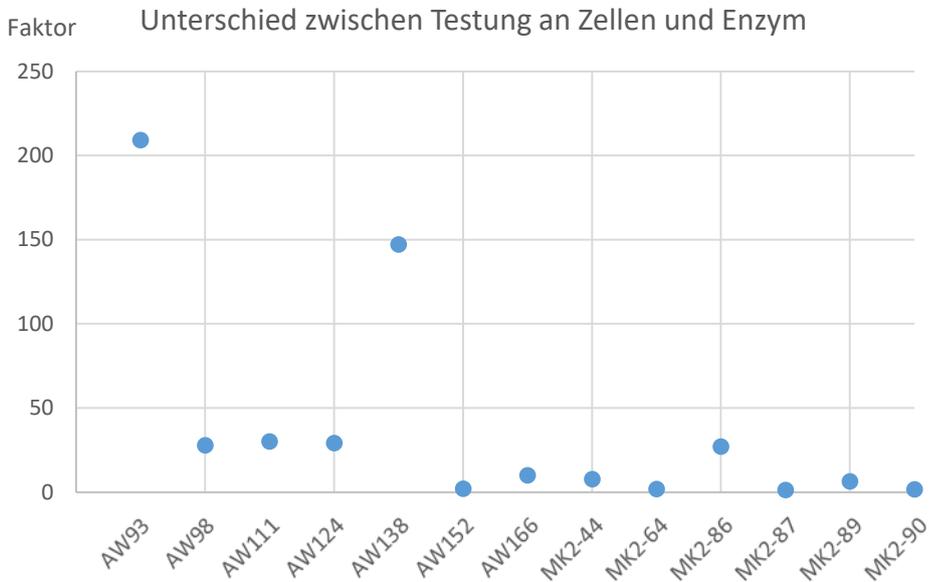


Abbildung 2.1 Verschiedene OSC-Inhibitoren und der jeweilige Unterschied zwischen dem Ergebnis im zellulären- und im enzymatischen Testsystem. Der angegebene Faktor berechnet sich aus dem Quotienten aus zellulären IC_{50} und enzymatischen IC_{50} .

Für diese Diskrepanzen gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte es sein, dass die Inhibitoren im Sinne einer zytotoxischen oder zytostatischen Nebenwirkung das Wachstum der HL-60 Zellen gebremst haben. Da pro Experiment 1 Million Zellen ausgesät werden, welche stets gleiche Mengen an Cholesterol synthetisieren, würde eine Reduktion der Zellzahl auch ohne Biosynthese-Hemmung einen verminderten Gehalt an neu-synthetisiertem Cholesterol zur Folge haben. Eine Substanz, die das Enzym Oxidosqualencyclase hemmt, aber schon in einer niedrigeren Konzentration toxisch auf die Zellen wirkt, würde ein ähnliches Verhalten zeigen wie AW93 und AW138. Allerdings werden in dem zellulären Assay des Arbeitskreises Bracher alle gemessenen Konzentrationen über die Proteinmenge am Ende des Versuches korrigiert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine eventuelle Toxizität der jeweiligen Inhibitoren die Diskrepanzen zwischen den Testsystemen verursacht hat.

Die andere, plausiblere Möglichkeit ist, dass die beiden Substanzen AW93 und AW138 zusätzlich zur OSC und mit dem Faktor >100 höherer Potenz auch noch ein weiteres Enzym (oder mehrere) der Cholesterolsynthese hemmen. Das würde erklären warum der Cholesterolgehalt sinkt, obwohl die Konzentration noch gar nicht für eine OSC-Hemmung ausreicht. Dieses unbekannte Enzym muss sich im Prä-Squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese befinden, da der bisherige Assay nur kompletten Postsqualen-Abschnitt abdeckt und für den Prä-Squalen-Abschnitt „blind“ ist.

Um das Targetenzym dieser hoch potenten Cholesterolsynthese-Inhibitoren zu identifizieren, wurde somit ein neues Testsystem benötigt, welches möglichst viele Enzyme des Prä-Squalen-Abschnittes der Cholesterolsynthese abdeckt.

Ein derartiges Testsystem zu entwickeln war das Ziel dieser Doktorarbeit. Dabei sollte das wichtigste Zielenzym zunächst die Squalensynthase (SQS) sein, das letzte Enzym des Prä-Squalen-Abschnitts, welche zwei Einheiten Farnesylpyrophosphat zu Squalen umwandelt. Bei Erfolg sollte der Assay „upstream“ auf weitere Enzyme ausgeweitet werden. Wenn möglich, sollte das Instrumentarium des schon etablierten, auf GC-MS basierende Testsystems (auf Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts) verwendet und modifiziert werden, sodass im besten Fall beide Testsysteme parallel genutzt oder sogar vereinigt werden können.

Abschließend sollte der Assay zur Testung verschiedener Testsubstanzen des Arbeitskreises Bracher angewendet werden, inklusive der oben beschriebenen Inhibitoren von Annette Wolfgardt.

Der Plan für den neuen SQS-Assay

Variante A: Messung des Absinkens des Gehaltes an neugebildetem Squalen nach SQS-Hemmung

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, die Hemmung eines Enzyms zu quantifizieren. Entweder misst man nach Inkubation mit dem Inhibitor die Akkumulation des Substrats oder man misst die Abnahme der Menge an Produkt der Enzymreaktion (bei der SQS wäre dies Squalen, siehe Abbildung 2.2). Ist das Produkt der enzymatischen Umsetzung allerdings ein Intermediat einer längeren Biosynthese (und das ist bei der SQS der Fall!),

so wird dieses Produkt typischerweise vom nächsten Enzym „downstream“ schnell (und meist auch praktisch quantitativ) zu Folgemetaboliten umgesetzt. Die Quantifizierung derartiger Intermediate stellt somit eine große Herausforderung dar.

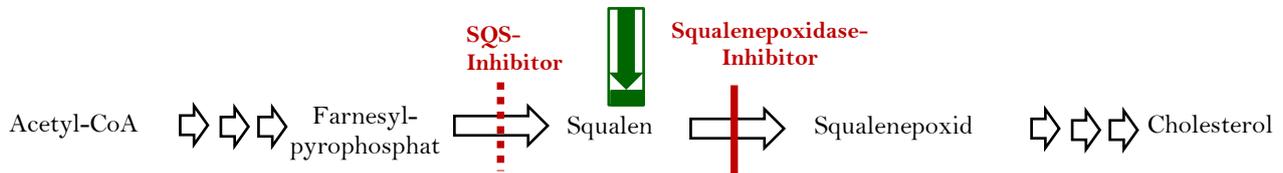


Abbildung 2.2 Prinzip des geplanten SQS-Assays nach Variante A

Falls die Menge an natürlich gebildeten bzw. nach Inkubation mit einem SQS-Inhibitor akkumulierendem Squalen innerhalb der Zellen nicht ausreicht, um ein ausreichendes Signal in der GC-MS zu verursachen, kann optional ein Squalenepoxidase-Inhibitor zusätzlich verwendet werden. Durch die (idealerweise quantitative) Blockade dieses Enzyms, welches Squalen in Squalenepoxid umwandelt, steigt der Squalengehalt in der Zelle und somit das Signal in der GC-MS stark an. Falls dann zusätzlich die zu testende Substanz die Squalensynthese hemmt, sinkt die Konzentration des Squalens wieder ab. Problematisch ist, dass theoretisch jede Hemmung eines beliebigen Enzyms in der Cholesterolsynthese (vor der Squalensynthese) diese Reduktion an akkumuliertem Squalen verursachen könnte. Eine Lösung dieses Problems bietet die Verwendung von isotope markiertem Farnesol. Durch Verfüttern dieses isotope markierten Substrats der SQS lässt sich gezielt der Effekt des Inhibitors auf die Squalensynthese untersuchen. Denn nur wenn der Gehalt an isotope markiertem Squalen, welches nur aus isotope markiertem Farnesol entstehen kann, abnimmt, ist das Enzym Squalensynthese von der Hemmung betroffen. Falls der Gesamt-Squalengehalt abnimmt, die Menge an markierten Squalen aber gleich bleibt, wurde hingegen die Cholesterolsynthese in einem der Schritte vor der Squalensynthese gehemmt. Auf diese Weise sollte sich durch die Verwendung von isotope markiertem Farnesol und einem Squalenepoxidase-Inhibitor ein zelluläres Testsystem konstruieren lassen, welches Hemmwirkungen auf die Squalensynthese anzeigen kann.

Variante B: Messung der Akkumulation von Farnesol nach SQS-Hemmung

Eine andere Herangehensweise entspricht dem Vorgehen zur qualitativen Bestimmung der Hemmwirkung und Identifizierung des Zielenzyms im bisherigen Assay. Statt über das Absinken der Produkt-Konzentration wird die Enzymhemmung über den Anstieg der Substrat-Konzentration charakterisiert. Übertragen auf den anvisierten Squalensynthese-Assay steigt die intrazelluläre Konzentration von Farnesylpyrophosphat an, wenn die Squalensynthase durch einen Inhibitor gehemmt wird (Abbildung 2.3).

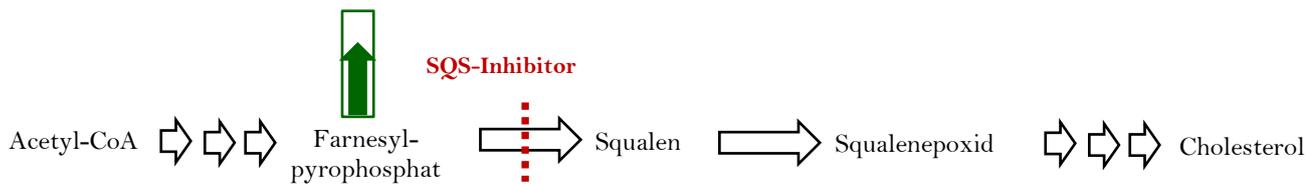


Abbildung 2.3 Prinzip des geplanten SQS-Assays nach Variante B

Positiver Nebeneffekt dieses Assays sollte sein, dass sich zusätzlich eine Quantifizierung der Hemmwirkung über die Messung der Abnahme an neu gebildeten Cholesterols durchführen lassen sollte (dies ist bei Variante B nicht möglich, da schon der zusätzlich einzusetzende Squalenepoxidase-Inhibitor zu einer Absenkung des Cholesterolspiegels führt).

Mit diesem Assay sollten sich (wie auch mit dem etablierten Assay) mehrere Enzyme auf einmal untersuchen und unter Umständen simultane Hemmungen an unterschiedlichen Enzymen registrieren lassen.

Eine Herausforderung bei diesem Assay ist, dass der zu vermessende Analyt Farnesylpyrophosphat nicht direkt mittels GC-MS zu vermessen ist.

Daher wurde zunächst der Entwicklung des SQS-Assays nach Variante A Vorrang gegeben, falls größere Probleme auftreten sollten, könnte auf Variante B umgeschwenkt werden.

3 Methodenentwicklung

3.1 Variante A: Bestimmung der Hemmung der Produktion von Squalen

Zur Entwicklung eines Squalensynthese-Assays basierend auf Variante A wird isotopenmarkiertes Farnesol benötigt. Ohne entsprechendes Substrat der Squalensynthese liefert der Assay kein selektives Ergebnis, sondern lediglich die grundsätzliche Aussage, dass eine Hemmung vor der Squalenepoxidase stattgefunden hat. Ein häufig verwendetes Substrat für diesen Zweck ist Farnesol-d₆. Es enthält genügend Deuterium, um eine ausreichende Massenverschiebung gegenüber undeutertem Farnesol zu verursachen. Weiterhin kann es wesentlich leichter die Zellmembran passieren als seine phosphorylierte Variante. Zwar wird von dem Zielenzym innerhalb der Zelle, der Squalensynthese, nur zweifach phosphoryliertes Farnesol verarbeitet, aber mehrere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass das freie Farnesol durch intrazelluläre Kinasen in Farnesylpyrophosphat umgewandelt werden kann^{60,61,62}. Das benötigte Farnesol-d₆ wurde aus Farnesol synthetisiert, da es nicht käuflich erwerbbar war.

3.1.1 Synthese von Farnesol-d₆

Die Darstellung von Farnesol-d₆ (**8**) orientierte sich an der Arbeit von J. S. de Ropp und F. A. Troy, welche bereits 1984 Geraniol und Farnesol in die jeweiligen Deuteriummarkierten Verbindungen umwandelten⁶³. Nach der dort beschriebenen Strategie wird zuerst die distale Doppelbindung oxidativ gespalten und dann der resultierende Aldehyd in einer Wittig-Reaktion mit einem isotopenmarkierten Isopropyl-Baustein wieder verknüpft, so dass der deuterierte Naturstoff resultiert (Abbildung 3.1).

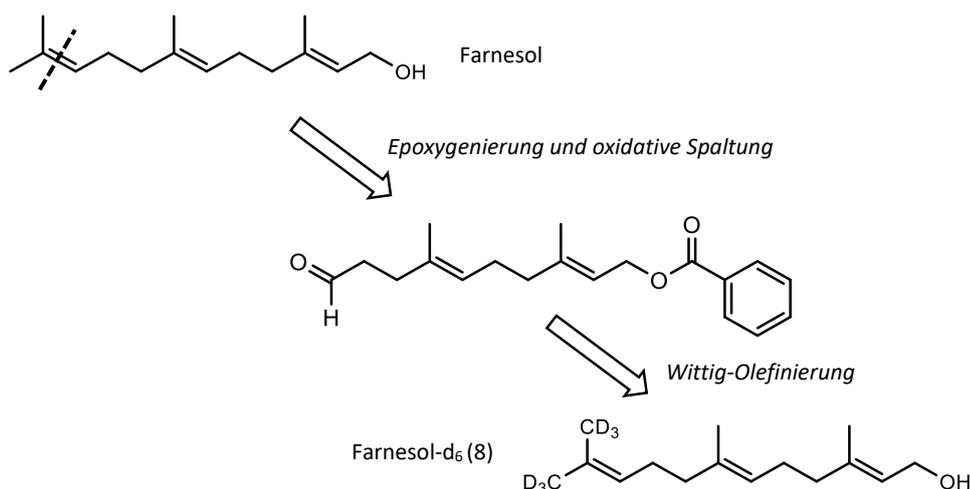


Abbildung 3.1 Syntheschema zur Darstellung von sechsfach deuteriertem Farnesol (8) nach J. S. Ropp und F. A. Troy

Für die tatsächlich hier durchgeführte Synthese wurden jedoch teils modernere Synthesemethoden für einzelne Schritte verwendet. Ausgangsstoff für die Synthese ist Farnesol, welches als Isomerengemisch kommerziell erhältlich ist. Zwar kommt im menschlichen Körper nur *E,E*-Farnesol vor, jedoch sollten die anderen Doppelbindungsisomere die späteren Untersuchungen kaum stören, da sie auch keine negativen Wirkungen auf die Zellen haben⁶⁴. Da isomerenreines Farnesol wesentlich teurer ist als das Isomerengemisch, wurde zuerst das Isomerengemisch für die Synthese und die ersten biologischen Tests verwendet.

Die ersten Schritte der D₆-Farnesol Darstellung bis zum Zwischenprodukt 9-(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)-2,7-dimethylnona-2,6-dien-1-ylacetat (4) wurden nach R. P. Hanzlik durchgeführt⁶⁵ (Abbildung 3.2). Zuerst wird eine Acetat-Schutzgruppe eingeführt (2). Anschließend wird eine selektive Bromhydrinierung an der distalen Doppelbindung durchgeführt (3) und durch Behandlung mit einer Base ein Epoxid gebildet (4). Durch die hierfür verwendete methanolische Kaliumcarbonat-Lösung wird aber auch die Acetat-Schutzgruppe abgespalten, so dass diese durch Umsetzung mit Acetanhydrid/Pyridin wieder angefügt werden muss (5). Im nächsten Schritt wird nach einer Methode von Labadie⁶⁶ der Epoxid-Ring durch Periodsäure oxidativ geöffnet und es entsteht der Aldehyd 6. Schließlich wird der mühevoll abgespaltene Isopropenyl-Rest durch eine Wittig-Reaktion wieder angefügt, nur dieses Mal in einer deuterierten Variante. Als Vorschrift diente eine Methode von Comeskey et al. aus dem Jahr 2006⁶⁷. Zwar verwendet

Comeskey Geraniol statt Farnesol als Edukt, aber die Strukturunterschiede sind so gering, dass sich die Vorschrift erfolgreich übertragen ließ. Das Wittig-Reagenz für die Reaktion

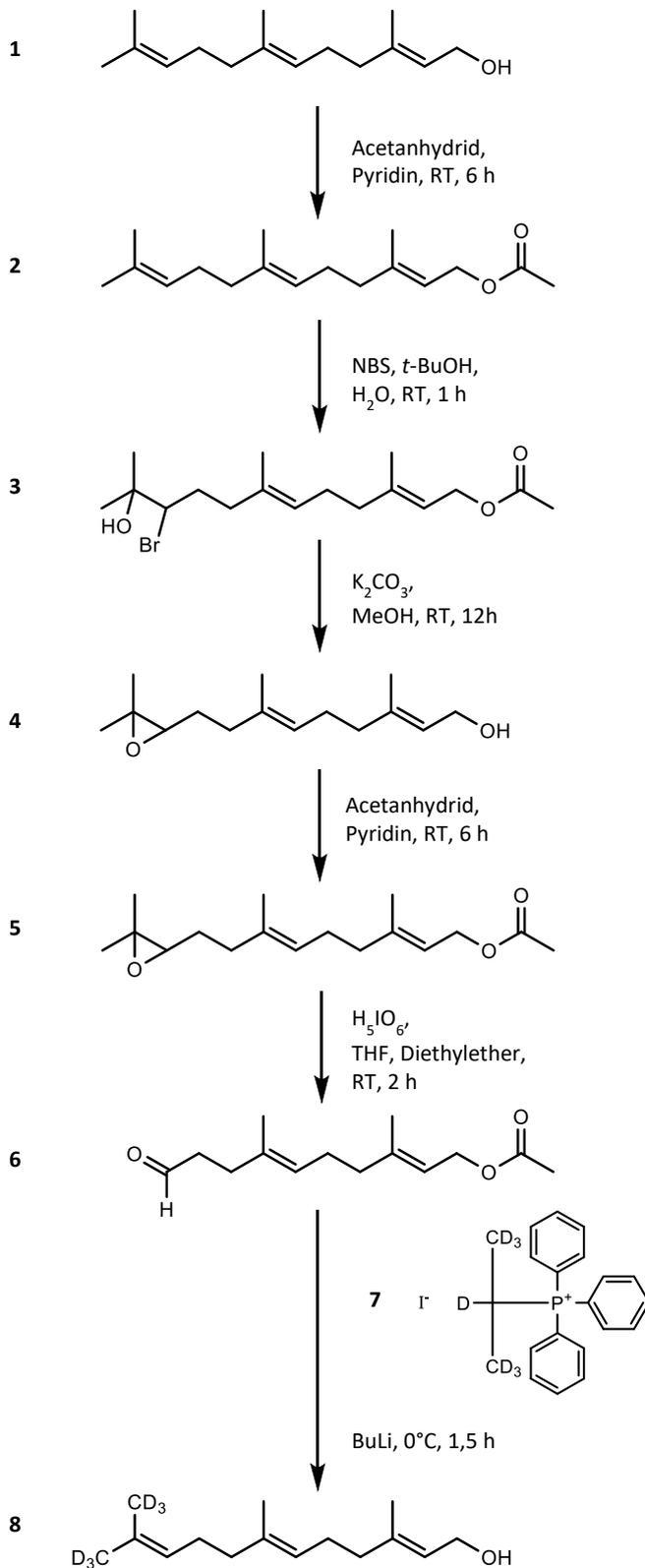


Abbildung 3.2 Synthese von Farnesol-d₆ (8)

wurde *in situ* durch Deprotonierung des Phosphoniumsalzes **7** hergestellt, anschließend kommt es zu einer Übertragung des Isopropenyl-d₆ Restes auf **6** und es entsteht die Zielverbindung **8**. Wegen des Einsatzes eines großen Überschusses an Butyllithium für die Herstellung des Ylids wird die Acetat-Schutzgruppe komplett abgespalten. Kleinere Mengen Butyllithium erbrachten geringere bis keine Ausbeuten. Da die Schutzgruppe aber sowieso abgespalten werden muss, ist dieser Nebeneffekt eher positiv.

Für die Synthese des deuterierten Phosphoniumsalzes **7** aus D₇-Isopropyljodid wurden mehrere Varianten mit verschiedenen Lösungsmitteln getestet (Tabelle 3.1). Die höchste Ausbeute ließ sich mit der Methode nach S. Takami et al. erreichen (85 %) ⁶⁸. Daher wurde diese Variante für die Darstellung des Wittig-Reagenzes ausgewählt, trotz der langen Reaktionsdauer (Abbildung 3.3).

Vorschrift	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Ausbeute (%)
De Ropp et al. 1984 ⁶³	Xylol	16 h	21
Comeskey et al. 2006 ⁶⁷	Schmelze	3,5 h	0
Nakashara et al. 2009 ⁶⁹	Toluol	24 h	8
Takami et al. 2013 ⁶⁸	Acetonitril	5 d	67

Tabelle 3.1 Überblick der getesteten Ansätze zur Synthese des Phosphoniumsalzes **7**

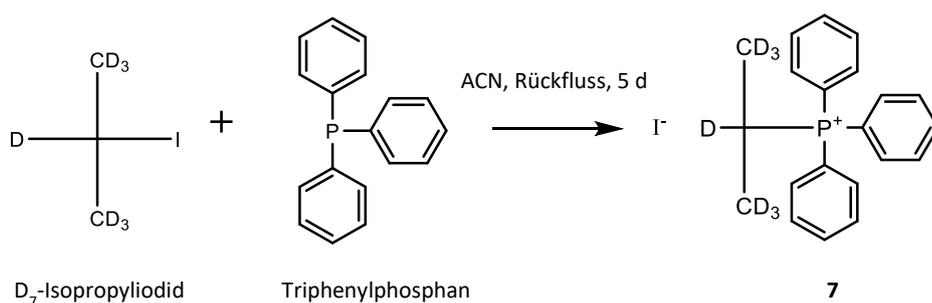


Abbildung 3.3 Synthese des Wittig-Reagenzes

3.1.2 Auswahl geeigneter Inhibitoren für die biologischen Tests

Um herauszufinden, ob ein Testsystem funktioniert und es anschließend weiter zu optimieren sind Referenzinhibitoren unverzichtbar. Für die ersten Tests wurden zwei publizierte Inhibitoren ausgewählt: Saragossasäure A (auch Squalestatin S1 genannt) und Chlorogensäure (Abbildung 3.4).

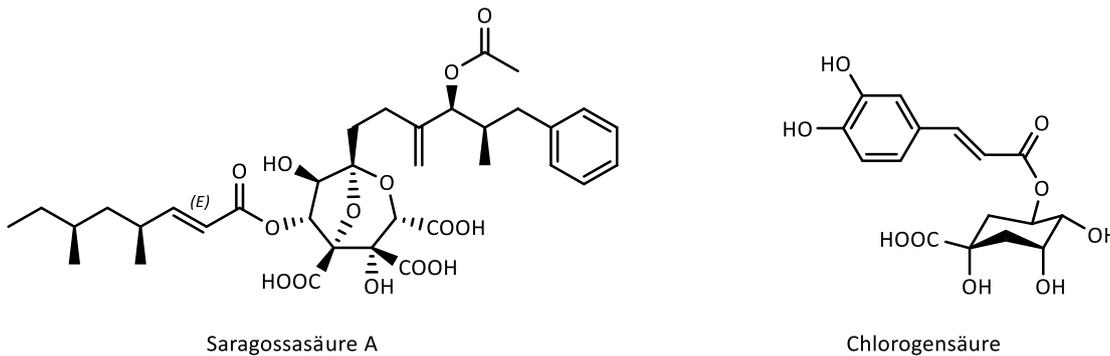


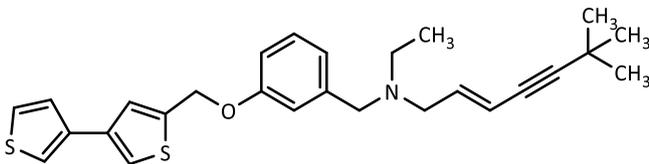
Abbildung 3.4 Strukturen der beiden Squalensynthese-Inhibitoren Saragossasäure A und Chlorogensäure

Saragossasäure A ist der mit Abstand am meisten genutzte Inhibitor der Squalensynthese. Er wurde in den Jahren 1991 und 1992 nahezu gleichzeitig von 3 Forschergruppen entdeckt: Zum einen von der Firma Merck, welche mehrere Saragossasäuren aus einem Pilz, welcher in der spanischen Provinz Saragossa gefunden wurde, extrahierten⁷⁰, ferner von der Firma Glaxo⁷¹ und einer Kooperation der Firma Mitsubishi Kasei mit Akiro Kendo (Tokio Noko Universität)⁷², die jeweils eine Gruppe von Substanzen in den Pilzarten *Phoma* sp. C2932 bzw. *Setosphaeria khartoumensis* fanden, welche sie nach ihrer biologischen Wirkung Squalestatine nannten. Auch wenn beide Bezeichnungen gängig sind, wird in dieser Arbeit der Name Saragossasäure A verwendet. Der Wirkmechanismus ist eine zunächst kompetitive Hemmung durch Verdrängung von FPP mit anschließender irreversibler Bindung an das Enzym, möglicherweise in Form einer Michael-Addition an den α,β -ungesättigten Ester der Acyl-Seitenkette⁷³. Der IC_{50} -Wert beträgt am isolierten Enzym 0,5 nM und an Hep G2 Zellen 6 μ M, bezogen auf die resultierende Cholesterolsenkung^{74,70}.

Chlorogensäure ist ein bekanntes Molekül innerhalb der pharmazeutischen Biologie. Der Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure lässt sich als Naturstoff in viele Pflanzen finden, bekannte Quellen sind: Kaffeepflanze, Johanniskraut, Weißtanne, Weißdorn, Roter

Sonnenhut, Kartoffel und Brennessel^{75,76,77}. Im Jahr 2007 fanden Choi et al. heraus, dass eine Substanz aus *Prunus mume* (japanische Aprikose) die Squalensynthese hemmt ($IC_{50} = 100$ nM am isoliertem Enzym) und identifizierten diese Substanz als Chlorogensäure⁷⁸. In einer anderen Publikation von Delcy et al. wird berichtet, dass Chlorogensäure neben anderen Wirkungen in der Lage ist den Gesamtcholesterolspiegel zu senken, was ebenso auf eine inhibitorische Wirkung innerhalb der Cholesterolsynthese hinweist⁷⁹. Im Gegensatz zur Saragossasäure A gibt es allerdings keine weiteren Erfahrungen zur Wirkung der Chlorogensäure als Squalensynthese-Hemmer und ob eventuell auch noch andere Enzyme beeinflusst werden. Wegen ihrer günstigen Anschaffungskosten (Faktor 800 günstiger als Saragossasäure A, Sigma Aldrich) wurde dennoch entschieden die Chlorogensäure zusätzlich mit zu testen. Falls sich herausstellen sollte, dass die Chlorogensäure ähnlich wie der Referenzinhibitor selektiv und in niedrigen Konzentrationen die Squalensynthese hemmt, hätte man eine günstigere Alternative zur Saragossasäure A (613 € pro 5 mg, Sigma Aldrich).

Als Inhibitor für die Squalenepoxidase, der zur Akkumulation von Squalen dient (siehe Kapitel 2 Themenstellung), wurde NB-598 ausgewählt (Abbildung 3.5). Der kompetitive Inhibitor hat einen IC_{50} -Wert von 4,4 nM und hat sich bereits als zellgängig erwiesen⁸⁰.



NB-598

Abbildung 3.5 Strukturformel des Squalenepoxidase-Inhibitors NB-598

3.1.3 Tests mit SQS-Inhibitor

Mit diesen Inhibitoren wurden verschiedene Versuche an HL-60 Zellen durchgeführt. Zuerst wurde untersucht, ob sich durch Inkubation mit dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 Squalen akkumulieren lässt. Als analytische Methode wurde hierbei von der ursprünglichen, bereits etablierten Methode des Cholesterolsynthese-Assays ausgegangen⁵⁹. Squalen ließ sich ohnehin bereits mit dieser Methode analysieren und die Fähigkeit Farnesol bzw. Farnesyl-TMS zu messen konnte in ersten, eigenen Versuchen rasch bestätigt werden. Eine Änderung der GC-MS Methode war dazu nicht notwendig, sämtliche Methodenparameter wurden von der Methode nach Giera übernommen. Ein Überblick über die notwendigen Schritte zur Aufarbeitung liefert Abbildung 3.6. Eine genaue Beschreibung der Arbeitsgänge ist in Kapitel 6.1 aufgeführt. Im Laufe der Arbeit wird diese schematische Übersicht öfter verwendet werden, um die Weiterentwicklung der Methode im Laufe der Doktorarbeit darzustellen. Die jeweiligen Änderungen werden dort gelb gekennzeichnet und jeweils kommentiert.

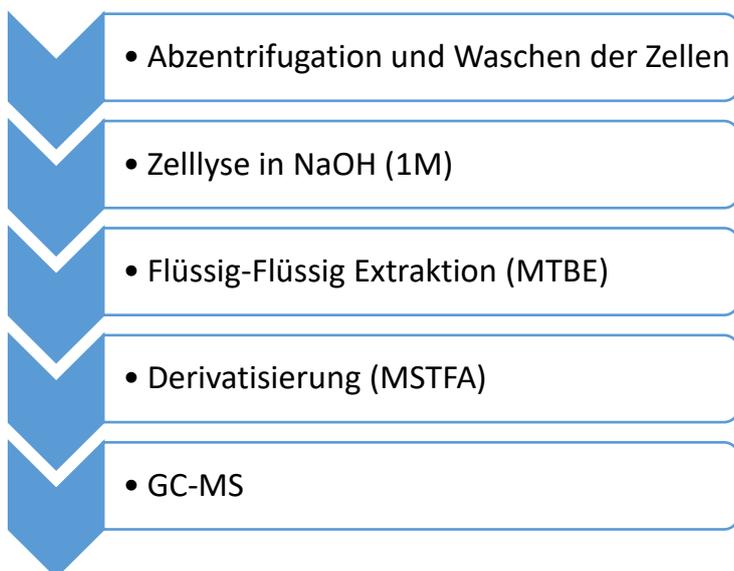


Abbildung 3.6 Schema der Aufarbeitung der ursprünglichen Methode nach Giera⁵⁹ zur Analyse von Intermediaten der Cholesterolsynthese (Vorschrift: siehe Kapitel 6.1)

In ersten Versuchen konnte durch Inkubation mit NB-598 eine Akkumulation von Squalen problemlos erzielt werden und auch der gleichzeitig beobachtete sinkende Gehalt von neugebildeten Cholesterol in den Zellen steht im Einklang mit einer erfolgreichen Hemmung der Squalensynthese (Abbildung 3.7). In einem weiteren Experiment wurde

mithilfe einer Konzentrationsreihe der IC_{50} -Wert von NB-598, bezogen auf die Fähigkeit die Cholesterolsynthese zu hemmen, berechnet (Abbildung 3.8). Der experimentell bestimmte Wert von 4,2 nM weicht nur geringfügig von dem Literaturwert eines enzymatischen Assays 0,75 nM⁸⁰ (ermittelt am isolierten Enzym Squalenepoxidase) ab, was auf eine exzellente Zellmembrandurchlässigkeit hinweist. Gleichzeitig mit der Abnahme von neugebildeten Cholesterol wurde auch die Akkumulation von Squalen in Abhängigkeit der Konzentration von NB-598 untersucht (Abbildung 3.9), da dies der eigentliche gewünschte Effekt ist. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Squalenkonzentration erreicht wird, ist 5,6 nM – ein Wert der sich nur geringfügig vom zellulären IC_{50} -Wert (welcher sich auf die Verringerung des neusynthetisierten Cholesterols bezieht) unterscheidet. Dies ist auch nicht überraschend, da beide Effekte in Korrelation zur Stärke der Squalenepoxidase-Hemmung stehen.

Um eine konstante maximale Akkumulation von Squalen zu erzielen, wurde in allen folgenden Versuchen, in denen NB-598 eingesetzt wurde, eine Endkonzentration von 30 nM im Medium verwendet.

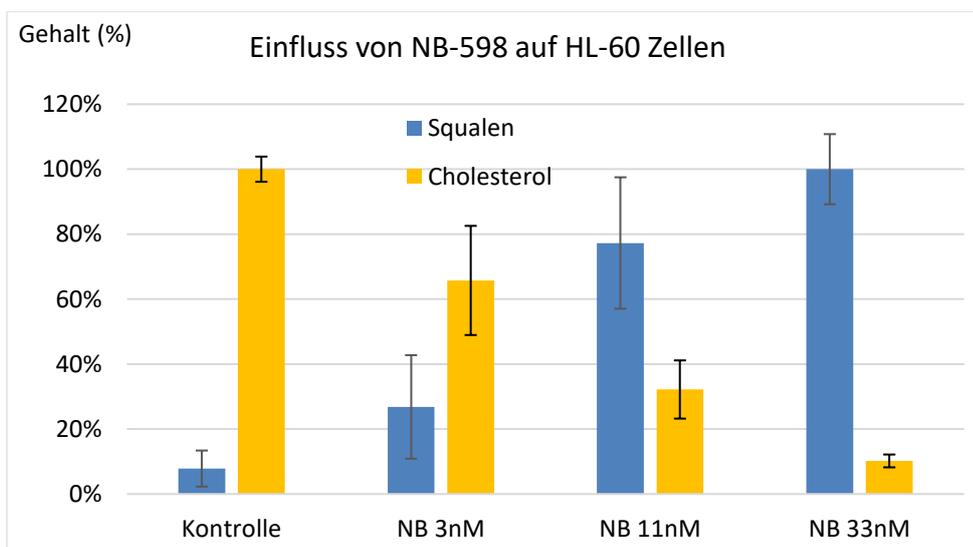


Abbildung 3.7 Inkubation von HL60 Zellen mit dem Inhibitor NB-598. Blaue Balken stellen den Squalengehalt dar, bezogen auf die Probe mit dem höchsten Squalengehalt („NB 33 nM“). Die gelben Balken zeigen den Gehalt an de-novo-synthetisiertem Cholesterol bezogen auf den Cholesterolgehalt der negativ-Kontrolle ohne Inhibitor. Die Konzentrationen beider Stoffe wurden mittels internem Standard (Cholestan) berechnet und um die Proteinmenge korrigiert. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

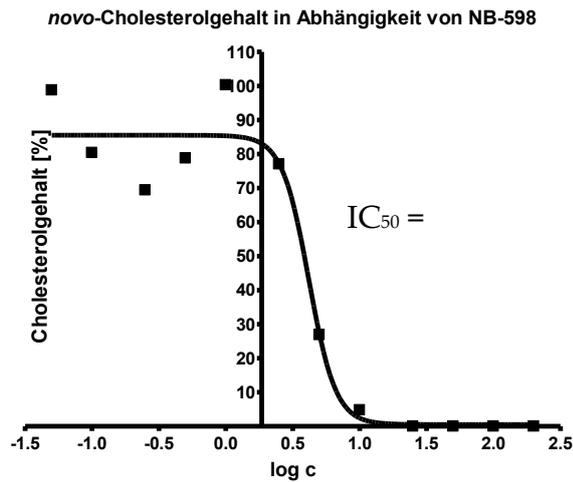


Abbildung 3.8 Gehalt an neugebildeten Cholesterol in HL60 Zellen in Abhängigkeit zu der logarithmierten NB-598-Konzentration. 100 % entspricht dem Cholesterolgehalt der Negativkontrolle (Zellen ohne Inhibitor). $IC_{50} = 4,2 \text{ nM}$.

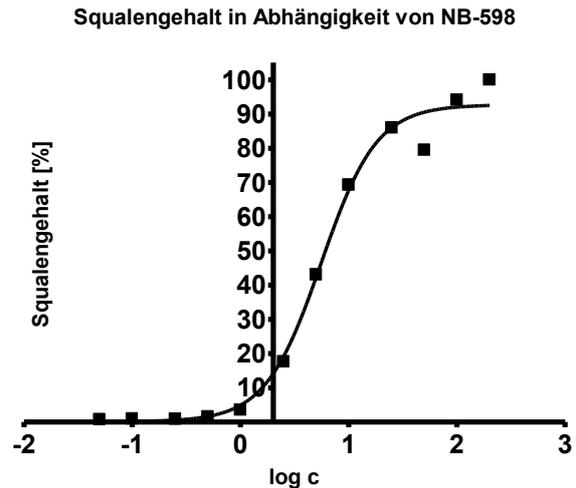


Abbildung 3.9 Gehalt an Squalen in HL60 Zellen in Abhängigkeit der logarithmierten NB-598-Konzentration. 100 % entspricht dem Squalengehalt der Probe mit der höchsten NB-598 Konzentration.

Da es nun möglich war Squalen zuverlässig akkumulieren zu lassen, wurden als nächstes die beiden Squalensynthese-Inhibitoren Saragossasäure und Chlorogensäure eingesetzt. Dazu wurden beide Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit NB-598 auf die Zellen gegeben und nach Aufarbeitung der Zellen der Squalengehalt mittels GC-MS vermessen. Für den Fall, dass ein Inhibitor keine Wirkung zeigt, sollte sich das Squalen-Signal im Vergleich mit nur mit NB-598 behandelten Zellen kaum verändern. Bei Hemmung der Squalensynthese sollte der Squalengehalt mit steigender Inhibitor-Konzentration immer weiter absinken bis die maximale Hemmung erreicht ist. Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Bei einer Konzentration von 20 nM Saragossasäure bzw. 400 nM Chlorogensäure lässt sich eine deutliche Reduktion des Squalengehalts gegenüber der Kontrolle nur mit NB-598 beobachten. Dies weist auf eine erfolgreiche Hemmung der Squalensynthese hin.

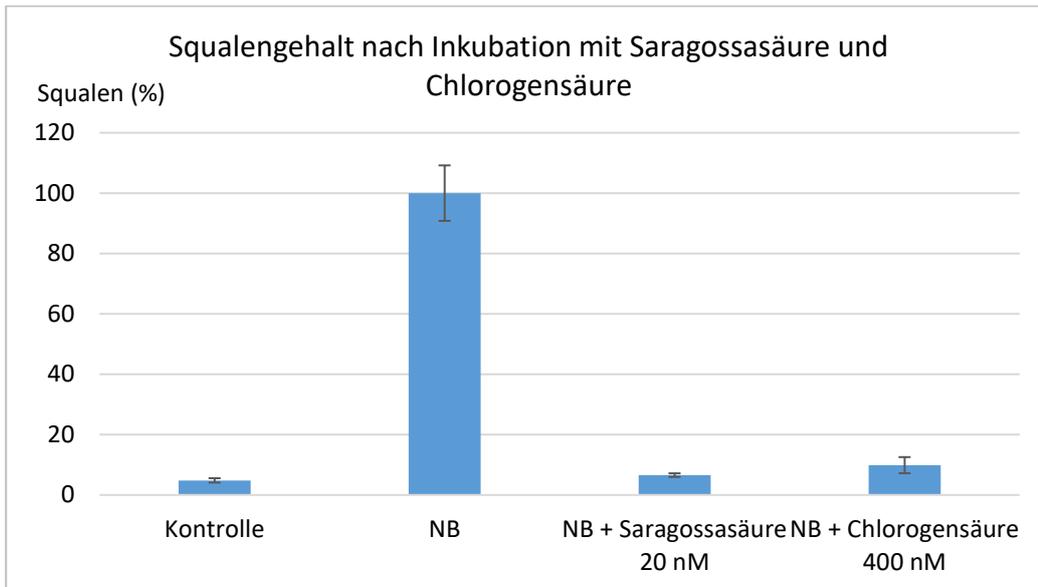


Abbildung 3.10 Einfluss von SQS-Inhibitoren auf den Squalengehalt von HL60-Zellen, welcher durch NB-598 akkumuliert wurde (NB = NB598, $c = 30 \text{ nM}$). Ergebnis bezogen auf die Squalenkonzentration bei alleiniger Hemmung durch NB598. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

In Wahrheit lässt sich durch eine Reduktion des Squalengehalts aber nicht mit Sicherheit feststellen, welches Enzym im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese gehemmt wurde. Auch eine Hemmung eines Enzyms *upstream* der hier interessierenden Squalensynthese würde in diesem Experiment den gleichen Effekt zeigen. Aufgrund der bereits publizierten Daten zu den beiden verwendeten SQS-Inhibitoren erscheint es plausibel, dass in diesem Fall tatsächlich die Squalensynthese gehemmt wurde. Im Falle von unbekanntem Inhibitoren sieht das jedoch anders aus; hier lässt sich noch keine genaue Aussage über das gehemmte Enzym treffen.

Deshalb wurden im nächsten Schritt Zellen mit deuteriertem Farnesol (Farnesol- d_6) versetzt, was zur Produktion von deuteriertem Squalen führt. Das Ziel war zunächst, herauszufinden wie hoch Farnesol in Zellen dosiert werden kann, ohne dass die Vitalität der Zellen zu stark beeinträchtigt wird. Denn eine höhere Konzentration von deuteriertem Farnesol bedeutet letztendlich auch eine höhere Konzentration an produziertem, deuteriertem Squalen. Es stellte sich aber heraus, dass Farnesol-Konzentrationen von über 90 nM von den Zellen nicht gut vertragen werden (Abbildung 3.11). Höhere Farnesol-Konzentrationen führten zum Absinken des Proteingehalts als Maß für die Vitalität der Zellen. Es ist aber notwendig, dass die Zellen den größten Teil ihrer Vitalität behalten, da nur gesunde und vermehrungsfreudige Zellen über eine genügende Squalen- bzw.

Cholesterin-Produktion verfügen. Stattdessen sank der Squalengehalt bei 900 nM Farnesol sogar auf ein Niveau ab, welches ohne Akkumulation von NB-598 besteht – obwohl NB-598 sehr wohl eingesetzt wurde. Ein Grund dafür könnte sein, dass die HMG-CoA-Reduktase, ein sehr frühes Enzym der Cholesterinbiosynthese, durch Farnesol gehemmt wird⁸¹. Die hohen Farnesol-Konzentrationen dürften diesen negativen Feedback-Mechanismus ausgelöst und somit die Produktion von Squalen blockiert haben. Dadurch leidet letztendlich auch die Produktion von Cholesterin, wodurch das Zellwachstum negativ beeinträchtigt wird. Durch diesen Mechanismus ließen sich also die beobachteten, toxischen Effekte einer zu hohen Farnesol-Konzentration erklären. Daher wurde als oberes Limit von Farnesol zur Inkubation eine Konzentration von 90 nM festgesetzt.

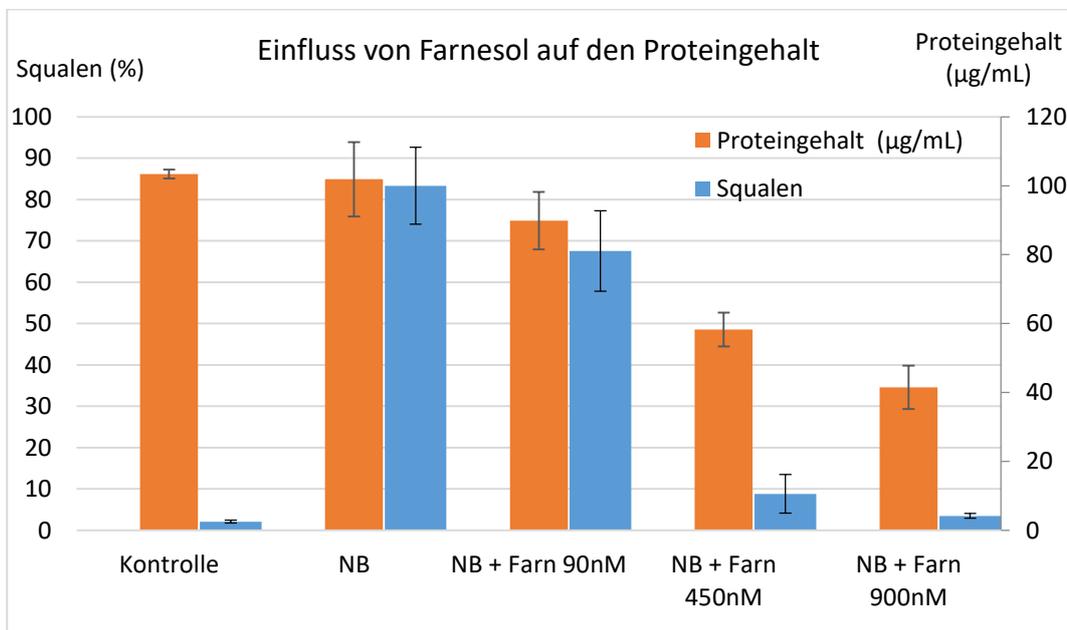


Abbildung 3.11 Einfluss von deuteriertem Farnesol auf das Zellwachstum über die Bestimmung des Proteingehaltes. Ein sinkender Proteingehalt weist auf eine Beeinträchtigung des Zellwachstums bzw. -stoffwechsels hin. 100 % Squalen entspricht maximaler Akkumulation. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

Anschließend wurden Zellen mit deuteriertem Farnesol und dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 inkubiert und anschließend analysiert. Aber obwohl die Zellen ausreichend gewachsen sind und Squalen akkumuliert ist, konnte kein deuteriertes Squalen nachgewiesen werden. Auch weitere Versuche, in denen 4 Proben gepoolt und aufkonzentriert wurden, blieben ohne Erfolg. Doch ohne die Möglichkeit deuteriertes Squalen zu messen, kann das Testsystem nicht selektiv auf die Squalensynthese testen.

Daher wurden als nächstes Anstrengungen unternommen, die Ursache für das Fehlen von deuteriertem Squalen nach der hier beschriebenen Inkubation herauszufinden.

3.1.4 Bestimmung der Aufnahme von Farnesol in HL-60 Zellen

Nachdem das Inkubieren von isotonenmarkierten Substanzen ein weitverbreitetes und bewährtes Prinzip ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Ursache für die im vorangegangenen Kapitel geschilderten Probleme nicht in einer unterbliebenen Umsetzung von Farnesol-d₆ zu deuteriertem Squalen liegt. Mehrere Forschungsarbeiten machten sich dieses Prinzip innerhalb des Präsqalen-Abschnittes der Cholesterolsynthese bereits erfolgreich zu Nutze^{50,53,54}. Ein Problem könnte jedoch die Einschleusung von Farnesol-d₆ in den Biosyntheseweg sein. Dafür muss das isotonenmarkierte Substrat im Wesentlichen zwei Hürden überwinden: 1. Das Passieren der Zellmembran. 2. Die endogene Pyrophosphorylierung, da nur Farnesylpyrophosphat von der Squalensynthase als Substrat verwendet wird. Um diese kritischen Schritte zu überprüfen, wurde eine bestimmte Menge Farnesol (undeuteriert) auf die Zellen gegeben und zu mehreren Zeitpunkten Medium und Zellen auf ihren Farnesolgehalt überprüft. Das gleiche Experiment wurde zusätzlich während einer Hemmung durch Chlorogensäure durchgeführt (Abbildung 3.12). Auf diese Weise sollte Aufschluss darüber erhalten werden, ob Farnesol in den intrazellulären Raum der Zellen übertritt und ob eine Verstoffwechslung von Farnesol eintritt.

