

Synthese und präklinische Evaluation
von neuen antioxidativen Substanzen zur Neuroprotektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Maike Ohlow

geb. in Nastätten

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Oxidativer Stress	1
1.1.1 Sauerstoff und die mitochondriale Atmungskette.....	1
1.1.2 Sauerstoff und seine reaktiven Spezies.....	4
1.1.3 Zelluläre Angriffspunkte von ROS	7
1.1.4 Endogene Verteidigungsmechanismen.....	14
1.2 Akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen	18
1.2.1 Akute zerebrale Ischämie - Schlaganfall	18
1.2.2 Morbus Parkinson.....	19
1.2.3 Die Alzheimersche Erkrankung	20
1.3 Antioxidantien für therapeutische Zwecke	22
1.3.1 Phenothiazine	25
2 Fragestellung/Ziele	31
3 Material	33
3.1 Spezielle Chemikalien	33
3.2 Geräte	33
3.3 Zellen	34
3.3.1 Klonale Zellen	34
3.4 Lösungen und Medien für die Zellkultur	34
3.5 Lösungen für biochemische und zellbiologische Assays	34
3.6 Puffer und Lösungen für die Proteinanalytik	35
3.7 Antikörper	36
4 Methoden	37

4.1	Quantenchemische Berechnungen zur Vorhersage der antioxidativen Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten.....	37
4.2	Chemische Synthesen von ausgewählten Phenothiazinderivaten	37
4.2.1	Herstellung von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin	38
4.2.2	Herstellung von 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin.....	38
4.2.3	Herstellung von 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin, 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin und 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin....	39
4.2.4	Herstellung von 2-Carboxylphenothiazin („NH-Trolox“).....	40
4.2.5	Herstellung von 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“).....	40
4.3	Zellkultur.....	41
4.3.1	Klonale Zellen	41
4.4	Biochemische Assays.....	41
4.4.1	TEAC-Oxidationsmessung	41
4.4.2	B-Phycoerythrin-Proteinoxidation	42
4.4.3	TBARS-Lipidperoxidation	42
4.5	Zellbiologische Assays.....	42
4.5.1	MTT-Zellviabilität.....	42
4.5.2	PI-Plasmamembranintegrität.....	43
4.5.3	DCFDA-Peroxidakkumulation	43
4.5.4	Isoprostan-Lipidperoxidation.....	44
4.5.5	DNPH-Proteincarbonylierung.....	44
4.6	Präparation von Rattenhirn-Lipiden	47
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Quantenchemische Berechnungen zur Vorhersage der antioxidativen Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten.....	48
5.2	Synthese und Analyse von ausgewählten neuen Phenothiazinderivaten	51
5.2.1	Herstellung von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin	51
5.2.2	Herstellung von 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin.....	52
5.2.3	Herstellung von 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin, 2-(Laurylamidomethyl)- phenothiazin und 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin	53

5.2.4	Herstellung von 2-Carboxylphenothiazin („NH-Trolox“)	55
5.2.5	Herstellung von 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“)	56
5.3	Biochemische Untersuchungen des pharmakologisch-antioxidativen Potentials der neu synthetisierten Phenothiazinderivate	57
5.3.1	TEAC-Oxidationsmessung	59
5.3.2	B-Phycoerythrin-Proteinoxidation	61
5.3.3	TBARS-Lipidperoxidation	62
5.4	Zellbiologische Untersuchungen des antioxidativen Potentials von neuen Phenothiazinderivaten	65
5.4.1	MTT-Zellviabilität nach Toxinexposition	65
5.4.2	PI-Plasmamembranintegrität	70
5.4.3	DCFDA-Peroxidakkumulation	72
5.4.4	Isoprostan-Lipidperoxidation	73
5.4.5	DNPH-Proteincarbonylierung	74
5.5	QSAR – Quantitative Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung	81
6	Diskussion	85
6.1	Synthesestrategie	85
6.1.1	Generierung von Derivaten variabler Lipophilie	85
6.1.2	Generierung geladener Derivate mit verringerter Lipophilie und variabler Löslichkeit	86
6.1.3	Generierung neuer Derivate mit höherer Radikalstabilität durch Vergrößerung des aromatischen Systems	87
6.2	Struktur-Wirkungs-Analyse in biochemischen Systemen	88
6.3	Struktur-Wirkungs-Analyse in zellulären neuronalen Systemen	92
6.4	Bedeutung von Lipidperoxidation und Proteinoxidation für den Schutz von zellulären neuronalen Systemen durch Phenothiazine	96
6.5	Evolutionäre Betrachtung: Amine versus Phenole	98
6.6	Perspektiven für die klinische Anwendung	100
6.6.1	Wirkt Phenothiazin prinzipiell <i>in vivo</i> als Antioxidans?	102

6.6.2	Phenothiazin im Tiermodell bei Schlaganfall.....	103
6.6.3	Phenothiazin im Menschen	104
6.6.4	Zusammenfassung	107
7	Zusammenfassung	109
8	Abstract.....	110
9	Literatur.....	111
10	Abbildungsverzeichnis	124
11	Tabellenverzeichnis	126
12	Lebenslauf.....	127
13	Eigene Publikationen.....	128
14	Danksagung	130

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β -Peptid
AAPH	2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumpersulfat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DCFA	2',7'-Dichlorfluorescindiacetat
DHA	Dehydroascorbinsäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
FBS/FCS	<i>fetal bovine/calf serum</i> , fötales Rinderserum
GSH	Glutathion (reduziert)
GPx	Glutathionperoxidase
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
HNE	Hydroxynonenal
¹ H-NMR	Kernspinresonanzspektroskopie von Wasserstoffkernen
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
kDa	Kilodalton
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
m	Multipllett
MDA	Malondialdehyd
mM	millimolar
min	Minute(n)
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nM	nanomolar
nm	Nanometer

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PI	Propidiumiodid
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> , polyungesättigte Fettsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
Smp.	Schmelzpunkt
SOD	Superoxiddismutase
t	Triplett
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> , Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidative capacity</i> , Trolox-äquivalente antioxidative Kapazität
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tween	Polysorbat
μM	mikromolar
μ-PET	Mikro-Positronenemissionstomographie, Tier-PET
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

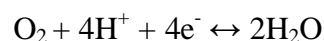
1.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist seit über 25 Jahren als Charakteristikum vieler pathologischer Prozesse bekannt. Helmut Sies beschrieb bereits in den 1980er Jahren oxidativen Stress als Störung in der prooxidativen/antioxidativen Balance zugunsten der prooxidativen Seite, wodurch es potentiell zu Schäden in diversen Geweben kommt (Sies 1986). Eine übermäßige Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche den oxidativen Stress vermitteln, tritt bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und zerebraler Ischämie auf. Auch Erkrankungen wie Arteriosklerose sowie die Alterung *per se* sind mit vermehrtem oxidativen Stress assoziiert. In all diesen Pathologien wird der Anstieg der körpereigenen ROS als Ursache oder zumindest als ein wesentlicher krankheitsfördernder Faktor diskutiert.

Um die Entstehung und Beteiligung von reaktiven Spezies an pathologischen Prozessen im Organismus zu verstehen, sind Kenntnisse der Reaktivität von Sauerstoff nötig. Im Folgenden werden diese detailliert beschrieben. Die Konsequenzen für Reaktionspartner wie Lipide und Proteine sowie die Auswirkungen im Krankheitsverlauf zeigen einen Ansatzpunkt für den therapeutischen Einsatz antioxidativ wirkender Substanzen.

1.1.1 Sauerstoff und die mitochondriale Atmungskette

Aerobe, eukaryotische Organismen benötigen Sauerstoff für eine effiziente Energieproduktion. Zu diesem Zweck werden Elektronen in den Mitochondrien eukaryotischer Zellen mittels Transportketten auf molekularen Sauerstoff (O₂) übertragen.



Evolutionär betrachtet bewirkte der Wechsel zu einem aeroben Metabolismus eine enorme Zunahme der Energieproduktion in Form von ATP, was sich nach heutigem Wissen nur durch die Entwicklung von antioxidativen Verteidigungssystemen durchsetzen ließ. Beispielsweise konnte durch die Verwendung von Sauerstoff bei der Glucose-Verwertung eine 15-fache ATP-Steigerung erreicht werden.

Mitochondrien werden oft als die Kraftwerke der Zelle bezeichnet. Sie generieren in der inneren Mitochondrienmembran mindestens 80 % des gesamten ATP, welches in allen Zellen

im Organismus gebraucht wird. Eine Störung dieses Prozesses durch Inhibition mittels Rotenon, einem Atmungskettenkomplex I-Hemmer, kann zum Zelltod führen und zeigt die Bedeutung von aktiven Mitochondrien für das Zellüberleben (Li et al. 2003). In der inneren Mitochondrienmembran arbeiten fünf assoziierte Multienzymkomplexe (I – V) miteinander an der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff. Diese Elektronen stammen aus dem oxidativen Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten aus der Nahrung und werden zuerst auf Coenzyme wie NAD^+ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) oder FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) übertragen (Ballard & Whitlock 2004). Das resultierende, reduzierte NADH wird in den Mitochondrien durch den Multienzymkomplex I (NADH-Dehydrogenase) oxidiert, und die zwei dadurch frei werdenden Elektronen werden von Ubichinon (Coenzym Q_{10}) aufgenommen (siehe Abb.1.1.1), wobei erst Ubisemichinon durch eine Ein-Elektronenreduktion gebildet wird, und dann vollständig zu Ubichinol reduziert wird. Der Atmungskettenkomplex II speist ebenfalls Elektronen von Succinat auf Coenzym Q_{10} in die Elektronen-Transportkette ein. Nachdem die Elektronen den Multiproteinkomplex III (Cytochrom c-Reduktase) passiert und das Hämprotein Cytochrom ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) reduziert haben, wird selbiges im Komplex IV, der Cytochrom c-Oxidase, wieder oxidiert. Dieses terminale Oxidase-Enzym ist verantwortlich für nahezu den gesamten Sauerstoff-Umsatz im Körper. Es nimmt je ein e^- von vier reduzierten Cytochrom c-Molekülen auf und reduziert damit ein O_2 -Molekül unter Aufnahme von Protonen zu zwei Molekülen Wasser (siehe vorherige Reaktionsgleichung).

Der gesamte Atmungsketten-Prozess bildet einen transmembranären, elektrochemischen Gradienten, der von der ATP-Synthase (Komplex V) zur Produktion von ATP genutzt wird. Abschließend wird das ATP von einer Adenin-Nukleotid-Translokase im Austausch mit ADP durch die innere Mitochondrienmembran ins Cytoplasma geschleust und auf diese Weise dem Rest der Zelle zur Verfügung gestellt.

Bei der Zellatmung oder oxidativen Phosphorylierung, wie der Mitochondrien-Energiestoffwechsel auch genannt wird, entstehen auch unter normalen Bedingungen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Generell gelten die Mitochondrien als die wichtigste Quelle einer speziellen ROS, des Superoxidanion-Radikals $\text{O}_2^{\cdot-}$. Bei seiner Entstehung spielen die zur Elektronenübertragung notwendigen Redoxreaktionen, die den wie zuvor erwähnten Protonengradienten zwischen Matrix und Intermembranraum generieren, eine besondere Rolle. Die Enzyme der Atmungskette weisen besonders an den Komplexen I und III eine Schwachstelle auf (Chen et al. 2003; Brand 2010). Der Multienzymkomplex I besitzt als Redoxzentren unter anderem Flavinmononukleotide (FMN), welche normalerweise oxidiert

vorliegen. Durch beispielsweise atemungskettenhemmende Toxine kann es an Komplex I zu einer Art Elektronenstau kommen, wodurch Flavin völlig reduziert (Brand 2010) wird und so Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, anstatt die Atmungskette entlang zu wandern – Superoxid entsteht. An Komplex III wird ebenfalls Superoxid durch ein Ubisemichinonanionradikal ($Q^{\cdot-}$) als Elektronendonator generiert. Mitochondriales Superoxid wird meist in die Matrix (St-Pierre et al. 2002; Brand 2010) abgegeben, wo es von manganhaltiger SOD (Superoxiddismutase) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff umgesetzt wird (Fridovich 1995). Diese nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies kann dann durch weitere Enzyme wie Katalasen oder die im Gehirn häufiger vorkommenden Glutathionperoxidasen, deren höchste Konzentrationen sich in der Leber finden, sowie durch Peroxiredoxine entgiftet werden.

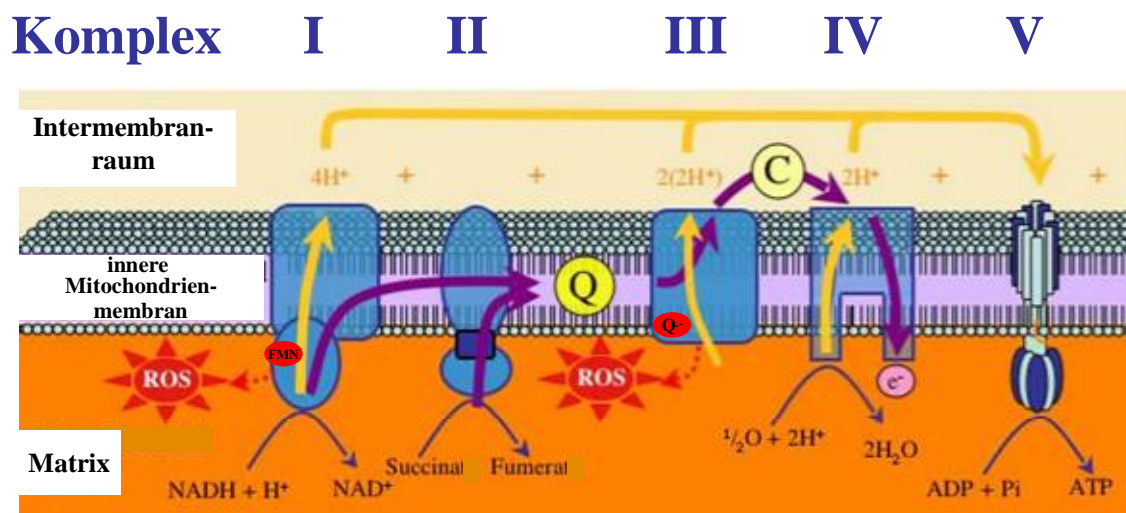


Abb. 1.1.1: Mitochondriale oxidative Phosphorylierung

Mitochondrien übertragen innerhalb der Atmungskette an fünf miteinander gekoppelten Multienzymkomplexen über Redoxreaktionen Elektronen, die aus dem oxidativen Abbau von Kohlenhydraten und Fetten (Glykolyse, Citratzyklus) stammen, um Wasser und Energie in Form von ATP zu gewinnen. Dabei spielt molekularer Sauerstoff die Rolle des terminalen Elektronenakzeptors für die Elektronentransportkette entlang der Komplexe, wodurch ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran generiert wird. Elektronen werden durch Coenzyme (NADH) und Succinat in Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und II in die e⁻-Transportkette eingespeist, von Ubichinon (Q) auf Komplex III (Cytochrom c-Reduktase) übertragen und über Cytochrom c auf Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) transferiert, welcher final 4 e⁻ an ein Molekül O₂ abgibt. Die Energie des transmembranären Protonengradienten nutzt die ATP-Synthase zur Kondensierung von ADP (Adenosindiphosphat) mit Phosphat. An Komplex I und III können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid und Wasserstoffperoxid entstehen. (Abbildung nach Ballard und Whitlock, 2004)

Unter physiologischen Bedingungen wird die Produktion von ROS über die mitochondriale Atmungskette als die größte Quelle angesehen, davon scheinen nach neueren Erkenntnissen 0,15 % H_2O_2 bei normalem Elektronenfluss zu entstehen (St-Pierre et al. 2002; Muller et al. 2004). In fortgeschrittenem Alter, bei altersassoziierten Erkrankungen oder durch veränderten Sauerstoffpartialdruck jedoch nimmt die ROS-Generierung durch Mitochondrien pathologisch zu (Freeman & Crapo 1981; Turrens 2003).

1.1.2 Sauerstoff und seine reaktiven Spezies

Sauerstoff selbst ist im Gewebe nicht toxisch. Er ist Vorläufer für Sauerstoffradikale, die schädliche Effekte entwickeln können. Radikale definieren sich über den Besitz von einem oder mehreren ungepaarten Elektronen im Atom- oder Molekülorbital. Diatomarer Sauerstoff besitzt zwei ungepaarte Elektronen, die jeweils ein π^* -Orbital besetzen (Abb.1.1.2). Beide Elektronen haben dabei den gleichen Spin (parallel). Diese Konstellation bildet die energetisch stabilste Form von Sauerstoff und wird daher auch Grundzustand genannt. Sauerstoff kann andere Moleküle oxidieren, indem er ein Elektronenpaar des Reaktionspartners akzeptiert, wobei diese beiden anderen Elektronen ebenfalls die gleiche Spinquantenzahl haben müssen, um in den freien Raum der π^* -Orbitale von O_2 hineinzupassen. Da die meisten Moleküle aber einen antiparallelen Spin im ihren Grundzustand besitzen, muss zur Reaktion mit Sauerstoff erst eine energieverbrauchende Spinumkehr betrieben werden, um sich dementsprechend in die freien Räume der π^* -Orbitale einfügen zu können. Dies erklärt die Reaktionsträgheit von molekularem Sauerstoff (Halliwell & Gutteridge 1984).

Der Singulett-Sauerstoff existiert in zwei Zuständen ($^1\Delta\text{gO}_2$ und $^1\Sigma\text{g}^+$) und stellt eine reaktivere Form von Sauerstoff (O_2) dar. Singulett-Sauerstoff $^1\Delta\text{gO}_2$ besitzt keine ungepaarten Elektronen, ist wenig reaktiv und kein Radikal. Der $^1\Sigma\text{g}^+$ Zustand (in Abb.1.1.2 ganz rechts) ist reaktiver, fällt jedoch nach Anregung direkt wieder in den reaktionsärmeren Zustand $^1\Delta\text{gO}_2$ zurück.

Biologischer Singulett-Sauerstoff spielt in Photosensibilisierungsreaktionen eine bedeutende Rolle. Wenn bestimmte Photosensibilisatoren mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt werden, führt die Absorption der Energie zur elektronischen Anregung des Moleküls. Hierzu gehören beispielsweise Inhaltsstoffe aus Johanniskraut oder Tetrazykline, welche bei UV-Bestrahlung in der Haut die Energie auf ein benachbartes O_2 -Molekül übertragen und dadurch Singulett-Sauerstoff generieren.

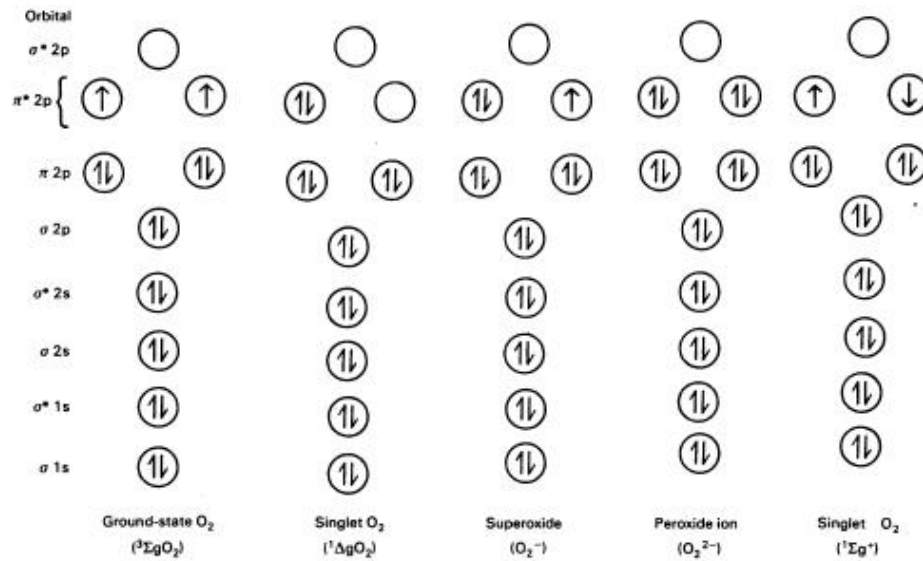


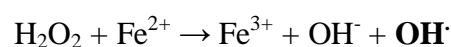
Abb. 1.1.2: Bindungen im diatomaren Sauerstoffmolekül (aus Halliwell und Gutteridge, 1984)

Durch UV-Exposition bilden sich auch Superoxid und Hydroxylradikale (OH[•]), die in der Regel für phototoxische Schäden wie Sonnenbrand verantwortlich gemacht werden (Martin & Logsdon 1987). Das Superoxidanionradikal O₂^{•-} weist im Gegensatz zum Grundzustand von Sauerstoff ein zusätzliches Elektron auf. Obwohl Superoxid nur ein ungepaartes e⁻ aufweist, ist es in biochemischer Hinsicht reaktiver als molekularer Sauerstoff.

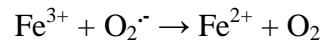
Die im biologischen Zusammenhang überwiegenden Zwei- und Vier-Elektronen-Reduktionen produzieren Wasser oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂), die protonierten Formen des Peroxidations O₂²⁻.



Über Katalysatoren wie freie Übergangsmetalle (Eisen oder Kupfer), welche in gebundener Form in aktiven Zentren vieler Enzyme vorkommen, kann aus Wasserstoffperoxid *in vivo* das hochreaktive Hydroxylradikal (OH[•]) (Fenton-Reaktion) entstehen.



Die Fenton-Reaktion vermittelt die von Haber und Weiss (Haber & Weiss 1934) entdeckte, indirekte Superoxid-Toxizität. Hierbei reduziert Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}), wobei sich molekularer Sauerstoff bildet.



Das reduzierte zweiwertige Eisen (Fe^{2+}), welches normalerweise im Cytosol nicht frei vorliegt, reagiert dann (entsprechend Fenton) wiederum mit Wasserstoffperoxid zum aggressiven Hydroxylradikal.

Die allgemeine Haber-Weiss-Reaktion lautet: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$

Wasserstoffperoxid wird physiologisch kontinuierlich in allen Geweben produziert. Mitochondrien tragen einen signifikanten Teil durch ihre Superoxid-Produktion aus der Elektronen-Transportkette dazu bei, wobei das Superoxid dann durch Enzyme wie der SOD (Halliwell & Gutteridge 2008) zu H_2O_2 umgewandelt wird. Andere Enzyme wie die Xanthinoxidase oder die Monoaminoxidase stellen Superoxid-unabhängig ebenfalls Wasserstoffperoxid her. Dies kann Zellmembranen spontan passieren und ist in hohen Konzentrationen (μM) trotz der generell geringen Reaktivität cytotoxisch. Dies lässt sich durch die Fähigkeit, Zellmembranen per Diffusion zu überwinden, begründen, wodurch es in Kompartimente gelangt, in denen freies Eisen vorliegt. Dort ist eine Reaktion von H_2O_2 mit dem Eisen sehr wahrscheinlich, und die Generierung von Hydroxylradikalen nach Fenton wird forciert (Spencer et al. 1995).

Hydroxylradikale permeieren Membranen nicht. Sie reagieren sofort mit Molekülen in ihrer nächsten Umgebung (2 -10 nm) innerhalb von Nanosekundenbruchteilen (Pryor 1986; Saran & Bors 1989; Halliwell & Gutteridge 2008).

Das geladene Superoxidanionradikal ist dagegen auf spezifische Kanäle angewiesen. Anionenaustauscher-Proteine, wie sie beispielsweise in Erythrocyten oder in der Lunge vorzufinden sind, können zum Transport genutzt werden (Nozik-Grayck et al. 2003). Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) ist in wässrigem Milieu sehr reaktionsträge. Seine Reaktionsraten mit DNA, Lipiden, Aminosäuren und anderen Biomolekülen sind abhängig von der Anwesenheit und Konzentration der SOD und anderen Reaktionspartnern, werden aber generell als äußerst gering eingeschätzt (Pryor 1986).

1.1.3 Zelluläre Angriffspunkte von ROS

Polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs), Proteine sowie die DNA sind besonders von der Reaktivität der reaktiven Sauerstoffspezies betroffen. Die Hauptkomponenten von biologischen Membranen sind Lipide und Proteine, die in einer Lipiddoppelschicht angeordnet sind. Die dominierenden Lipide in tierischen Zellmembranen sind Phospholipide wie das Lecithin (Phosphatidylcholin). In Mitochondrien findet sich das Cardiolipin, dessen Peroxidation für den alters-assoziierten Rückgang der terminalen Cytochrom c-Oxidase-Aktivität verantwortlich gemacht wird (Paradies et al. 1997).

Je mehr unterschiedliche Proteine in Membranen enthalten sind, desto vielfältigere Funktionen werden der Membran zugeschrieben. Die einfache Membran Myelin besteht aus 18 % Protein (Guidotti 1972) und nimmt im Wesentlichen die Funktion als Permeabilitätsbarriere (Isolator) ein. Die meisten Membranen beinhalten 30 % oder mehr Protein für enzymatische und Transportfunktionen. Die innere Mitochondrien-Membran jedoch besteht aus bis zu 80 % Protein (Guidotti 1972). Ihre wichtigste Aufgabe ist die Energiebereitstellung durch oxidative Phosphorylierung (Atmungskette), was eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Proteinoxidation mit sich bringt.

Oxidativer Stress wirkt auch auf DNA. Oxidativer Schaden kann die Purin (Adenin, Guanin) - und Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin) sowie den Desoxyribose-Zucker beeinflussen (Evans et al. 2004). Nachfolgend werden alle drei oxidativ vulnerablen Komponenten (Lipide, Proteine und DNA) genauer betrachtet.

1.1.3.1 Lipidperoxidation

Gewöhnlich besitzen Membranlipide tierischer Zellen Fettsäure-Seitenketten mit 14 bis 24 Kohlenstoffatomen. Bei ungesättigten Fettsäuren sind die Doppelbindungen *cis*-konfiguriert und sorgen daher für eine Erniedrigung des Schmelzpunktes der Lipiddoppelschicht, so dass die Viskosität eines einfachen Öls erreicht wird (Halliwell & Gutteridge 2008), in dem Proteine und Lipide rasch hin und her diffundieren können. Man spricht dabei von Membranfluidität (Singer & Nicolson 1972). Der große sterische Anspruch der mehrfach ungesättigten Fettsäurereste verhindert, dass sich ein kristalliner Membranzustand ausbildet. Bei einer Schädigung der PUFAs durch Oxidation wird die Fluidität vermindert und so die volle Funktion von biologischen Membranen negativ beeinträchtigt.

Die Initiierung der Lipidperoxidation wird meist durch die Subtraktion eines Wasserstoffatoms von einer C-H-Bindung einer Fettsäure-Seitenkette, die neben einer Doppelbindung liegt (Abb.1.1.3), durch eine reaktive radikale Spezies verursacht. Das resultierende

Kohlenstoffradikal des polyungesättigten Fettsäurerests neigt dazu, sich zu einem konjugierten Dien umzulagern, welches schnell mit molekularem Sauerstoff, wenn vorhanden, zu einem Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$) reagiert. Dieses wiederum kann ein Wasserstoffatom von der nächsten PUFA abziehen und zum Lipidhydroperoxid (ROOH) werden, während ein neues Kohlenstoffradikal entsteht und die Radikalkettenreaktion fortführt (Propagierung) (Gardner 1989). Reagieren zwei Radikale miteinander, wird die Radikalkettenreaktion unterbrochen (Termination).

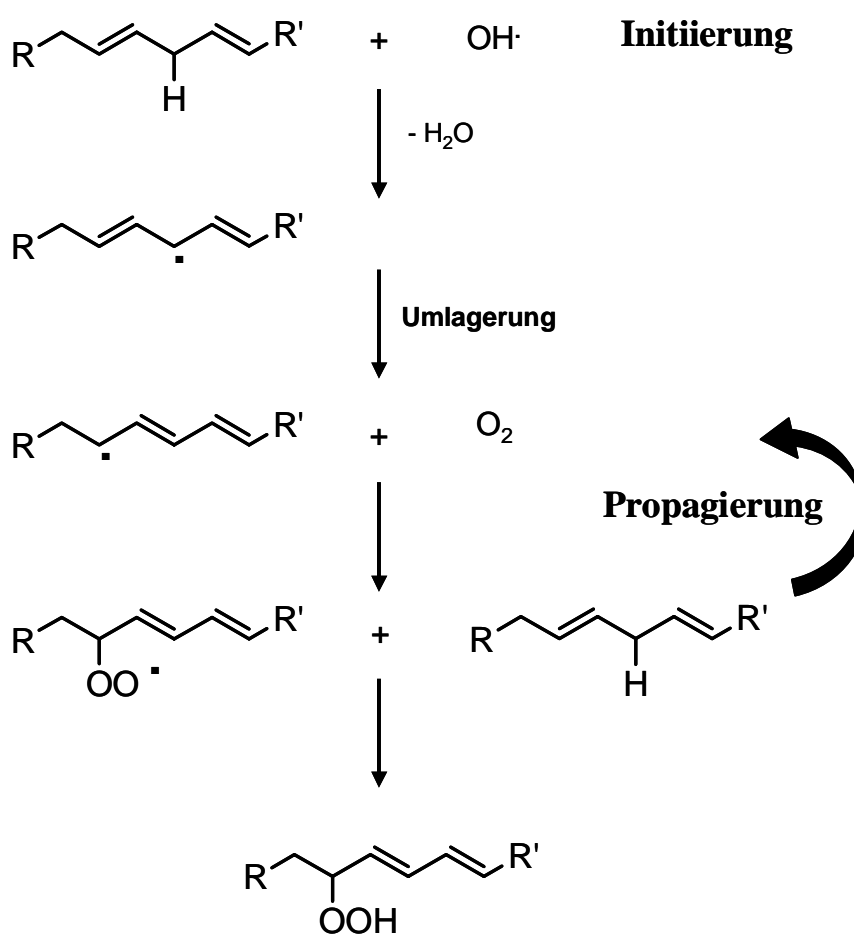
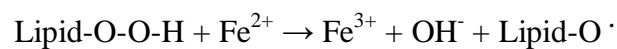


Abb. 1.1.3: Schema der Initiierung von Lipidperoxidation mit folgender Radikalkettenreaktion

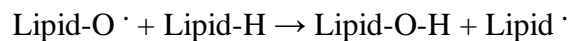
Nach der Entfernung des Wasserstoffatoms der ungesättigten Fettsäure durch das Hydroxylradikal reagiert das entstandene Kohlenstoffradikal mit O_2 zu einem Peroxylradikal, welches einer anderen mehrfach ungesättigten Fettsäure in α -Position zur Doppelbindung ein H-Atom abstrahiert, um selbst zu einem Lipidhydroperoxid zu werden.

Eine Doppelbindung schwächt die Bindungsenergie von benachbarten (allylischen) C-H-Bindungen. Dieser Effekt tritt besonders stark auf, wenn an beiden Seiten der C-H-Bindung Doppelbindungen vorkommen (bisallylisch). Somit ist beispielsweise die Oxidierbarkeit von Docosahexaensäure (DHA) mit sechs Doppelbindungen in *in vitro*-Experimenten um einiges höher als die von Linolsäure mit zwei Doppelbindungen (Koppenol 1990).

Die Initiierung von Lipidperoxidation wird durch die Anwesenheit von Übergangsmetallen wie Eisen forciert. Zum einen werden vermehrt Hydroxylradikale generiert (siehe Fenton-Reaktion), zum anderen werden Lipidhydroperoxide in Alkoxyradikale (Lipid-O \cdot) gespalten.



Diese haben die Fähigkeit, von PUFAs ein Wasserstoffatom aufzunehmen und so die Lipidperoxidation zu propagieren.



Die aus der Lipidperoxidation resultierende Verringerung der Membranfluidität ermöglicht Phospholipiden, einfacher zwischen den beiden Monolayern der Lipiddoppelschicht zu wechseln (Richter 1987). Außerdem wird die Membran durchlässig für Substrate, die diese normalerweise nicht ohne einen spezifischen Kanal oder Transporter überwinden können. Die Beweglichkeit von Membranproteinen wird durch cross-linking (Vernetzung von Proteinen durch Oxidation von z.B. Thiolgruppen schwefelhaltiger Aminosäuren wie Cystein, die dadurch intra- oder intermolekular quervernetzte schwefelhaltige Brücken ausbilden) (Levine et al. 1996) stark eingeschränkt, und im schlimmsten Fall können Enzyme sowie Ionenkanäle inaktiviert werden (Richter 1987).

Zu den Lipidperoxidationsprodukten wie oxidierten Fettsäureresten und oxidierten Membranproteinen gehören auch Malondialdehyd (MDA), 4-Hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) und Acrolein. Malondialdehyd wird häufig als Marker für Lipidperoxidation verwendet, da es mit Thiobarbitursäure zu einem rosa gefärbten Reaktionsprodukt reagiert und so quantifiziert werden kann. Es entsteht bei der Peroxidation von PUFAs mit mehr als zwei Doppelbindungen und liegt *in vivo* bei physiologischem pH-Wert als freies Enolat-anion vor (Esterbauer et al. 1991). Malondialdehyd zeigt gegenüber Proteinen eine geringe Reaktivität, die mit sinkenden pH-Wert steigt, wobei es dann mit Aminogruppen von Proteinen oder DNA-Basen, bevorzugt Guanin, reagiert und mutagene Schäden hinterlassen kann

(Niedernhofer et al. 2003). Zu den ungesättigten Aldehyden wie MDA gehören auch 4-Hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) und Acrolein (Uchida et al. 1998). HNE entsteht während der Peroxidation von Omega-6-Fettsäuren und reagiert schnell mit Amino- oder Thiolgruppen von umliegenden Proteinen oder anderen Biomolekülen (Parola et al. 1999). Ebenfalls reaktiv ist Acrolein, welches mit DNA-Basen noch schneller reagiert als HNE. Die genannten Aldehyde MDA, HNE und Acrolein können generell von körpereigenen Aldehyddehydrogenasen oxidiert und somit entgiftet werden.

Zu Lipidperoxidationsprodukten gehören auch die Isoprostane (IPs). Sie werden *in vivo* durch die Peroxidation von Phospholipiden generiert und liegen meist verestert vor. Isoprostane sind strukturell dem Prostaglandin sehr ähnlich und bilden sich nur aus polyungesättigten Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Nomenklatur dieser Verbindungen ist abhängig von der peroxidierten PUFA. Aus Arachidonsäure werden F₂-Isoprostane, aus Eicosapentaensäure (EPA) F₃-Isoprostane, und aus Docosahexaensäure (DHA) F₄-Isoprostane erzeugt. Es existiert eine Vielzahl an Isoprostan-Isomeren (64 bei F₂-IPs). Freie Isoprostane besitzen im Vergleich zu den mit Phospholipiden veresterten Formen eine geringe Plasmahalbwertszeit von weniger als 20 Minuten (Halliwell & Gutteridge 2008), werden schnell metabolisiert und im Urin nachweisbar ausgeschieden (Roberts et al. 2005). Isoprostane gelten als sensitivster Marker für Lipidperoxidation und werden in vielen Versuchen zur Quantifizierung des oxidativen Stresses eingesetzt.

1.1.3.2 Proteinoxidation

Proteine können nicht nur von Lipidperoxidationsendprodukten wie den reaktiven Aldehyden MDA, HNE und Acrolein, sondern auch direkt von reaktiven Spezies angegriffen werden. Die Variationen sind vielfältig, da hierbei 20 Aminosäuren oxidativ verändert werden können (Davies 2005). Es wird zwischen Schäden der Seitenkette von Proteinen und Beschädigungen am Proteinerückgrat unterschieden. Bestimmte Aminosäuren wie Cystein, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind besonders empfindlich.

An der Seitenkette von Proteinen finden an aromatischen Aminosäureresten wie Tyrosin oder Tryptophan hauptsächlich Additionsreaktionen mit reaktiven Spezies statt (Davies 2005). Zum Beispiel generiert das initiale Hydroxylradikal Kohlenstoffradikale (wie auch an aliphatischen Aminosäureresten wie z.B. Prolin, Arginin, Leucin), die mit molekularem Sauerstoff Alkoxy- und Peroxylradikale ergeben. Diese entziehen dem benachbarten Reaktionspartner (entweder innerhalb desselben Proteins oder auf ein anderes Protein bezogen) ein Wasserstoffatom und werden dadurch zu Peroxiden, welche dann zu weiteren

Reaktionen fähig sind. Bei Anwesenheit von Übergangsmetallen beschleunigt sich dieser Prozess. Auf diesem Wege entstehen bei der Reaktion von Tyrosin mit Radikalen, durch Oxidation des Rings mittels z.B. dem Hydroxylradikal, Phenoxyradikale (Hawkins & Davies 2001), welche miteinander dimerisieren und ein vernetztes Dityrosin bilden. Dityrosin ist für intra- und intermolekulare Protein-cross-links verantwortlich. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin sind besonders vulnerabel gegenüber vielen reaktiven Spezies. Sie bilden rasch Thiylradikale, dimerisieren zu Disulfiden (bei Oxidation von Cystein) oder reagieren über eine Zweielektronen-Oxidation zu Sulfoxiden (Hauptprodukt von Methionin), die zu Sulfonen weiteroxidiert werden können (Hampton et al. 2002; Taylor et al. 2003).

Das Proteinrückgrat wird oxidativ beispielsweise durch α -Amidierungsreaktionen (Dalle-Donne et al. 2003) gespalten. Dabei wird ein Wasserstoffatom des α -Kohlenstoffs des Proteins durch ein Radikal abgezogen und ein Kohlenstoffradikal gebildet, das unter Sauerstoffeinfluss zum Peroxylradikal wird. Dies kann über eine Iminzwischenstufe durch Hydrolyse zu einer Fragmentierung des Proteinrückgrats führen (Davies 2005). Das Protein kann auch über einen zweiten Weg gespalten werden. In diesem Fall abstrahiert das Peroxylradikal einem benachbarten Molekül ein Wasserstoffatom, wird zum Hydroperoxid, welches zum Alkoxyradikal oxidiert wird und fragmentiert. Auch die Oxidation von Glutamin-Seitenketten führt zur Beschädigung des Proteins (Dalle-Donne et al. 2003).

Die Folge vieler Oxidationreaktionen an Proteinen ist die Ausbildung von Proteincarbonylen (Aldehyde und Ketone) als Endprodukte, die als Maß für oxidativen Stress auf Proteinebene verwendet werden.

Physiologisch existieren jedoch Enzyme und enzymatische Systeme, die oxidativ beschädigte Proteine reparieren (z.B. Methioninsulfoxidreduktasen) oder selektiv abbauen (Proteasom, Lysosomen) (Lee et al. 2001) können und daher primär keine schwerwiegenden Konsequenzen zu erwarten wären (Levine et al. 1996). Ein irreversibler Schaden durch selektive Oxidation an wichtigen regulatorischen Positionen des Proteins kann jedoch, je nach Funktion, zur Beeinflussung der Signaltransduktion von Rezeptoren, oder dem Transport von Enzymen und Proteinen führen.

1.1.3.3 DNA-Oxidation

Oxidativer Stress bewirkt auch DNA-Schädigungen, die sich in Stangbrüchen und chemischen Modifikationen der DNA-Basen und der Desoxyribose äußern. Ähnlich wie bei der Proteinoxidation kann ein direkter Schaden durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen,

oder es wird ein indirekter Schaden durch Endprodukte der Lipidperoxidation wie HNE oder MDA ausgeübt. Zucker und Basen sind gleichermaßen betroffen, und je nach reaktiver Spezies variieren die zahlreichen Oxidationsprodukte. So reagieren DNA-Basen beispielsweise nicht mit Wasserstoffperoxid oder Superoxid (Halliwell & Aruoma 1991). Reaktive Stickstoffspezies gehören ebenfalls zu den Effektoren des oxidativen Stresses. Sie verursachen Desaminierungen von z.B. Cytosin zu Uracil oder Adenin zu Hypoxanthin. Die meisten Oxidationsprodukte jedoch generiert das aggressive Hydroxylradikal. Besonders empfindlich gegenüber oxidativem Angriff ist die Purinbase Guanin, die an Position 8 hydroxyliert (8-OHG) wird und den häufigst gemessenen Marker für oxidativen DNA-Schaden (Wiseman & Halliwell 1996) darstellt. Manchmal wird auch das Nukleosid, 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OHdG), dafür herangezogen. Weitere durch OH^\cdot hervorgerufene Reaktionen sind unter anderem Ringöffnungen von Guanin und Hydroxylierungen der Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Die Quelle des Hydroxylradikals ist schwer zu identifizieren. Es muss direkt im Zellkern produziert werden, da es keine weiten Strecken diffundiert (Pryor 1986; Halliwell & Gutteridge 2008) und mit dem nächstliegenden Reaktionspartner, der DNA, reagieren muss. Die Radiolyse von Wasser ist eine Erklärung der Bildung von OH^\cdot . Eine Nukleuselektivität ist dabei allerdings nicht gegeben, weil ionisierende Strahlung immer die gesamte Zelle beeinträchtigt. Wasserstoffperoxid wird jedoch wegen seiner Eigenschaft zur Reaktion mit Eisen- oder Kupferionen unter Bildung von Hydroxylradikalen nach Fenton als potentiell sehr schädliches Agens diskutiert. Hierbei müsste in direkter räumlichen Nähe zur DNA freies Eisen vorhanden sein, um OH^\cdot im Zellkern zu generieren. Tatsächlich liegt dieses Eisen *in vivo* normalerweise gebunden in Form von Ferritin oder Transferrin im Nukleus vor (Halliwell & Gutteridge 1990). Vermutlich übt oxidativer Stress einen besonderen Druck auf Eisenspeicher aus und führt zur Freisetzung des Übergangsmetalls. Die DNA selbst gilt auch als chelatierendes Agens, welches freies Eisen binden würde (Halliwell & Gutteridge 1990). Wasserstoffperoxid ist außerdem zusätzlich in der Lage aus Hämproteinen Eisen freizusetzen (Gutteridge 1986). So könnte es durchaus zu den nachweisbar stark erhöhten Leveln an Basenmodifikationen durch H_2O_2 kommen.