Aus den Ergebnissen des Experimentes lassen sich zwei wichtige Schlüsse ziehen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Farnesol die Zellmembran passiert. Denn nach 24 h war in dem Ansatz ohne Inhibitor kein Farnesol mehr im Medium mehr zu finden, im Ansatz mit der Chlorogensäure nur noch ein kleiner Rest. In den ersten zwei Stunden lässt sich im Medium zwar ein geringer Unterschied zwischen der Inkubation mit Inhibitor und ohne beobachten. Doch dieser tritt nur im Medium auf (nicht in den Zellen) und ist nach weiteren 3 Stunden wieder verschwunden. Der gesamte Gehalt an Farnesol (Medium + Zellen) sinkt nach etwa 5 h auf 10 % des ursprünglichen Gehaltes. Danach ist in den Zellen kein Farnesol mehr messbar und in dem Medium nur noch Rest (< 10 % der ursprünglichen Menge), welcher im Laufe der restlichen Zeit noch weiter sinkt. Probeversuche, in denen Farnesol 24 h dem Medium ohne Zellen ausgesetzt war, ergaben einen stabilen Farnesolgehalt. Daraus lässt sich schließen, dass der sinkende Farnesol-

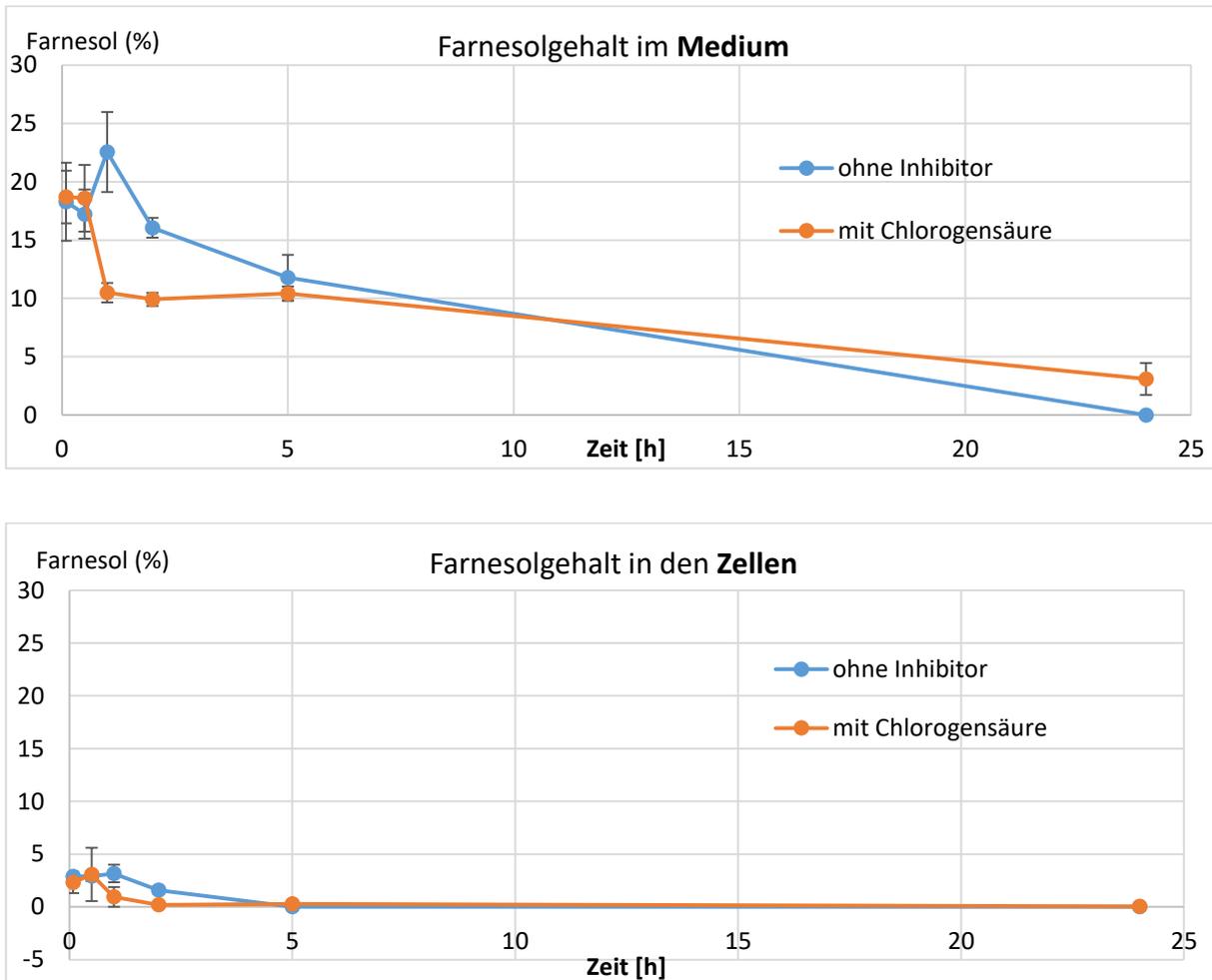


Abbildung 3.12 Nach einer einmaligen Gabe von 20 ng Farnesol pro 1 Mio. Zellen (entspricht 90 nM Farnesol = 100 %) wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden jeweils Medium und Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit von Chlorogensäure getrennt untersucht. Das obere Diagramm zeigt die Wiederfindung von Farnesol aus dem Medium, jeweils mit und ohne Inkubation mit Chlorogensäure. Das untere Diagramm zeigt die Wiederfindung von Farnesol aus den Zellen, jeweils mit und ohne Inkubation mit Chlorogensäure. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

gehalt nicht auf ein eventuell reaktives Medium zurückzuführen ist, sondern Farnesol in der Tat zellmembrangängig ist und in die Zellen hineingewandert sein muss. Der Farnesolgehalt innerhalb der Zellen steigt lediglich am Anfang leicht an und sinkt nach fünf Stunden auf null herab. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Farnesolkonzentration im Medium in der Anfangszeit ebenfalls am höchsten ist und somit mehr Farnesol in die Zellen dringen kann. Innerhalb der Zellen sinkt der Gehalt jedoch schnell herab, was für eine intensive zelluläre Verarbeitung des Farnesols spricht. Dies könnte eine enzymatische Abbaureaktion sein, oder die erwünschte Pyrophosphorylierung und Weitermetabolisierung. Insgesamt kann jedoch bestätigt

werden, dass Farnesol in der Lage ist in Zellen einzudringen und Zellen dieses Molekül verstoffwechseln. Es muss also ein anderer Grund vorliegen, dass in dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Experiment kein deuteriertes Squalen zu finden war.

Dieser Grund könnte zum Beispiel eine zu niedrig angesetzte Farnesol-d₆-Konzentration sein. Zwar sollte die Menge an Farnesol-d₆ theoretisch ausreichen, um genügend messbares deuteriertes Squalen zu produzieren. Wenn die Menge an eingesetztem Farnesol-d₆ aber mit der Menge von ¹³C-Acetat verglichen wird, welche in dem etablierten Assay des Postsqualen-Abschnittes verwendet wird, um isotoopenmarkiertes Cholesterol zu produzieren, so lässt sich ein großer Unterschied feststellen (Tabelle 3.2).

Menge an ¹³ C-Acetat pro 1 Mio. Zellen	Menge an Farnesol-d ₆ pro 1 Mio. Zellen
62,5 µg	0,020 µg

Tabelle 3.2 Menge an isotoopenmarkierten Substraten pro 1 mL Zellsuspension (1 Millionen Zellen) in den jeweiligen Testsystemen

Es wird in dem bereits etablierten Cholesterolbiosynthese Assay 3125-mal so viel an isotoopenmarkierter Substanz zugesetzt. Trotz dieser beträchtlichen Menge an ¹³C-Acetat ist das resultierende Signal von deuteriertem Cholesterol relativ klein. Eine Reduktion der ¹³C-Acetat-Menge würde das Testsystem empfindlich stören, da die Menge an produziertem isotoopenmarkiertem Cholesterol unter die Detektionsgrenze abfallen würde. Zwar ist es so, dass Acetat in vielen Bereichen der Biosynthese innerhalb der Zelle eingesetzt wird (Fettsäuren-Biosynthese, Citratzyklus etc.) und es dementsprechend im Gegensatz zu Farnesol einen höheren Schwund erleidet, bis die markierten Acetateinheiten ein Cholesterolmolekül bilden. Aber trotzdem scheint die Menge an zugesetztem Farnesol angesichts der Erfahrungen mit dem Acetat viel zu niedrig zu sein. Leider lässt sich die Menge nicht weiter erhöhen, da Farnesol in höheren Konzentrationen (im Gegensatz zu Acetat) zytotoxische Wirkungen zeigt (siehe vorheriges Kapitel).

3.1.5 Fazit zur Variante A

Letztendlich war hier ein toter Punkt in der Entwicklung des Assays nach „Variante A“ erreicht. Um eine relevante und messbare Konzentration von deuteriertem Squalen zu erreichen, müsste die Menge an zugesetztem Farnesol-d₆ signifikant erhöht werden. In höheren Konzentrationen aber wirkt Farnesol hemmend auf das Zellwachstum, weswegen eine Konzentrationserhöhung unmöglich ist. Unter Umständen ließe sich das durch den Einsatz von bereits phosphorylierten Farnesol-d₆ beheben, aber dann entstünden eventuell weitere Probleme, wie z. B. eine fragliche oder zumindest erschwerte Passage durch die Zellmembran aufgrund der permanenten negativen Ladungen an dem Pyrophosphatrest.

Es ist mit „Variante A“ also nicht möglich, das Zielenzym eines Inhibitors der Cholesterolsynthese zu identifizieren, da in den Zellen kein bzw. nicht genügend deuteriertes Squalen produziert wurde. Ohne deuteriertes Squalen, welches aus der Inkubation mit deuteriertem Farnesol hätte entstehen sollen, kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob tatsächlich die Squalensynthese gehemmt wurde. Und andere Zielenzyme *upstream* der SQS hätten nach Variante A ohnehin nicht identifiziert werden können. Es ist aber sehr wohl möglich die Ursache einer Hemmung der Cholesterolsynthese auf den Präsqalen-Abschnitt einzugrenzen (über die Bestimmung des Squalengehalts nach gleichzeitiger NB-598-Gabe). Je stärker der Gehalt des akkumulierten Squalens mit Vergleich zur Negativkontrolle (mit NB-598, aber ohne Inhibitor) absinkt, desto stärker ist sein Hemmeffekt auf den Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese. Obwohl es keinen Sinn macht die Zellen zusätzlich zum Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 mit ¹³C-Acetat zu inkubieren, lässt sich die Wirkung auf die gesamte Cholesterolsynthese auf diese Weise zumindest indirekt quantifizieren. Die Methode ist somit komplementär zum Cholesterolsynthese Assay nach Giera, welcher nur den Postsqualen-Abschnitt untersucht und blind für Präsqalen-Abschnitt ist.

An dieser Stelle wurde daher entschieden, die Arbeiten an „Variante A“ einzustellen und an „Variante B“ weiter zu forschen.

3.2 Variante B: Akkumulation von Farnesol

Im Unterschied zur „Variante A“, bei der die Abnahme des akkumulierten Squalen für die Detektion und Quantifizierung einer Enzymhemmung gemessen wird, wird bei „Variante B“ die Akkumulation des Enzymsubstrates der Squalensynthase für die Detektion einer Enzymhemmung genutzt. Das Ziel ist also eine Akkumulation von Farnesol nach der Inkubation von Zellen mit SQS-Inhibitoren zu messen. Dadurch könnte man zweifelsfrei eine Hemmung der Squalensynthase innerhalb von lebenden Zellen feststellen. Eine Inkubation mit isotopenmarkierten Substraten ist bei dieser Variante aus zwei Gründen nicht nötig:

Zum einen war aus vorherigen Versuchen (siehe Kapitel 3.1) bereits bekannt, dass die physiologische Konzentration von Farnesol so niedrig ist, dass ohne Hemmung der SQS ohnehin kein Farnesol-Signal zu detektieren ist. Eine Unterscheidung zwischen neu synthetisiertem und bereits vor der Inkubation vorhandenem Farnesol ist somit nicht erforderlich. Zum anderen ist Selektivität auch ohne die Verwendung isotopenmarkierter Standards gegeben, da für jedes Enzym bei einer Hemmung ein unterschiedliches Substrat akkumulieren würde.

3.2.1 Synthese weiterer SQS-Inhibitoren

Um die Substanzbibliothek von SQS-Inhibitoren zu erweitern, wurden zwei weitere Substanzen synthetisiert: „Carbazol 11“ und YM175 (Abbildung 3.13).

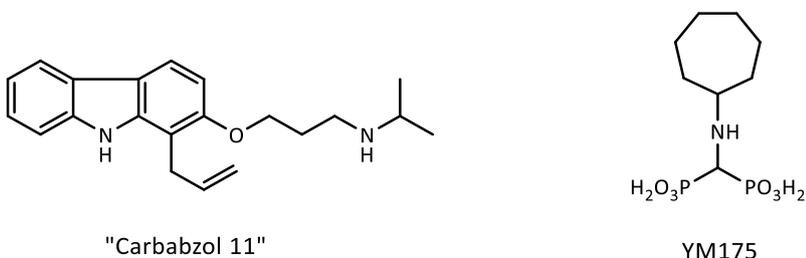


Abbildung 3.13 **Links:** „Carbazol 11“ (1-Allyl-2-[3-(isopropylamino)propoxy]-9H-carbazol; **Rechts:** YM175 ((Cycloheptylamino)-methylenbisphosphonat).

Im Jahr 2004 publizierten Ishihara et al.⁸² eine Arbeit, in der die Wirkung unterschiedlicher Carbazole auf die Squalensynthese untersucht wurde. Die höchste Aktivität zeigte dabei „Carbazol 11“ mit einem IC₅₀-Wert von 32 nM (mikrosomaler Assay). Synthetisiert wurde „Carbazol 11“ nach publizierter Vorschrift (Abbildung 3.14). Bei manchen Schritten wurde die Umkristallisation nach der Säulenchromatographie weggelassen, da die entsprechenden Produkte bereits ausreichende Reinheit besaßen. Die Synthese begann bei dem käuflich erwerblichen 2-Hydroxy-9H-carbazol. Dieses Edukt wurde zuerst mit Allylbromid in einer S_N2-Reaktion umgesetzt und der entstandene Allylether in einer Claisen-Umlagerung zu 1-Allyl-2-hydroxy-9H-carbazol umgelagert. Anschließend wurde in weiteren, konsekutiven S_N2-Reaktionen die Seitenkette aufgebaut und es entstand das finale Produkt „Carbazol 11“.

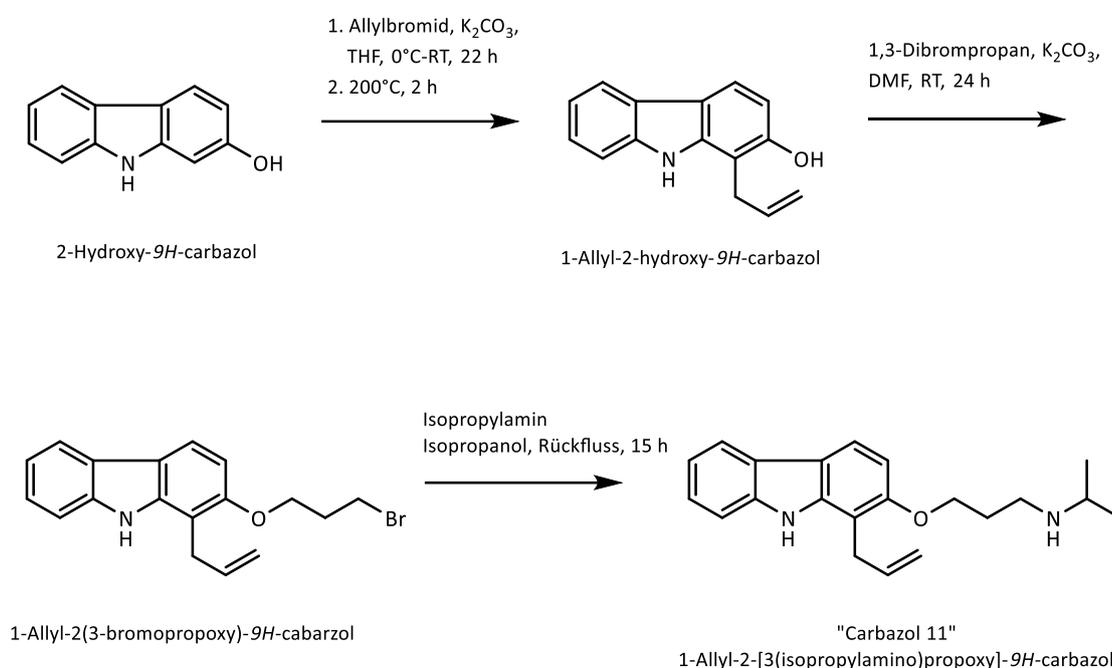


Abbildung 3.14 Synthese von „Carbazol 11“ nach Ishihara et al. 2004⁸²

Der zweite SQS-Inhibitor, der für die biologischen Testungen synthetisiert wurde, ist das Bisphosphonat YM175 von Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd (Entwickelt zur Behandlung von Osteoporose). Bei Untersuchungen zum Wirkmechanismus stellte sich heraus, dass YM175 ein hervorragender SQS-Inhibitor ist, mit einem IC₅₀-Wert von 17 nM (mikrosomaler Assay)⁸³. Daher wurde entschieden YM175 zu synthetisieren und zu testen. Die Vorschrift dazu lieferten Widler et al., welche Cycloheptylamin, Orthoameisensäuretriethylester und Diethylphosphit in einer einstufigen Reaktion zu den

Ethylester von YM175 kondensierten. Eine saure Esterspaltung mittels konzentrierter Salzsäure lieferte das gewünschte Produkt YM175 (Abbildung 3.15)⁸⁴.

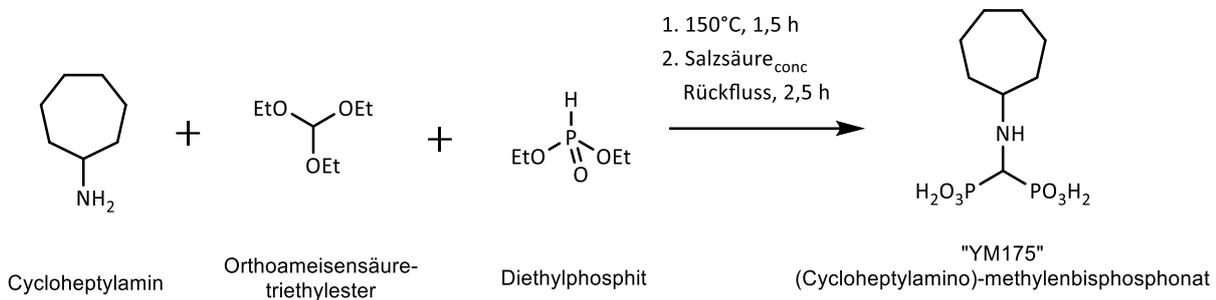


Abbildung 3.15 Synthese von YM175 nach Widler et al. 1992⁸⁴

3.2.2 Einsatz von Phosphatasen / Lösung diverser Detektionsprobleme

HL-60 Zellen wurden mit den SQS-Inhibitoren Saragossasäure, Chlorogensäure, YM175 und „Carbazol 11“ inkubiert und der Farnesolgehalt mittels GC-MS bestimmt. Es konnte allerdings kein akkumuliertes Farnesol gefunden werden; auch nicht in sehr geringer Konzentration. Selbst in Zellen, welche mit Saragossasäure inkubiert wurden und die laut Literatur definitiv akkumuliertes Farnesol enthalten sollten^{57,85}, konnte kein Farnesol nachgewiesen werden. Da Farnesol aber nach Injektion einer Standardlösung sehr wohl detektiert werden konnte, kann die Ursache für die fehlenden Farnesol-Signale nach Inkubation mit den etablierten SQS-Inhibitoren nur in den Schritten davor (Zellen und Aufarbeitung) liegen. Wenn ein so grundlegendes Problem wie ein „verschwendener Analyt“ auftritt, lohnt es sich alle Schritte der Aufarbeitung noch einmal zu überdenken und gegebenenfalls einzeln mittels Kontrollexperimenten zu überprüfen.

- Wird Farnesol eventuell nicht erfolgreich akkumuliert, z.B. aus pharmakokinetischen Gründen?
 - ⇒ Pharmakokinetische Probleme (Mangelnde Penetration der Inhibitoren in die Testzellen) und eine zu geringe Aktivität der Inhibitoren können ausgeschlossen werden, denn zumindest die Saragossasäure ist ein viel verwendeter und wohl bekannter Inhibitor, welcher schon öfter erfolgreich in Zellen zur Akkumulation

von Farnesol verwendet wurde. Zur Sicherheit wurde die Konzentration der Saragossasäure bei der Inkubation in weiteren Versuchen stufenweise bis zur Toxizitätsgrenze erhöht, jedoch ohne Effekt auf das fehlende Messsignal von Farnesol.

- Wenn davon ausgegangen wird, dass Farnesol nach Inkubation mit SQS-Inhibitoren akkumuliert, könnte dann die akkumulierte Farnesolkonzentration zu niedrig, also unterhalb der Detektionsgrenze des Massenspektrometers sein?

⇒ Die zu erwartende Farnesolkonzentration (1,5 - 3 µg/mL) wurde nach Literatur⁸⁵ berechnet und mit der Detektionsgrenze der GC-MS-Methode verglichen (0,1 µg/mL). Zur Sicherheit wurden nach einer Inkubation mit Saragossasäure 4 Proben gepoolt und durch Abblasen des Lösungsmittels aufkonzentriert. Weil diese 4-fach konzentrierte Probe ebenfalls kein Farnesol signal in der GC-MS verursachte, scheint das Problem des fehlenden Signals nicht aus der fehlenden Leistung des Massendetektors zu resultieren.

- Falls die Inhibition erfolgreich ist und das Signal hoch genug sein sollte, um im MS-Detektor erkannt zu werden, kann das Problem nur noch dazwischen liegen: an der Aufarbeitung. Um ein verlässliches Farnesol signal detektieren zu können, sind zwei Schritte während der Aufarbeitung besonders kritisch. Zum einen die Hydrolyse von Farnesylpyrophosphat zu Farnesol, welche in 1 M Natronlauge (70°C, 1 h) während der Zellyse stattfinden soll. Und zum anderen die Extraktion von Farnesol aus wässriger Lösung in ein organisches Lösungsmittel, da für die Gaschromatographie (GC) nur flüchtige Lösungsmittel verwendet werden können.

⇒ Beide Schritte wurden in Experimenten überprüft. Um die Extraktion von Farnesol während der Flüssig-Flüssig-Extraktion zu überprüfen, wurde ein einfaches Wiederfindungsexperiment durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass Farnesol mit der bisher genutzten Extraktionsmethode nahezu quantitativ in die organische Phase überführt werden kann. Ein ähnlicher Versuch wurde durchgeführt, um die Hydrolyse von Farnesylpyrophosphat zu überprüfen. Käuflich erworbenes FPP wurde hierzu verschiedenen wässrigen Milieus (sauer, neutral, basisch) und auch einer Phosphatase (saure Phosphatase aus Weizenkeimen nach einer Vorschrift von Crick et al. 1991⁸⁶) ausgesetzt (Abbildung 3.16).

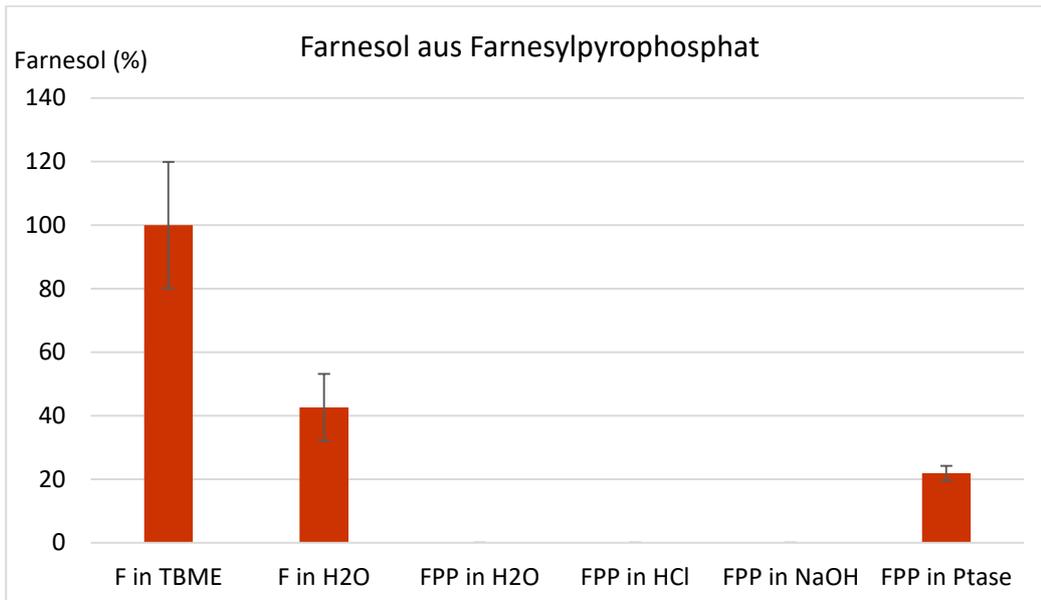


Abbildung 3.16 Wiederfindung von Farnesol aus Farnesylpyrophosphat unter verschiedenen wässrigen Bedingungen, Extraktion in MTBE. F = Farnesol (10 μ M), FPP = Farnesylpyrophosphat (10 μ M). Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

Es reichten weder Salzsäure noch Natronlauge (jeweils 1 M, 70 °C) aus, um auch nur eine kleine Menge an Farnesylpyrophosphat zu hydrolysieren. Lediglich in dem Ansatz mit der sauren Phosphatase ließ sich Farnesol detektieren. Aus dieser Erkenntnis, dass Natronlauge nicht ausreicht, um FPP zu hydrolysieren, lässt sich das bisher fehlende Farnesolsignal nach Akkumulation nach SQS-Hemmung erklären. Es scheint, als wäre es unbedingt nötig eine Phosphatase einzusetzen. Nachdem durch den Einsatz von Salzsäure und Natronlauge nicht nur keine quantitative Menge Farnesol entstand, sondern nicht mal eine ganz kleine Menge, wurde darauf verzichtet weitere Säuren/Basen oder weitere Versuchsbedingungen (Zeit, Temperatur, Konzentration) zu testen. Stattdessen wurde die enzymatische Hydrolyse von FPP optimiert.

Die Wiederfindung von Farnesol aus Farnesylpyrophosphat nach Inkubation mit saurer Phosphatase (ACP) aus Weizenkeimen ist mit ca. 20 % noch viel zu gering. Eine Erhöhung der ohnehin schon langen Inkubationsdauer von 18 h brachte keine weitere Verbesserung der Ausbeute an freien Farnesol. Daher wurden zunächst verschiedene Phosphatasen verglichen. Zum einen eine alkalische Phosphatase (ALP) aus Rinderschleimhaut, eine saure Phosphatase aus der Süßkartoffel und zum Vergleich die saure Phosphatase aus Weizenkeimen. Die Reaktionspuffer wurden auf die jeweiligen für die Enzyme optimalen pH-Werte eingestellt: Rinderschleimhaut ALP -> pH = 10,4; Süßkartoffel ACP -> pH = 5,5;

Weizenkeim ACP -> pH = 5,5. Da die ALP laut Datenblatt zweiwertige Kationen benötigt, wurden Magnesium- und Zink-Ionen (1 mM) zugefügt und zum Vergleich ein Ansatz ohne diese Kationen durchgeführt. Nach Inkubation (1 h, 40 °C) von FPP mit den Phosphatasen wurde jeweils das entstandene freie Farnesol extrahiert und mittels GC-MS bestimmt (Abbildung 3.17).

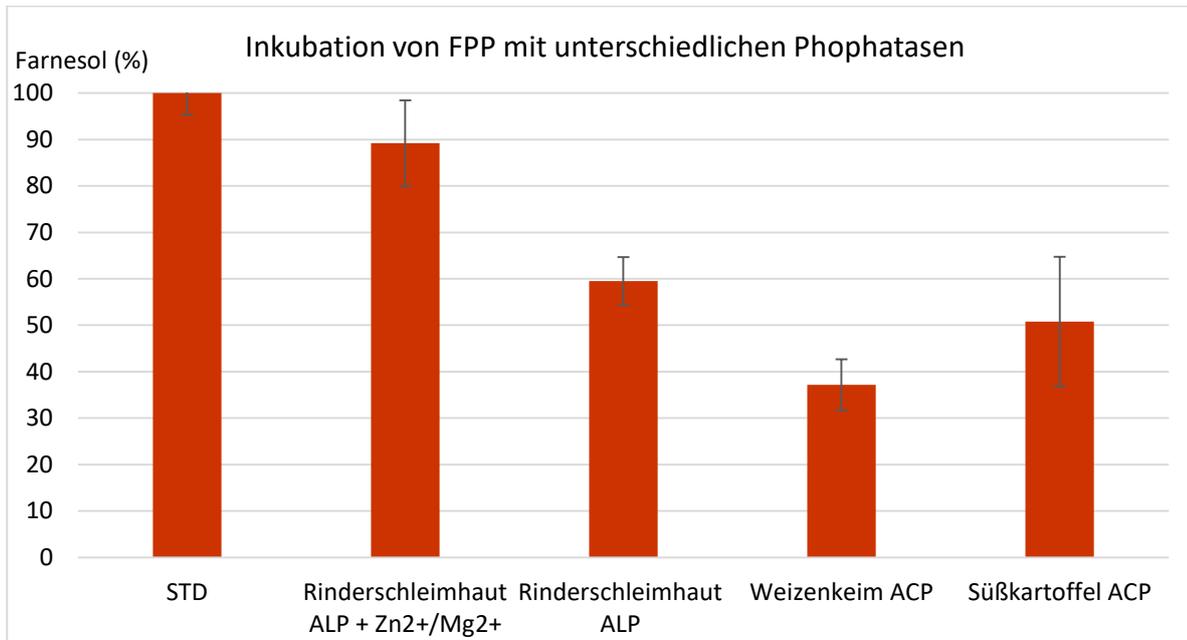


Abbildung 3.17 Freisetzung von Farnesol aus Farnesylpyrophosphat (FPP). Die Menge an Enzym beträgt jeweils 2 Units auf 2 µg FPP in 600 µL Puffer (pH eingestellt auf das pH-Optimum des jeweiligen Enzyms). Inkubationsbedingungen sind 37 °C für 1 h. ALP = alkalische Phosphatase, ACP = saure Phosphatase. 100 % Farnesol entspricht der maximal freisetzbaren Menge an Farnesol, berechnet durch Extraktion einer äquimolaren Menge an freiem Farnesol. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass die alkalische Phosphatase aus der Rinderschleimhaut Farnesylpyrophosphat nicht nur am effektivsten, sondern auch nahezu quantitativ spaltet. Lässt man die Kationenzusätze weg, läuft die Hydrolyse des Phosphats wie bei den anderen beiden Phosphatasen nur unvollständig ab. Die Gabe von zusätzlicher Apyrase verbesserte die Wiederfindung nicht weiter als Ansätze mit alleiniger Phosphatase. Apyrasen sind Enzyme, welche Phosphorsäureanhydrid-Brücken spalten, und somit Isoprenoid-Pyrophosphatester in Isoprenoid-Monophosphatester umwandeln. Die resultierenden Monophosphatester können dann von den Phosphatasen leichter angegriffen werden. Denn für Enzyme ist es durchaus ein Unterschied, ob die Esterbrücke zwischen dem Alkohol und der Phosphorsäure oder die Anhydridbrücke zwischen zwei Phosphorsäure-Einheiten hydrolysiert wird. Die Haupteigenschaft von Phosphatasen ist

die Spaltung der Esterbrücke zwischen dem Alkohol und der Phosphorsäure. Doch häufig ist die Spezifität dieser Enzyme nicht stark genug, um ausschließlich Esterbrücken zu spalten und viele Phosphatasen besitzen zusätzlich Fähigkeiten einer Apyrase, nur schwächer ausgeprägt. Und tatsächlich reichte die geringe Apyrase-Aktivität, welche die meisten Phosphatasen besitzen aus, dass die zusätzliche Gabe von Apyrase keine Verbesserung gegenüber der alleinigen Gabe der Phosphatase brachte.

Als nächstes wurde überprüft, welche Inkubationsdauer benötigt wird, um eine gewisse Menge Farnesylpyrophosphat zu spalten (Abbildung 3.18). Die Reaktion verläuft anscheinend sehr schnell; eine relevante Menge Farnesol lässt sich schon zum Zeitpunkt „0“ finden, also unmittelbar nach Zugabe des Enzyms und sofortiger Aufarbeitung. Nach 10 min wird schon das Maximum erreicht und nach 1 h nimmt die gemessene Farnesolmenge kurioserweise kontinuierlich ab, bis nach 6 h nur noch ca. die Hälfte übrig ist. Warum die Menge an freiem Farnesol mit der Zeit langsam aber stetig absinkt ist nicht klar. Theoretisch kann jedes Enzym zur eigentlichen Reaktion auch die Rückreaktion katalysieren. Im Falle der alkalischen Phosphatase wäre dafür eine große Menge an freien Phosphat nötig⁸⁷. Im Falle des Farnesols würde das heißen, dass die im Reaktionsverlauf ansteigende Menge von hydrolysiertem Phosphat dafür verantwortlich ist, das Enzym zu hemmen und die Umkehrreaktion in Gang zu bringen. Dieser Mechanismus könnte ein Absinken des Farnesolspiegels mit der Zeit zumindest teilweise erklären.

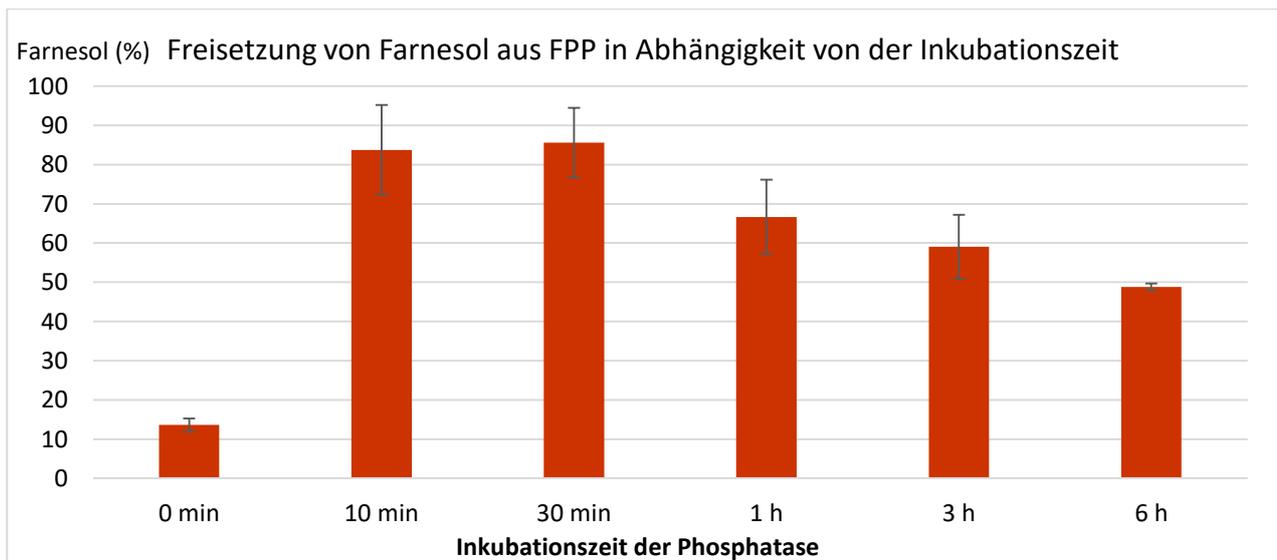


Abbildung 3.18 Wiederfindung von freiem Farnesol aus Farnesylpyrophosphat (FPP) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Für die Lyse wurden 2 Units der alkalischen Phosphatase aus Rinderschleimhaut verwendet. FPP: 2 µg. Reaktionspuffer: NaOH/Glycin (pH = 10,4; 0,1 M). 100 % Farnesol entspricht der maximal freisetzbaren Menge an Farnesol. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass FPP mithilfe der alkalischen Phosphatase aus Rinderschleimhaut schnell und effektiv gespalten werden kann. Um die Phosphatase in die Aufarbeitungsmethode zu integrieren, wurde die alkalische Lyse der Zellen geringfügig modifiziert. Statt 1 mL Natronlauge (1 M) werden nun 300 μL der Natronlauge verwendet. Nach erfolgreicher Lyse wird das Zelllysate zur Neutralisation mit 300 μL HCl versetzt und anschließend mit 60 μL 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer (NaOH/Glycin; pH = 10,4; 1 M; $\text{Mg}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 10 mM; siehe Kapitel 6.1) versetzt. Dieser Reaktionspuffer ist 10-fach konzentriert gegenüber der Konzentration, die eigentlich in der Probe erreicht werden soll. Die Zugabe von 60 μL auf 600 μL ergibt eine Verdünnung um den Faktor 10, sodass die gewünschte Konzentration des Puffers in der Probe (0,1 M) erreicht wird. Mehrere Probeversuche mit anschließender pH-Wert-Messung zeigten, dass diese Schritte - Neutralisation und Pufferung – ausreichen um den gewünschten pH-Wert im Probengefäß einzustellen. Anschließend kann das Enzym zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert werden. Probeversuche mit FPP dotierter Matrix zeigten eine vollständige Umsetzung des Farnesylpyrophosphats in den freien Alkohol. Eine Übersicht der aktuellen Methode, welche für die darauffolgenden Zellversuche eingesetzt wurde, zeigt Abbildung 3.19.

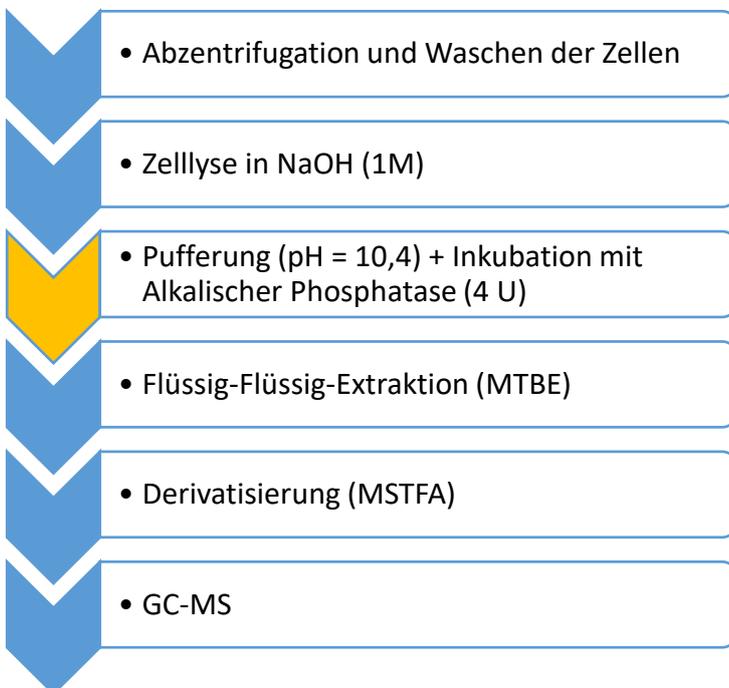


Abbildung 3.19 Schema der modifizierten Probenvorbereitungsmethode. Der neue Schritt, die Pufferung des Zelllysates auf pH = 10,4 und der Einsatz der Phosphatase zur Abspaltung von Pyrophosphat, ist gelb markiert. Die restlichen Schritte sind gleich geblieben (Übersicht der ursprünglichen Vorschrift: siehe Kapitel 3.1.3).

3.2.3 Tests mit Inhibitoren

Mit dem modifizierten Testsystem wurden erneut Zellversuche mit SQS-Inhibitoren durchgeführt und zum ersten Mal ließ sich nun ein Anstieg von Farnesylpyrophosphat (bestimmt als freies Farnesol) beobachten. Der FPP-Gehalt der Zellen stieg nach Gabe von Saragossasäure konzentrationsabhängig an. Im Gegenzug sank der Squalengehalt der Zellen (akkumuliert durch Gabe von NB-598, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben) durch die SQS-Hemmung ab (Abbildung 3.20). Genau dieser Effekt soll später in dem fertigen Testsystem bei unbekanntem Inhibitoren eine SQS-Hemmung eindeutig identifizieren.

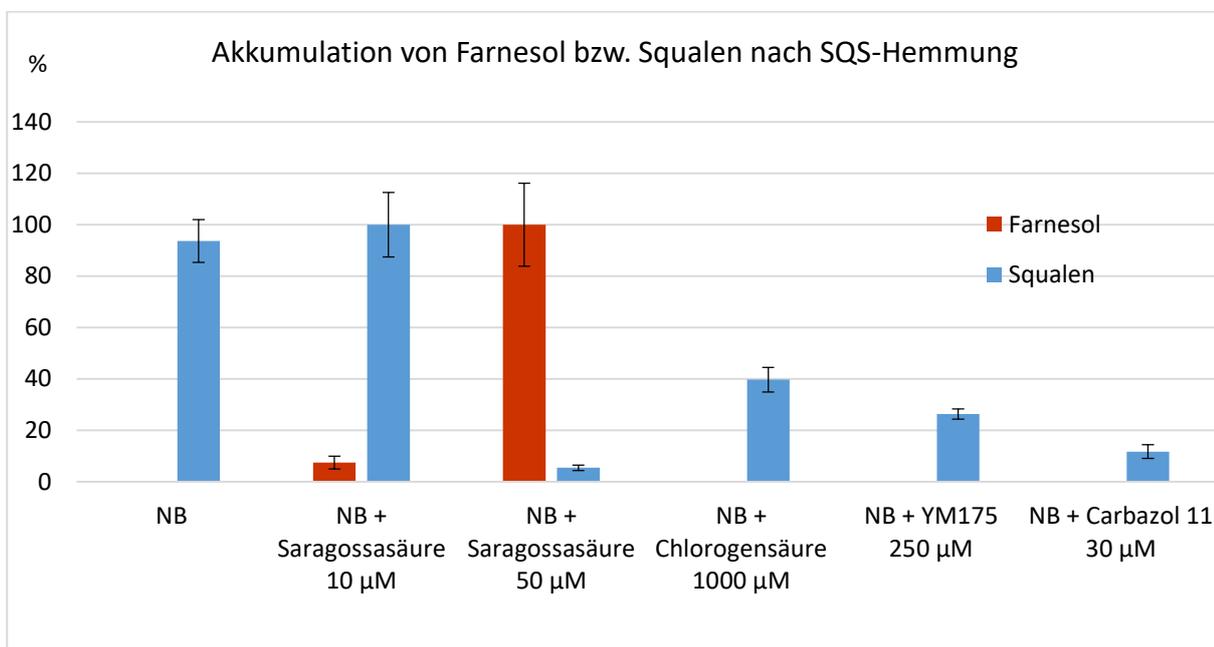


Abbildung 3.20 Farnesol- bzw. Squalengehalt nach Gabe verschiedener SQS-Inhibitoren, NB = Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 (in allen Experimenten 30 nM). 100 % Squalen entspricht der Squalenakkumulation nur mit NB-598 und ohne zusätzlichen SQS-Inhibitor. 100 % Farnesol entspricht der maximal akkumulierten Menge an Farnesol unter Saragossasäure (50 µM). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Allerdings zeigte nur die Saragossasäure den gewünschten Effekt, bei Chlorogensäure, YM175 und „Carbazol 11“ konnte nur ein unterschiedlich starkes Absinken an akkumuliertem Squalen beobachtet werden, jedoch keine Akkumulation von Farnesol. Daraus lässt sich folgern, dass die drei genannten Inhibitoren zwar die Cholesterolsynthese im Prä-squalen-Abschnitt hemmen, jedoch nicht an der Squalensynthese, da sonst ein Anstieg von Farnesol (wie bei der Saragossasäure) hätte beobachtet werden müssen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Substanzen neben

der Squalensynthese (in Assays an der isolierten SQS eindeutig bestätigt^{78,83,82}) auch noch ein oder mehrere weitere Enzyme „upstream“ der SQS hemmen und zwar in einem stärkeren Maße als die SQS. Dies würde dazu führen, dass in einem zellulären Testsystem das erste signifikant gehemmte Enzym „downstream“ die Versorgung von Farnesylpyrophosphat für die Squalensynthese blockiert. Damit lässt sich auch keine Akkumulation von Farnesol messen, obwohl der Inhibitor grundsätzlich auch zur SQS-Hemmung in der Lage wäre.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt (Abbildung 3.21):

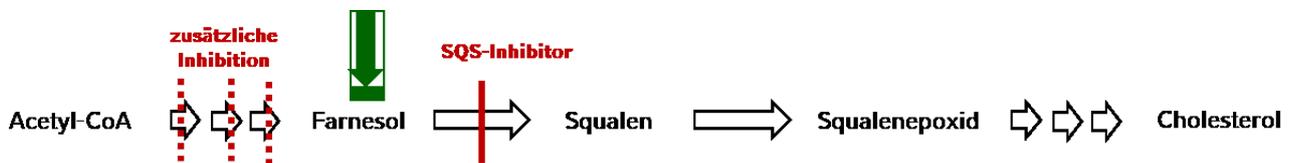


Abbildung 3.21 Schematischer Überblick über den Effekt, den ein Inhibitor erzielt, der neben der Squalensynthese (SQS) noch weitere Enzyme „upstream“ hemmt. Normalerweise würde der Farnesolpyrophosphat-Gehalt durch die SQS-Hemmung ansteigen (grüner Balken), doch wegen zusätzlicher Inhibition „upstream“ findet eine abgeschwächte bzw. keine Akkumulation statt (grüner Pfeil), da der SQS weniger bzw. kein FPP mehr zugeführt wird.

So wie bisher standardmäßig Squalen durch Gabe von NB-598 akkumuliert wurde, so wurde für dieses Experiment eine hohe Konzentration Saragossasäure (50 μ M) verwendet, um in allen Zellen FPP akkumulieren zu lassen. Gleichzeitig wurden die Chlorogensäure, YM175 bzw. „Carbazol 11“ in wirksamen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und zusammen mit der Saragossasäure inkubiert. Falls die Inhibitoren ähnlich wie die Saragossasäure nur die SQS hemmen, dann sollte durch die Co-Inkubation kein beobachtbarer Effekt auftreten, da die SQS schon bereits durch die Saragossasäure vollständig gehemmt ist. Falls durch die anderen Inhibitoren tatsächlich ein oder mehrere Enzyme „upstream“ zusätzlich zur Squalensynthese gehemmt werden, dann würde der durch die Saragossasäure akkumulierte Farnesolgehalt bei Co-Inkubation absinken. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

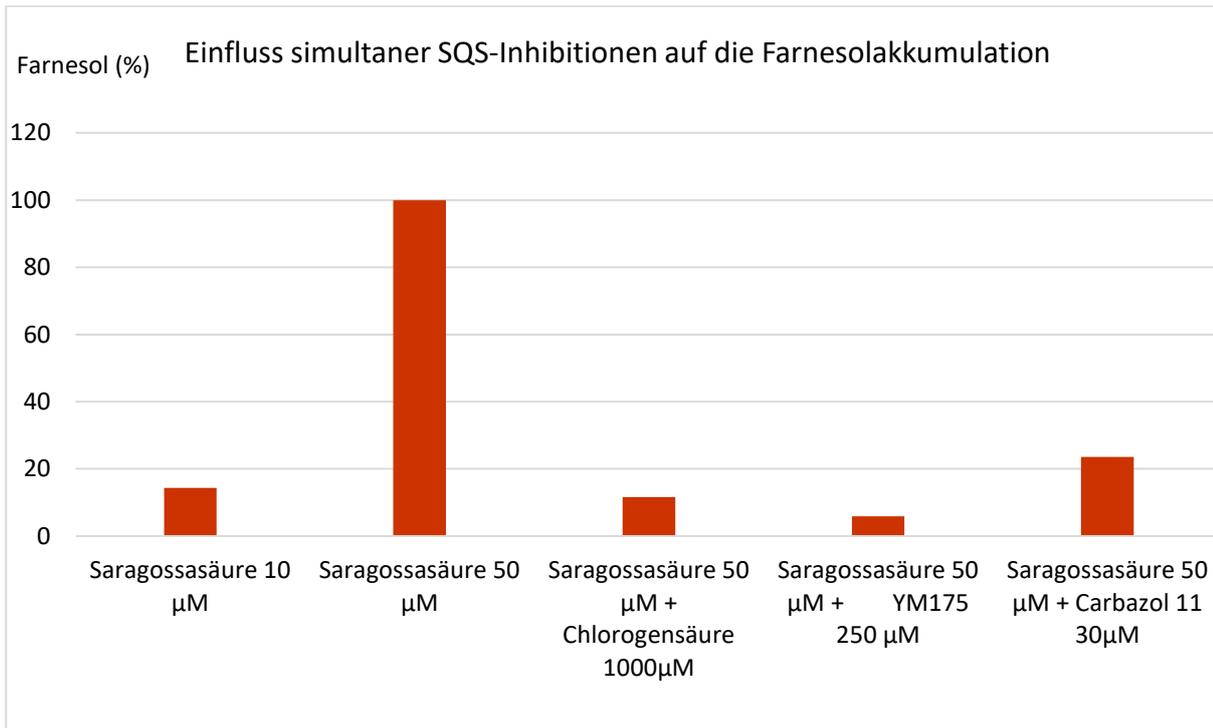


Abbildung 3.22 Einfluss einer Co-Inhibition von Saragossasäure mit Chlorogensäure, YM175 bzw. „Carbazol 11“ auf die Akkumulation von Farnesol. 100 % Farnesol entspricht der maximal akkumulierten Menge an Farnesol unter Saragossasäure (50 µM).

Es lässt sich eindeutig erkennen, dass eine simultane Inkubation von Saragossasäure und den anderen Inhibitoren die Akkumulation von Farnesol reduziert. Daraus lässt sich folgern, dass Chlorogensäure, YM175 und „Carbazol 11“ in einem zellulären System noch andere Enzyme „upstream“ der Squalensynthese hemmen. Diese Erkenntnis lieferte den Anstoß dafür, den Assay auf weitere Enzyme zu erweitern. Ähnlich dem bereits im Arbeitskreis Bracher etablierten Assay für Enzyme des Postsqualen-Abschnitts der Cholesterolsynthese⁵⁹, welcher ebenfalls mehrere Enzyme überspannt, sollte es möglich sein den erfolgreich entwickelten Squalensynthese-Assay zu einem Multienzym-Assay umzugestalten. Und da das Kernprinzip - die Akkumulation eines Substrates zur Identifikation des Targetenzym - gleich bleibt, bestand die Herausforderung hauptsächlich darin, die entsprechenden Substrate nach der Aufarbeitung auch in der GC-MS zu detektieren.

3.2.4 Exkurs: Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Die Bestimmung von IC₅₀-Werten innerhalb zellulärer oder noch komplexerer biologischer Systeme (dann EC₅₀) ist nicht immer einfach zu bewerkstelligen. Grundsätzlich ist der IC₅₀-Wert diejenige Konzentration, bei der der Inhibitor das betreffende Enzym halbmaximal hemmt. Um diesen Wert zu bestimmen, wird entweder das Absinken der Produktmenge oder das Ansteigen des Substrates gemessen. Solange der IC₅₀-Wert an dem isolierten Enzym bestimmt wird, sind diese beiden Ansätze (Bestimmung von Substrat bzw. Produkt) noch einfach zu bewerkstelligen. In lebenden Zellen dagegen besteht einerseits die Möglichkeit, dass das akkumulierende Substrat in andere Stoffwechselwege geschleust oder gleich direkt abgebaut wird. Weiterhin ist es schwierig eine halbmaximale Produktion zu berechnen, wenn das Produkt sofort von dem nächsten Enzym in mehrstufigen Biosynthesen komplexer Biomoleküle weiterverarbeitet wird. Es ist zwar grundsätzlich möglich das Enzym (oder die Enzyme) zu hemmen, welches für die Weiterverarbeitung des Produkts verantwortlich ist, doch dann wird noch stärker in das biologische System eingegriffen. Bei Inhibitoren, die in die Cholesterolsynthese eingreifen, hat sich daher etabliert den IC₅₀-Wert von Inhibitoren in zellulären Testsystemen oder Lebewesen (z.B. Ratten⁸²) auf die Fähigkeit zu beziehen, die Menge an neugebildeten (*de-novo*) Cholesterol (also dem Endprodukt der gesamten Biosynthese) zu reduzieren. Theoretisch sollte ein auf Cholesterol bezogener IC₅₀-Wert vergleichbar sein mit dem IC₅₀-Wert, der aus Messung der Substrate oder Produkte des betrachteten Zielenzyms resultiert – zumindest für Inhibitoren, die nur ein einziges Enzym der gesamten Biosynthese hemmen. Um diese auf verschiedene Weise berechneten IC₅₀-Werte besser einschätzen zu können, wurde der IC₅₀-Wert von Saragossasäure auf drei verschiedene Arten bestimmt. Zuerst wurde der klassische IC₅₀-Wert berechnet, welcher sich auf die Reduktion der *de-novo*-Biosynthese von Cholesterol bezieht. Dies war möglich, indem die Zellen statt mit NB-598 mit ¹³C-Acetat zusätzlich zur Saragossasäure inkubiert wurden. Als Folge wird durch das Überangebot von ¹³C-Acetat ganz überwiegend isotopenmarkiertes Cholesterol gebildet, dessen Abnahme mit steigender Inhibitor-Konzentration beobachtet werden kann (gleiches Prinzip wie beim Assay nach Giera⁵⁹). Substrat (Farnesylpyrophosphat) und Produkt (Squalen) des Zielenzyms Squalensynthase wurden in einem parallel angesetzten Versuch unter Verwendung des in dieser Arbeit entwickelten Testsystems bestimmt. Anschließend wurden die gemessenen Konzentrationen der jeweiligen Analyte gegen die logarithmierten Konzentrationen der Saragossasäure aufgetragen und die IC₅₀-Werte bestimmt (Abbildung 3.23).

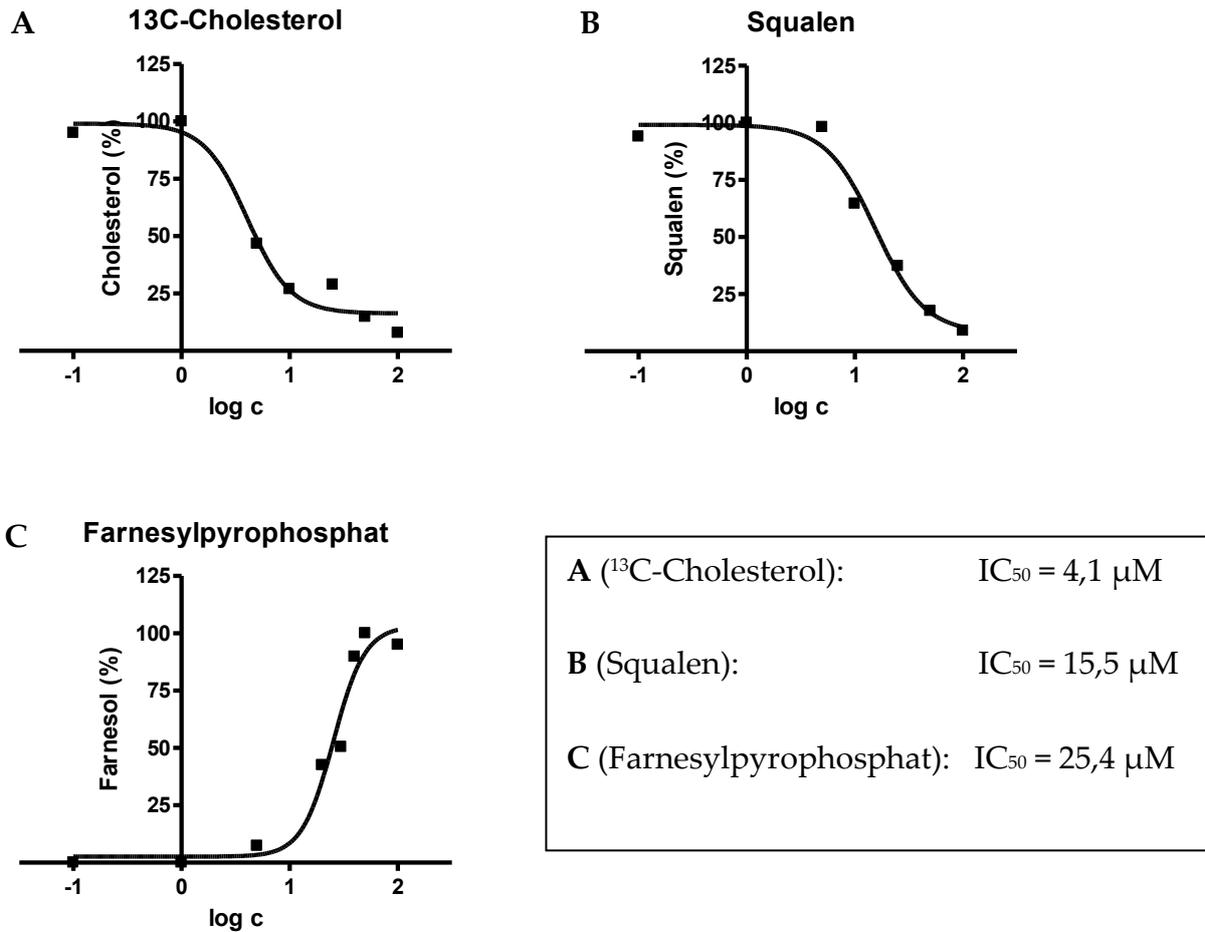


Abbildung 3.23 Bestimmung des IC_{50} von Saragossasäure bezogen auf konzentrationsabhängige Veränderung von A: ^{13}C -Cholesterolbiosynthese, B: Squalen-Konzentration, C: Farnesylpyrophosphat-Konzentration.

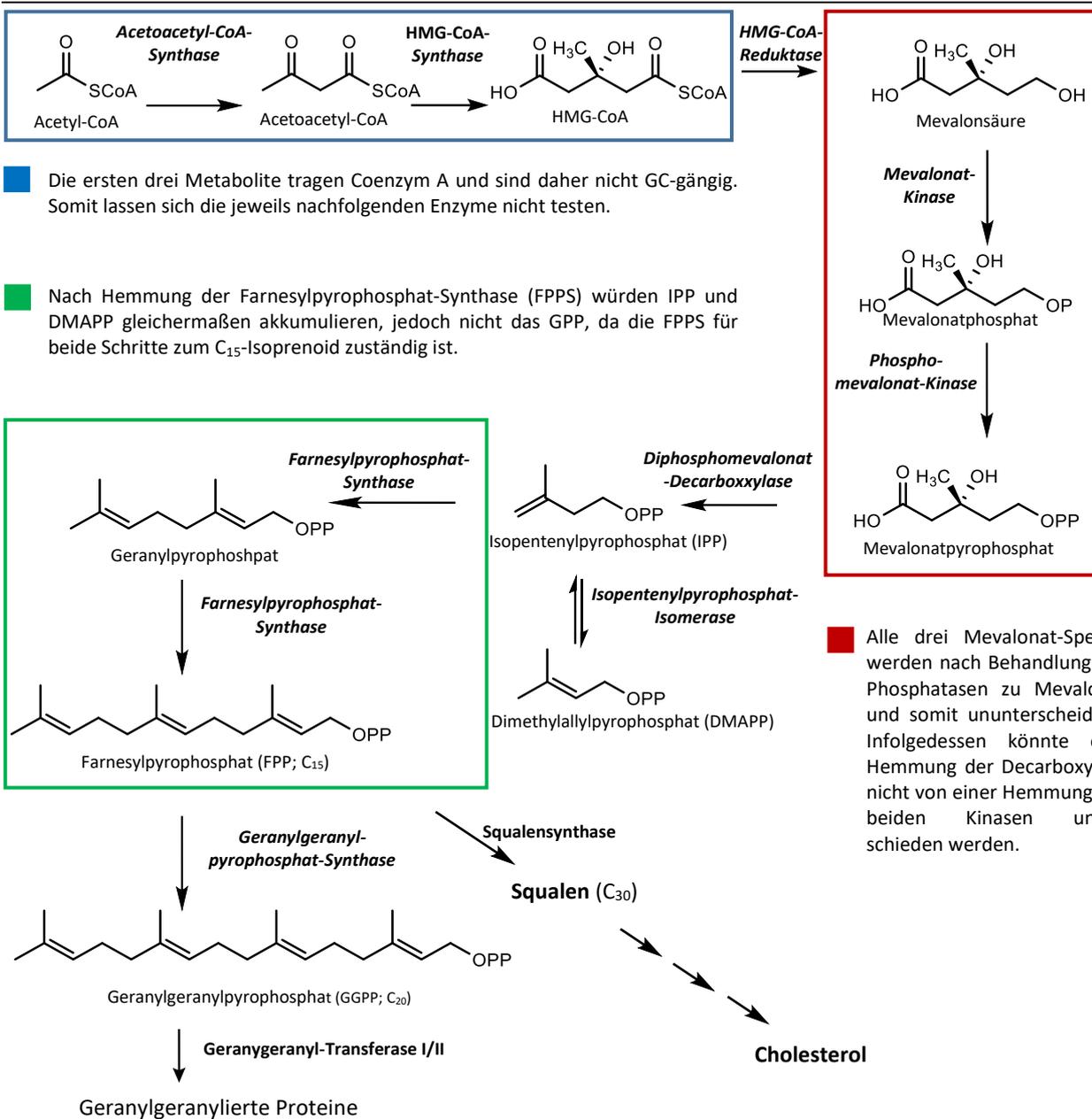
Die niedrigste halbmaximale Hemmkonzentration wurde ermittelt, wenn die *de-novo*-Biosynthese von ^{13}C -Cholesterol als Maßstab für die Hemmung verwendet wurde. Die beiden anderen IC_{50} -Werte, bei denen Farnesol halbmaximal akkumuliert bzw. das akkumulierte Squalen auf die Hälfte seiner Ausgangsmenge absinkt, liegen etwa um den Faktor 4 bzw. 8 höher, aber immer noch grob in der gleichen Größenordnung. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen bei NB-598 (IC_{50} bezogen auf Cholesterol: 4,2 nM, bezogen auf Squalen 5,6 nM, siehe Kapitel 3.1.2). Auch hier ist die halbmaximale Hemmkonzentration für Cholesterol wieder etwas niedriger als die für Squalen. Der Unterschied ist bei Squalen zwar nicht so groß wie bei der Saragossasäure, doch die Tendenz bleibt.

Für den in dieser Arbeit entwickelten Assay gilt nach wie vor, dass neu entdeckte Inhibitoren über den IC_{50} -Wert bezogen auf die de-novo-Cholesterolsynthese charakterisiert werden. Dieses Experiment soll aber helfen, das Potential von unbekanntem Inhibitoren zur Hemmung der Cholesterolsynthese bereits vor dem eigentlichen IC_{50} -Experiment größenordnungsmäßig einzuschätzen.

3.2.5 Erweiterung des Testsystems auf andere Targetenzyme

Abbildung 3.24 zeigt einen Überblick der enzymatischen Reaktionen bis zum Squalen. Die ersten Schritte von Acetyl-CoA bis zum 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) lassen sich mit der geplanten Methode nicht erfassen, da der sehr große Coenzym A Rest vor der Messung und vermutlich auch vor der Flüssig-Flüssig-Extraktion abgespalten werden müsste. Dafür gibt es jedoch keine einfache Lösung, welche im Aufarbeitungsprotokoll zusätzlich untergebracht werden könnte. Daher werden an Coenzym A gebundene Substrate und deren verarbeitende Enzyme nicht weiter in der Methodenentwicklung berücksichtigt. Das erste interessante Molekül ist somit Mevalonat (MVA), welches nach geeigneter Aufarbeitung mittels GC-MS analysiert werden kann. Mevalonat entsteht durch die HMG-CoA-Reduktase aus HMG-CoA und wird nach doppelter Phosphorylierung in das erste Isoprenoide Isopentenylpyrophosphat (IPP) umgewandelt. Das Problem hierbei ist, dass bei allen drei Schritten (Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase, Diphosphomevalonat-Decarboxylase) Mevalonat bzw. phosphorylierte Mevalonate als Substrate verwendet werden, welche in dem entwickelten Assay nach Einsatz der Phosphatase allesamt zu Mevalonat werden würden. Das bedeutet, jedes der drei Enzyme würde nach einer Hemmung einen Anstieg von Mevalonat zur Folge haben und es wäre nicht möglich, die Hemmung einem bestimmten dieser drei Enzyme zuzuordnen. Dennoch wurde versucht Mevalonat in das Testsystem mit einzubeziehen, da es zusätzliche Informationen über einen unbekanntem Inhibitor liefern kann. Die beiden C_5 -Isoprenoide Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) werden von der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) umgesetzt und würden nach Hemmung derselben beide akkumulieren. IPP und DMAPP stehen untereinander mittels der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (IPP-Isomerase) im Gleichgewicht. Obwohl sich die beiden C_5 -Isoprenoide sehr ähneln (Stereoisomere), sollte es möglich sein die beiden Moleküle mittels Gaschromatographie zu trennen. Nach erfolgreicher Adaption des Assays an die beiden kleinen Isoprenoide

Methodenentwicklung



Die ersten drei Metabolite tragen Coenzym A und sind daher nicht GC-gängig. Somit lassen sich die jeweils nachfolgenden Enzyme nicht testen.

Nach Hemmung der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) würden IPP und DMAPP gleichermaßen akkumulieren, jedoch nicht das GPP, da die FPPS für beide Schritte zum C₁₅-Isoprenoid zuständig ist.

Alle drei Mevalonat-Spezies werden nach Behandlung mit Phosphatasen zu Mevalonat und somit ununterscheidbar. Infolgedessen könnte eine Hemmung der Decarboxylase nicht von einer Hemmung der beiden Kinasen unterschieden werden.

Abbildung 3.24 Überblick und Besonderheiten des Prä-squalen-Abschnittes der Cholesterolsynthese

könnte demnach nicht nur eine Inhibition an der FPPS-Synthase, sondern auch an der IPP-Isomerase nachgewiesen werden. Das nächste Molekül im Stoffwechselweg ist Geranylpyrophosphat, welches mithilfe der FPPS entsteht. Dieser Metabolit ist relativ uninteressant, da er durch das gleiche Enzym zum Farnesylpyrophosphat weiterverarbeitet wird. Eine Hemmung an der FPPS würde also keine Akkumulation von Geranylpyrophosphat zur Folge haben, sondern immer von IPP und DMAPP. Während Farnesylpyrophosphat im Zusammenhang mit der Squalensynthase bereits etabliert ist (siehe Kapitel 3.2), könnte Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) als letzter möglicher

Kandidat im Präsqalen-Abschnitt ebenfalls interessant sein. Die Enzyme, welche GGPP weiterverarbeiten, sind die Geranylgeranyl-Transferase I und II (GGTase I/GGTase II). Diese Enzyme sind zwar nicht Teil der Biosynthese von Cholesterol, doch durch seine strukturellen Ähnlichkeiten zu FPP dürfte es leicht sein, GGPP in das bestehende Testsystem zu inkorporieren. Ein Anstieg des C₂₀-Körpers GGPP kann aus einer Hemmung der Geranylgeranyl-Transferase oder als Folge einer Umverteilung von FPP von nach SQS-Hemmung resultieren. Der erwartete Anstieg wäre zwar sehr gering⁵⁷, bietet aber dennoch mehr Informationen für den Assay.

Wenn es möglich wäre mit ein und demselben Testsystem alle genannten Vorstufen zu detektieren, ließen sich Rückschlüsse auf bis zu sechs weitere Enzyme neben der Squalensynthese ziehen. Daher wurde beschlossen, weitere Versuche zur Erweiterung des Testsystems durchzuführen.

3.2.5.1 Geranylgeranylpyrophosphat

Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) ist das als C₂₀-Körper zweitgrößte Isoprenoid (nach Squalen) und nicht Intermediat der Cholesterolbiosynthese. Stattdessen wird es in Zellen ebenso wie Farnesylpyrophosphat zur Prenylierung von Proteinen verwendet. Demnach akkumuliert es vor allem nach Hemmung der Geranylgeranyl-Transferase (GGTase). Es kann aber auch als Nebeneffekt einer Hemmung der Squalensynthese akkumulieren, wenn auch in geringerem Maße (Abbildung 3.25). Dieser Effekt wurde schon mehrmals publiziert^{57,85,88}. Der Grund für die Akkumulation von GGPP nach einer SQS-Inhibition ist eine Umverteilung von Farnesylpyrophosphat. Denn wenn FPP in den Zellen anstaut, kann ein Teil davon in alternative Stoffwechselwege fließen, z.B. die Biosynthese von Dolichol, Häm A und eben auch GGPP (Abbildung 3.25).

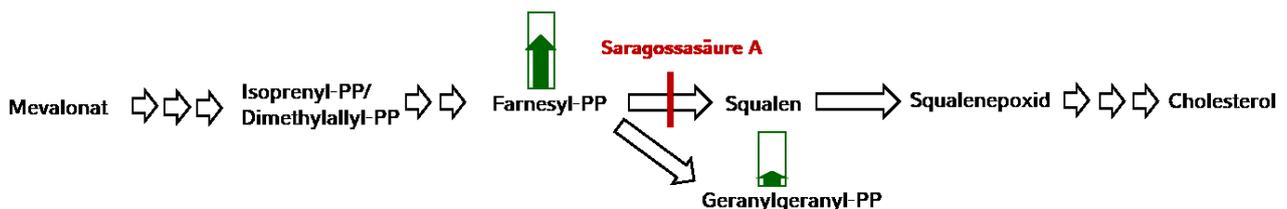


Abbildung 3.25 Schema zur Umverteilung akkumuliertem FPP nach SQS-Hemmung

Geranylgeraniol konnte mit der bestehenden Methode einwandfrei extrahiert und mit derselben GC-MS Methode analysiert werden, mit der bisherige Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Bedingungen für Einsatz der Phosphatase wurden beibehalten. Es konnte also derselbe Versuchsaufbau wie bei der Akkumulation von Farnesol verwendet werden. Nur sollte dieses Mal auch ein Anstieg von Geranylgeraniol zu messen sein, da die GC-MS Methode im Gegensatz zu früheren Versuchen nicht blind für Geranylgeraniol ist. Für den Versuch wurde wieder die Saragossasäure eingesetzt, welche sich bereits in vorherigen Versuchen als zuverlässiger und selektiver Squalensynthese-Inhibitor erwiesen hatte (Abbildung 3.26).

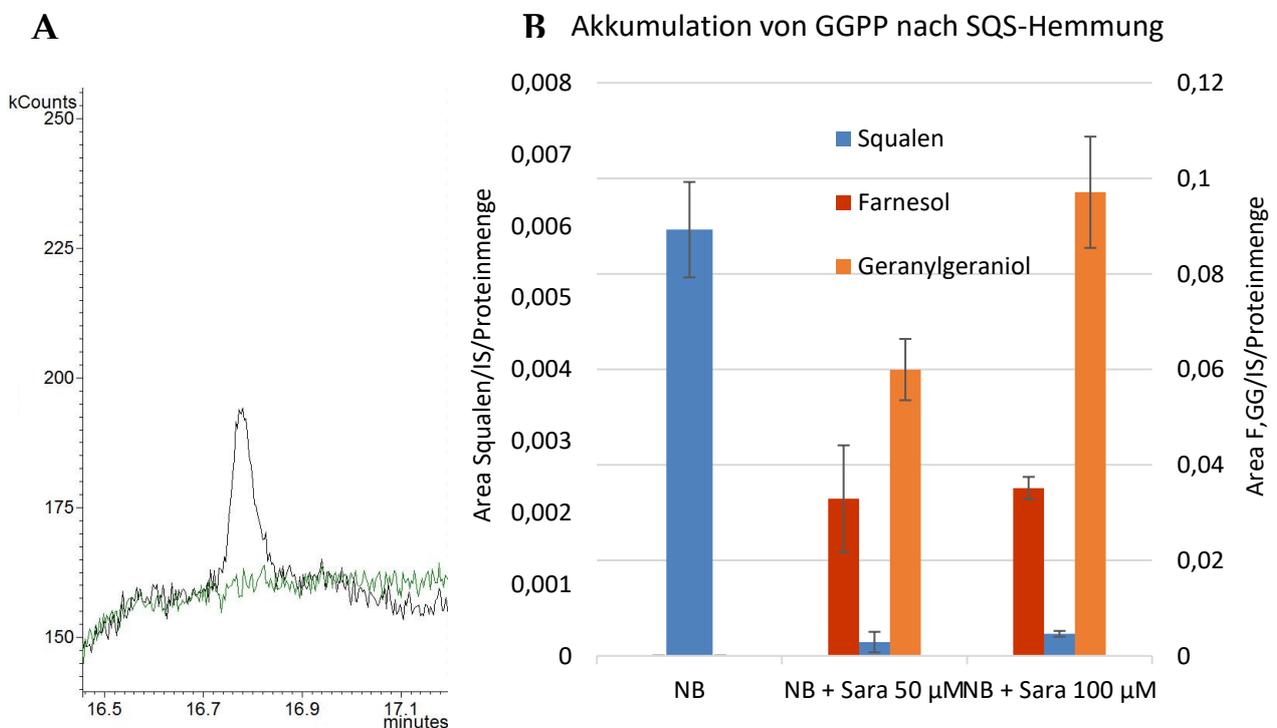


Abbildung 3.26 **A**: Beispielchromatogramm von akkumulierten GGPP. **Schwarz** = Hemmung mit SQS-Inhibitor Saragossasäure, **grün** = ohne Inhibitor. **B**: Akkumulation von FPP und GPP nach SQS-Inhibition, NB = NB598 (30 nM), Sara = Saragossasäure A. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Die Ergebnisse der Zellversuche beweisen, dass das Testsystem in der Lage ist einen Anstieg von Geranylgeranylpyrophosphat in Zellen zu detektieren. Ob eine Hemmung der Geranylgeranyl-Transferase ebenso vom Testsystem detektiert werden kann, wurde nicht mehr untersucht, da die GGT kein Enzym innerhalb der Cholesterolsynthese ist und damit nicht die gleiche Relevanz für diese Arbeit besitzt wie andere Enzyme

innerhalb der Cholesterolsynthese. Es wurde daher entschieden keinen GGTase-Inhibitor zu kaufen, um die Akkumulation von Geranylgeranylpyrophosphat (welche schon nach Inkubation mit Saragossasäure gezeigt werden konnte) noch weiter zu überprüfen.

Grundsätzlich ist das Testsystem aber in der Lage, diese nach GGTase-Hemmung resultierende Akkumulation von GGPP, so lange sie stark genug ist, zu messen. Doch diese Akkumulation fällt oftmals nur sehr schwach aus. Hennemann et al. konnten 2011 mit einem ebenfalls auf Massenspektrometrie basierenden Assay keine Akkumulation von Geranylgeraniol nach Hemmung der Transferase nachweisen⁸⁵. Daher sind für die Messung der Aktivität der Geranylgeranyl-Transferase andere Methoden wie enzymatische Assays oder Western-Blots geeigneter.

3.2.5.2 Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat

Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat werden von geeigneten Phosphatasen zu den freien C₅-Alkoholen Isoprenol (3-Methyl-3-buten-1-ol) und Prenol (3-Methyl-2-buten-1-ol) umgesetzt. Um das Testsystem auf die beiden Metaboliten zu erweitern ist es erforderlich, diese beiden Isoprenoide in die bestehende GC-MS Methode einzubinden. In ersten Versuchen aber waren beide Moleküle nicht zu detektieren (Abbildung 3.27, A). Wenn Substanzen in der Gaschromatographie keinen Peak erzeugen, kann das grundsätzlich zwei Gründe haben:

- Coelution mit dem Lösungsmittelpeak
- Substanz eluiert gar nicht, weil sie nicht flüchtig ist (z.B. Salze).

Da Isoprenol und Prenol kleine, leichte und sehr flüchtige (Sdp. 129 °C bzw. 140 °C) Substanzen sind, wurde gefolgert, dass sie zu schnell eluieren. Das ist deshalb ein Problem, weil während der ersten Minuten eines GC-Laufes die MS-Detektoren noch nicht eingeschaltet werden, um eine Verschmutzung durch das zwangsläufig riesige Lösungsmittel-Signal zu vermeiden. Um die Isoprenol- und Prenol-Peaks doch noch zu sehen, wurde der Lösungsmittel-Cut-Off stetig in kleinen Schritten bis zum Lösungsmittel-Peak verschoben. Trotzdem konnte kein Isoprenol oder Prenol beobachtet werden; es scheint als würden die beiden Substanzen tatsächlich zusammen mit dem

Lösungsmittel-Peak eluieren. Auch Änderungen am Säulenofenprogramm brachten nicht den gewünschten Effekt.

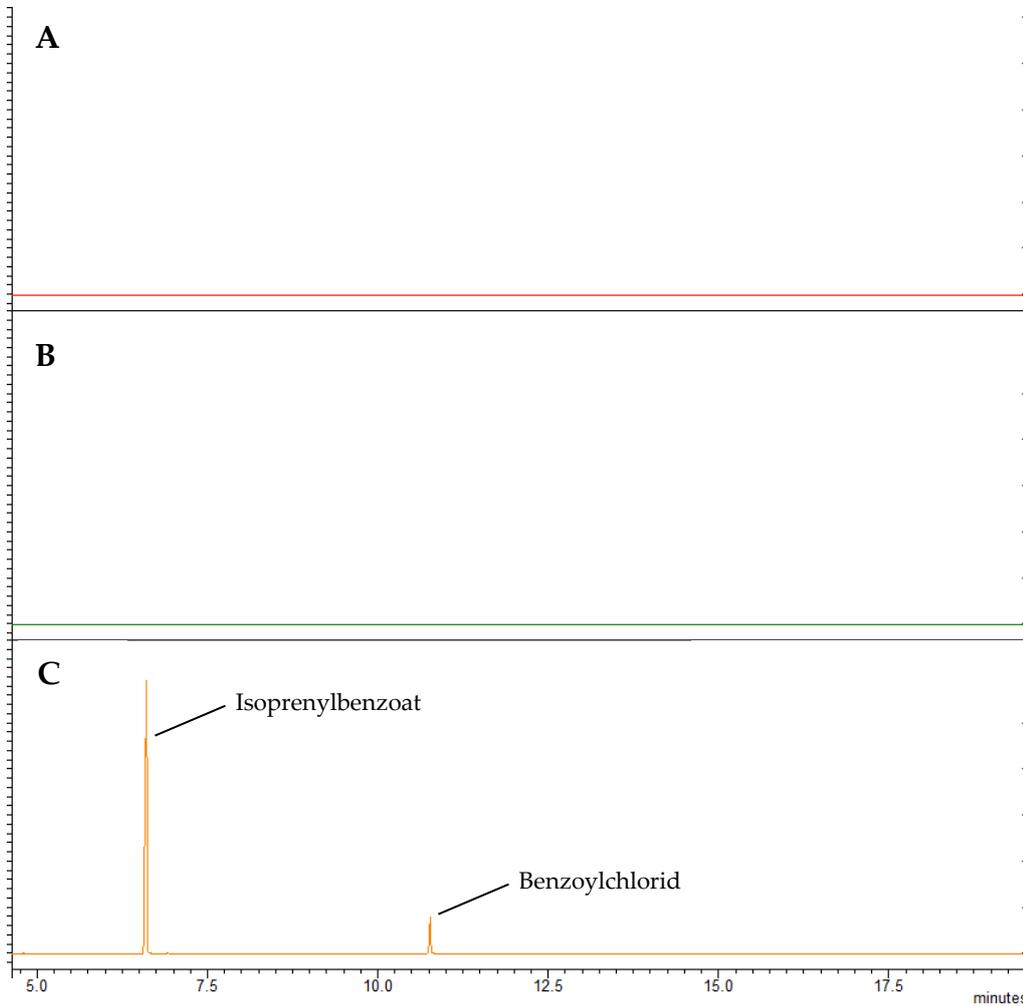


Abbildung 3.27 Chromatogramme von Isoprenol (A), Isoprenol als Trimethylsilylether (B) und Isoprenol als Benzoatester (C)

Um dieses Problem zu lösen, wurden mehrere Derivatisierungsreagenzien getestet, denn durch geeignete Derivatisierung (hier also mit dem eher untypischen Ziel, die Analyten weniger flüchtig zu machen) würden die Substanzen später eluieren. Die bisher verwendete Derivatisierungsmethode für neutrale Sterole/Terpene, welche eine Trimethylsilyl (TMS)-Gruppe an freie Alkohole anfügt (und diese damit flüchtiger macht), war dafür nicht geeignet (Abbildung 3.27, B). Um die Flüchtigkeit von Isoprenol und Prenol zu reduzieren wurden, folgende Derivatisierungsreagenzien untersucht:

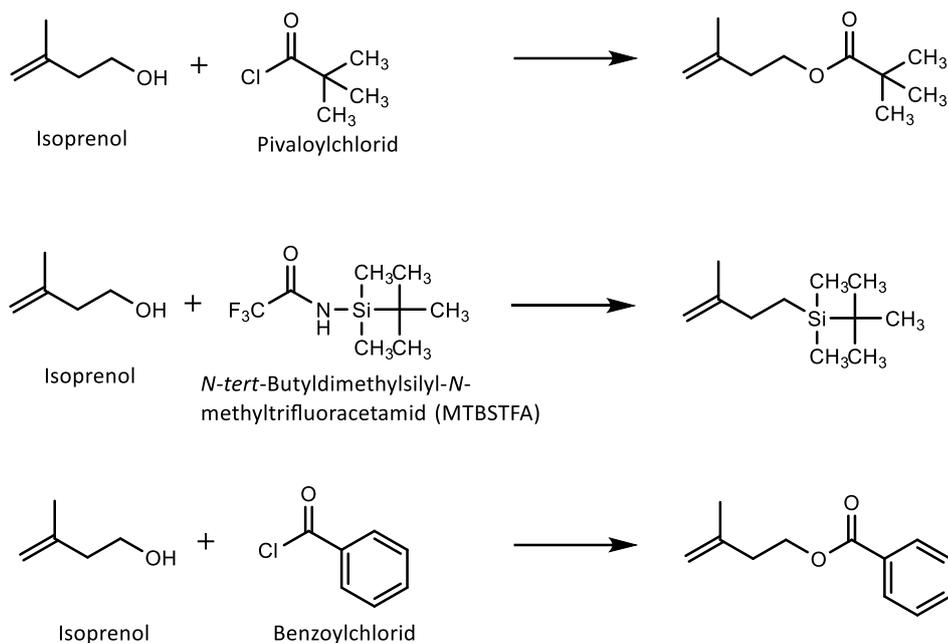


Abbildung 3.28 Potentielle Derivatisierungsreagenzien zur Erhöhung der Retentionszeit.

Einzig die Verwendung von Benzoylchlorid ermöglichte den Retentionsfaktor von Isoprenol weit genug zu erhöhen, dass sich der Isoprenolpeak signifikant vom Lösungsmittelpeak unterscheidet (Abbildung 3.27, C). Damit ist die GC-MS Methode in der Lage die beiden C₅-Isoprenoide zusammen mit Farnesol zu erfassen. Zwar wird durch die Derivatisierung mit Benzoylchlorid nun auch Farnesol und Geranylgeraniol derivatisiert, doch konnten die neuen Retentionszeiten ohne weiteres in die Methode übernommen werden. Farnesylbenzoat eluiert immer noch früher als Squalen und Cholestan (IS), und Geranylgeranylbenzoat kurz nach diesen beiden, sodass die Messdauer der Methode nicht verlängert werden musste (siehe Tabelle 3.3).

	Isoprenol	Prenol	Farnesol	Geranylgeraniol	Squalen	Cholestan (IS)
∅	-	-	8,45	10,30	16,31	16,58
Benzoylchlorid	5,97	6,34	14,48	16,74	16,31	16,58

Tabelle 3.3 Übersicht der Retentionszeiten der Analyte mit und ohne Derivatisierung durch Benzoylchlorid (und Pyridin). Zeit in Minuten.

Als nächstes wurde untersucht welche Menge an Benzoylchlorid nötig ist, um sicherzustellen, dass alle Analyten derivatisiert werden. Zwar könnte man auch auf Nummer sicher gehen und eine große Menge Reagenz zusetzen, doch damit würde

natürlich auch die Belastung des Gerätes mit überschüssigem Benzoylchlorid drastisch ansteigen. Daher ist es sinnvoll die Menge an Derivatisierungsreagenz so gering wie möglich zu halten, aber immer noch genug einzusetzen, um zuverlässig alle Analyten restlos zu derivatisieren. Benzoylchlorid ist (untypisch für Säurechloride) relativ stabil, selbst unter basischen Bedingungen bleibt es stabil (siehe Schotten-Baumann-Reaktion^{89,90}) und auch unter Probenvorbereitungsbedingungen reagierte es nicht vollständig ab. In einem Experiment wurden daher verschiedene Mengen an Benzoylchlorid (+ Pyridin in gleicher Menge) einer Mischung aller bisherigen derivatisierbaren Analyte (Mevalonolacton, Isoprenol, Prenol, Geraniol, Farnesol, Geranylgeraniol) (Konzentration 10 µg/mL in Isohexan) zugesetzt und die Proben nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden gemessen (Abbildung 3.29).

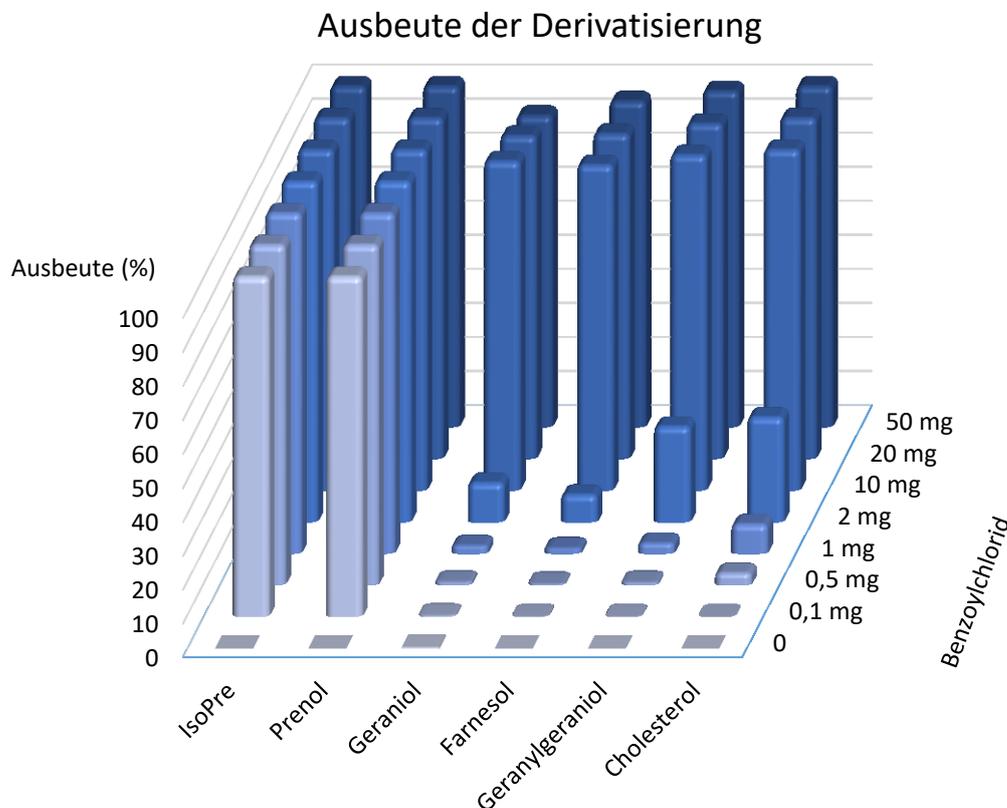


Abbildung 3.29 Ausbeute der Derivatisierung in Abhängigkeit von der Menge an Derivatisierungsreagenz. Menge an Alkohole: jeweils 10 µg. Die Hilfsbase Pyridin wurde stets in gleicher Menge (bezogen auf das Volumen) wie Benzoylchlorid zugegeben. Y-Achse: Ausbeute an derivatisiertem Analyt, Z-Achse: Menge an Derivatisierungsreagenz (Benzoylchlorid). Reaktionszeit = 3 h.

Interessant an dem Versuch sind zwei Dinge. Zum einen lässt sich leicht die Menge an Derivatisierungsreagenz ermitteln, welche für eine ausreichende Derivatisierung nötig ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, in welcher Reihenfolge die Analyten derivatisiert

werden. Während mit einer ausreichenden Derivatisierung für alle Analyten erst ab 10 μL Benzoylchlorid gerechnet werden kann, steigen die Isoprenol- und Prenol-Signale schon ab einer Menge von 0,1 μL Benzoylchlorid nicht mehr weiter an, was für eine quantitative Umsetzung zu ihren Benzoatestern spricht. Das ist sehr praktisch, da Isoprenol und Prenol im Gegensatz zu den anderen Isoprenoiden underivatisiert nicht detektiert werden können. Sobald derivatisiertes Farnesol gemessen werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass eventuell gleichzeitig vorhandene C₅-Isoprenoide ebenfalls vollständig derivatisiert worden sind.

Da nun die GC-MS Methode etabliert war, muss als nächstes die Aufarbeitung angepasst werden. Zunächst wurde mit den freien Alkoholen gearbeitet und die Extraktion der Alkohole aus wässriger Lösung samt nachfolgender Derivatisierung überprüft. Doch sofort zeigte sich ein weiteres Problem mit Isoprenol und Prenol. Sobald eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. Abkürzung: LLE, steht für *liquid-liquid extraction*) der Derivatisierung vorgeschaltet wird, lässt sich weder Isoprenol noch Prenol detektieren. Auch die benzoilierten Formen der anderen Analyte ließen sich nicht mehr detektieren bzw. sanken in ihrer Konzentration stark ab (Abbildung 3.30). Durch Messung der freien Formen von Farnesol, Geraniol und Geranylgeraniol konnte die Ursache des Problems bestimmt werden: die Extraktion gelang, aber die Derivatisierung war nicht erfolgreich! Denn es konnten trotz Zugabe der Derivatisierungsreagenzien nach der Extraktion underivatisiertes Farnesol, Geraniol und Geranylgeraniol gemessen werden. Underivatisiertes Isoprenol und Prenol lässt sich aufgrund oben genannter Probleme (Elution mit Lösungsmittelpeak) zwar nicht messen. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass Isoprenol und Prenol ein vergleichbares Extraktionsverhalten aufweisen wie die anderen Isoprenoide und somit ebenfalls erfolgreich extrahiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass die Ursache der fehlenden Peaks der C₅-Isoprenoide die ausbleibende Derivatisierung ist.

Des Weiteren konnte eine kleine Wasserblase am Boden der Ethylacetat-Phase, welche nach LLE abpipettiert wurde, beobachtet werden. Diese Wasserblase trat nur dann auf, wenn eine Flüssig-Flüssig-Extraktion von wässriger Lösung mit Ethylacetat und anschließend die Derivatisierung durchgeführt wurde (Abbildung 3.31). Die LLE oder die Derivatisierung alleine ließen keine Wasserblasen entstehen und jeder Prozess für sich alleine beeinflusste die Wiederfindung kaum. Alle Versuche die organische Phase nach der Extraktion mit großen Mengen an Natriumsulfat zu trocknen scheiterten. Lediglich die Zugabe eines großen Überschusses an Benzoylchlorid und Pyridin ermöglichte die

Derivatisierung der Analyte trotz der Wasserblase. Doch obwohl dieser Ansatz nicht als dauerhafte Lösung des Problems herangezogen werden konnte, lieferte er doch zusätzliche Informationen, um die Ursache des Dilemmas zu verstehen.

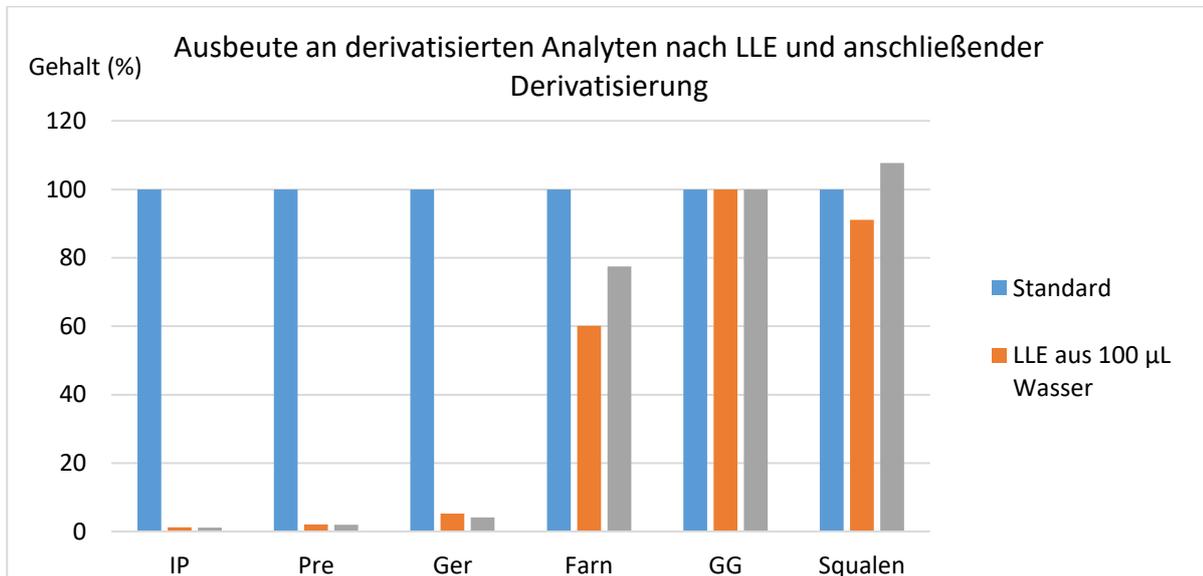


Abbildung 3.30 Ausbeute an derivatisierte Analyte nach Extraktion einer wässrigen Lösung von jeweils 10 µg/mL Isoprenol, Prenol, Geraniol, Farnesol, Geranylgeraniol und Squalen mit 1000 µL Ethylacetat. 100 % Gehalt entspricht maximaler Ausbeute nach der Derivatisierung, berechnet auf eine derivatisierte Standardlösung der reinen Isoprenoide in Ethylacetat. IP = Isoprenol, Pre = Prenol, Ger = Geraniol, Farn = Farnesol, GG = Geranylgeraniol. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

	keine Derivatisierung	Derivatisierung
reines Lösungsmittel	-	-
extrahiertes Lösungsmittel	-	wässrige Blase gebildet



Abbildung 3.31 Beobachtung der Abscheidung einer wässrigen Blase nach Zugabe der Derivatisierungsreagenzien. Dies findet nur statt, wenn vorher eine Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Wasser stattgefunden hat.