Desoxyribose und Ribose werden von Hydroxylradikalen zahlreich fragmentiert. Dabei können sich an allen Positionen der Zucker Kohlenstoffradikale bilden, die bei der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff rasch zu Peroxylradikalen weiter reagieren und unterschiedliche Carbonylprodukte ergeben. Auch Kernproteine werden von OH^\cdot attackiert und können als Proteinradikale mit DNA-Basen zu DNA-Protein-Vernetzungen (cross-links)

führen (Altman et al. 1995). DNA-Basenradikale können ebenfalls mit Aminosäureresten reagieren und ergeben beispielsweise Thymin-Tyrosin-cross-links. Ultraviolettes Licht bedingt kovalente Vernetzungen von Pyrimidinen (Dimerisierung) untereinander und steuert durch die Konvertierung von Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal zu anderen Schädigungen bei (Halliwell & Gutteridge 2008).

Viele Forscher gehen davon aus, dass die mitochondriale DNA (mtDNA) besonders von oxidativem Stress betroffen sei. Faktoren wie die räumliche Nähe von mtDNA zur ROS-produzierenden Atmungskette unterstützen diese Annahme. Zudem bildet mtDNA eine größere Angriffsfläche aufgrund fehlender Verpackung durch Histone. Sie besitzt keine Introns, wodurch das zufällige Auftreffen einer reaktiven Spezies eher ein Gen schädigt (Beckman & Ames 1999). Es wird auch vermutet, dass die DNA-Reparatur im Mitochondrium nicht so schnell erfolgt wie im Zellkern, um so die Akkumulation der Schäden der mtDNA zu erklären. Allerdings besteht eine widersprüchliche Datenlage bei Messungen von oxidativem mitochondrialen DNA-Schaden, was eine besondere Vulnerabilität der mtDNA gegenüber Zellkern-DNA nicht mit Sicherheit belegen lässt (Beckman & Ames 1999).

Konsequenzen der allgemeinen DNA-Oxidation sind meist Basenfehlpaarungen, Basenverlust, Punktmutationen und Strangbrüche. Die DNA-Polymerase besitzt allerdings eine sehr hohe Genauigkeit beim Replizieren der DNA. Beschädigte Nukleotide und Basen können vor der Replikation erkannt, herausgeschnitten und ersetzt werden (Nakabeppu et al. 2004). Sollte es durch eine DNA-Polymerase-Fehlfunktion doch zu Basenfehlpaarungen kommen, existieren immer noch Proteinkomplexe, die diese nach der Replikation entfernen (Christmann et al. 2003). Bei Überwiegen der DNA-Schäden, die auch Defekte von Reparaturenzymen und anderen Polymerasen betreffen, wird entweder der Zelltod eingeleitet, oder es kommt zur Tumorgenese (Evans et al. 2004; Mitchell et al. 2005). Ein seltenes, DNA-Reparaturdefekt-bedingtes Krankheitsbild ist Xeroderma pigmentosum. Die Haut ist hierbei besonders sensibel gegenüber Sonnenlicht und das Hautkrebsrisiko sehr hoch, da unter anderem Pyrimidindimere nicht entfernt werden können und die Mutationen zunehmen. Beim ebenfalls sehr seltenen, transkriptions-gekoppelten Cockayne-Syndrom ist neben der Photosensibilität eine verlangsamte neuronale Entwicklung sowie ein mangelndes Wachstum mit beschleunigter Alterung zu verzeichnen (Tuo et al. 2003). Es ist durch einen Defekt der Reparatur von vor allem 8-OHdG und Pyrimidindimeren begründet.

1.1.4 Endogene Verteidigungsmechanismen

Je nach Gewebe stehen der Zelle unterschiedliche Möglichkeiten, sich gegen oxidativen Stress zu verteidigen, zur Verfügung. Mit Hilfe von Enzymen können ROS katalytisch zu weniger schädlichen Spezies umgesetzt werden. Bestimmte Proteine (z.B. Transferrin) ermöglichen eine Bindung von Pro-oxidantien wie Eisen- oder Kupferionen. Zu den besonders wichtigen zellulären Verteidigungssystemen gehören die Superoxiddismutasen (SODs). Die Cu-Zn-Superoxiddismutase (Fridovich 1978; 1995) ist im Cytosol aller eukaryotischen Zellen lokalisiert und besteht aus zwei Proteinuntereinheiten, in denen die aktiven Zentren von Kupfer- und Zinkionen besetzt sind. Die SOD katalysiert die Dismutation von zwei Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, wobei Cu^{2+} die Dismutation ermöglicht und Zn^{2+} das Enzym stabilisiert. Eine zweite SOD, die manganhaltige SOD (MnSOD), ist ebenfalls weit verbreitet in Eukaryoten. Die MnSOD unterstützt die gleiche Dismutationsreaktion, besteht aus vier Untereinheiten und befindet sich hauptsächlich in den Mitochondrien (Fridovich 1995). Das Endprodukt der Superoxiddismutase-Reaktion, H_2O_2 , wird durch Katalasen oder Peroxidasen weiter umgesetzt (Chance et al. 1979). Tierische Katalasen mit ihren vier Untereinheiten und Fe^{3+} in den aktiven Zentren (Reid et al. 1981) bewirken die Disproportionierung von zwei Molekülen H_2O_2 zu zwei H_2O und O_2 . Prinzipiell sind Katalasen in allen Organen vorzufinden, allerdings weniger konzentriert im Gehirn, Herz und Skelettmuskel. Sie befinden sich innerhalb der Zelle in den Peroxisomen (Chance et al. 1979), weil diese selbst H_2O_2 -produzierende Enzyme beherbergen. Mitochondrien beinhalten nur wenig bis gar keine Katalase. Sie sind auf Peroxidasen aus ihrem Umfeld angewiesen, im Besonderen auf die Glutathionperoxidasen (GPx). Diese gehören zu einer Enzymfamilie, deren Subtypen Selen im aktiven Zentrum tragen und je nach Isoenzym im Cytoplasma jeder Zelle (GPx 1), im Darm extrazellulär (GPx 2), im Plasma (GPx 3) oder ubiquitär (GPx 4 in niedrigen Konzentrationen) anzutreffen sind (Brigelius-Flohé 1999). Die Glutathionperoxidase (1-4) kann mit Hilfe von Glutathion (GSH) sowohl Wasserstoffperoxid als auch Lipidhydroperoxide zu Wasser und Hydroxylipid umsetzen. Glutathion wird dabei oxidiert und durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig in einem nachfolgenden Schritt wieder reduziert. Die folgende schematische Abbildung 1.1.4 bietet einen Überblick der enzymatischen zellulären Abwehr.

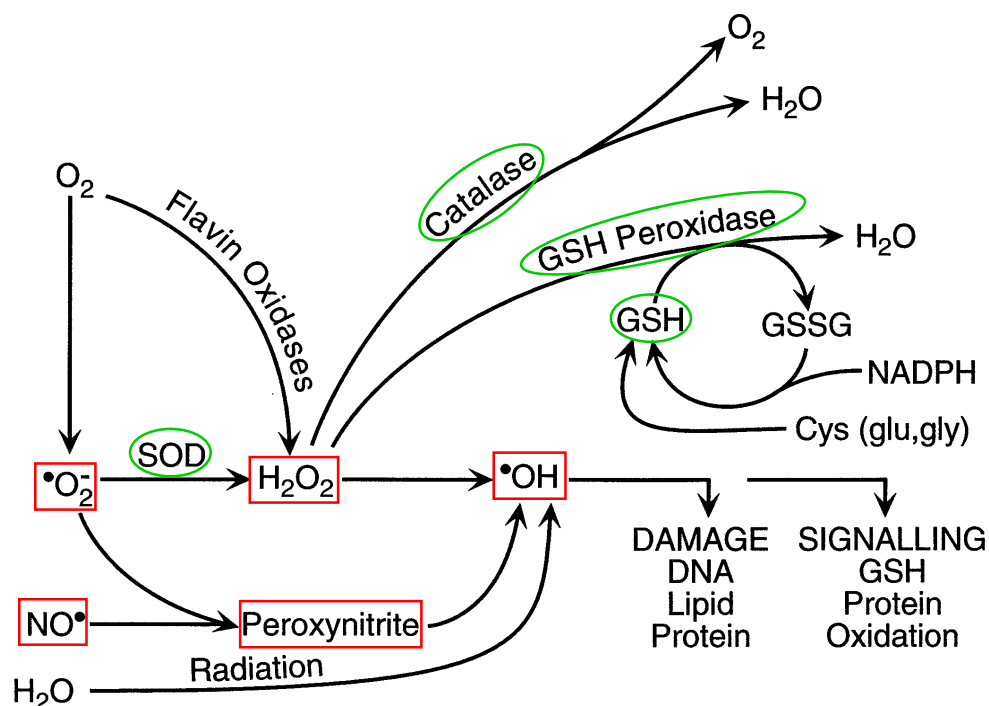


Abb. 1.1.4: Zelluläre Entgiftungsmechanismen von ROS

Rot markiert sind schädliche reaktive Spezies, und grün markiert antioxidative Verteidigungssysteme in Form von Enzymen und niedermolekularen Stoffen. SOD- Superoxiddismutase. GSH- Glutathion, GSSG- oxidiertes Glutathion, Cys- Cystein, glu- Glutaminsäure, gly- Glycin; (nach Maher und Schuber, 2000)

In der Abb. 1.1.4 sind nur einige der wichtigsten Enzyme zur ROS-Entgiftung aufgeführt. Beachtenswert ist auch die Gruppe der Peroxiredoxine. Sie funktionieren als Homodimere, deren redoxaktives Cystein katalytisch H₂O₂ und Peroxide umsetzt. Die dabei ablaufenden Oxidationen der Thiolgruppen von Cystein werden von kleineren Redox-Proteinen, den Thioredoxinen, wieder rückgängig gemacht (Rhee et al. 2005). Peroxiredoxine scheinen mit ihren bisher bekannten sechs Subtypen vermutlich einen noch höheren Stellenwert in der antioxidativen Verteidigung im Gehirn einzunehmen als Katalase und GPx.

Die Zelle verfügt nicht nur über enzymatische Verteidigungsmechanismen, auch niedermolekulare Stoffe kommen gegen reaktive Sauerstoffspezies zum Einsatz. Das zuvor erwähnte Glutathion, ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, dient nicht nur als Cofaktor für die Glutathionperoxidase, sondern unterstützt viele enzymabhängige Redoxreaktionen zur Detoxifikation unterschiedlicher reaktiver Spezies und wird im Cytoplasma aller Zellen generiert. In den Mitochondrien sind 10 bis 20 % des totalen

zellulären GSH vorzufinden (Fernandez-Checa & Kaplowitz 2005), die über spezielle Transporter die Mitochondrien erreichen.

Zu den niedermolekularen antioxidativen Komponenten gehören die Vitamine C (Ascorbinsäure) und E (Tocopherol). Ascorbinsäure ist ein hydrophiles Antioxidans und im Körper extrazellulär eher in der Zerebrospinalflüssigkeit als im Plasma vorzufinden. Intrazellulär am höchsten konzentriert findet man Ascorbinsäure, welche bei physiologischem pH als Ascorbat vorliegt, im millimolaren Bereich im Gehirn (Halliwell 2001; Wilson 2005). Ascorbat wird über einen Symport mit Natriumionen in die Zelle aufgenommen und agiert als Radikalfänger. Das dabei entstehende Ascorbylradikal ist wenig reaktiv und disproportioniert spontan langsam zu Ascorbat und Dehydroascorbinsäure (DHA) oder wird durch diverse membranständige Enzyme wie NADH-abhängiger Reduktasen oder der Thioredoxinreduktase (May et al. 1998) reduziert. Ascorbat unterbricht aber nicht nur selbst die Radikalkettenreaktion, sondern dient auch zur Regeneration des lipophilen Vitamin E (siehe Abb.1.1.5).

Der Begriff Vitamin E umfasst eine Gruppe von vier Tocopherolen (α , β , γ und δ) und vier Tocotrienolen, wird aber im allgemeinen Sprachgebrauch mit α -Tocopherol gleichgesetzt. Tocopherole und Tocotrienole sind die bedeutendsten Lipidperoxidationshemmer, da sie schneller mit Peroxylradikalen reagieren (Abb.1.1.5) und somit die Radikalkettenreaktion terminieren, als Peroxylradikale empfindliche Fettsäureseitenketten oxidieren können (Propagierung). Das α -Tocopherol stellt die effektivste Form in Tieren dar, weil im Organismus nur für α -Tocopherol ein sogenanntes Tocopherol-Transferprotein existiert (Traber & Atkinson 2007), welches für die Aufrechterhaltung des natürlichen Plasmaspiegels verantwortlich ist. α -Tocopherol akkumuliert im Inneren von Membranen und in Lipoproteinen. Mit dem Phytlysubstituenten verankert es sich in der Membran und präsentiert unter anderem die hydrophilere Chromanol-Kopfgruppe mit der Radikal-fangenden phenolischen Hydroxylgruppe an der Oberfläche. Viele klinische Studien beschäftigten sich mit der α -Tocopherol-Supplementation bei neurodegenerativen Erkrankungen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, wobei allerdings nur widersprüchliche Ergebnissen resultierten (Martin et al. 2002). Isoprostane als Marker von Lipidperoxidation konnten teilweise gesenkt werden, aber eine Relevanz der Minderung für die jeweilige pathologische Beeinträchtigung wird dennoch kritisch diskutiert.

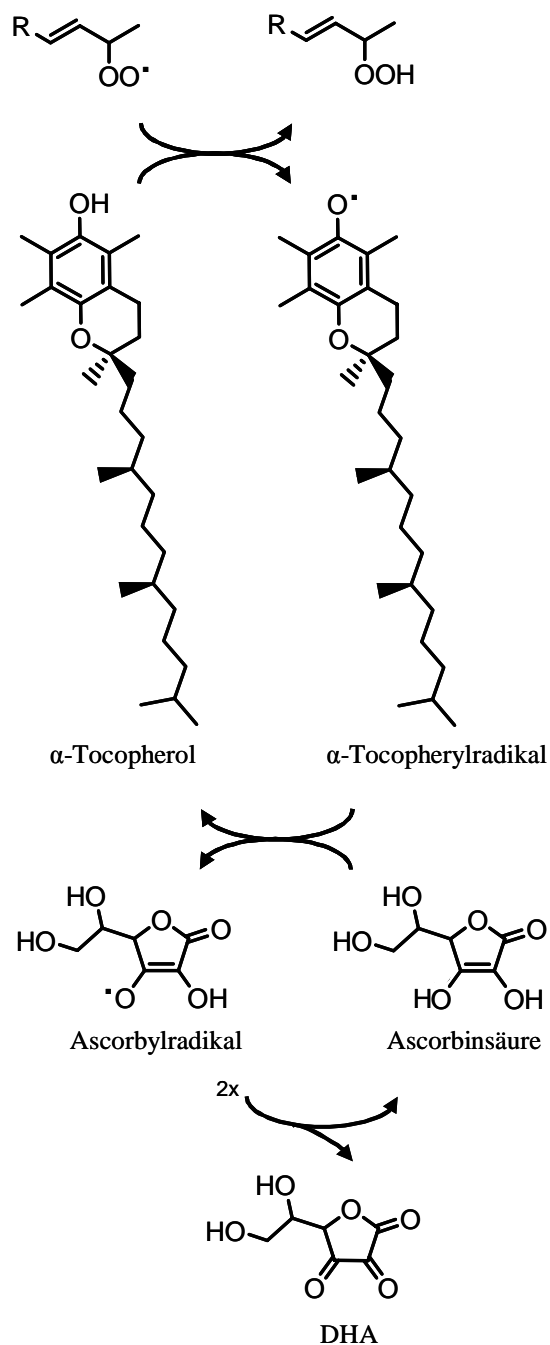


Abb. 1.1.5: Detoxifikation eines Peroxylradikals durch α -Tocopherol mit anschließendem Recycling über Ascorbat

α -Tocopherol gibt sein phenolisches Wasserstoffatom an das Peroxylradikal ab, entgiftet dieses somit und wird dabei selbst radikalisiert. Die bei physiologischem pH vorliegende ionisierte Form der Ascorbinsäure, Ascorbat, übernimmt die radikalische Funktion (Ascorbylradikal), recycelt α -Tocopherol und disproportioniert zu DHA (Dehydroascorbinsäure) und Ascorbinsäure.

1.2 Akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen

Ist das Verhältnis von reaktiven Spezies zu deren Verteidigungssystemen gestört und besteht ein Ungleichgewicht zugunsten der reaktiven Spezies, setzt dies den Organismus unter Stress und unterstützt diverse Erkrankungen, je nachdem, welches Gewebe betroffen ist. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf neurodegenerativen Erkrankungen. Das Gehirn verstoffwechselt ~20 % des basalen Sauerstoffs im menschlichen Körper, um die Energieproduktion in Form von ATP zu gewährleisten. Es ist nicht nur wegen der hohen O₂-Aufnahme besonders vulnerabel gegenüber oxidativem Stress (Halliwell & Gutteridge 2008). Exzitotoxische Aminosäuren wie Glutamat, neuronale Membranen mit besonders hohem Gehalt an Lipiden, die aus sehr vielen polyungesättigten Fettsäuren bestehen, die Anwesenheit von vielen Übergangsmetallen und der relative Mangel an antioxidativer Verteidigung verglichen mit anderen Geweben (Behl & Moosmann 2002), die hohe Konzentration an neuronalen, Superoxid produzierenden Mitochondrien sowie die Gegenwart von bestimmten autoxidierbaren Neurotransmittern wie Dopamin oder Serotonin verstärken die Sensibilität des Gehirns gegenüber O₂ maßgeblich.

Besonders die hohe Konzentration von Übergangsmetallen wie Eisen (Fe) stellt für neuronale Strukturen eine potentielle Gefährdung dar. Vom gesamten Eisengehalt von 4,5 g eines durchschnittlichen männlichen Erwachsenen entfallen 60 mg auf nicht-hämgebundenes Eisen und somit potentiell frei umsetzbares Eisen im Gehirn. Dies betrifft zum Beispiel die intrazellulären Fe-Speicher in Form von Ferritin (Liu & Theil 2005) oder das zirkulierende Eisen-Transportprotein Transferrin (Hentze et al. 2004). Laut Eisenverteilungsstudien im Gehirn variiert die Fe-Konzentration in den verschiedenen Hirnarealen und ist beispielsweise in der *Substantia nigra* besonders hoch (Schenck & Zimmerman 2004; Jenner 2003). Dies könnte die Entwicklung neuronal degenerativer Erkrankungen beeinflussen.

1.2.1 Akute zerebrale Ischämie - Schlaganfall

Bei der zerebralen Ischämie, einer Minderdurchblutung von bestimmten Hirnarealen (fokale Ischämie) oder des gesamten Gehirns (globale Ischämie), sind bestimmte Zellen wie die pyramidalen Neurone des Hippocampus besonders anfällig gegenüber oxidativer Schädigung. Globale Ischämien werden meist durch einen Myokardinfarkt ausgelöst, während die fokale Hirnschädigung durch einen Schlaganfall hervorgerufen wird. Dieser kann durch eine Ruptur eines Blutgefäßes (hämorrhagischer Schlaganfall) oder durch einen Gefäßverschluss (thrombotischer Schlaganfall, 85 % der Fälle) verursacht werden. Die meisten Neurone können laut Tierstudien ca. 30 min eine Minderdurchblutung tolerieren. Das zelluläre Sterben

beginnt innerhalb von Stunden im Kerngebiet des Infarkts, und erst später in der den Kern umgebenden Penumbra nach der Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung des betreffenden Hirnbereichs. Nach dem klassischen Modell wird die plötzlich auftretende hohe Sauerstoffkonzentration im Vergleich zur vorherigen Unterversorgung für erhöhten oxidativen Stress und damit verbundener Apoptose verantwortlich gemacht. Andere Modelle beschreiben das Auftreten des oxidativen Stresses bereits innerhalb der Ischämiephase (Hyslop et al. 1995; Echtay et al. 2002). Eine Störung der ATP-Synthese in den Mitochondrien veranlasst Neuronen zur erhöhten Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat (Choi 2005), welcher durch die übermäßige Aktivierung bestimmter Rezeptoren zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle führt und letztendlich die ATP-Konzentration weiter sinkt. Cyclooxygenase II produziert vermehrt Prostaglandine, und die sekundäre Entzündungsreaktion führt unter anderem durch Azidose zur Eisenfreisetzung aus intrazellulären Speichern, gefolgt vom Anschwellen der Zellen und Ödembildung. Das Hirnödem stellt ein gefürchtetes Symptom der Sekundärreaktion nach Schlaganfall dar und begründet auch, dass die zerebrale Ischämie zur dritthäufigsten Todesursache weltweit gezählt wird (Unterberg et al. 2004). In diversen Tierversuchen konnte nach der Reoxygenierung im murinen Cortex eine erhöhte Konzentration an durch Hydroxylradikale oxidativ veränderten DNA-Basen detektiert werden (Liu et al. 1996). Eine aktuelle Studie von 66 Schlaganfallpatienten demonstriert zahlreiche, signifikant erhöhte sensitive Biomarker von oxidativem Stress wie F_2 -Isoprostan, in einem Beobachtungszeitraum von bis zu 14 Tagen nach dem Infarkt (Seet et al. 2011). In transgenen Mausmodellen, die CuZnSOD oder Glutathionperoxidase überexprimierten, wurde eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit beobachtet (Halliwell & Gutteridge 2008). Eine mechanisch verursachte, neuronale Verletzung wie beim Schädel-Hirn-Trauma setzt ebenfalls eine Kaskade von Sauerstoff-induzierten Schädigungen von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen in Gang (Hall et al. 2010). Die Auswirkungen sind jedoch erst Stunden und Tage nach der primären Verletzung in ihrem ganzen Ausmaß erkennbar.

1.2.2 Morbus Parkinson

Der Untergang von neuronalen Zellpopulationen kann aber auch sehr langsam fortschreiten. Im Falle von Morbus Parkinson degenerieren vorzugsweise dopaminerge Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* im Mittelhirn (Moore et al. 2005). Die meisten Parkinson-Fälle treten sporadisch auf und haben keinen nachweisbaren genetischen Hintergrund. Bei 5 % aller über 85-Jährigen wird die Erkrankung diagnostiziert. Zu den Symptomen gehören

verlangsamte Bewegungen (Bradykinese), Zittern der Extremitäten in Ruhe (Tremor), Muskelsteifigkeit (Rigor) und kognitive Störungen. Zudem lassen sich sogenannte Lewy-Bodies, elektronendichte Einschlusskörperchen, die hauptsächlich aus dem Protein α -Synuclein bestehen, nachweisen. Im Verlauf der Krankheit kommt es zur absoluten Bewegungsstarre (Akinese), und die Patienten versterben. In vergleichenden Studien von Hirngewebe verstorbener Parkinson-Patienten und Gesunden lässt sich erhöhter oxidativer Schaden und das Absterben von Mitochondrien nachweisen (Jenner 2003). Die Verringerung der Komplex I-Aktivität in der Atmungskette im Bereich der *Substantia nigra* scheint hierbei spezifisch zu sein (Blum et al. 2001). Die Dysfunktion der Mitochondrien begünstigt die Generierung vermehrter ROS, das mitochondriale Membranpotential verringert sich und der apoptotischen Zelltod wird eingeleitet (Jenner 2003). Hochdosiertes Coenzym Q₁₀ konnte in einigen Studien einen mäßig positiven Effekt, vermutlich durch Protektion der Mitochondrien, bewirken (Beal 2004).

Da die Erkrankung nur dopaminerge Zellen betrifft, wird eine Verantwortlichkeit des Dopaminmetabolismus vermutet. Tatsächlich werden Dopamin und sein Vorläufermolekül L-DOPA (Levodopa) sehr wahrscheinlich *in vivo* zu chinoiden Strukturen sowie Superoxid und H₂O₂ umgesetzt, was durch Übergangsmetalle erleichtert wird. Eine Dopaminoxidation scheint neurotoxisch zu wirken und wird ebenfalls durch die Anwesenheit von Eisen begünstigt. 6-Hydroxydopamin inhibiert den mitochondrialen Komplex I (Cohen & Heikkila 1984; von Bohlen und Halbach et al. 2004). Man findet zusätzlich einen erhöhten Gehalt von Konjugationsprodukten mit Glutathion in der *Substantia nigra*, was auch auf vermehrten oxidativen Stress hinweist. Die Fragestellung, ob oxidativer Stress eine Konsequenz der Parkinsonschen Krankheit oder eine Ursache ist, lässt sich bis heute nicht eindeutig beantworten. Tierstudien nach zu urteilen, scheint die Glutathiondepletion ein eher frühes Merkmal zu sein, welches die Neurodegeneration langsam vorantreibt (Aoyama et al. 2006).

1.2.3 Die Alzheimersche Erkrankung

Die häufigste altersassoziierte neurodegenerative Erkrankung ist die Alzheimersche Krankheit. Das Risiko, an der häufigeren sporadischen Form zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter. Bis zu 60 % aller Demenzfälle sind auf Morbus Alzheimer zurückzuführen (Ferri et al. 2005). Der Verlust des Kurzzeit-Gedächtnisses, gefolgt von Desorientierung in der Umwelt bis hin zur völligen Wesensveränderung kennzeichnen den progressiven Verfall des Patienten, der letztendlich auf eine Vollzeitpflege bis zum Tod angewiesen ist (Braak & Braak 1997). Die Erkrankung ist durch die frühe Degeneration von hippocampalen Neuronen und

cholinergen Neuronen des mittleren Vorderhirns charakterisiert (Simonian & Coyle 1996). Zu den pathologischen Hauptmerkmalen zählen extrazelluläre Ablagerungen des Amyloid- β -Peptids (senile A β -Plaques) (Selkoe 1991) und intrazelluläre, paarweise angeordnete, helicale Filamente aus hyperphosphoryliertem tau-Protein (neurofibrilläre tangles) (Brion et al. 1985). Plaques finden sich im Allgemeinen in der Amygdala, dem Hippocampus und dem zerebralen Cortex (Braak & Braak 1997). Neben dem vielfach massiv angereicherten, abgelagerten A β ist auch eine Zunahme an löslichem A β im Gehirn zu verzeichnen (Halliwell & Gutteridge 2008). Neurowissenschaftler gehen davon aus, dass A β sich während der Ausbildung der senilen Plaques neurotoxisch auswirkt (Piccini et al. 2005). Hinweise zur Involvierung oxidativen Stresses im Krankheitsverlauf sind Anstiege von DNA-Basenoxidaionsprodukten wie 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) (Wang et al. 2005) und die Zunahme von Lipidperoxidationsmarkern wie Isoprostanen, Proteincarbonylen, Acrolein und HNE (Ahmed et al. 2005) im Hirngewebe und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Das β -Amyloid scheint die Entstehung des oxidativen Stresses mit zu verursachen (Varadarajan et al. 2000; Su et al. 2008). Es fördert die Oxidation unterschiedlicher Biomoleküle sowie von Membranlipiden und Lipoproteinen und ist ebenfalls in der Lage, in Zellen Wasserstoffperoxid zu generieren (Behl et al. 1994). Es wird vermutet, dass der oxidative Schaden nicht zufällige Moleküle betrifft, sondern selektiv Enzyme des Protein- und Energiemetabolismus beeinflusst (Choi et al. 2005; Halliwell 2006). Beispiel hierfür sind die in den Plaques zu findende, oxidativ modifizierte, carbonylierte CuZnSOD (Choi et al. 2005) und das mit dem Lipidperoxidationsprodukt HNE konjugierte, neuronale Glukosetransportprotein GLUT3, das dadurch am Transport von Glucose behindert wird und zu einer Verarmung der Zelle an ATP führt (Mark et al. 1997). In transgenen Tierstudien wurde die Bildung von Isoprostanen im Gehirn vor der Plaque-Ablagerung beobachtet (Praticò et al. 2001), welche als Lipidperoxidationsmarker durch α -Tocopherol reduziert werden konnte (Conte et al. 2004). Kurative therapeutische Maßnahmen für Patienten, die an Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer erkrankt sind, gibt es bis heute keine. Man versucht daher, die Progression der Krankheiten zu verlangsamen, indem der Abbau bestimmter Neurotransmitter medikamentös aufgehalten wird. Eine Alternative stellt die zusätzliche Behandlung mit Antioxidantien zur Neuroprotektion dar. Hierbei fokusierte man sich in der Vergangenheit auf die natürlich vorkommenden Substanzen Ascorbat und α -Tocopherol, allerdings nur mit mäßigem Erfolg (Martin et al. 2002). In der Rotterdam Studie wurden über 5000 Menschen zwischen 55 und 95 Jahren ohne Demenz nach dreijähriger Einnahme von entweder 10 mg/d Vitamin E oder 100 mg/d Vitamin C untersucht, wobei die Autoren zu dem Schluss kamen, dass eine

Supplementation von Vitamin E mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit an Morbus Parkinson zu erkranken korrelierte (de Rijk et al. 1997). Bei einer Querschnittsanalyse der Daten bezüglich der kognitiven Funktion stellte sich keine signifikante Verbindung zwischen der kognitiven Leistungsfähigkeit und der Vitamin E- und C-Gabe heraus (Jama et al. 1996). Sano und Kollegen analysierten placebokontrolliert Patienten mit moderatem Alzheimer, die zwei Jahre lang mit Selegilin (Monooxidase B-Antagonist), mit 1350 mg/d Vitamin E (2000 IU) oder beidem behandelt worden waren (Sano et al. 1997). Die Studienresultate erbrachten eine signifikante Verzögerung des Todeszeitpunktes und des Eintritts von Vollzeitpflegebedürftigkeit, jedoch blieb der kognitive Verfall durch jegliche Behandlung unbeeinflusst. In einer nachfolgenden Studie wurde allerdings diese positive Wirkung von Vitamin E mit einer deutlich höheren Studienteilnehmeranzahl widerlegt (Petersen et al. 2005).

Zusammenfassend scheint die Supplementierung natürlicher Antioxidantien partiell unterstützend zu wirken, zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen bedarf es allerdings spezifischerer Substanzen. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ist eine wesentliche Eigenschaft, die Antioxidantien zur Neuroprotektion aufweisen sollten (Gilgun-Sherki et al. 2001), und im Falle von Vitamin E eher als gering einzuordnen. Exemplarisch werden im folgenden Kapitel einige besonders designte Experimental-Antioxidantien für spezifische Erkrankungen beschrieben.

1.3 Antioxidantien für therapeutische Zwecke

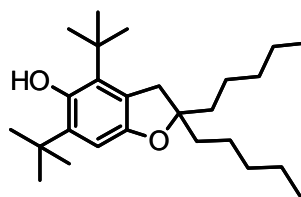
Antioxidative Substanzen lassen sich nach ihrer Wirkungsweise untergliedern in

- a) direkte, radikalkettenunterbrechende Antioxidantien,
- b) indirekte, radikalbildungshemmende Antioxidantien und
- c) metabolische, die zelluläre Fähigkeit, entsprechend auf ROS zu reagieren, unterstützende Antioxidantien.

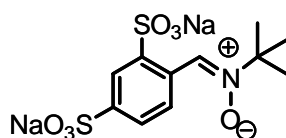
Zu den indirekten Antioxidantien gehört Desferrioxamin (McLachlan et al. 1991), welches durch Komplexbildung von beispielsweise Eisenionen die Generierung von reaktiven Spezies über die Fenton-Reaktion verhindert. Idebenon ist ein Strukturanalogon zu Ubichinon und wird als ZNS-gängiger, antioxidativer Stoff zur metabolischen Mitochondrienstabilisierung verwendet (Weyer et al. 1997). Direkte Antioxidantien reagieren selbst mit reaktiven Spezies, übernehmen die radikalische Funktion im eigenen Molekül und sind Gegenstand dieser Arbeit. Die antioxidative Substanz, BO-653 (Abb.1.3.1) (Cynshi et al. 1998) ist ein Beispiel für das zielorientierte Design von neuen direkten Antioxidantien. Oxidativer Stress spielt, wie

eingangs erwähnt, nicht nur bei neurodegenerativen Erkrankungen, die meist in fortgeschrittenem Alter auftreten, eine maßgebliche Rolle. Auch bei der Arteriosklerose scheint das Low Density Lipoprotein (LDL) durch ROS oxidativ modifiziert zu werden (Palinski et al. 1989) und die Akkumulation von Cholesterin in arteriosklerotischen Plaques in Blutgefäßen zu fördern (Ross 1999). Die zunehmende Gefäßverengung wird durch unterschiedliche Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie (Müller 1938; 1939) unterstützt und führt im schlimmsten Fall zur Gefäßruptur oder zu Ischämie, Herzinfarkt oder Schlaganfall (Takahashi et al. 2002). Da die Oxidation des low-density-Lipoproteins (LDL) als eine Ursache für Arteriosklerose angesehen wird (Steinbrecher et al. 1990), wurde in diesem Bereich ebenfalls nach effektiven Antioxidantien geforscht und die Substanz BO-653 entwickelt. Unter Beachtung der unerwünschten Nebenwirkung (Erniedrigung des positiven Parameters HDL) des zuvor eingesetzten Polyphenols Probuocol und der 10- bis 100-fach erhöhten Reaktivität des α -Tocopherols wurde BO-653 synthetisiert. Es erhielt in *para*-Stellung zur antioxidativen phenolischen Gruppe ein Sauerstoffatom (Abb.1.3.1), um die Dissoziationsenergie des Phenols zu erniedrigen und somit das Radikal zu stabilisieren, sowie zwei lipophile Reste zur Anreicherung im hydrophoben LDL-Partikel (Cynshi et al. 1998). In drei arteriosklerotischen Tiermodellen wurde es erfolgreich getestet (Cynshi et al. 1998) und stellt daher eine vielversprechende Substanz gegen Lipidperoxidation mit klinischem Untersuchungsbedarf dar (Niki et al. 2008).

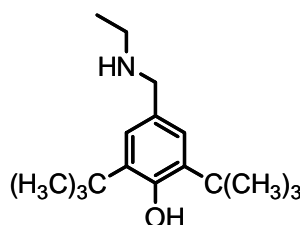
Eine antioxidative Substanz für akuten ischämischen Schlaganfall ist das NXY-059 (Cerovive®) (Abb.1.3.1), welches bereits in eine klinische Phase III-Studie gelangte (Lees et al. 2006). Dieses Nitron (Abb.1.3.1) mit Radikalfängereigenschaft reagiert bevorzugt mit Substanzen mit radikalischem Spin und wird daher auch als spin trap bezeichnet. Es wirkt neuroprotektiv und war im Tiermodell in der Lage, die Hirninfarktgröße zu reduzieren (Kuroda et al. 1999; Sydserff et al. 2002). Eine randomisierte, doppelblind placebokontrollierte Studie mit 1722 Schlaganfallpatienten zeigte nach intravenöser Gabe von NXY-059 innerhalb eines therapeutischen Fensters von sechs Stunden nach Schlaganfall, eine signifikante Verbesserung der Bettlägerigkeit oder andauernde Pflegebedürftigkeit nach drei Monaten (Lees et al. 2006). Die neurologischen Funktionen wurden jedoch nicht positiv beeinflusst. Eine bestätigende Untersuchung mit größerer Patientenzahl wurde unternommen, konnte allerdings nicht das gewünschte Ergebnis liefern und führte zur Einstellung des spin traps als neue Therapieoption beim akuten ischämischen Schlaganfall (Diener et al. 2008).



BO-653



NXY-059



LY231617

Abb. 1.3.1: Chemische Strukturen von neuen Antioxidantien für therapeutische Zwecke

In Modellen zur neuronalen Ischämie wurden noch weitere Antioxidantien getestet. LY231617 (Abb.1.3.1) ist dem bekannten direkten Antioxidans Butylhydroxytoluol (BHT) sehr ähnlich. Die monophenolische Komponente besitzt zusätzlich eine Ethylaminomethylsubstitution in *para*-Stellung zur Hydroxylgruppe (Abb.1.3.1) (Clemens et al. 1993). In zellulären Experimenten zur Hemmung der Lipidperoxidation sowie in Tierstudien zur globalen Ischämie erwies sich das Antioxidans LY231617 als wirkungsvoll (Clemens et al. 1993; Fuson et al. 1999). Es konnte eine halbe Stunde vor Schlaganfallinduzierung oral verabreicht (50 mg/kg), eine Reduktion des hippocampalen und striatalen Schadens um 75 % nach 72 Stunden erreichen. Die intravenöse Gabe verringerte die zelluläre Schädigung um 40 und 50 %. Als unerwünschte Wirkung trat eine Erniedrigung des Blutdrucks um 10 – 15 % (Clemens et al. 1993) auf. Aus diesem Grund wurden vermutlich bisher noch keine klinischen Studien mit LY231617 durchgeführt.

Zahlreiche Phenole wurden ebenfalls auf ihr cytoprotektives Potential *in vitro* getestet. Dabei versprach man sich von Polyphenolen wie Flavonoiden (Quercetin, Resveratrol, etc.) aufgrund ihrer mehreren funktionellen Hydroxylgruppen eine besonders hohe Wirksamkeit.

Substanzen mit monophenolischer Struktur zeigten jedoch oft niedrigere halbmaximale effektive Wirkkonzentrationen im Zellkulturmodell (EC_{50} -Wert von 4-Dodecylphenol $1,5 \mu\text{M}$ (Moosmann et al. 2001; Behl & Moosmann 2002). Das korrespondierende Amin 4-Dodecylanilin oder Diphenylamin, welches über eine Aminbindung zwei aromatische Ringe verknüpft, waren noch effektiver ($EC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$). Für Phenothiazin lag die halbmaximale Wirkkonzentration bei 20 - 30 nM im MTT-Zellüberlebensexperiment (Moosmann et al. 2001). Auf dem Feld der Schlaganfallforschung wurde bereits 1992 ein Phenothiazinderivat aufgrund seiner protektiven Eigenschaften bei globaler und fokaler zerebraler Ischämie im Rattenmodell eingesetzt und konnte die postischämisch oxidativ vermittelte Lipidperoxidation im Rattenhirn verringern (Yu et al. 1992).

Im folgenden Kapitel wird diese besondere Substanz Phenothiazin in unterschiedlichsten medizinischen und nicht-medizinischen Bereichen bis hin zur noch heute gegenwärtigen Anwendung als Neuroprotektivum näher beleuchtet.

1.3.1 Phenothiazine

Phenothiazin wurde erstmals von dem deutschen Chemiker Heinrich August Bernthsen im Jahre 1887 synthetisiert und beschrieben. Zwei Jahre zuvor hatte er die detaillierte Struktur des Farbstoffs Methylenblau (Abb.1.3.2) (Bernthsen 1883) untersucht. Diesen Farbstoff, der ein Derivat von Phenothiazin darstellt, verwendete unter anderem Paul Ehrlich für seine Blutausschlag-Anfärbungen von Plasmodien. Geleitet von der Idee, dass eine spezifische Färbung eine spezifische Bindung und damit eine spezifische Toxizität bedingen könnte, behandelte Ehrlich im Jahre 1891 erstmals zwei Malaria-Patienten mit Methylenblau (Guttman & Ehrlich 1891). Während seiner Färbungen von unterschiedlichen Geweben beobachtete er zufällig die Redoxaktivität von Methylenblau. Gewebe wie Lunge und Leber reduzierten Methylenblau im Organismus zu seiner farblosen Leukoform. Diese farblosen Gewebe wurden *ex vivo* unter Luftsauerstoffeinwirkung wieder nach blau oxidiert (Ehrlich 1885).

In den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts fand Phenothiazin vermehrt Anwendung als Insektizid im Obstanbau (Howard et al. 1935). Die dabei beobachtete fungizide und antibakterielle Wirkung von Phenothiazin führte zum therapeutischen Einsatz bei einfachen Harnwegsinfekten im Menschen (DeEds et al. 1939). Noch heute werden Phenothiazinderivate im Hinblick auf ihre antibakterielle Potenz gegenüber Mykobakterien, welche Tuberkulose auslösen, (Yano et al. 2006; Madrid et al. 2007) sowie zur Antibiotika-

Sensibilisierung von Antibiotika-resistenten Staphylococcus- und Streptococcus- Stämmen untersucht (Kristiansen et al. 2007).