Während der Flüssig-Flüssig-Extraktion vermischt sich Wasser und Ethylacetat, und auch nach dem Abtrennen der organischen Phase ist ein kleiner Teil Wasser in der Ethylacetatphase gelöst. Dieser wässrige Anteil bleibt normalerweise gelöst und trennt sich nicht von alleine ab. Doch während der Derivatisierungsreaktion bildet sich als Begleitprodukt Salzsäure, welche von der Hilfsbase Pyridin abgefangen wird. Es entsteht das Salz Pyridiniumchlorid, welches wiederum durch Erhöhen der Ionenstärke die Phasentrennung einleitet, da gesättigte Lösungen bzw. Lösungen mit erhöhter Ionenstärke eine schlechtere Mischbarkeit mit unpolaren Lösungsmitteln haben. Dieser Effekt wird z.B. auch in der QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) Extraktionstechnik ausgenutzt, um die Wiederfindung polarer Verbindungen zu erhöhen⁹¹. Hier jedoch zieht die entstandene wässrige Blase insbesondere die kleineren Isoprenoide Isoprenol, Prenol (C₅) und Geraniol (C₁₀) in die wässrige Phase, in welcher sie der Derivatisierung entzogen werden. Zusätzlich zu den Analyten kann sich auch ein Teil des Pyridins in der wässrigen Phase lösen, welches dann nicht mehr als Hilfsbase reagieren kann. Weiterhin kann Benzoylchlorid auch Pyridin selber benzoylieren und das entstehende Salz die Bildung der wässrigen Phase verstärken. Dies erklärt, warum auch in extrahiertem Ethylacetat ohne Analyte zur Benzoylierung die Bildung einer wässrigen Blase zu beobachten ist.

Da die Ursache des Problems in einem ungeeigneten Lösungsmittel liegt, welches während der Flüssig-Flüssig-Extraktion zu viel Wasser aufnimmt, lag es nahe mehrere Lösungsmittel miteinander zu vergleichen und so ein besser geeignetes Lösungsmittel zu finden. Folgende Lösungsmittel wurden getestet:

- Ethylacetat, Methyl-*tert*-butylether, Isohexan, Diethylether, Diisopropylether, Acetonitril

Dichlormethan und Chloroform wurden nicht getestet, weil sie sich aufgrund der höheren Dichte unterhalb der wässrigen Phase befunden hätten und dies zu unpraktisch für die nachfolgenden Pipettierschritte gewesen wäre. Acetonitril ist mit Wasser mischbar, daher wurde für die Erzwingung einer Phasentrennung zusätzlich Na₂SO₄ eingesetzt. Alle Lösungsmittel wurden in einem Reaktionsgefäß mit Wasser vermischt, geschüttelt und nach Phasentrennung wieder abpipettiert. Zu der abgetrennten organischen Phase wurden 10 µL Benzoylchlorid und 10 µL Pyridin pipettiert. Unter den getesteten Lösungsmitteln zeigten nur Isohexan und Diisopropylether keine Neigung zur Wasserblasenbildung nach Zugabe der Derivatisierungsreagenzien. Da Isohexan ein

bekanntes und gebräuchliches Lösungsmittel für die Gaschromatographie ist, wurde dieses als neues organisches Lösungsmittel für die Aufarbeitung gewählt. Als letzte Änderung wurde Benzoylchlorid durch seine perfluorierte Variante Pentafluorbenzoylchlorid (PFBCl) ersetzt, um schnellere Reaktionszeiten und bessere Kompatibilität für negative chemische Ionisation (NCI) in eventuellen, künftigen Versuchen zu ermöglichen.

Ein anschließend durchgeführtes Wiederfindungsexperiment zeigte nach erfolgter Extraktion und Derivatisierung gute Ausbeuten von mindestens 75% bei allen Analyten (Abbildung 3.32).

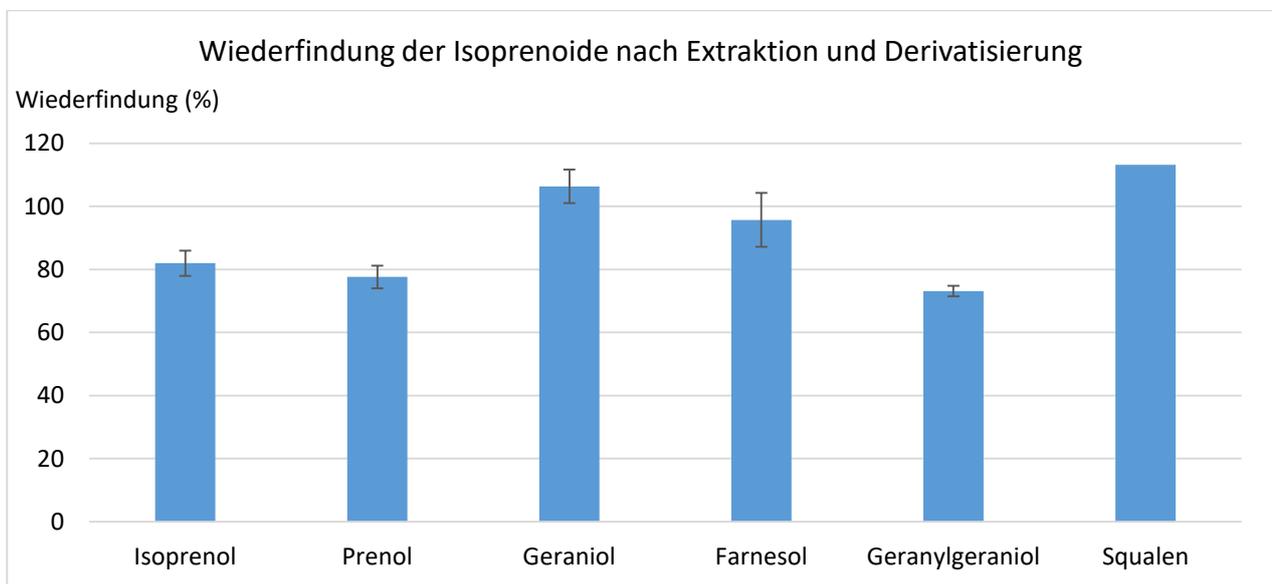


Abbildung 3.32 Wiederfindung pentafluorbenzoylierter Alkohole nach Extraktion von jeweils 10 µg Analyt aus 600 µL H₂O mit 2 x 600 µL Isohexan und anschließender Derivatisierung. Derivatisierung durch Zugabe von 10 µL PFBCl und 10 µL Pyridin. 100% bezieht sich auf das Messsignal einer derivatisierten Standardlösung. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Der letzte zu überprüfende Schritt ist die Hydrolyse der Phosphatester, da sowohl Isoprenol als auch Prenol in der Zelle als Pyrophosphatester vorliegen (IPP und DMAPP). Dazu wurde 2 µg IPP zu bekannten Bedingungen (4 Units, 40°C, 1 h, pH = 10,4) mit der alkalischen Phosphatase inkubiert, extrahiert, derivatisiert und mit einer Standardlösung gleicher Stoffmengen-Konzentration verglichen. Es stellte sich heraus, dass die für Farnesylpyrophosphat optimierten Bedingungen ausreichen, um auch Isopentenylpyrophosphat vollständig zu lysieren.

Damit war es gelungen Isoprenol, Prenol, Geraniol, Geranylgeraniol als zusätzliche Analyte neben Farnesol dem Testsystem hinzuzufügen. Die Methode hat sich im Vergleich zu Kapitel 3.2.2 wie folgt verändert (Abbildung 3.33, Änderungen gelb markiert):

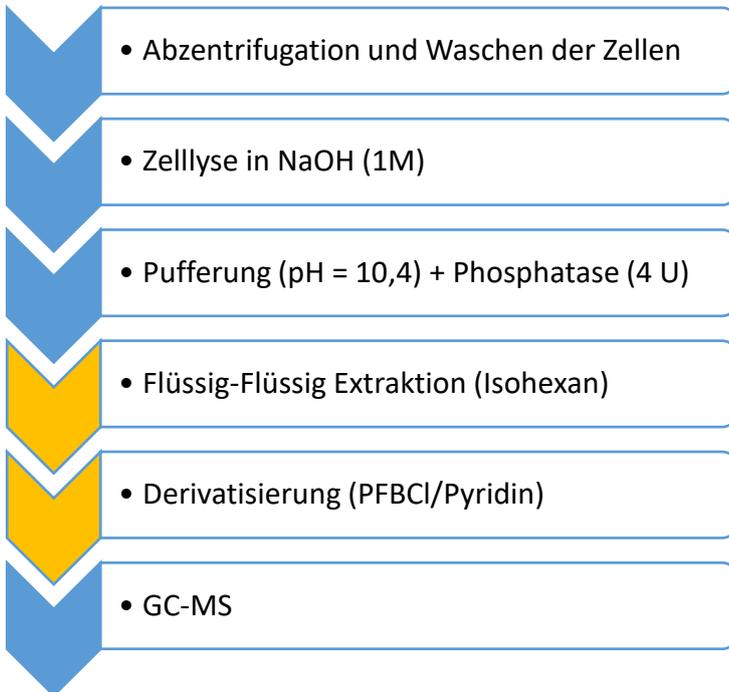


Abbildung 3.33 Schema der modifizierten Methode. Die neuen Schritte, das Extraktionsmittel und die Derivatisierung mit PFBCl, sind gelb markiert. Die restlichen Schritte sind gleichgeblieben (vgl. Kapitel 6.1).

Abschließend stand nur noch die experimentelle Bestätigung aus, dass das Testsystem nicht nur theoretisch, sondern auch tatsächlich in der Lage ist eine Akkumulation von Isoprenol und Prenol nach Hemmung der Farnesyldiphosphat-Synthase zu messen. Für die entsprechenden Versuche in einem zellulären Testsystem brauchte es wieder einen geeigneten Referenzinhibitor. Der Inhibitor, welcher hierfür verwendet wurde, ist die Zoledronsäure. Die Zoledronsäure ist ein von Novartis entwickeltes Bisphosphonat (Handelsnamen: Zometa, Aclasta, Zoledro-Denk), welches bei tumorinduzierter Hypercalciämie und bei Osteoporose zum Einsatz kommt. In Zellen wurde es bereits mehrfach verwendet, um Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat zu akkumulieren^{85,92}. HL-60 Zellen wurden mit diesem Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M) 24 h lang inkubiert. Zusätzlich wurde wieder NB-598 (30 nM) aus den in Kapitel 3.1.3 erwähnten Gründen hinzugegeben.

Anschließend wurden die Zellen nach der aktuellen Vorschrift aufgearbeitet und die Extrakte analysiert (Abbildung 3.34).

Mit steigender Konzentration an Zoledronsäure nimmt der Gehalt an durch NB-598 akkumulierten Squalen ab und gleichzeitig akkumuliert Isopentenylpyrophosphat. Allerdings akkumuliert kein Dimethylallylpyrophosphat, obwohl dies bei reiner FPPS-Hemmung passieren müsste. Dieser Effekt ist noch nicht bekannt oder in der Literatur beschrieben. Die meisten Assays basieren auf LC-MS Systemen und diese können IPP und DMAPP - im Gegensatz zu dem von mir entwickelten Assay - nicht unterscheiden. Die Akkumulation von IPP, aber nicht DMAPP, weist auf eine Hemmung der FDPS hin. Ohne Hemmung der Isomerase würde DMAPP in ähnlichem Maße ansteigen wie IPP (siehe YM175 in Kapitel 4.1). Es sind noch keine Referenzinhibitoren für die Hemmung der humanen IPP-Isomerase bekannt.

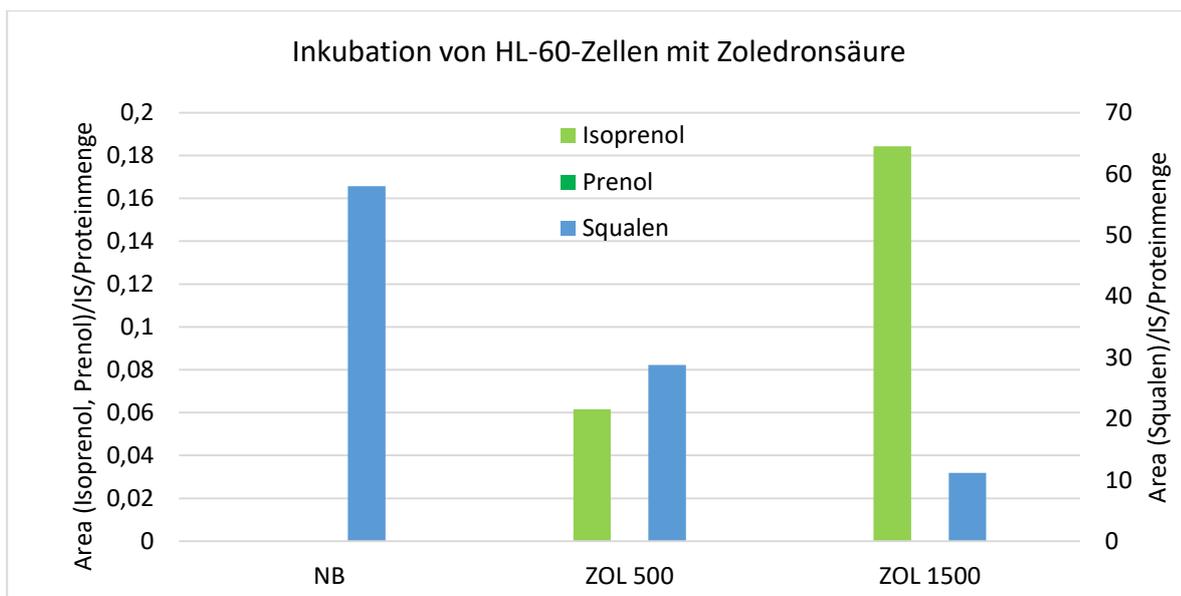


Abbildung 3.34 Akkumulation von Squalen, Isoprenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat (bestimmt nach Dephosphorylierung als Isoprenol und Prenol) nach Gabe von NB-598 und Zoledronsäure. ZOL = Zoledronsäure. NB-598 wurde in der üblichen Konzentration von 30 nM zugesetzt. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

3.2.5.3 Mevalonat

Ungünstigerweise trägt Mevalonat (MVA) als Carbonsäure unter den Bedingungen, die nach dem Einsatz der Phosphatase vorliegen (ca. pH = 10), eine negative Ladung und bildet somit Salze, welche nicht flüchtig sind und daher auch nicht mittels GC-MS gemessen werden können. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine typische Reaktivität von Mevalonat unter sauren Bedingungen ausgenutzt. Über die endständige Carbonsäure- und Alkoholgruppe kann Mevalonat in einer intramolekularen Esterbildung ein Lacton ausbilden. Diese Gleichgewichtsreaktion ist abhängig von der Konzentration und dem pH-Wert (Abbildung 3.35). In saurer Lösung liegt das Gleichgewicht auf der Seite von Mevalonolacton, in alkalischer Lösung auf der Seite von Mevalonat.

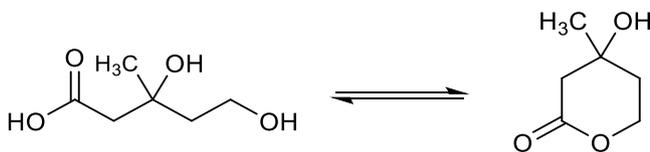


Abbildung 3.35 Umwandlung von Mevalonat in Mevalonolacton.

Mevalonolacton (MVA-L) trägt keine Ladung mehr und kann als flüchtiges Molekül (Sdp. 145-150°C, 5,0 mm Hg⁹³) mittels GC-MS gemessen werden. Nach den ersten Experimenten zeigte sich jedoch schon die erste Hürde. Mevalonolacton ist im Gegensatz zu den restlichen Analyten nicht in jedem organischen Lösungsmittel löslich (Abbildung 3.36). Eine Extraktion mit Isohexan wie bisher war somit nicht mehr möglich und ein anderes Extraktionsmittel musste gefunden werden. Dieser Umstand war besonders ärgerlich, weil im Zuge der Derivatisierungsversuche (siehe Kapitel 3.2.5.1) Isohexan zusammen mit Diisopropylether als einzige geeignete Lösungsmittel identifiziert wurden, in welchen sich die Derivatisierung von Isoprenol, Prenol, Farnesol und Geranylgeraniol nach Extraktion problemlos durchführen lässt. Da beide Lösungsmittel nicht in der Lage waren Mevalonolacton aus wässriger Phase zu extrahieren, blieb nichts anderes übrig, als zu Ethylacetat zurückzukehren und das Problem der Wasserblasen-Bildung musste auf eine andere Weise gelöst werden, als durch den zwischenzeitlich gewählten Wechsel des Lösungsmittels zu Isohexan.

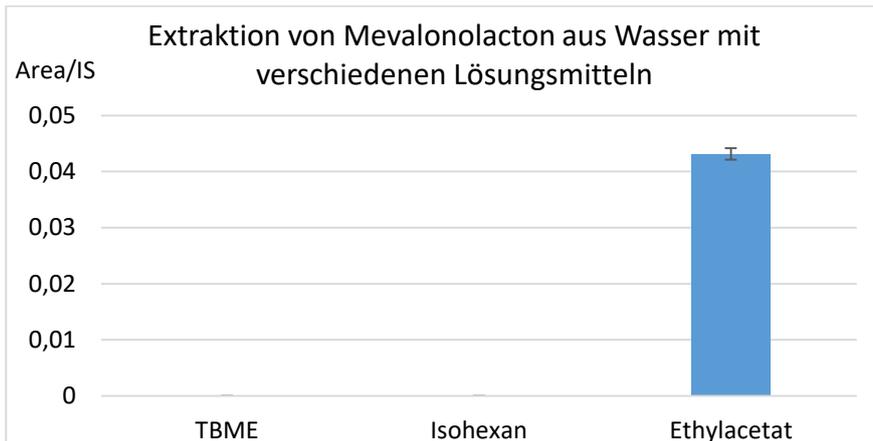


Abbildung 3.36 Fläche des Mevalonolacton-Peaks in verschiedenen Lösungsmitteln nach LLE aus Wasser. Da ein Peak nur in Ethylacetat zu beobachten ist, lassen sich daraus Rückschlüsse auf die Löslichkeit von Mevalonolacton in den anderen Lösungsmitteln ziehen. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

Dies wurde durch einen zusätzlichen Arbeitsschritt erreicht: bläst man nach der Extraktion das Lösungsmittel mittels eines Stickstoffstroms ab, so verdunstet nicht nur das Ethylacetat, sondern auch das wenige Wasser, welches aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion stammt. Dies klappt deshalb so gut, weil Ethylacetat und Wasser ein azeotropes Gemisch bilden, welches einen noch niedrigeren Siedepunkt als die einzelnen Substanzen für sich besitzt (Wasser: 100°C, Ethylacetat: 78°C, Wasser/Ethylacetat-Gemisch: 70°C). Wichtig ist jedoch, die organische Phase nicht ganz trocken zu blasen, sondern einen Rest Lösungsmittel übrig zu lassen (ca. 100 - 200 μL). Durch diesen Kniff lässt sich verhindern, dass die ebenfalls relativ flüchtigen Analyte Isoprenol bzw. Prenol mit abgeblasen werden. Nachdem der größte Teil des organischen Lösungsmittels nach der Extraktion abgeblasen wurde, kann der Rückstand in Ethylacetat neu gelöst werden. Da dieses Ethylacetat noch nicht mit Wasser in Berührung gekommen ist, findet die Derivatisierungsreaktion ohne Probleme und ohne Bildung einer störenden Wasserblase statt. Die erfolgreiche Derivatisierung von Mevalonolacton zu Mevalonolactonbenzoat wurde Chromatogramm (Retentionszeitverschiebung) und Massenspektrum bestätigt.

Die so modifizierte LLE ermöglicht es, Mevalonolacton aus wässrigem Milieu zu extrahieren und zu analysieren. Da jedoch in Zellen Mevalonat bzw. dessen phosphorylierte Derivate vorliegen, müssen diese wie bereits erwähnt vor der Extraktion durch Ansäuern in seine Laktonform überführt werden. In ersten Versuchen wurde dazu die wässrige Mevalonat-Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert (1 h) und es konnte ein Mevalonolacton-Signal nach Extraktion mit Ethylacetat erhalten. Um den Einfluss des pH-

Wertes weiter zu untersuchen, wurde die Laktonisierung bei mehreren pH-Werten untersucht (pH-Wert = 1: HCl, pH-Werte = 2-4: Citronensäure + HCl/NaOH Puffer) und das erhaltene Messsignal nach LLE mit einer Standardlösung von MVA-L in Ethylacetat verglichen (Abbildung 3.37).

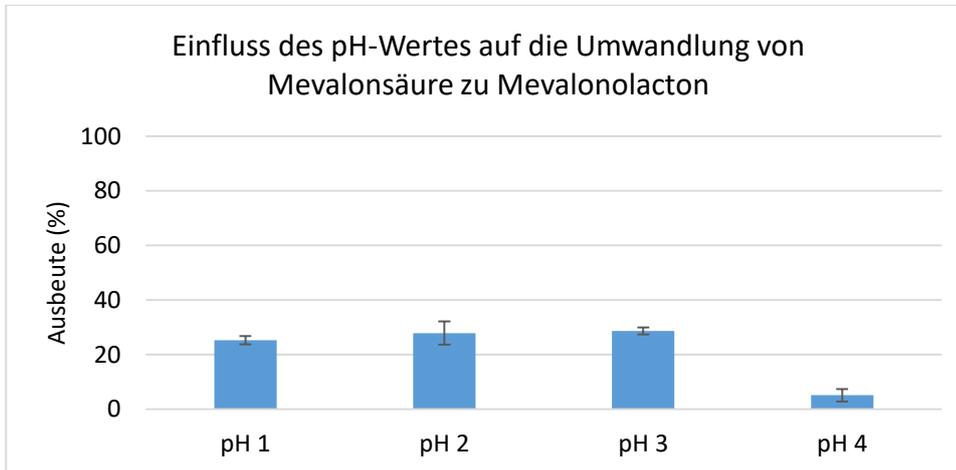


Abbildung 3.37 Umwandlung von MVA zu MVA-L bei verschiedenen pH-Werten (pH-Wert 1: HCl, pH-Werte 2-4: Citronensäure + HCl/NaOH Puffer) und anschließender LLE mit Ethylacetat. Reaktionszeit: 1h. 100% entspricht einer vollkommenen Umwandlung von MVA zu MVA-L (berechnet durch Vergleich mit einer MVA-L-Standardlösung). Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

Da die Ausbeute der Laktonisierung in ersten Experimenten jedoch noch nicht gut genug war, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss verschiedener Parameter auf die Laktonisierung und die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Mevalonat untersucht, um die optimalen Bedingungen herauszufinden (Abbildung 3.38).

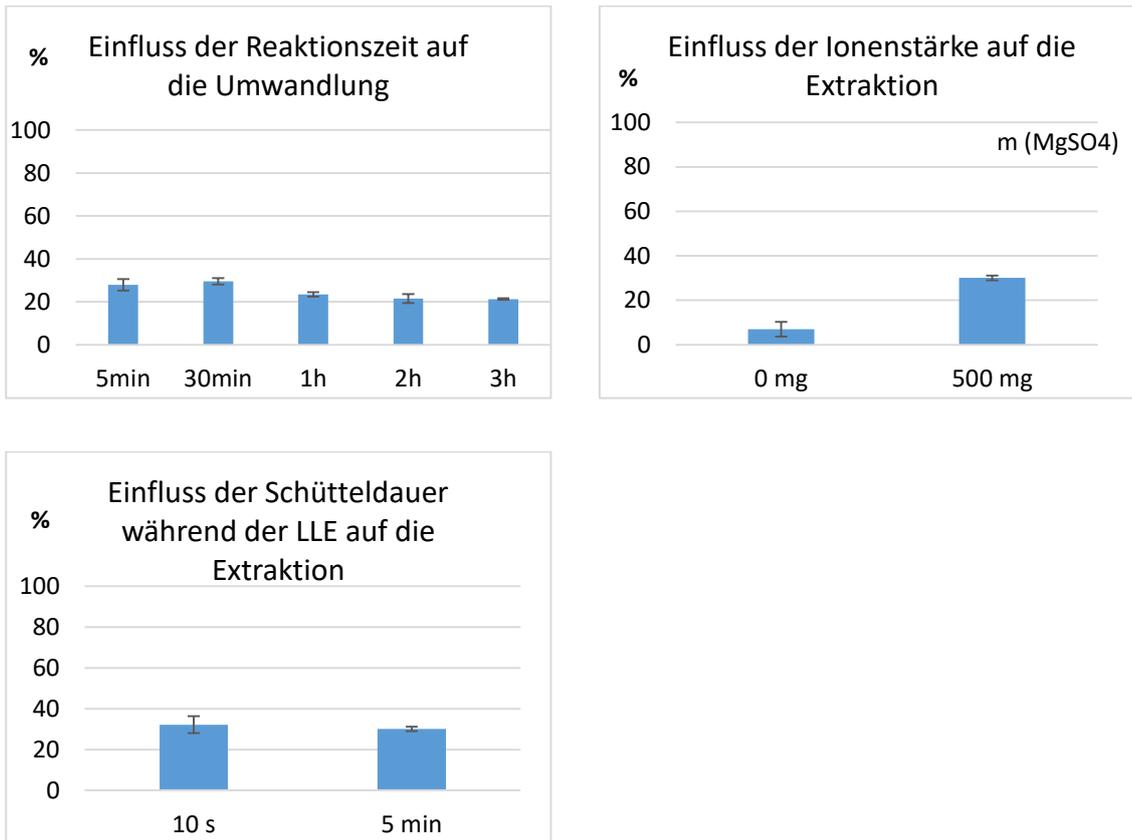


Abbildung 3.38 Wiederfindung von Mevalonolacton aus Mevalonat in einer wässrigen Lösung (pH = 2) mit anschließender Extraktion mit Ethylacetat. 100 % entspricht einer vollständigen Umwandlung von Mevalonat in. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Es stellte sich heraus, dass sich das Gleichgewicht der Reaktion von Mevalonat zu Mevalonolacton bereits nach kurzer Zeit einstellt. Kurz nach der Zugabe von Mevalonat zu dem Puffer (Zeitpunkt 5 min) war bereits fast die maximal erreichbare Menge an Mevalonolacton zu messen. Nach 30 Minuten erreichte die extrahierte Menge an Mevalonolacton ihr Maximum, danach ist sogar ein leichter Rückgang messbar (ca. 10 % nach 2 Stunden). Der Effekt, dass die Wiederfindung von Mevalonolacton im Laufe der Zeit wieder absinkt, konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden. Die Ursache für diesen Schwund ist höchstwahrscheinlich eine Nebenreaktion von Mevalonolacton in saurem Milieu (Abbildung 3.39).

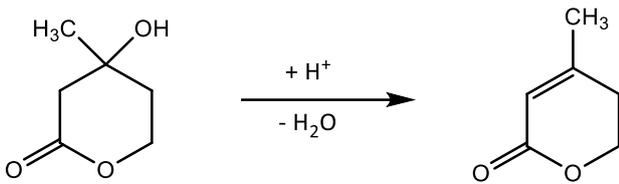


Abbildung 3.39 Dehydratisierung von Mevalonolacton in Anwesenheit von Säure.

Die Dehydratisierungsreaktion scheint langsamer abzulaufen als die Umwandlung von Mevalonat zu Mevalonolacton. Davon abgesehen beschleunigt auch ein zu niedriger pH-Wert die weitere Umsetzung von Mevalonolacton. Die Extraktion von MVA-L in die organische Phase lässt sich weiter steigern durch den Einsatz von Magnesiumsulfat nach dem Prinzip des „Aussalzens“. Die Schütteldauer zur Einstellung des Gleichgewichts während der Flüssig-Flüssig-Extraktion hatte keinen messbaren Einfluss auf die Effizienz der LLE und somit auf die Höhe des Messsignals von Mevalonolacton.

Nach der Extraktion wurde als nächstes die Hydrolyse der Mevalonatphosphat/Mevalonatpyrophosphat überprüft. Denn Mevalonat liegt in Zellen sowohl als freier Alkohol als auch 1-fach und 2-fach phosphoryliert vor. Je nachdem, ob die Mevalonat-Kinase, die Mevalonatphosphat-Kinase oder die Diphosphomevalonat-Decarboxylase gespalten wird, akkumuliert blankes Mevalonat oder eines der phosphorylierten Derivate. Um zu überprüfen, ob verestertes Mevalonat mit der bereits verwendeten alkalischen Phosphatase erfolgreich gespalten werden kann, wurde Mevalonatpyrophosphat auf eine wässrige Lösung lysierter Zellen aufdotiert und unter den für Farnesol entwickelten Bedingungen hydrolysiert (4 Units alk. Ptase, pH = 10,4, 1 h, 40°C), angesäuert (mit 6 M HCl), extrahiert und als Mevalonolacton gemessen. Im Vergleich dazu wurde dieselbe Menge Mevalonolacton auf die lysierten Zellen gegeben und ebenfalls extrahiert und gemessen. In beiden Ansätzen konnte dieselbe Menge an Mevalonolacton gemessen werden, sodass gefolgert werden kann, dass die Methode zur Hydrolyse der Phosphatester unverändert von der bisherigen Methode übernommen werden kann. Die Erfahrung hat gezeigt, dass 30 µL Salzsäure (6 M) reicht, um den pH-Wert zuverlässig auf 1 - 2 einzustellen.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse wurde die bisherige Methode (blaue Pfeile) wie folgt modifiziert (gelbe Pfeile):

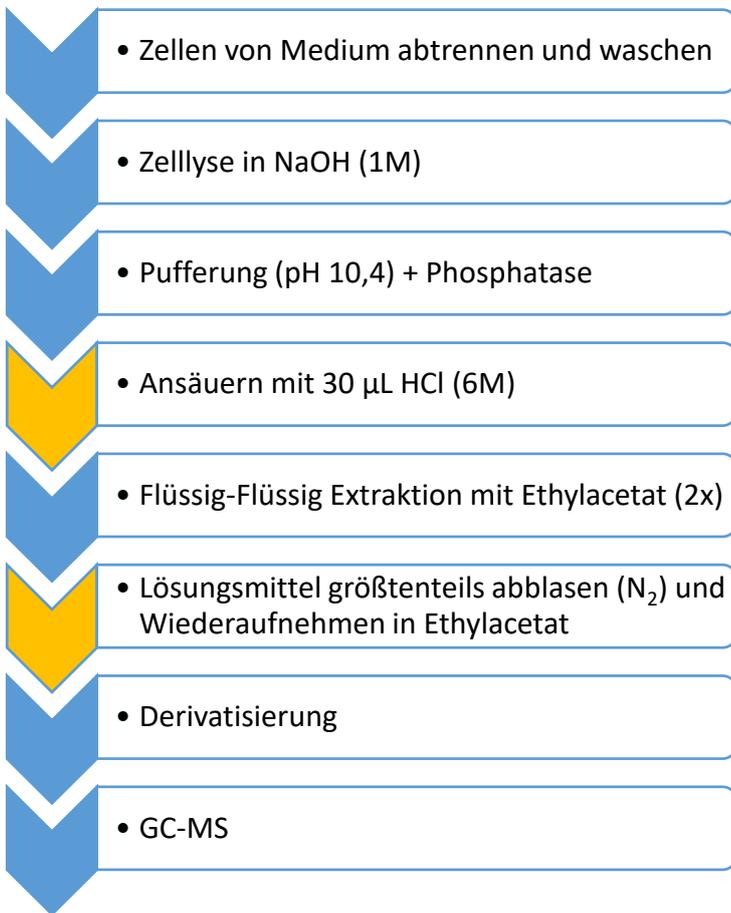


Abbildung 3.40 Schematischer Überblick der Aufarbeitung. Gelbe Pfeile signalisieren Änderungen gegenüber der vorherigen Version. Ansäuern der gepufferten, wässrigen Lösung nach der Hydrolyse mit 30 µL HCl (6 M) lässt den pH-Wert zuverlässig auf 1 - 2 absinken.

Um zu zeigen, dass mit dem Assay eine Akkumulation von Mevalonat (oder phosphoryliertem Mevalonat) nach Hemmung eines entsprechenden Enzyms (Mevalonat-Kinase, Mevalonatphosphat-Kinase oder Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase) gemessen werden kann, wurden HL-60 Zellen mit dem Mevalonat-Kinase Inhibitor 6-Fluormevalonat⁹⁴ behandelt (Abbildung 3.41). Nach Inhibition durch 6-Fluormevalonat sollte Mevalonat in den Zellen akkumulieren, welches nach Umwandlung und Extraktion als Mevalonolacton zu messen sein sollte (wie bereits L. Henneman im Jahre 2011 zeigen konnte⁸⁵).

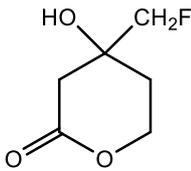


Abbildung 3.41 Strukturformel von 6-Fluormevalonat

Die Zell-Versuche zeigten allerdings keine Akkumulation von Mevalonat nach Inkubation der Zellen mit 6-Fluormevalonat. Dies liegt vermutlich daran, dass die akkumulierte Menge an Mevalonat zu niedrig ist. Erst ab 20 µg/mL Mevalonatpyrophosphat (MVAPP) ist ein ordentliches Signal in der GC-MS zu detektieren. Dazu kam die nach wie vor schlechte Wiederfindung (<25%) aus dem Extraktionsprozess (Lactonisierung/Flüssig-Flüssig-Extraktion), welche sich im Vergleich zu den bisherigen Optimierungsversuchen nicht verändert hatte.

Es konnte aber definitiv gezeigt werden, dass die Aufarbeitung prinzipiell in der Lage ist Mevalonatpyrophosphat in Zellen nachzuweisen. Es konnte in Versuchen auch gezeigt werden, dass die Menge an entstandenem Mevalonolacton aus MVAPP, welches auf Zellmatrix gegeben und aufgearbeitet wurde, gleich der Menge an Mevalonolacton ist, welches direkt zur Zellmatrix hinzugegeben und in gleicher Weise extrahiert wurde. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Ursache der fehlenden Mevalonat-Akkumulation nicht eine mangelhafte Hydrolyse des Pyrophosphats oder ein negativer Einfluss der Matrix ist. Denn gäbe es ein Problem mit der enzymatischen Hydrolyse oder der Matrix, würde das aufdotierte MVA-PP nicht dieselbe Menge an Mevalonolacton generieren wie die Zugabe von Mevalonolacton direkt vor der Aufarbeitung.

Es drängte sich der Eindruck auf, dass das Problem in der schlechten Extraktion beim Ausschütteln von MVA-L in die organische Phase liegt. Selbst wenn gleich MVA-L zur Extraktion eingesetzt wird, ist die Ausbeute gering. Entweder ist die Verteilung von Mevalonolacton nicht genügend auf der organischen Seite, sodass ein zweimaliges Ausschütteln immer noch keine zufriedenstellende Wiederfindung gewährleistet. Dies könnte daran liegen, dass MVA-L zu polar ist. Oder die Gleichgewichtsreaktion liegt in den gewählten wässrigen Bedingungen immer noch zu sehr auf der Seite von Mevalonat. Beide Gründe würden erklären, weshalb auch Mevalonolacton – welches nicht erst noch in seine Lacton-Form umgewandelt werden muss – dieselbe schlechte Wiederfindung zeigt.

Um aufzuklären, ob eine zu hohe Polarität des Moleküls ein Problem für die Flüssig-Flüssig-Extraktion darstellt, welche ein wesentlicher Schritt in der Aufarbeitung der biologischen Proben ist, wurde der log P-Wert von Mevalonolakton näher betrachtet. Log P ist ein Wert, welcher die Verteilung einer Substanz innerhalb eines Zweiphasensystems bestehend aus Wasser und organischer Phase (meist wird *n*-Octanol verwendet) beschreibt. Dabei wird die Konzentration der Substanz in der *n*-Octanol-Phase durch die Konzentration in der wässrigen Phase geteilt (K_{ow}- oder auch P-Wert) und anschließend der Übersichtlichkeit halber der dekadische Logarithmus gebildet (Formel 3.1). Liegt der log P-Wert im Negativen, so überwiegt der Anteil in der wässrigen Phase und ein quantitatives Ausschütteln der Substanz in eine organische Phase ist nur schwer möglich.

$$\log P = \log \frac{c_{n\text{-Octanol}}}{c_{\text{Wasser}}}$$

Formel 3.1 Berechnung des Verteilungskoeffizienten P bzw. log P

Es konnte kein experimentell bestimmter Verteilungskoeffizient für MVA-L gefunden werden, aber einige berechnete log P-Werte: ALOGPS -> -0,14; ChemAxon -> -0,43; ACD -> -0,93 (verwendete Software -> berechneter log P). Die berechneten Werte sagen vorher, dass sich Mevalonolakton eher schlecht in die organische Phase ausschütteln lässt. Das erklärt auch, weshalb die Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von Magnesiumsulfat einen so großen Effekt auf die Wiederfindung besitzt. Es scheint also, dass die schlechte Ausbeute nicht nur auf die ständige Gleichgewichtseinstellung zwischen Mevalonat und Mevalonolakton zurückzuführen ist, sondern auch an der ungünstigen Verteilung von MVA-L zwischen wässriger und organischer Phase liegt.

Eine Literaturrecherche offenbarte, dass andere Forschergruppen ebenfalls nur niedrige Ausbeuten von Mevalonat in Flüssig-Flüssig-Extraktionen hatten (25,3 %⁹⁵, 51,2 %⁹⁶, 21 %⁹⁷). Obwohl dort das Problem mithilfe geeigneter interner Standards (z.B. deuteriertes Mevalonat) umgangen bzw. einfach toleriert wurde, kommen diese Lösungsansätze für diesen Assay nicht in Betracht. Nur eine ausreichende Extraktionsausbeute garantiert, dass die niedrigen Mengen an akkumuliertem Mevalonat zuverlässig gemessen werden können. Und in der Tat konnte mit diesem Assay noch keine Akkumulation von

Mevalonat in Zellen gemessen werden, obwohl andere Gruppen (welche andere analytische Methoden verwendeten) dies bereits mit dem gleichen Inhibitor zeigen konnten⁸⁵.

Zusätzlich zum Extraktionsproblem ergab sich im Laufe der Zeit noch ein weiteres Problem: Die Peakform von Mevalonat verschlechterte sich durch Zunahme des Tailings über einen Zeitraum von 3 Monaten so sehr, dass die unterste messbare Konzentrationsgrenze (LOD) von 1 µg/mL auf 10 µg/mL anstieg. Dieser Effekt zeigte sich nur bei MVA-L, aber nicht bei den anderen Analyten. Der schon vorher eher schlechte LOD-Wert von MVA-L war also noch schlechter geworden. Dieser Effekt in Kombination mit der schlechten Extraktionsausbeute verhinderte trotz großer Anstrengungen, dass für Mevalonat eine Methode entwickelt werden konnte, welche den Anforderungen des Assays genüge. Über die Gründe der Verschlechterung der Peakform kann nur spekuliert werden. Grundsätzlich wird eine Peakform immer dann schlechter, wenn die Auflösung der Substanz auf der GC-Säule schlechter wird, z.B. durch Abnutzung oder Verschmutzung der Säule. Eine Arbeit von Woollen et al. aus dem Jahr 2001 berichtet über denselben Effekt von Mevalonat⁹⁵. Woollen erklärt die sich verschlechternde Peakform mit einer zunehmenden Schädigung der Säule durch die teilweise Extraktion von Salzsäure aus saurer Lösung. So soll während der Flüssig-Flüssig-Extraktion ein wenig saure wässrige Phase in der organischen Phase verbleiben und dadurch mit in den Gaschromatographen injiziert werden. Die Säure gelangt auf die GC-Säule und schädigt das Säulenmaterial, wodurch die Peakform von Mevalonat schlechter wird. Eine wirkliche Lösung für dieses Problem gibt es nicht, außer einer Neutralisation der organischen Phase mit neutralem/basischem Puffer. Dies bedingt allerdings einen weiteren Kontakt des Mevalonolaktons in der organischen Phase mit einer wässrigen Phase und somit eine weitere Verschlechterung der Ausbeute.

3.2.6 Fazit zur Variante B

Der Plan Variante B war es die Inhibition von Enzymen innerhalb des Präskualen-Abschnittes der Cholesterolsynthese durch die Akkumulation der jeweiligen Enzymsubstrate darzustellen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der Einsatz von alkalischer Phosphatase als zusätzlicher Schritt in der Probenaufarbeitung etabliert. Nach Abschluss der Methodenentwicklung ist es gelungen die konzentrationsabhängige

Akkumulation von Farnesol nach Hemmung der Squalensynthese durch Saragossasäure nachzuweisen. Danach wurde das Testsystem durch Analyse weiterer Isoprenoide um die beiden Enzyme Farnesylpyrophosphat-Synthase und Isopentenylpyrophosphat-Isomerase erweitert.

Nach Änderung des Extraktionsmittels auf Isohexan und Derivatisierung mittels Pentafluorbenzoylchlorid war es möglich zusätzlich zu Farnesylpyrophosphat auch Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallylpyrophosphat auch Geranylgeranylpyrophosphat aus Zellen zu extrahieren und zu messen. In biologischen Tests von Referenzinhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Farnesylpyrophosphat-Synthase mit Zoledronsäure tatsächlich eine messbare Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat nach sich zieht. Nach Hemmung mit Squalensynthese-Inhibitor Saragossasäure konnte zudem die (für die Cholesterolsynthese irrelevante) Akkumulation von Geranylgeranyldiphosphat gezeigt werden, welche bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde^{57,85}. Nur bei Mevalonat war es nicht möglich eine zufriedenstellende Extraktion von Mevalonat zu gewährleisten und diese in die bestehende Methode einzuarbeiten. Es konnte zwar eine Extraktionsmethode entwickelt werden, doch diese litt unter niedrigen Ausbeuten trotz deutlichem Mehraufwand während der Probenaufarbeitung. Daher wurde entschieden Mevalonat nicht in den Assay mit aufzunehmen.

Bevor mit dieser Methode weitere Substanzen auf eine potentielle Hemmung innerhalb des Präsqalen-Abschnittes getestet wurden, wurde noch eine ausführliche Validierung durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit und die Grenzen des Assays zu bestimmen.

3.3 Validierung

Eine Methode zu validieren bedeutet, zu beweisen, dass die Leistungsfähigkeit der zu validierenden Methode ihren Ansprüchen tatsächlich genügt („fit for purpose“⁹⁸). Wird zum Beispiel der Gehalt einer Substanz mittels linearer Kalibriergerade berechnet, so muss erst gezeigt werden, dass die zu erwartenden Messsignale auch tatsächlich in einem linearen Verhältnis zu den wahren Konzentrationen der Substanz stehen. Andererseits können die verschiedenen Validierungsparameter auch dazu dienen, die jeweilige Methode in ihrer allgemeinen Leistungsfähigkeit zu bewerten und mehrere Methoden

miteinander zu vergleichen. Zum Beispiel ist bei sonst gleichen Leistungskriterien diejenige Methode vorzuziehen, welche eine niedrigere relative Standardabweichung, also eine bessere Präzision besitzt. Die Methodvalidierung ist demnach ein essentieller Teil jeder Methodenentwicklung und stets vor den eigentlichen Messungen durchzuführen. Denn ohne Kenntnis der bestimmten Validierungsparameter lassen sich Messergebnisse nicht vollständig interpretieren.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte der Validierung detailliert eingegangen. Die Richtlinie der European Medicines Agency (EMA) zu Validierung von bioanalytischen Methoden⁹⁹ diene als Vorlage und Orientierung für die Validierung des beschriebenen Testsystems zur Charakterisierung von Inhibitoren des Präqualen-Abschnitts der Cholesterolsynthese.

Linearität:

Die Linearität wurde überprüft, indem Verdünnungen einer Mischung aller Analyte auf aufgearbeitete Matrix pipettiert wurden („matrix matched calibration“), um letztendlich folgende Konzentrationen zu erhalten: 1000 ng/mL, 750 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL und 1 ng/mL; dazu jeweils 1000 ng/mL Cholestan als Interner Standard. Die Standards werden auf aufgearbeitete Matrix gegeben, um eventuelle Einflüsse der Matrix auf Signale mit zu berücksichtigen. Die Konzentrationsstufen wurden als Triplikate vermessen und eine $1/x$ gewichtete Kalibriergerade erstellt. Die Gewichtung der Abstandskvadrat, welche zur Berechnung der linearen Ausgleichsgerade verwendet werden, um den Faktor $1/x$ (x = Konzentration) ist erforderlich, da die Methode einen Konzentrationsbereich überspannt, der mehrere Zehnerpotenzen groß ist (bis zu Faktor 1000). Da bei der Berechnung der Ausgleichsgerade nur absolute Abweichungen der Messwerte zur Kalibrierfunktion berücksichtigt werden, würden ansonsten die relativen Abweichungen bei den kleineren Konzentrationen größer als bei den höheren Konzentrationen ausfallen. Eine Gewichtung von $1/x$ bei der Berechnung der Ausgleichsgerade kann diesen Effekt kompensieren.

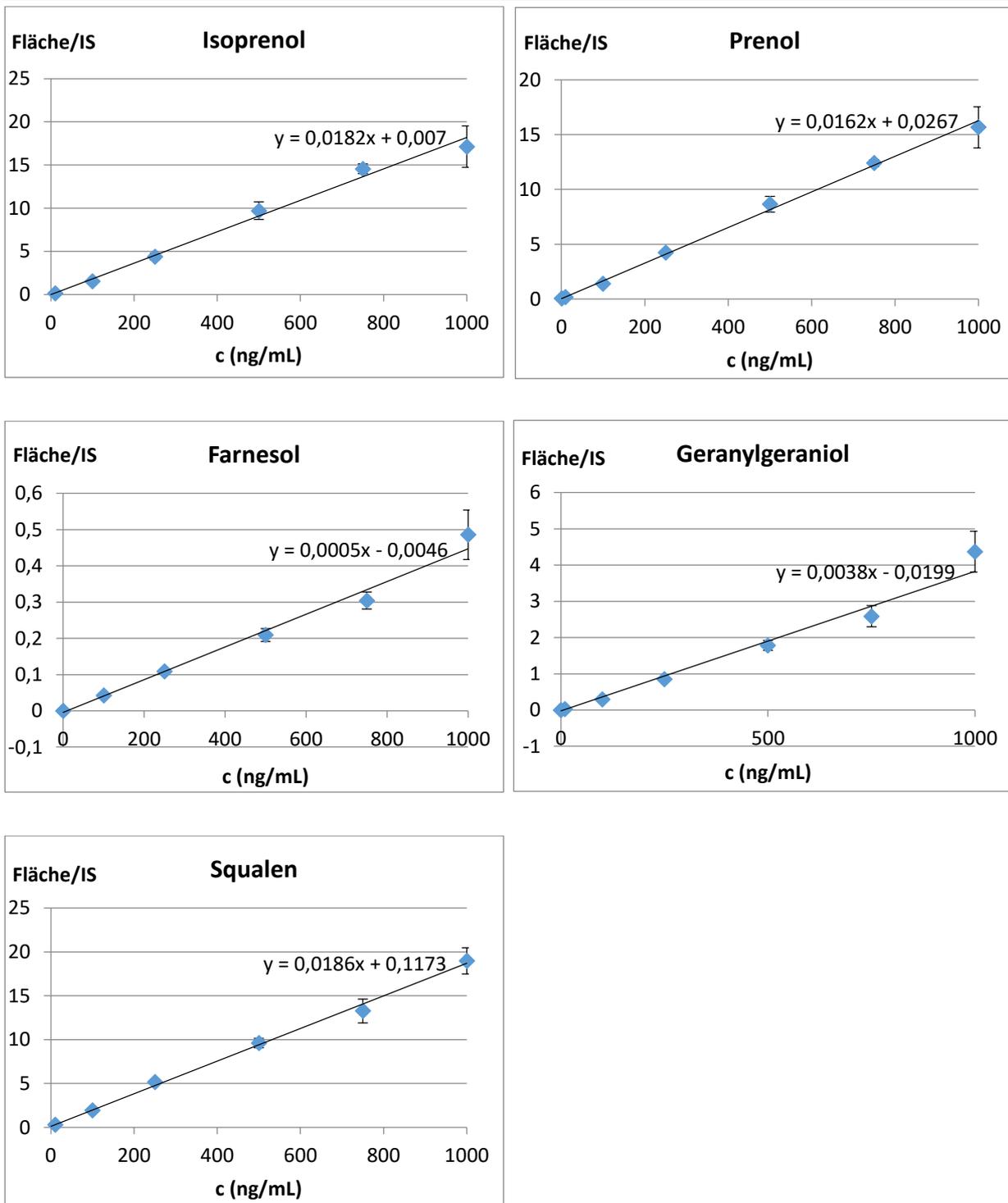


Abbildung 3.42 Kalibrierkurven der einzelnen Analyte. Dargestellt sind die Konzentrationsstufen, welche in Tabelle 3.4 für die jeweiligen Substanzen dargestellt sind und die dazugehörige lineare Ausgleichsgerade (1/x gewichtet). IS = Cholestan.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.42 dargestellt. In einem ersten Schritt werden die Werte optisch auf ihre Linearität überprüft. Außerdem fordert die EMA-Richtlinie, dass mithilfe der Kalibriergeraden und der Messergebnisse aus dem Validierungsexperiment

die Konzentrationen der einzelnen Konzentrationsstufen rückberechnet werden sollen. Diese berechneten Konzentrationen sollen nicht stärker als 15% (bzw. 20% auf der jeweils niedrigsten Konzentrationsstufe) von den nominalen Konzentrationen abweichen (Tabelle 3.4).

Isoprenol		
nominale Konzentration	berechnete Konzentration	Abweichung (%)
1000	941,5008	-5,8
750	800,2021	6,7
500	533,43	6,7
250	242,011	-3,2
100	84,71686	-15,3
10	8,385944	-16,1
1	1,272505	27,3

Prenol		
nominale Konzentration	berechnete Konzentration	Abweichung (%)
1000	965,3746068	-3,5
750	763,1998712	1,8
500	532,2228315	6,4
250	259,4939348	3,8
100	84,98372569	-15,0
10	9,339794664	-6,6
1	1,128228348	12,8

Farnesol		
nominale Konzentration	berechnete Konzentration	Abweichung (%)
1000	1086,138593	8,6
750	684,0225836	-8,8
500	473,1362895	-5,4
250	251,6660086	0,7
100	104,8550539	4,9

Geranylgeraniol		
nominale Konzentration	berechnete Konzentration	Abweichung (%)
1000	1140,981	14,1
750	677,7852	-9,6
500	469,6371	-6,1
250	226,1444	-9,5
100	82,35437	-17,6
10	12,87403	28,7

Squalen		
nominale Konzentration	berechnete Konzentration	Abweichung (%)
1000	1014,17	1,4
750	707,45	-5,7
500	510,26	2,1
250	271,46	8,6
100	97,92	-2,1
10	9,24	-7,6
1	1,04	3,6

Tabelle 3.4 Abweichungen der mittels Kalibriergerade berechneten Konzentrationen und den Soll-Konzentrationen. Die jeweils unterste Konzentration ist die niedrigste quantifizierbare Konzentration und variiert von Analyt zu Analyt.

Die EMA Richtlinie fordert, dass 75 % der berechneten Konzentrationen eine Abweichung von maximal 15 % gegenüber der Soll-Konzentration aufweisen. Bei der niedrigsten

Konzentrationsstufe werden 20 % Abweichung toleriert. Die Analyte Prenol, Farnesol und Squalen erfüllen dieses Kriterium einwandfrei. Isoprenol reißt in den Konzentrationen 100 und 10 ng/mL die 15 % Grenze nur leicht (-15,3 % und -16,1 %) und auf der niedrigsten Konzentration beträgt die Abweichung 27,3 %. Allerdings sind nach Richtlinie Ausreißer erlaubt und die absolute Abweichung immer noch sehr gering und daher gut verkraftbar. Geranylgeraniol hat ebenfalls eine leicht erhöhte Abweichung bei 100 ng/mL (-17,6 %) und einen Ausreißer auf der niedrigsten Konzentrationsstufe. Insgesamt zeigen die Kalibriergeraden jedoch eine gute Linearität und ausreichend niedrige relative Abweichungen über den gesamten Konzentrationsbereich.

Präzision

Die Präzision wurde ermittelt, indem ein Analyt-Mix in verschiedenen Konzentrationen auf aufgearbeitete Matrix pipettiert wurde (resultierende Konzentrationen: LLOQ, 100 ng/mL, 500 ng/mL und 1000 ng/mL). Sechs Proben jeder Konzentrationsstufe, welche auf diese Art hergestellt wurden, wurden analysiert und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet (siehe Tabelle 3.5).

Analyt	Relative Standardabweichung (%)			
	1000 ng/mL	500 ng/mL	100 ng/mL	LLOQ
Isoprenol	0,8	9,8	11,8	9,3
Prenol	4,3	8,7	14,0	8,9
Farnesol	11,7	11,6	4,8	4,8
Geranylgeraniol	13,0	13,4	16,0	19,0
Squalen	3,9	9,1	4,0	4,2

Tabelle 3.5 Präzisions-Werte für die einzelnen Analyte, berechnet als relative Standardabweichung.

Erlaubt gemäß EMA-Richtlinie ist eine relative Standardabweichung von maximal 15 % bzw. 20 % am LLOQ. Fast alle berechneten Standardabweichungen sind innerhalb der erlaubten Grenzen, mit Ausnahme von Geranylgeraniol bei 100 ng/mL (16,0 % statt <15 %). Die Methode zeigt damit eine ausreichende Präzision.

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein wichtiger Parameter jeder Methode, denn sie offenbart den systematischen Fehler. Ein wichtiger Bestandteil der Bestimmung der Richtigkeit ist der Vergleich eines Standards bekannter Konzentration (QC-Standard) mit der mittels Kalibriergerade berechneten Konzentration (berechnet aus separaten Kalibrierstandards). Das Prinzip ist ähnlich zur Bestimmung der Abweichungen, welche für die Beurteilung der Qualität der Linearität verwendet wurde. Allerdings stammt die Kalibriergerade dieses Mal nicht aus demselben Experiment, sondern aus Kalibrierstandards, welche separat zu dem QC-Standard hergestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Analyt	Nominale Konzentration (ng/mL)	Berechnete Konzentration (ng/mL)	Abweichung (%)
Isoprenol	100	101,7	+1,7
Prenol	100	102,9	+2,9
Farnesol	100	93,3	-6,7
Geranylgeraniol	100	92,4	-7,6
Squalen	100	105,7	+5,7

Tabelle 3.6 Bestimmung der Konzentrationen von QC-Proben bekannter Konzentration unter Verwendung einer Kalibriergerade aus Kalibrierproben. Es wurden Triplikate vermessen und Cholestan als interner Standard verwendet.

Sämtliche Abweichungen sind weit unter 15 % und erfüllen somit die Kriterien der EMA-Richtlinie.

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Beurteilung der Richtigkeit ist die Wiederfindung (WDF); insbesondere, falls eine komplexe Probenaufarbeitung verwendet wird. Je niedriger die Wiederfindung eines Analyten, desto mehr Analyt geht während der Aufarbeitung verloren. Zwar ist es theoretisch möglich trotz schlechter Wiederfindung den systematischen durch einen geeigneten Internen Standard zu eliminieren, doch ist sie trotzdem ein schlechtes Zeichen und wirkt sich auf indirektem Wege negativ auf die Präzision, Empfindlichkeit und andere Parameter aus. Zur Berechnung der Wiederfindung wurden Verdünnungen der freien Alkohole in verschiedenen Konzentrationsstufen auf frisch hergestelltes Zell-Lysat pipettiert (1000 ng/mL, 750 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL und 1 ng/mL). Anschließend wurden die

Proben entsprechend der Vorschrift (siehe Kapitel 6.1) aufgearbeitet und gemessen. Dieser Wert wird durch den Messwert geteilt, welcher durch Aufdotierung derselben Analyt-Konzentrationen auf bereits aufgearbeiteter Matrix erhalten wird (Tabelle 3.7).

Analyt	Ø WDF	min./max. WDF
Isoprenol	101 %	86-123 %
Prenol	81 %	63-110 %
Farnesol	103 %	90-111 %
Geranylgeraniol	91 %	72-121 %
Squalen	101 %	83-120 %

Tabelle 3.7 Bestimmung der Wiederfindung. Es wurden Triplikate vermessen und Cholestan als interner Standard verwendet. Die Konzentrationsstufen entsprechen den Konzentrationsstufen, welche auch für die Kalibriergeraden zur Bestimmung der Linearität verwendet wurden. Ø WDF gibt die durchschnittliche Wiederfindung über den gesamten Konzentrationsbereich an; min./max. WDF gibt die jeweils kleinste und größte Wiederfindung innerhalb des ganzen Konzentrationsbereiches an.

Die EMA-Richtlinie beinhaltet keine Vorgaben zu einzuhaltenden Grenzen für die Wiederfindung. Die durchschnittlichen Wiederfindungswerte weichen aber nur um bis zu 20 % von dem Vergleichswert ab. Dies ist ein guter Wert, wenn die komplexe Aufarbeitung und die niedrigen Konzentrationen der Analyte berücksichtigt werden. Die einzelnen Wiederfindungen über den gesamten Konzentrationsbereich schwanken stärker, aber immer noch in akzeptablen Grenzen.

Lower limit of quantification (LLOQ)

„Lower limit of quantification“ bezeichnet die niedrigste Konzentration, welche noch valide quantifiziert werden kann. Nach der EMA Richtlinie wird LLOQ als die unterste Konzentrationsstufe behandelt und wird bei der Bestimmung der Präzision und Richtigkeit mitberücksichtigt. Zusätzlich muss das Analyt-Signal der untersten Konzentration 5-mal höher sein, als das Signal einer Matrixprobe ohne zusätzlich aufdotierte Analyte. Dieses zweite Kriterium der EMA-Richtlinie macht für das hier entwickelte Testsystem keinen Sinn, da körpereigene Stoffe analysiert werden und nicht körperfremde Wirkstoffe. Körpereigene Stoffe kommen in geringen Menge physiologisch

im Körper vor und werden stets in der Matrix zu finden sein – falls die Sensitivität des Testsystems ausreicht, um sie messen zu können. Daher wurde in dieser Arbeit stattdessen das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) am LLOQ als zusätzliches Kriterium verwendet, welches auch von der ICH („International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“) in ihrer Richtlinie Q2R1 genannt wird⁹⁸. Das Signal-Rausch-Verhältnis soll dabei einen Wert von mindestens 10 haben.

Analyt	Isoprenol	Prenol	Farnesol	Geranylgeraniol	Squalen
LLOQ	1 ng/mL	1 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL
S/N	53,6	40,9	20,9	13,4	248,9

Tabelle 3.8 Lower limit of quantification (LLOQ) der einzelnen Analyte. S/N = Signal-Rausch-Verhältnis („signal to noise ratio“).

Alle LLOQs erfüllen die Kriterien der Präzision und Richtigkeit. Weiterhin zeigt Tabelle 3.8, dass ein genügend hohes Signal-Rausch-Verhältnis (>10) bei allen unteren Quantifizierungsgrenzen vorliegt.

Matrix-Effekt

Zur Beurteilung des Matrixeffektes wird für jeden Analyten und den Internem Standard ein Matrix-Faktor (MF) berechnet, indem die Flächen der Analyte von dotierten Matrix-Proben (aufgearbeitete Matrix mit anschließender Aufdotierung) durch die Flächen von Analyt in reinem Lösungsmittel geteilt wird. Anschließend wird noch ein IS-normalisierter Matrix-Faktor berechnet, indem der MF jedes Analyten durch den MF des Internem Standards geteilt wird. Die relative Standardabweichung, berechnet aus 6 Matrix-Proben, darf maximal 15 % betragen. Auf diese Weise will die EMA-Richtlinie sicherstellen, dass die Matrix keine allzu großen Schwankungen in dem System verursacht. Die Matrix-Faktoren der einzelnen Analyte wurden jeweils für die Konzentration 100 ng/mL berechnet und die relativen Standardabweichungen in Tabelle 3.9 dargestellt.

Analyt	Isoprenol	Prenol	Farnesol	Geranylgeraniol	Squalen
RSD _{MF} normalisiert (%)	9,8	8,7	11,0	14,7	4,0

Tabelle 3.9 Relative Standardabweichungen (RSD) der normalisierten Matrix-Faktoren. Konzentration der Analyte: 100 ng/mL. Abweichung berechnet aus 6 Matrix-Proben.

Keine relative Standardabweichung ist größer als 15 %, die Kriterien der Richtlinie wurden somit erfüllt.

Zusammenfassung

Das Testsystem zeigt trotz der komplexen Aufarbeitung eine gute Linearität, Präzision und Richtigkeit über einen großen Konzentrationsbereich (1 bis 1000 ng/mL). Nach abgeschlossener Validierung ist die Methode nun bereit potentielle Inhibitoren auf ihre Wirkung auf den Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese zu untersuchen.

4 Biologische Testung

4.1 Testung publizierter, aber nicht etablierter Inhibitoren

Als erstes wurden Inhibitoren getestet, welche bereits publiziert waren und deren Hemmung der Squalensynthese bereits in enzymatischen Assays bewiesen wurde (Chlorogensäure, YM175, „Carbazol 11“ und 6-Fluormevalonat). Danach wurden Inhibitoren getestet, welche im Arbeitskreis Prof. Bracher synthetisiert wurden. Diese Substanzen wurden entweder wegen ihrer Ergebnisse im Postsqualen-Assay (siehe Kapitel 2 Themenstellung) oder aufgrund struktureller Ähnlichkeit zu anderen interessanten Substanzen zur Testung im Präsqalen-Assay ausgesucht.

Chlorogensäure

Die Chlorogensäure wurde als Squalensynthese-Inhibitor (im enzymatischen Assay⁷⁸) bereits während der Methodenentwicklung des Öfteren getestet, jedoch ohne eine Akkumulation von Farnesylpyrophosphat beobachten zu können. Daher wurde die Chlorogensäure mit dem fertigen Testsystem noch einmal getestet, in der Hoffnung eine Akkumulation eines anderen Isoprenoids der Cholesterolsynthese messen zu können. Schließlich war die Chlorogensäure durchaus in der Lage den mittels Inkubation mit NB-598 akkumulierten Squalengehalt zu senken (Abbildung 4.1).

Auch mit dem finalen Assay konnten keine Akkumulationen von Isoprenoiden beobachtet werden, trotz einer konzentrationsabhängigen Abnahme des akkumulierten Squalengehalts („+300 μ M Chloro“ ist vermutlich ein Ausreißer). Gleichzeitig mit dem sinkenden Squalengehalt, sank aber auch der Proteingehalt – bis auf unter die Hälfte der Referenz ohne Chlorogensäure (Abbildung 4.2). Dieser sinkende Proteingehalt weist auf ein schlechtes Wachstum der Zellen über den 24 Stunden hin. Dies könnte ebenfalls die Ursache der Abnahme von akkumuliertem Squalen in den Zellen sein. Bei einer Inkubation von ganzen 1200 μ M eines Inhibitors ist ein hemmender Einfluss auf das Zellwachstum aber auch nicht besonders überraschend.

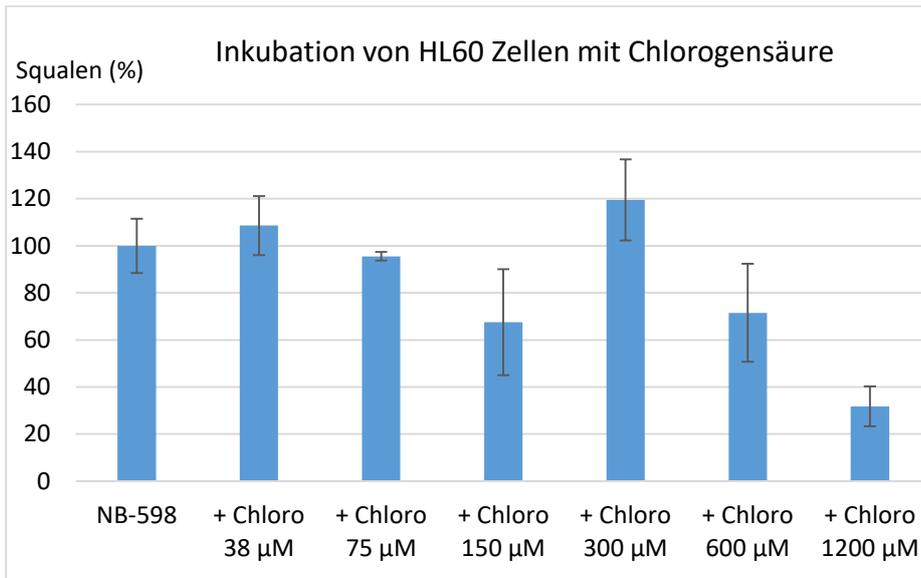


Abbildung 4.1 HL-60 Zellen wurden entweder mit dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 oder NB-598 zusammen mit Chlorogensäure („+ Chloro X µM“) inkubiert. Dargestellt ist der gemessene Squalengehalt im Verhältnis zum Squalengehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

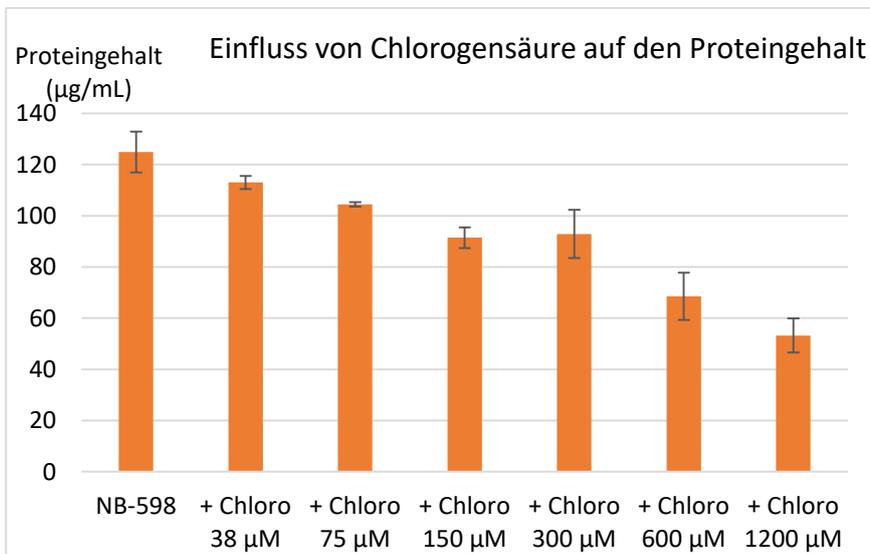


Abbildung 4.2 Darstellung des Proteingehaltes von HL-60 Zellen nach Inhibition mit NB-598 und Chlorogensäure. Fehlerbalken: Standardabweichung ($n = 3$).

Da eine Akkumulation von Isoprenoiden ausbleibt und der abgesunkene Squalengehalt auch durch die Wachstumshemmung erklärt werden kann, ist anzunehmen, dass die Chlorogensäure in HL-60 Zellen weder die Squalensynthese noch ein anderes Enzym des Präsqalenabschnitts der Cholesterolsynthese hemmt.

YM175

Das Bisphosphonat YM175 wird ebenfalls in hohen Konzentrationen eingesetzt (bis zu 1000 μM). In diesem Fall sind aber pharmakokinetische Gründe verantwortlich für die hohen benötigten Konzentrationen, da das YM175-Molekül durch seine zwei Phosphonat-Gruppen unter physiologischen Bedingungen negative Ladungen trägt, welche seine Zellmembrangängigkeit erheblich verschlechtern. YM175 ist strukturell ähnlich zu therapeutisch eingesetzten Bisphosphonaten wie Alendronat, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie eine sehr geringe Bioverfügbarkeit von unter 1% besitzen¹⁰⁰. Daher ist es nicht überraschend, dass auch bei YM175 hohe Konzentrationen nötig sind, um einen Effekt in den HL-60 Zellen zu provozieren (Abbildung 4.4). Ab 125 μM YM175 tritt eine Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) auf, welche sich allerdings bei steigenden YM175-Konzentrationen wieder verringert (Abbildung 4.3). Dies ist ungewöhnlich, da der Gehalt betreffender Isoprenoide bei geeigneten Inhibitoren normalerweise konzentrationsabhängig weiter ansteigen sollte, anstatt wieder abzusinken. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass YM175 bei niedrigen Konzentrationen zuerst die Farnesylpyrophosphat-Synthase hemmt und somit die Akkumulation von IPP und DMAPP bewirkt. In höheren Konzentrationen (ab 250 μM) wird zusätzlich ein weiteres Enzym gehemmt, welches sich „upstream“, also noch vor der Farnesylpyrophosphat-Synthase befindet. Durch die konzentrationsabhängig immer stärker werdende Hemmung des unbekanntes „upstream“-Enzyms wird der Nachschub an Substrat der Farnesylpyrophosphat-Synthase (= IPP und DMAPP) abgeschnitten und die Akkumulation von IPP und DMAPP verhindert. Obwohl YM175 zumindest in enzymatischen Assays die Squalensynthase hemmt⁸³, konnte keine Akkumulation von Farnesylpyrophosphat beobachtet werden.

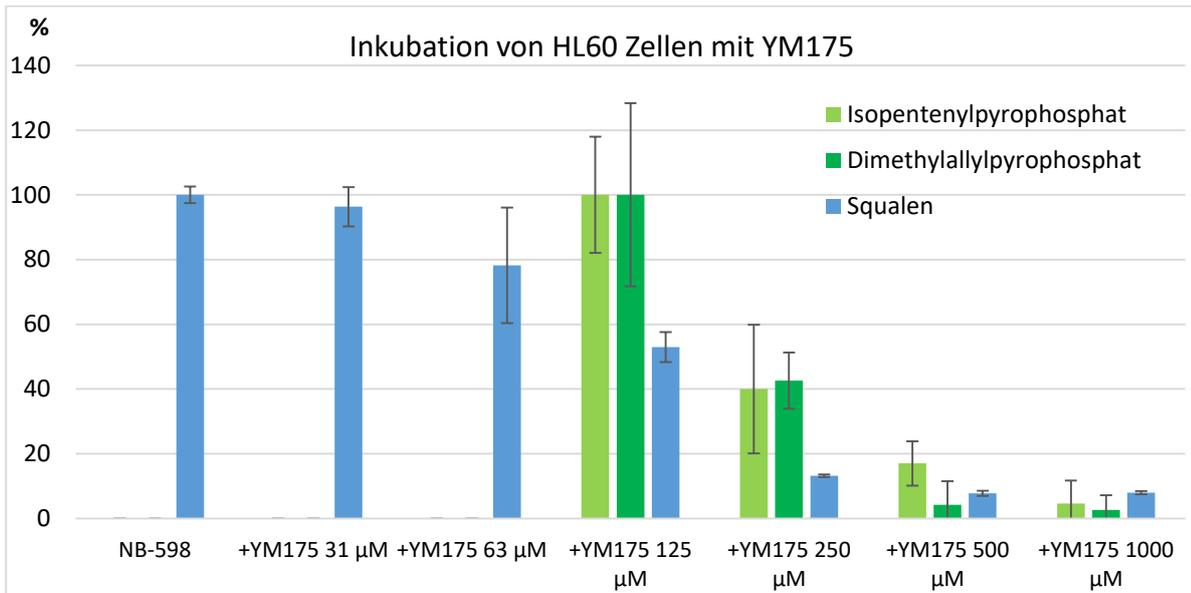


Abbildung 4.3 HL-60 Zellen wurden entweder mit dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 oder NB-598 zusammen mit YM175 („+ YM175 X µM“) inkubiert. 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Probe mit nur NB-598. 100 % Isopentenylpyrophosphat (IPP) entspricht dem IPP-Gehalt der Probe mit dem höchsten IPP-Gehalt („+YM 125 µM“). 100 % Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) entspricht dem DMAPP-Gehalt der Probe mit dem höchsten DMAPP-Gehalt („+YM 125 µM“). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

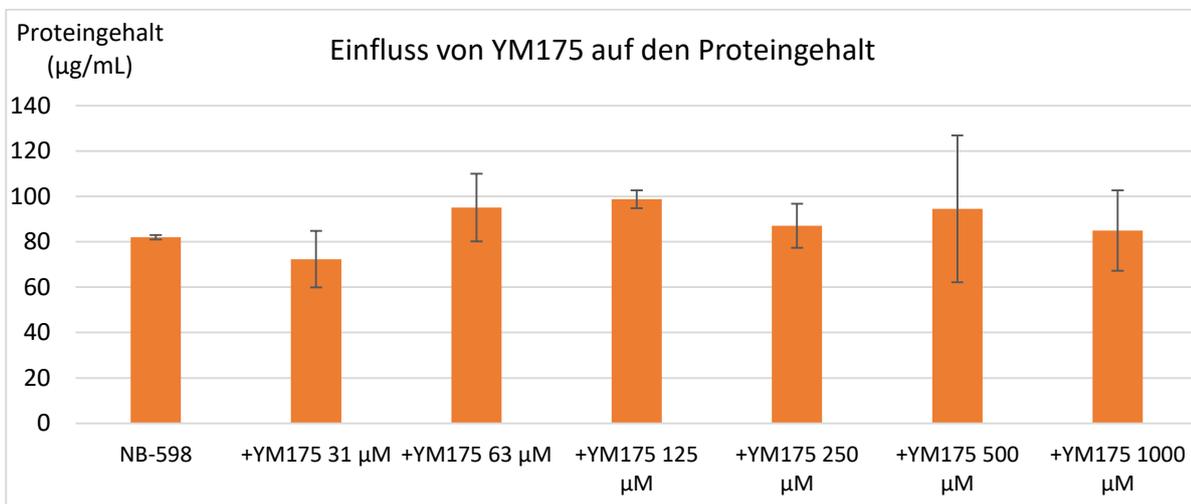


Abbildung 4.4 Darstellung des Proteingehaltes von HL-60 Zellen nach Inhibition mit NB-598 und YM175. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

„Carbazol 11“

„Carbazol 11“ ist ein weiterer Inhibitor, welcher in enzymatischen Assays die Squalensynthase hemmen konnte ($IC_{50} = 32 \text{ nM}$). Ishihara et al. haben die Substanz zusätzlich an Ratten getestet und Wirksamkeit im Sinne einer Senkung des Cholesterol- und Triglycerid-Gehalts im Blut festgestellt⁸². Diese bereits vorhandenen biologischen Daten sprechen für eine bessere Bioverfügbarkeit im Vergleich zum Bisphosphonat YM-175. In der Tat ergab sich in biologischen Testungen von „Carbazol 11“ mit dem finalen Testsystem eine Aktivität in Konzentrationen von unter $50 \mu\text{M}$ (Abbildung 4.5) anstatt von Werten im milimolaren Bereich. Zwar unterschieden sich der enzymatische und der zelluläre Wert immer noch um den Faktor 1000, aber dies ist nicht ungewöhnlich, wie der SQS-Referenzinhibitor Saragossasäure zeigt ($IC_{50, \text{ enzymatisch}}: 0,5 \text{ nM}$; $IC_{50, \text{ zellulär}}: 4,1 \mu\text{M}$). Gründe für die notwendige, höhere Konzentration in Zellen könnten eine schlechte Membrangängigkeit (wenn auch nicht auf den Niveau von YM175) oder bereits einsetzende Abbauvorgänge sein.

Der mittels NB-598 akkumulierte Squalengehalt sinkt mit steigenden „Carbazol 11“-Konzentrationen immer weiter ab. Gleichzeitig sinkt aber auch der Proteingehalt schrittweise auf ein Niveau, welches nur noch 22 % im Vergleich zur Negativ-Referenz (nur NB-598) beträgt (Abbildung 4.6). Das spricht für eine erheblich reduzierte Wachstumsrate und Vitalität der Zellen - und Zellen, die sich nicht genügend vermehren, produzieren auch weniger Cholesterol und damit auch weniger Squalen. Es konnte auch keine Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat beobachtet werden. Es bleibt damit offen, ob „Carbazol 11“ eine bisher unbekannte inhibitorische Aktivität im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolbiosynthese weiter „upstream“ der bisher beobachtbaren Enzyme besitzt, oder ob die Toxizität der Substanz die Ursache für die erniedrigte Squalenkonzentration ist.

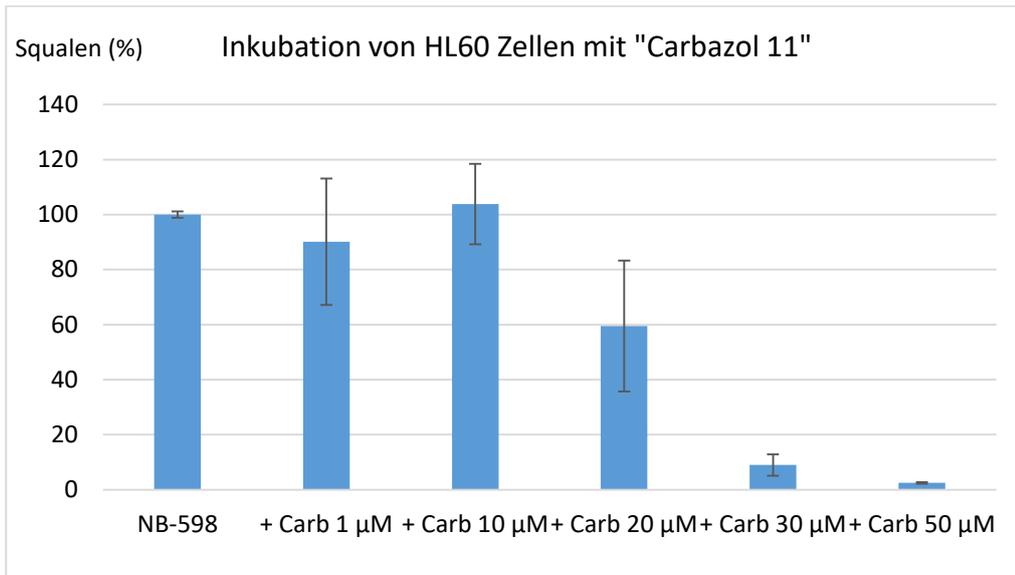


Abbildung 4.5 HL-60 Zellen wurden entweder mit dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 oder NB-598 zusammen mit „Carbazol 11“ („+ Carb X µM“) inkubiert. 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Probe mit nur NB-598. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

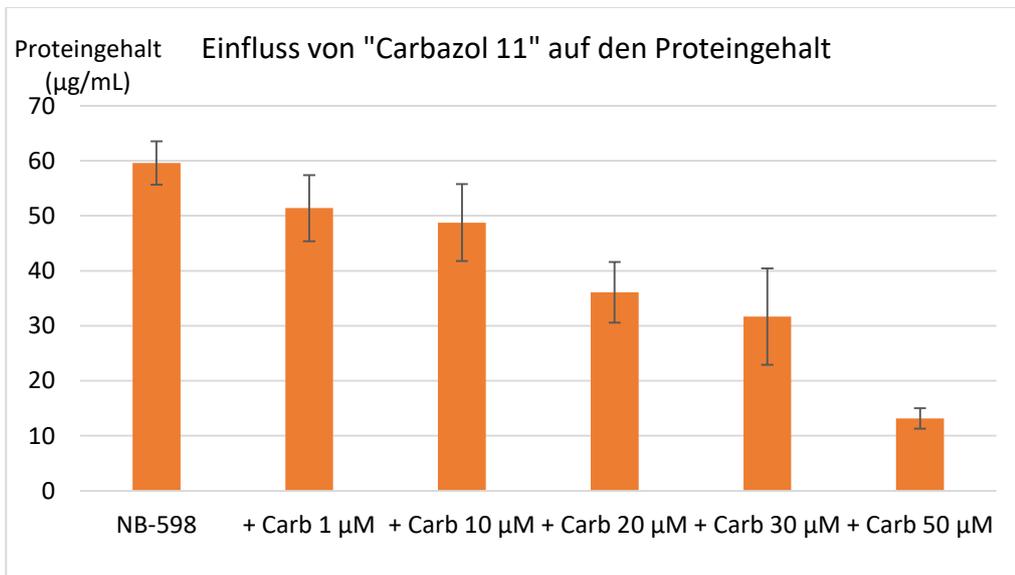


Abbildung 4.6 Darstellung des Proteingehaltes von HL-60 Zellen nach Inhibition mit NB-598 und „Carbazol 11“ („+ Carb X µM“). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

6-Fluormevalonat

6-Fluormevalonat ist eigentlich ein Referenzinhibitor für die Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase⁹⁴ und sorgt für eine Akkumulation von Mevalonatpyrophosphat. Daneben wurde in einem zellulären Assay von L. Henneman im Jahre 2011 allerdings auch eine Akkumulation von C₅-Isoprenoiden beobachtet. Welches der beiden C₅-Isoprenoide akkumulierte, konnte in dem Assay von L. Henneman entwickelten Assay nicht festgestellt werden, da dieses Testsystem auf Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) basierte und die Auflösung nicht ausreichte, um Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat auf der Säule zu trennen. 6-Fluormevalonat sollte in diesem Assay vor allem dazu dienen, die Akkumulation von Mevalonat nach Hemmung des entsprechenden Enzyms zu demonstrieren. Dies zu zeigen gelang aufgrund der schlechten Sensitivität des Testsystems gegenüber Mevalonat nicht. Dafür konnte derselbe Nebeneffekt beobachtet werden, den auch schon L. Hennemann sehen konnte: die Akkumulation von C₅-Isoprenoiden (Abbildung 4.7). Es akkumulierte allerdings ausschließlich Isopentenylpyrophosphat und kein Dimethylallylpyrophosphat. Daraus lässt sich folgern, dass 6-Fluormevalonat neben der Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase auch noch andere Enzyme hemmt. Entweder wird nur noch die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase zusätzlich gehemmt, oder die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase und Farnesylpyrophosphat-Synthase gleichzeitig. Beide Möglichkeiten würden die einseitige Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat erklären.

An dem unveränderten Proteingehalt nach Inkubation mit steigenden Mengen 6-Fluormevalonat (Abbildung 4.8) lässt sich erkennen, dass 6-Fluormevalonat für die Zellen gut verträglich ist, trotz seiner inhibitorischen Wirkung im Präsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese.

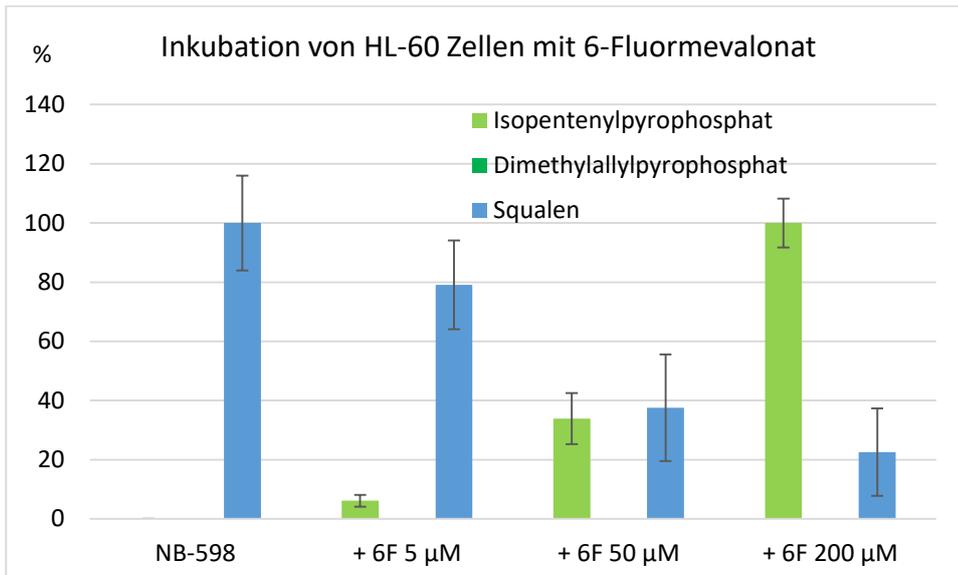


Abbildung 4.7 HL-60 Zellen wurden entweder mit dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 oder NB-598 zusammen mit 6-Fluormevalonat („+ 6F X μM“) inkubiert. 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). 100 % Isopentenylpyrophosphat (IPP) entspricht dem IPP-Gehalt der Probe mit dem höchsten IPP-Gehalt („+6F 125 μM“). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

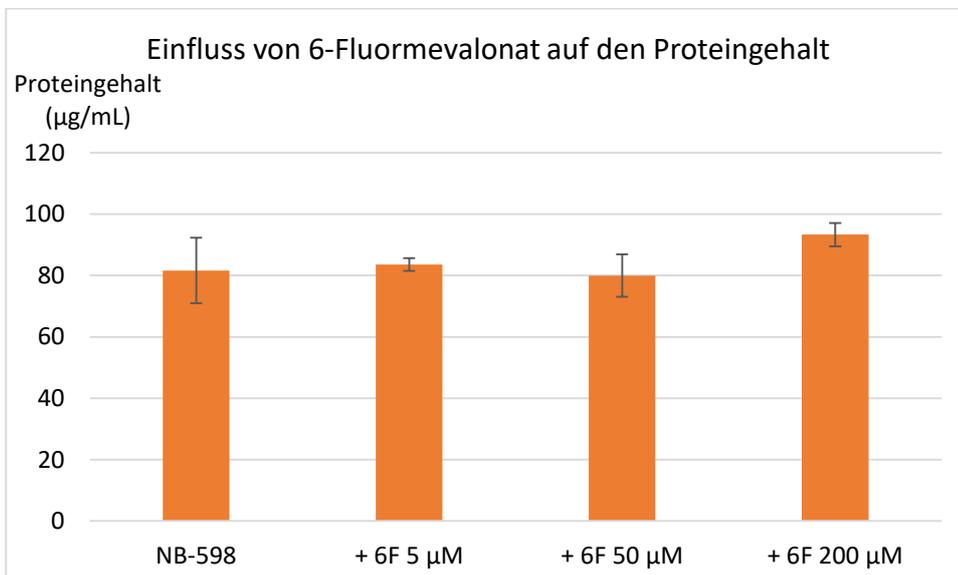


Abbildung 4.8 Darstellung des Proteingehaltes von HL-60 Zellen nach Inhibition mit NB-598 und 6-Fluormevalonat (+ 6F X μM). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Fazit zur Testung literaturbekannter Inhibitoren:

Weder bei der Chlorogensäure, „Carbazol 11“ oder YM175 konnten die literaturbekannten Hemmungen der Squalensynthese bestätigt werden. Allerdings wurden bisherige Literaturwerte aus enzymatischen Assays gewonnen, während die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse aus einem zellulären Assay stammen. Bei der Chlorogensäure und „Carbazol 11“ könnten die beobachteten wachstumshemmenden Effekte diese Diskrepanz erklären.

YM175 zeigte zwar keine Akkumulation von Farnesylpyrophosphat, aber dafür eine Akkumulation der beiden C₅-Isoprenoide, was für eine Hemmung der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) spricht. Diese Hemmwirkung konnte bereits an der isolierten FPPS gezeigt werden (IC_{50,enzym} = 61,1 nM¹⁰¹) – neu ist aber die Erkenntnis, dass in zellulären Versuchen die Hemmung der Squalensynthese, welche ebenfalls in enzymatischen Testungen bestimmt wurde, keine Rolle spielt und stattdessen in Zellen nur eine Hemmung der FPPS zu beobachten ist. In höherer Konzentration von YM175 nimmt der Gehalt von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat sogar wieder ab, was sich durch die Hemmung eines weiteren, nicht-identifizierten Enzyms „upstream“ der FPPS erklären lässt.

Die Tests mit 6-Fluormevalonat bestätigen bisherige Literaturergebnisse. So beschrieben bereits L. Hennemann et al. 2011⁸⁵, dass 6-Fluormevalonat in der Lage ist C₅-Isoprenoide akkumulieren zu lassen. Dass jedoch statt beiden C₅-Isoprenoiden nur Isopentenylpyrophosphat akkumuliert, wurde bisher noch nicht beschrieben.

4.2 Testung von Inhibitoren aus dem Arbeitskreis

Als nächstes wurden Inhibitoren getestet, welche aus dem Arbeitskreis Prof. Bracher stammen. Dies sind zum einen Substanzen, welche von Dr. Annette Wolfgardt synthetisiert wurden, sowie zwei strukturell verwandte Substanzen von Dr. Marco Keller. Besonders interessant sind dabei vor allem die Substanzen AW93 und AW138, welche in Zell-Versuchen eine wesentlich stärkere Hemmung der Cholesterolsynthese erreichten, als es der von Kooperationspartnern in einem unabhängigen Enzym-Assay bestimmte IC₅₀-Wert am ursprünglich angenommenen Targetenzym Oxidosqualensynthase erwarten

lässt (siehe Kapitel 2 Themenstellung). Eine Übersicht der getesteten Strukturen gibt Abbildung 4.9:

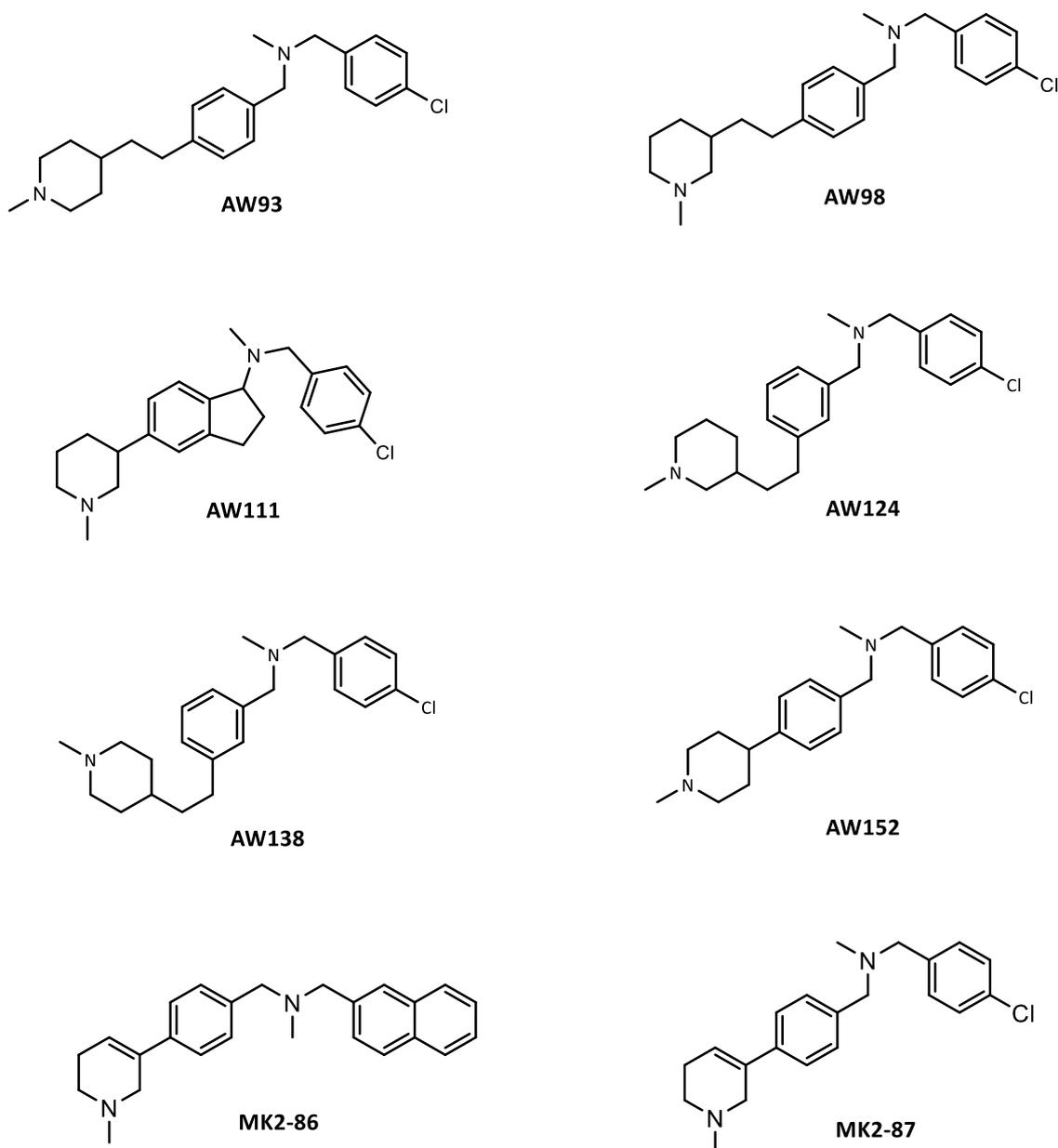


Abbildung 4.9 Auf Hemmung im Präskualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese getestete Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt (AW) und Dr. Marco Keller (MK).