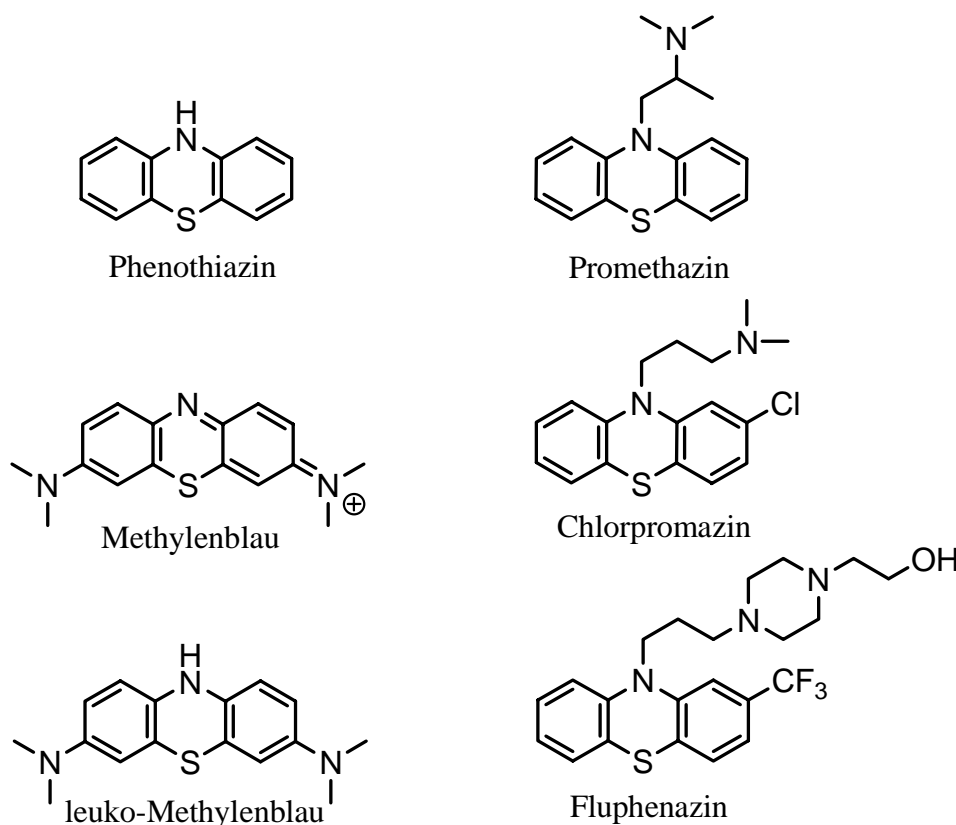


Abb. 1.3.2: Chemische Strukturen von Phenothiazin und einigen Derivaten

Ende der 1930er Jahre wurde eine besondere anthelmintische Aktivität von Phenothiazin entdeckt. Zwischen 1939 und 1943 führte der Einsatz gegen parasitische Nematoden in Schafen, Schweinen, Rindern und Geflügel zu einem 3000-fachen Anstieg der jährlichen Produktion von Phenothiazin (Swales 1939; 1940; Mitchell 2006). Aufgrund der erfolgreichen Behandlung von Tieren wurde Phenothiazin auch bei humaner Rundwurminfektion angewendet. Die Einführung der sogenannten „Wurmschokolade“ war ein Meilenstein in der Behandlung von parasitärem Fadenwurmbefall. Mechanistisch geht man davon aus, dass *in vivo* oxidierte Metabolite von Phenothiazin wie hydroxyliertes Phenothiazin mit der Redoxregulierung des Wurms interferieren. Hydroxylphenothiazin besitzt drei stabile Redox-Formen, das Phenothiazinradikal, das reduzierte leuko-Phenothiazon und das chinoide Phenothiazon (Abb. 1.3.3). Diese Metabolite können für den

Wurm wichtige Dehydrogenasen inhibieren und so möglicherweise zu einer Störung des intrazellulären Elektronentransports führen. Lähmung oder Tod des Parasiten sind die Folge (Craig et al. 1960). Nach Dosisreduktionen wegen gelegentlich auftretender schwerer Anämien (Malorny 1954) wurde die „Wurmschokolade“ mit 0,2 g Phenothiazin pro Stück in den späten 1950ern durch das nebenwirkungsärmere und anthelmintisch potentere Piperazin abgelöst (Cross et al. 1954).

Seit 1942 finden sich Phenothiazine ebenfalls in der Behandlung von Allergien wieder. Forscher der Rhône-Poulenc-Laboratorien in Paris hatten die antihistaminischen Effekte des Phenothiazinderivates Promethazin (Abb.1.3.2) (Halpern & Wood 1950) entdeckt. Bis heute wird diese Substanz (Phenergan[®]) in den USA als Antiallergikum, Sedativum und Antiemetikum eingesetzt und rezeptfrei verkauft. Die beruhigenden bis sedativen Effekte beruhen auf der Fähigkeit von Promethazin, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und im Gehirn lokalisierte H₁(Histamin)-Rezeptoren zu inhibieren. Dieser zentrale Nebeneffekt wird bei neueren Antihistaminika durch die strukturbedingt fehlende Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität umgangen.

In Paris wurde 1951 ein weiteres Phenothiazinderivat, Chlorpromazin, auf mögliche antiallergische Effekte getestet (Abb.1.3.2). Diese dem Promethazin sehr ähnliche Struktur wies allerdings eine so stark sedierende Potenz auf, so dass sie keinesfalls für den Gebrauch als Antihistaminikum in Frage kam (Burn 1954; Vaughan et al. 1955). Daher wurde Chlorpromazin ab 1954 als Antipsychotikum in schizophrenen Patienten mit einem immensen Therapieerfolg eingesetzt. Heute ist der antipsychotische Effekt von Chlorpromazin mechanistisch weitgehend aufgeklärt. Es handelt sich um einen Antagonismus an D₂-like Dopaminrezeptoren (D₂, D₃ und D₄). Die Phenothiazinderivate imitieren über das planare trizyklische Ringsystem mit einer Seitenkette am zentralen Stickstoffatom und daran substituiertem protonierbaren Stickstoff die Konformation von Dopamin und binden mit höherer Affinität als Dopamin an dessen Rezeptor (Horn & Snyder 1971). Die Bindungskapazität des Chlorpromazins und seiner Abkömmlinge beschränkt sich allerdings nicht nur auf Dopaminrezeptoren. Es werden je nach Substanz unterschiedlich stark ebenso muskarinerge Rezeptoren, α_1 -, H₁-Histamin- sowie 5HT_{2A}-Serotonin-Rezeptoren inhibiert. Trizyklische Neuroleptika vom Phenothiazintyp findet man noch heute in der Therapie von psychischen Störungen.

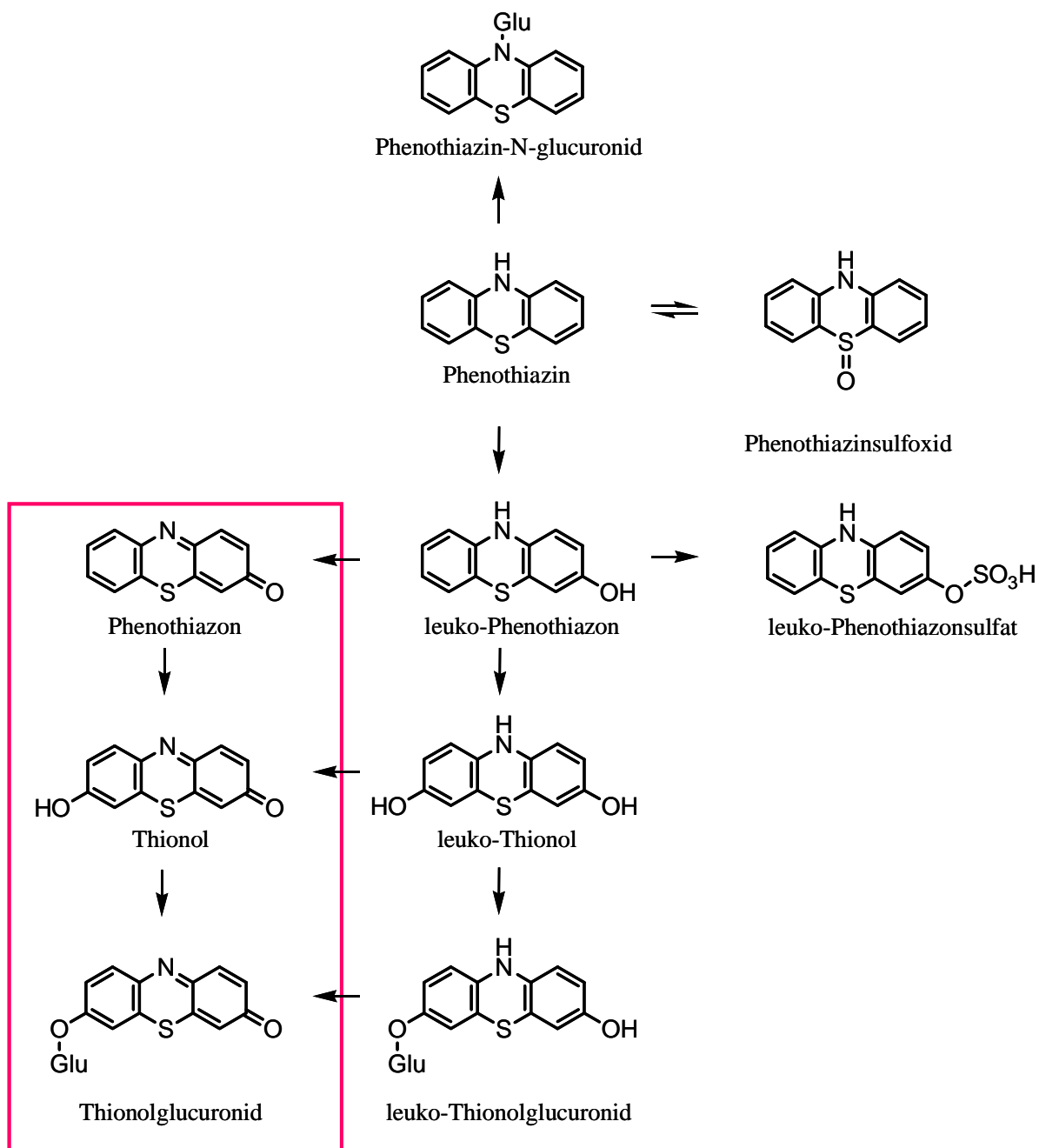


Abb. 1.3.3: In vivo-Metabolismus von Phenothiazin nach Mitchell, 1982

Phenothiazin wird in zwei Oxidationsschritten in *para*-Stellung zum zyklischen Stickstoffatom über das leuko-Phenothiazon (3-Hydroxyphenothiazin) zum zweifach hydroxylierten leuko-Thionol metabolisiert. Im Verlauf des Metabolismus oxidieren diese Komponenten zu farbigen chinoiden Systemen (Phenothiazon und Thionol). Ein weiterer Metabolit ist das Sulfoxid, welches unverändert ausgeschieden wird. Metabolite der Biotransformation sind Phenothiazin-N-glucuronid, leuko-Thionolglucuronid, das farbige Thionolglucuronid und das leuko-Phenothiazonsulfat. Die Abkürzung Glu steht für „konjugiertes Glucuronid“.

Das antioxidative Potential von Phenothiazin wurde Ende der 1940er Jahre im Bereich der Motorenindustrie entdeckt. Das nicht am Stickstoff substituierte Phenothiazin reagiert dabei als Wasserstoff-Donor, wird dadurch selbst stabil radikalisiert und unterbricht somit die Radikalkettenreaktion in Motorölen.

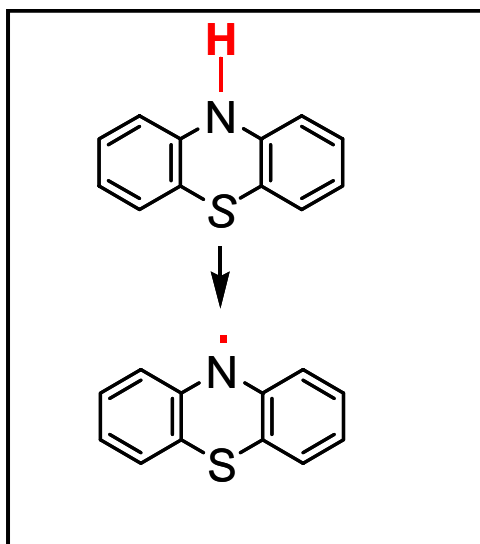


Abb. 1.3.4: Radikalisierung von Phenothiazin

(Abbildung entspricht Abb.5.1.1)

Durch 0,2 % Zusatz des Antioxidans wurde beispielsweise in einem Patent von 1952 synthetisches Schmieröl für Turbojet-Motoren effektiv vor Oxidation geschützt und folglich länger haltbar gemacht (Saunders & Murphy 1952). Die Fähigkeit von Phenothiazin, als resonanzstabilisiertes freies Radikal zu existieren, begründet den Einsatz und die Erforschung in verschiedenen technischen Bereichen, wie zum Schutz von Überlastung in Lithiumionen-Batterien (Buhrmester et al. 2006), in neuen Konstruktionen für Solarenergiespeicher-Elemente (Hu & Kevan 1990) oder als Initiator für photochemische Polymerisationsreaktionen (Crivello 2008).

Oxidativer Stress wird heute als ein entscheidender Faktor in vielen unterschiedlichen pathologischen Prozessen wie Neurodegeneration, Arteriosklerose und Autoimmunerkrankungen angesehen. Die Forschung um neue antioxidative Substanzen als Radikalfänger und Cytoprotektoren stellt einen bekannten Bereich der Biomedizin dar. Aufgrund seiner bereits in den 1950ern entdeckten antioxidativen Kapazität wurde Phenothiazin bereits in diversen Experimenten zu oxidativem Stress als erfolgreicher Lipidperoxidationsinhibitor in

isolierten Rattenhirnlipiden sowie als Neuroprotektor in Zellkultur getestet (Yu et al. 1992). Erst ab dem Jahr 2000 wurden sowohl Schutz vor Glutathiondepletion als auch protektive Eigenschaften durch Phenothiazin sowie durch weitere aromatische Amine in anderen zellulären Paradigmen der oxidativen Neurodegeneration nachgewiesen (Moosmann et al. 2001). Die Entwicklung neuer, verbesserter, antioxidativ wirksamer Substanzen zur Neuroprotektion stellt nach wie vor eine plausible Möglichkeit einer chancenreichen Intervention bei neurodegenerativen Erkrankungen dar.

2 Fragestellung/Ziele

Aufgrund verbesserter medizinischer Versorgung steigt das Durchschnittsalter der Bevölkerung, was wiederum mit der Zunahme von alters-assoziierten, neurodegenerativen Erkrankungen korreliert. Bisher kann man die Symptome der chronischen Neurodegeneration wie Demenz, Tremor oder Bewegungsarmut behandeln. Die genauen pathologischen Ursachen von Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer sind immer noch umstritten. Bei diesen Erkrankungen tritt neuronaler Zelltod auf, der mit einer Zunahme von oxidativem Stress (Simonian & Coyle 1996) in Form von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht und somit ein kausaler Faktor sein könnte. Die Anwendung von endogenen sowie synthetischen Antioxidantien hat bisher, nach erfolgversprechenden *in vitro*-Versuchen und Experimenten im Tiermodell, in klinischen Studien meist nicht die gewünschten Resultate ergeben (Martin et al. 2002; Blacker 2005; Halliwell 2006). Potentielle Ursachen dieser widersprüchlichen Ergebnisse könnten in unzureichender Blut-Hirn-Schrankengängigkeit, in zu kurzen Behandlungsintervallen oder in zu geringen Dosierungen der Prüfsubstanzen liegen (Gilgun-Sherki et al. 2001). Beim Vergleich der physiko-chemischen Eigenschaften bekannter phenolischer Antioxidantien mit Phenothiazin wurden sehr günstige Charakteristika des letzteren im Hinblick auf ZNS-Gängigkeit und neuroprotektive Wirksamkeit beschrieben: Phenothiazin überwindet die Blut-Hirn-Schranke, was bereits 1962 über eine Markierung mit radioaktivem Schwefel gezeigt wurde (Tadros & Wahab 1962). Es wurde jüngst auch in etablierten Modellen der Parkinsonschen Krankheit auf seine protektiven Effekte gegenüber mitochondrialen Toxinen getestet (Hajjeva et al. 2009). Bei der sporadischen Form der Parkinsonschen Erkrankung gilt es als wahrscheinlich, dass dopaminerge Neurone in der *Substantia nigra* durch eine Kombination aus einer Dysfunktion der Mitochondrien mit gleichzeitig gesteigerter ROS-Produktion (Blum et al. 2001) degenerieren. Dies lässt sich mit Reagenzien wie MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) oder Rotenon, die als mitochondriale Atmungskettenkomplex I-Inhibitoren wirken, nachbilden, welche zum Zelltod führen. Bereits 20-60 nM Phenothiazin verhinderten den Zelltod von Neuroblastom-Zellen und schützten primäre Mittelhirnneurone *in vitro* (Hajjeva et al. 2009). In einem transgenen Wurmmodell für Morbus Parkinson (*Caenorhabditis elegans*) bestätigte sich diese Beobachtung. Phenothiazin konnte die durch die Komplex I-Hemmung hervorgerufenen toxischen Effekte verhindern, wogegen N-substituierte Derivate (Chlorpromazin) keine Protektion aufwiesen (Mocko et al. 2010).

Da die Fähigkeit, Radikalkettenreaktionen in Lipidmembranen mit nanomolarer Potenz zu unterbrechen, außergewöhnlich ist, kann Phenothiazin als Leitstruktur für neue Substanzen mit möglicherweise noch höherer antioxidativer Kapazität angesehen werden.

Ziel der projektierten Arbeit war die Generierung und Beschreibung einer antioxidativen Substanz mit einer bisher noch nie erreichten Wirksamkeit in neuronaler Zellkultur.

Ein quantitatives Struktur-Wirkungsbeziehungs-Modell (QSAR-Modell) zur Synthese neuer, effektiverer Phenothiazinderivate wurde mittels Computerberechnungen angewandt. Die cytoprotektive Aktivität einer Substanz konnte somit unter Berücksichtigung quantenchemischer und empirischer Parameter vorhergesagt werden. Hierbei fanden Lipophilie, Radikalstabilisierung und Löslichkeit besondere Beachtung. Nach Synthese von ausgewählten Derivaten sollten die vorhergesagten Resultate dieser neuen Substanzen zunächst in biochemischen Experimenten zur generellen Fähigkeit eine Radikalkettenreaktion zu unterbrechen sowie ein einzelnes großes Protein vor Oxidation und native Hirnlipide vor Lipidperoxidation zu schützen überprüft werden. Desweiteren sollten die Substanzen im Zellkulturmodell auf das Ausmaß ihrer Cytoprotektivität getestet werden, wobei die mechanistische Ursache ihrer Cytoprotektivität im Hinblick auf die Hemmung von Lipidperoxidation und Proteinoxidation bestimmter Zellkompartimente genauer untersucht werden sollte. Das zukünftige Design neuer antioxidativer Therapeutika sollte abschließend mittels durch die Ergebnisse gegebenenfalls verbesserten QSAR-Modells erleichtert werden, um unter Berücksichtigung bestimmter quantenchemischer Eigenschaften, effektivere neuroprotektive Antioxidantien generieren zu können.

3 Material

Für diese Arbeit wurden Chemikalien von Biomol (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Gibco/Invitrogen (Paisley, Schottland) und Bernhagen-Chemie (Bad Homburg) mit dem höchsten Reinheitsgrad erworben, nach Angaben des Herstellers aufbewahrt und verwendet. Die Benzo[x]phenothiazine wurden von Prof. James V. Crivello am Department of Chemistry and Chemical Biology des Rensselaer Polytechnic Institute in Troy, NY, USA, zur Verfügung gestellt.

3.1 Spezielle Chemikalien

2-(Aminomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese
2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese
2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese
2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese
2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese
2-Carboxylphenothiazin	Eigensynthese
2-(Phytilamidomethyl)-phenothiazin	Eigensynthese

3.2 Geräte

Absaug-System „VacuSafe“	Integra, Fernwald
Fluoreszenz-Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Wallac Inc., PerkinElmer, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Labsystems, Ulm
Mini-PROTEAN 3, Western-Blotting-System	BioRad, München
Präparierbesteck	FineScienceTools, Heidelberg
Spektrophotometer	Beckman, München
Swing-Out Rotor TLS 55	Beckman, München
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Schmelzpunktmessgerät SMP 10	Stuart, Stone, Staffordshire, UK
Trans-Blot-Blottingapparatur	BioRad, München
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman, Krefeld

Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen
ChemOffice 2005 Software	CambridgeSoft, Cambridge, UK
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Schwabach
micro-PET Focus 220	Siemens, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
HPLC Dionex P680	Dionex Softron, Germering

3.3 Zellen

3.3.1 Klonale Zellen

In diesem Projekt wurde mit der etablierten Zelllinie HT-22, immortalisierten, murinen, hippocampalen Neuronen, gearbeitet.

3.4 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden von der Firma GIBCO/Invitrogen bezogen. Das verwendete fötale Rinderserum (FBS) wurde zuvor 30 min bei 56 °C Hitze-inaktiviert.

Kulturmedium für HT-22-Zellen

DMEM, (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)
 50 ml FBS (inaktives fötales Rinderserum)
 5 ml AA (Antibiotika-Antimykotika-Mix aus 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin)
 5 ml Pyruvat (100 mM)

3.5 Lösungen für biochemische und zellbiologische Assays

Solubilisierungs-Lösung für Zellen

40 % (w/v) Dimethylformamid
 10 % (w/v) SDS
 pH 4,0 (Eisessig)

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid -Lösung

5 mg/ml MTT in ddH₂O

 5 % Trichloressigsäure in 1 M Eisessig
 0,5 % Thiobarbitursäure in 10 mM NaOH
 20 mM DCFA (2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat) in Ethanol
 7 mM ABTS (Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure) in ddH₂O
 10 mM K₂S₂O₈ (Kaliumperoxodisulfat) in ddH₂O

10 nM B-Phycoerythrin in PBS

10 mM AAPH (2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid) in ddH₂O

3.6 Puffer und Lösungen für die Proteinanalytik

10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄ x H₂O

18 mM KH₂PO₄

pH 7,4 (NaOH)

10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

0,25 M Tris-Base

1,37 M NaCl

27 mM KCl

pH 7,4 (HCl)

Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN 20 (TBST)

1x TBS

0,05 % (v/v) TWEEN 20

pH 7,4

3x Lysispuffer (denaturierend)

10 % (w/v) Saccharose

2 % (w/v) SDS

62,5 mM Tris-HCl; pH 7,4

Homogenisierungspuffer

5 mM Tris-HCl; pH 7,4

1 mM DTT (Dithiothreitol)

1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

100 µM BHT (Butylhydroxytoluol)

10 µl Proteaseinhibitor

10 mM DNPH (Dinitrophenylhydrazin)- Lösung (1:2 v/v in 2 N HCl)

4x Ladepuffer für die SDS-PAGE

200 mM Tris-HCl, pH 6,8

8 % (w/v) SDS

40 % (w/v) Glycerol

0,02 % (w/v) Bromphenolblau

20 % (v/v) β-Mercaptoethanol

10x Laufpuffer für die SDS-PAGE

250 mM Tris-Base
2,5 M Glycin
1 % (w/v) SDS
pH 8,3

Trenngel für die SDS-PAGE

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8
10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (v/v) TEMED
0,1 % (w/v) APS

Sammelgel für die SDS-PAGE

0,15 M Tris-HCl; pH 6,8
3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (v/v) TEMED
0,1 % (w/v) APS

10x Transferpuffer

25 mM Tris-Base
250 mM Glycin
Zugabe von 20 % Methanol bei Herstellung der 1x Verdünnung

1x Ponceau S

0,2 % (w/v) Ponceau S
5 % (v/v) Essigsäure

Blockierungspuffer

2 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBST

3.7 Antikörper

anti-DNP (Invitrogen, Karlsruhe), Kaninchen, monoklonal 1:1000

anti-Natrium/Kalium-ATPase (Acris, Herford), Maus, monoklonal 1:3000

anti-SOD 1 (Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA), Kaninchen, monoklonal 1:1000

anti-Rabbit-HRP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 1:7500

4 Methoden

4.1 Quantenchemische Berechnungen zur Vorhersage der antioxidativen Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten

Das antioxidative Potential von aromatischen Verbindungen wurde näherungsweise mit folgendem Algorithmus berechnet (Moosmann et al. 2001):

$$\ln_{(EC50)} = 1,109 + 0,271 * \Delta H_f + 1,781 * E(LUMO_r) - 0,340 * \log P - 12,687 * \sigma(N)$$

Der EC₅₀-Wert ergab sich demnach aus der Differenz der Bildungsenthalpie ΔH_f von dem gesättigten Molekül zu seiner radikalisierten Form sowie aus der Energie E(LUMO_r) des niedrigst unbesetzten Molekülorbitals der Radikalform. Die Spindichte $\sigma(N)$ am radikalisierten Stickstoffatom floß in die Berechnung mit ein sowie der logP-Wert des Moleküls als Maß der Lipophilie.

Geometrische Optimierungen des Moleküls wurden mit der Chem3D Software Version 9.0 von CambridgeSoft Corporation erstellt. Dieses Programm arbeitet auf Basis der Energieminimierung im Kraftfeld nach Allinger. Mit Hilfe des MOPAC Programms zur AM1 semi-empirischen Kalkulation chemischer Strukturen wurden die Faktoren Bildungsenthalpie H_f , Energie des LUMO_r und Spindichte $\sigma(N)$ ermittelt. Der logP-Wert wurde mittels Inkrementverfahren mit in der Literatur belegten Werten nach der „besten Schätzungsmethode“ über die ChemDraw 9.0 Software bestimmt.

Der natürliche Logarithmus der halbmaximalen effektiven Wirkkonzentration bildete die Grundlage für die Entwicklung der neuen antioxidativen Derivate.

4.2 Chemische Synthesen von ausgewählten Phenothiazinderivaten

Ablauf und Vollständigkeit der Synthesen wurden anhand von Dünnschichtchromatographie und UV-Photometrie verfolgt. Die von der ChemDraw 9.0 Software kalkulierten Molekulargewichte finden sich unter den Reaktionsgleichungen und galten bei der Identifikation als Referenz.

Die synthetisierten Phenothiazinderivate wurden mittels Massenspektrometrie nach der Elektronenstoßionisations-Methode und ¹H-NMR-Spektroskopie im Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz identifiziert.

4.2.1 Herstellung von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin

Die Synthese wurde analog einer typischen Hydrierungsreaktion (Amundsen & Nelson 1951) durchgeführt.

500 mg 2-Cyanophenothiazin wurden in 180 ml Ether vorgelegt und 26 ml 1 M LAH (Lithiumaluminiumhydrid) langsam bei RT zugetropft. Die Reduktion der Nitrilgruppe ging mit Farbänderung der sich bildenden Suspension einher (von dunkelorange bis grün-gelblich während einer Stunde Reaktionszeit). Das Reaktionsgemisch wurde am nächsten Tag mit 30 ml 1 M Salzsäure versetzt, um überschüssiges LAH abreagieren zu lassen. Bei einem pH-Wert von 4-5 (gegebenenfalls Einstellung mit gesättigter Natriumcarbonatlösung) wurde der entstandene feine Aluminiumhydroxid- und Lithiumhydroxid-Niederschlag über einen Papierfilter (Durchmesser 150 mm) abfiltriert und dem Reaktionsgemisch entzogen. Die Etherphase wurde mehrfach mit H₂O und frischem Ether gewaschen, anschließend getrocknet, im Vakuumrotationsverdampfer eingedampft und der feste Rückstand im Exsikkator getrocknet.

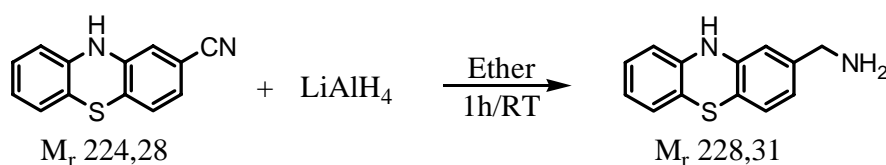


Abb. 4.2.1: Hydrierung von 2-Cyanophenothiazin mit Lithiumaluminiumhydrid zu 2-(Aminomethyl)-phenothiazin

4.2.2 Herstellung von 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin

Die Synthese wurde als nukleophile Substitution (Fincher et al. 1996) durchgeführt.

20 mg 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (0,09 mmol) wurden mit 0,09 mmol Pyridin und 0,09 mmol Butansäurechlorid in 10 ml DMF bei 0 °C zur Reaktion gebracht. Nach Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 50 °C für 2 Stunden und einer Abkühlphase von 24 h wurde mit 35 ml Wasser überschüssiges Fettsäurechlorid inaktiviert. Der entstandene Niederschlag wurde bei 0 °C über eine Glasfritte (Porendurchmesser 10-16 µm) abfiltriert. Dieser Rückstand ließ sich dann in einem heißem Methanol/Wasser-Gemisch (9:1) umkristallisieren. Die auskristallisierte Substanz wurde erneut bei 0 °C abgenutscht und im Exsikkator getrocknet.

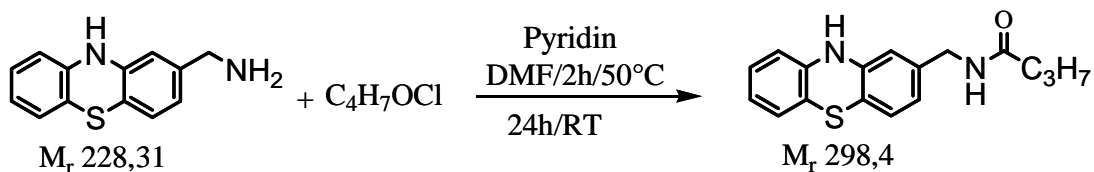


Abb. 4.2.2: Nukleophile Substitution von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Butansäurechlorid zu 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin

4.2.3 Herstellung von 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin, 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin und 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin

Die Synthesen erfolgten wie in 4.2.2 (Fincher et al. 1996) beschrieben analog mit je 0,09 mmol Octansäurechlorid, Laurinsäurechlorid und Palmitinsäurechlorid.

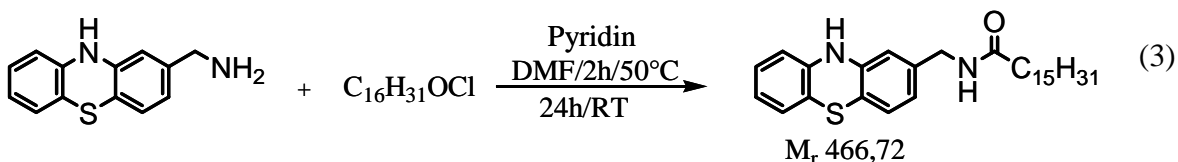
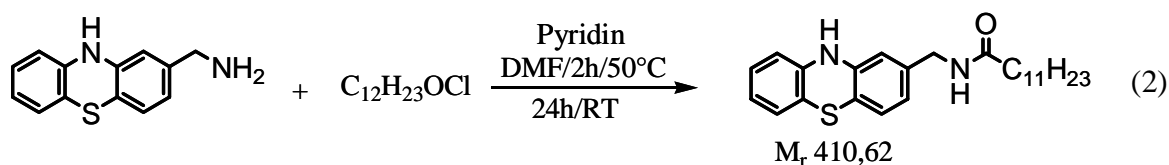
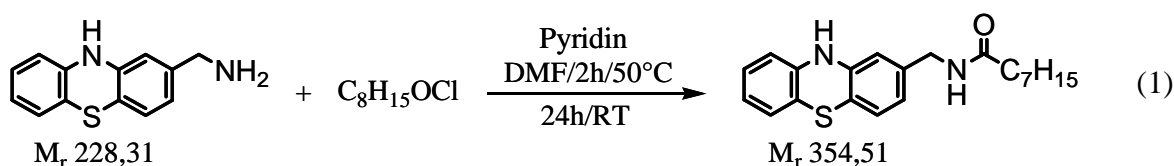


Abb. 4.2.3: Nukleophile Substitutionen von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Octansäurechlorid zu 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (1), von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Laurinsäurechlorid zu 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (2), von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Palmitinsäurechlorid zu 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (3)

4.2.4 Herstellung von 2-Carboxylphenothiazin („NH-Trolox“)

2-Carboxylphenothiazin wurde mittels einer Hydrolyse-Reaktion aus 2-Cyanophenothiazin nach einer modifizierten Vorschrift (Wenner 1950) synthetisiert.

200 mg Cyanophenothiazin wurden in 10 ml 37 % Salzsäure bei RT unter Zusatz von 10 ml Eisessig als Lösungsvermittler gelöst. Nach 24 h Kochen bei 110 °C unter Rückfluß wurde der abgekühlte grüne Niederschlag abfiltriert und chromatographisch über eine Silicasäule mit dem Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol 2:1 aufgereinigt. Die vereinigten substanzhaltenden Fraktionen wurden im Ethanol-Wasser-Gemisch (4:3) umkristallisiert.

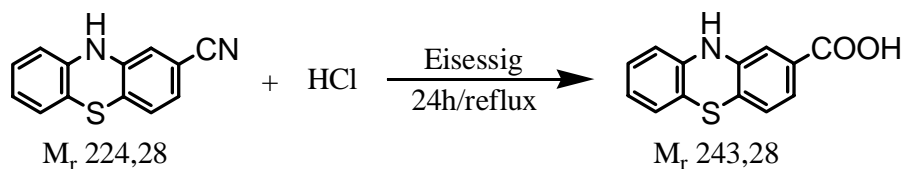


Abb. 4.2.4: Hydrolyse von 2-Cyanophenothiazin zu 2-Carboxylphenothiazin („NH-Trolox“)

4.2.5 Herstellung von 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“)

Die nukleophile Substitutionsreaktion wurde analog der Methode von Anderson et al. (1967) bei -20 °C durchgeführt.

150 mg Phytansäure (0,48 mmol) wurden in 1 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und unter Kühlung mit Trockeneis und Methanol (-20°C) mit 0,48 mmol (1 Äquivalent) Diisopropylethylamin (DIPEA) sowie 1 Äquivalent Ethylchlorformiat versetzt. Nach 20 min wurde das ebenfalls in DMF gelöste 2-(Aminomethyl)-phenothiazin zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Inaktivierung mit H₂O wurde der entstandene gelbweiße Niederschlag mit Ether fraktioniert, eingedampft und aus einem heißem Ethanol/Wasser-Gemisch (2:1) umkristallisiert. Die Trocknung des abfiltrierten Niederschlags erfolgte im Exsikkator.

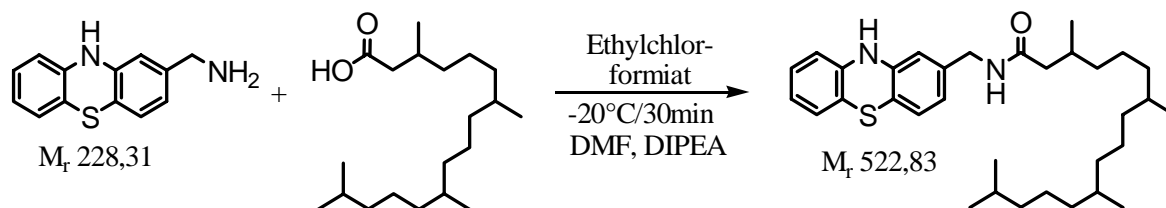


Abb. 4.2.5: Reaktion von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Phytansäure zu 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“)

4.3 Zellkultur

4.3.1 Klonale Zellen

Murine hippocampale, adhärenente Neurone der Zelllinie HT-22 (Davis & Maher 1994) wurden in einem Medium aus DMEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin-Mix und 1 mM Pyruvat bei 37 °C, 100 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Der Zusatz von Phenolrot im Medium diente als pH-Indikator. Nach Erreichen einer 75 % Konfluenz auf einer 10 cm Zellkulturschale wurden die Zellen passagiert. Die Splittung erfolgte unter Verwendung von 2,5 % Trypsin in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).

4.4 Biochemische Assays

4.4.1 TEAC-Oxidationsmessung

Die potentielle antioxidative Kapazität von verschiedenen Substanzen wurde nach der TEAC-Methode (trolox equivalent antioxidative capacity) (Re et al. 1999) bestimmt. Dazu fand das ABTS^{•+}-Radikal-Kation (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) als Oxidationsindikator Anwendung. Das blau-grüne ABTS^{•+}-Chromophor wurde durch eine Reaktion von 7 mM ABTS mit 10 mM Kaliumpersulfat (final 2,45 mM) in wässriger Lösung hergestellt. Die zeitabhängige Erniedrigung der typischen UV-Absorption des Radikals von 0,7-0,8 bei einer Wellenlänge von 734 nm stellte das Ausmaß der antioxidativen Radikalfängereigenschaft einer gelösten Substanz im Vergleich zu einer Troloxlösung gleicher Konzentration dar. Dieser Assay wurde unter ethanolischen sowie unter wässrigen Bedingungen durchgeführt.

4.4.2 B-Phycoerythrin-Proteinoxidation

B-Phycoerythrin ist ein photosynthetisches Protein aus Rotalgen (*Phorphyridium cruentum*) und Cyanobakterien, dessen intensive rote Fluoreszenz bei 572 nm durch radikale Sauerstoffspezies vermindert wird (DeLange & Glazer 1989). Dieser wässrige Proteinoxidations-Assay lässt somit eine Bewertung von antioxidativen Substanzen durch eine verringerte Fluoreszenzlöschung zu.

Es wurden 200 µl einer 10 nM Lösung von B-Phycoerythrin in PBS in einer 96-Well-Platte vorgelegt und die zu untersuchenden Antioxidantien in verschiedenen Konzentrationen dazupipettiert. Als Radikalkettenreaktionsinitiator wurde 500 µM AAPH (2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid) hinzugefügt. Die Proben wurden 6 h bei 37 °C im Multikanal-Plattenlesegerät (Wallac Victor, PerkinElmer) bei einer Exzitation von 340 ± 50 nm und einer Emission von 572 ± 6 nm gemessen.

4.4.3 TBARS-Lipidperoxidation

Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) stellen ein Maß für durch oxidativen Stress hervorgerufene Lipidperoxidation dar. Das hochreaktive Malondialdehyd (MDA) entsteht bei Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs) und bildet mit Thiobarbitursäure ein detektierbares Fluoreszenzsignal. Laut Protokoll (Hajieva et al. 2009) wurden 0,5 mg/ml Rattenhirnlipide, welche zuvor 1 h mit den zu überprüfenden Verbindungen inkubiert worden waren, zur Peroxidationsinitiierung mit 10 µM Fe^{2+} und 200 µM Ascorbat bei Raumtemperatur behandelt. Nach 30 min erfolgte der Reaktionsabbruch durch Hinzufügen einer Stopplösung bestehend aus 1 vol 0,5 %iger Thiobarbitursäure und 2,5 vol 5 % Trichloressigsäure. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 95 °C erhitzt und die denaturierten Proteine bei 10 000 g für 10 min abzentrifugiert. Die Messung der Fluoreszenz des Überstandes wurde im Fluorometer (Wallac Viktor; Exzitation 531 nm, Emission 572 nm) durchgeführt.

4.5 Zellbiologische Assays

4.5.1 MTT-Zellviabilität

Das Zellüberleben nach diversen pharmakologischen Behandlungen kann mit Hilfe dieses kolorimetrischen Assays (Mosmann 1983) sichtbar gemacht werden. Das gelbe wasserlösliche Tetrazol MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von lebenden, metabolisch aktiven Zellen zu einem purpurfarbenen unlöslichen

Formazan reduziert. Die Zellen nutzen für die Reduktion von MTT zu seinem Formazan das der mitochondrialen Atmungskette zugehörige „Succinat-Tetrazol-Reduktase-System“. Dafür müssen die Zellen wie erwähnt metabolisch aktiv sein, um auch nach einer Behandlung mit Stressoren den Purpur-Farbstoff umzusetzen. Somit kann man den Zellschutz bzw. die Cytotoxizität durch die Färbung spektrophotometrisch quantifizieren.

Hierzu wurden HT-22-Neurone in 96-Well-Zellkulturplatten in einer Dichte von 3000 Zellen pro Well ausgesät und mit den zu untersuchenden Derivaten sowie Toxinen (entweder 5 mM Glutamat oder 300 μ M H₂O₂) behandelt. Eine Konzentration von 10 μ l der MTT-Lösung (5 mg/ml) pro Well wurden nach 24 h hinzugefügt und nach weiteren 3 - 5 h im Brutschrank (37 °C, 100 % Luftfeuchte, 5 % CO₂) erfolgte die Solubilisierung der Zellen mit 100 μ l Solubilisierungslösung (siehe Kapitel 3.5). Die Absorption des purpurnen bis blauen Farbstoffs (Formazan) bei 560 nm wurde am nächsten Tag in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ThermoLabsystems) (Lagerung bei Dunkelheit und RT) gemessen.

4.5.2 PI-Plasmamembranintegrität

Die Propidiumiodid (PI) –Färbung gilt als Indikator für die Plasmamembranintegrität. Der rote Farbstoff (PI) durchdringt die zerstörte Membran von toten Zellen und interkaliert in die DNA des Zellkerns, so dass eine mikroskopische Unterscheidung von lebenden und toten Zellen fluorimetrisch möglich wird (Krishan 1975).