Die Ergebnisse der Testungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Substanzen wurden jeweils in den Konzentrationen 1 μ M und 50 μ M getestet. Diese beiden Konzentrationsstufen wurden bereits im etablierten Assay des Postsqualen-Abschnitts der Cholesterolsynthese verwendet und decken die Konzentrationsspanne ab, in der viele Inhibitoren wirken (siehe Saragossasäure, „Carbazol 11“, NB-598). Für den Fall, dass

50 μM nicht ausreichte, um eine signifikante Akkumulation eines Isoprenoids bzw. eine Verringerung des akkumulierten Squalengehalts zu erreichen, wurde die zu testende Konzentration des betreffenden Inhibitors nicht weiter erhöht. Bei Effekten auf die Cholesterolsynthese in Konzentrationen über 50 μM ist der zu erwartende IC_{50} -Wert einfach zu hoch und der Inhibitor zu schwach, als dass die Substanz noch von Interesse wäre. Zwar wurden in den in Kapitel 4.1 beschriebenen Untersuchungen gelegentlich auch Inhibitoren in höheren Konzentrationen vermessen, aber nur weil für die entsprechenden Substanzen bereits Aktivitäten in zellulären oder enzymatischen Assays beschrieben waren und entsprechend hohe Konzentrationen für die Reproduzierung der Ergebnisse erforderlich waren. Normalerweise werden in Assays jedoch Substanzen unbekannter Wirkung getestet und es wäre ein übertriebener Aufwand, ohne entsprechendes Indiz bei jedem potentiellen Inhibitor auch höhere Konzentrationen zu testen. Des Weiteren wird in der Tabelle zusätzlich die bei der jeweiligen Testkonzentration ermittelte Proteinmenge angegeben, um das wachstumshemmende Potential jeder einzelnen Substanz besser abschätzen zu können.

Substanzen	Detektion von Isoprenoiden				Testkonzentration 1 μM		Testkonzentration 50 μM	
	IPP	DMAPP	FPP	GGPP	Squalen (%)	Protein- menge (%)	Squalen (%)	Protein- menge (%)
AW93	-	-	-	-	115	80	19	45
AW98	-	-	-	-	48	84	26	50
AW111	-	-	-	-	80	84	26	48
AW124	-	-	-	-	80	66	54	42
AW138	-	-	-	-	75	74	18	40
AW152	-	-	-	-	63	98	34	65
MK2-86	-	-	-	-	60	76	15	22
MK2-87	-	-	-	-	41	62	15	47

Tabelle 4.1 Liste der getesteten Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt (AW) und Dr. Marco Keller (MK). 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). 100 % Proteinmenge entspricht ebenfalls dem Proteingehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). Getestet wurden jeweils Triplikate jeder Konzentration. IPP = Isopentenylpyrophosphat, DMAPP = Dimethylallylpyrophosphat, FPP = Farnesylpyrophosphat, GGPP = Geranylgeranylpyrophosphat.

Bei keiner Substanz konnte eine Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat beobachtet werden.

Bei einer Testkonzentration von 1 μM verringerte sich nur bei AW98 und MK2-87 der Squalengehalt auf unter 50 %, was für eine leichte Hemmung eines Enzyms im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese spricht. AW98 zeigte in früheren Tests einen Unterschied von Faktor 28 zwischen Hemmung der Gesamt-Cholesterolsynthese-Hemmung im zellulären Assay und Hemmung der isolierten Oxidosqualencyclase (OSC) im Enzymassay ($\text{IC}_{50, \text{Cholesterol}} = 0,097 \mu\text{M} \leftrightarrow \text{IC}_{50, \text{OSC}} = 2,70 \mu\text{M}$; Tabelle 4.2). Insofern bestätigt die hier beobachtete Reduktion der Squalenproduktion im zellulären Assay die Vermutung, dass AW98 ein weiteres Enzym „upstream“ der IPP-Isomerase hemmt.

Bei MK2-87 sank der Proteingehalt auf 62 % im Vergleich zur Negativ-Referenz mit maximal akkumuliertem Squalengehalt (Inkubation nur mit NB-598), während bei AW98 (1 μM) der Proteingehalt noch 84 % beträgt. Je niedriger der Proteingehalt, desto mehr wurden die Zellen in ihrem Wachstum gehemmt - und Zellen, die weniger stark wachsen, produzieren auch weniger Cholesterol bzw. Squalen. Da bei MK2-87 der Proteingehalt gleichzeitig mit dem Squalengehalt absank, scheint eine Hemmung der Cholesterolsynthese im Präsqalen-Abschnitt daher unwahrscheinlich. Der Unterschied zwischen Hemmung der zellulären Cholesterolsynthese und der OSC ist dazu nur vernachlässigbar ($\text{IC}_{50, \text{Cholesterol}} = 2,14 \mu\text{M} \leftrightarrow \text{IC}_{50, \text{OSC}} = 2,51 \mu\text{M}$; Tabelle 4.2). Eine Hemmung im Präsqalen-Abschnitt war daher auch nicht zu erwarten.

Die dritte interessante Substanz ist AW152. Der Squalengehalt ist bei 1 μM Testkonzentration nur mäßig reduziert (63 %) im Vergleich zur Negativ-Referenz mit maximal akkumuliertem Squalen, das aber bei praktisch unveränderten Proteingehalt (-2 %). Da bei einer Testkonzentration von 1 μM auch bei AW152 keine Akkumulation von Isopreniden beobachtet werden konnte, scheint ein Enzym „upstream“ der IPP-Isomerase gehemmt zu werden. Der Unterschied aus zellulärer Hemmung (Cholesterol) und enzymatischem Assay (OSC) aus früheren Versuchen ist bei AW152 nur sehr gering ($\text{IC}_{50, \text{Cholesterol}} = 0,26 \mu\text{M} \leftrightarrow \text{IC}_{50, \text{OSC}} = 0,51 \mu\text{M}$, Tabelle 4.2), aber vorhanden. Eine Hemmung im Präsqalen-Abschnitt war daher nicht unbedingt zu erwarten gewesen, doch auch nicht völlig überraschend.

Verbindung	IC ₅₀ im zellulären Assay (μM bezogen auf Hemmung der Cholesterolsynthese)	IC ₅₀ im enzymatischen Assay (μM an der OSC)	Quotient aus IC ₅₀ (enz.) und IC ₅₀ (zell.)
AW93	0,011	2,3	209
AW98	0,097	2,7	28
AW111	0,140	4,2	30
AW124	0,172	5,0	29
AW138	0,017	2,5	147
AW152	0,260	0,51	2,0
MK2-86	0,370	10	27
MK2-87	2,14	2,5	1,2

Tabelle 4.2 Ausschnitt aus Tabelle 2.1 (Kapitel 2 Themenstellung) mit den Inhibitoren, welche in dem hier beschriebenen Assay auf Hemmung im Präsqalolen-Abschnitt der Cholesterolsynthese getestet wurden.

Die beiden Inhibitoren AW93 und AW138, welche die größten Unterschiede in zellulären und enzymatischen Tests zeigten (Faktoren 209 bzw. 147), haben überraschenderweise den Squalengehalt bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ kaum verändert (115 % bzw. 75 %). Dieser Squalengehalt ist nicht niedrig genug, um daraus eine Hemmung im Präsqalolen-Abschnitt der Cholesterolsynthese abzuleiten, welche bei $1 \mu\text{M}$ schon längst hätte eintreten sollen. Warum diese beiden Inhibitoren die zelluläre Cholesterolsynthese so viel stärker hemmen als das bisher einzige für diese Substanzen im Postsqualolen-Abschnitt identifizierte Enzym Oxidosqualencyclase in enzymatischen Tests, konnte mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Präsqalolen-Assay nicht geklärt werden.

Bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ reduzierten alle getesteten Substanzen den akkumulierten Squalengehalt auf unter 54 %. Sechs Substanzen (AW93, AW98, AW111, AW138, MK2-86 und MK2-87) reduzierten den Squalengehalt sogar auf unter 30 %, was auf den ersten Blick auf eine deutliche Hemmung im Präsqalolen-Abschnitt hinweist. Die Deutung dieser reduzierten Squalen-Konzentrationen wird allerdings erschwert durch den gleichzeitig ebenfalls deutlich gesunkenen Proteingehalt (Proteingehalt unter 65 % bei allen Substanzen) bei Inkubation mit dieser hohen Konzentration der Testsubstanzen. Besonders niedrig ist der Proteingehalt bei den sechs Substanzen, welche den Squalengehalt am stärksten sinken ließen (Proteingehalt unter 47 %). HL-60 Zellen verdoppeln ihre Zellmasse ca. alle 24 h. Falls eine Substanz die Zellen so stark hemmt,

dass keine Zellvermehrung eintritt, würde der Proteingehalt nach 24 h nur 50 % der ungehemmten Proben betragen. Nach 24 h entspräche ein Proteingehalt von 60 % einer enormen Zellwachstumshemmung von 80 %. Welchen Einfluss eine ausgeprägte Wachstumshemmung auf den daraus resultierenden Squalengehalt (also unabhängig von einer zusätzlichen Hemmung eines Enzyms im Präsqalenabschnitt) hat, wird im nächsten Abschnitt noch ausführlicher diskutiert.

Routinemäßig wird im Arbeitskreis Prof. Bracher für jede Substanz ein MTT-Test durchgeführt. Dieser Assay wird im Gegensatz zum Cholesterol-Assay, welcher Zelltoxizität nur indirekt über Änderungen in der Proteinmenge beobachtet, zur direkten Bestimmung der Toxizität von Testsubstanzen auf Zellen verwendet. Von metabolisch aktiven Zellen wird der wasserlösliche, schwach gelb gefärbte MTT-Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem wasserunlöslichen, tiefblau gefärbten Formazan umgesetzt. Die Reaktion wird von Dehydrogenasen der Zellen katalysiert und läuft umso ausgeprägter ab, je mehr Reduktionsäquivalente (NADH/H⁺ bzw. NADP⁺/NADPH/H⁺) der Zelle zur Verfügung stehen. Die Menge der Reduktionsäquivalente, die der Zelle zur Verfügung stehen, ist wiederum ein Maß für die metabolische Aktivität der Zelle und somit ein Maß für die Zellviabilität (= „Lebendzellanteil“). Im MTT-Test zeigte keine der getesteten Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt und Dr. Marco Keller einen nennenswerten toxischen Effekt innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs (bis 50 µM), bis auf AW98 (IC₅₀-Wert = 15 µM) und AW138 (IC₅₀-Wert = 33 µM). Bei diesen beiden Substanzen bestätigte sich also die im Präsqalen-Assay beobachtete Hemmung des Zellwachstums. Bei den anderen Substanzen konnte die Reduktion der Proteinmenge nicht mit einer Toxizität im MTT-Test korreliert werden. Es könnte aber sein, dass der MTT-Assay bei Testkonzentrationen von über 50 µM durchaus wachstumshemmende Effekte gezeigt hätte. Schließlich nützt der MTT-Test ein anderes Prinzip zur Detektion von toxischen Effekten, wodurch kleinere Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen vom MTT-Test und dem Präsqalen-Testsystem erklärt werden können.

Betrachtung des Einflusses einer allgemeinen Wachstumshemmung auf den Squalengehalt von Zellen:

Zwar wird zur Berechnung der Squalenkonzentration das verminderte Wachstum durch Einbeziehung der bestimmten Proteinmenge mit berücksichtigt. Aber das Signal wird nur auf die Menge an Protein am Ende der Inkubation bezogen, nicht auf die Wachstumsrate.

Es ist bekannt, dass die Cholesterol-Produktion am intensivsten in den Zellen stimuliert wird, welche eine hohe Vermehrungsrate haben^{102,103}. Dies erklärt sich auch aus der Tatsache, dass 90 % des gesamten Cholesterols in der Zellmembran landet^{104,105,106}. Je mehr neue Zellen gebildet werden, desto mehr Zellmembranen müssen entstehen und desto stärker wird die Cholesterolsynthese angekurbelt. Zellen deren Wachstum gehemmt ist, produzieren deutlich weniger Cholesterol als Zellen in der Teilungsphase.

Daraus ergibt sich für die Berechnung des Squalengehalts folgendes Problem: Wenn eine Substanz zwar nicht in die Cholesterolsynthese eingreift, aber auf eine andere Art das Zellwachstum hemmt bzw. die Zellen sogar abtötet, dann sinkt der akkumulierte Squalengehalt trotz Einbeziehung der Proteinmenge auf die Berechnung der Squalenmenge – und das, obwohl eigentlich keine Hemmung der Cholesterolsynthese selbst vorliegt.

Es folgen ein paar Rechenbeispiele, um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen. Die Rahmenbedingungen sind dieselben wie in den realen Versuchen (1 Mio Zellen, NB-598 standardmäßig hinzugesetzt). Zusätzlich basieren die Rechnungen auf folgende Annahmen, um das Modell zu vereinfachen:

- Pro 24 h nimmt die Zahl der Zellen um 80 % zu (experimentell bestimmter Wert).
- Angesetzte Zellen: 1 Mio. HL-60 mit NB-598 (hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum); der zugesetzte zu charakterisierende Inhibitor hemmt nur das Zellwachstum, aber nicht Cholesterolsynthese.
- 100 % des neu produzierten Squalens dienen dem vermehrten Bedarf an Squalen während der Zellvermehrung; diese Menge ist proportional zur Vermehrungsrate der Zellen (produziertes Squalen ~ Zuwachs an Zellen).

Zuerst werden beispielhaft der absolute Squalengehalt und relative Squalengehalt (= absoluter Squalengehalt / Zellzahl) berechnet, für den Fall, dass die Zellteilung der Zellen durch den zu charakterisierenden Inhibitor gar nicht (0 %) zur Hälfte (50 %) oder stark (90 %) gehemmt wird (Abbildung 4.10).

Hemmung	Zellzahl _{24h} (Mio.)*	Squalengehalt**	rel. Squalen***	rel. Squalen (in %)****
Keine:	1,80	100	55,6 (= $100/1,80$)	100 %
50%:	1,40	50 (100 × 0,50)	35,7 (= $50/1,40$)	64 %
90%:	1,08	10 (100 × 0,10)	9,3 (= $10/1,08$)	17 %

<p>* Zellzahl_{24h} =</p> <p>Zellzahl in Mio. nach 24 h unter Annahme einer Wachstumsrate von +80 % pro Tag (ungehemmt).</p> $N_{24h} = N_{0h} + N_{Wachstum} = 1,00 + (\%_{Hemmung} \times 0,80)$	<p>**Squalengehalt</p> <p>Squalengehalt, welcher tatsächlich in der Zelle vorliegt. Entspricht in der Realität der Peakfläche im GC-MS.</p> $abs. Squalen = 100 \times (100 - \%_{Hemm.})$
<p>***relativer Squalengehalt:</p> <p>Bezieht den gemessenen Squalengehalt auf die Zellzahl (im Assay wird stattdessen die Proteinmenge verwendet).</p> $rel. Squalen = \frac{abs. Squalen}{N_{24h}(Zellzahl)}$	<p>****relativer Squalengehalt (%)</p> <p>100 % entspricht dem maximal akkumulierten Squalengehalt. Je niedriger der Wert, desto stärker erscheint die Hemmung.</p>

Abbildung 4.10 Berechnung des Squalengehalts (bezogen auf den Proteingehalt der Zellen) in Abhängigkeit einer fiktiven Hemmung des Zellwachstums (ohne Hemmung der Cholesterolsynthese).

Nachfolgend wird der relative Squalengehalt für Hemmungen des Zellwachstums durch die Testsubstanz in einem Ausmaß von 10 bis 100 % simuliert. Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse der Berechnungen.

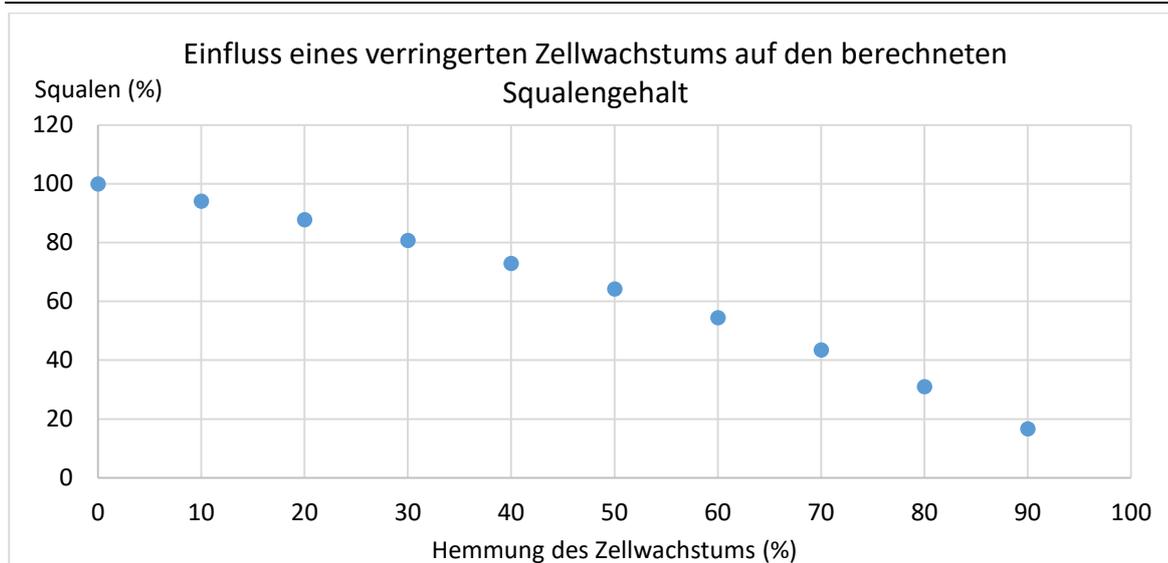


Abbildung 4.11 Darstellung des Squalengehalts (Squalen/Proteingehalt; berechnet nach dem oben erklärten Modell) in Abhängigkeit von der Hemmung des Zellwachstums (%).

Wie deutlich zu erkennen ist, sinkt der berechnete Squalengehalt (= gemessenes Squalen pro Proteinmenge) ab, je stärker das Zellwachstum gehemmt wird – wohlgermerkt, obwohl keine Hemmung der Cholesterolsynthese vorliegt, sondern nur die Zellvermehrung gehemmt wurde. Dadurch, dass der berechnete Squalengehalt bei zunehmender Hemmung des Zellwachstums unweigerlich absinkt, wird fälschlicherweise suggeriert, dass die betreffende Substanz Einfluss auf die Cholesterolsynthese nimmt. Dieses Problem existiert natürlich nur, wenn versucht wird, allein durch die Bestimmung der Abnahme von akkumuliertem Squalen auf eine Cholesterolsynthese-Hemmung zu schließen. Für den Fall, dass eine Akkumulation eines anderen Isoprenoids außer Squalen gemessen wird, kann weiterhin zweifelsfrei auf das gehemmte Enzym Rückschluss gezogen werden.

Um diese Fehleinschätzung im realen Assay zu vermeiden, ist es wichtig die nach Zellyse bestimmten Proteinmengen der Zell-Ansätze sorgfältig zu beobachten und, falls die Proteinmenge im Verhältnis zur Referenz stark absinkt (z.B. unter 70 %), das Absinken des Squalengehalts nicht für eine eindeutige Hemmung im Prä-squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese zu halten. Die verwendete Korrektur (gemessenes Squalen geteilt durch Proteinmenge) reicht nicht aus, um ein fehlerfreies Ergebnis zu erhalten. Dabei gilt: je stärker das Zellwachstum gehemmt wird, desto stärker sinkt der akkumulierte Squalengehalt ab (ohne dass notwendigerweise eine Cholesterolsynthese-Hemmung vorliegt). Inhibitoren, welche die Proteinmenge verringern, sind also in zweifacher Hinsicht problematisch: Zum einen sind Cholesterolsynthese-Inhibitoren, welche

zytostatisch oder sogar zytotoxisch wirken, generell eher uninteressant. Zum anderen ist die Verringerung von akkumuliertem Squalen bei gleichzeitig stark erniedrigtem Proteingehalt (im Vergleich zur Negativ-Referenz, also Probe ohne Inhibitor) kein zuverlässiges Kriterium mehr, um eine Hemmung im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese anzuzeigen. Dies gilt insbesondere dann, wenn keine Akkumulation von Substraten bekannter Enzyme des Präsqalen-Abschnitts der Cholesterolsynthese, wie z.B. Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallyl-pyrophosphat, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat beobachtet werden kann. Falls der akkumulierte Squalengehalt sinkt, ohne dass die Proteinmenge absinkt, kann aber auf eine Hemmung „upstream“ der Squalenepoxidase geschlossen werden.

Nach den Simulationen eines fiktiven Inhibitors wurden die beiden interessantesten Kandidaten aus den vorherigen Testungen noch einmal unter Berücksichtigung der Berechnungen zum Einfluss von Zellwachstumshemmungen auf die Cholesterolsynthese bewertet. Beide Kandidaten (AW98, AW152) zeigten eine moderate Reduktion des akkumulierten Squalengehalts bei einer Testkonzentration von 1 μM (auf 48 % bzw. 63 %) und eine stärkere Reduktion bei 50 μM (auf 26 % bzw. 34 %), hier allerdings begleitet von einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums, erkennbar am niedrigen Proteingehalt. In der nachfolgenden

Tabelle 4.3 werden diese Werte dem auf Wachstumshemmung bezogenen Squalengehalt gegenüber gestellt - also dem Squalengehalt, welchen die Zellen lediglich aufgrund ihrer Wachstumshemmung (ohne Beeinflussung der Cholesterolsynthese) haben würden. Die Annahmen sind dabei dieselben, wie in den vorangegangenen Rechnungen (80 % Zuwachs an Zellen pro Tag, produziertes Squalen \sim Zuwachs an Zellen).

1 μ M	Protein- menge (%)	Zellwachstum	Zellwachstums- hemmung (%)	tatsächlicher Squalengehalt (%)	simulierter Squalengehalt (%)
AW98	84	+ 65 %	35	48	78
AW152	98	+ 96 %	4	63	98

50 μ M	Protein- menge (%)	Zellwachstum	Zellwachstums- hemmung (%)	tatsächlicher Squalengehalt (%)	simulierter Squalengehalt (%)
AW98	50	- 13 %	<i>cytotox. Effekt</i>	26	0
AW152	65	+ 21 %	79	34	33

Tabelle 4.3 Vergleich der tatsächlichen Squalenkonzentration im Vergleich zur simulierten Konzentration. 100 % Proteinmenge entspricht der Proteinmenge der ungehemmten Negativ-Referenz. 100 % Zellwachstum entspricht einem ungehemmten Wachstum. 0 % Wachstum entspricht einer Proteinmenge von 56 % (basierend auf einem Zuwachs von 80 % Zellmasse pro Tag).

Bei der Testkonzentration von 1 μ M sind die tatsächlichen Squalenkonzentrationen aus den Testungen niedriger als die Werte, welche aus der Zellwachstumshemmung abgeleitet wurden (48 % < 78 %, bzw. 63 % < 98 %). Das spricht dafür, dass sowohl AW98 als auch AW152 ein noch nicht identifiziertes Enzym im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolbiosynthese hemmen. Die zugleich einsetzende Hemmung des Zellwachstums bei beiden Substanzen (AW98, AW152) ist zu schwach, um den reduzierten Squalengehalt zu erklären. Bei höheren Konzentrationen allerdings verstärkt sich die Hemmung des Zellwachstums. Der tatsächliche Squalengehalt liegt nicht mehr unter dem simulierten. Bei AW98 (50 μ M) wird sogar ein leichter cytotoxischer Effekt festgestellt. Dies ist aber nicht verwunderlich, da AW98 auch im MTT-Test eine cytotoxische Wirkung gezeigt hatte (IC_{50} = 15 μ M).

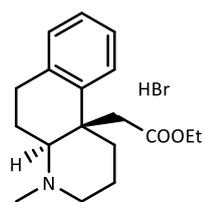
Im Vergleich dazu zeigten alle bislang erfolgreich eingesetzten Inhibitoren, dass es durchaus möglich ist akkumuliertes Squalen zu reduzieren, andere Isoprenoide zu akkumulieren und trotzdem keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben (Tabelle 4.4). Eine Hemmung der Cholesterolbiosynthese im Präsqalen-Abschnitt geht also nicht notwendigerweise mit einer Hemmung des Zellwachstums einher.

Inhibitor	Konzentration	Squalen (%)	Proteingehalt (%)
Saragossasäure	50 μ M	7	102
Zoledronsäure	1500 μ M	19	87
6-Fluormevalonat	200 μ M	23	114
YM175	1000 μ M	8	105

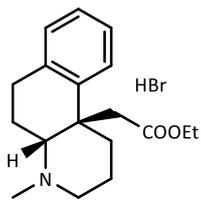
Tabelle 4.4 Übersicht getesteter Inhibitoren und der jeweils gemessenen Squalen- und Proteingehalte. Als Konzentration wurde diejenige Konzentration gewählt, welche den höchsten Effekt im Sinne einer Reduzierung von akkumulierten Squalen erreichte. 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). 100 % Proteingehalt entspricht dem Proteingehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aus den untersuchten Substanzen aus dem AK Bracher AW98 und AW152 die vielversprechendsten Kandidaten für eine Hemmung des Präsqalen-Abschnitts der Cholesterolsynthese ist. Allerdings ist die Hemmung nur relativ schwach (48 % bzw. 63 %) und das gehemmte Enzym konnte bisher nicht identifiziert werden.

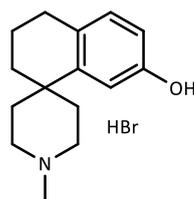
Die nächsten getesteten Inhibitoren stammen ebenfalls aus der Substanzsammlung von Prof. Bracher und sind von damaligen Doktoranden des Arbeitskreises Prof. Eberhard Reimann synthetisiert worden (Abbildung 4.12). Es handelt sich um rigidisierte Pethidin-Analoga und diese Substanzen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt, welche aufgrund ihrer Diskrepanzen zwischen enzymatischen und zellulären Messungen der Aufklärung bedurften (siehe Kapitel 2 Themenstellung).



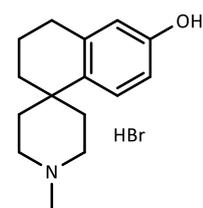
19A (trans, racemisch)



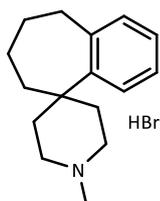
19B (cis, racemisch)



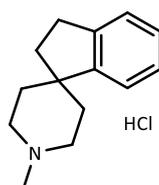
50b



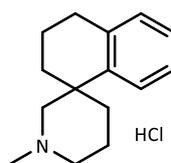
50c



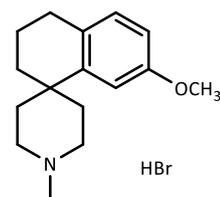
50f



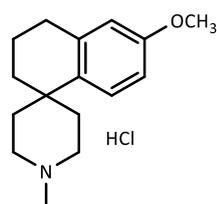
50g



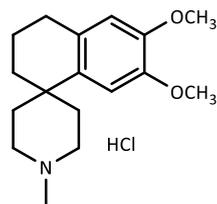
51 (racemisch)



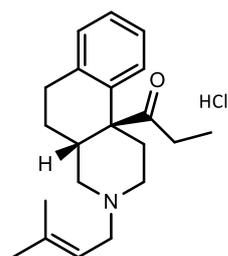
60b



60c



60d



75b (cis, racemisch)

Abbildung 4.12 Substanzen **19A** und **19B** wurden von Prof. Franz Bracher synthetisiert¹⁰⁷. **50b**, **50c**, **50f**, **50g**, **51**, **60b**, **50c**, **60d** stammen von Dr. Johann Speckbacher^{108,109,110,111}. **75b** wurde von Dr. Harald Benend dargestellt¹¹².

Sie Substanzen wurden wieder auf Hemmung im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese getestet. Untersucht wurden wieder jeweils 1 μM und 50 μM der jeweiligen Substanz zusammen mit NB-598, welches der Akkumulation von Squalen dient. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Substanzen	Detektion von Isoprenoide				1 μ M		50 μ M	
	IPP	DMAPP	FPP	GGPP	Squalen (%)	Proteinmenge (%)	Squalen (%)	Proteinmenge (%)
19A	-	-	-	-	94	101	93	103
19B	-	-	-	-	85	106	94	96
50b	-	-	-	-	87	94	70	104
50c	-	-	-	-	80	112	66	128
50f	-	-	-	-	68	113	78	111
50g	-	-	-	-	92	99	119	82
51	-	-	-	-	122	83	87	84
60b	-	-	-	-	118	87	93	87
60c	-	-	-	-	117	80	103	91
60d	-	-	-	-	60	95	96	90
75b	-	-	-	-	69	76	79	92

Tabelle 4.5 Ergebnisse der Testungen der Pethidin-Analoga von Prof. Franz Bracher, Dr. Johann Speckbacher und Dr. Harald Benend. 100 % Squalen entspricht dem Squalengehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). 100 % Proteinmenge entspricht ebenfalls dem Proteingehalt der Negativ-Referenz (nur NB-598). Getestet wurden jeweils Triplikate jeder Konzentration. IPP = Isopentenylpyrophosphat, DMAPP = Dimethylallylpyrophosphat, FPP = Farnesylpyrophosphat, GGPP = Geranylgeranylpyrophosphat.

Bei keiner der Substanzen konnte eine Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat beobachtet werden. Auf der höchsten Testkonzentration sank bei keiner Substanz der Gehalt an akkumuliertem Squalen auf Werte niedriger als 66 % (**50c**). 60d ist die einzige Ausnahme, da die Substanz bei einer Testkonzentration von 1 μ M den Squalengehalt auf 60 % gegenüber der Referenz reduzieren konnte. Bei der höheren Testkonzentration konnte dagegen kein Einfluss auf den Squalengehalt beobachtet werden, daher schien das

Testresultat von 60d bei 1 μM ein Ausreißer zu sein. Eine erneute Testung bestätigte, dass 60d keine Aktivität im Präsqalen-Abschnitt zeigt (104 % Squalen).

Im Gegensatz zu den Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt und Dr. Marco Keller blieb der Proteingehalt bei allen Substanzen auf beiden Konzentrationsstufen größtenteils konstant und sank niemals unter 82 % gegenüber der Negativ-Referenz (nur NB-598).

4.3 Vereinbarkeit von Post- und Präsqalen-Assay

Ein Vorteil des hier entwickelten Testsystems, welcher weder in der Methodenentwicklung noch in den biologischen Testungen zum Tragen gekommen ist, ist die Kompatibilität mit dem bereits existierenden Testsystem zur Charakterisierung von Enzyminhibitoren im Postsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese. Einige der Probleme, die in dieser Arbeit auftraten, hätten sich wesentlich eleganter lösen lassen, wenn größere Änderungen an der „Hardware“ des Systems möglich gewesen wären. So hätte sich das Problem der Coelution der C_5 -Isoprenoide mit dem Lösungsmittelpeak durch Wechsel zu einer für diese speziellen Analyten geeigneteren Säule lösen lassen, wodurch eventuell zusätzlich die Derivatisierung mit Benzoylchlorid bzw. Pentafluorbenzoylchlorid hätte umgangen werden können. Mevalonat hätte eventuell besser mit einem LC-MS System bestimmt werden können. All dies wären aber Anpassungen zur Lösung von speziellen Teilproblemen gewesen, bei denen das große Ganze aus den Augen verloren wird. Einen großen Vorteil hat die vorliegende Methode nämlich in ihrer jetzigen Form: Die Möglichkeit, Testungen im Prä- und Postsqalen-Assay zu vereinen. Da die Aufarbeitung der Zellen nur erweitert, aber nicht grundlegend geändert wurde, lassen sich mit der hier für den Präsqalen-Abschnitt entwickelten Methode alle Sterole aus dem Postsqalen-Abschnitt weiterhin bestimmen.

Folgende Maßnahmen sind nötig, um beide Assays zu kombinieren:

- Die HL-60 Zellen werden statt mit NB-598 mit ^{13}C -Acetat zusätzlich zum zu testenden Inhibitor inkubiert. Dadurch geht zwar etwas Information verloren, da kein Absinken von akkumuliertem Squalen nach Hemmung im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese mehr beobachtet werden kann. Dafür ist es

nun möglich isotopenmarkiertes Cholesterol zu messen und somit den Einfluss eines Inhibitors auf die Gesamtcholesterolbiosynthese zu bestimmen.

- Vor dem Derivatisierungsschritt wird die Probe in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wird mittels MSTFA silyliert und zur Analyse der Sterolintermediate des Postsqualen-Abschnitts der Cholesterolbiosynthese verwendet. Das zweite Aliquot wird mittels Pentafluorbenzoylchlorid (+ Pyridin) derivatisiert und zur Analyse ausgewählter Metaboliten des Präsqalen-Abschnitts verwendet.

Einen schematischen Überblick über die Vorgehensweise zur parallelen Analyse des Prä- und Postsqualenabschnitts der Cholesterolbiosynthese zeigt Abbildung 4.13. Auf diese Weise lassen sich mit einer einzigen Aufarbeitung Hemmeffekte auf jedes Enzym der Cholesterolbiosynthese von der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase bis zur $\Delta 24$ -Reduktase nachweisen.

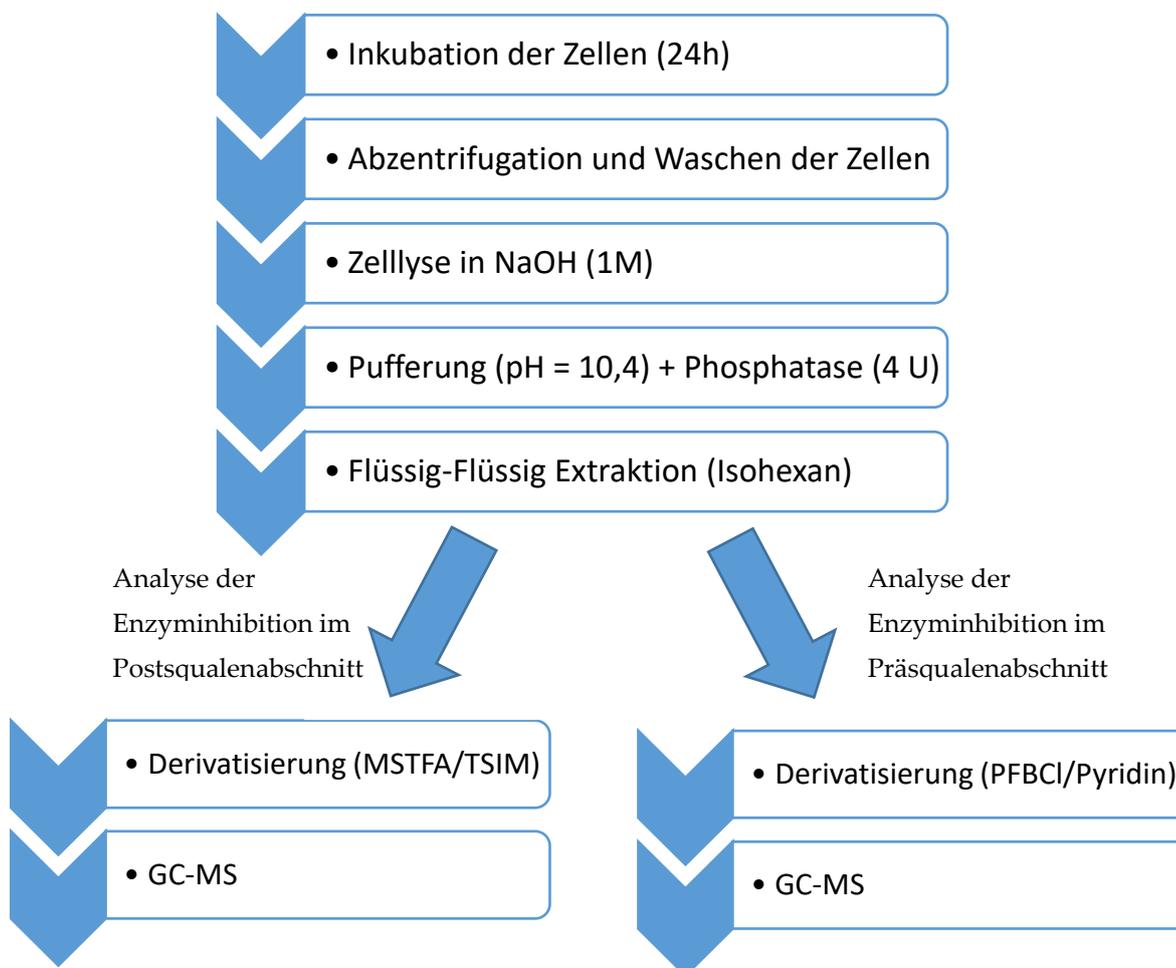
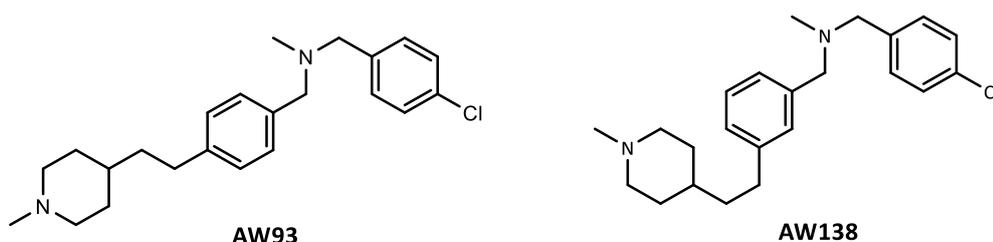


Abbildung 4.13 Schematischer Überblick zur parallelen Analyse von Enzyminhibitoren im Prä- und Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolbiosynthese. Es genügt eine Aufarbeitung der Zellen; zum Schluss müssen aufgrund der unterschiedlichen Derivatisierungen die Proben in zwei Teile geteilt werden

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Testsystem zu entwickeln, welches in der Lage ist Inhibitoren der Squalensynthese in der Cholesterolsynthese zu identifizieren. Später wurde das Testsystem sogar noch auf weitere Enzyme im Prä-squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese erweitert. Der Grund für die Entwicklung eines solchen Assays waren Substanzen von Dr. Annette Wolfgardt (AW93, AW138), welche Auffälligkeiten in früheren biologischen Testungen zeigten. Beide Substanzen wurden ursprünglich als Inhibitoren des Enzyms Oxidosqualencyclase entwickelt, hemmten allerdings überraschenderweise die Cholesterolsynthese in Zellen um den Faktor 147 (AW138) bzw. 209 (AW93) stärker als in enzymatischen Tests das isolierte Enzym Oxidosqualencyclase, welches im Testsystem von Giera et al.⁵⁹ als Zielenzym identifiziert wurde (Tabelle 5.1).



Verbindung	IC ₅₀ im zellulären Assay (μM bezogen auf Hemmung der Cholesterolsynthese)	IC ₅₀ im enzymatischen Assay (μM an der OSC)
AW93	0,011	2,3
AW138	0,017	2,5

Tabelle 5.1 Struktur und Testergebnisse von AW93 und AW138.

Dieses Testsystem ist aber nur in der Lage eine Enzyminhibition im Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese zu detektieren. Es bestand daher die Vermutung, dass AW93 und AW138 zusätzlich zur Oxidosqualencyclase ein oder mehrere weitere Enzyme im Prä-squalen-Abschnitt hemmen und das in extrem niedrigen Konzentrationen. Das würde

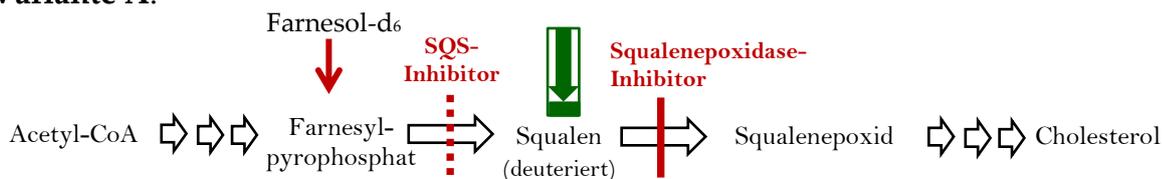
erklären, warum AW93 und AW138 die Cholesterolsynthese in Konzentration hemmen, die wesentlich niedriger sind als der IC_{50} an der Oxidosqualencyclase in enzymatischen Tests.

Um ein Testsystem für die Squalensynthese aufzubauen, sollte der Assay zur Identifizierung von Inhibitoren im Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese von Giera et al. als Basis verwendet werden. Dieser Assay von Giera et al., welcher schon seit längerem im Arbeitskreis Prof. Bracher etabliert ist, nützt GC-MS, um Extrakte aus Zellen zu analysieren, welche zuvor 24 h mit den zu testenden Inhibitoren behandelt wurden.

Um darauf basierend einen Squalensynthese-Assay zu entwickeln, kamen zwei Varianten in Frage: In Variante A sollte Deuterium-markiertes Farnesol in die Cholesterolsynthese von Zellen eingeschleust werden und eine Hemmung der Squalensynthese anhand der Abnahme der Menge an *de-novo* produziertem, deuteriertem Squalen gezeigt werden. Ohne deuteriertes Farnesol wäre das Testsystem nicht in der Lage spezifisch auf die Squalensynthese zu testen, denn eine Hemmung jedes beliebigen Enzyms „upstream“ der Squalensynthese kann ebenfalls eine Abnahme von akkumuliertem Squalen verursachen. Durch Inkubation der Zellen mit deuteriertem Farnesol und ausschließlicher Bestimmung von anschließend produziertem deuteriertem Squalen lässt sich das Testsystem spezifisch für die Analyse Squalensynthese-Inhibitoren gestalten. Da Squalen üblicherweise nur in niedrigen Konzentrationen in Zellen vorliegt (weil die Zellen es umgehend weiterverarbeiten), wurde zusätzlich der Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 standardmäßig dazu verwendet, Squalen in Zellen akkumulieren zu lassen.

Variante B sollte ähnlich zum bisherigen Testsystem für den Postsqualen-Abschnitt von Giera et al. funktionieren: Die Akkumulation des Enzymsubstrats Farnesylpyrophosphat (FPP) nach Inkubation mit einem Inhibitor sollte eindeutig eine Hemmung der Squalensynthese belegen (Abbildung 5.1).

Variante A:



Variante B:

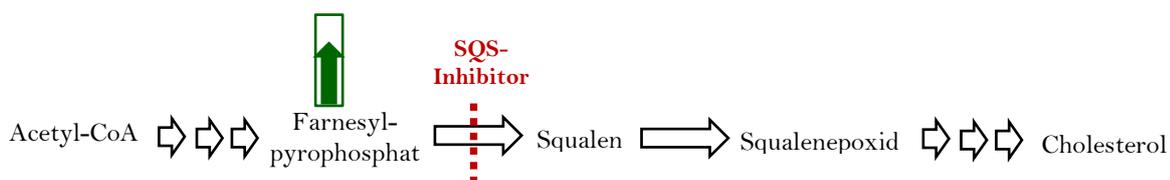


Abbildung 5.1 Funktionsweisen von Variante A und B

Um Variante A durchführen zu können, musste zunächst Farnesol- d_6 synthetisiert werden. Die Syntheseroute orientierte sich an einer Arbeit von J. S. de Ropp und F. A. Troy und ging von nicht-deuteriertem Farnesol aus (Abbildung 5.2).

Zuerst wurde nach einer Vorschrift von R. P. Hanzlik⁶⁵ das Farnesol mit einer Acetat-Schutzgruppe versehen und anschließend die terminale Doppelbindung mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) in das Bromhydrin **3** umgewandelt. Danach wurde das Epoxid **5** mittels Kaliumcarbonat gebildet und die Acetat-Schutzgruppe, welche durch das Kaliumcarbonat hydrolysiert wurde, wieder hergestellt. Das Epoxid wurde nach Labadie et al.⁶⁶ oxidativ gespalten, um den Aldehyd **6** zu erhalten. Dieser Aldehyd wurde in einer Wittig-Kupplung analog zu einer Vorschrift von Comeskey⁶⁷ zu Farnesol- d_6 (**8**) umgesetzt. Im letzten Reaktionsschritt wurde die Acetat-Schutzgruppe durch einen Überschuss des zur Generierung des Wittig-Ylids eingesetzten Butyllithium entfernt, sodass dafür kein extra Reaktionsschritt erforderlich war.

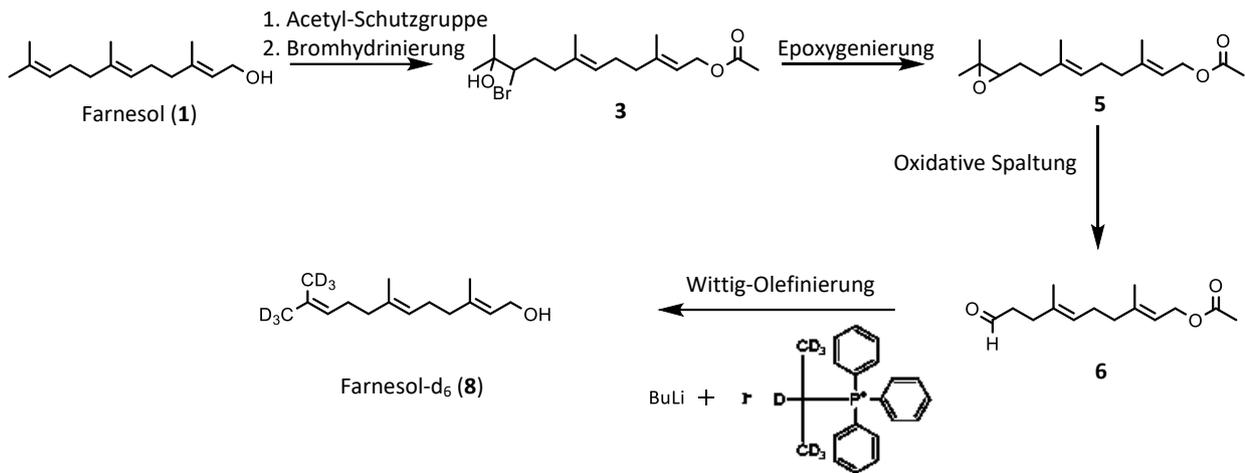


Abbildung 5.2 Synthese von Farnesol-d₆

Mit Farnesol-d₆ und dem Squalenepoxidase-Inhibitor NB-598 wurden Tests an Zellen durchgeführt. Obwohl nach Inkubation mit NB-598 erfolgreich Squalen akkumuliert werden konnte, konnte zu keinem Zeitpunkt deuteriertes Squalen gemessen werden. Dies lag vermutlich daran, dass die Menge an deuteriertem Farnesol in den Zellen nicht ausreichte, um eine für die Detektion genügende Menge an markiertem Squalen zu erzeugen. Doch ohne deuteriertes Squalen wäre das Testsystem nicht spezifisch für die Squalensynthese (SQS) gewesen. An diesem Punkt wurde entschieden die Arbeiten an Variante A einzustellen und stattdessen Variante B zu verfolgen.