Hierzu wurden HT-22 Zellen analog dem MTT-Zellviabilitätstest (siehe 4.5.1) auf 96-Well-Platten ausgesät und behandelt. Nach einer 24 h Inkubationszeit der Zellen mit zu untersuchenden Substanzen und dem Toxin Glutamat (5 mM) wurde für 10 min 1 μ g/ml Propidiumiodid in jedes Well hinzugefügt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop in allen Wells sowohl die toten, rot gefärbten Zellen als auch die lebenden, farblosen Zellen gezählt.

4.5.3 DCFA-Peroxidakkumulation

Der Farbstoff DCFA (2',7'-Dichlorfluorescindiacetat) permeiert in lebende Zellen und wird dort hydrolytisch von Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) gespalten. Dieses kann die Zelle nicht mehr verlassen und akkumuliert. Tritt nun direkter oxidativer Stress (durch Peroxide) auf, wird das nicht fluoreszierende DCF intrazellulär zu dem messbar fluoreszierenden DCF-Farbstoff oxidiert (Bass et al. 1983).

Zu diesem Zwecke wurden 96-Well-Platten mit adhäsiven konfluenten HT-22 Zellen 3 h mit Antioxidantien in 200 μ l/Well phenolrotfreiem und FBS-freiem DMEM-Medium inkubiert (im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte). Eine Konzentration von 5 μ M

DCFA wirkte dann eine weitere Stunde auf die Zellen ein. Es folgte ein Waschschriff mit frischem Indikator- und FBS-freiem DMEM, um nicht in die Zellen eingedrunenes Antioxidans sowie überschüssiges DCFA-Reagenz zu entfernen. Daraufhin wurden 500 μM H_2O_2 hinzupipettiert und direkt die DCF-Oxidation fluorimetisch im Multikanal-Plattenlesegerät (Wallac Victor, PerkinElmer) bei 37 °C quantifiziert. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm, die Emissionswellenlänge 535 nm.

4.5.4 Isoprostan-Lipidperoxidation

Isoprostane bilden sich aus Phospholipiden eines beliebigen Gewebes, welche durch die Einwirkung von Sauerstoffradikalen oxidiert werden. Zu den am genauesten untersuchten Isoprostanen zählen diejenigen, welche aus Arachidonsäure entstehen. Die Isoprostane gehören zu der Gruppe der Eicosanoide und gelten als momentan bester Biomarker für Lipidperoxidation (Janssen 2001).

Um die Bildung von Isoprostanen im zellulären Modell zu untersuchen, wurden konfluente adhäsive HT-22 Zellen (96-Well-Platte) mit frischem DMEM-Medium gewaschen und mit den Antioxidantien für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Stunde Inkubation mit 500 μM H_2O_2 , worauf 50 μl Überstand für einen kompetitiven Enzym-Immuno-ELISA (Kit von Cayman Chemical) abgenommen wurden. Die Proben wurden auf die im Kit enthaltene ELISA-Platte aufgetragen und inkubierten den Kit-Instruktionen folgend 18 h bei 4 °C. Nach 5 Waschschriffen mit Puffer vom Hersteller wurde frisch hergestelltes Ellmann's Reagenz im Dunkeln bei Raumtemperatur hinzupipettiert und für 90 – 120 min inkubiert. Der ELISA beruht auf einer Reaktion von an die Mikrotiterplatte gebundenem 8-Isoprostanspezifischem Kaninchen-Antikörper mit 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase, welche das Ellmann's Reagenz, ein Substrat der Acetylcholinesterase, zu einem gelb-absorbierenden Produkt umsetzt. Die Intensität dieses Produktes ist umgekehrt proportional zum Gehalt an freiem 8-Isoprostan. Die Absorption des Farbstoffes wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ThermoLabsystems) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Detektionsgrenze befand sich bei etwa 5,1 pg/ml.

4.5.5 DNPH-Proteincarbonylierung

Oxidativer Schaden an Proteinen kann mittels Carbonyldetektion nachgewiesen werden (Levine et al. 1990). Die Carbonylgruppen von oxidativ geschädigten Proteinen lassen sich bei saurem pH mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu den korrespondierenden

Hydrazonen derivatisieren, welche nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western Blot mit einem anti-DNP-Antikörper visualisiert und quantifiziert werden können.

4.5.5.1 Isolierung der Proteinproben

HT-22 Zellen wurden bis zu einer Dichte von 70 % in 6-Well-Platten kultiviert und dann mit den zu untersuchenden Antioxidantien 3 h vorinkubiert. Daraufhin wurden 500 μM H_2O_2 für weitere 3 h hinzugegeben. Durch den nachfolgenden Waschschrift mit PBS wurde das Kulturmedium mit Rinderserum entfernt. Im Folgenden wurden zwei Verfahrensweisen zur Gewinnung von Proteinen angewandt.

Zum einen wurde die Reaktion mit 50 μl Lysispuffer (3x) gestoppt und die Zellen lysiert. Die so gewonnenen Gesamtzell-Proteinproben konnten entweder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt oder gleich weiterverarbeitet werden.

Zum anderen wurden die Proteine in Membran- und Cytosolproteine fraktioniert. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschschrift mit PBS in 200 μl Homogenisierungspuffer aufgenommen und 2 μl Proteaseinhibitor-Cocktail (P2714, Simga-Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt. Nach dreimaligem Sonifizieren für 5 Sekunden wurden die Proben bei 100 000 g für 90 min bei einer Temperatur von $4\text{ }^\circ\text{C}$ ultrazentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation bildete die Cytosolfraktion. Das leicht gelbe Pellet mit den enthaltenen Membranproteinen wurde wiederum in 50 μl Homogenisierungspuffer resuspendiert, sonifiziert und wie die Cytosolproteinfraktion bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für folgenden Experimente aufbewahrt.

4.5.5.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung des BCA-Kits der Firma Pierce. Als Referenz diente bovines Serumalbumin (BSA). Es wurden in Doppelbestimmungen je 5 μl Probe (1:10) mit 95 μl BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure) 30 min bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Hierbei werden zweiwertige Kupferionen von Proteinen quantitativ reduziert und der dabei entstehende violette Farbstoff kann bei 560 nm photometrisch im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt und ausgewertet werden.

4.5.5.3 Derivatisierung der Proteincarbonyle

Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ normiert und mit 10 mM DNPH (Dinitrophenylhydrazin) für 20 min bei RT versetzt. Das Hydrazinreagenz reagiert hierbei spezifisch mit Carbonylen, wobei sich unter Wasserabspaltung die entsprechenden Hydrazone

bilden. Die Derivatisierungsreaktion wurde mit einem Äquivalent 3 M Tris-Lösung abgestoppt, worauf die Proben direkt für eine weitere Untersuchung mit der SDS-PAGE verwendet werden konnten.

4.5.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der denaturierenden diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht trennen. Dazu wurde ein Gel aus 2 unterschiedlichen Komponenten gegossen. Hierzu gehören das Trenngel (pH 8,8), bestehend aus 10 % Polyacrylamid, und das Sammelgel (pH 6,8) aus 4 % Polyacrylamid, welches zur Aufkonzentrierung der Proben vor Eintritt dieser ins Trenngel dient. Das fertige Gel wurde in die Gel-Kammer (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Biorad) eingespannt und die Kammer mit 1-fach Laufpuffer gefüllt.

Die derivatisierten Proteinproben wurden mit SDS-haltigem 4-fach Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Der Zusatz von Glycerol im Ladepuffer vereinfachte die Beladung der Taschen durch besseres Absinken der Proben in die Taschen. Als Größenstandard wurde der peqGOLD Protein-Marker IV (prestained) von PeqLab ebenfalls auf das Gel mitaufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von 60 – 80 Volt für das Durchlaufen des Sammelgels und nachfolgend einer Erhöhung auf 130 Volt für das Trenngel wanderten die durch das SDS negativ geladenen Proteinproben zur Anode hin im elektrischen Feld und trennten sich ihrer Größe nach in den Acrylamidmaschen auf.

4.5.5.5 Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wurden sie durch das Western Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hier fand das Wetblot-System „Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell“ von der Firma Biorad Verwendung. Die Nitrocellulosemembran wird dabei wie ein „Sandwich“ auf das Gel, umgeben von Whatmanpapieren und Schwämmchen, gepresst und in die Blotkammer, welche mit 1-fach Transferpuffer mit 20 % Methanol gefüllt ist, hineingeschoben. Anschließend wurden die SDS-Protein-Mizellen bei einer Spannung von 30 V über Nacht bei 4 °C von dem Gel auf die Membran übertragen. Der Transfer und die Beladung wurden mit einer Ponceau S-Färbung nach dem Übertrag überprüft. Für diesen Nachweis ließ man 5 min eine Ponceau S-Lösung auf die Nitrocellulosemembran einwirken und entfärbte danach den Hintergrund mit ddH₂O.

4.5.5.6 Immunologischer Protein-Nachweis auf Western Blot-Ebene

Unspezifische Bindungen an der Nitrocellulosemembran wurden durch das 30 min Einwirken von einer Milchlösung (2 %) entfernt. Nach drei Waschschritten mit TBST für je ca. 10 min folgte die Inkubation des jeweiligen primären Antikörpers (Konzentration siehe Kapitel 3.7) bei 4 °C über Nacht. Die anschließenden drei Waschschrritte mit TBST für 5 min entfernten überschüssigen Primärantikörper. Die Inkubation mit sekundärem horseradish peroxidase (HRP)-gekoppeltem Antikörper erfolgte für 90 min bei RT, woraufhin nach weiteren dreimaligen TBST-Waschungen (5 min) der Blot mithilfe einer Peroxidase-abhängigen Chemilumineszenz-Lösung in einer digitalen Entwicklermaschine („Las 3000“, FujiFilm) detektiert und mit einer Quantifizierungs-Software (AIDA) ausgewertet wurde.

4.6 Präparation von Rattenhirn-Lipiden

Nach Dekapitation einer adulten männlichen Sprague-Dawley-Ratte unter Isoflurannarkose wurde das Gehirn herauspräpariert und in kaltem PBS bei 4 °C die überschüssige weiße Substanz sowie das Cerebellum entfernt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Resthirns durch eine Pinzette. Nach der Homogenisierung des Gewebes in einem vorgekühlten Homogenisator wurde bei 3000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml 0,5 M NaCl resuspendiert, sonifiziert, auf sechs Beckmann-Zentrifugentubes à 1 ml verteilt und 20 min bei 4 °C und 100 000 g ultrazentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml MilliQ H₂O versetzt, sonifiziert und ultrazentrifugiert. Dieser Waschschrtritt erfolgte noch ein weiteres Mal. Anschließend wurden die Gewebeproben gepoolt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Hirnlipide wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

5 Ergebnisse

5.1 Quantenchemische Berechnungen zur Vorhersage der antioxidativen Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten

Bei der Untersuchung von bekannten Antioxidantien zur Neuroprotektion im Hinblick auf ihre physiko-chemischen Eigenschaften fiel häufig auf, dass die allgemeine Wirksamkeit nicht nur von der Fähigkeit, ein Radikal abzufangen, abhängig ist, sondern auch generelle Löslichkeit, Lipophilie und Radikalstabilisierung eine sehr wichtige Rolle spielen (Moosmann et al. 2001). Eine Substanz muss in Gewebsflüssigkeiten bei variablem pH-Wert löslich sein, um zum Wirkort transportiert werden zu können, wobei die Moleküloberfläche wesentlichen Einfluss nimmt. Der Transport ist jedoch auch von einer bestimmten Lipophilie des Moleküls abhängig, da dieses oft auf unselektive Transportmechanismen angewiesen ist. Die allgemeine Wirkfähigkeit, als Radikalfänger zu agieren, bedingt in der Regel die Anwesenheit einer funktionellen H-Atom-abspaltenden Gruppe. Bei α -Tocopherol (Vitamin E) zum Beispiel fungiert die phenolische Hydroxylgruppe als Wasserstoffdonator. Die Eigenschaft, die damit entstehende Radikalfunktion in der Antioxidans-Molekülstruktur entsprechend zu stabilisieren, um eine Weitergabe zu verhindern, fordert ebenfalls besondere strukturelle Voraussetzungen. Experimentelle Arbeiten haben das äußerst hohe antioxidative Potential von aromatischen Aminen (Moosmann et al. 2001) gezeigt. Mit Hilfe bestimmter Molekülcharakterisierender Hauptparameter ließ sich empirisch die Wirksamkeit der Amine in lebenden Zellen annähernd vorhersagen. Am Beispiel der in dieser Arbeit als Basis verwendeten Substanz Phenothiazin soll jene quantenchemische Analyse kurz erläutert werden.

Die Anwesenheit der freien NH-Bindung im Phenothiazin-Molekül ist wie zuvor erwähnt essentiell für die antioxidative Kapazität (Moosmann et al. 2001). Durch die homolytische Dissoziation des H-Atoms kann die Entgiftung eines Radikals erfolgen (siehe Abb. 5.1.1). Hierbei agiert das Imin als H-Atom-Donator für die angreifende radikale Spezies, und die radikalische Funktion wird auf das aromatische π -System des Antioxidans übertragen.

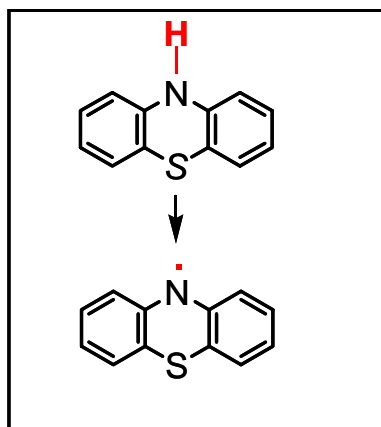


Abb. 5.1.1: Radikalisierung von Phenothiazin

Das entstehende Antioxidans-Radikal wird über die Verbindung der aromatischen, lipophilen Ringe durch ein Heteroatom mit einsamen Elektronenpaaren (in diesem Fall 2 Elektronenpaare bei Schwefel) besonders stabilisiert, und eine Steigerung der antioxidativen Wirksamkeit ist die Folge. Eine Verringerung der LUMOr -Energielevel (Energielevel des niedrigst unbesetzten Molekülorbitals der Radikalform) geht dabei mit einer steigenden kinetischen Stabilität des zu erwartenden aromatischen Stickstoffradikals einher, eine geringere Radikalbildungsenthalpie ΔH_f zeigt eine höhere energetische Stabilität des Antioxidans-Stickstoffradikals an. Die Spindichte $\sigma(N)$ am radikalisierten Stickstoffatom korreliert in dem im Folgenden herangezogenen Modell nur indirekt mit dem antioxidativen Potential (Moosmann et al. 2001). Sie dient als Korrekturfaktor von überbewerteten Einflüssen von ΔH_f und $E(LUMOr)$. Ein steigender Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) gilt als Index für Lipophilie.

Mit Hilfe der empirischen Daten des unterschiedlichen Einflusses der vier Parameter wurden aromatische Phenothiazin-basierte Amine mit verschiedenen Substituenten an Position 2 berechnet. Des Weiteren wurde das aromatische System durch Anellierung eines oder mehrerer Benzolringe vergrößert. Die Berechnungsergebnisse sind in Tab.5.1.1 dargestellt.

Tab. 5.1.1: Empirische Abschätzung des antioxidativen Potentials von aromatischen Substanzen mittels 4-faktoriellem, quantenchemischem Algorithmus

	logP	ΔH_f [kcal/mol]	E(LUMOr) [eV]	$\sigma(N)$	ln(EC50)
Tocopherol	9,98	30,36	0,389	0,047	6,040
Phenothiazin	3,97	26,53	-0,456	0,210	3,476
2-Cyanophenothiazin	3,38	26,78	-0,951	0,214	2,804
2-(Aminomethyl)-phenothiazin	2,39	26,18	-0,483	0,210	3,869
2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin	3,39	35,41	-0,495	0,298	4,891
2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin	5,06	35,34	-0,494	0,298	4,308
2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin	6,73	34,95	-0,478	0,297	3,673
2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin	8,40	34,55	-0,48	0,297	2,993
2-Carboxylphenothiazin	2,90	27,03	-0,964	0,217	2,978
2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin	9,72	26,96	-0,633	0,211	1,309
Benzo[a]phenothiazin	4,34	12,11	-0,538	0,177	-0,287
Benzo[b]phenothiazin	4,34	24,10	-0,529	0,218	2,462
Benzo[c]phenothiazin	4,34	23,39	-0,735	0,185	2,317

ΔH_f - Differenz der Bildungsenthalpie der Radikalform aus der Grundform; E(LUMOr) - Energie des niedrigst unbesetzten Molekülorbitals der Radikalform; logP - Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient; $\sigma(N)$ - Spindichte am radikalisierten Stickstoffatom; ln(EC₅₀) - natürlicher Logarithmus der vorhergesagten halbmaximalen effektiven Konzentration. Der Ec50-Wert wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\ln_{(EC50)} = 1,109 + 0,271 * \Delta H_f + 1,781 * E(LUMOr) - 0,340 * \log P - 12,687 * \sigma(N)$$

Die Erhöhung der Lipophilie führte zu einer verbesserten antioxidativen Kapazität der zu untersuchenden Substanzen. Zum einen wurde dies durch eine Erhöhung des logP-Wertes mittels Substitution von unterschiedlich langen Fettsäureketten wie bei 2-(Butylamidomethyl)-, 2-(Octylamidomethyl)-, 2-(Laurylamidomethyl)- und 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin erreicht. Zum anderen war die Steigerung des antioxidativen Potentials aber auch eine Folge der Erniedrigung von ΔH_f durch die variable Anellierung eines oder mehrerer aromatischer Ringsysteme wie bei Benzo[a], [b] und [c]

phenothiazin. Aus Tab.5.1.1 geht ebenfalls hervor, dass eine Erniedrigung der LUMO -Energie und gleichzeitige Erhöhung der Lipophilie (logP) zu niedrigeren EC_{50} -Werten führen sollte (siehe 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin). Aber auch der Einfluss einer Erniedrigung der Enthalpiedifferenz ΔH_f mit Verringerung der LUMO -Energie bei gleichbleibender Lipophilie schien einen Gewinn an Wirkpotential zu gewährleisten (siehe Benzo[x]phenothiazine). Erweitert man das aromatische System durch Anellierung zusätzlicher Benzolringe, wird nach diesem Modell die Radikalisierungsenthalpie ΔH_f gesteigert und erreicht bei Benzo[a]phenothiazin ein Maximum. Die logP-Werte bleiben aber gleich, unabhängig dessen, an welcher Position der zusätzliche Benzolring anelliert wird. Insgesamt zeigt nach dieser Vorhersage Benzo[a]phenothiazin den effektivsten EC_{50} -Wert.

5.2 Synthese und Analyse von ausgewählten neuen Phenothiazinderivaten

Um diese computerbasierten Vorhersagen der antioxidativen Wirksamkeit experimentell zu überprüfen, wurden ausgewählte Phenothiazinderivate erstmals synthetisiert. Hierbei wurde eine Reihe von Substanzen ausgewählt, welche sich in der Länge der Kohlenstoffketten-Substituenten an Position 2 des aromatischen trizyklischen Phenothiazinringsystems unterschieden (4, 8, 12, 16 Kohlenstoffatome), sowie für Phenothiazin mit einem Phytylrest (ein Tocopherol-Analogon), um Effekte unterschiedlicher Lipophilie für lineare wie verzweigt-kettige Substituenten aufzuzeigen. Die Substanzen 2-(Aminomethyl)-phenothiazin und 2-Carboxylphenothiazin (ein Trolox-Analogon) wurden generiert, um Löslichkeitsdifferenzen und pH-Abhängigkeiten zu analysieren. Zur Einführung der zuvor erwähnten Substituenten war es möglich, als Ausgangsprodukt ein Phenothiazin mit einer Nitrilgruppe an Position 2 (2-Cyanophenothiazin) zu verwenden und dieses zum primären Amin zu reduzieren (Abb.5.2.1). Über nukleophile Substitutionsreaktionen des kationischenamins mit linearen und verzweigt-kettigen Fettsäuren sollten die gewünschten Fettsäurederivate erhalten werden. Eine saure Hydrolyse des Nitrils würde außerdem in leicht zugänglicher Weise das anionische 2-Carboxylphenothiazin ergeben, so die Synthesestrategie.

5.2.1 Herstellung von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin

Die Hydrierung der Nitrilgruppe von 2-Cyanophenothiazin wurde mit dem stark reduzierenden Lithiumaluminiumhydrid (LAH) durchgeführt. Es hydriert selektiv Doppel- und Dreifachbindungen zwischen Kohlenstoff und Heteroatomen und wirkt nicht auf Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (Amundsen & Nelson 1951).

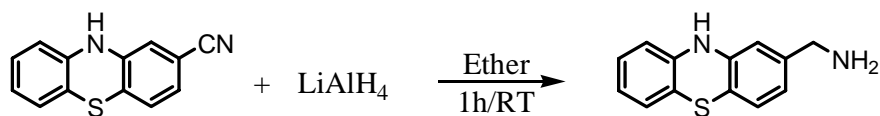


Abb. 5.2.1: Hydrierung von 2-Cyanophenothiazin mit Lithiumaluminiumhydrid zu 2-(Aminomethyl)phenothiazin

Das Derivat konnte eindeutig durch sein ¹H-NMR-Spektrum identifiziert werden. Im Folgenden werden die Charakteristika aller neu synthetisierten Substanzen in kurzer Tabellenform genannt.

Ausbeute:	73-75 %
Aussehen:	hellgelbes bis weißes, leicht metallisch glänzendes Pulver
Masse:	228,1
Schmelzpunkt:	151 °C
¹ H-NMR:	δ (400 MHz; (CD ₃) ₂ CO) 4,25 (2H, s); 6,7-6,97 (7H, m); 7,73 (1H, s)

5.2.2 Herstellung von 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin

Die nukleophile Substitution (Fincher et al. 1996) von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Butansäurechlorid erfolgte in wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) bei 50 °C für zwei Stunden. Um eine Vollständigkeit der Reaktion zu gewährleisten, ließ man das Gemisch weitere 24 h bei Raumtemperatur rühren.

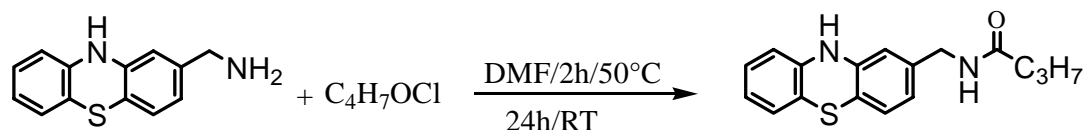


Abb. 5.2.2: Nukleophile Substitution von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Butansäurechlorid zu 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin

Die niedrige Ausbeute von 19,2 % ist vermutlich durch kleine Ansätze (20 mg) und den Substanzverlusten beim Aufreinigen durch Umkristallisation zu erklären, da es durch seinen amphiphilen Charakter nicht gut kristallisiert.

Ausbeute:	19,2 %
Aussehen:	silbrige Nadeln
Masse:	298,2
¹ H-NMR:	δ (400 MHz; (CD ₃) ₂ CO) 0,86 (3H, t); 1,55-1,64 (2H, m); 4,19 (2H, d); 6,62-6,98 (7H, m); 7,31 (2H, s); 7,81 (1H, s)

5.2.3 Herstellung von 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin, 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin und 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin

Diese drei Phenothiazinderivate wurden, wie im Methodenteil 4.2.3 beschrieben, durch eine nukleophile Substitutionsreaktion analog mit Octansäurechlorid, Laurinsäurechlorid und Palmitinsäurechlorid unter Einwirkung von Pyridin (Fincher et al. 1996) synthetisiert und anschließend umkristallisiert und verifiziert.

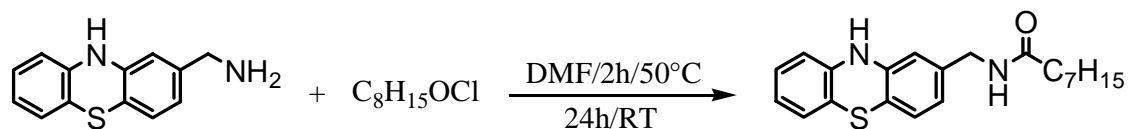
2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin

Abb. 5.2.3: Nukleophile Substitution von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Octansäurechlorid zu 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin

Ausbeute: 27 %

Aussehen: graues Pulver

Masse: 354,3

¹H-NMR: δ (400 MHz; (CD₃)₂CO) 0,84 (3H, t); 1,24-1,27 (8H, m);
1,56-1,60 (2H, m); 2,16 (2H, t); 4,18 (2H, d);
6,63-6,98 (7H, m); 7,3 (2H, s); 7,8 (1H, s)

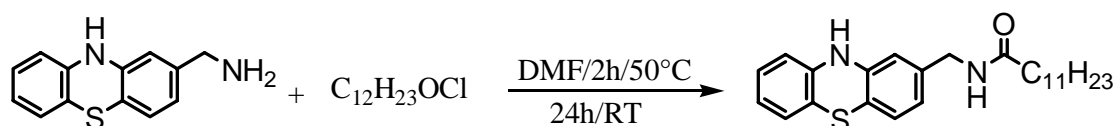
2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin

Abb. 5.2.4: Nukleophile Substitution von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Laurinsäurechlorid zu 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin

Ausbeute: 29 %

Aussehen: graues Pulver

Masse: 410,3

Schmelzpunkt: 121 °C

$^1\text{H-NMR}$: δ (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 0,85 (3H, t); 1,25 (16H, s); 1,57 (2H, t);
2,03 (2H, t); 4,18 (2H, d); 6,62-6,97 (7H, m);
7,3 (2H, s); 7,8 (1H, s)

2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin

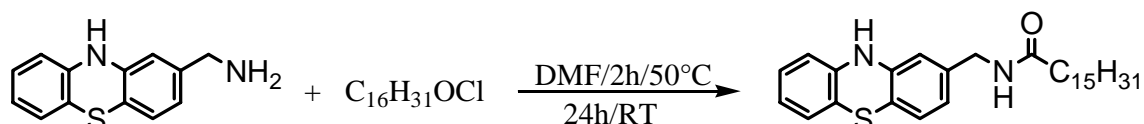


Abb. 5.2.5: Nukleophile Substitution von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Palmitinsäurechlorid zu 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin

Ausbeute: 63,4 %
Aussehen: graues Pulver
Masse: 466,4
Schmelzpunkt: 161 °C
 $^1\text{H-NMR}$: δ (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 0,85 (3H, t); 1,36 (24H, s); 1,58 (2H, t);
2,14 (2H, t); 4,18 (2H, d); 6,62-6,97 (7H, m);
7,3 (2H, s); 7,79 (1H, s)

5.2.4 Herstellung von 2-Carboxylphenothiazin („NH-Trolox“)

Das Carboxylderivat wird im Folgenden auch als NH-Trolox bezeichnet, da es durch die funktionelle Carboxylgruppe dem Trolox nachempfunden ist und formal nur die Trolox-Kopfgruppe durch Phenothiazin ausgetauscht wurde (vgl. Abb.5.3.2). Zur Generierung von 2-Carboxylphenothiazin aus 2-Cyanphenothiazin wurde eine Hydrolysereaktion unter Reflux mit konzentrierter Salzsäure über 24 h durchgeführt.

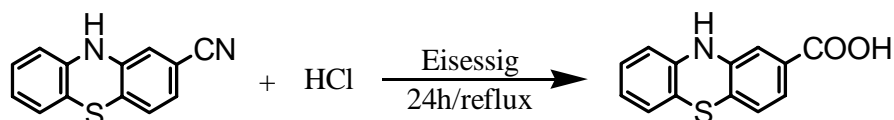


Abb. 5.2.6: Hydrolyse von 2-Cyanophenothiazin („NH-Trolox“) zu 2-Carboxyphenothiazin

Ausbeute: 89,8 %

Aussehen: gelb-grünliches Pulver

Masse: 243,0

Schmelzpunkt: 226 °C

$^1\text{H-NMR}$: δ (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,35 (1H, s); 6,72-7,05 (5H, m); 7,44 (1H, d);
7,99 (1H, s); 10,97 (1H, s)

5.2.5 Herstellung von 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“)

Die Synthese erfolgte ebenfalls als nukleophile Substitution des Naturproduktes Phytansäure an 2-(Aminomethyl)-phenothiazin unter Zuhilfenahme des hochreaktiven Chlorameisensäureethylesters. Dieser bildet zuerst mit Phytansäure ein reaktives Anhydrid, welches nach Zugabe von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin zum Säureamid reagiert. Das Produkt ähnelt durch den verzweigt-kettigen Phitylschwanz dem Tocopherol und trägt statt einer Chromanol-Kopfgruppe das Phenothiazin (vgl. Abb.5.3.2). Daher wurde dieses Derivat in der vorliegenden Arbeit auch NH-Tocopherol genannt.

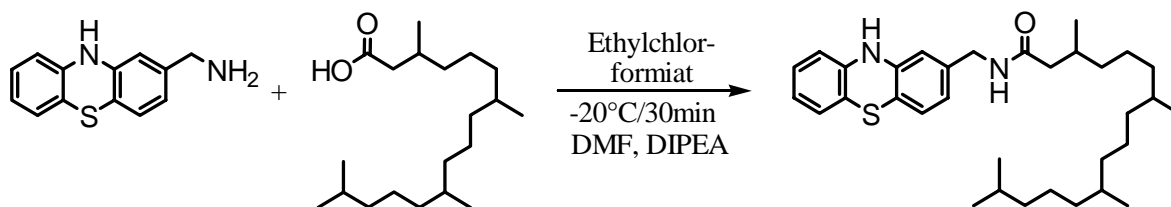


Abb. 5.2.7: Synthese von 2-(Aminomethyl)-phenothiazin mit Phytansäure zu 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin („NH-Tocopherol“)

Ausbeute: 27,1 %

Aussehen:	feines weißes Pulver
Masse:	522,3
$^1\text{H-NMR}$:	δ (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 0,85-0,95 (33H, m); 1,1-1,3 (4H, m); 1,99-2,24 (2H, m); 4,2 (2H, d); 6,68-7,0 (7H, m); 7,82 (1H, s)

5.3 Biochemische Untersuchungen des pharmakologisch-antioxidativen Potentials der neu synthetisierten Phenothiazinderivate

Zur Charakterisierung einer direkt möglichen Reaktion mit Radikalen wurden die neuen Derivate biochemisch mittels TEAC-Assay überprüft. Darauf folgten eine Untersuchung des antioxidativen Potentials während der Proteinoxidation im Experiment mit B-Phycoerythrin sowie die Analyse der protektiven Aktivität bezüglich der Lipidperoxidation in nativen Rattenhirnlipiden. Die einzelnen Substanzen werden weiterhin mit Ziffern bezeichnet (Überblick siehe Abb.5.3.1 bis Abb.5.3.3). In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die Substanzen aus Abbildung 5.3.1 in den verschiedensten Experimenten miteinander verglichen. Die Derivate 2-Carboxylphenothiazin (**8**) und 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin (**9**) wurden im Vergleich zu ihren Analoga Trolox (**8a**) und Tocopherol (**9a**) betrachtet (Abb.5.3.2). Die anellierten Benzo[x]phenothiazine (**10**, **11**, **12**) wurden von Professor James Crivello aus New York zur Verfügung gestellt (siehe Abb.5.3.3).

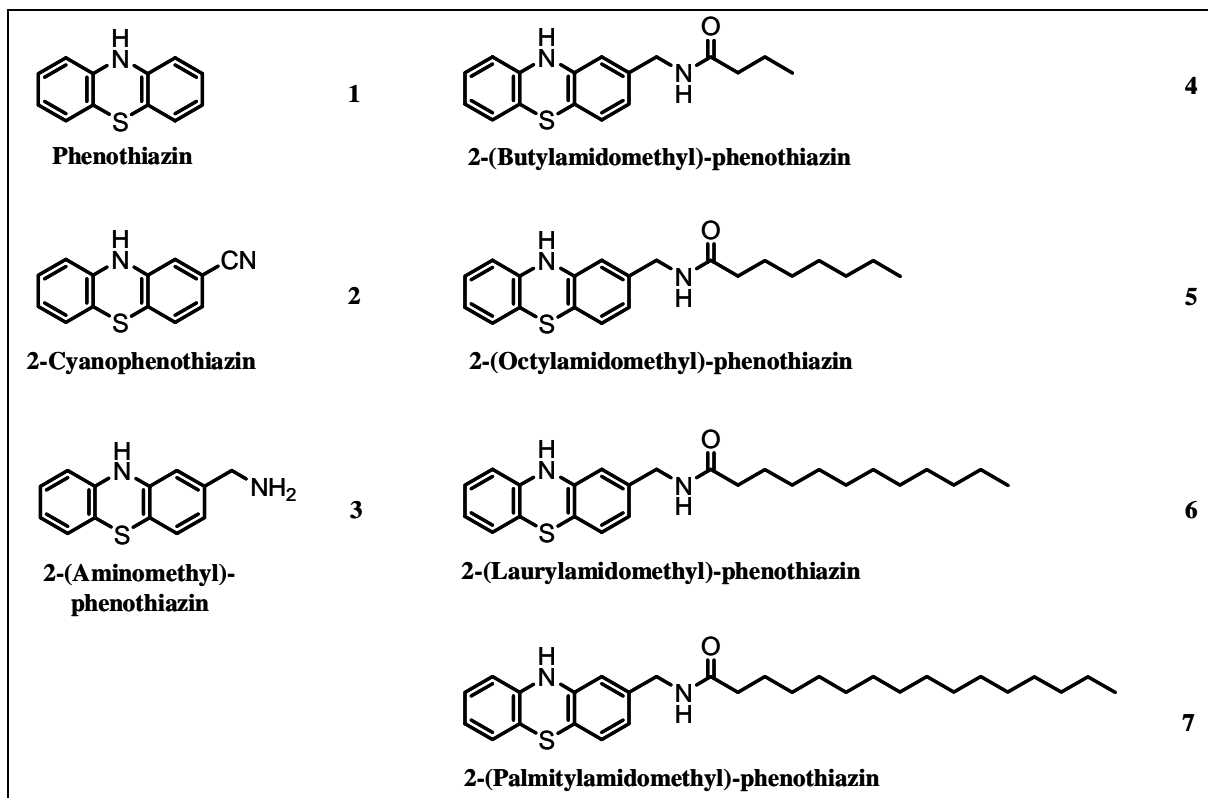
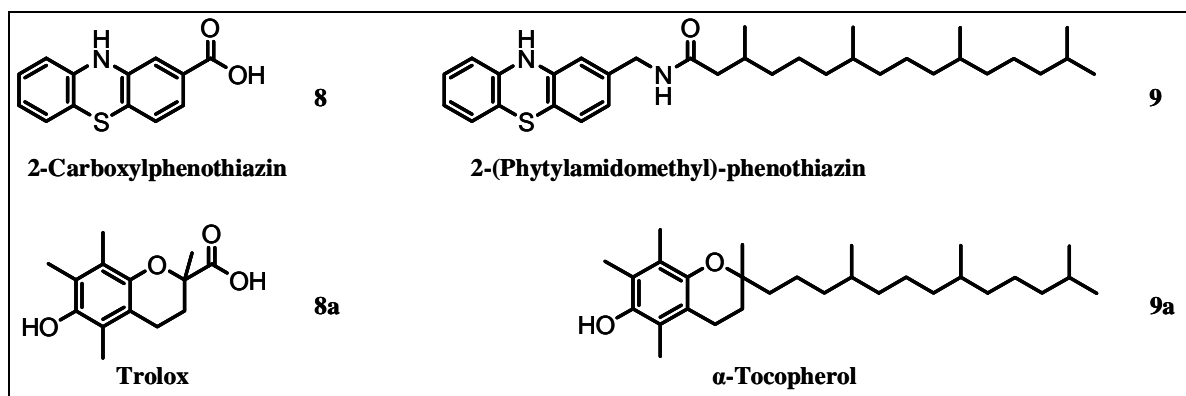


Abb. 5.3.1: Strukturen der verwendeten Moleküle mit numerischer Abkürzung

Abb. 5.3.2: Strukturen der Vergleichssubstanzen zu den bekannten Antioxidantien Trolox und α -Tocopherol (Vitamin E) mit numerischer Abkürzung

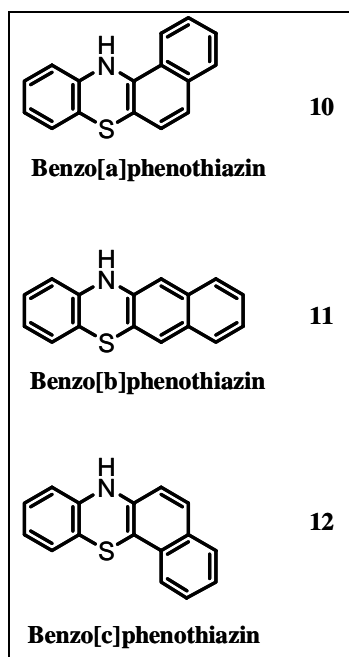


Abb. 5.3.3: Strukturen der benzanellierten Phenothiazinderivate mit numerischer Abkürzung

5.3.1 TEAC-Oxidationsmessung

Die Fähigkeit der direkten Reaktion eines Antioxidans mit einem künstlich generierten Radikal lässt sich gut im Trolox-Äquivalent Aktivitäts-Experiment, kurz TEAC, untersuchen. Hierbei wird die Erniedrigung der Absorption eines grünen stabilen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ - Radikals bei 734 nm durch Einwirkung der zu untersuchenden Antioxidantien gemessen. Nach linearer Regression wurde das Verhältnis der einzelnen Substanzen relativ zur Reaktivität der Referenz Trolox gebildet. Der absolute TEAC-Wert von Trolox ist immer 1. Ergibt sich ein Wert über 1, so stellt dieser eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität gegenüber Trolox dar. Um wasserlösliche und lipidlösliche Derivate untersuchen zu können, wurden wässrige wie ethanolische Bedingungen gewählt. Dazu wurden die Substanzen zunächst in 99 % Ethanol gelöst und dann entweder 1:100 in eine wässrige $\text{ABTS}^{\bullet+}$ - Lösung oder in eine 99 % ethanolische $\text{ABTS}^{\bullet+}$ - Lösung pipettiert.

Tab. 5.3.1: TEAC-Werte der neuen Phenothiazinderivate

	ethanolisch	wässrig
Trolox (8a)	1	1
Phenothiazin (1)	2,05 ± 0,05	1,01 ± 0,01
2-Cyanophenothiazin (2)	1,7 ± 0,3	1,07 ± 0
2-(Aminomethyl)-phenothiazin (3)	1,32 ± 0,12	0,83 ± 0,04
2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (4)	0,70 ± 0,08	0,35 ± 0
2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (5)	0,72 ± 0,03	0,38 ± 0,02
2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (6)	1,62 ± 0,09	0,39 ± 0,02
2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (7)	0,87 ± 0	0,35 ± 0,03
2-Carboxylphenothiazin (8)	1,69 ± 0,11	1,73 ± 0,03
α-Tocopherol (9a)	0,80 ± 0,13	0,65 ± 0,04
2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin (9)	2,74 ± 0,42	1,30 ± 0,10
Benzo[a]phenothiazin (10)	1,55 ± 0,35	1,82 ± 0,28
Benzo[b]phenothiazin (11)	1,60 ± 0,16	0,44 ± 0,03
Benzo[c]phenothiazin (12)	1,15 ± 0,05	1,58 ± 0,18

Die Ausgangssubstanz Phenothiazin zeigt im ethanolischen Milieu eine doppelt so gute antioxidative Kapazität wie Trolox. Auch in wässriger Umgebung erreicht sie die Wirksamkeit der Referenzsubstanz. Von den neuen Derivaten mit unterschiedlichem Fettsäuresubstituenten zeigt sich nur die Substanz mit der C12-Kettenlänge (**6**) im ethanolischen (lipophilen) Bereich besser als Trolox. Im Wässrigen sind alle Moleküle erwartungsgemäß geringer wirksam, was durch die schlechte Löslichkeit der lipophilen Substanzen und durch daraus möglicherweise bedingter Mizellenbildung zu erklären ist. Das Trolox-Analogon 2-Carboxyphenothiazin (**8**) erreicht in beiden Versuchsanordnungen eine höhere Wirksamkeit als das phenolische Trolox (**8a**). 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin (**9**) als Korrelat zum Tocopherol (**9a**) zeigt in beiden Experimenten ebenfalls einen deutlich besseren TEAC-Wert als Vitamin E. Auch die benzanellierte Aromatensysteme der Benzo[x]phenothiazine (**10**, **11**, **12**) stellen sich in wässrigen wie lipophilen Milieu als gut wirksam heraus.

5.3.2 B-Phycoerythrin-Proteinoxidation

Nach dem Nachweis der direkten Radikalfänger-Eigenschaft gegenüber einem zuvor stabil generierten Radikal lag es nahe, auch die Protektionskapazität der Substanzen in Bezug auf induzierte Proteinoxidation zu betrachten. Die Fluoreszenz des roten B-Phycoerythrinproteins aus der Rotalge *Porphyridium cruentum* wurde anschließend im Experiment durch Peroxylradikale, die durch thermische Zersetzung von 500 μ M AAPH (2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidin)-dihydrochlorid) bei 37 °C über Zwischenschritte produziert wurden, vermindert. Eine Verhinderung der Fluoreszenzlöschung über einen Zeitraum von 500 min wurde durch alle eingesetzten Antioxidantien erreicht. Abb.5.3.4 **A** zeigt, dass Phenothiazin (**1**) ab 200 min genauso wirksam wie Trolox ist, obwohl die experimentellen Bedingungen wässrig sind. 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) stellt sich als das beste Antioxidans in **A** heraus. Die in **B** abgebildeten C_x-Derivate haben alle ein zueinander sehr ähnliches Wirkpotential. Nur **7** verhindert die Fluoreszenzlöschung im Vergleich zu den anderen linearen Fettsäure-Derivaten weniger effektiv.