Variante B sollte eine Hemmung der Squalensynthese durch Messung von akkumuliertem Farnesylpyrophosphat anzeigen. Die standardmäßige Zugabe von NB-598 zusätzlich zu den zu testenden Squalensynthese-Inhibitoren aus Variante A wurde beibehalten, sodass bei einer Squalensynthese-Hemmung neben dem Farnesylpyrophosphat-Anstieg auch ein Absinken des akkumulierten Squalen beobachtet werden konnte. Da in Variante B kein isotopenmarkiertes Farnesol an die Zellen verfüttert wurde, konnte ein Absinken von Squalen nicht spezifisch auf die Hemmung der Squalensynthese hinweisen, sondern lediglich allgemein auf eine Hemmung von Enzymen im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese. Doch auch diese Information ist wertvoll genug, sodass der Einsatz von NB-598 weiterhin als sinnvoll erachtet wurde. Vor allem, da durch den Einsatz des Squalenepoxidase-Inhibitors das Hauptprinzip des Assays nach Variante B, der Akkumulation von Farnesylpyrophosphat, nicht beeinträchtigt wurde. Für den Fall, dass sich ein potentieller Squalensynthese-Inhibitor als wirksam erweist, würde also zum

einen Farnesylpyrophosphat akkumulieren und zum anderen der Squalengehalt, welcher durch NB-598 akkumuliert wurde, wieder absinken.

Nach Beginn der Methodenentwicklung stellte sich schnell heraus, dass die bisherigen Lyse-Bedingungen nicht ausreichten, um Farnesylpyrophosphat zu hydrolysieren. Da jedoch nur das freie Farnesol lipophil genug für die Flüssig-Flüssig-Extraktion war, wurde als erstes eine Methode entwickelt den Phosphatester enzymatisch mittels einer Phosphatase zu spalten. Dazu wurden mehrere Enzyme getestet (alkalische Phosphatase aus Rinderschleimhaut, saure Phosphatase aus der Süßkartoffel, saure Phosphatase aus Weizenkeimen, Apyrase aus Kartoffeln), um eine quantitative Spaltung des Phosphatesters zu erreichen. Nach weiteren Tests zur Optimierung der Reaktionszeit, konnte Farnesylpyrophosphat mittels alkalischer Phosphatase aus Rinderschleimhaut zuverlässig und quantitativ in Farnesol umgewandelt werden. Nachdem die enzymatische Hydrolyse von FPP erfolgreich in das Testsystem eingebaut war, konnte zum ersten Mal ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Farnesylpyrophosphat-Konzentration nach Inkubation von HL-60 Zellen mit dem Squalensynthese-Inhibitor Saragossasäure gemessen werden. Im selben Zuge sank der Squalengehalt der Zellen mit steigender Inhibitor-Konzentration immer weiter ab. Das Primärziel dieser Arbeit, einen funktionierenden Squalensynthese-Assay zu entwickeln, war damit erreicht.

Neben der Saragossasäure wurden auch die in der Literatur als SQS-Inhibitoren beschriebenen Substanzen Chlorogensäure⁷⁸, YM175⁶⁶ und „Carbazol 11“⁸² getestet. Für alle drei Substanzen war von anderen Autoren in enzymatischen Tests eine inhibitorische Wirkung an der Squalensynthese gezeigt worden, diese Substanzen wurden aber bisher noch nicht in zellulären Testsystemen untersucht. In dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem konnte mit keiner dieser drei Substanzen eine Akkumulation von Farnesylpyrophosphat erzielt werden, obwohl die Menge an durch NB-598 akkumuliertem Squalen in allen Experimenten mit steigender Inhibitor-Konzentration absank. Daraus kann geschlossen werden, dass diese drei Substanzen eher ein anderes Enzym innerhalb des Präsqalen-Abschnittes der Cholesterolbiosynthese hemmen, welches sich im Biosyntheseweg „upstream“ der Squalensynthese befindet. Das erklärt, dass nach Inkubation mit Chlorogensäure, YM175 und „Carbazol 11“ die Menge an akkumuliertem Squalen sinkt (was allgemein auf eine Hemmung im Präsqalen-Abschnitt hinweist), ohne dass im Gegenzug das SQS-Substrat Farnesylpyrophosphat akkumuliert. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde das Testsystem angepasst und

weiterentwickelt, um auch die Inhibition weiterer Enzyme „upstream“ der Squalensynthese zu erkennen.

Zuerst wurde das Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) in das Testsystem aufgenommen. Durch seine starke strukturelle Ähnlichkeit zu Farnesylpyrophosphat musste das Testsystem, insbesondere die Aufarbeitung und die enzymatische Hydrolyse, nicht verändert werden. Zwar ist GGPP nicht Teil der Cholesterolsynthese, die Bestimmung von GGPP bringt trotzdem einen Zusatzgewinn an Erkenntnissen, ohne das Testsystem zu verändern. So konnte eine Akkumulation von GGPP nach Inkubation mit Saragossasäure beobachtet werden. Diese steht im Einklang mit der Literatur^{57,85} und kann durch eine verstärkte Umverteilung von FPP zur Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase nach Hemmung der Squalensynthese erklärt werden. Theoretisch könnte das Testsystem auch eine Inhibition der Geranylgeranylpyrophosphat-Transferase detektieren; dieser Aspekt wurde aber nicht weiter überprüft.

Im nächsten Schritt wurde eine Derivatisierung mit Pentafluorbenzoylchlorid und Pyridin eingeführt, um die Retentionszeit der C₅-Isoprenoide Isopentenylpyrophosphat (IPP, bestimmt als Isoprenolpentafluorbenzoat) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, bestimmt als Prenolpentafluorbenzoat) zu verlängern, damit diese Analyten nicht länger mit dem Lösungsmittelpeak coeluierten und somit bestimmt werden konnten. Auf diese Weise konnte anschließend in Zell-Versuchen gezeigt werden, dass YM175 sowohl IPP als auch DMAPP akkumulieren lässt und somit in HL-60 Zellen vorrangig die Farnesylpyrophosphat-Synthase hemmt; in enzymatischen *in vitro*-Tests war für YM175 bislang lediglich eine Hemmung der Squalensynthese gezeigt worden⁸³.

Eine Hemmung der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase kann mit dem Testsystem nun ebenfalls erstmals sichtbar gemacht werden, da in diesem Fall nur Isopentenylpyrophosphat akkumuliert, während bei einer Hemmung der Farnesylpyrophosphat-Synthase sowohl IPP als auch DMAPP akkumulieren. Dieses Phänomen konnte nach Inkubation der HL-60 Zellen mit Zoledronsäure und auch mit 6-Fluormevalonat beobachtet werden (siehe Abbildung 5.3).

Zusammenfassung

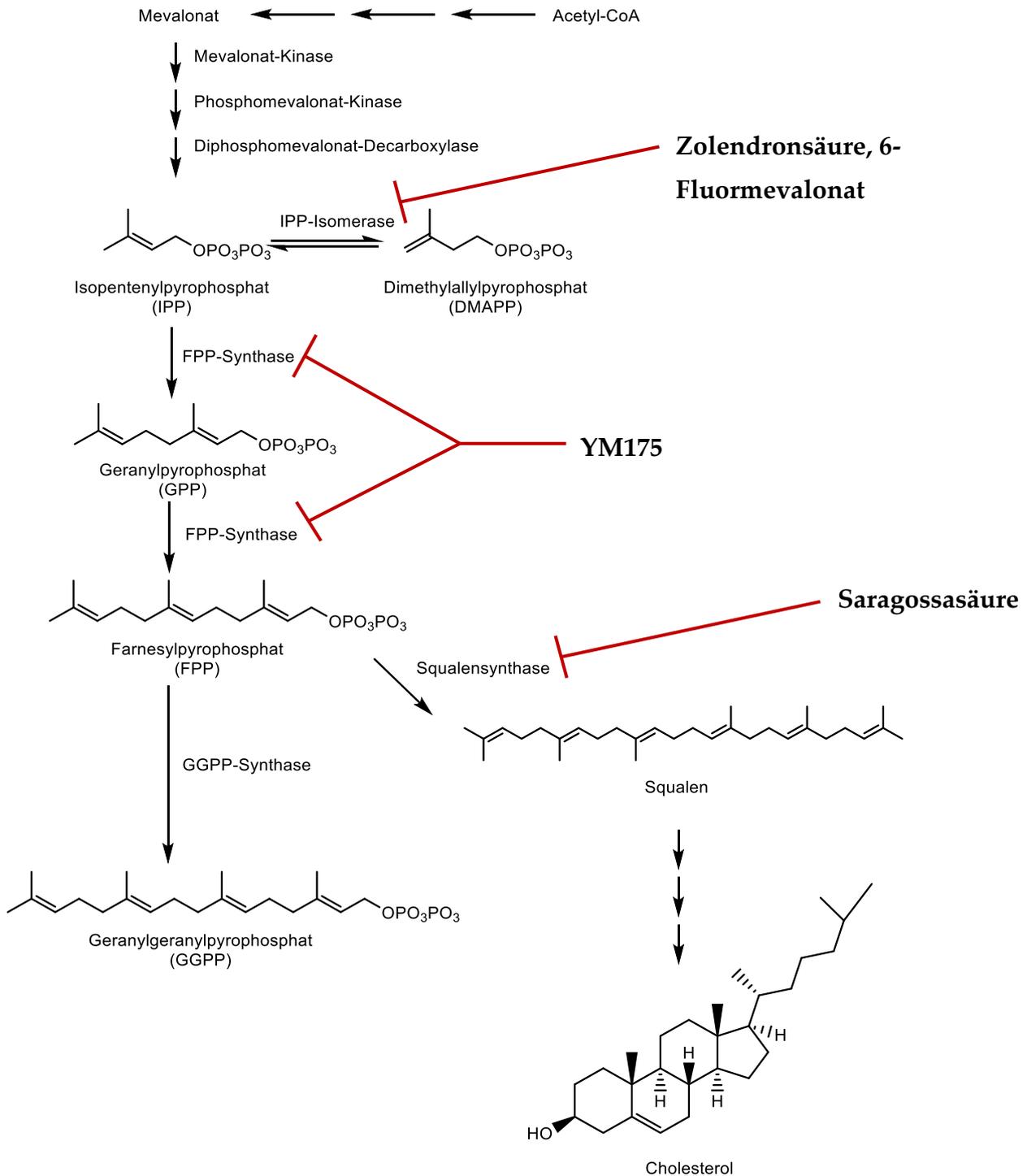


Abbildung 5.3 Ausschnitt aus dem Prä-squalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese.

Eine Hemmung von drei Enzymen „upstream“ der IPP-Isomerase, nämlich der Mevalonatkinase, der Phosphomevalonatkinase bzw. der Diphosphomevalonat-Decarboxylase hätte prinzipiell durch eine Akkumulation von Mevalonat (vorliegende Metabolite vor der Hydrolyse mittels Phosphatase: Mevalonat, Mevalonatphosphat bzw.

Mevalonatpyrophosphat) sichtbar gemacht werden können. Doch die Erweiterung des Testsystems um den Analyten Mevalonat gelang leider nicht. Um Mevalonat in die organische Phase auszuschütteln und einer gaschromatischen Messung zugänglich zu machen, war die Umwandlung von Mevalonat in seine nichtionische Laktatform Mevalonolacton erforderlich. Nach langwierigen Optimierungsexperimenten (Variation von pH-Wert, Reaktionszeit, Extraktionsmittel) konnte zwar eine Methode entwickelt werden, um Mevalonat (bzw. seine Phosphatester) in Form von Mevalonolacton aus Zellen zu extrahieren und mit der GC-MS zu analysieren. Doch war es nicht möglich die Ausbeute von ca. 25 % weiter zu steigern. Der Grund dafür war vermutlich die hohe Hydrophilie von Mevalonat, sodass in der Flüssig-Flüssig-Extraktion keine zufriedenstellenden Ausbeuten erreicht werden konnten. In Zell-Versuchen mit 6-Fluormevalonat (Inhibitor der Mevalonatkinase) konnte keine Akkumulation messbarer Mengen von Mevalonat beobachtet werden. Letztendlich wurde daher entschieden, Mevalonat nicht in das Testsystem aufzunehmen. Damit war die Entwicklung des Testsystems abgeschlossen (Abbildung 5.4).

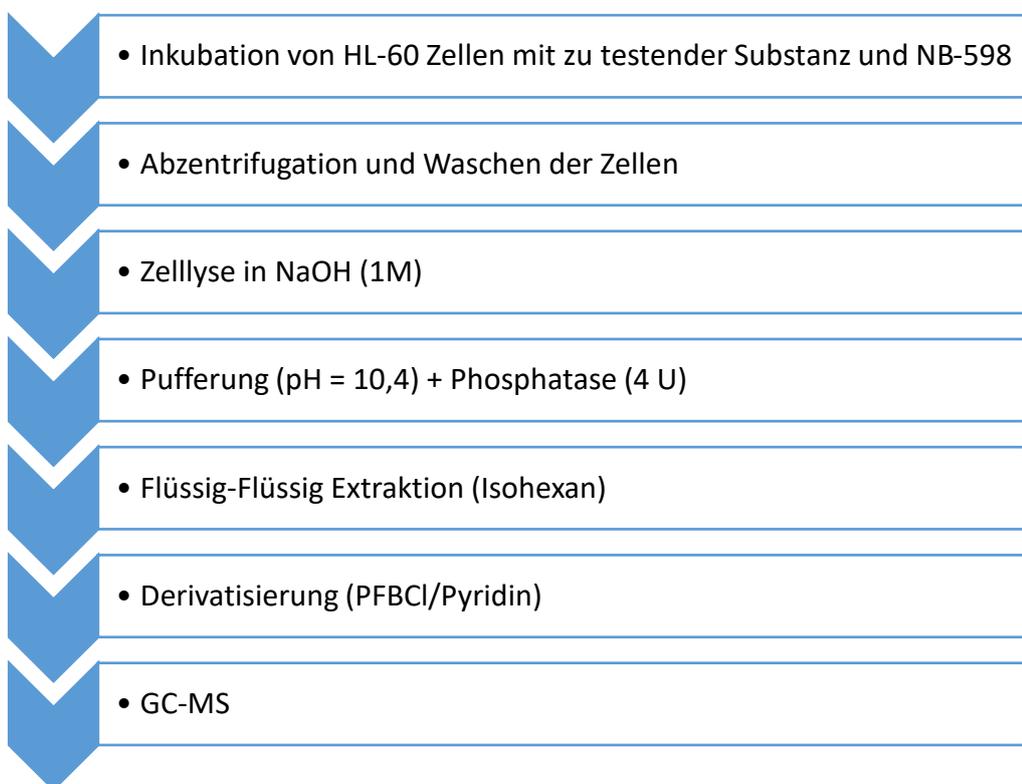


Abbildung 5.4 Schematischer Überblick über das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem.

Das fertige zelluläre Testsystem mit anschließender GC-MS-Analytik ist in der Lage Farnesylpyrophosphat (FPP), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zu messen und somit Inhibition der Enzyme Squalensynthase, Farnesylpyrophosphat-Synthase und Isopentenylpyrophosphat-Isomerase zu detektieren.

Bevor Messungen mit potentiellen Inhibitoren starteten, wurde die Methode basierend auf den Richtlinien zur „Validierung von bioanalytischen Methoden“ der EMA validiert. Dabei zeigte die Methode eine gute Linearität über einen weiten Konzentrationsbereich (je nach Analyt: 1 bis 1000 ng/mL). Die Präzision, berechnet als relative Standardabweichung (n = 6), entsprach bei jedem Analyten den Kriterien der Richtlinie. Als Maß für die Richtigkeit wurden zuerst Proben bekannter Konzentration mittels Kalibriergerade quantifiziert und nur geringe Abweichungen zu der nominalen Konzentration festgestellt (<10 %). Weiterhin wurde die Wiederfindung über den gesamten Extraktionsprozess untersucht. Die durchschnittlichen Wiederfindungen über den gesamten Konzentrationsbereich der einzelnen Analyte reichten von 81 % bis 103 %.

Nach Abschluss der Validierung wurden bekannte Substanzen, für welche von anderen Autoren in enzymatischen Assays eine Hemmung der Squalensynthase nachgewiesen war, mit dem fertigen Testsystem untersucht und anschließend Substanzen aus dem Arbeitskreis getestet.

Inkubation mit Chlorogensäure führte zur keiner Akkumulation von FPP, GGPP, IPP oder DMAPP. Zwar sank der Squalengehalt mit steigender Chlorogensäure-Konzentration ab, doch kann dieser Effekt auch durch die wachstumshemmende Wirkung von Chlorogensäure auf die HL-60 Zellen erklärt werden. Daher konnte die Choi et al. publizierte Hemmung der Squalensynthase⁷⁸ (bestimmt in einem enzymatischen Assay) in dem hier beschriebenen zellulären Assay nicht bestätigt werden. „Carbazol 11“ zeigte ähnliches Verhalten wie die Chlorogensäure: Die Menge an akkumuliertem Squalen sank ab, gleichzeitig aber auch die Proteinmenge, was eher für eine Hemmung des Zellwachstums, als für eine Hemmung der SQS spricht. Weiterhin ließ sich keine Akkumulationen von FPP, GGPP, IPP oder DMAPP beobachten. Da ein Absinken der Proteinmenge für eine Verschlechterung des Zellwachstums spricht, was ebenfalls eine verringerte Squalen-Akkumulation verursachen kann, konnte die Ishihara et al. für „Carbazol 11“ beschriebene Hemmung der SQS⁸² nicht bestätigt werden.

Unter Inkubation mit YM175 (125 μM) akkumulierten dagegen IPP und DMAPP. Dies spricht dafür, dass YM175 in Zellen die Farnesylpyrophosphat-Synthase hemmt, obwohl für den Inhibitor bereits eine SQS-Hemmung am isolierten Enzym gezeigt werden konnte⁸³. Gegen die Erwartung sank bei höheren Inhibitorkonzentrationen allerdings die Menge der beiden C₅-Isoprenoide wieder ab. Der Grund für dieses widersprüchliche Verhalten bei steigenden Inhibitor-Konzentrationen ist vermutlich, dass YM175 in höheren Konzentrationen als 125 μM anfängt ein weiteres Enzym „upstream“ der Farnesylpyrophosphat-Synthase zu hemmen.

Nach Inkubation der HL-60 Zellen mit 6-Fluormevalonat konnte ein Anstieg von IPP beobachtet werden, aber kein Anstieg von DMAPP. Daraus kann geschlossen werden, dass 6-Fluormevalonat die IPP-Isomerase hemmt. Diese Erkenntnis ist neu, da bisher in der Literatur nur eine nicht näher differenzierte Akkumulation von C₅-Isoprenoiden beschrieben wurde (zusätzlich zur Akkumulation von Mevalonatpyrophosphat, welche in dem hier beschriebenen Testsystem nicht messbar ist)⁸⁵. Bisherige zelluläre Multienzym-Assays basieren vor allem auf LC-MS und sind daher nicht in der Lage, IPP und DMAPP chromatographisch aufzutrennen. Das in dieser Arbeit beschriebene Testsystem ist der erste zelluläre Multienzym-Assay, welcher in der Lage ist IPP und DMAPP getrennt zu analysieren und damit eine Hemmung der IPP-Isomerase von einer Hemmung der FPP-Synthase zu unterscheiden.

Abbildung 5.5 bietet einen Überblick über sämtliche Inhibitoren, welche in dem hier beschriebenen Testsystem Aktivität (im Sinne einer Akkumulation eines oder mehrerer Isoprenoide) gezeigt haben. Für die Chlorogensäure und „Carbazol 11“ konnte die publizierte Aktivität an der Squalensynthase nicht bestätigt werden. Zu YM175 war bislang nur bekannt, dass die Substanz in enzymatischen Assays sowohl die Farnesylpyrophosphat-Synthase, als auch die Squalensynthase hemmt. Die Ergebnisse in dem hier beschriebenen zellulären Testsystem zeigen zum ersten Mal, dass in Konzentrationen von ca. 100-500 μM die Hemmwirkung an der FPPS dominiert und anschließend ein weiteres, bislang nicht identifiziertes Enzym „upstream“ der FPPS zur Hemmung maßgeblich beiträgt. Bei Versuchen mit 6-Fluormevalonat konnte zum ersten Mal eine Hemmung der IPP-Isomerase gezeigt werden.

Inhibitor	Akkumulation	Gehemmtes Enzym
Saragossasäure	Farnesylpyrophosphat	Squalensynthase
Zoledronsäure	Isopentenylpyrophosphat	IPP-Isomerase
YM175	Isopentenylpyrophosphat + Dimethylallylpyrophosphat	FPP-Synthase
6-Fluormevalonat	Isopentenylpyrophosphat	IPP-Isomerase

Abbildung 5.5 Übersicht über die Inhibitoren, welche in dem Testsystem zur Akkumulation von Isoprenoiden des Präsqalenabschnitts der Cholesterolsynthese führten. IPP = Isopentenylpyrophosphat, FPP = Farnesylpyrophosphat.

Im nächsten Schritt wurden 8 Inhibitoren (inkl. AW93 und AW138), welche von Dr. Annette Wolfgardt und Dr. Marco Keller synthetisiert wurden, im Testsystem untersucht. Bei keinem Inhibitor konnte eine Akkumulation eines Isoprenoids festgestellt werden. Am vielversprechendsten waren AW98 und AW152, welche beide bei einer Testkonzentration von 1 μM den Gehalt von akkumulierten Squalen auf ca. die Hälfte reduzieren konnten, ohne das Zellwachstum signifikant zu hemmen. Daraus lässt sich ableiten, dass AW98 und AW152 wahrscheinlich ein nicht identifiziertes Enzym „upstream“ der IPP-Isomerase hemmen. In höheren Konzentrationen wurde sowohl bei AW93 als auch bei den anderen Substanzen die Abnahme an akkumulierten Squalen durch eine starke Wachstumshemmung überschattet. Dies gilt auch für AW93 und AW138, die der Anstoß für die Entwicklung dieses Assays zur Identifizierung von Inhibitoren des Präsqalen-Abschnitts der Cholesterolsynthese waren. Ohne vitale Zellen funktioniert das Testsystem nicht und eine Abnahme an akkumuliertem Squalen kann nicht zweifelsfrei mit einer Hemmung eines Enzyms im Präsqalen-Abschnitt korreliert werden.

Zum Abschluss der Testungen wurden weitere Substanzen von Prof. Franz Bracher, Dr. Johann Speckbacher und Dr. Harald Benend getestet. Bei keiner der 11 Substanzen konnte eine Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat, Dimethylallylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat gemessen werden. Da auch

kein Einfluss auf den Squalengehalt festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass keine der getesteten Substanzen einen Effekt auf den Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese haben.

Das neu entwickelte Testsystem ist der erste zelluläre Multienzym-Assay im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterolsynthese, welches in der Lage ist Hemmungen der Squalensynthase, der Farnesylpyrophosphat-Synthase und der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase parallel zu analysieren. Ein weiterer großer Vorteil dieses Assays ist die Vereinbarkeit mit dem bereits etablierten Postsqualen-Assay. Zusätzlich konnten mithilfe dieses Assays neue Aktivitäten einiger bekannter Inhibitoren entdeckt werden, welche mit bisherigen Testsystemen unerkant geblieben sind.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Parameter

GC-MS

Für die Methodenentwicklung wurde ein Varian 1200 Triple Quadrupole und ein Gaschromatograph Varian 3800 (Darmstadt, Deutschland) benutzt. Der dazugehörige Autosampler CombiPAL stammte von der Firma CTC Analytics (Zwingen, Schweiz). Die dazugehörige Software war Varian MS Workstation 6.9.

Für die Validierung und die biologische Testung wurde ein Triple Quadrupol 7010B von Agilent (Santa Clara, USA), gekoppelt an einen Gaschromatographen 7890B (ebenfalls Agilent), verwendet. Der dazugehörige Autosampler PAL RSI 85 stammte von der Firma CTC Analytics (Zwingen, Schweiz). Zur Steuerung der GC-MS wurde die Software Masshunter von Agilent verwendet.

Plate Reader

Zur Messung der Proteinmenge wurde der Plate Reader MRX II von Dynex Technologies (Chantilly, USA) benutzt.

Ausbeuten bei Synthesen

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die durch Filtration und Waschen oder säulenchromatographisch aufgereinigten Substanzen.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC Fertigfolien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm; Format 40 × 80 mm) der Fa. Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und DC Fertigfolien ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄ (Schichtdicke 0.15 mm; Format 5 × 10 cm) der Fa. Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 und 366 nm, sowie durch Eintauchen in geeignete Reagenzien.

Flash-Säulen-Chromatographie

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung der synthetisierten Verbindungen wurde Kieselgel 60, Korngröße 0.040 – 0.063 mm, der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die jeweils eingesetzten Fließmittelzusammensetzungen finden sich bei der Beschreibung der einzelnen Verbindungen. Bei den angegebenen Mischungsverhältnissen handelt es sich um Volumenanteile.

HRMS

Die hochauflösenden Massenspektren (HRMS) wurden durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei 70 eV Anregungsenergie an einem Jeol JMS-GCmate II (Fa. Jeol, Peabody, USA) oder Thermo Finnigan MAT 95 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) an einem Thermo Finnigan LTQ FT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden mit einem Avance III HD 400 MHz Bruker Biospin (Fa. Bruker, Billerica, USA) und Avance III HD 500 MHz Bruker Biospin (Fa. Bruker, Billerica, USA) aufgenommen. Die in parts per million [ppm] angegebenen chemischen Verschiebungen δ beziehen sich auf den Peak des jeweils verwendeten Lösungsmittels als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden an einer Büchi Schmelzpunktapparatur B-540 (Fa. Büchi, Flawill, Schweiz) bestimmt und sind unkorrigiert in Grad Celsius [°C] angegeben.

6.2 Arbeitsvorschriften

Puffer

PBS-Puffer:

Es werden 20,0 g Natriumchlorid, 0,50 g Kaliumchlorid, 3,55 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,68 g Natriumdihydrogenphosphat eingewogen und in 2,5 L destilliertem Wasser gelöst.

Reaktionspuffer (1,0 M, pH = 10,4):

Es werden 126,3 mg Zinkchlorid, 203,3 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat und 7,507 g Glycin in einen 100 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 50 mL Wasser versetzt. Nachdem sich die Substanzen gelöst haben, wird der pH-Wert der Lösung mit Natronlauge (2 M) auf 10,4 eingestellt (dazu notwendiges Volumen (NaOH) = ca. 38,6 mL). Anschließend wird die Pufferlösung in einen Messkolben überführt und auf 100,0 mL aufgefüllt.

Enzympuffer (30 mM, pH = 7,6):

Für den Puffer, in welchem die Phosphatase dispergiert wird, werden 0,45 g Triethanolamin, 17,5 g Natriumchlorid, 0,10 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat und 2,73 g Zinkchlorid eingewogen und in 80 mL Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 M Salzsäure auf 7,6 eingestellt und das Volumen auf 100 mL aufgefüllt.

Phosphatase-Lösung (400 U/mL):

40 mg der Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Rinderschleimhaut, CAS: 9001-78-9, ≥ 10 DEA units/mg Pulver, Sigma Aldrich Artikel-Nr.: P7640) werden in 1 mL Enzympuffer (30 mM, pH = 7,6) gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank bei 2 - 8°C gelagert und behält ihre Aktivität für mindestens 3 Monate.

Bradford-Assay

Zur Vorbereitung werden die Bovines Serum Albumin (BSA) Standards in den Konzentrationen 40, 60, 80, 100, 120 und 140 $\mu\text{g/mL}$ zum Auftauen aus dem Gefrierschrank genommen. Zusätzlich wird das Farbreagenz durch Verdünnung des Bradford-Konzentrats „Roti Quant“ der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) mit Wasser hergestellt (1 Teil Konzentrat auf 2,25 Teile Wasser, z. B. 6 mL Konzentrat mit 16,5 mL Wasser – reicht für eine Platte). Anschließend wird der Blank (Wasser) und die BSA-Standards in Triplikaten von 50 μL in die entsprechenden Wells auf der 96 Well Platte pipettiert. Aus dem nach der Zelllyse erhaltenen neutralisierten Zellextrakt werden je Probe drei 25 μL Aliquote entnommen und in die entsprechenden Wells einer 96 Well Platte pipettiert (siehe Pipettierschema aus Abbildung 6.1). Die Positionen der Standards und der Proben sollten stets eingehalten werden, damit später die Auswertung der Daten im Plate Reader automatisch erfolgt. Nachdem zu jedem 25 μL Aliquot der Proben 25 μL Wasser pipettiert wurden, werden jedem Well jeweils 200 μL Farbreagenz zugegeben. Es wird fünf Minuten gewartet bevor die UV-metrische Bestimmung am Plate Reader erfolgt (Methode: „Bradford Assay“). Dabei wird die UV-Absorption bei 595 nm gemessen und automatisch die Konzentration der Proben in $\mu\text{g/mL}$ mittels Kalibriergerade aus Standardverdünnungen (40-140 $\mu\text{g/mL}$) berechnet.

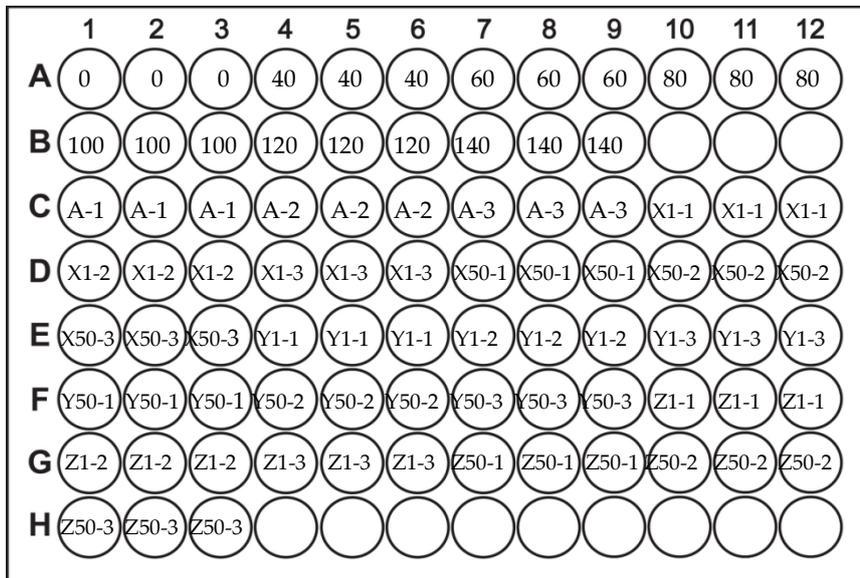


Abbildung 6.1 Pipettierschema der 96 Well Platte zum Bradford-Assay. 0-140: Blank bzw. BSA-Standardkonzentrationen (40-140 $\mu\text{g/mL}$), A: negativ-Kontrolle, X1/X50: Inhibitor X in den Konzentrationen 1 μM /50 μM , Y1/Y50 bzw. Z1/Z50 entsprechend.

Inkubation der Zellen

980 μL einer Suspension von HL-60 Zellen in von Cholesterol befreitem Kulturmedium (RPMI-1640 Medium + 10% FKS) werden in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro Well auf die Wells einer 24-Well Platte verteilt. Die ersten drei Wells dienen der Negativ-Kontrolle: + 10 μL Ethanol + 10 μL NB-598 (3,0 μM), A1-A3). Zu den restlichen Wells werden in Triplets mit 10 μL einer Lösung der zu testenden Verbindung (5,0 μM bzw. 0,1 μM) und ebenfalls 10 μL der NB-598 Lösung (3,0 μM) pipettiert (A4-D3). Die resultierenden Konzentrationen der Verbindungen in dem Medium sind 50 μM bzw. 1 μM und 30 nM für NB-598. Ein Beispiel für ein Pipettierschema zeigt Abbildung 6.2. Die Zellen werden 24 h in einen Brutschrank inkubiert.

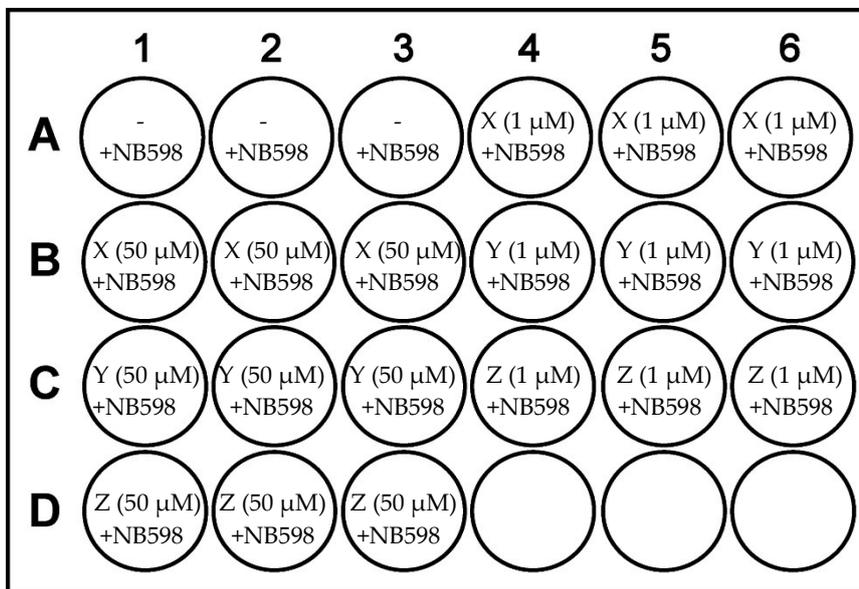


Abbildung 6.2 Pipettierschema für die Inkubation von HL-60 Zellen mit unbekannter Inhibitoren. A1-A3: Negativ-Referenz, A4-D3: Inhibitoren X, Y und Z in den Konzentrationen 1 μM und 50 μM

Ursprüngliche Aufarbeitung (Postsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese)

Die Zellsuspensionen (ca. 1 mL) werden in 2,0 mL Eppendorf Tubes pipettiert. Um eine möglichst vollständige Überführung der Zellen zu gewährleisten, werden die leeren Wells mit 750 μL PBS-Puffer gespült und dieser Puffer zu der Zellsuspension in den Eppendorf Tubes gegeben. Nach Zentrifugation bei 10000 g wird der Überstand verworfen und 1 mL

PBS-Puffer auf die Zellpellets gegeben. Es wird nochmal zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Auf das nun von Medium befreite, farblose Zellpellet wird 1 mL NaOH (1 M) gegeben und die Suspension in einem Trockenschrank für 60 min auf 70 °C erhitzt. Nach Ablauf der Zeit sind die Zellen vollständig lysiert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden pro Tube dreimal 25 µL für den Bradford-Assay abgeführt.

Anschließend werden 100 µL einer Cholestan-Lösung (Interner Standard, 10 µg/mL) und 650 µL Methyl-*tert*-butylether (MTBE) zu dem Zelllysat gegeben. Die Eppendorf Tubes werden 5 min von Hand geschüttelt und anschließend 5 min bei 5000 g zentrifugiert, um die Phasen vollkommen zu trennen. Von der oberen, organischen Phase werden 550 µL abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Es werden weitere 750 µL MTBE zu der wässrigen Lösung gegeben und wieder für 5 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 10000 g). Dieses Mal werden 650 µL der oberen, organischen Phase in dasselbe Eppendorf-Gefäß transferiert. Die gesammelten organischen Phasen werden mit 50 mg dSPE-Mischung (dispersive Solid Phase Extraction; 4:1, Magnesiumsulfat: PSA, Sigma Aldrich) versetzt und anschließend für 5 min geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 10000 g). Der Überstand wird abgenommen und in ein GC-Vial überführt. Dort wird das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand wieder in 950 µL MTBE gelöst. Nachdem in jedes Vial 50 µL einer Silylierungsmischung (MSTFA: TSIM, 10: 1) gegeben wurde, sind die Proben bereit mittels GC-MS gemessen zu werden.

Endgültige Aufarbeitung (Präsqualen-Abschnitt der Cholesterolsynthese)

Die Zellsuspensionen (ca. 1 mL) werden in 2,0 mL Eppendorf Tubes pipettiert. Um eine möglichst vollständige Überführung der Zellen zu gewährleisten, werden die leeren Wells mit 750 µL PBS-Puffer gespült und dieser Puffer zu der Zellsuspension in den Eppendorf Tubes gegeben. Nach Zentrifugation bei 10000 g wird der Überstand verworfen und 1 mL PBS-Puffer auf die Zellpellets gegeben. Es wird nochmal zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Auf das nun von Medium befreite, farblose Zellpellet wird 300 µL NaOH (1 M) gegeben und die Suspension in einen Trockenschrank für 60 min auf 70°C erhitzt. Nach Ablauf der Zeit sind die Zellen vollständig lysiert und werden zuerst ein

wenig abgekühlt. Anschließend wird das alkalische Zelllysate mit 300 µL HCl (1 M) versetzt. Aus dieser Mischung werden pro Tube dreimal 25 µL für den Bradford-Assay abgeführt und anschließend 60 µL des Reaktionspuffer (1,0 M, pH = 10,4) und 10 µL der Phosphatase-Lösung (Zusammensetzung weiter oben beschrieben, entspricht 4 Units) zugegeben. Die Inkubation erfolgt im Trockenschrank für 60 min bei 37°C.

Nach erfolgter Inkubation mit der Phosphatase werden 590 µL Isohexan und 10 µL einer Cholestan-Lösung (0,1 mg/mL) als Interner Standard zu der wässrigen Lösung aus dem Zelllysate gegeben. Die Eppendorf Tubes werden 5 min geschüttelt und anschließend 5 min bei 5000 g zentrifugiert, um die Phasen vollkommen zu trennen. Von der oberen, organischen Phase werden 450 µL abgenommen und in ein GC Probenvial transferiert. Es werden weitere 600 µL Isohexan zu der wässrigen Lösung in den Eppendorf Tubes gegeben und wieder für 5 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 10000 g). Dieses Mal werden 550 µL der oberen, organischen Phase in dasselbe GC-Probenvial transferiert. Zur vollständigen Derivatisierung werden in jedem GC-Probenvial 10 µL Pentafluorbenzoylchlorid und 10 µL Pyridin pipettiert. Nach 60 min hat sich das Nebenprodukt Pyridiniumchlorid am Vial-Boden abgesetzt und der Inhalt jedes Vials wird in ein frisches Vial gekippt, sodass der feste Rückstand zurückbleibt. Die Proben sind nun bereit mittels GC-MS gemessen zu werden.

GC-MS Methode

2 µL der Probe wird „splitless“ bei 270 °C injiziert. Die Probe wird auf einer „DB-5ms“ Säule (30 m, 0,25 µm, Agilent) unter Nutzung des folgenden Temperaturprogramms getrennt: 2 Minuten lang bei 75 °C, dann Anstieg auf 150 °C bei 25 °C/min, Anstieg auf 250 °C bei 10 °C/min und Anstieg auf 310 °C bei 20 °C/min und wird dort 1 min gehalten. Die Detektion erfolgt im Massendetektor per Single-Ion-Monitoring (SIM) Modus 4,5 min nach Proben-Injektion, in welcher das Lösungsmittel und andere flüchtige Matrixbestandteile eluieren. Ionen werden per Elektronenstoß-Ionisation (EI) generiert bei einer Filamentspannung von 70 Volt. Einen Überblick über die gemessenen Ionenmassen und den Retentionszeiten der Analyte zeigt Tabelle 6.1.

Zeitabschnitt (min)	Masse (m/z)	Analyt	Retentionszeit (min)
4,50-12,00	68	Isoprenol	4,88
	68	Prenol	5,10
12,00-16,00	93	Farnesol	13,13
	93	Geranylgeraniol	14,73
16,00-16,45	81	Squalen	16,31
16,45-17,00	217	Cholestan (IS)	16,59

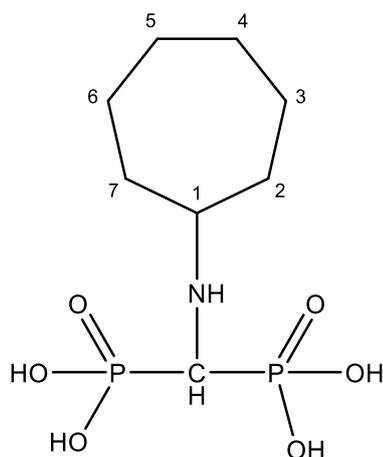
Tabelle 6.1 Tabellarische Übersicht der gemessenen (m/z) und der korrespondierenden Analyten.

Auswertung:

Alle Analyt-Peaks (Peaks an den angegebenen Retentionszeiten, siehe Tabelle 6.1) werden integriert. Anschließend wird die Fläche des Analyten durch die Fläche des Internen Standards und der im Bradford-Assay bestimmten Proteinmenge geteilt.

6.3 Synthesen

(Cycloheptylamino)-methylenbisphosphonat („YM175“)



$C_8H_{19}NO_6P_2$

$M_r = 287,08 \text{ g/mol}$

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Widler et al. aus dem Jahr 2002⁸⁴. 3,01 g (26,6 mmol) Cycloheptylamin, 6,26 g (42,2 mmol) Orthoameisensäuretriethylester und 19,5 g (141 mmol) Diethylphosphit wurden für 1,5 h auf 150°C erhitzt und das dabei entstandene Ethanol über eine Claisen-Brücke abgeführt. Die abgekühlte Mischung wurde im Rotationsverdampfer eingengt und das dabei erhaltene gelbe Öl für 2,5 h in 80 mL konzentrierter Salzsäure zum Rückfluss erhitzt. Nach Einengen der Lösung im Rotationsdampfer entstand ein gelb-oranges Öl. Dieses Öl wurde in 240 mL Methoanol/Aceton (80 : 20) aufgenommen und 20 Stunden bei 3°C stengelassen. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und 3-mal mit Aceton gewaschen. Die Aufreinigung erfolgte mittels Rekrystallisation aus einer Methanol-Wasser Mischung (50 : 50).

Ausbeute: 4,17 g (42 %)

farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 152-153°C

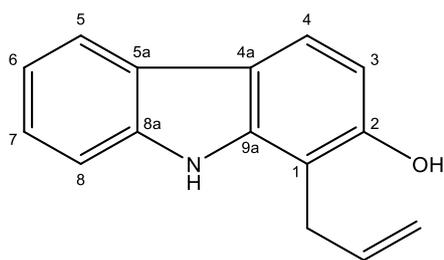
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1.21-2.11 (m, 12 H, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-H), 3.51 (t, $J_{\text{H-P}} = 18.2 \text{ Hz}$, 1 H, P-CH-P), 3.65-3.56 (m, 1 H, 1-H).

Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ (ppm) = 23.4 (C-4, C-5), 26.9 (C-3, -6), 30.4 (C-2, C-7), 52.6 (t, $J_{\text{C-P}} = 123.8$ Hz, P-CH-P), 62.1 (C-1).

^{31}P -NMR (125 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.13 (d, $J = 18.3$ Hz, P-CH-P).

HRMS (ESI): $m/z = 288,07602$ [$\text{M}+\text{H}^+$] (berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{P}_2^+$: 288,07604).

1-Allyl-2-hydroxy-9H-carbazol $C_{15}H_{13}NO$ $M_r = 223,28 \text{ g/mol}$

Die Synthese erfolgte nach Ishihara et al. aus dem Jahr 2004⁸². 1,03 g (5,59 mmol) 2-Hydroxy-9H-carbazol wurde mit 0,84 g (6,9 mmol) Allylbromid in 5 mL DMF gelöst und die Mischung auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden 1,20 g Kaliumcarbonat (8,68 mmol) portionsweise zugegeben. Das Gemisch wurde 2 h bei 0°C und dann noch 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Suspension in 60 mL Wasser geschüttelt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Durch Umkristallisation aus n-Hexan/Chloroform (85 : 15) wurde 2-Allyloxy-9H-carbazol als grauer Feststoff erhalten.

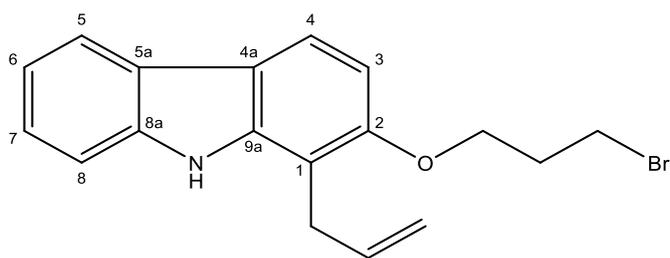
Dieser Feststoff wurde ohne Lösungsmittel für 3 h auf 200°C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt der Umlagerung zuerst per Säulenchromatographie aufgereinigt (n-Hexan/Ethylacetat = 80 : 20) und dann aus n-Hexan/Chloroform (80 : 20) umkristallisiert.

Ausbeute: 0,47 g (37 %)

brauner Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.59 (d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 2 H, CH₂), 4.95 (dd, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 10.0 Hz, 1 H, CH=CHH'), 5.08 (dd, $J = 2.2$, 17.1 Hz, 1 H, CH=CHH'), 5.96-6.05 (m, 1 H, CH=CH₂), 6.72 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 7.04-7.08 (m, 1 H, 6-H), 7.22-7.26 (m, 1 H, 7-H), 7.40 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 7.72 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H), 7.90 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 1 H, 5-H), 9.26 (s, 1 H, O-H), 10.82 (s, 1 H, 9-H)

1-Allyl-2(3-bromopropoxy)-9H-carbazol



$C_{18}H_{18}BrNO$

$M_r = 345,25 \text{ g/mol}$

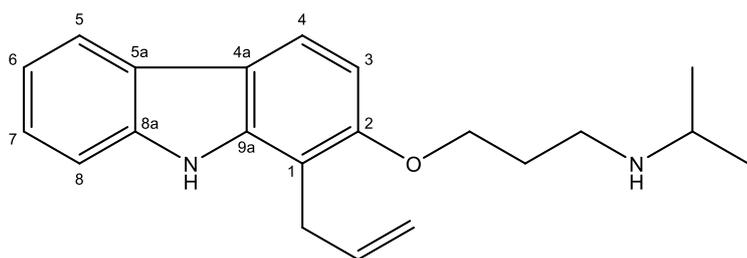
Die Synthese erfolgte nach Ishihara et al. aus dem Jahr 2004⁸². 0,46 g 1-Allyl-2-hydroxy-9H-carbazol (2,1 mmol) wurden in 3 mL DMF gelöst und zusammen mit 1,26 g 1,3-Dibrompropan (6,24 mmol) und 0,43 g Kaliumcarbonat (3,1 mmol) 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde mit 10 mL Wasser versetzt und anschließend 3-mal mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 10 mL Wasser und 10 mL gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Produkt per Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat = 90 : 10) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,39 g (54 %)

grauer Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2.37-2.24 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.58 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3.62-3.70 (m, 2 H, 1-CH_2), 4.15 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2 H, O-CH_2), 5.02-5.15 (m, 2 H, CH=CH_2), 5.93-6.09 (m, 1H, CH=CH_2), 6.82 (dd, $J = 5.6, 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 7.10-7.15 (m, 1 H, 6-H), 7.23-7.29 (m, 1 H, 7-H), 7.32 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 7.80 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H), 7.90 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1 H, 5-H)

1-Allyl-2-[3-(isopropylamino)propoxy]-9H-carbazol („Carbazol 11“)



$C_{21}H_{26}N_2O$

$M_r = 322,45 \text{ g/mol}$

Die Synthese erfolgte nach Ishihara et al. aus dem Jahr 2004⁸². 0,38 g 1-Allyl-2-(3-brompropoxy)-9H-carbazol (1,1 mmol) wurde in 5 mL Isopropanol gelöst und nach Zugabe von 0,25 mL Isopropylamin (2,9 mmol) 15 h lang zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde im Rotationsverdampfer eingengt und mit 7,5 mL Chloroform verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit 10%iger Kaliumcarbonat-Lösung wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat = 5 : 95) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,09 g (25 %)

farbloser Feststoff

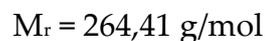
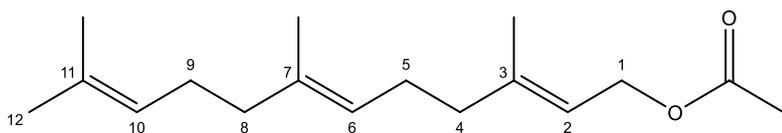
Schmelzpunkt: 270-271°C

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.25 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 6 H, 2 CH_3), 1.96-2.25 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.13 (t, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.30-3.40 (m, 1 H, NH-CH-CH_3), 3.66 (d, $J = 6,2 \text{ Hz}$, 2 H, 1- CH_2), 4.17 (t, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2 H, O- CH_2), 4.98 (dd, $J = 9.9, 2.0 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{CH=CHH}'$), 5.10 (dd, $J = 17.1, 1.7 \text{ Hz}$, 1 H, $\text{CH=CHH}'$), 5.96-6.09 (m, 1 H, CH=CH_2), 6.91 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 7.11 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 7.30 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 7.44 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H, 8-H), 7.93 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H), 8.00 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 1 H, 5-H), 11.0 (s, 1 H, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 19.1 (2 CH_3), 26.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 29.4 (1- CH_2), 42.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 50.1 (NH-CH-CH_3), 66.0 (O- CH_2), 105.4 (C-1), 109.7 (C-8), 111.1 (C-5a), 115.3 (CH=CH_2), 117.5 (C-4a), 118.96 (C-a), 119.01 (C-3), 119.9 (C-6), 123.4 (C-5), 124.9 (C-7), 136.7 (CH=CH_2), 140.4 (C-8a), 140.7 (C-9a), 154.8 (C-2).

HRMS (ESI): $m/z = 323,21160$ [$\text{M}+\text{H}^+$] (berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}^+$: 323,21179).

Farnesylacetat (2)



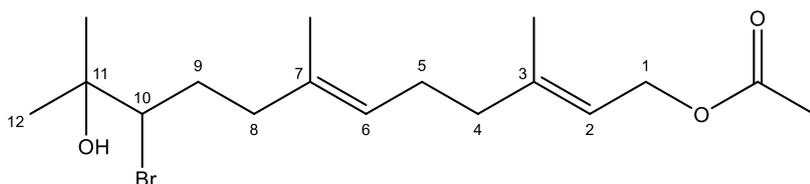
Die Synthese erfolgte nach Hanzlik aus dem Jahr 2003⁶⁵. 5,0 g Farnesol (22 mmol) wurden in 8 mL Pyridin gelöst und über 15 min insgesamt 8,0 mL Acetanhydrid (85 mmol) portionsweise zugegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 50 g Eis gegossen. Nach Zugabe von weiteren 80 mL Wasser wurde die Mischung 5-mal mit je 50 mL Isohexan extrahiert. Die vereinigten Isohexan-Phasen wurden 2-mal mit 50 mL 5%iger Schwefelsäure und 2-mal mit 50 mL Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und in Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat = 70 : 30) aufgereinigt.

Ausbeute: 4,56 g (72 %)

farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.60 (s, 6 H, 12-H, 11- CH_3), 1.65-1.73 (m, 6 H, 3- CH_3 , 7- CH_3), 1.95-2.14 (m, 11H, 4-H, 5-H, 8-H, 9-H, CO- CH_3), 4.59 (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2 H, 1-H), 5.03-5.16 (m, 2 H, 6-H, 10-H), 5.31-5.39 (m, 1 H, 2-H)

10-Brom-11-hydroxy-10,11-dihydrofarnesylacetat (3)



$C_{17}H_{29}BrO_3$

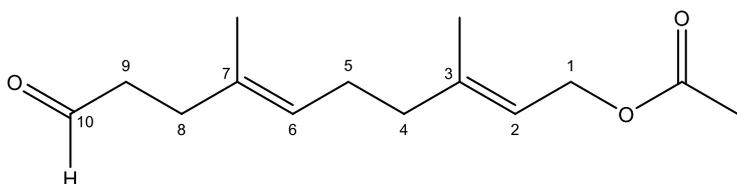
$M_r = 361,32 \text{ g/mol}$

Die Synthese erfolgte nach Hanzlik aus dem Jahr 2003⁶⁵. 4,56 g Farnesylacetat (17,2 mmol) wurde in einer Mischung aus 190 mL *tert*-Butanol und 80 mL Wasser gelöst und 3,19 g *N*-Bromsuccinimid (17,9 mmol) zugegeben. Nach einer Stunde wurde der Ansatz im Rotationsverdampfer auf ca. 200 mL eingengt und 3-mal mit je 80 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat = 60 : 40) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,69 g (46 %)

farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.32 (s, 6 H, 12-H, 11- CH_3), 1.58 (s, 3 H, 3- CH_3), 1.69 (s, 3 H, 7- CH_3), 2.00-2.16 (m, 11 H, 4-H, 5-H, 8-H, 9-H, CO- CH_3), 3.90-4.14 (m, $J = 11.4 \text{ Hz}$, 1 H, 10-H), 4.58 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2 H, 1-H), 5.10-5.23 (m, 1 H, 6-H), 5.28-5.40 (m, 1 H, 2-H)

3,7-Dimethyl-10-oxodeca-2,6-dien-1-ylacetat (6) $C_{14}H_{22}O_3$ $M_r = 238,33 \text{ g/mol}$

Die Epoxid-Synthese und die Acetylierung erfolgten nach Hanzlik aus dem Jahr 2003⁶⁵ und die Oxidation erfolgte nach Labadie et al. aus dem Jahr 2006⁶⁷.

2,69 g 10-Brom-11-hydroxy-10,11-dihydrofarnesylacetat (7,44 mmol) wurden in 100 mL Methanol gelöst und 3,09 g Kaliumcarbonat (22,4 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch im Rotationsverdampfer auf ca. 50 mL eingengt und nach Zusatz von 100 mL Wasser 4-mal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das entstandene rohe Epoxid (1,41 g Rückstand) erwies sich als instabil gegenüber Kieselgel und wurde daher ohne Aufreinigung weiterverwendet.

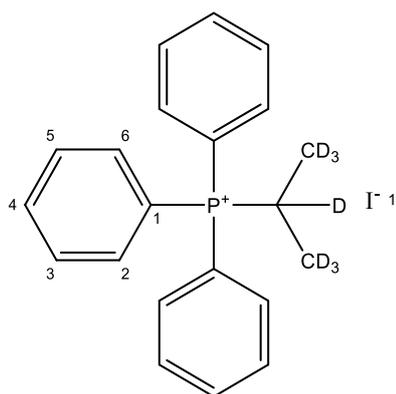
Da die Acetat-Schutzgruppe durch das basische Kaliumcarbonat entfernt wurde, musste die Acetat-Schutzgruppe erneut eingeführt werden. Dazu wurde der Rückstand in 8 mL Pyridin gelöst und 8,0 mL Acetanhydrid (85 mmol) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und dann auf 100 g Eis geschüttet. Anschließend wurde die wässrige Mischung 5-mal mit je 50 mL Ether extrahiert. Die vereinigten Ether-Phasen wurden 4-mal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und in Vakuum eingengt.

Der Rückstand (2,1 g) wurde in 60 mL einer THF/Wasser-Mischung (1 : 1) gelöst und 2,38 g Periodsäure (10,4 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz 3-mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 100 mL Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat/Triethylamin = 80 : 20 : 0,1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,67 g (35 %)

farbloses Öl

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.61-1.73 (m, 6 H, 3-CH₃, 7-CH₃), 2.03-2.17 (m, 7 H, 4-H, 5-H, CO-CH₃), 2.29-2.40 (m, 2 H, 9-H), 2.48-2.56 (m, 2 H, 8-H), 4.58 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H, 1-H), 5.10-5.21 (m, 1 H, 6-H), 5.31-5.40 (m, 1 H, 2-H), 9.74-9.81 (m, 1 H, 10-H)

Isopropyl-d₇-triphenylphosphoniumiodid (7) $C_{21}H_{16}D_6IP$ $M_r = 439,33 \text{ g/mol}$

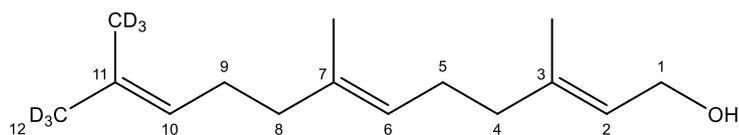
Die Synthese erfolgte nach Takami et al. aus dem Jahr 2013⁶⁸. 1,00 g 2-Iodpropan-d₇ (5,65 mmol) wurde in 10 mL Acetonitril gelöst und zusammen mit 1,55 g Triphenylphosphan (5,91 mmol) fünf Tage zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit 2-mal 20 mL Ether gewaschen.

Ausbeute: 1,65 g (67 %)

farblose Kristalle

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 25.1 (CD₃-CD-CD₃), 67.5 (CD₃-CD-CD₃), 117.5 (d, $J_{C-P} = 83.8 \text{ Hz}$, C-1), 130.2 (d, $^4J_{C-P} = 12.2 \text{ Hz}$, C-3, C-5), 133.6 (d, $^3J_{C-P} = 9.2 \text{ Hz}$, C-2, C-6), 134.82 (d, $^5J_{C-P} = 3.0 \text{ Hz}$, C-4)

Farnesol-11,11,11,12,12,12-d₆ (8)



C₁₅H₂₀D₆O

M_r = 228,41 g/mol

Die Wittig-Reaktion wurde analog zu einer Vorschrift von Comeskey⁶⁷ durchgeführt. 0,30 g Isopropyl-d₇-triphenylphosphoniumiodid (0,67 mmol) wurden in 5 mL wasserfreien THF gelöst und in einen mit Stickstoff gefluteten Rundkolben überführt. Die Mischung wurde auf 0°C abgekühlt und tropfenweise mit 2,0 mL *n*-Butyllithium-Lösung (1,6 M in Hexan) versetzt. Nach 30 min wurden 0,18 mg 3,7-Dimethyl-10-oxodeca-2,6-dien-1-ylacetat (0,76 mmol) – gelöst in 1,5 mL wasserfreies THF – dem Ansatz zugegeben. Nach weiteren 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL Methanol gestoppt und das Gemisch im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit 10 mL Wasser verdünnt und 4-mal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat = 80 : 20) aufgereinigt.

Ausbeute: 28,5 mg (18 %)

farbloses Öl

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.13-1.29 (m, 6 H, 3-CH₃, 7-CH₃), 1.51-1.64 (m, 8 H, 4-H, 5-H, 8-H, 9-H), 4.51 (d, *J* = 7.1 Hz, 2 H, 1-H), 5.00-5.06 (m, 2 H, 6-H, 10-H), 5.25 (m, 1 H, 2-H)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1 (11-CH₃), 16.0 (3-CH₃), 16.5 (7-CH₃), 21.1 (C-12), 26.1 (C-9), 26.2 (C-9), 26.6 (C-5), 26.7 (C-5), 39.5 (C-8), 39.7 (C-4), 39.8 (C-4), 59.4 (C-1), 118.2 (C-10), 123.6 (C-2), 124.2 (C-6), 124.4 (C-6), 131.2 (C-11), 131.4 (C-11), 135.5 (C-7), 135.6 (C-7), 142.3.8 (C-3), 142.3 (C-3)

HRMS (EI): *m/z* = 228,2361 (berechnet für C₁₅H₂₀D₆O: 228,2360).

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACP	saure Phosphatase
ALP	alkalische Phosphatase
BuLi	Butyllithium
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CoA	Coenzym A
d	Dublett
dd	Doppeldublett
dL	Deziliter
dSPE	dispersive Festphasenextraktion (<i>dispersive solid phase extraction</i>)
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EMA	European Medicines Agency
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
FKS	fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FPPS	Farnesylpyrophosphat-Synthase
FTase	Farnesyl-Transferase

Verzeichnisse

FTI	Farnesyl-Transferase-Inhibitoren
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GPP	Geranylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTase	Geranylgeranyl-Transferase
HDL	High-Density-Lipoprotein
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hz	Hertz
IC ₅₀ -Wert	inhibitorische Konzentration, bei der 50 % der maximalen Wirkung eintritt
IPP	Isopentenylpyrophosphat
J	Kopplungskonstante
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (<i>liquid-liquid extraction</i>)

Verzeichnisse

LLOQ	Unterste Quantifizierungsgrenze (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	Detektionslimit (<i>limit of detection</i>)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
m	Multipllett
M	Molar (= mol/L)
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/L)
MVA	Mevalonat
MVA-L	Mevalonolacton
MVAPP	Mevalonatpyrophosphat
NBS	N-Bromsuccinimid
nM	nanomolar (nmol/L)
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OSC	Oxidosqualencyclase
QuEChERS	<i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i> (Probenaufarbeitungs-Technik)

Verzeichnisse

PFBCl	Pentafluorbenzoylchlorid
PSA	Extraktionsmaterial, welches primäre und sekundäre Amingruppen enthält
RSD	relative Standardabweichung (<i>relative standard deviation</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
SIM	Single Ion Monitoring
Smp.	Schmelzpunkt
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (<i>signal/noise</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
SQS	Squalensynthese
t	Triplett
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TSIM	1-(Trimethylsilyl)imidazol
UV	Ultraviolett
WDF	Wiederfindung
z.B.	zum Beispiel

7.2 Zusätzlich bearbeitete Projekte

Neben dem Hauptthema, der Entwicklung eines Assays zur Identifizierung von Inhibitoren des Präsqualen-Abschnittes der Cholesterolsynthese, wurden eine Reihe kleinerer Nebenprojekte bearbeitet, welche teilweise auch zu Publikationen führten. Im Folgenden wird daher kurz auf die wichtigsten zusätzlich bearbeiteten Projekte eingegangen.

Bestimmung von Cumarin in Weihnachtsgebäck mittels QuEChERS und GC-MS

Während der Weihnachtszeit nehmen die Menschen häufig große Mengen an Zimt über das Weihnachtsgebäck zu sich. Je nach Zimtsorte enthält das Gewürz bis zu 7 g/kg Cumarin, welches in hohen Konzentrationen schädlich für die Leber ist. Daher hat die EFSA eine erlaubte, tägliche Maximaldosis festgesetzt (0,1 mg/kg Körpergewicht) und Begrenzungen des Cumaringehalts in verschiedenen Lebensmittel erlassen (Weihnachtsgebäck: 50 mg/kg). Auf Anfrage des Bayerischen Rundfunks wurde eine Reihe von Produkten aus dem Handel analysiert, um festzustellen, ob die gesetzlichen Grenzen eingehalten werden. Um valide Ergebnisse liefern zu können, wurde eigens eine Methode zur Bestimmung des Cumaringehalts in Weihnachtsgebäck entwickelt. Hierbei wurde eine Methode entwickelt Cumarin mittels QuEChERS-Probenaufarbeitung aus dem zerkleinerten Gebäck zu extrahieren und anschließend per GC-MS zu quantifizieren. Es wurden 14 Proben (Lebkuchen, Zimtsterne, Spekulatius) analysiert und bei 9 Proben Cumarin gefunden. Die bestimmten Konzentrationen reichten von 1,45 mg/kg bis zu 39,4 mg/kg und blieben somit allesamt innerhalb der erlaubten gesetzlichen Grenzen.

Eigenanteil: Entwicklung der Extraktionsmethode, der GC-MS Methode und Aufarbeitung der Proben.

Publikation: **F. Vetter**, C. Müller, M. Stöckelhuber, F. Bracher, Determination of coumarin in seasonal bakery products using QuEChERS and GC-MS, *Pharmazie* **2017**, 72 (6), 313-316.

Optimierung des Prozesses zum Auftragen einer Silikonschicht in Spritzen

Bei Fertigspritzen als Arzneimittel wird Silikonöl genutzt, um die Gleitfähigkeit des Kolbens in der Spritze zu verbessern. Das Silikonöl kann entweder aufgesprüht oder als Emulsion aufgetragen und „eingebacken“ werden (Silikonisierung). Das Ziel ist eine möglichst hohe Gleitfähigkeit des Kolbens in der Spritze zu erreichen, ohne dass Überreste des Silikonöls das Arzneimittel verunreinigen. Um herauszufinden, welchen Einfluss die unterschiedlichen Parameter der Silikonisierung auf die Zusammensetzung und Funktionalität des Silikonöls hat, wurde für Dr. Stefanie Funke aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. W. Frieß (Department für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, LMU München) eine Methode zur Quantifizierung von Siloxanen, den Hauptbestandteilen der Silikonemulsion, entwickelt. Die Methode quantifizierte sechs Analyte per GC-MS und umspannte einen Konzentrationsbereich von 0,1 – 1,5 µg/mL. Die so gewonnenen Daten waren ein Teil einer größeren Datenmenge, aus der eine Übersicht über die Einflüsse der verschiedenen Parameter erstellt wurde.

Eigenanteil: Entwicklung der GC-MS Methode, Vermessung und Auswertung der Proben.

Publikation: S. Funke, J. Matilainen, H. Nalenz, K. Bechtold-Peters, H.C. Mahler, **F. Vetter**, C. Müller, F. Bracher, W. Friess, Optimization of the bake-on siliconization of cartridges. Part II: Investigations into burn-in time and temperature, Eur. J. Pharm. Biopharm. **2016**, *105*, 209-222.

Bestimmung von Pestiziden in Insekten, Spinnen und Schnecken

Pestizide werden seit langem verwendet, um das Wachstum von pflanzlichen und tierischen Schädlingen zu kontrollieren. Die Folgen auf das Ökosystem sind dabei nicht einfach abzuschätzen, da Pestizide über Insekten, welche kontaminierte Pflanzenteile fressen, auch in andere Tiere gelangen können. In Kooperation mit Dr. N. Wagner vom Department für Biogeographie (Universität Trier) wurde untersucht, ob signifikante Mengen an Pestiziden in Insekten zu finden sind. Dazu wurde eine auf mikro-QuEChERS basierende Aufarbeitung entwickelt und die Extrakte mittels GC-MS analysiert. Anschließend wurden sieben in einem Weinberg nach Pestizidausbringung gesammelte Proben (Insekten, Spinnen und Schnecken) auf das Vorhandensein von neun Pestiziden

(Cyflufenamid, Difenoconazol, Dimethomorph, Fluopicolid, Fluopyram, Metrafenone, Myclobutanil, Quinoxyfen und Tebuconazol) untersucht. In zwei Proben konnte Fluopicolid in einer Konzentration unter dem Quantifizierungslimit, aber über dem Detektionslimit detektiert werden (0,15 – 1,00 mg/kg). In einer dritten Probe wurde ein Gehalt von 1,68 mg/kg Fluopicolid festgestellt.

Eigenanteil: Mitbetreuung der Masterarbeit von Markus Stöckelhuber.

Publikation: M. Stöckelhuber, C. Müller, **F. Vetter**, V. Mingo, S. Lötters, N. Wagner, F. Bracher, Determination of pesticides adsorbed on arthropods and gastropods by a micro-QuEChERS approach and GC–MS/MS, *Chromatographia* **2017**, *80*, 825-829.

Analytik von Cefaclor in Schokoladenkapseln

Bittere Arzneistoffe wie z.B. Cefaclor können zu Problemen bei der oralen Applikation, z.B. in Form von Säften bei Kleinkindern führen und damit den Erfolg der Pharmakotherapie gefährden. Dies gilt insbesondere dann, wenn der Arzneistoff über einen langen Zeitraum verabreicht werden muss. Daher wurden von dem Apotheker Dr. B. Pohl (München) Schokoladenkapseln entwickelt, welche den bitteren Geschmack des Antibiotikums Cefaclor maskieren. Um den Wirkstoffgehalt in den Schokoladenkapseln bestimmen zu können, wurde eine Methode entwickelt, um Cefaclor quantitativ aus Schokolade zu extrahieren und anschließend zu quantifizieren. Dazu wurden die zu untersuchenden Schokoladen-Proben in Salzsäure dispergiert und die sich abscheidenden Fette der Schokoladenmasse abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Cyclohexan extrahiert und mittels Ionenpaar-HPLC analysiert. Die untersuchten Cefaclor-Schokoladenkapseln zeigten einen gleichmäßigen und richtigen Gehalt an Cefaclor (80 – 120 %).

Eigenanteil: Entwicklung der Extraktionsmethode, der HPLC-Methode, Aufarbeitung und Vermessung der Proben.

Publikation: **F. Vetter**, J. Pohl, B. Pohl, F. Bracher, Analysis of cefaclor in novel chocolate-based camouflage capsules, *Pharmazie* **2014**, *69* (5), 455-457.

7.3 Literaturverzeichnis

1. Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 ed.; Springer-Verlag: 2014.
2. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*. 5 ed.; New York : W.H. Freeman: 2002.
3. Alberts B, B. D., Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, *Essential cell biology*. Garland Science: 2013.
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, L.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Molecular biology of the cell*. 4 ed.; New York: Garland Science: 2002.
5. Yeagle, P. L., Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1985**, 822 (3), 267-287.
6. Lipmann, F., ENZYMATIC SYNTHESIS OF ACETYL PHOSPHATE. *Journal of Biological Chemistry* **1944**, 155 (1), 55-70.
7. Baddiley, J.; Thain, E. M.; Novelli, G. D.; Lipmann, F., Structure of coenzyme A. *Nature* **1953**, 171 (4341), 76.
8. Lynen, F., Feodor Lynen - Nobel Lecture: The Pathway from "Activated Acetic Acid" to the Terpenes and Fatty Acids. Lecture, N., Ed. 1964.
9. Bloch, K., Konrad E. Bloch - Nobel Lecture: The Biological Synthesis of Cholesterol. Lecture, N., Ed. 1964.
10. Kovacs, W. J.; Tape, K. N.; Shackelford, J. E.; Duan, X.; Kasumov, T.; Kelleher, J. K.; Brunengraber, H.; Krisans, S. K., Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and Cell Biology* **2007**, 127 (3), 273-290.
11. Müller, C. Charakterisierung von Sterol-Biosynthese-Inhibitoren und Entwicklung von Methoden für die moderne Spurenanalytik. Ludwigs-Maximilians-Universität München, <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-168544>, 2013.

12. Expert Panel on, D.; Evaluation; and Treatment of High Blood Cholesterol in, A., Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii). *JAMA* **2001**, *285* (19), 2486-2497.

13. Law, M. R.; Wald, N. J.; Rudnicka, A. R., Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2003**, *326* (7404), 1423.

14. Trapani, L.; Segatto, M.; Ascenzi, P.; Pallottini, V., Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents. *IUBMB Life* **2011**, *63* (11), 964-971.

15. Amin, D.; Rutledge, R. Z.; Needle, S. N.; Galczenski, H. F.; Neuenschwander, K.; Scotese, A. C.; Maguire, M. P.; Bush, R. C.; Hele, D. J.; Bilder, G. E.; Perrone, M. H., RPR 107393, a Potent Squalene Synthase Inhibitor and Orally Effective Cholesterol-Lowering Agent: Comparison with Inhibitors of HMG-CoA Reductase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, *281* (2), 746-752.

16. Hiyoshi, H.; Yanagimachi, M.; Ito, M.; Ohtsuka, I.; Yoshida, I.; Saeki, T.; Tanaka, H., Effect of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in rhesus monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research* **2000**, *41* (7), 1136-1144.

17. Stein, E. A.; Bays, H.; O'Brien, D.; Pedicano, J.; Piper, E.; Spezzi, A., Development of a Squalene Synthase Inhibitor for the Treatment of Hypercholesterolemia. *Circulation* **2011**, *123* (18), 1974-1985.

18. Epstein, W. W.; Lever, D.; Leining, L. M.; Bruenger, E.; Rilling, H. C., Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88* (21), 9668-9670.

19. James, G. L.; Brown, M. S.; Cobb, M. H.; Goldstein, J. L., Benzodiazepine peptidomimetic BZA-5B interrupts the MAP kinase activation pathway in H-Ras-transformed Rat-1 cells, but not in untransformed cells. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (44), 27705-27714.

20. Bolick, S. C. E.; Landowski, T. H.; Boulware, D.; Oshiro, M. M.; Ohkanda, J.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M.; Dalton, W. S., The farnesyl transferase inhibitor, FTI-277, inhibits growth and induces apoptosis in drug-resistant myeloma tumor cells. *Leukemia* **2003**, *17* (2), 451-457.
21. Sharma, S.; Kemeny, N.; Kelsen, D. P.; Ison, D.; O'Reilly, E.; Zaknoen, S.; Baum, C.; Statkevich, P.; Hollywood, E.; Zhu, Y.; Saltz, L. B., A phase II trial of farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336, given by twice-daily oral administration, in patients with metastatic colorectal cancer refractory to 5-fluorouracil and irinotecan. *Annals of Oncology* **2002**, *13* (7), 1067-1071.
22. Cortes, J.; Faderl, S.; Estey, E.; Kurzrock, R.; Thomas, D.; Beran, M.; Garcia-Manero, G.; Ferrajoli, A.; Giles, F.; Koller, C.; O'Brien, S.; Wright, J.; Bai, S. A.; Kantarjian, H., Phase I Study of BMS-214662, a Farnesyl Transferase Inhibitor in Patients With Acute Leukemias and High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23* (12), 2805-2812.
23. Adjei, A. A.; Mauer, A.; Bruzek, L.; Marks, R. S.; Hillman, S.; Geyer, S.; Hanson, L. J.; Wright, J. J.; Erlichman, C.; Kaufmann, S. H.; Vokes, E. E., Phase II Study of the Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21* (9), 1760-1766.
24. Yang, Y.-F.; Jan, Y.-H.; Liu, Y.-P.; Yang, C.-J.; Su, C.-Y.; Chang, Y.-C.; Lai, T.-C.; Chiou, J.; Tsai, H.-Y.; Lu, J.; Shen, C.-N.; Shew, J.-Y.; Lu, P.-J.; Lin, Y.-F.; Huang, M.-S.; Hsiao, M., Squalene Synthase Induces Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Enrichment in Lipid Rafts to Promote Lung Cancer Metastasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2014**, *190* (6), 675-687.
25. Sinensky, M.; Beck, L. A.; Leonard, S.; Evans, R., Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (32), 19937-41.
26. Dalton, M. B.; Fantle, K. S.; Bechtold, H. A.; DeMaio, L.; Evans, R. M.; Krystosek, A.; Sinensky, M., The Farnesyl Protein Transferase Inhibitor BZA-5B Blocks Farnesylation of Nuclear Lamins and p21^{ras} but Does Not Affect Their Function or Localization. *Cancer Research* **1995**, *55* (15), 3295-3304.

27. Wolozin, B.; Kellman, W.; Ruosseau, P.; Celesia, G. G.; Siegel, G., Decreased prevalence of alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Archives of Neurology* **2000**, *57* (10), 1439-1443.
28. Simons, M.; Keller, P.; De Strooper, B.; Beyreuther, K.; Dotti, C. G.; Simons, K., Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (11), 6460-6464.
29. Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lütjohann, D.; Keller, P.; Runz, H.; Kühl, S.; Bertsch, T.; von Bergmann, K.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; Hartmann, T., Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (10), 5856-5861.
30. Simons, M.; Schwärzler, F.; Lütjohann, D.; Von Bergmann, K.; Beyreuther, K.; Dichgans, J.; Wormstall, H.; Hartmann, T.; Schulz, J. B., Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Annals of Neurology* **2002**, *52* (3), 346-350.
31. Höglund, K.; Wiklund, O.; Vanderstichele, H.; Eikenberg, O.; Vanmechelen, E.; Blennow, K., Plasma levels of β -amyloid(1-40), β -amyloid(1-42), and total β -amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. *Archives of Neurology* **2004**, *61* (3), 333-337.
32. Kojro, E. F., Petra; Prinzen, Claudia; Kanarek, Anna Maria; Rat, Dorothea; Endres, Kristina; Fahrenholz, Falk; Postina, Rolf, Statins and the Squalene Synthase Inhibitor Zaragozic Acid Stimulate the Non-Amyloidogenic Pathway of Amyloid- β Protein Precursor Processing by Suppression of Cholesterol Synthesis. *Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, *20* (4), 1215-1231.
33. Hooff, G. P.; Wood, W. G.; Müller, W. E.; Eckert, G. P., Isoprenoids, Small GTPases and Alzheimer's Disease. *Biochimica et biophysica acta* **2010**, *1801* (8), 896-905.
34. Hottman, D. A.; Li, L., Protein Prenylation and Synaptic Plasticity: Implications for Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology* **2014**, *50* (1), 177-185.

35. Th  roux, L.; Pelleieux, S.; Tsantrizos, Y.; Dea, D.; Poirier, J., ISOPRENOIDS PATHWAY, TAU PHOSPHORYLATION AND ALZHEIMER'S DISEASE. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* **2017**, 13 (7), P1314.
36. van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; L  wik, C.; Papapoulos, S., Farnesyl Pyrophosphate Synthase Is the Molecular Target of Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 264 (1), 108-111.
37. Bergstrom, J. D.; Bostedor, R. G.; Masarachia, P. J.; Reszka, A. A.; Rodan, G., Alendronate Is a Specific, Nanomolar Inhibitor of Farnesyl Diphosphate Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, 373 (1), 231-241.
38. Dunford, J. E.; Thompson, K.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Hahn, F. M.; Poulter, C. D.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J., Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, 296 (2), 235-242.
39. Thompson, K.; Dunford, J. E.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J., Identification of a Bisphosphonate That Inhibits Isopentenyl Diphosphate Isomerase and Farnesyl Diphosphate Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 290 (2), 869-873.
40. Fisher, J. E.; Rogers, M. J.; Halasy, J. M.; Luckman, S. P.; Hughes, D. E.; Masarachia, P. J.; Wesolowski, G.; Russell, R. G. G.; Rodan, G. A.; Reszka, A. A., Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96 (1), 133-138.
41. Reszka, A. A.; Rodan, G. A., Nitrogen-Containing Bisphosphonate Mechanism of Action. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 4 (7), 711-719.
42. Szabo, C. M.; Matsumura, Y.; Fukura, S.; Martin, M. B.; Sanders, J. M.; Sengupta, S.; Cieslak, J. A.; Loftus, T. C.; Lea, C. R.; Lee, H.-J.; Koohang, A.; Coates, R. M.; Sagami, H.; Oldfield, E., Inhibition of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase by Bisphosphonates and

- Diphosphates: A Potential Route to New Bone Antiresorption and Antiparasitic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (11), 2185-2196.
43. Einav, S.; Glenn, J. S., Prenylation inhibitors: a novel class of antiviral agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *52* (6), 883-886.
44. Bordier, B. B.; Marion, P. L.; Ohashi, K.; Kay, M. A.; Greenberg, H. B.; Casey, J. L.; Glenn, J. S., A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles. *Journal of Virology* **2002**, *76* (20), 10465-10472.
45. Koh, C.; Canini, L.; Dahari, H.; Zhao, X.; Uprichard, S. L.; Haynes-Williams, V.; Winters, M. A.; Subramanya, G.; Cooper, S. L.; Pinto, P.; Wolff, E. F.; Bishop, R.; Han, M. A. T.; Cotler, S. J.; Kleiner, D. E.; Keskin, O.; Idilman, R.; Yurdaydin, C.; Glenn, J. S.; Heller, T., Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *The Lancet. Infectious diseases* **2015**, *15* (10), 1167-1174.
46. Park, E.-M.; Nguyen, L. N.; Lim, Y.-S.; Hwang, S. B., Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 regulates hepatitis C virus propagation. *FEBS Letters* **2014**, *588* (9), 1813-1820.
47. Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T.; Hiyoshi, H., In Vitro and In Vivo Activities of E5700 and ER-119884, Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48* (7), 2379-2387.
48. Sealey-Cardona, M.; Cammerer, S.; Jones, S.; Ruiz-Pérez, L. M.; Brun, R.; Gilbert, I. H.; Urbina, J. A.; González-Pacanowska, D., Kinetic Characterization of Squalene Synthase from *Trypanosoma cruzi*: Selective Inhibition by Quinuclidine Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51* (6), 2123-2129.
49. Shang, N.; Li, Q.; Ko, T.-P.; Chan, H.-C.; Li, J.; Zheng, Y.; Huang, C.-H.; Ren, F.; Chen, C.-C.; Zhu, Z.; Galizzi, M.; Li, Z.-H.; Rodrigues-Poveda, C. A.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Veiga-Santos, P.; de Carvalho, T. M. U.; de Souza, W.; Urbina, J. A.; Wang, A. H. J.; Docampo, R.; Li, K.; Liu, Y.-L.; Oldfield, E.; Guo, R.-T., Squalene Synthase As a Target for Chagas Disease Therapeutics. *PLoS Pathogens* **2014**, *10* (5), e1004114.

50. Poulter, C. D.; Capson, T. L.; Thompson, M. D.; Bard, R. S., Squalene synthetase, inhibition by ammonium analogs of carbocationic intermediates in the conversion of presqualene diphosphate to squalene. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (10), 3734-3739.
51. Zhang, D. L.; Poulter, C. D., Analysis and Purification of Phosphorylated Isoprenoids by Reversed-Phase HPLC. *Analytical Biochemistry* **1993**, *213* (2), 356-361.
52. Bruenger, E.; Rilling, H. C., Determination of isopentenyl diphosphate and farnesyl diphosphate in tissue samples with a comment on secondary regulation of polyisoprenoid biosynthesis. *Analytical Biochemistry* **1988**, *173* (2), 321-327.
53. McTaggart, F.; Brown, G. R.; Davidson, R. G.; Freeman, S.; Holdgate, G. A.; Mallion, K. B.; Mirrlees, D. J.; Smith, G. J.; Ward, W. H. J., Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinuclidines. *Biochemical Pharmacology* **1996**, *51* (11), 1477-1487.
54. Keller, R. K., Squalene synthase inhibition alters metabolism of nonsterols in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1996**, *1303* (3), 169-179.
55. Song, L., Detection of farnesyl diphosphate accumulation in yeast ERG9 mutants. *Analytical Biochemistry* **2003**, *317* (2), 180-185.
56. Henneman, L.; van Cruchten, A. G.; Denis, S. W.; Amolins, M. W.; Placzek, A. T.; Gibbs, R. A.; Kulik, W.; Waterham, H. R., Detection of nonsterol isoprenoids by HPLC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* **2008**, *383* (1), 18-24.
57. Tong, H.; Holstein, S. A.; Hohl, R. J., Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells. *Analytical Biochemistry* **2005**, *336* (1), 51-59.
58. Giera, M.; Renard, D.; Plössl, F.; Bracher, F., Lathosterol side chain amides—A new class of human lathosterol oxidase inhibitors. *Steroids* **2008**, *73* (3), 299-308.
59. Giera, M.; Plössl, F.; Bracher, F., Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids* **2007**, *72* (8), 633-642.

60. Crick, D. C.; Andres, D. A.; Waechter, C. J., Farnesol Is Utilized for Protein Isoprenylation and the Biosynthesis of Cholesterol in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *211* (2), 590-599.
61. Fliesler, S. J.; Keller, R. K., Metabolism of [3H] Farnesol to Cholesterol and Cholesterogenic Intermediates in the Living Rat Eye. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *210* (3), 695-702.
62. Bentinger, M.; Grünler, J.; Peterson, E.; Swiezewska, E.; Dallner, G., Phosphorylation of Farnesol in Rat Liver Microsomes: Properties of Farnesol Kinase and Farnesyl Phosphate Kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, *353* (2), 191-198.
63. De Ropp, J. S.; Troy, F. A., Chemical synthesis and deuterium NMR investigations of polyisoprenols: dynamics in model membranes. *Biochemistry* **1984**, *23* (12), 2691-2695.
64. Keller, R. K.; Zhao, Z.; Chambers, C.; Ness, G. C., Farnesol Is Not the Nonsterol Regulator Mediating Degradation of HMG-CoA Reductase in Rat Liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1996**, *328* (2), 324-330.
65. Hanzlik, R. P., Selective Epoxidation of Terminal Double Bonds: 10,11-Epoxyfarnesyl Acetate. In *Organic Syntheses*, John Wiley & Sons, Inc.: 2003.
66. Labadie, G. R.; Viswanathan, R.; Poulter, C. D., Farnesyl Diphosphate Analogues with ω -Bioorthogonal Azide and Alkyne Functional Groups for Protein Farnesyl Transferase-Catalyzed Ligation Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72* (24), 9291-9297.
67. Comeskey, D. J.; Rowan, D. D.; Matich, A. J., Synthesis of d8-geranyl diphosphate. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2006**, *49* (1), 47-54.
68. Shizuka, T.; Ayano, S.; Kazuyuki, S.; Ryota, M.; Tadatsugu, Y.; Masahiro, I., Photochromic Performance of 1-Thiazolyl-2-vinylcyclopentene Derivatives Having a Phenyl- or 4-Methoxyphenyl-Substituted Olefin. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2013**, *86* (9), 1059-1064.
69. Nakahara, A.; Satoh, K.; Kamigaito, M., Cycloolefin Copolymer Analogues from Styrene and Isoprene: Cationic Cyclization of the Random Copolymers Prepared by Living Anionic Polymerization. *Macromolecules* **2009**, *42* (3), 620-625.

70. Bergstrom, J. D.; Kurtz, M. M.; Rew, D. J.; Amend, A. M.; Karkas, J. D.; Bostedor, R. G.; Bansal, V. S.; Dufresne, C.; VanMiddlesworth, F. L.; Hensens, O. D., Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90* (1), 80-84.
71. Dawson, M. J. F., J. E.; Marshall, P. S.; Middleton, R. F.; O'Neill, M. J.; Shuttleworth, A.; Stylli, C.; Tait, R. M.; Taylor, P. M.; Wildman, H. G.; Buss, A. D.; Langley, D.; Hayes, M. V., The Squalostatins, novel inhibitors of squalene synthase produced by a species of *phoma I*. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activity. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (5), 639-647.
72. Hasumi, K. T., Kyioshi; Sakai, Kaoru; Murakawa, Shigeo; Yoshikawa, Nobuji; Kumazawa, Shigenori; Endo, Akira, COMPETITIVE INHIBITION OF SQUALENE SYNTHETASE BY SQUALESTATIN 1. *J. Antibiot.* **1993**, *46* (4), 689-691.
73. Lindsey, S.; Harwood, H. J., Inhibition of Mammalian Squalene Synthetase Activity by Zaragozic Acid A Is a Result of Competitive Inhibition Followed by Mechanism-based Irreversible Inactivation. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (16), 9083-9096.
74. Dufresne, C.; Wilson, K. E.; Zink, D.; Smith, J.; Bergstrom, J. D.; Kurtz, M.; Rew, D.; Nallin, M.; Jenkins, R.; Bartizal, K.; Trainor, C.; Bills, G.; Meinz, M.; Huang, L.; Onishi, J.; Milligan, J.; Mojena, M.; Pelaez, F., The isolation and structure elucidation of zaragozic acid C, a novel potent squalene synthase inhibitor. *Tetrahedron* **1992**, *48* (47), 10221-10226.
75. Bruchhausen, F. v., *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Springer: 1949.
76. Friedman, M., Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (5), 1523-1540.
77. Römpp Online. Georg Thieme Verlag: 2013.
78. Choi, S. W.; Hur, N. Y.; Ahn, S. C.; Kim, D. S.; Lee, J. K.; Kim, D. O.; Park, S. K.; Kim, B. Y.; Baik, M. Y., Isolation and structural determination of squalene synthase inhibitor from *Prunus mume* fruit. *Journal of microbiology and biotechnology* **2007**, *17* (12), 1970-5.

79. Rodriguez de Sotillo, D. V.; Hadley, M., Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2002**, *13* (12), 717-726.
80. Horie, M.; Tsuchiya, Y.; Hayashi, M.; Iida, Y.; Iwasawa, Y.; Nagata, Y.; Sawasaki, Y.; Fukuzumi, H.; Kitani, K.; Kamei, T., NB-598: a potent competitive inhibitor of squalene epoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (30), 18075-18078.
81. Meigs, T. E.; Roseman, D. S.; Simoni, R. D., Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Degradation by the Nonsterol Mevalonate Metabolite Farnesol in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (14), 7916-7922.
82. Ishihara, T.; Kakuta, H.; Moritani, H.; Ugawa, T.; Yanagisawa, I., Synthesis and biological evaluation of novel propylamine derivatives as orally active squalene synthase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (22), 5899-5908.
83. Amin, D.; Cornell, S. A.; Gustafson, S. K.; Needle, S. J.; Ullrich, J. W.; Bilder, G. E.; Perrone, M. H., Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* **1992**, *33* (11), 1657-63.
84. Widler, L.; Jaeggi, K. A.; Glatt, M.; Müller, K.; Bachmann, R.; Bisping, M.; Born, A.-R.; Cortesi, R.; Guiglia, G.; Jeker, H.; Klein, R.; Ramseier, U.; Schmid, J.; Schreiber, G.; Seltenmeyer, Y.; Green, J. R., Highly Potent Geminal Bisphosphonates. From Pamidronate Disodium (Aredia) to Zoledronic Acid (Zometa). *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (17), 3721-3738.
85. Henneman, L.; van Cruchten, A. G.; Kulik, W.; Waterham, H. R., Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, *1811* (4), 227-233.
86. Crick, D. C.; Rush, J. S.; Waechter, C. J., Characterization and Localization of a Long-Chain Isoprenyltransferase Activity in Porcine Brain: Proposed Role in the Biosynthesis of Dolichyl Phosphate. *Journal of Neurochemistry* **1991**, *57* (4), 1354-1362.
87. Kim, E. E.; Wyckoff, H. W., Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology* **1991**, *218* (2), 449-464.

88. Weivoda, M. M.; Hohl, R. J., Effects of Farnesyl Pyrophosphate Accumulation on Calvarial Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* **2011**, *152* (8), 3113-3122.
89. C., S., Ueber die Oxydation des Piperidins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1884**, *17* (2), 2544-2547.
90. E., B., Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1886**, *19* (2), 3218-3222.
91. Anastassiades, M.; Lehota, S. J.; Stajnbaher, D., Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Approach for the Determination of Pesticide Residues. In *WTQA 2002 - 18th Annual Waste Testing & Quality Assurance Symposium*, 2002.
92. Rääkkönen, J.; Mönkkönen, H.; Auriola, S.; Mönkkönen, J., Mevalonate pathway intermediates downregulate zoledronic acid-induced isopentenyl pyrophosphate and ATP analog formation in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *79* (5), 777-783.
93. Santa Cruz Biotechnology, I. DL-Mevalonolactone *Sicherheitsdatenblatt* [Online], 2015.
94. Nave, J. F.; d'Orchymont, H.; Ducep, J. B.; Piriou, F.; Jung, M. J., Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate. *Biochemical Journal* **1985**, *227* (1), 247-254.
95. Woollen, B. H.; Holme, P. C.; Northway, W. J.; Martin, P. D., Determination of mevalonic acid in human urine as mevalonic acid lactone by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *760* (1), 179-184.
96. Abrar, M.; Martin, P. D., Validation and application of an assay for the determination of mevalonic acid in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2002**, *773* (2), 103-111.
97. Saini, G. S.; Wani, T. A.; Gautam, A.; Varshney, B.; Ahmed, T.; Rajan, K. S.; Pillai, K. K.; Paliwal, J. K., Validation of the LC-MS/MS method for the quantification of mevalonic acid in human plasma and determination of the matrix effect. *Journal of Lipid Research* **2006**, *47* (10), 2340-2345.

98. ICH, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. EMA: 2005.
99. (CHMP), C. f. M. P. f. H. U., Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency: 2011.
100. Soares, A. P.; do Espírito Santo, R. F.; Line, S. R. P.; Pinto, M. d. G. F.; Santos, P. d. M.; Toralles, M. B. P.; do Espírito Santo, A. R., Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2016**, *42*, 212-217.
101. Dunford, J. E.; Kwaasi, A. A.; Rogers, M. J.; Barnett, B. L.; Ebetino, F. H.; Russell, R. G. G.; Oppermann, U.; Kavanagh, K. L., Structure–Activity Relationships Among the Nitrogen Containing Bisphosphonates in Clinical Use and Other Analogues: Time-Dependent Inhibition of Human Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (7), 2187-2195.
102. Chen, H. W.; Heiniger, H. J.; Kandutsch, A. A., Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72* (5), 1950-1954.
103. Habenicht, A. J.; Glomset, J. A.; Ross, R., Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255* (11), 5134-5140.
104. Goluszko, P.; Nowicki, B., Membrane Cholesterol: a Crucial Molecule Affecting Interactions of Microbial Pathogens with Mammalian Cells. *Infection and Immunity* **2005**, *73* (12), 7791-7796.
105. Barbara, B.; Francesca, S., Cholesterol metabolism during cell growth: Which role for the plasma membrane? *European Journal of Lipid Science and Technology* **2006**, *108* (8), 687-699.
106. Chen, H. W., Role of cholesterol metabolism in cell growth. *Fed Proc* **1984**, *43* (1), 126-130.

107. Eberhard, R.; Franz, B., Pethidin-Analoga mit eingeschränkter Konformation, 1. Mitt. Synthese von cis- und trans-4-Methyl-10b-carbethoxymethyl-1,2,3,4,4a,5,6,10b-octahydrobenzo(f)chinolin. *Archiv der Pharmazie* **1988**, 321 (4), 185-188.
108. Eberhard, R.; Johann, S.; Hermann, L., Intramolekulare Aromatenalkylierungen, 18. Mitt. Synthese von 3,4-Dihydro-1'-methylspiro[naphthalin-1(2H), 4'-piperidinen]. *Archiv der Pharmazie* **1987**, 320 (5), 385-393.
109. Eberhard, R.; Johann, S., Intramolekulare Aromatenalkylierungen, 27. Mitt.1): Synthese von 3,4-Dihydro-1'-methylspiro [naphthalin-1(2H), 3'-piperidin]. *Archiv der Pharmazie* **1990**, 323 (1), 13-15.
110. Eberhard, R.; Johann, S.; Jürgen, S., Intramolekulare Aromatenalkylierungen, 28.Mitt.1): Synthese und pharmakologische Prüfung homologer und hydroxylierter 3,4-Dihydro-1'-methylspiro[naphthalin-1(2H),4'-piperidine]. *Archiv der Pharmazie* **1990**, 323 (1), 35-39.
111. Speckbacher, J., Dissertation: Potentielle Wirkstoffe mit eingeschränkter Konformation. 1987.
112. Benend, H., Dissertation: Potentielle Analgetika mit 4-Phenylpiperidin-Struktur: Synthese, Konfigurationsbestimmung und pharmakologische Prüfung von CIS-Octahydrobenzo(f)isochinolinen. **1990**.