Obwohl dieses Experiment nur im wässrigen Milieu durchgeführt wurde und die lipophilen Phenothiazinderivate hierbei eigentlich erwartungsgemäß nicht so gut abschneiden sollten, erweisen sich die untersuchten Substanzen als zumindest nicht wesentlich unwirksamer als der wässrige Antioxidantien-Standard Trolox. Allerdings lassen sich keine charakteristischen Besonderheiten untereinander ableiten.

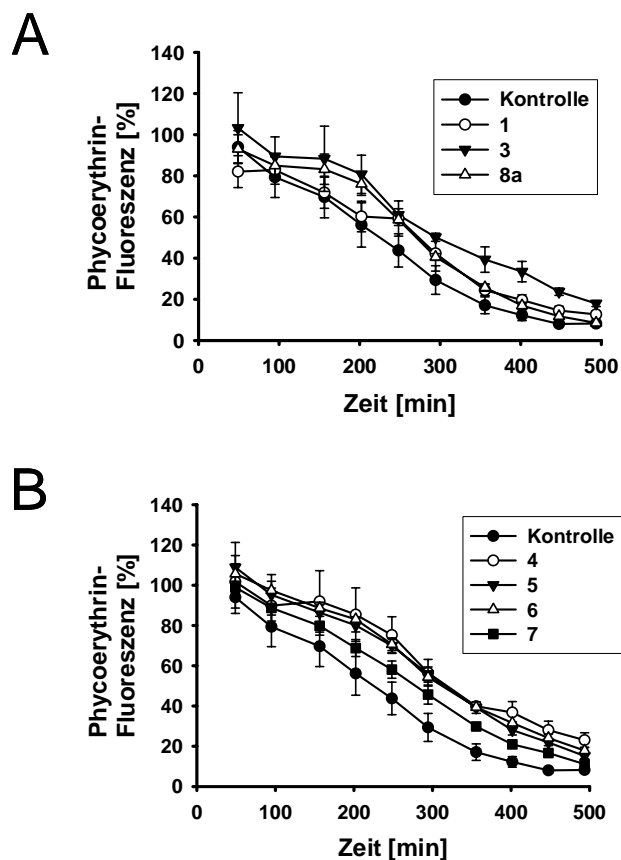


Abb. 5.3.4: Kinetik der Fluoreszenzlöschung von B-Phycoerythrin

Vergleich der Minderung der Phycoerythrin-Fluoreszenz, hervorgerufen durch den thermischen Zerfall von 500 μM AAPH bei 37 $^{\circ}\text{C}$, mittels Phenothiazin (**1**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) und Trolox (**8a**) bei einer Konzentration von 1 μM ($n=4$) in **A** und durch 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (**4**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (**7**) in **B**

5.3.3 TBARS-Lipidperoxidation

Da die Interferenz mit der Proteinoxidation im B-Phycoerythrinassay keine ausgeprägte Abhängigkeit des Antioxidantieneffekts von der Lipophilie der neuen Derivate aufzeigte, sollten die protektiven Moleküleigenschaften in Bezug auf native Rattenhirnlipide untersucht werden. Die Bildung von Malondialdehyd (MDA), das mit Thiobarbitursäure eine detektierbare Substanz (TBARS) ergibt, gilt als Index für Lipidperoxidation nach Einwirkung von oxidativen Stressoren auf Lipide. Die neuen potentiellen Antioxidantien wurden in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μM eingesetzt. In Abb.5.3.5 **A** und **B** wird die

protektive Kapazität nach dem 30-minütigen Einwirken von 10 μM Fe^{2+} und 200 μM Ascorbat gezeigt ($n=2$). Ascorbat wirkt hier in Kombination mit dem Übergangsmetall Eisen pro-oxidativ. Es sorgt dafür, dass Eisen im reduzierten Zustand vorliegt. Das durch die Zwei-Elektronen-Reduktion (siehe Einleitung 1.1.2) von Luftsauerstoff in geringen Dosen spontan entstehende H_2O_2 wird unter Einwirkung des reduzierten Eisens zu Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) umgesetzt (Fenton-Reaktion). Diese initiieren dann die Peroxidation von umgebenden Lipiden. Gleichzeitig fördert das reduzierte Eisen die Lipidperoxidation von bereits vorhandenen Lipidhydroperoxiden. Diese Reaktion macht den Großteil des oxidativen Stresses innerhalb des Experiments aus. Während Substanz **2** und **3** erst bei höheren Konzentrationen (100 nM, 1 μM) effektiv vor Lipidperoxidation schützen, wirkt Phenothiazin (**1**) bereits bei 10 nM protektiv. Bei den Kohlenstoffketten-Derivaten zeigen die Substanzen **4** und **5** mit den kürzeren Substituenten einen vergleichbaren Schutz wie **2** und **3**. Das Derivat **6** mit der C12-Kette an Position 2 des Phenothiazins weist eine Wirksamkeitsminderung auf, während Substanz **7** (Kette von 16 C-Atomen) in keiner Konzentration eine antioxidative Aktivität zeigt.

Dieser Sachverhalt bestand nicht aufgrund mangelnder Löslichkeit bzw. Mizellenbildung der größeren Moleküle. In einem hier nicht gezeigten Experiment wurde während der einstündigen Vorinkubation drei Mal für 20 Sekunden sonifiziert, um die Auflösung von eventuellen Mizellen und eine verbesserte Löslichkeit in wässrigem Medium (PBS) zu gewährleisten. Es resultierte allerdings keine verbesserte antioxidative Effektivität. Daher wurde ein Versuchsablauf über einen längeren Zeitraum (24 h) gewählt, bei dem nach einstündiger Antioxidantieninkubation mit 1 μM die Peroxidation initiiert und nach 1 h, 6 h und 24 h abgebrochen wurde. Auf diese Weise sollte die schützende Fähigkeit der C_x -Derivate bei länger andauerndem oxidativen Stress, ähnlich der *in vivo*-Situation, betrachtet werden. Wie in **C** dargestellt, erreicht **7** nach 6 h eine knapp 60-prozentige Protektion, welche sich auch nach 24 h nicht mehr merklich verbessert. Die drei anderen Derivate halten ihre hohe antioxidative Kapazität über den gesamten Zeitraum stabil. Abb.5.3.5 **D** zeigt den Vergleich zwischen NH-Trolox (**8**) und Trolox (**8a**) sowie zwischen NH-Tocopherol (**9**) und Vitamin E (**9a**). Die einzelnen Substanzen wurden ebenfalls in Konzentrationen eingesetzt, welche das Wirkspektrum erfassten. Das Carboxylderivat **8** weist schon bei 200 nM eine äußerst wirksame Verhinderung der TBARS-Bildung auf, während dies bei **8a** erst bei 20 μM auftritt. Eine über 60-fache Steigerung der Lipidperoxidationsinhibierung kann somit durch Ersatz des phenolischen Grundkörpers von Trolox (**8a**) durch das Phenothiazingrundgerüst erreicht werden. Der Unterschied von α -Tocopherol (**9a**) und seinem Analogon NH-

Tocopherol (**9**) ist ebenfalls stark ausgebildet. Das Phenothiazinderivat lässt bei 1 μM einen Schutz von 90 % erkennen. Vitamin E (**9a**) blockiert dagegen bei 1 μM noch keine Malondialdehydbildung. In diesem Experiment kann bei höchster Konzentration von 20 μM an Vitamin E nur ein 50 % Schutz vor Lipidperoxidation beobachtet werden.

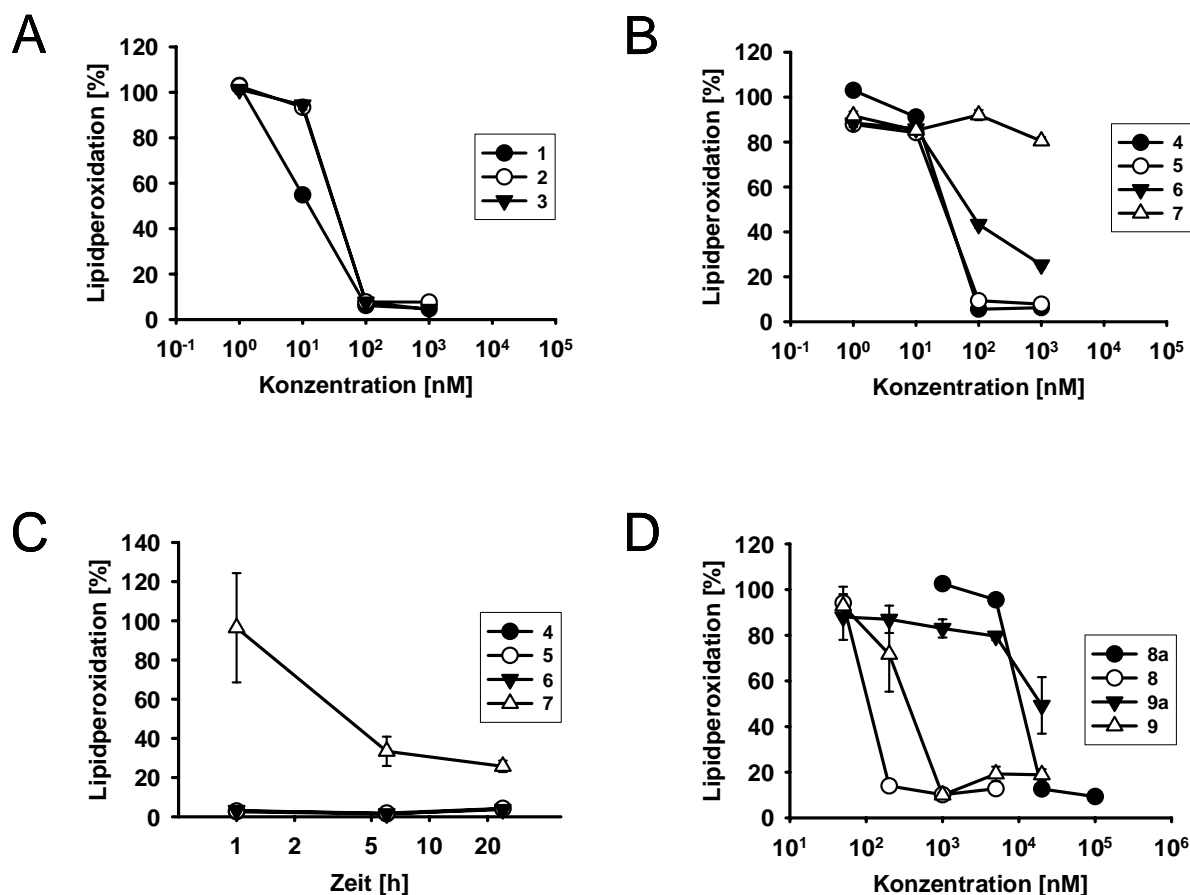


Abb. 5.3.5: Messung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen als Marker der Lipidperoxidation

A- Konzentrationsabhängiges Schutzpotential vor durch 10 μM Fe^{2+} und 200 μM Ascorbat (30 min) induzierter Lipidperoxidation von Phenothiazin (**1**), 2-Cyanophenothiazin (**2**) und 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**); n=2
 B- wie A, 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (**4**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (**7**)

C- zeitabhängige Lipidperoxidation bei 1 μM Antioxidans

D- wie A und B, 2-Carboxylphenothiazin (NH-Trolox) (**8**), Trolox (**8a**), 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin (NH-Tocopherol) (**9**), α -Tocopherol (**9a**)

5.4 Zellbiologische Untersuchungen des antioxidativen Potentials von neuen Phenothiazinderivaten

Nach den allgemeinen, biochemischen Untersuchungen der neuen Phenothiazinderivate zur radikalfängerischen Aktivität in Bezug auf direkte Radikalinteraktion (TEAC), Verhinderung der radikalinduzierten Proteinoxidation (B-Phycoerythrin) sowie Protektion vor Lipidperoxidation (TBARS), sollte in Annäherung an die *in vivo* Situation das antioxidative Potential nun auf komplexer, zellulärer Ebene analysiert werden. Hierzu wurden klonale, hippocampale HT-22 Neurone aus der Maus verwendet. Diese bereits etablierte Zelllinie wurde durch SV40-Transformation aus primären Neuronen eines Maushippocampus gewonnen. Da die Substanzen besonders in Bezug auf Neuroprotektion analysiert werden sollten, wurde diese neuronale Zelllinie ausgewählt. Ein Charakteristikum ist die Abwesenheit von ionotropen Glutamatrezeptoren (Maher & Schubert 2000).

5.4.1 MTT-Zellviabilität nach Toxinexposition

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen zwei Arten von Glutamat-vermitteltem Zelltod – der Rezeptor-initiierten Exzitotoxizität und der nicht Rezeptor-vermittelten oxidativen Glutamatoxizität. Bei einer unphysiologisch hohen Konzentration an Glutamat an der Postsynapse bzw. im synaptischen Spalt spricht man von Exzitotoxizität. Hierbei führt der exzessive Calciumeinstrom durch den glutamataktivierten NMDA-Rezeptor-Ionenkanal zu verschiedenen zellulären Antworten, welche in einer vermehrten Produktion besonders der mitochondrialen ROS resultieren und letztlich den Zelltod einleiten (Murphy et al. 1950; Schubert & Piasecki 2001). Da HT-22 Neurone keine ionotropen Glutamatrezeptoren (z.B. NMDA-Rezeptoren) exprimieren, können diese nicht durch Glutamat aktiviert werden. In diesem Zellmodell jedoch wird durch die Blockade des Cystin/Glutamat-Antiporters mittels hohem extrazellulären Glutamat eine oxidative Glutamatoxizität erreicht. Es kommt dabei zur Inhibierung der Cystin-Aufnahme in die Zelle, wo Cystin als oxidierte Form von Cystein essentiell in der Glutathionsynthese vorhanden sein muss. Durch den „Eduktmangel“ sinken die Level des intrazellulären Antioxidans Glutathion. Die Glutathiondepletion bedingt nur einen 5- bis 10-fachen Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies. Erst in der zweiten Phase der oxidativen Glutamatoxizität führt eine Sekundärreaktion der mitochondrialen Atmungskette zu 200- bis 400-fach erhöhten ROS-Werten (Tan et al. 1998). Das Gleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien verschiebt sich zu zugunsten der reaktiven Spezies, und der

vermehrte oxidative Stress führt zur Initiierung eines programmierten Zelltods, welcher sowohl Symptome von Apoptose als auch von Nekrose aufweist (Tan et al. 2001).

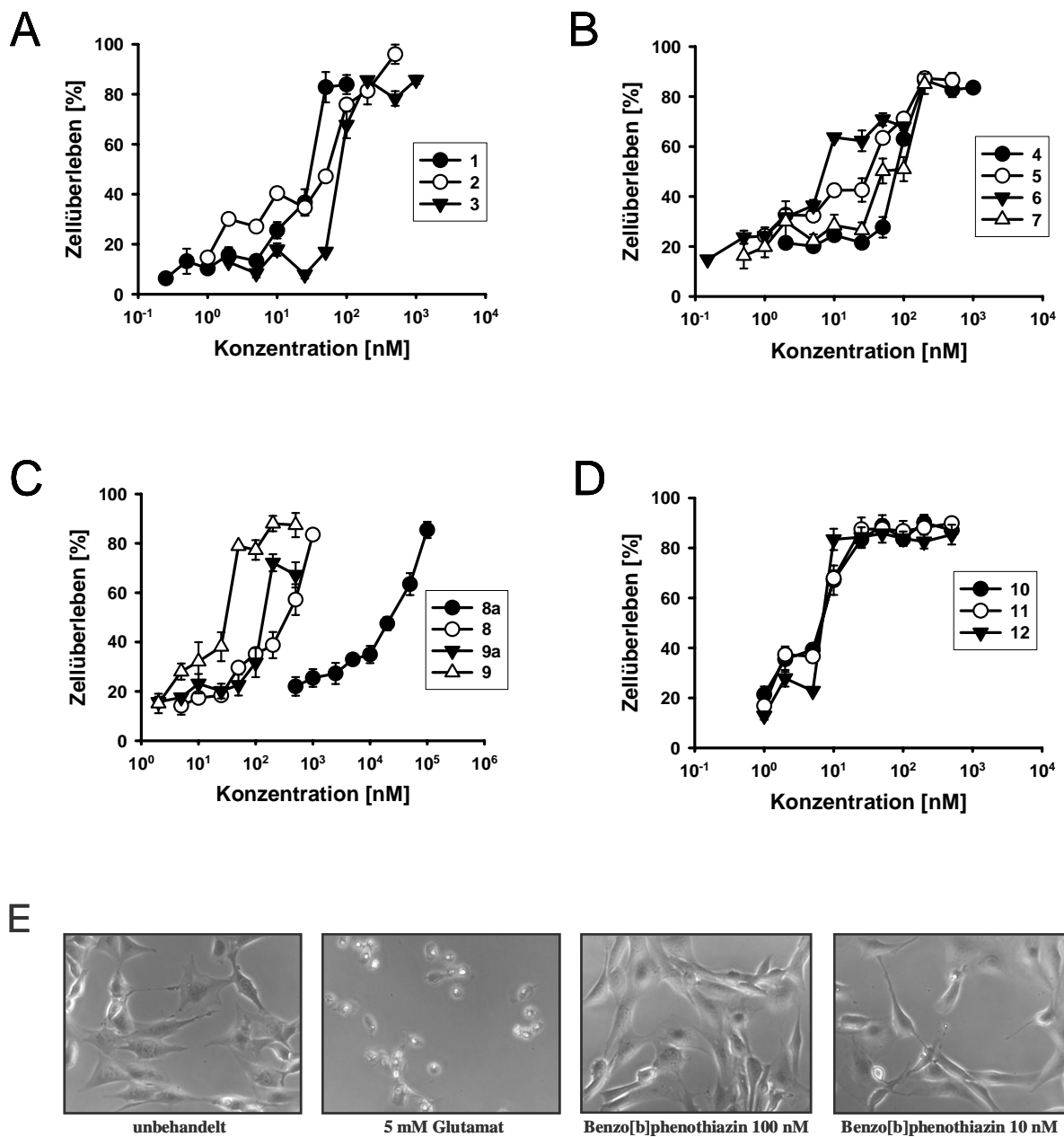


Abb. 5.4.1: Zellüberleben von HT-22 Neuronen nach Glutamatexposition

Die Überleben von HT-22 Zellen wurde nach einer 5 mM Toxinexposition und nach einer Behandlung mit antioxidativen Phenothiazinderivaten über 24 h mittels MTT-Metabolisierung gemessen (n=7).

A: Phenothiazin (1), 2-Cyano-phenothiazin (2), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (3)

B: 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (4), 2-(Octyl-amidomethyl)-phenothiazin (5), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (6), 2-(Palmitylamidomethyl)-pheno-thiazin (7)

C: NH-Trolox (8), Trolox (8a), NH-Tocopherol (9), α -Tocopherol (9a)

D: Benzo[a]phenothiazin (10), Benzo[b]phenothiazin (11), Benzo[c]phenothiazin (12)

E: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HT-22 Neuronen mit unterschiedlicher Behandlung in 20-facher Vergrößerung

Nach Gabe von 5 mM Glutamat über 24 h wurde das Zellüberleben untersucht. Unter Zuhilfenahme der sich ergebenden sigmoidalen Überlebenskurven kann die mittlere effektive Wirkkonzentration (EC₅₀-Wert) abgelesen werden (Abb.5.4.1). Phenothiazin (**1**) zeigt in **A** das höchste Wirkpotential, mit einem EC₅₀ von 30 nM. Mit den kleinen Substituenten –CN und –CH₂-NH₂ an Position 2 des Ringsystems erhöht sich die halbmaximale effektive Wirkkonzentration auf 50 nM (**2**) und 80 nM (**3**). Bei der Betrachtung der Kohlenstoffschwanz-Derivate in **B** zeigt sich, dass der kürzeste Butylrest (**4**) ebenfalls zu einem Wert von 80 nM führt. Mit Verlängerung der Kette steigt das neuroprotektive Potential von 40 nM bei **5** auf ein Optimum von 8 nM beim Einsatz von Substanz **6**. Die Substitution von Palmitinsäure an Phenothiazin (**7**) bedingt wiederum ein Absinken der antioxidativen Wirksamkeit mit einem EC₅₀-Wert von 80 nM. Dies lässt darauf schließen, dass eine Kohlenstoffkettenlänge von 12 C-Atomen für eine günstige Verteilung der antioxidativen Kopfgruppe Phenothiazin in der Zelle sorgt. Dies wird entweder durch die Erhöhung der Lipophilie und somit bessere Zellpermeabilität erreicht, oder der C12-Schwanz bildet einen bestmöglich sterisch ausgerichteten Membrananker, der die Kopfgruppe in entsprechender Position in der Zellmembran oder in der Mitochondrienmembran fixiert. 16 C-Atome scheinen die Diffusion des Moleküls zum Wirkort in der Zelle oder die generelle Zellpermeation durch zu hohe Lipophilie zu behindern (siehe Tab.5.1.1. logP).

Der Vergleich des wässrigen Antioxidans Trolox (**8a**) mit seinem neuen lipophilen Pendant 2-Carboxylphenothiazin (**8**) zeigt eine deutliche Verbesserung der antioxidativen Neuroprotektion (**C**). Von einem EC₅₀-Wert von 20 µM bei **8a** wurde eine Steigerung des Schutzes auf 0,3 µM bei **8** erreicht. Die Gegenüberstellung des lipophilen Standards Vitamin E (**9a**) und des neuen NH-Tocopherol (**9**) ergab eine 5-fache Zunahme der Wirksamkeit (150 nM versus 30 nM). Die in **D** dargestellten Überlebenskurven der benzanellierten Phenothiazine **10**, **11**, **12** zeigen ein mehr oder weniger gleiches Wirkpotential aller drei Substanzen mit 10 nM, 8 nM und 8 nM mittlerer effektiver Wirkkonzentration. Zur Illustration dienen die in **E** gezeigten exemplarischen lichtmikroskopischen Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Während mit 100 nM Benzo[b]phenothiazin (**11**) noch genauso viele Zellen leben wie in der unbehandelten Kontrolle, nimmt die Viabilität beim Einsatz von nur 10 nM **11** sichtbar ab. Allerdings sind immer noch signifikante Anzahlen lebender Neurone zu erkennen, im Gegensatz zur Kontrolle mit 5 mM Toxin.

Um die Wirksamkeit ausgewählter Derivate auch bei Verwendung eines akuten Stresses zu testen, wurde das gleiche Experiment unter Verwendung von 300 µM Wasserstoffperoxid durchgeführt. H₂O₂ gilt als schnelleres Oxidans wegen des akut wirkenden Peroxids. Der

oxidative Stress wirkt hierbei als Bolusstress und nicht, wie bei Glutamatexposition, langsam und endogen.

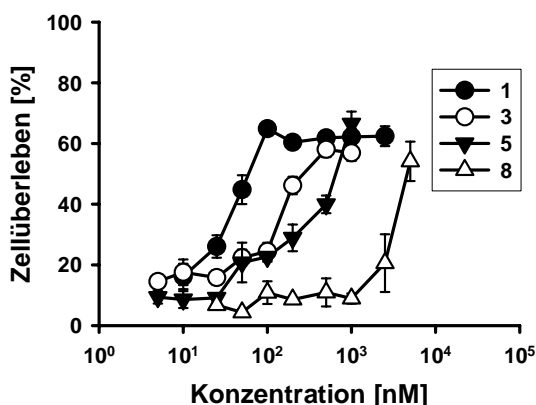


Abb. 5.4.2: Zellüberleben von HT-22 Neuronen nach H₂O₂-Exposition

Die Überleben von HT-22 Zellen wurde nach einer 300 μ M Toxinexposition und einer Behandlung ausgesuchten antioxidativen Phenothiazinderivaten über 24 h mittels MTT-Metabolisierung gemessen (n=4). Phenothiazin (**1**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), NH-Trolox (**8**)

Im Wesentlichen ließen sich die EC₅₀-Werte des Glutamat-Assays reproduzieren. Beispielsweise entwickelt Phenothiazin (**1**) mit einem EC₅₀ von 30 nM bei Glutamatexposition eine sehr ähnliche mittlere effektive Wirkung von 50 nM unter H₂O₂-Einwirkung. Die Substanzen **3**, **5** und **8** zeigen ein antioxidatives Potential mit einem um etwa Faktor 10 gesteigerten EC₅₀, von 0,3 μ M bei Glutamat auf 3 μ M bei H₂O₂ (**8**) (NH-Trolox/2-Carboxylphenothiazin). Das Gleiche gilt für 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**). Ionische Verbindungen permeieren generell nicht sehr effektiv durch Membranen. Die Protonierbarkeit der Amino- (bei **3**) bzw. die Deprotonierbarkeit der Carboxylgruppe (bei **8**) bewirkt somit eine erschwerte Permeabilität in die Zelle der Derivate durch die Ladung. Jedoch können im Allgemeinen Alkylamine eher die Zellmembran überwinden als Carboxylat-Verbindungen, weil sie in protonierter Form pKs-Werte in der Nähe des physiologischen pH-Werts von 7,37 – 7,43 besitzen (beispielsweise 2-Aminoacridin einen pKs von 8,04 (Brown et al. 1955)), während Carboxylate sehr viel niedrigere pKs-Werte im sauren Bereich aufweisen. 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**) kann ebenfalls durch den lipophilen Rest möglicherweise nicht sehr rasch das Zellinnere erreichen und bewirkt somit einen mittleren

Schutz vor der schnellen Wasserstoffperoxid-Oxidation erst bei 150 nM anstatt bei 80 nM. Allgemein scheinen die nicht so effektiv permeablen Substanzen im akuten Stressmodell geringere Wirksamkeiten als im chronischen Glutamat-Modell aufzuweisen.

5.4.2 PI-Plasmamembranintegrität

Um mit einem zweiten, unabhängigen Assay-System die MTT-Ergebnisse (siehe Kapitel 5.4.1) zu validieren, wurde die Färbung mit Propidiumiodid (PI) gewählt. PI interkaliert in die DNA von Zellen mit geschädigter Membran. Der Farbstoff gilt als Marker für eine gestörte Plasmamembranintegrität und als Index für den bevorstehenden Zelltod. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop werden rot gefärbte Zellen als beschädigt betrachtet. Es wurde nach den gleichen Versuchsbedingungen wie bei dem MTT-Experiment mit PI gefärbt, und die Verhältnisse von sterbenden zu lebenden Zellen wurden quantifiziert.

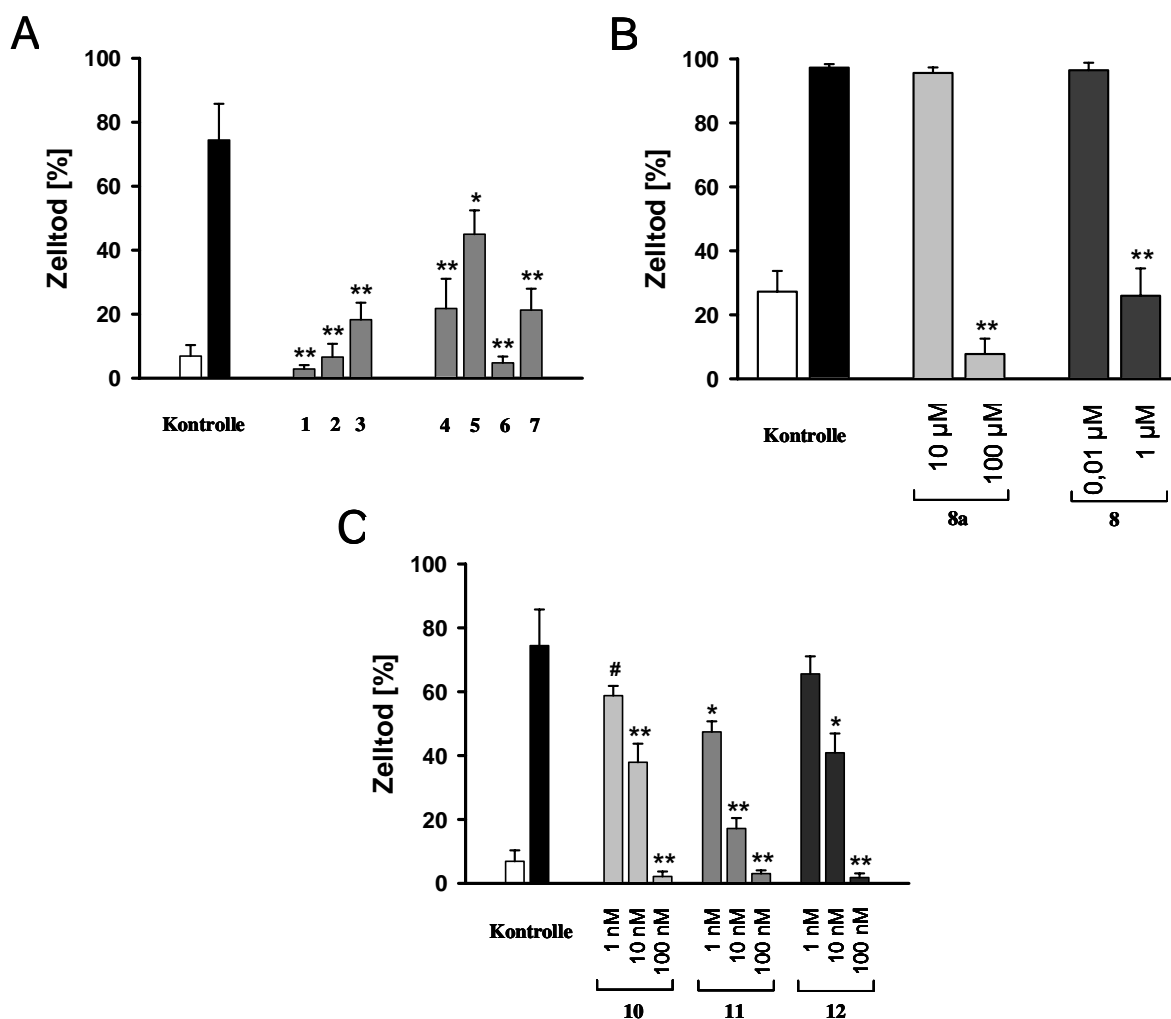


Abb. 5.4.3: Quantifizierung des Zellüberlebens von HT-22 Zellen nach Glutamatbehandlung mittels PI

Weißer Balken stellt die Negativkontrolle, schwarzer Balken die Positivkontrolle dar; in **A** wurden 100 nM Antioxidans verwendet. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt und statistisch ausgewertet (# $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; t-Test). Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.D.

A: Phenothiazin (**1**), 2-Cyanophenothiazin (**2**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**), 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (**4**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (**7**)

B: Trolox (**8a**), 2-Carboxyl-phenothiazin/NH-Trolox (**8**);

C: Benzo[a]phenothiazin (**10**), Benzo[b]phenothiazin (**11**), Benzo[c]phenothiazin (**12**)

Die in Abb.5.4.3 **A** abgebildeten Substanzen wurden alle in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Es zeigt sich eine deutliche, signifikante Verringerung des Zelltods durch alle Derivate. In **B** wurden Konzentrationen um den jeweiligen EC_{50} -Wert der Substanzen im MTT-Versuch gewählt (bei **8a** 10 μ M und 100 μ M, bei einem EC_{50} von 20 μ M). Die MTT-

Ergebnisse von beiden Molekülen **8** und **8a** konnten im Wesentlichen bestätigt werden. Auch bei den benzanellierten Phenothiazinderivaten lies sich das verbesserte Zellüberleben durch Phenothiazine mit PI-Färbung nachvollziehen (**C**). Hier scheint das linear verknüpfte Benzo[b]phenothiazin (**11**) bei 10 nM auffallend gut vor dem Verlust der Plasmamembranintegrität zu schützen. Es zeigte sich eine hohe Signifikanz in allen drei Konzentrationen. Substanz **11** ist in diesem Experiment die effektivste antioxidative Substanz, da sie sogar noch bei 1 nM höchst signifikant ($p < 0,01$) Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität bieten kann. Derivat **12** konnte bei der niedrigsten Konzentration von 1 nM keine Signifikanz mehr erreichen. Im Allgemeinen konnten die PI-Resultate die Protektionsqualität der Substanzen im Viabilitätsexperiment bestätigen.

5.4.3 DCFA-Peroxidakkumulation

Mit dem redox-sensitiven DCFA-Farbstoff lässt sich unter den gewählten Bedingungen die eukaryotische zelluläre Antwort auf durch Wasserstoffperoxid induzierten oxidativen Stress widerspiegeln. Das Reagenz ist wasserlöslich und akkumuliert nach Abspaltung der Acetylgruppe als DCF im wässrigen Kompartiment, dem Cytosol der Zelle. Somit kann die potentielle Protektion durch Antioxidantien lokalisiert und untersucht werden.

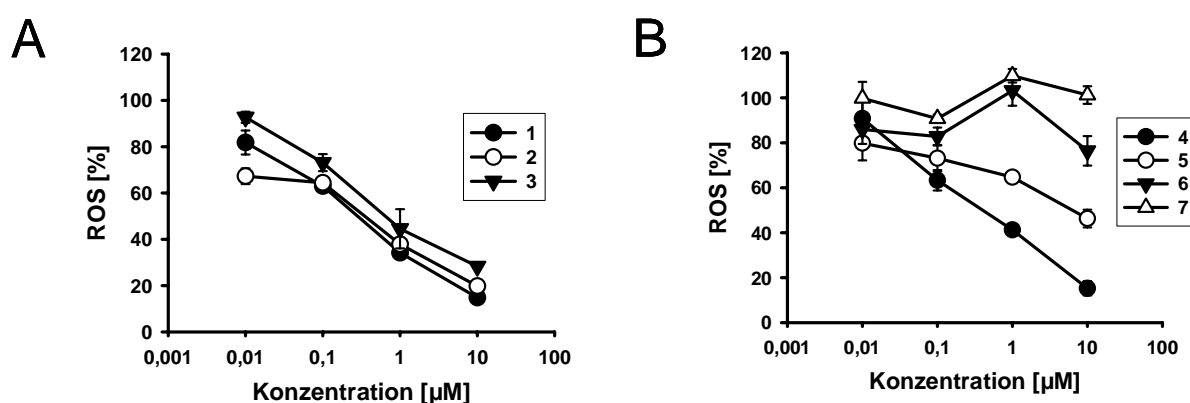


Abb. 5.4.4: Antioxidative Effekte der neuen Phenothiazinderivate auf die Peroxidakkumulation

Die Fähigkeit, die durch 500 µM H₂O₂ hervorgerufene ROS-Akkumulation konzentrationsabhängig bei 37 °C zu verhindern, wurde mittels DCF-Fluoreszenz (5 µM) gemessen (n=4).

A: Phenothiazin (**1**), 2-Cyanophenothiazin (**2**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**);

B: 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (**4**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (**7**)

Die Analyse der in dieser Arbeit behandelten Substanzen ergab bei der Ursubstanz Phenothiazin (**1**) im Vergleich zu den ähnlich kleinen Molekülen **2**, **3** und **4** keine nennenswerten Unterschiede (Abb.5.4.4 **A** und **B**). Der beste Schutz vor Peroxidakkumulation wurde mit einer Konzentration von 10 μM erreicht. Je lipophiler die Derivate sind, desto ineffizienter konnten sie die Zunahme an ROS verhindern (**B**). Wie anfangs erwähnt werden hierbei die oxidativen Vorgänge im wässrigen Teil der Zelle bevorzugt betrachtet. Die mit steigender C-Atom-Kettenlänge immer lipophiler werdenden Substanzen reichern sich aber wahrscheinlich eher in Zellorganellmembranen an. Oder aber es besteht ein generelles Problem der mangelnden Diffusibilität der Derivate in die adhärente Zelle innerhalb der Versuchszeit von 4 h.

5.4.4 Isoprostan-Lipidperoxidation

Die Messung des 8-Isoprostans (F_2 -Isoprostan) bietet aktuell eine der sensitivsten Möglichkeiten, Lipidperoxidation in biologischen Flüssigkeiten oder gewebsspezifisch nachzuweisen. Isoprostane gelten im Allgemeinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als relativ stabile Oxidationsmarker verglichen mit MDA und HNE, da sie meist mit Phospholipiden verestert vorliegen. Sie ähneln dem Prostaglandin und werden aus polyungesättigten Fettsäuren (PUFAs) mit mindestens drei Doppelbindungen, wie Linolsäure, Arachidonsäure (Vorläufer der F_2 -Isoprostane) oder Docosahexaensäure (DHA, Vorläufer der Neuroprostane) gebildet. Ihr Gehalt steigt bei oxidativer Schädigung schnell an, und die Level lassen sich effektiv mittels Antioxidantien senken (Morrow & Roberts 1996).

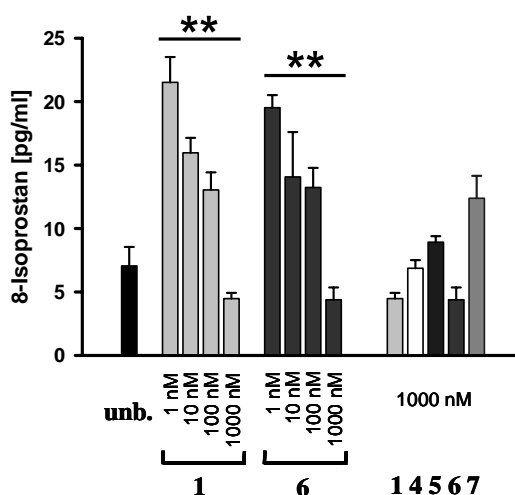


Abb. 5.4.5: Konzentrationsabhängige Verhinderung der 8-Isoprostanbildung als Lipidperoxidationsmarker

Die Verringerung der Isoprostan-Bildung durch Phenothiazin (**1**) und 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) ist signifikant (lineare Regression; Tendenz $**p < 0,001$; $n=4$). Gezeigt sind Mittelwerte des 8-Isoprostangehalts \pm S.D. ($n=3$); 2-(Butylamidomethyl)-phenothiazin (**4**), 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**), 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), 2-(Palmitylamidomethyl)-phenothiazin (**7**)

Die Bildung von F_2 -Isoprostan (8-Isoprostan) wurde nach einstündiger Toxineinwirkung ($500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) auf HT-22 Zellen mit und ohne Einfluss von Antioxidantien via Enzym-Immuno-Assay gemessen (Abb.5.4.5). Insbesondere zeigt sich eine konzentrationsabhängige Senkung des Isoprostans bei Phenothiazin (**1**) und dem Derivat 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**). Hier wurde nach linearer Regression ein hoch signifikanter Trend der Protektion vor H_2O_2 -induzierter Isoprostan-Bildung gemessen. Der Vergleich der neuen lipophileren Substanzen **4**, **5**, **6** und **7** mit der Ausgangssubstanz **1** bei gleicher Konzentration von $1 \mu\text{M}$ weist ebenfalls auf eine gute antioxidative Kapazität der neuen Phenothiazinderivate hin.

5.4.5 DNPH-Proteincarbonylierung

Neben der Lipidperoxidation stellt die Proteinoxidation einen wesentlichen Parameter der oxidativen Beeinflussung durch ROS *in vivo* dar. Mit Hilfe der Antioxidantien sollte die Bildung von Proteincarbonylen, als Marker für Proteinoxidation, untersucht werden. Vorteilhaft in technischem Sinne sind die höhere Stabilität oxidierter Proteine und ihrer irreversiblen Modifikationen im Vergleich zu Lipidperoxidationsprodukten wie Isoprostanen

oder Malondialdehyd (MDA). Daher können sie zur Messung des Ausmaßes an oxidativen Modifikationen in Geweben oder Gewebsflüssigkeiten verwendet werden. Proteincarbonyle können auf mindestens vier unterschiedlichen Wegen entstehen.

- 1) In der Seitenkette von Proteinen können bestimmte Aminosäuren wie Lysin, Prolin, Arginin und Threonin direkt oxidiert werden.
- 2) Das Proteinrückgrat wird oxidativ beispielsweise durch eine α -Amidierungsreaktion gespalten.
- 3) Durch Lipidperoxidation entstandene Aldehyde wie Acrolein (2-Propenal) und Malondialdehyd können über eine Michael-Addition an der Aminogruppe von Lysin und Histidin Carbonyle in Proteine einführen.
- 4) Reaktive Carbonylderivate (Ketoamine, Ketoaldehyde) können durch Reaktionen von reduzierenden Zuckern oder deren Oxidationsprodukten mit Lysinresten entstehen (Dalle-Donne et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Induktion der Proteincarbonylierung murine hippocampale Neurone nach Vorinkubation (3 h) mit den Antioxidantien mit 500 μ M Wasserstoffperoxid für 3 h gestresst. Die Zellproben wurden zu diesem Zeitpunkt gesammelt, da man nach 3 h visuell eine beginnende Abnahme des Überlebens erkennen konnte. So war eine Messung von noch lebenden Zellen gewährleistet. Die Detektion der oxidativ gebildeten Proteincarbonyle erfolgte mittels DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin)-Derivatisierung. Das Ergebnis ist in der Antikörper-Visualisierung (Abb.5.4.6, oben) dargestellt. Die mit Ponceau gefärbte Ladekontrolle (Abb.5.4.6, unten) zeigt eine gleichmäßige Auftragung der Proteine in allen Proben. Bei der Auftrennung der Proteine im Anti-DNP-Blot ist eine Induktion der Carbonyle in den Toxinkontrollen zu sehen (Banden 2 und 9). Phenothiazin (**1**) und das C12-Derivat (**6**) mindern die Proteincarbonyl-Bildung in einer eingesetzten Konzentration von 1 μ M sichtbar, während 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) dies nicht erkennen lässt.

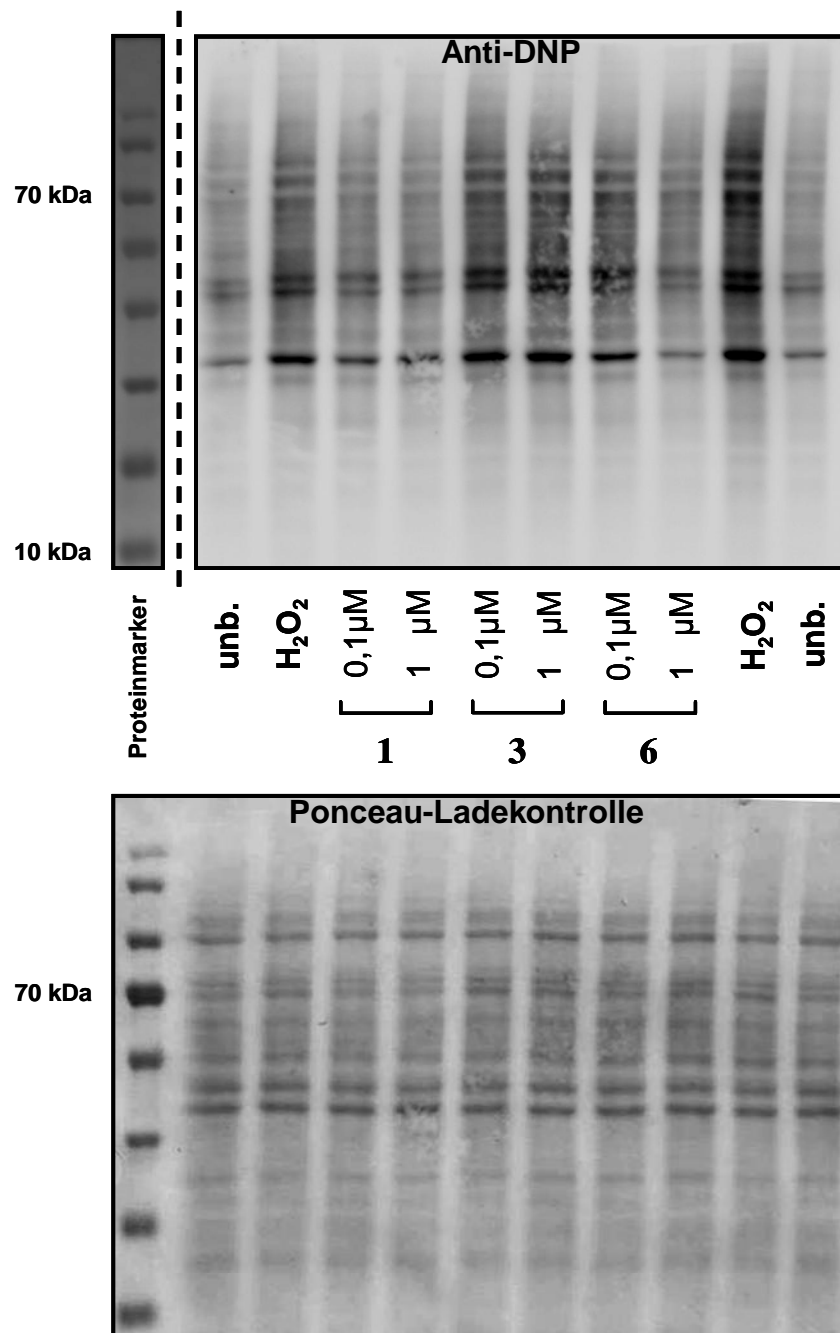


Abb. 5.4.6: Western Blot von mit DNPHderivatisierten Proteincarbonylen

Anti-DNP-Western Blot mit dem zugehörigen, mit dem Farbstoff Ponceau angefärbten Blot als Ladekontrolle (unten). Der Proteingehalt wurde auf 15 µg normiert. Aufgetragen sind Proteinlysate aus Zellen, die mit den Substanzen Phenothiazin (**1**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) und 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) in den Konzentrationen 0,1 und 1 µM behandelt worden waen.

Die mit Hilfe der Software AIDA in Abb.5.4.7 dargestellte Quantifizierung aus 4 Experimenten ergab einen signifikanten Schutz durch **6** in der Konzentration von 100 nM,

nach Normierung auf die Positivkontrolle. Das Derivat **3** konnte eine vergleichbar signifikante Protektion nur bei 1 μM erreichen. Phenothiazin (**1**) scheint im dargestellten Blot die Carbonylentstehung in beiden Konzentrationen zu reduzieren, erreichte aber im Mittel von 4 Experimenten keine Signifikanz (siehe Abb.5.4.7).

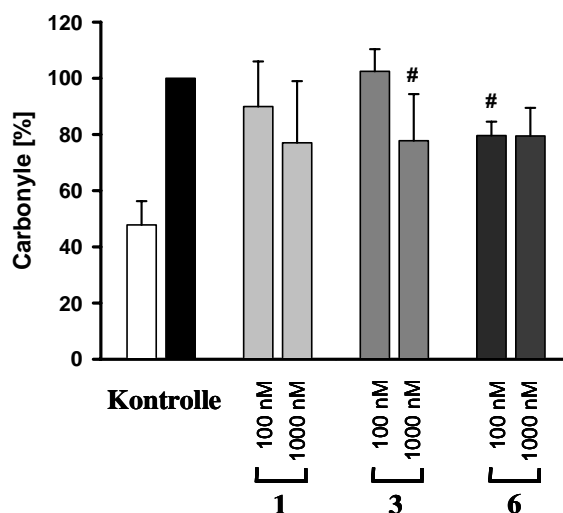


Abb. 5.4.7: Quantifizierung der anti-DNP Western Blots

Die dargestellte Graphik wurde mit der Software AIDA aus 4 Experimenten erstellt. Weiße Balken stellen die Negativkontrolle, schwarze Balken die Positivkontrolle dar. Die Statistik der Mittelwerte \pm S.D. wurde mit einem twoway ANOVA mit Korrektur für multiples Testen durchgeführt ($n=4$, $\#p < 0,05$); Phenothiazin (**1**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) und 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) in den Konzentrationen 0,1 und 1 μM

Die signifikante Protektion durch das lipophilste getestete Derivat **6** warf die Frage auf, ob Membranoxidation in den HT-22 Neuronen besonders relevant sei. Membranproteine haben ein anderes Aminosäuremuster als cytosolische Proteine (Landolt-Marticorena et al. 1993; Hajjeva et al. 2006), wodurch eine andere Neigung zur Carbonylbildung naheliegender ist. In einem Experiment zur Membranprotein-Autolyse sollte die zelluläre Antwort auf einen langsamen endogenen Stress durch Glutamat zu einem relativ späten Zeitpunkt (18 h) in der Todeskaskade beobachtet werden. Zu diesem Zwecke wurde nach der Probensammlung, der eine Inkubation mit Antioxidantien und 5 mM Toxin für 18 h voraus ging, ein Ultrazentrifugationsschritt durchgeführt, um cytosolische und membranäre Fraktionen zu

erhalten. Eine DNPH-Derivatisierung erfolgte nicht. Die auf den gleichen Proteingehalt beziehungsweise Peptidgehalt normierten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Abb.5.4.8 **A** und **B** zeigen die mit Ponceau gefärbten Blots von Membran- und Cytosolfraktionen, wobei die Membranproben (**A**) in den positiven Toxinkontrollen sowie bei niedrigen Antioxidantienkonzentrationen (10 nM) eine globale, generalisierte Autolyse der Membranproteine aufzuweisen scheinen. Die Untersuchung der Cytosolproteine zeigt dagegen nur eine selektive Proteolyse von bestimmten Proteinen (**B**). Die Relevanz von oxidativen Proteinveränderungen in Membranen scheint somit deutlich höher zu sein als die, welche cytosolische Proteine betreffen.

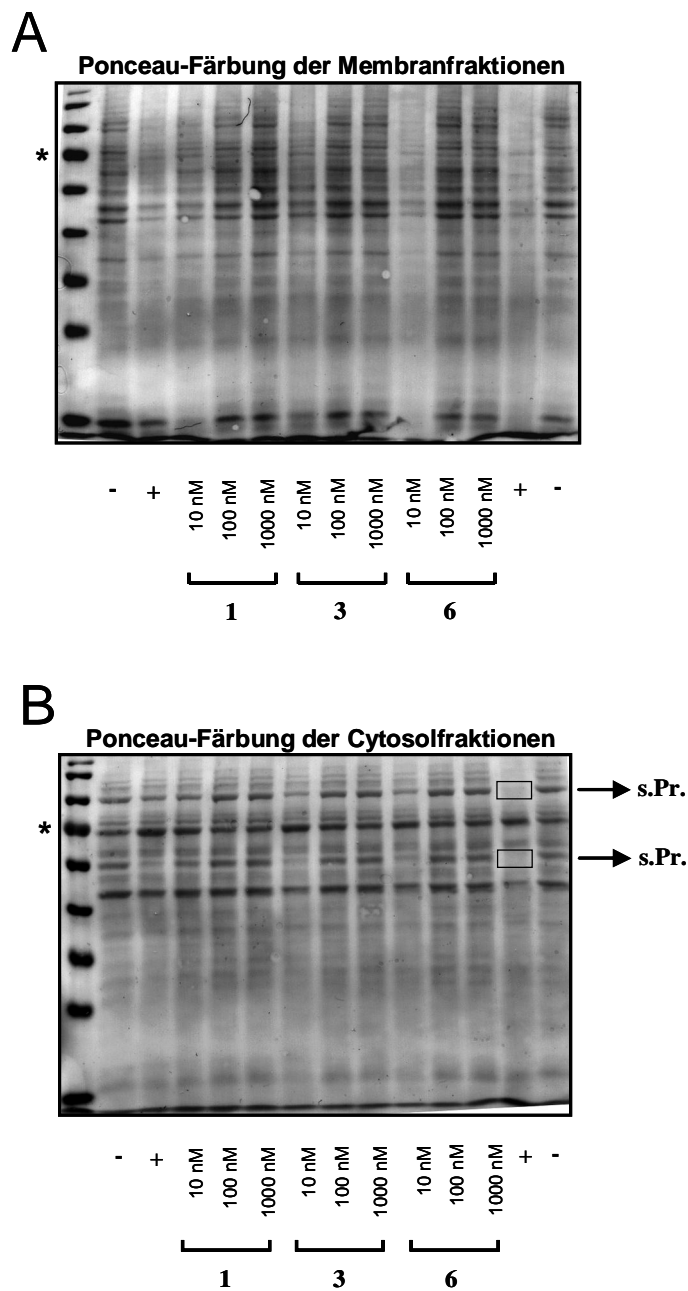


Abb. 5.4.8: Ponceau-Färbungen von Membran- und Cytosolfractionen

A zeigt den mit Ponceau gefärbten Western Blot von HT-22-Membranfraktionen, die mit den Substanzen Phenothiazin (**1**), 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) und 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) in den Konzentrationen 0,01; 0,1 und 1 μ M und mit 5 mM Glutamat (18 h) behandelt wurden. * markiert die 70 kDa Bande des Proteinmarkers, (+) sind nur mit Toxin behandelte Zellen und (-)unbehandelte Zellen.

B: Ponceau-Färbung der Cytosolfractionen; selektive Proteolyse (s.Pr.)

Um das Vorliegen einer Membranproteinautolyse zu spezifizieren, wurde das in Zellmembranen verankerte Transmembranprotein Na/K-ATPase unter den gleichen

Versuchsbedingungen überprüft. Die α -Untereinheit der Natrium-Kalium-Pumpe wurde mit einem Na/K-ATPase-spezifischen primären Antikörper visualisiert. Der Western Blot in Abb.5.4.9 zeigt Proteine im Bereich von 25 kDa bis 170 kDa. Die Na/K-ATPase ist auf der Höhe der 100 kDa-Bande des Markers (links) und, wie erwartet, nur in den Membranfraktionsproben zu sehen. Die Bande bei 70 kDa ist offenkundig unspezifisch, da sie im Cytosol auftaucht. Das Vorliegen eines Autolysemechanismus wird durch das gelegentliche Auftauchen schwacher Fragmentbanden wie bei 10 nM der Substanz **3** in der Membranfraktion bekräftigt. Nach Einwirkung des Glutamats wird das vom Antikörper erkannte Epitop der Na/K-ATPase folglich vollständig degradiert und ist nicht mehr zu detektieren. Eine Protektion gegen den Abbau ist bei allen Konzentrationen von Phenothiazin (**1**) gegeben. Die Derivate **3** und **6** können nur bei 100 nM und 1 μ M die ATPase vor Degradation bewahren. Die Glutamat-induzierte Membranproteolyse kann komplett mit relativ niedrig dosierten Antioxidantien verhindert werden, wobei sich die Überlegenheit des lipophilen C12-Derivats **6** gegenüber Phenothiazin (**1**) jedoch nicht bestätigt hat.

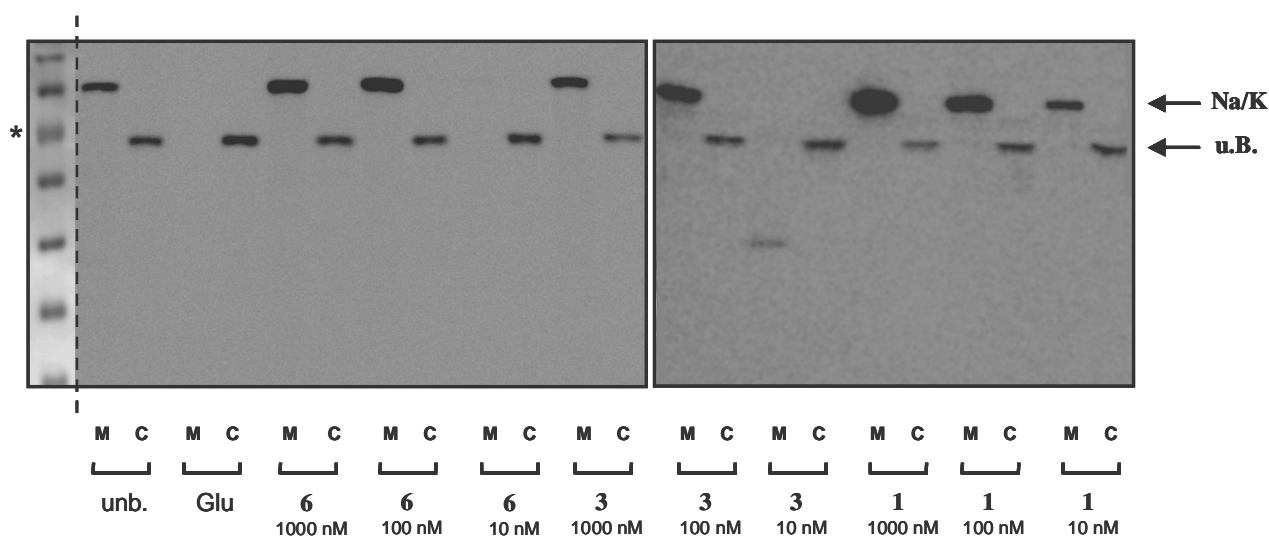


Abb. 5.4.9: Western Blot von Fraktionierungen in Membran und Cytosol, mit Visualisierung der Na/K-ATPase

anti-Na/K-ATPase Western Blot, gezeigt sind Banden von 25 bis 170 kDa; Na/K entspricht der Na/K-ATPase-Bande bei 110 kDa, u.B. stellt eine unspezifische Bande im Cytosol dar und * steht für die 70 kDa Bande des Proteinmarkers.

5.5 QSAR – Quantitative Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung

Die in HT-22 Zellen gemessenen, mittleren cytoprotektiv effektiven Wirkkonzentrationen der neuen Phenothiazinderivate (EC_{50}) wurden mit den zuvor errechneten Werten verglichen. Die Gegenüberstellung ergab bei einigen Substanzen größere Unterschiede von experimentell bestimmten zu vorhergesagten EC_{50} -Werten. Daher wurden die chemisch-physikalischen Eigenschaften, welche in die computerbasierten Kalkulationen mit eingeflossen waren, näher betrachtet. Ziel war es, gegebenenfalls einen neuen Algorithmus für eine exaktere quantenchemische Vorhersage des antioxidativen Potentials eines aromatischen Moleküls zu erstellen. Im ersten Schritt wurden hierfür in einer multiplen Regression alle vier Parameter des anfangs verwendeten Algorithmus erneut in eine Gleichung gebracht. Der Regressionskoeffizient r des Modells 1 (siehe Tab.5.5.1) beträgt 0,608. Die Signifikanzen der beiden Einzeleinflüsse (p-Werte) der beiden Faktoren $\log P$ und $\sigma(N)$ sind jedoch sehr gering. Aus diesem Grund wurde im quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungs-Modell 2 auf $\log P$ und die Spindichte $\sigma(N)$ verzichtet und nur die Vorhersagekraft durch die Radikalisierungsenthalpie ΔH_f und die LUMO -Energie im radikalisierten Zustand des Moleküls $E(LUMO_r)$ getestet. Die p-Werte erreichen zwar keine Signifikanz, verbessern sich allerdings deutlich. Da der Lipophilie-Parameter $\log P$ im Modell 1 einen unerwartet geringen Einfluss ausübt (Moosmann et al. 2001), wurde aufgrund der hohen Varianz der Molekülgröße der neuen Phenothiazinderivate der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts der zu bestimmenden Substanz $\log M_r$ neu eingeführt (Modell 3). In diesem 3-Faktoren-Modell erhöhte sich der Regressionskoeffizient r allerdings nur marginal. Auch in Modell 4, in dem statt $\log M_r$ der Lipophiliefaktor $\log P$ als dritter Parameter verwendet wurde, ergibt sich keine Verbesserung der Vorhersagekraft.

Tab. 5.5.1: Vergleich von 4 unterschiedlichen QSAR-Modellen

	r	p(ΔH_f)	p(E(LUMOr))	p(logP)	p($\sigma(N)$)	p(logMr)
Modell 1	0,608	0,372	0,287	0,514	0,853	
Modell 2	0,568	0,113	0,136			
Modell 3	0,588	0,120	0,182			0,616
Modell 4	0,606	0,106	0,196	0,473		

Der Regressionskoeffizient r beschreibt die Güte der Regression, wobei die Anzahl der unabhängigen Variablen nicht berücksichtigt wird. Die p-Werte bilden die Signifikanzen der einzelnen Variablen in den 4 Modellen zur Vorhersagekraft der antioxidativen Wirksamkeit ab. Alle Werte ergaben sich in einer multiplen Regression (Verwendung von SigmaStat Software) aus folgenden Algorithmen:

Modell 1: $\ln EC_{50} = -0,00636 + (0,120 * \Delta H_f) - (2,650 * E(LUMOr)) - (0,116 * \log P) - (3,692 * \sigma(N))$

Modell 2: $\ln EC_{50} = -0,928 + (0,0909 * \Delta H_f) - (3,124 * E(LUMOr))$

Modell 3: $\ln EC_{50} = 2,548 + (0,105 * \Delta H_f) - (2,950 * E(LUMOr)) - (1,524 * \log M_r)$

Modell 4: $\ln EC_{50} = -0,371 + (0,0985 * \Delta H_f) - (2,819 * E(LUMOr)) - (0,119 * \log P)$

Es scheinen in der getroffenen Auswahl an Verbindungen somit hauptsächlich die Enthalpiedifferenzen und die Radikalisierungsenergien des niedrigst unbesetzten Molekülorbitals die antioxidative Wirksamkeit einer Substanz in HT-22 Zellen zu bedingen. Geladene Verbindungen und eine große Lipophilie-Bandbreite können somit nicht direkt erfasst werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden die von den Modellen 2, 3 und 4 vorhergesagten $\ln EC_{50}$ -Werte graphisch gegen den experimentell bestimmten $\ln EC_{50}$ aufgetragen (siehe Abb.5.5.1).

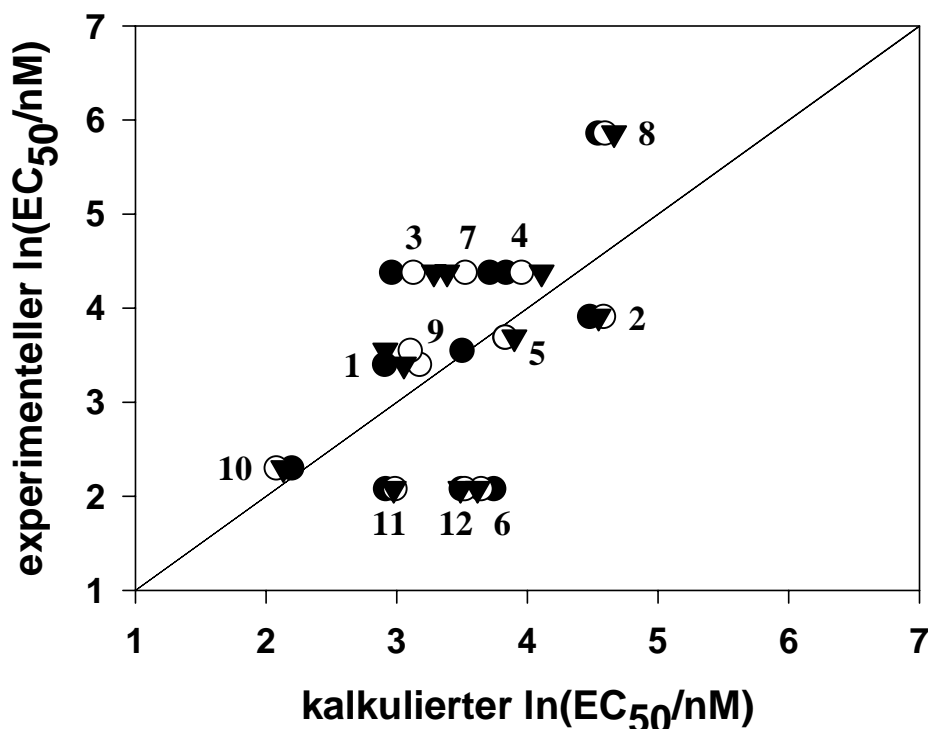


Abb. 5.5.1: Analyse von QSAR-Modellen für cytoprotektive Antioxidantien-Aktivität

Aufgetragen wurden die gemessenen $\ln EC_{50}$ -Werte aller Phenothiazinderivate gegen die durch unterschiedliche QSAR-Modelle vorhergesagten $\ln EC_{50}$ -Werte. Gefüllte Kreise (●) repräsentieren das bifaktorielle Modell 2, welches die Radikalisierungsenthalpie ΔH_f und die Energie des radikalischen LUMOr einschließt. Offene Kreise (○) stellen die mittels eines 3-faktoriellen Algorithmus (Modell 3) berechneten $\ln EC_{50}$ -Werte unter zusätzlichem Einbezug des dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts $\log M_r$ dar. Gefüllte Dreiecke (▼) zeigen ebenfalls ein 3 Faktoren-Modell (4), welches als Lipophilie-Parameter den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ berücksichtigt.

Mit Hilfe dieser Graphik (Abb.5.5.1) lassen sich potentiell die Schwächen der Prognose-Modelle erkennen. Substanzen mit bei physiologischem pH geladenen Gruppen wie 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (3) und 2-Carboxyphenothiazin (8) werden durch alle Algorithmen überschätzt. Die Chem3D Software ist möglicherweise nicht in der Lage, diese Löslichkeitsextrema mittels empirischer Fragmentierungsmethoden zur Abschätzung von $\log P$ -Werten zu erfassen. Eine sehr gute Radikalstabilisierung der großen Aromaten wie im Fall von Derivat 11 und 12 wird offenbar unterschätzt. Die basale chemische Logik würde keinen wesentlichen Unterschied in der Radikalisierungswärme ΔH_f der Benzo[x]phenothiazine 10, 11, und 12 vorhersagen, wie er in Tabelle 5.1.1 berechnet wurde, so dass möglicherweise die Berechnung des π -Systems durch das Programm (MOPAC) nicht

präzise ist. Am Beispiel des 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazins (**6**), welches nach der Computervorhersage nahezu gleich wie Phenothiazin (**1**) antioxidativ wirken sollte, dies aber im Zellmodell um ein Vierfaches übertrifft (Abb.5.4.1), wird offensichtlich, dass durch die Berechnungen ein zellulärer Einfluss nicht berücksichtigt wurde. Vermutlich besitzt das Derivat **6** genau die richtige Mischung aus Lipophilie und Penetrationsfähigkeit, um das experimentell ermittelte Wirkoptimum zu erreichen. Ein solcher zelluläre Einfluß kann durch quantenchemischen Berechnungen nicht erfasst werden. Die Software berechnet nur die Situation der Einzelmoleküle im Vakuum und schließt auch keine Molekülinteraktionen in die Schätzung mit ein.

6 Diskussion

Vermehrter oxidativer Stress ist vor allem mit dem Auftreten und dem Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen verbunden (Simonian & Coyle 1996; Blum et al. 2001; Halliwell & Gutteridge 2008). Für den Untergang von Neuronen in krankheitsspezifischen Hirnarealen werden unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich gemacht (Sies 1986; Blum et al. 2001; Jenner 2003), die durch den Einsatz von niedermolekularen Antioxidantien abgefangen und neutralisiert werden könnten. Die bereits seit vielen Jahrzehnten bekannte Substanz Phenothiazin besitzt nachgewiesene neuroprotektive, antioxidative Eigenschaften im nanomolaren Bereich (Moosmann et al. 2001; Hajieva et al. 2009; Mocko et al. 2010) und wurde als Leitstruktur zur Generierung neuer, noch wirksamerer Antioxidantien verwendet. Die Veränderung der Lipophilie durch Substitution von linearen oder verzweigt-kettigen Fettsäuren an das Ausgangsmolekül Phenothiazin verursachte unter bestimmten Bedingungen eine Steigerung der Cytoprotektion (Optimum durch Derivat **6** mit $\log P \approx 7$). Die Einführung von geladenen Gruppen an das Phenothiazin-Grundgerüst (**1**) führte zu einem prognostiziert weitgehenden Erhalt der Wirksamkeit bei einer wesentlichen Erhöhung der Wasserlöslichkeit. Eine Vergrößerung des aromatischen Systems durch Anellierung von Benzol verbesserte die Radikalstabilisierung, was sich in einer effizienteren Protektion von neuronalen Zellen im Vergleich zur Ausgangssubstanz **1** widerspiegelte.

6.1 Synthesestrategie

Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses der drei Parameter Lipophilie, Radikalstabilisation und Löslichkeit, welche sowohl die generellen Moleküleigenschaften als auch die eigentliche antioxidative Wirksamkeit bestimmen, wurden geeignete Substituenten für Phenothiazin ausgewählt. Ziel war die Generierung eines Wirkoptimums bei schneller zellulärer Distribution und Stabilität der Substanz. Derivate mit steigender Lipophilie (siehe $\log P$ in Tab.5.1.1 von Substanz **4**, **5**, **6**, **7** und **9**), mit unterschiedlicher Ladung (Substanz **3** und **8**) und mit gesteigerter Radikalstabilisierung (Substanz **10**, **11** und **12**) wurden synthetisiert. Letztere wurden über eine Kollaboration erhalten.

6.1.1 Generierung von Derivaten variabler Lipophilie

Um die Lipophilie des einfachen Phenothiazins zu beeinflussen, wurden vier lineare Fettsäuren, die sich in ihrer Länge jeweils um vier Kohlenstoffe unterschieden, ausgewählt.

Eine schnelle *in vivo* Degradation der neuen Substanzen sollte strukturell vermieden oder vermindert werden. Da eine Peptidbindung durch ihren partiellen Doppelbindungscharakter mesomerie-stabilisiert ist (Lauvergnat & Hiberty 1997), wird sie im Organismus weitaus langsamer metabolisiert als eine Esterverbindung, die oftmals schnell durch Esterasen gespalten wird. Aus diesem Grund wurde nach einer geeigneten Methode für eine effiziente und elegante nukleophile Substitution der linearen Fettsäuren mit gleichzeitiger Generierung einer Amidbindung gesucht. Hierfür bot sich eine Hydrierung von 2-Cyanophenothiazin (**2**) mit Lithiumaluminiumhydrid an, durch welche sich eine primäre Aminomethylgruppe an Position 2 des Phenothiazinkerns (siehe Abb.5.2.1) bildete, die wiederum mit den Fettsäuren zur Reaktion gebracht werden konnte (Abb.5.2.2 bis Abb.5.2.5). Die auf diese Weise synthetisierten Fettsäurederivate **4**, **5**, **6**, und **7** bilden eine Reihe von Substanzen mit aufsteigender Lipophilie, wobei **7** den höchsten logP-Wert aufweist (Tab.5.1.1), bei gleichzeitiger Esterase-stabiler Peptidbindung.

Die Ausbeuten variierten mitunter nur um 50 %. Dies lässt sich durch den amphiphilen Charakter der entstandenen Derivate begründen, der zu Problemen bei der Aufreinigung wie der Umkristallisation führte.

Zusätzlich wurde noch eine Komponente, das „NH-Tocopherol“, generiert, das dem natürlich vorkommenden Vitamin E ähnelt (Vergleich Abb.5.3.2 Substanzen **9a** und **9**). Die antioxidative Wirkung der Phenolstruktur des α -Tocopherols (Vitamin E) wird hierbei durch den Phenothiazinring übernommen, woran der verzweigt-kettige Phitylrest des α -Tocopherols über ein reaktives Anhydrid als Zwischenprodukt gekoppelt wurde (Abb.5.2.7). Dieser Phitylseitenrest erhöht nicht nur die Lipophilie maßgeblich (höchster Lipophiliegrad der Reihe der neuen Derivate von logP = 9,72), sondern erleichtert und fördert, laut Literatur, die Aufnahme und den Verbleib von Vitamin E in Biomembranen (Machlin 1980; Niki et al. 1985). Dies könnte einen Unterschied in der zellulären Wirkung gegenüber den Derivaten mit linearer Fettsäure bewirkt haben.

6.1.2 Generierung geladener Derivate mit verringerter Lipophilie und variabler Löslichkeit

Die Löslichkeit von Substanzen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit *in vivo*. Unsubstituiertes Phenothiazin ist in Wasser praktisch unlöslich (Sicherheitsdatenblatt von Phenothiazin, Sigma-Aldrich). Aus diesem Grund wurde die Synthese zweier neuer Phenothiazinderivate mit verbesserter Löslichkeit angestrebt. Dazu wurde das PhenothiazinGrundgerüst mit geladenen funktionellen Gruppen substituiert. Das neue Derivat

3 mit leicht protonierbarer, primärer Aminogruppe entstand durch Hydrierung des 2-Cyanophenothiazin (**2**) (Abb.5.2.1) und war gleichzeitig Ausgangsstoff für die nuklephilen Substitutionsreaktionen mit den aktivierten Fettsäuren (Abb.5.2.2 bis Abb.5.2.5). Als Gegenpart zu diesem positiv geladenen Amin wurde eine einfach zu deprotonierende Carboxylgruppe durch Hydrolyse von **2** mit Salzsäure in das PhenothiazinGrundgerüst eingeführt (siehe Abb.5.2.6). Mit diesem Derivat, 2-Carboxylphenothiazin (Substanz **8**), war ein weiterer bei physiologischem pH-Wert geladener und somit in Wasser leichter löslicher Stoff synthetisiert worden, welcher in dieser Arbeit auch als „NH-Trolox“ bezeichnet wird. Die Ausbeute betrug 75 – 90 %, und die Aufarbeitung der Derivate konnte aufgrund der geladenen Gruppen pH-abhängig gut gesteuert werden.

Bei allen Substitutions-, Hydrierungs- und Hydrolysereaktionen wurde die ringinterne NH-Gruppe nicht zusätzlich mit einer Schutzgruppe versehen. Die durch die Aromatizität desamins bedingte geringere Nukleophilie der Ausgangssubstanz **1** und die sterische Abschirmung durch die aromatischen Ringe ließen eine elegante, unaufwändige Synthese neuer Phenothiazinderivate mit den gewünschten chemisch-physikalischen Eigenschaften unter relativ milden Reaktionsbedingungen zu.

6.1.3 Generierung neuer Derivate mit höherer Radikalstabilität durch Vergrößerung des aromatischen Systems

Als dritter zu variierender Parameter wurde die Radikalstabilisation ausgewählt. Die Größe des aromatischen Systems beeinflusst die Delokalisation der π -Elektronen und damit die Stabilität des sich bildenden Radikals maßgeblich (Halliwell & Gutteridge 2008). Die Stabilität wurde durch anellierte Benzolringe erhöht. Die Substanzen **10**, **11** und **12** (siehe Abb.5.3.3) wurden von Prof. James Crivello aus New York freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Synthese erfolgte dort durch eine Schwefelschmelze unter Iodkatalyse von N-Phenyl-1-naphthylamin zu Benzo[a]phenothiazin (**10**) und von N-Phenyl-2-naphthylamin zu Benzo[c]phenothiazin (**12**) (Crivello 2008). Benzo[b]phenothiazin (**11**) wurde aus 2,3-Dihydroxynaphthalin und 2-Aminothiophenol durch eine Kondensationsreaktion bei 4 h Kochen in Trichlorbenzol unter Rückfluss (Crivello 2008) erhalten. Die so gewonnene Vergrößerung des π -Elektronensystems sollte, nach semi-empirischer Vorhersage (Tab.5.1.1), bei näherungsweise gleicher Lipophilie durch eine unterschiedliche Radikalisierungsenthalpie ΔH_f sowie durch variierte Energielevel des niedrigst unbesetzten Molekülorbitals E(LUMO) zu einer Verbesserung der antioxidativen Aktivität führen.

6.2 Struktur-Wirkungs-Analyse in biochemischen Systemen

Die neu synthetisierten Phenothiazinderivate wurden zunächst im Hinblick auf ihre basale antioxidative Aktivität hin untersucht. Die allgemeine Fähigkeit von Antioxidantien, unter definierten Bedingungen direkt ein chemisch stabiles Radikal abzufangen, wurde mittels TEAC-Assay (Kapitel 4.4.1) überprüft (Re et al. 1999). Die Anzahl und die Lokalisation der antioxidativen, funktionellen Gruppen im zu untersuchenden Molekül sind in diesem Experiment oft ausschlaggebend für die Kapazität zur Entfärbung des gefärbten Radikals (Lien et al. 1999). Die Eigenschaft der Phenothiazinderivate, die Oxidation eines einzelnen Proteins verhindern zu können, wurde mit dem B-Phycoerythrin-Experiment untersucht (Kapitel 4.4.2). Auf diese Weise konnte die Kapazität der Derivate, Peroxylradikale zu entgiften, in wässriger Umgebung analysiert werden (DeLange & Glazer 1989). Das Potential der neuen Substanzen, native Rattenhirnlipide vor Lipidperoxidation zu schützen, wurde mit dem TBARS-Test (Kapitel 4.4.3) überprüft (Esterbauer et al. 1991). Dieser erlaubt eine globale, aber sensitive Abschätzung in Bezug auf Lipidperoxidationsinhibierung (Lefèvre et al. 1998), in dem nur ein Endprodukt (Malondialdehyd) der radikal-induzierten Degradation von polyungesättigten Fettsäuren betrachtet wird (Gutteridge & Quinlan 1983; Valenzuela 1991).

Die Analyse der direkten Radikalinteraktion der Antioxidantien mit einem chemisch generierten Radikal (ABTS^{•+}-Radikal) wurde in zwei Lösungsmitteln (Wasser, Ethanol) durchgeführt. Hierbei zeigten alle untersuchten Antioxidantien eine gute Abfang-Reaktivität gegenüber dem Radikal (siehe Tab.5.3.1). Der Vergleich von phenolischen Antioxidantien wie α -Tocopherol (**9a**) mit aromatischen Aminen offenbart die Überlegenheit der letzteren. Dies könnte auf die niedrigeren NH-Bindungsenergien der Phenothiazinderivate im Gegensatz zu der höheren OH-Bindungsenergie von α -Tocopherol zurückzuführen sein (Lucarini et al. 1999). Die Alkylsubstituenten der lipophilen Phenothiazinderivate haben durch ihre leicht elektronenschiebende Eigenschaft zusätzlich die Fähigkeit, die Dissoziationsenthalpie des funktionellen aromatischen Amins zu erniedrigen (Lucarini et al. 1999) und unterstützen somit das leichtere Abspalten des Wasserstoffatoms für eine Entgiftungsreaktion eines angreifenden Radikals. Aromatische Amine ohne Heteroatom im Aromaten zeigten in anderen Versuchen bereits eine festere Stickstoff-Wasserstoff-Bindung (Lucarini et al. 1999).

Die hohe Aktivität von 2-Carboxylphenothiazin (**8**) als Trolox-Analogen ist beachtenswert (siehe Tab.5.3.1) und lässt sich vermutlich durch den zusätzlichen elektronengebenden Effekt

der deprotonierten Carboxylgruppe erklären, wobei für die antioxidative Hauptkapazität vor allem der Phenothiazinkern verantwortlich bleibt. Für die dagegen schwächere Wirksamkeit von Substanz **3**, dem Derivat mit der protonierbaren Aminogruppe, könnte die, durch den elektronenziehenden Effekt dieser NH_3^+ -Gruppe, vermutlich erhöhte NH-Bindungsenergie des Phenothiazinderivats verantwortlich sein.

Die Untersuchung der Proteinoxidation des Proteins B-Phycoerythrin (aus der Rotalge *Porphyridium cruentum*) spiegelt dahingegen vielschichtigere Umstände wider. Zum einen wird hier eine Oxidation durch Peroxylradikale initiiert, vor der es zu schützen gilt; zum anderen ist der zu schützende Reaktionspartner ein komplexes Protein mit bis zu 34 Tetrapyrrolen (DeLange & Glazer 1989). Antioxidantien sollen dabei ihre Fähigkeit, als schnelle Peroxylradikalfänger zu agieren, unter Beweis stellen. Die Resultate (Abb.5.3.4) zeigen bei allen getesteten Substanzen ein ähnliches Wirkpotential. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. **7** war etwas weniger wirksam, was jedoch bei dem hier lipophilsten Phenothiazinderivat unter den vorgegebenen wässrigen Bedingungen zu erwarten war.

Beim TBARS-Assay (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen) handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung der antioxidativen Aktivität von Substanzen bezüglich der Lipidperoxidationshemmung von, in diesem Fall, nativen Rattenhirnlipiden (Esterbauer et al. 1991). Die Oxidation der Lipide wird dabei mittels einer Kombination aus Eisen und Ascorbat durch entstehende Hydroxylradikale (OH^\bullet) induziert. Die Ergebnisse (Abb.5.3.5 A) zeigen Phenothiazin (**1**) bereits in niedrigen Konzentrationen als äußerst potente Protektionskomponente. Unter den Versuchsbedingungen, die mit (kurzzeitigem) oxidativen Stress bei Raumtemperatur einhergehen (30 min), weisen die zuvor 1 h vorinkubierten lipophileren Derivate **6** und **7** mit je 12 oder 16 C-Atomen (Abb.5.3.5 B) ein geringeres Schutzpotential als **4** und **5** auf. Erst bei permanentem oxidativen Druck über 24 Stunden (Abb.5.3.5 C) entwickelt auch 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) eine hohe antioxidative Wirksamkeit, während das Derivat mit dem C16-Rest dies nur bedingt, bis zu 60 %, erreicht. Als eine Erklärung könnte man das umgebende Medium heranziehen. Die nativen Rattenhirnlipide befinden sich in einer Lösung aus PBS, wo hinein die Antioxidantien sowie die Pro-oxidantien gegeben werden. In diesem wässrigen Phosphatpuffersystem konnten die hoch lipophilen Substanzen auch mit forcierter Lösungsvermittlung durch Sonifikation (siehe Kapitel 5.3.3) nur eine geringe Wirksamkeit bei akutem oxidativem Stress zeigen. Der Vergleich zwischen Derivat **8** mit seinem Analogon Trolox (**8a**) und Derivat **9** mit Vitamin E (**9a**) bekräftigt die scheinbar paradoxe Beobachtung, dass hydrophile

Substanzen in diesem Versuchsaufbau effektiver vor Lipidperoxidation schützen (Abb.5.3.5 D). Die Diffusion der lipophilen Derivate und somit die homogene Verteilung zwischen wässriger Phase und den Rattenhirnlipiden könnte zeit- und temperaturabhängig sein. Auf diesem Wege ließe sich das verzögerte Auftreten der antioxidativen Wirksamkeit der lipophileren Derivate nach längerem oxidativem Stress und längerer Inkubation der Antioxidantien erklären. Die mittellipophilen Substanzen haben während 6 h vermutlich ausreichend Zeit, um sich bei Raumtemperatur gleichmäßig im Reaktionsgemisch zu verteilen, die Lipidvesikel zu penetrieren und die Lipide gegenüber Peroxidation zu schützen.

Ein anderer Erklärungsversuch bezieht Ascorbat mit ein, welches in diesem Versuchsaufbau prooxidativ wirkt und das Eisen für eine Fentonreaktion mit spontan entstehendem H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge 2008) reduziert. Es wäre demnach auch denkbar, dass Ascorbat zu einem gewissen Prozentsatz als hydrophiles Antioxidans mittellipophile, radikalische Phenothiazinderivate wiederherstellt (Abb.6.2.1), so wie es diese Aufgabe wohl *in vivo* bei der Regeneration von α -Tocopherol übernimmt (Packer et al. 1979).

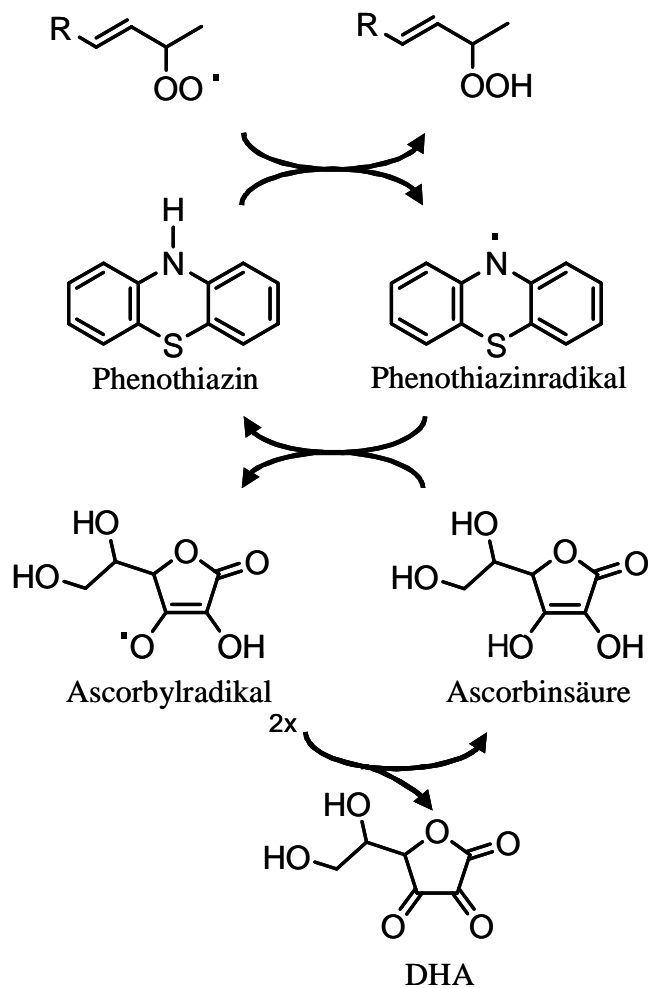


Abb. 6.2.1: Entgiftung eines Peroxylradikals durch Phenothiazin mit anschließendem Recycling über Ascorbat

Phenothiazin detoxifiziert durch Abgabe seines Wasserstoffatoms ein in der Nähe befindliches Peroxylradikal und nimmt die radikalische Funktion in sein aromatisches System auf. Möglicherweise kann es wie α -Tocopherol mit der Hilfe von Ascorbat recycelt werden (siehe Abb.1.1.5), welches dadurch selbst radikalisiert wird. Zwei Ascorbylradikale disproportionieren dann spontan zu Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure.

Diese Annahme wird auch durch die Wirksamkeitsresultate des Vergleichs zwischen Trolox (**8a**) und NH-Trolox (**8**) sowie α -Tocopherol (**9a**) und NH-Tocopherol (**9**) unterstützt (Abb.5.3.5 **D**). Generell ist die verbesserte Inhibition der Lipidperoxidation durch die Phenothiazinderivate gegenüber den phenolischen Varianten deutlich zu erkennen. Das hydrophile Trolox-Analogon **8** wirkt jedoch effektiver als das lipophile α -Tocopherol-Analogon **9**, so wie die eher gering lipophilen Phenothiazinderivate **2**, **3**, **4**, **5** und Phenothiazin selbst, zeitlich früher schützen als die mittel- bis hochlipophilen Substanzen **6** und **7** (Abb.5.3.5 **A**, **B**). Das eigentliche α -Tocopherol **9a** schneidet im Vergleich zu den

anderen Komponenten (Abb.5.3.5 **D**) am schlechtesten ab und kann nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration (20 μM) einen etwa halbmaximalen Schutz bieten. Ascorbat ist also vermutlich in der Lage, im Lipidgemisch die kleineren, geringer lipophilen Substanzen eher zu recyceln, während größere, lipophilere Derivate erst zeitabhängig wiederhergestellt werden können, wenn sie sich homogen verteilt haben.

6.3 Struktur-Wirkungs-Analyse in zellulären neuronalen Systemen

Nach diesen allgemeinen biochemischen Analysen der neuen Phenothiazinderivate wurden Untersuchungen im komplexen zellulären Modell bezüglich der antioxidativen Wirksamkeit und Neuroprotektion vorgenommen. Murine neuronale HT-22 Zellen wurden als etablierte Zelllinie für Cytoprotektionstests bei unterschiedlicher Toxinexposition (Glutamat oder H_2O_2) gewählt. Die Plasmamembranintegrität wurde als Marker für das Zellüberleben nach oxidativem Stress durch spezielle Färbung analysiert. Zur groben Einschätzung der Lokalisation des neuronalen Schutzes fand der redox-sensitive Farbstoff DCFA, als wasserlösliche Sonde, Anwendung.

Die Effektivität der Cytoprotektion wurde zunächst bei einem langsamen, durch Glutamat induzierten Stress über 24 Stunden erfasst. Nur lebende, metabolisch aktive neuronale HT-22 Zellen setzen den gelben Farbstoff MTT zu einem violett gefärbten Produkt um, dessen Quantität photometrisch bestimmt wird (Mosmann 1983) und so Aussagen über die neuroprotektiven Fähigkeiten von Substanzen zulässt. Phenothiazin (**1**) stellte sich als hoch cytoprotektives Antioxidans mit einem EC_{50} -Wert von 30 nM heraus (Abb.5.4.1 **A**), welches nur noch von 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) (Abb.5.4.1 **B**) und den benzenellierten Derivaten **10**, **11** und **12** (Abb.5.4.1 **D**) übertroffen wurde, deren mittlere effektive Wirkkonzentration bei ca. 8 nM lag. Die Substitution von Fettsäureketten mit 4, 8 und 16 Kohlenstoff (Substanzen **4**, **5** und **7**) zeigte keine Steigerung der cytoprotektiven Aktivität gegenüber unsubstituiertem Phenothiazin. Dies könnte bei dem vermutlich zu lipophilen Derivat **7** auf eine ineffiziente Permeation der Zellmembran zurückzuführen sein, wobei der C16-Substituent die Diffusion in die Zelle behinderte. Es könnten sich auch im wässrigen Zellkulturmedium, aufgrund schlechter Löslichkeit von **7**, Mizellen gebildet haben, die ein Eindringen in die Zelle erschwerten. Derivat **4** ist trotz des C4-Fettsäurerests nicht lipophiler als Phenothiazin (vgl. Tab.5.1.1) und erreichte auch keine effektivere Wirksamkeit. 2-(Octylamidomethyl)-phenothiazin (**5**) ist lipophiler als die Ausgangssubstanz und entwickelte eine bessere Protektionsaktivität als **4**, die jedoch ebenfalls nicht der Kapazität von Phenothiazin entspricht. Das C12-Derivat (**6**) zeigt eine Neuroprotektionsaktivität, welche um

das Vierfache höher ist als die von **1** (Abb.5.4.1 **B**). Es scheint ein Lipophilieoptimum (bei einem $\log P \approx 7$) für eine optimale Wirkung als neuroprotektives Antioxidans zu geben.

Die Substanzen mit der endständigen Amino- und Carboxylgruppe (**3** und **8**) (Abb.5.4.1 **A** und **C**) zeigen im Vergleich zu den lipophilen Derivaten höhere EC_{50} -Werte. Ihre verringerte antioxidative Wirksamkeit lässt sich durch das Vorliegen der geladenen Gruppen erklären, die die Substanzen wasserlöslicher machen, aber gleichzeitig die Zellpermeation erschweren. Das Aminoderivat (**3**) besitzt in diesem Sinne noch den Vorteil, im protonierten Zustand mit seinem pKs-Wert näher am physiologischen pH der Zelle zu sein, somit eher die Zelle zu permeieren und eine höhere neuroprotektive Effektivität als **8** zu entwickeln.

Vergleicht man 2-Carboxylphenothiazin (**8**) mit seinem wässrigen Analogon Trolox (**8a**) (Abb.5.4.1 **C**), erreicht **8** deutlich niedrigere EC_{50} -Werte (0,3 μM zu 20 μM). Gleiches gilt für NH-Tocopherol (**9**) (mit dem Phtylsubstituenten) versus α -Tocopherol (**9a**) (30 nM zu 150 nM). Hierbei offenbart sich die Überlegenheit der Substanzen mit der Phenothiazingruppe als antioxidatives Element gegenüber den Substanzen mit einem Phenol als antioxidative Komponente. Bemerkenswerterweise wirkt NH-Tocopherol (**9**) genauso effektiv auf das Überleben der neuronalen Zellen wie die Muttersubstanz **1** ($EC_{50} = 30$ nM), trotz der höchsten Lipophilie in der Reihe aller Derivate. Der verzweigte Phtylrest bedingt offenbar eine Überschreitung des vermutlichen Lipophilieoptimums von ungefähr $\log P \approx 7$, was aber nicht wirksamkeitsmindernd zu sein scheint. Ursache hierfür könnte die Verzweigung des lipophilen Rests sein, welche gewisse Rotationen des Substituenten zulässt, wodurch gegebenenfalls eine schnellere Diffusion durch eine kleinere Moleküloberfläche begünstigt werden könnte. Die strukturelle Nähe zum im Organismus essentiellen α -Tocopherol könnte ebenfalls Teil an diesem positiven Effekt haben.

Die benzanellierten Substanzen **10**, **11** und **12** (Abb.5.4.1 **D**) zeigten alle eine Erniedrigung der halbmaximal effektiven Wirkkonzentration um den Faktor vier im Vergleich zu Phenothiazin. Die erhöhte strukturbedingte Radikalstabilisierung gibt diesen Derivaten offenbar die Fähigkeit, eine höchst effektive, antioxidative Neuroprotektion auszuüben.

Die experimentelle Variation des Toxins ergab ähnliche Resultate (Abb.5.4.2). Das dabei eingesetzte H_2O_2 übte einen akuten Stress aus, was mutmaßlich die nicht so schnell und effizient permeierenden Stoffe in ihrer Aktivität insgesamt eingeschränkte.

Allgemein könnte man, ebenso wie bei den TBARS-Experimenten (Kapitel 6.2), eine Abhängigkeit von Zeit und Temperatur vermuten. Unter den gewählten Cytoprotektions-Bedingungen wirkt das Toxin sowie die Antioxidantien lange (24 h) auf die Zellen bei der erhöhten Temperatur von 37 °C ein. Höhere Temperaturen fördern generell die Diffusion. Ein

Verteilungsgleichgewicht der lipophileren Substanzen hätte sich folglich früher einstellen können, so dass die Zellen früher vor oxidativem Stress bewahrt werden konnten und das C12-Derivat (**6**) eine viermal so effektive Schutzkapazität im Vergleich zu Phenothiazin ausübte.

Zusätzlich wurde ein Vergleich der Cytoprotektionseffektivität gegenüber Glutamatstress mit bekannten natürlichen Antioxidantien wie Ascorbat, dem häufig in Nahrungsmitteln verwendeten Phenol Butylhydroxytoluol (BHT), dem Radikalfänger NXY-059 (Cerovive®) sowie α -Tocopherol (**9a**) und Trolox (**8a**) unternommen. Abbildung 6.3.1 zeigt die deutliche Überlegenheit von Phenothiazin (**1**), dem C12-Derivat (**6**) und dem benzanellierten Derivat **12**. Phenothiazin (**1**) als Leitstruktur für die in dieser Arbeit synthetisierten, neuen antioxidativen, kettenabbrechenden Substanzen zeigt neben dem besten natürlichen, phenolischen Antioxidans Vitamin E (**9a**), welches schon häufig in klinischen Studien untersucht wurde (Martin et al. 2002), eine Protektionssteigerung von 150 nM auf 30 nM halbmaximale effektive Wirkkonzentration. Als bekanntes Phenol mit sehr gut beschriebener antioxidativer Wirkung (Freyschuss et al. 2001) entwickelt BHT einen EC_{50} -Wert von 2 μ M, wohingegen das hydrophile, häufig klinisch getestete Ascorbat (Martin et al. 2002) mit 12 μ M weniger effektiv vor dem Glutamat-induzierten Zelltod schützt. Das ebenfalls wasserlösliche Trolox (**8a**) wirkt bei 20 μ M halbmaximal gegen oxidativen Stress. Auffällig ist hierbei die Unwirksamkeit von NXY-059 bis zu einer Konzentration von 1 mM, wobei dieses sich bis 2006 in einer klinischen Phase III-Studie für neuronale Ischämie befand (Lees et al. 2006). Phenothiazin übertrifft alle bisher bekannten phenolischen Antioxidantien, seien diese natürlich vorkommend oder synthetisch modifiziert. In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die Grundstruktur des Phenothiazins so zu verändern, dass die ausgewählten neuen Derivate **6** und **12** in noch niedrigeren Konzentrationen (um einen Faktor 4 besser) neuroprotektiv wirken, was anhand der Kurven (Abb.6.3.1) offensichtlich wird. Dabei konnte dieser Effekt entweder durch die Optimierung der Lipophilie mittels Substitution einer C12-Fettsäure ($\log P \approx 7$) oder mittels Erhöhung der Radikalstabilisierung des aromatischen Systems durch Benzanellierung erreicht werden.

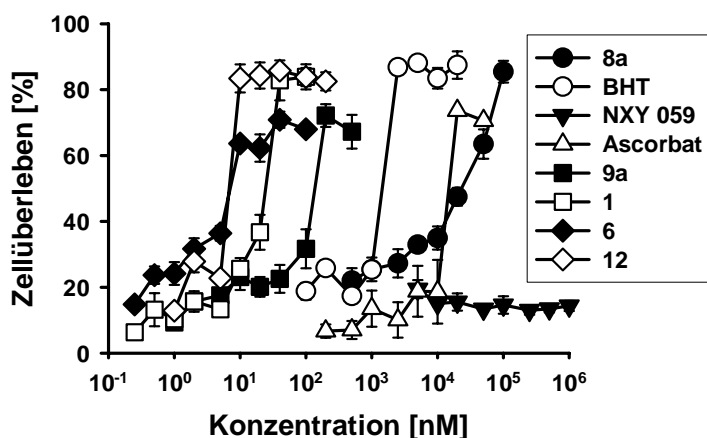


Abb. 6.3.1: Vergleich des Zellüberlebens von HT-22-Neuronen mit bekannten Antioxidantien nach Glutamatexposition

8a – Trolox; **BHT** – Butylhydroxytoluol; **NXY-059** – zweifach sulfoniertes Phenylbutylnitron; **9a** – α -Tocopherol; **1** – Phenothiazin; **6** – 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin; **12** – Benzo[c]phenothiazin

Um einen systematischen Fehler durch mögliche Redoxreaktionen des verwendeten Farbstoff MTT mit den zu testenden Antioxidantien auszuschließen, wurde nach den gleichen Bedingungen mit einer Propidiumiodid-Färbung gearbeitet (Kapitel 4.5.2) (Krishan 1975), mit Hilfe derer sich die überlebenden Zellen mikroskopisch quantifizieren ließen. Wie in den Ergebnissen in Kapitel 5.4.2 dargestellt, konnten die MTT-Resultate bestätigt werden (Abb.5.4.3). Im PI-Test zeigten sich Unterschiede zwischen den aromatischen Benzo[x]phenothiazinen (Abb.5.4.3 C). Nur das linear verknüpfte Benzo[b]phenothiazin (**11**) bewirkt schon bei einer getesteten Konzentration von 1 nM eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Protektion der murinen Neurone gegen Glutamat. Die a- und c-Anellierung des aromatischen Ringes der anderen beiden Benzophenothiazine (**10**, **12**) könnte die Diffusion in die Zelle strukturell beeinflussen, während das lineare benzanellierte Derivat leichter die Zellmembran überwinden und so marginal effizienter reaktive Spezies abfangen könnte.

Zur subzellulären Lokalisation des antioxidativen Schutzes der neuronalen HT-22 Zellen durch die neuen lipophilen Substanzen wurde der Farbstoff DCFA verwendet, der sich im Cytosol anreichert und dort zum Beispiel von zellulären Peroxiden angegriffen wird. Die Protektion von DCFA durch die zu untersuchenden Antioxidantien sank mit zunehmender Lipophilie (Abb.5.4.4). Die Resultate untermauern die Hypothese, dass die fettsäuretragenden Phenothiazinderivate sich eher in Zellorganellmembranen, wie beispielsweise der Mitochondrienmembran, anreichern und dort vor Oxidation schützen und so wesentliche

Zellfunktionen erhalten. Im wässrigen Zellkompartiment, dem Cytosol, können offensichtlich nur amphiphile (3) oder nicht so lipophile Derivate (1, 2, 4) (Abb.5.4.4) ihre Protektionsfunktion ausführen.

6.4 Bedeutung von Lipidperoxidation und Proteinoxidation für den Schutz von zellulären neuronalen Systemen durch Phenothiazine

Die Überlegenheit im Zellüberlebensexperiment von 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (6) gegenüber der Leitstruktur Phenothiazin (1) wurde auf besondere Zielmoleküle untersucht. Die Frage, welche Bestandteile der Zelle durch das C12-Derivat eher vor Oxidation geschützt werden als durch das weniger lipophile Phenothiazin, galt es zu beantworten. Zur Aufklärung dessen wurde der Fokus zunächst auf die Lipidperoxidation einer bestimmten polyungesättigten Fettsäure, der Arachidonsäure, gelegt. Deren Peroxidation, kann durch die Bildung von 8-Isoprostanen (Janssen 2001) in Zellen unter oxidativem Stress, als selektiver und empfindlicher Marker verwendet werden. Um die Cytoprotektionsunterschiede der Substanzen weiter zu analysieren und für die Zelle wichtige molekulare Überlebensfaktoren, die es zu schützen gilt, zu ermitteln, wurde die Protektion vor oxidativen irreversiblen Modifikationen auf allgemeiner Proteinebene (Levine et al. 1990) in Form von Proteincarbonylen, und mit nachträglicher Spezifikation auf ein bestimmtes Transmembranprotein (Na/K-ATPase) untersucht.

Die Bildung von freiem 8-Isoprostan (F₂-Isoprostan) konnte mit beiden getesteten Substanzen 1 und 6 in gleichem Ausmaß unterbunden werden (Abb.5.4.5). Der erhaltene, signifikante Trend erhöhter Lipidprotektion in Toxin-exponierten HT-22 Zellen zeigte sich bei beiden Substanzen nahezu in identischer Weise (Abb.5.4.5). Da also keine wesentlichen Unterschiede sichtbar waren, ist davon auszugehen, dass Derivat 6 im Hinblick auf durch Lipidperoxidation gebildete, eher kurzlebige Isoprostane (im Vergleich zu eher langlebigen Proteinoxidationsprodukten) keinen so intensiven Einfluss auf den ungefähr 4-fach verbesserten EC₅₀-Wert von Substanz 6 nimmt. Verglichen mit den *in vitro* -Experimenten zur Lipidperoxidation mit nativen Rattenhirnlipiden (TBARS, Abb.5.3.5) ist die Untersuchungsmethode zur Bildung von Isoprostanen häufig vorteilhafter. Generell wurde von anderen Arbeitsgruppen oft ein paralleles Ansteigen von Malondialdehyd (MDA), welches der Marker im TBARS-Experiment ist, und F₂-Isoprostanen festgestellt (Longmire et al. 1994). MDA ist jedoch relativ instabil und wird von zahlreichen PUFAs gebildet, während F₂-Isoprostane sich nur aus der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure bilden und stabiler sind als MDA, und daher den Vorteil einer höheren Sensitivität und Spezifität des Assays

bieten (Longmire et al. 1994; Morrow & Roberts 1996). Die im TBARS-Experiment sichtbaren Unterschiede zwischen Phenothiazin und Derivat **6**, in denen Phenothiazin besser vor Lipidperoxidation der Rattenhirnlipide schützte (Abb.5.3.5 **A** und **B**), werden in der empfindlicheren Isoprostan-Messung im komplexen Zellmodell aufgehoben.

Auf der Ebene der Lipide schützen beide Antioxidantien (**1** und **6**) gleich gut (Abb.5.4.5). Wenn die neuen lipophileren Derivate folglich keinen wesentlicheren Einfluss auf die Verhinderung der Lipidperoxidation nehmen sollten als das Ursprungsmolekül Phenothiazin, könnte der Schutz vor Proteinoxidation als Hauptparameter für die verbesserten MTT-Überlebensresultate verantwortlich sein. Die irreversible Oxidation von bestimmten Proteinen kann wichtige Zellfunktionen negativ beeinflussen (siehe Einleitung Kapitel 1.1.3.2) und zum Zelluntergang führen. Die Bildung von Proteincarbonylen sowohl in der Proteinseitenkette als auch im Proteinrückgrat durch Oxidation kann über eine Derivatisierung mit DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) sichtbar gemacht werden (Methoden 4.5.5). Entsprechende Versuche zur Proteincarbonylierung ergaben (Abb.5.4.6 und Abb.5.4.7) tatsächlich eine signifikante Überlegenheit des C12-Derivates **6** gegenüber Phenothiazin nach statistischer Auswertung. Der experimentellen Methode nach (Kapitel 4.5.5) war Substanz **6** durch vorherige dreistündige Vorinkubation bei 37 °C offenbar in der Lage, effektiv in die HT-22 Neuronen zu permeieren und vermutlich sich in den wichtigsten Zellmembranen zu akkumulieren. Der Fettsäurerest des Derivat **6** von 12 Kohlenstoffatomen könnte zusätzlich dessen Abbau verlangsamen und so zu einem längeren Anhalten der cytoprotektiven Funktion in der Zelle führen, vergleichbar mit einem pharmakologischen Retardeffekt. Die Diffusion von Phenothiazin (**1**) könnte aufgrund seiner kleinen Molekülgröße bei entsprechender Lipophilie ($\log P \approx 4$) ebenso schnell und effizient erfolgt sein. Jedoch besitzt Phenothiazin im Gegensatz zu 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin keine lipophile Seitenkette, welche sehr wahrscheinlich zusätzlich als Membrananker agiert und auf diese Weise die Anreicherung von **6** an Membranen fördert.

Wenn das C12-Derivat sich besonders an Membranen akkumulieren sollte, könnte eine Verhinderung der Oxidation von Membranproteinen vielleicht von besonderer Relevanz sein. Da sich Proteine in Membranen in ihrem Aminosäuremuster von denen im Cytosol unterscheiden (Landolt-Marticorena et al. 1993; Hajieva et al. 2006), könnte man auf eine andere Neigung zur Carbonylbildung schließen. Ob Membranproteine gegenüber zum Abbau führender Oxidation vulnerabler sind als cytosolische Proteine, wurde in einem Experiment zur Membranprotein-Autolyse überprüft. Die Hypothese ließ sich nach Einwirken von Glutamat auf HT-22 Zellen bekräftigen. Die Ponceau-Färbungen der getrennten

Proteinfractionen zeigen eine weitgehend globale Proteolyse der Membranproteine, verglichen mit nur selektiver Proteolyse von einzelnen Proteinen im Cytosol (siehe Abb.5.4.8). Die Degradation der Membranproteine konnte durch die Behandlung der Zellen mit Antioxidantien gehemmt werden. Man kann demnach schlussfolgern, dass die Protektion von Proteinen, die sich allgemein in der Zellmembran befinden, eine wichtige Aktivität der Antioxidantien vom Phenothiazintyp ist.

Zur weiteren Spezifikation wurde ein bestimmtes, funktionell zentrales Transmembranprotein, die Na/K-ATPase, auf Autolyse untersucht. Der in MTT-Tests gezeigte Cytoprotektionsvorteil von 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**) ließ sich dabei mechanistisch jedoch nicht abbilden (Abb.5.4.9). Prinzipiell wäre zu klären, wann ein Membranprotein nach Oxidation abgebaut wird und welche strukturellen Voraussetzungen dafür vorhanden sein müssen. Möglicherweise sind Proteincarbonyle keine Signalstrukturen für die Degradation der Na/K-ATPase (Grune et al. 1997). Die Erkennungssignaturen für einen schnellen proteolytischen Abbau unterscheiden sich gegebenenfalls von denen, die für eine langsame Proteolyse verantwortlich sind. Denkbar als Abbau-Signale wären andere Produkte der Proteinoxidation wie Dityrosine oder aberrante Disulfide. Bei der Vielzahl an Membranproteinen könnte die Degradation ebenso vielfältig wie spezifisch ausgelöst werden, und es bedarf diesbezüglich weiterer Aufklärung.

6.5 Evolutionäre Betrachtung: Amine versus Phenole

In der präsentierten Arbeit wird gezeigt, dass es möglich ist, basierend auf relativ unkomplizierten Vorhersagen einiger weniger Schlüsselparameter, kettenabbrechende Antioxidantien mit höherer Wirksamkeit als α -Tocopherol und Trolox zu generieren. Im folgenden Abschnitt werden die Resultate der neu generierten Phenothiazinderivate NH-Tocopherol (**9**) und NH-Trolox (**8**) im Vergleich zu ihren phenolischen Analoga α -Tocopherol und Trolox bezüglich der evolutionären Entwicklung von Phenolen betrachtet. Aus welchen Gründen findet man in der Natur hauptsächlich phenolische, niedermolekulare Strukturen für antioxidative Zwecke?

Die durchgeführten Experimente (zur Lipidperoxidation und zum Zellüberleben) beschreiben vermutlich die relevanteste *in vivo*-Aktivität von α -Tocopherol, nämlich die Hemmung von freien Radikalkettenreaktionen in unpolarer Umgebung. α -Tocopherol ist eine phenolische Substanz, deren cytoprotektives Potential in kultivierten Neuronen von allen anderen Antioxidantien wie Phenolen, Thiolen, Polyenen oder Spin Traps unerreicht ist (Behl & Moosmann 2002; Ohlow et al. 2010). Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann

man spekulieren, dass aromatische Amine einen generellen Vorteil in Bezug auf antioxidative Aktivitäten besitzen, da NH-Tocopherol (**9**) fünfmal effektiver cytoprotektiv wirkt als α -Tocopherol (Abb.5.4.1 C). Dieser Vorteil könnte aus der besseren Stabilisation des radikalischen Zustands durch die vorhandenen zwei gepaarten aromatischen Ringsysteme des Phenothiazingerüsts herrühren. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass einfache aromatische Amine wie 4-Dodecylanilin genauso potent wie einfache phenolische Komponenten wie 4-Dodecylphenol sind, während beide Strukturen jedoch weniger antioxidativ wirken als Diphenylamin, in welchem der Stickstoff mit zwei Benzolringen verknüpft ist (Moosmann et al. 2001). Überdies ist NH-Tocopherol noch nicht einmal als Antioxidans optimiert und wurde vor allem wegen der Ähnlichkeit zu α -Tocopherol gemäß Molekülgröße und Löslichkeit synthetisiert. Beispielsweise könnte eine Methylierung oder Addition anderer Substituenten an das PhenothiazinGrundgerüst zu einer noch besseren Cytoprotektivität führen.

Neben dieser lediglich biochemischen Betrachtung muss man allerdings bedenken, dass NH-Tocopherol, auch wenn es das Zellüberleben effektiver als α -Tocopherol schützt, dennoch potentielle, rezeptorabhängige Mechanismen des echten α -Tocopherols nicht notwendigerweise auch nachahmen kann. Darüber hinaus ist für die Gewebsverteilung von α -Tocopherol das sogenannte α -Tocopherol-Transferprotein verantwortlich (Hosomi et al. 1997). Das Fehlen eines entsprechenden Transferproteins für NH-Tocopherol könnte zu einer niedrigeren Resorption (Traber & Atkinson 2007) führen. Zusätzlich besitzen Chromanol (Kopfgruppe von Vitamin E) und Phenothiazin (Kopfgruppe von NH-Tocopherol) unterschiedliche Abbau- und Exkretionswege, was ebenfalls die relative Wirksamkeit *in vivo* beeinflussen könnte. Jedoch in Bezug auf die primäre Aktivität als Inhibitoren der Lipidperoxidation und als cytoprotektive Substanzen sind aromatische Amine (hier: Phenothiazin) offensichtlich potenter als Phenole (hier: Chromanol). Das wirft die Frage auf, warum nur Tocopherol mit der Chromanol-Kopfgruppe von der Natur als primäres kettenabbrechendes Antioxidans ausgewählt wurde und nicht ein aromatisches Amin. Für beide Klassen an Substanzen existieren auch biosynthetische Strategien (Romero et al. 1995; Dellapenna 2005), so dass beide Prinzipien möglich gewesen wären. Eine mögliche Antwort ergibt sich aus dem Syntheseweg von α -Tocopherol.

Die Tocopherol-Synthese in Pflanzen beginnt mit Tyrosin, wird über Homogentisinsäure fortgesetzt, in welcher die spätere *para*-Konfiguration der zwei Sauerstoff-Substituenten am aromatischen Ring bereits vorbereitet ist, und führt zu dem sehr lipophilen Isoprenphenol 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzochinon (Dellapenna 2005). Sie wird durch den Ringschluß zum δ -

Tocopherol beendet, wobei sich Methylierungsreaktionen zu β -, γ - oder α -Tocopherol anschließen können. Jeder der genannten Syntheseschritte (Lipophilisation, Ringschluß, Methylierung) steigert nun die antioxidative Kapazität des resultierenden Produktes. Tyrosin, die monophenolische Ausgangskomponente und proteinogene Aminosäure, wird als eines der ältesten, wenn nicht sogar das älteste Antioxidans angesehen (Moosmann & Behl 2000; Moosmann et al. 2010), weist aber nur mäßige antioxidative Aktivität auf. Erst durch Substitution eines lipophilen Rests erhält Tyrosin signifikant antioxidative und cytoprotektive Aktivität (Moosmann & Behl 2000). Die Ringschlußreaktion zum Chromanol verstärkt als dann eine molekulare Konformation, in der die einsamen Elektronenpaare des *para*-Sauerstoffs sich zur weiteren Stabilisierung des radikalisierten Zustands des phenolischen Moleküls in günstiger Weise ausrichten (Burton & Ingold 1981). Im letzten Schritt führt besonders die Methylierung der phenolischen *ortho*-Positionen zu zusätzlicher induktiver und sterischer Stabilität des radikalischen Phenoxylstatus (Burton et al. 1985). Mit Blick auf diese Biosynthese und die evolutionäre Abfolge der Ereignisse scheint es, dass die Natur, durch den Anstieg des biosphärischen Sauerstoffgehalts oder durch andere prooxidative Veränderungen in der Umwelt gezwungen war, bessere kettenabbrechende Antioxidantien zu entwickeln. Dabei war es möglicherweise günstiger, bei dem einmal gewählten Strukturmotiv zu bleiben und die vorhandene, erprobte, phenolische Strategie der Antioxidation nach und nach zu verbessern, als alle Konzepte zu verwerfen und eine komplett neue Substanzklasse zu generieren. Diese Schlußfolgerung wird durch die Betrachtung der Biosynthese aromatischer Amine unterstützt, die generell vom Anthranilsäure-Weg ausgeht. Dieser stellt einen evolutionär jüngeren Biosyntheseweg zur Bereitstellung von Tryptophan, der jüngsten proteinogenen Standardaminosäure (Trifonov 2004), dar (Romero et al. 1995). Außer Tryptophan entwickelten sich nur sehr wenige andere Metabolite aus dem Anthranilsäure-Weg, wie die Acridon-Alkaloide (Rohde et al. 2008). Demzufolge ist es möglich, dass die Natur Phenole als vorherrschende kettenabbrechende Antioxidantien gewählt hat, weil der Anthranilsäure-Weg noch nicht zur Verfügung stand, als pro-oxidative Veränderungen in der Umwelt die Entwicklung von spezialisierten, hocheffizienten Antioxidantien wie α -Tocopherol erforderte.

6.6 Perspektiven für die klinische Anwendung

Der Zusammenhang von gesteigertem oxidativen Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies und dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen wurde bereits vielfach belegt (Simonian & Coyle 1996; Markesberry 1997; Jenner 2003; Halliwell 2006;

Sayre et al. 2008). Der Einsatz von Antioxidantien zur Neuroprotektion könnte somit möglicherweise eine Therapieoption zur Verbesserung der Krankheitssymptomatiken darstellen (Moosmann & Behl 2002; Beal 2004; Halliwell & Gutteridge 2008). Die in dieser Arbeit neu synthetisierten Phenothiazinderivate zeigten in etablierten, biochemischen Experimenten gute radikalfängerische (Tab.5.3.1), proteinoxidationsinhibierende (Abb.5.3.4) und lipidperoxidationshemmende (Abb.5.3.5) Eigenschaften. Besonders hohe cytoprotektive Fähigkeiten von bestimmten Derivaten waren im zellulären Modell nachweisbar (Abb.5.4.1). Diese Fähigkeiten beinhalten den Schutz vor Lipidperoxidation (Abb.5.4.4) sowie vor Proteinoxidation (Abb.5.4.5 bis Abb.5.4.9), besonders der Membranproteine, wie experimentell belegt wurde. Um nun eine Empfehlung für eine potentielle klinische Anwendung abgeben zu können, muss man die chemischen Eigenschaften der einzelnen neuen Substanzen gesondert betrachten.

Bei akuten neurodegenerativen Prozessen wie etwa dem Schlaganfall wäre prinzipiell ein Antioxidans von kleiner Molekülgröße mit leichterer Löslichkeit von Vorteil. Eine höhere Lipophilie ist in diesem Fall vermutlich von untergeordneter Bedeutung. Es wird angenommen, dass bei zerebraler Ischämie die Blut-Hirn-Schranke in den betroffenen Hirnarealen massiv gestört ist. Somit würde keine Diffusionsbarriere mehr bestehen, welche lipophilie-abhängig überwunden werden müsste. Die neuen Derivate 2-(Aminomethyl)-phenothiazin (**3**) und 2-Carboxylphenothiazin (**8**) wären durch ihre löslichkeitsvermittelnden geladenen Gruppen daher möglicherweise gut geeignet, oxidativen Stress nach einem Schlaganfall an Ort und Stelle zu vermindern.

Für chronische, langsam fortschreitende neurodegenerative Krankheiten (Parkinsonsche oder Alzheimersche Erkrankung) ist dagegen ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke durch cytoprotektive Antioxidantien essentiell, was eine hohe, aber nicht zu hohe Lipophilie bei relativ geringer Molekülgröße erfordern würde (Seelig et al. 1994). Aufgrund des chronischen Krankheitsverlaufes wäre eine dauerhafte Einnahme empfehlenswert, was Substanzen erfordert, die in geringsten Dosierungen hocheffektiv wirksam sind und nur wenige bis optimalerweise gar keine Nebenwirkungen auslösen. Das C12-Derivat, 2-(Laurylamidomethyl)-phenothiazin (**6**), erfüllt mit einem logP-Wert von ungefähr 7 und einen EC₅₀ von 8 nM diese Voraussetzungen und bietet zugleich noch den Vorteil, dass es mit seinem Fettsäurerest als Membrananker in der Plasmamembran (zu schützen bei Morbus Alzheimer) und möglicherweise auch in der Mitochondrienmembran (besondere Protektion bei Morbus Parkinson) akkumuliert.

Auch die Verhinderung der Oxidation von LDL-Partikeln (Steinbrecher et al. 1990), in der Pathogenese der Arteriosklerose (Palinski et al. 1989; Ross 1999), könnte durch die in dieser Arbeit vorgestellten Substanzen günstig beeinflusst werden. Oxidiertes LDL führt vermutlich zu einer Ansammlung von Cholesterin in arteriosklerotischen Plaques, wodurch Blutgefäße verengen und schwere sekundäre Effekte wie Schlaganfall ausgelöst werden. 2-(Phytylamidomethyl)-phenothiazin (**9**) wäre eine Anwendungsoption zur Hemmung der LDL-Oxidation, wobei diese höchst lipophile Substanz (logP 9,72) sich im äußerst großen lipophilen LDL-Teilchen ansammeln wird. Allerdings wäre es durchaus möglich, dass eben aufgrund dieser höchsten Lipophilie, die der des α -Tocopherols sehr ähnlich ist, sich Substanz **9** wie α -Tocopherol gegenüber LDL verhält und daher in diesen Partikel aufgenommen und im Inneren gehalten wird (Cynshi et al. 1998). Die Oxidationsinitiation geschieht jedoch mehrheitlich an der Oberfläche des Partikels. Daher wäre zu bedenken, ob eine der leichter löslichen Substanzen mit geladener Gruppe wie Derivat **3** nicht günstiger für die Oxidationsprotektion von LDL sein könnte. Es wäre durch die aromatische trizyklische Struktur wahrscheinlich immer noch lipophil genug, um sich an LDL anzulagern, könnte sich aber durch die Ladung bevorzugt an der Oberfläche des Partikels aufhalten und könnte dort effektiver vor ROS schützen. Dies sind allerdings nur theoretische Überlegungen und bedürften eingehender Lokalisationsstudien.

6.6.1 Wirkt Phenothiazin prinzipiell *in vivo* als Antioxidans?

Das Cytoprotektionspotential von Phenothiazin wurde bereits in Mitochondrientoxin-basierten Modellen zu Morbus Parkinson untersucht. Die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* im Mittelhirn (Moore et al. 2005) zählt zu den typischen Symptomatiken der Parkinsonschen Erkrankung (Kapitel 1.2.2). Die sporadische Form dieser Erkrankung geht vermutlich mit einer Dysfunktion der Mitochondrien sowie einer vermehrten Produktion an ROS einher (Blum et al. 2001; Jenner 2003). Da hierbei die Aktivität des Atmungskettenkomplexes I in der *Substantia nigra* gestört zu sein scheint (Blum et al. 2001), wird in Krankheitsmodellen oft mit Komplex I-Inhibitoren wie MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) oder Rotenon gearbeitet, die auch zu einer Steigerung der reaktiven Sauerstoffspezies führen (Cleeter et al. 1992), gefolgt von der Einleitung des Zelltods. Auf zellulärer Ebene war es nun möglich, dopaminerge Zellen durch Gabe von Phenothiazin im nanomolaren Bereich (20 – 60 nM) vor Toxinen wie MPP⁺ und Rotenon zu schützen (Hajjeva et al. 2009).

Auch in einem etablierten Wurmmodell (*Caenorhabditis elegans*) für die Parkinsonsche Erkrankung konnte eine cytoprotektive Wirkung von Phenothiazin gezeigt werden. Bei diesem *in vivo* Experiment führt die Behandlung der Würmer mit MPP⁺ ebenfalls zu einer spezifischen Degeneration der dopaminergen Neurone (Braungart et al. 2004). Mit Toxin behandelte Würmer gingen in Studien ohne Antioxidans in larvalen Arrest über oder verstarben, während Phenothiazin und dessen Derivat Methylenblau (Abb.1.3.1) eine normale Entwicklung des Wurms zum adulten Tier ermöglichten (Mocko et al. 2010). N-substituierte Substanzen wie das Antipsychotikum Chlorpromazin (Abb.1.3.1) waren nicht in der Lage, protektiv auf den Wurm einzuwirken, was wiederum einen antioxidativen Wirkmechanismus von Phenothiazin untermauert. Die Gabe von Antioxidantien wie α -Tocopherol, Catechin und Epigallocatechingallat schützte nur in hohen Konzentrationen von 20 μ M vor dem Toxin (Mocko et al. 2010). Zur Überprüfung der Integrität der Dopaminreizweiterleitung und der senso-motorischen Regelkreisläufe (Sanyal et al. 2004) wurde in jener Arbeit der sogenannte Nose-Touch Assay angewendet, bei dem eine messbare Rückwärtsbewegung des Wurms nach mechanischer Stimulation nur bei funktionellen dopaminergen Neuronen ausgelöst wird. Auch unter diesen Bedingungen konnte unter Einfluss von Phenothiazin ein weitgehend normales, Dopamin-gesteuertes, lokomotorisches Verhalten verzeichnet werden (Mocko et al. 2010). Aus dem Vergleich dieser Daten mit den Resultaten der Überlebensexperimente von neuronalen, durch Glutamat oxidativ geschädigten HT-22 Zellen (Abb.5.4.1) lässt sich schlussfolgern, dass zumindest einige der neu synthetisierten Substanzen auch in Parkinsonmodellen antioxidative Wirkeffekte zeigen sollten.

6.6.2 Phenothiazin im Tiermodell bei Schlaganfall

Die Protektionsergebnisse der mit Glutamat gestressten murinen hippocampalen HT-22 Zellen erlauben Schlußfolgerungen zur Schlaganfalltherapie. Ein Schlaganfall wird meist durch einen thromboembolischen Verschuß eines Gefäßes im Gehirn ausgelöst (Kapitel 1.2.1). Die Minderdurchblutung bedingt einen Sauerstoffmangel in betroffenen Hirnarealen und fördert letztendlich eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration (Murphy et al. 1989, Schubert & Piasecki 2001; Choi 2005). Die dadurch vermehrt aktivierten NMDA-Rezeptoren führen zu einem massiven Einstrom von Natrium- und Calciumionen, zur erhöhten Produktion von ROS und erhöhtem Verbrauch von ATP (siehe Kapitel 5.4.1). Die Neuronen leiten aufgrund der Exzitotoxizität durch Glutamat den programmierten Zelltod ein. Unter Zellkulturbedingungen verursacht ein hohe Konzentration Glutamat in den HT-22 Zellen jedoch keine Exzitotoxizität, sondern eine sogenannte Glutamatoxizität durch die

Hemmung des Cystin/Glutamat-Antiporters. Dennoch wirkt zuviel Glutamat schließlich toxisch. Phenothiazin wurde bisher in einer *in vivo* Studie als Neuroprotektivum bei zerebraler Ischämie getestet. Dabei wurden Ratten vor Induktion des Schlaganfalls 10 mg/kg Phenothiazin verabreicht und dadurch das hippocampale Zellüberleben signifikant gesteigert (Lasarzik et al. 2010). Gleichzeitig überprüften die Autoren das räumliche Lernen (Barnes Maze Test) der Ratten an verschiedenen Tagen nach Ischämie und beobachteten durch *post mortem*-Mikroglia-Färbungen die Entzündungsreaktion. Die mit Phenothiazin behandelten Ratten wiesen ein signifikant verbessertes Lernverhalten auf, wobei es keinen Einfluss auf die gemessenen Entzündungsparameter gab (Lasarzik et al. 2010). Dies könnte mit einer antioxidativen Wirkung während der Reperfusionphase, in der das Gehirn vermehrtem oxidativen Stress ausgesetzt ist, zusammenhängen, während der spätere Entzündungsprozess noch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Die neuen Phenothiazinderivate könnten vermutlich zumindest prinzipiell ebenso protektiv in diesem Schlaganfallmodell agieren. Interessant wäre nun eine Untersuchung mit ausgewählten neuen Substanzen wie **3** und **8**. Phenothiazin musste für jene Tierstudie wegen seiner Wasserunlöslichkeit erst in Ether vorgelöst und dann in Lipovenös (eine lipophile Sojabohnenöllösung) überführt werden, bevor es den Ratten intravenös appliziert werden konnte. Leichter lösliche Derivate wie **3** und **8** könnten die Applikation vereinfachen. Zudem wären allgemeine Rückschlüsse zur Einordnung der Substanzgabe innerhalb eines bestimmten Zeitfensters nach einem Schlaganfall möglich, und es könnten Hinweise zur Präventionsmedikation für Hochrisikogruppen gewonnen werden.

6.6.3 Phenothiazin im Menschen

Hinweise auf eine antioxidative Wirkung von Phenothiazinen im Menschen gibt es ebenfalls bereits. Allerdings betreffen diese nicht Phenothiazin direkt, sondern eines seiner Derivate, das Methylenblau, welches sich durch zwei zusätzliche tertiäre Aminogruppen unterscheidet. Betrachtet man die Struktur von Methylenblau (Abb.1.3.1) genauer, fällt zunächst das Fehlen einer freien NH-Gruppe zur homolytischen Freigabe eines Wasserstoffatoms auf. Dies lässt primär nicht auf ein antioxidativ wirkendes Molekül schließen (Moosmann et al. 2001). Jedoch wird Methylenblau *in vivo* schnell durch NADPH-abhängige Flavoenzyme oder mitochondriale NADPH-Dehydrogenase (Atamna et al. 2008) zu seiner reduzierten leuko-Form umgewandelt, die, vergleichbar mit Phenothiazin, direkt antioxidativ wirken müsste (Abb.6.6.1). Somit könnte leuko-Methylenblau durch Abgabe seines freien Wasserstoffatoms ein Peroxylradikal entgiften und selbst radikalisiert werden. Die zwei

Dimethylaminosubstituenten befähigen leuko-MB, aus dem radikalischen Zustand zu disproportionieren. Das entstehende Methylenblau (MB) kann dann, wiederum NADPH-abhängig, enzymatisch zum antioxidativ aktiven leuko-MB umgesetzt zu werden. Diese Eigenschaft wird Redox-cycling genannt.

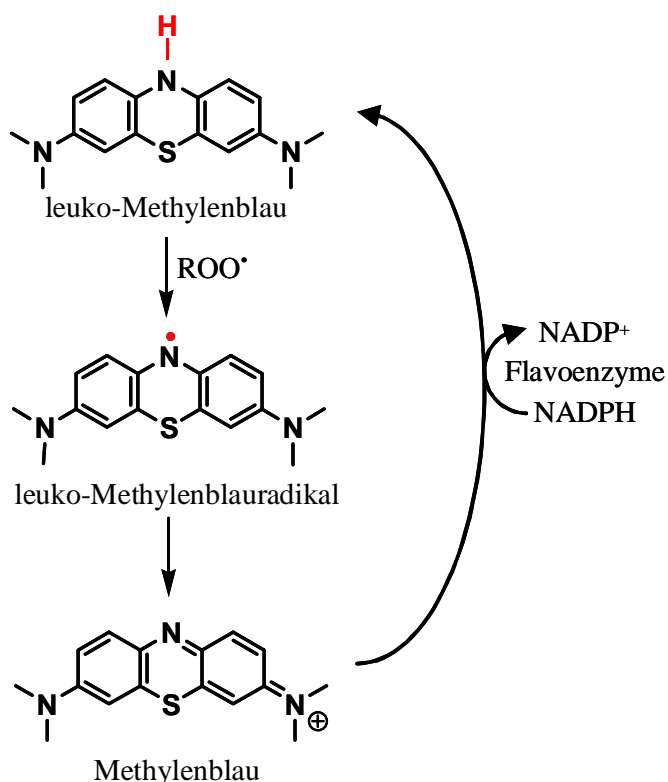


Abb. 6.6.1: Redox-cycling von Methylenblau

Methylenblau wird *in vivo* von Flavoenzymen NADPH-abhängig in das farblose leuko-Methylenblau reduziert, welches wiederum reaktive Spezies wie Peroxide (ROO^\bullet) durch die homolytische Abspaltung von Wasserstoff entgiften kann. In radikalisiertem Zustand kann leuko-Methylenblau im Zuge einer Disproportionierungsreaktion zusätzlich ein Elektron abgeben und resultiert im stabilen Methylenblau(kation). Der Prozess von Elektronenabgabe und -wiederaufnahme wird Redox-cycling genannt. (Abbildung aus Ohlow & Moosmann, 2011 leicht modifiziert)

Methylenblau kann darüberhinaus als lipophiles Kation in Mitochondrien akkumulieren, solange diese ihr Membranpotential aufrechterhalten. MB zögert die replikative Alterung von primären humanen Fibroblasten hinaus (Atamna et al. 2008), möglicherweise, indem es zwischen den Atmungskettenkomplexen I und IV redox-cycelt, was sich in einer Hemmung

der mitochondrialen Oxidantienproduktion zeigen sollte (siehe Abb.6.6.2 A). Man könnte nun vermuten, dass in den vielen bisher untersuchten Tiermodellen zur Neurodegeneration, in denen Methylenblau eine Wirkung zeigte (Zhang et al. 2006; Furian et al. 2007; Rojas et al. 2009), der eigentliche Träger der protektiven Funktion das leuko-Methylenblau war und wie das gewöhnliche Phenothiazin (1) antioxidativ, kettenabbrechend wirkte. Auch wenn mechanistisch höchst komplex, bleibt Methylenblau aber mit Sicherheit ein spannender Kandidat für Studien zu degenerativen Erkrankungen mit mitochondrialer Dysfunktion, wie sie beispielsweise für die Parkinsonsche Krankheit angenommen wird (Blum et al. 2001; Jenner 2003).

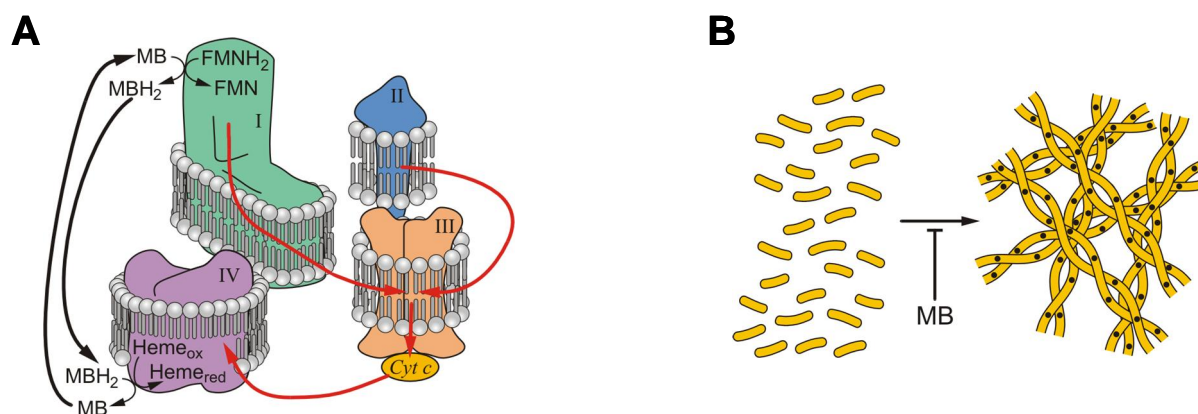


Abb. 6.6.2: Mögliche Mechanismen der Interferenz von Methylenblau bei der Alzheimer'schen Erkrankung

A: Methylenblau (MB) unterstützt die Atmungskettenkomplexe der Mitochondrien mittels seiner Fähigkeit zum Redox-cycling. Dabei wird an Komplex I das reduzierte Flavinmononukleotid (FMNH₂) MB-abhängig zu FMN oxidiert, wodurch weniger Superoxidanionradikale an dieser Stelle entstehen. Das reduzierte vorliegende MB (leuko-MB; MBH₂) wird an Komplex IV rücoxidiert. Der normale Elektronenfluss durch alle Atmungskettenkomplexe wird durch die roten Pfeile dargestellt.

B: Hemmung der tau-Aggregation (Bildung von neurofibrillären Ablagerungen) durch MB als lipophiles, oberflächenaktives Kation.

(Abbildung aus Ohlow & Moosmann, 2011 entnommen)

In Bezug auf dementielle Syndrome konnte Methylenblau in einem Mausmodell für Demenz und Alzheimer das durch Scopolamin gestörte räumliche Lernverhalten nebenwirkungsfrei (bis 4mg/kg) verbessern (Deiana 2009). Die Alzheimer Erkrankung ist gekennzeichnet durch

ein langsames Fortschreiten des Verlustes von hippocampalen und cholinergen Neuronen (Simonian & Coyle 1996), verbunden mit dem Auftreten von Demenz und extrazellulären A β -Plaques (Kapitel 1.2.3). Paarweise angeordnete, intrazelluläre, helicale Filamente aus hyperphosphoryliertem tau-Protein gelten ebenfalls als ein pathologisches Hauptmerkmal der Alzheimerschen Krankheit. In einer bisher noch nicht veröffentlichten klinischen Phase II-Studie sollen bereits 180 mg Methylenblau pro Tag über 21 Monate hinweg sehr gute Ergebnisse zur kognitiven Leistungsfähigkeit gegenüber Placebo bei Patienten mit diagnostiziertem moderaten Alzheimer ergeben haben (Strobel 2009). In vorhergehenden *in vitro*-Untersuchungen konnte die tau-Aggregation durch Methylenblau (siehe Abb.6.6.2 **B**) halbmaximal mit 3,4 μ M inhibiert werden (Wischik et al. 1996). Auf welche Weise Methylenblau nun mechanistisch auf die Alzheimer Pathologie einwirkt, ob durch die Unterstützung der Mitochondrien über Redox-cycling (Abb.6.6.2 **A**) (Rojas et al. 2009; Atamna et al. 2008), durch Protektion vor vermehrtem oxidativen Stress über das Abfangen von Radikalen (Abb.6.6.1) (Moosmann et al. 2001; Mocko et al. 2010) oder durch Hemmung der tau-Aggregation (Abb.6.6.2 **B**) (Wischik et al. 1996), bleibt jedoch weiterhin diskussionswürdig. Sollten jene Resultate in weiteren, unabhängigen klinischen Studien bestätigt werden, könnte Methylenblau zur Aufklärung des wahren Pathomechanismus der Alzheimerschen Erkrankung, der nach wie vor umstritten ist, beitragen.

6.6.4 Zusammenfassung

Die diskutierten Studien zeigen das besondere klinische Interesse am antioxidativen Phenothiazinmolekül. Die Fähigkeit, in nanomolarer Potenz zellulär als radikalkettenabbrechende Substanz zu agieren, sowie die durch geringste notwendige Dosierungen vermutlich bestehende Nebenwirkungsarmut, lassen Phenothiazin als attraktive Leitstruktur im zukünftigen Medikamentendesign für neurodegenerative Erkrankungen erscheinen. Es war innerhalb dieser Arbeit möglich, neue Substanzen auf Phenothiazinbasis zu generieren, von denen ausgesuchte Moleküle eine Wirksamkeitssteigerung und erwünscht veränderte Löslichkeitseigenschaften aufwiesen. Das C12-Derivat (**6**) zeigte sich als lipophiles Optimum ($\log P \approx 7$) für Cytoprotektion durch Inhibition der Proteinoxidation, das für die klinische Anwendung im Bereich von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson als Membranprotektor attraktiv wäre. Neben der Akkumulation in zu schützenden, wichtigen Zellmembranen bietet ein Fettsäurerest definierter Länge und eventuell auch Verzweigung wie bei Substanz **9** die Möglichkeit eines Retardeffektes durch verlangsamte Metabolisierung. Im Bereich der Verbesserung der Wasserlöslichkeit bei geringem antioxidativen

Wirksamkeitsverlust könnten die Derivate **3** und **8** eine neue Option für akute neurodegenerative Veränderungen (Schlaganfall) darstellen, die sich leichter applizieren lassen und sich schneller verteilen sollten. Die potentiellen Einsatzmöglichkeiten lassen sich auch auf nichtneurologische Erkrankungen erweitern, in denen oxidativer Stress ebenfalls eine pathologische Rolle spielt. So wären Studien mit den geladenen Substanzen **3** und **8** denkbar, welche die Hemmung der Oxidation von LDL-Partikeln bei Arteriosklerose untersuchen.

7 Zusammenfassung

Oxidativer Stress ist seit über 25 Jahren als ein Charakteristikum vieler pathologischer Prozesse bekannt. Helmut Sies beschrieb bereits in den 1980er Jahren oxidativen Stress als Störung in der prooxidativ – antioxidativen Balance zugunsten der prooxidativen Seite, wodurch es potentiell zu Schäden in verschiedenen Geweben kommt. Oxidativer Stress tritt sowohl bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und zerebraler Ischämie, bei peripheren Erkrankungen wie Arteriosklerose, als auch beim Alterungsprozess *per se* auf und wird als Ursache oder zumindest als ein krankheitsfördernder Faktor diskutiert. Die in *in vitro*-Experimenten als vielversprechend antioxidativ getesteten Substanzen (meist phenolhaltig) ergaben in mehreren klinischen Studien keinen signifikanten Vorteil. Um die Ursachen dieser Ergebnisse näher zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Basis des cytoprotektiven Phenothiazins, einem aromatischen trizyklischen Amin, der Einfluss von verschiedenen Substituenten im Hinblick auf Lipophilie, Radikalstabilisierung und Löslichkeit des Moleküls chemisch vorhergesagt. Anhand dieser *in silicio* Struktur-Wirkungs-Beziehung wurden anschließend neue Modellsubstanzen synthetisiert, welche sich systematisch in den drei zuvor genannten Parametern unterschieden. Dies wurde durch Substitution von unterschiedlich langen Fettsäureketten, von löslichkeitsbeeinflussenden funktionellen Gruppen, oder durch Anellierung zusätzlicher aromatischer Ringe erreicht. In den folgenden Versuchen zu antioxidativer Kapazität, zellulärem Überleben, Lipidperoxidation und Proteinoxidation zeigte sich, dass mit gesteigerter Stabilität der korrespondierenden Radikale und mit wachsender Lipophilie die antioxidativ cytoprotektive Aktivität der neuen Derivate bis zu einer gewissen Grenze ($\log P \approx 7$) signifikant zunahm; über diesen Wert hinaus sank die Effektivität wieder ab. Benzanellierte Phenothiazine entwickelten mit EC_{50} -Werten von ungefähr 8-10 nM die höchste mittlere effektive Wirkkonzentration in oxidativ geschädigten, klonalen hippocampalen Neuronen (HT-22 Zellen). Dies entspricht einer etwa 20-fachen Verbesserung gegenüber α -Tocopherol, welches bisher als bestes natürliches lipophiles Antioxidans angesehen wurde. Im Vergleich zu Phenothiazin erreichen die neuen Antioxidantien immerhin eine höhere Effektivität um den Faktor 4. Folglich sind es sowohl Aspekte der Löslichkeit und der Distribution, welche die Potenz der gegenwärtigen Antioxidantien limitieren als auch Aspekte der Radikalstabilisierung, die Einfluss auf die primäre Wirksamkeit nehmen. Dieses Wissen sollte beim zukünftigen Design neuer, antioxidativ potenter Moleküle im Hinblick auf ihren langfristigen Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen von Nutzen sein.

8 Abstract

Oxidative stress has been known as a common feature of a variety of pathologies for more than 25 years. It occurs in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's disease and cerebral ischaemia, as well as in the process of aging and is discussed as causative or disease-promoting factor. In *in vitro*-experiments, several antioxidative substances (almost all phenols) have shown promising results, but in several clinical studies, those compounds were not able to evoke significant benefits. Subsequent *in vitro*-investigations on a cellular level have shown favourable neuroprotective characteristics of bisarylimines as compared to phenols. In order to elucidate the higher efficacy of these substances, in the present work, the influence of substituents on the cytoprotective phenothiazine core, an aromatic tricyclic amine, was analysed chemically and biologically. With regard to lipophilicity, radical stabilisation and solubility, novel substances based on phenothiazine were synthesized, which systematically differed in the three above-named parameters. This was achieved by substitution of different fatty acid chains, of solubility-influencing functional groups, or by the anellation of aromatic rings. According to tests of antioxidative capacity, cell survival, lipid peroxidation and protein oxidation, the novel derivatives exhibited a significant increase in antioxidative and cytoprotective activity. This enhanced efficacy correlated with increased stability of the corresponding radicals and raised lipophilicity up to a threshold of $\log P \sim 7$. Benzoanellated phenothiazines demonstrated cytoprotection EC_{50} -values of 8-10 nM in oxidatively challenged, clonal hippocampal neurons (HT-22). This value represents a 20-fold improvement of the half-maximal effective concentration (EC_{50}) compared to α -tocopherol, the most potent natural cytoprotective antioxidant. A comparison with the parent phenothiazine demonstrated a superiority of novel antioxidants of factor 4 in EC_{50} values. Hence, it is particularly aspects of solubility and distribution which limit the potency of current antioxidants, as well as aspects of radical stabilisation, which influence primary efficacy. In the future, these results might help in the design of more potent antioxidants, especially when long-range administration in neurodegenerative diseases is attempted.

9 Literatur

- Ahmed et al., 2005. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *The Journal of Neurochemistry*, 92(2), pp.255-263.
- Altman et al., 1995. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(6), pp.897-902.
- Amundsen & Nelson, 1951. Reduction of nitriles to primary amines with lithium aluminum hydride. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1), pp.242-244.
- Anderson et al., 1967. Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 89(19), pp.5012-5017.
- Aoyama et al., 2006. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature Neuroscience*, 9(1), pp.119-126.
- Atamna et al., 2008. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *The FASEB Journal*, 22, pp.703-712.
- Ballard & Whitlock, 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), pp.729-744.
- Bass et al., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *The Journal of Immunology*, 130(4), pp.1910-1917.
- Beal, 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4), pp.381-386.
- Beckman & Ames, 1999. Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutation Research*, 424(1-2), pp.51-58.
- Behl et al., 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77(6), pp.817-827.
- Behl & Moosmann, 2002. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biological Chemistry*, 383(3-4), pp.521-536.
- Bernthsen, 1883. Über das Methylenblau. *Berichte der Deutsche Chemische Gesellschaft zu Berlin*, 16, pp.2896-2904.
- Blacker, 2005. Mild cognitive impairment--no benefit from vitamin E, little from donepezil. *The New England Journal of Medicine*, 352(23), pp.2439-2441.

- Blum et al., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), pp.135-172.
- Braak & Braak, 1997. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 18(4), pp.351-357.
- Brand, 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7-8), pp.466-472.
- Braungart et al., 2004. Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neuro-Degenerative Diseases*, 1(4-5), pp.175-183.
- Brigelius-Flohé, 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), pp.951-965.
- Brion et al., 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(1), pp.89-96.
- Brown et al., 1955. Determination of organic structures by physical methods. Academic Press, New York.
- Buhrmester et al., 2006. Phenothiazine molecules. *Journal of The Electrochemical Society*, 153(2), pp.A288-A294.
- Burn, 1954. The Pharmacology of Chlorpromazine and Promethazine. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 47(8), pp.617-621.
- Burton et al., 1985. Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *Journal of American Chemical Society*, 107, pp.7053-7065.
- Burton & Ingold, 1981. Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of American Chemical Society*, 103, pp.6472-6477.
- Chance et al., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), pp.527-605.
- Chen et al., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp.36027 -36031.
- Choi, 2005. Neurodegeneration: cellular defences destroyed. *Nature*, 433(7027), pp.696-698.
- Choi et al., 2005. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp.11648-11655.
- Christman et al., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), pp.3-34.

- Cleeter et al., 1992. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *The Journal of Neurochemistry*, 58(2), pp.786-789.
- Clemens et al., 1993. The antioxidant LY231617 reduces global ischemic neuronal injury in rats. *Stroke*, 24(5), pp.716-722.
- Cohen & Heikkila, 1984. Alloxan and 6-hydroxydopamine: Cellular toxins. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, Academic Press, vol.105, pp.510-516.
- Conte et al., 2004. Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *The Journal of Neurochemistry*, 90(3), pp.758-764.
- Craig et al., 1960. Chemical constitution and anthelmintic activity. IV. Substituted phenothiazines. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 2, pp.659-668.
- Crivello, 2008. Benzophenothiazine and benzophenoxazine photosensitizers for triarylsulfonium salt cationic photoinitiators. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46(11), pp.3820-3829.
- Cross et al., 1954. Piperazine adipate: a new anthelmintic agent. II. Toxicological and pharmacological studies. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(10), pp.711-717.
- Cynshi et al., 1998. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), p.10123-10128.
- Dalle-Donne et al., 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), pp.169-176.
- Davies, 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1703(2), pp.93-109.
- Davis & Maher, 1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research*, 652(1), pp.169-173.
- DeEds et al., 1939. Studies on phenothiazine VIII. antiseptic value of phenothiazine in urinary tract infections. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 65(4), pp.353-371.
- Deiana et al., 2009. Methylthioninium chloride reverses cognitive deficits induced by scopolamine: comparison with rivastigmine. *Psychopharmacology*, 202(1-3), pp.53-65.
- DeLange & Glazer, 1989. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: A screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry*, 177(2), pp.300-306.

- Dellapenna, 2005. Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in Plant Science*, 10(12), pp.574-579.
- Diener et al. 2008. NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II trials. *Stroke*, 39(6), pp.1751-1758.
- de Rijk et al., 1997. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study. *Archives of Neurology*, 54(6), pp.762-765.
- Echtay et al. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415, pp.96-99.
- Ehrlich, 1885. Zur biologischen Verwertung des Methylenblau. *Centralblatt für die medicinische Wissenschaften*, 8, pp.113-117.
- Esterbauer et al., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), pp.81-128.
- Evans et al., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1), pp.1-61.
- Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), pp.263-273.
- Ferri et al., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366(9503), pp.2112-2117.
- Fincher et al., 1996. In vitro evaluation of a series of N - dodecanoyl - L - amino acid methyl esters as dermal penetration enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(9), pp.920-923.
- Freeman & Crapo, 1981. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(21), pp.10986-10992.
- Freyschuss et al., 2001. On the anti-atherogenic effect of the antioxidant BHT in cholesterol-fed rabbits: inverse relation between serum triglycerides and atheromatous lesions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1534(2-3), pp.129-138.
- Fridovich, 1978. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochemistry and Photobiology*, 28(4-5), pp.733-741.
- Fridovich, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), pp.97-112.
- Furian et al., 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochemistry International*, 50(1), pp.164-171.
- Fuson et al., 1999. Characterization of LY231617 protection against hydrogen peroxide toxicity. *The Journal of Neurochemistry*, 72(3), pp.1154-1160.

- Gardner, 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(1), pp.65-86.
- Gilgun-Sherki et al., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), pp.959-975.
- Grune et al., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*, 11(7), pp.526-534.
- Guidotti, 1972. Membrane proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 41, pp.731-752.
- Gutteridge & Quinlan, 1983. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *Journal of Applied Biochemistry*, 5(4-5), pp.293-299.
- Gutteridge, 1986. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Letters*, 201(2), pp.291-295.
- Guttman & Ehrlich, 1891. Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 28, pp.953-956.
- Haber & Weiss, 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, 147 (861), pp.332 -351.
- Hajieva et al., 2006. Tyrosinyl- and tryptophanyl-lipids are potent antioxidants that mediate neuronal resistance against oxidative toxins. *Federation of European Neuroscience Societies*, 3, abstract (A236.8)
- Hajieva et al., 2009. Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *The Journal of Neurochemistry*, 110(1), pp.118-132.
- Hall et al., 2010. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), pp.51-61.
- Halliwell, 2001. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), pp.29-35.
- Halliwell, 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), pp.1634-1658.
- Halliwell & Aruoma, 1991. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1-2), pp.9-19.
- Halliwell & Gutteridge, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), pp.1-14.
- Halliwell & Gutteridge, 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), pp.1-8.

- Halliwell & Gutteridge, 2008. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press (Oxford), 4. Auflage.
- Halpern & Wood, 1950. The action of promethazine (phenergan) in protecting mice against death due to histamine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 5(4), pp.510-516.
- Hampton et al., 2002. Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides. *FEBS Letters*, 527(1-2), pp.289-292.
- Hawkins & Davies, 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1504(2-3), pp.196-219.
- Hentze et al., 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3), pp.285-297.
- Horn & Snyder, 1971. Chlorpromazine and dopamine: conformational similarities that correlate with the antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(10), pp.2325-2328.
- Hosomi et al., 1997. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters*, 409(1), pp.105-108.
- Howard et al., 1935. Derris and other insecticides for the control of the Mexican bean beetle. *Journal of Economic Entomology*, 28(444)
- Hu & Kevan, 1990. Photoionization of alkylphenothiazine sulfonates in reversed micelles: effects of cosurfactants and location of chromophore. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(13), pp.5348-5351.
- Hyslop et al., 1995. Measurement of striatal H_2O_2 by microdialysis following global forebrain ischaemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H_2O_2 in vitro. *Brain Research*, 671, pp.181-186.
- Jama et al., 1996. Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. *American Journal of Epidemiology*, 144(3), pp.275 -280.
- Janssen, 2001. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(6), pp.L1067-1082.
- Jenner, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53(S3), pp.S26-S38.
- Koppenol, 1990. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS Letters*, 264(2), pp.165-167.
- Krishan, 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology*, 66(1), pp.188-193.
- Kristiansen et al., 2007. Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), pp.1271 -1279.

- Kuroda et al., 1999. Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(7), pp.778-787.
- Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.
- Landolt-Marticorena et al., 1993. Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*, 229(3), pp.602-608.
- Lasarzik et al., 2010. NH-phenothazine dose-dependently improves neuronal outcome after cerebral ischemia in rats. *Proceedings of the 2010 Annual Meeting of the American Society Anesthesiologists*, abstract (A1046).
- Lauvergnat & Hiberty, 1997. Role of conjugation in the stabilities and rotational barriers of formamide and thioformamide. An ab initio valence-bond study. *Journal of American Chemical Society*, 119(40), pp.9478-9482.
- Lee et al., 2001. Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *The Journal of Neurochemistry*, 78(1), pp.32-41.
- Lees et al., 2006. NXY-059 for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 354(6), pp.588-600.
- Lefèvre et al., 1998. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annales De Biologie Clinique*, 56(3), pp.305-319.
- Levine et al. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, Elsevier, 186, pp.464-478.
- Levine et al., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), pp.15036-15040.
- Li et al., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp.8516-8525.
- Lien et al., 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3-4), pp.285-294.
- Liu et al., 1996. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *The Journal of Neuroscience*, 16(21), pp.6795 -6806.
- Liu & Theil, 2005. Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 38(3), pp.167-175.
- Longmire et al., 1994. Effect of oxygen tension on the generation of F2-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 47(7), pp.1173-1177.

- Lucarini et al., 1999. Bond dissociation energies of the N–H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxy, and peroxy radicals of phenothiazines and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 121(49), pp.11546-11553.
- Machlin, 1980. Vitamin E: A comprehensive treatise. Dekker Verlag, New York, Vol.1
- Madrid et al., 2007. Synthesis and antitubercular activity of phenothiazines with reduced binding to dopamine and serotonin receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(11), pp.3014-3017.
- Maher & Schubert, 2000. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(8), pp.1287-1305.
- Malorny, 1954. Toxische Anämie und beginnende Agranulocytose durch phenothiazinhaltige Wurm-Schokolade. *Archives of Toxicology*, 15(1), pp.32-34.
- Mark et al., 1997. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *The Journal of Neuroscience*, 17(3), pp.1046-1054.
- Markesberry, 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), pp.134-147.
- Martin et al., 2002. Roles of Vitamins E and C on neurodegenerative diseases and cognitive performance. *Nutrition Reviews*, 60(10), pp.308-326.
- Martin & Logsdon, 1987. The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(15), pp.7213 -7219.
- May et al., 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, pp.23039-23045.
- McLachlan et al., 1991. Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *The Lancet*, 337(8753), pp.1304-1308.
- Mitchell, 2006. Phenothiazine: the parent molecule. *Current Drug Targets*, 7(9), pp.1181-1189.
- Mitchell et al., 2005. Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research*, 571(1-2), pp.265-276.
- Mocko et al., 2010. Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 40(1), pp.120-129.
- Moore et al., 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), pp.57-87.
- Moosmann & Behl, 2000. Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267(18), pp.5687-5692.

- Moosmann et al., 2001. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biological Chemistry*, 382(11), pp.1601-1612.
- Moosmann et al., 2010. The advent of molecular oxygen in the biosphere triggered the introduction of the last two amino acids into the genetic code. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, abstract (S88).
- Morrow & Roberts, 1996. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology*, 51(1), pp.1-9.
- Mosmann, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), pp.55-63.
- Muller et al., 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp.49064-49073.
- Müller, 1938. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Medica Scandinavica*, 95(S89), pp.75-84.
- Müller, 1939. Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Archives of Internal Medicine*, 64(4), pp.675-700.
- Murphy et al., 1950. Mode of action of phenothiazine-type antioxidants. *Industrial & Engineering Chemistry*, 42(12), pp.2479-2489.
- Murphy et al., 1989. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2(6), pp.1547-1558.
- Nakabeppu et al., 2004. The defense mechanisms in mammalian cells against oxidative damage in nucleic acids and their involvement in the suppression of mutagenesis and cell death. *Free Radical Research*, 38, pp.423-429.
- Niedernhofer et al., 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), pp.31426-31433.
- Niki et al., 1985. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(4), pp.2191-2196.
- Niki et al., 2008. Antioxidant capacity of BO-653, 2,3-dihydro-5-hydroxy-4,6-di-tert-butyl-2,2-dipentylbenzofuran, and uric acid as evaluated by ORAC method and inhibition of lipid peroxidation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(7), pp.2464-2466.
- Nozik-Grayck et al., 2003. Bicarbonate-dependent superoxide release and pulmonary artery tone. *American Journal of Physiology*, 285(6), pp.H2327-2335.
- Ohlow et al., 2010. Comparative evaluation of biochemical antioxidants as neuroprotective agents. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, abstract (S192)

- Packer et al., 1979. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278(5706), pp.737-738.
- Palinski et al., 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(4), pp.1372-1376.
- Paradies et al., 1997. Age-dependent decline in the cytochrome c oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiolipin. *FEBS Letters*, 406(1-2), pp.136-138.
- Parola et al., 1999. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 1(3), pp.255-284.
- Petersen et al. 2005. A controlled trial of selegiline, alpha-Tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 336(17), pp.1216-1222.
- Piccini et al., 2005. β -Amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), pp.34186 -34192.
- Praticò et al., 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *The Journal of Neuroscience*, 21(12), pp.4183 -4187.
- Pryor, 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology*, 48, pp.657-667.
- Re et al., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), pp.1231-1237.
- Rhee et al., 2005. Controlled elimination of intracellular hydrogen peroxide: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5-6), pp.619-626.
- Reid et al., 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), pp.4767 -4771.
- Richter, 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), pp.175-189.
- Roberts et al., 2005. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathology*, 15(2), pp.143-148.
- Rohde et al., 2008. Anthranilate N-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 53(3), pp.541-553.
- Rojas et al., 2009. Striatal neuroprotection with methylene blue. *Neuroscience*, 163(3), pp.877-889.
- Rojas et al., 2009. Methylene blue provides behavioral and metabolic neuroprotection against optic neuropathy. *Neurotoxicity Research*, 15(3), pp.260-273.

- Romero et al., 1995. Anthranilate synthase in microorganisms and plants. *Phytochemistry*, 39(2), pp.263-276.
- Ross, 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), pp.115-126.
- Sano et al., 1997. A controlled trial of Selegiline, Alpha-Tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 336(17), pp.1216-1222.
- Sanyal et al., 2004. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, 23(2), pp.473-482.
- Saran & Bors, 1989. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free radical research communications*, 7(3-6), pp.213-220.
- Saunders & Murphy, 1952. Oxidation inhibitor for lubricating oils. Patent 2,609,343; Washington, D.C., United States of America
- Sayre et al., 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), pp.172-188.
- Schenck & Zimmerman, 2004. High field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker?. *NMR in Biomedicine*, 17(7), pp.433-445.
- Schubert & Piasecki, 2001. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *The Journal of Neuroscience*, 21(19), pp.7455-7462.
- Seelig et al., 1994. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), pp.68-72.
- Seet et al., 2011. Oxidative damage in ischaemic stroke revealed using multiple biomarkers. *Stroke*, 42(8), pp.2326-2329.
- Selkoe, 1991. Alzheimer's disease. In the beginning.. *Nature*, 354(6353), pp.432-433.
- Sies, 1986. Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie*, 98(12), pp.1061-1075.
- Simonian & Coyle, 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36(1), pp.83-106.
- Singer & Nicolson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23), pp.720-731.
- Spencer et al., 1995. DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Letters*, 375(3), pp.179-182.
- Steinbrecher et al., 1990. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(2), pp.155-168.

- St-Pierre et al., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp.44784-44790.
- Strobel et al., 2009. Vienna (and Burkina Faso): What's new with Methylene blue?. www.alzforum.org.
- Su et al., 2008. Oxidative Stress Signaling in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 5(6), pp.525-532.
- Swales, 1939. Tests of Phenothiazine as anthelmintic. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 3(7), pp.188-194.
- Swales, 1940. Phenothiazine in veterinary parasitology. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 4(12), pp.333-341.
- Sydserrff et al., 2002. Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), pp.103-112.
- Tadros & Wahab, 1962. The site of action of phenothiazine S35 in the central nervous system. *The British Journal of Psychiatry*, 108(457), pp.816-821.
- Takahashi et al., 2002. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy*, 35(4), pp.179-203.
- Tan et al., 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 141(6), pp.1423-1432.
- Tan et al., 2001. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, pp.497-506.
- Taylor et al., 2003. Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp.19587-19590.
- Traber & Atkinson, 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), pp.4-15.
- Trifonov, 2004. The triplet code from first principles. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 22, pp.1-11.
- Tuo et al., 2003. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. *The FASEB Journal*, 17(6), pp.668-674.
- Turrens 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), pp.335-344.

- Uchida et al., 1998. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), pp.16058-16066.
- Unterberg et al., 2004. Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), pp.1019-1027.
- Valenzuela, 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*, 48(4), pp.301-309.
- Varadarajan et al., 2000. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *Journal of Structural Biology*, 130(2-3), pp.184-208.
- Vaughan et al., 1955. Chlorpromazine in psychiatry. *The Lancet*, 268(6874), pp.1083-1087.
- von Bohlen und Halbach et al., 2004. Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 73(3), pp.151-177.
- Wang et al., 2005. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(4), pp. 953-962.
- Wenner, 1950. Hydrolysis of arylacetonitriles. *The Journal of Organic Chemistry*, 15(3), pp.548-551.
- Weyer et al., 1997. A Controlled Study of 2 Doses of Idebenone in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neuropsychobiology*, 36, pp.73-82.
- Wilson, 2005. Regulation of Vitamin C transport. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), pp.105-125.
- Wischik et al., 1996. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), pp.11213-11218.
- Wiseman & Halliwell, 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(1), pp.17-29.
- Yano et al., 2006. Steady-state kinetics and inhibitory action of antitubercular phenothiazines on mycobacterium tuberculosis type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2). *The Journal of Biological Chemistry*, 281(17), pp.11456-11463.
- Yu et al., 1992. Phenothiazines as lipid peroxidation inhibitors and cytoprotective agents. *The Journal of Medicinal Chemistry*, 35(4), pp.716-724.
- Zhang et al., 2006. Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina. *Neurotoxicity Research*, 9(1), pp.47-57.

Abb. 5.3.5: Messung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen als Marker der Lipidperoxidation	64
Abb. 5.4.1: Zellüberleben von HT-22 Neuronen nach Glutamatexposition	67
Abb. 5.4.2: Zellüberleben von HT-22 Neuronen nach H ₂ O ₂ -Exposition	69
Abb. 5.4.3: Quantifizierung des Zellüberlebens von HT-22 Zellen nach Glutamatbehandlung mittels PI	71
Abb. 5.4.4: Antioxidative Effekte der neuen Phenothiazinderivate auf die Peroxidakkumulation	72
Abb. 5.4.5: Konzentrationsabhängige Verhinderung der 8-Isoprostanbildung als Lipidperoxidationsmarker	74
Abb. 5.4.6: Western Blot von mit DNPHderivatisierten Proteincarbonylen	76
Abb. 5.4.7: Quantifizierung der anti-DNP Western Blots	77
Abb. 5.4.8: Ponceau-Färbungen von Membran- und Cytosolfractionen	79
Abb. 5.4.9: Western Blot von Fraktionierungen in Membran und Cytosol, mit Visualisierung der Na/K-ATPase	80
Abb. 5.5.1: Analyse von QSAR-Modellen für cytoprotektive Antioxidantien-Aktivität	83
Abb. 6.2.1: Entgiftung eines Peroxylradikals durch Phenothiazin mit anschließendem Recycling über Ascorbat	91
Abb. 6.3.1: Vergleich des Zellüberlebens von HT-22-Neuronen mit bekannten Antioxidantien nach Glutamatexposition	95
Abb. 6.6.1: Redox-cycling von Methylenblau	105
Abb. 6.6.2: Mögliche Mechanismen der Interferenz von Methylenblau bei der Alzheimerschen Erkrankung	106

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1.1: Empirische Abschätzung des antioxidativen Potentials von aromatischen Substanzen mittels 4-faktoriellem, quantenchemischem Algorithmus	50
Tab. 5.3.1: TEAC-Werte der neuen Phenothiazinderivate.....	60
Tab. 5.5.1: Vergleich von 4 unterschiedlichen QSAR-Modellen.....	82

12 Lebenslauf

13 Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Journalen oder als Poster veröffentlicht, die im Folgenden aufgelistet sind.

Posterbeiträge:

Ohlow MJ, Maus S, Krämer I, Schreckenberger M, Moosmann B (2008). "Rational design and evaluation of BBB permeable neuroprotective antioxidants." *Joint Meeting „Recent Progress in Developmental and Clinical Neuroscience“ 29.09.- 01.10.08 in Bochum*

Ohlow MJ, Moosmann B, Maus S, Schreckenberger M, Krämer I (2008). „Antioxidative drugs – a chance against neurodegenerative diseases.“ *Evaluation des GRK 1044/2 „Entwicklungsabhängige und krankheitsinduzierte Modifikationen im Nervensystem“, 18.06.2008 in Mainz.*

Abstracts:

Ohlow MJ, Mocko JB, Behl C, Hajieva P, Moosmann B (2010). "Comparative evaluation of biochemical antioxidants as neuroprotective agents." *17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) 2010, Orlando, FL, USA. Free Radic. Biol. Med. 49, S192.*

Publikationen:

Ohlow MJ, Moosmann B (2011). "Phenothiazine: The seven lives of pharmacology's first lead structure." *Drug Discovery Today 16, 119-131.*

Ohlow MJ, Granold M, Schreckenberger M and Moosmann B (2012). "Is the chromanol head group of vitamin E nature's final truth on chain-breaking antioxidants?" *FEBS letter, 586 (6): 711-716.*

Ohlow MJ, Granold M, Moosmann B and Schreckenberger M (2012). “A functional investigation of novel phenothiazine-type antioxidants reveals competing objectives for pharmacological neuroprotection.” (*in Vorbereitung*)

14 Danksagung