

modells mit einem Grundzustand (g) und einem Anregungszustand (a) durch Gleichung (2) gegeben.

$$\beta_{zzz}^{(ag)}(-2\omega; \omega, \omega) = \beta_{zzz}^{(ag)}(0) \frac{\omega_{ag}^4}{(\omega_{ag}^2 - \omega^2)(\omega_{ag}^2 - 4\omega^2)} \quad (1)$$

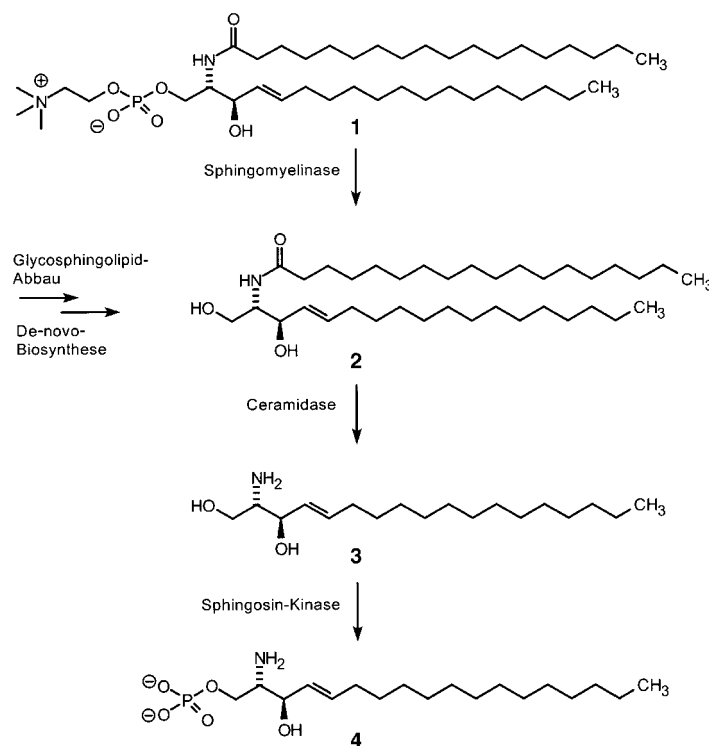
$$\beta_{zzz}^{(ag)}(0) = \lim_{\omega \rightarrow 0} (-2\omega; \omega, \omega) = \frac{6\Delta\mu_z^{ag}(\mu_z^{ag})^2}{(\hbar\omega_{ag})^2} \quad (2)$$

- [12] A. Willets, J. E. Rice, D. M. Burland, D. P. Shelton, *J. Chem. Phys.* **1992**, 97, 7590–7599.
- [13] K. Wallenfels, F. Witzler, K. Friedrich, *Tetrahedron* **1967**, 23, 1845–1855; die letzten beiden Stufen wurden zusammengefasst analog der Vorschrift in: G. A. Olah, T. Keumi, *Synthesis* **1979**, 112–113.
- [14] Bedingungen der modifizierten Stille-Reaktion nach: S. Gronowitz, P. Björk, J. Malm, A.-B. Hörnfeldt, *J. Organomet. Chem.* **1993**, 460, 127–129.
- [15] Analog zur Umsetzung mit Phenyltri-*tert*-butylzinn: H.-J. Götze, *Chem. Ber.* **1972**, 105, 1775–1777.
- [16] A. Samtleben, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, 31, 1141–1148.
- [17] E. Kober, C. Grundmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 3769–3770.
- [18] S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1980**, 627–630.
- [19] Analog zur Umsetzung mit Dimethylaminophenyltributylzinn: V. Farina, B. Krishnan, D. R. Marshall, G. P. Roth, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5434–5444.

Synthese des ersten selektiven irreversiblen Inhibitors der neutralen Sphingomyelinase**

Christoph Arenz und Athanassios Giannis*

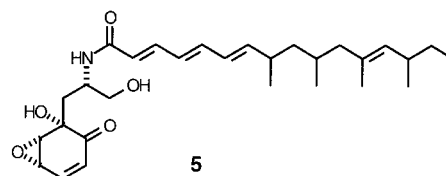
Sphingomyelin **1** (Schema 1) ist ein ubiquitärer Membranbaustein, der in Säugetierzellen je nach Zelltyp bis zu 25% der Membranlipide ausmacht.^[1] Die Kataboliten des Sphingomyelins, Ceramid **2**, Sphingosin **3** und Sphingosin-1-phosphat **4**, sind wegen ihrer vielfältigen biologischen Wirkung und ihrer möglichen Funktion als sekundäre Botenstoffe in den Mittelpunkt intensiver Forschung gerückt.^[1–4] Der primäre Sphingomyelin-Katabolit Ceramid entsteht im Sphingomyelincyclus^[5, 6] durch die Aktion entweder einer lysosomalen sauren Sphingomyelinase (A-SMase) oder einer membranständigen neutralen Sphingomyelinase (N-SMase). Ihm wird eine entscheidende Rolle in der Zellregulation, bei der Steuerung von Entzündungs-Prozessen sowie beim programmierten Zelltod (Apoptose) zugesprochen.^[1, 2, 5–7] Zahlreiche Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass verschiedene Cytokine (z. B. Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β , Interferon- γ) sowie Strahlung, Hitze, oxidative Agentien und Vitamin D₃ in der Lage sind die Sphingomyelinasen zu aktivieren. Ungeachtet dessen bleiben zahlreiche Aspekte der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion und insbeson-



Schema 1. Sphingomyelin **1** und die Abbauprodukte **2–4**.

dere die Rolle von Ceramid bei der Apoptose umstritten.^[8, 9] Mit Sicherheit ist die biologische Wirkung von Ceramid nicht in allen Fällen gleich, sondern hängt vom Zelltyp, von seiner Topologie innerhalb der Zelle und von einer Verbindung mit anderen Signalkaskaden (crosstalk) ab. Auch die Frage, welche Sphingomyelinase für die Stimulus-induzierte Ceramidfreisetzung jeweils zuständig ist, wird kontrovers diskutiert.^[5, 8–11] Der membranständigen N-SMase, die einer physiologischen Regulation durch Substanzen wie Glutathion und Arachidonsäure unterliegt,^[12] wird eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion beigemessen. Selektive Inhibitoren der verschiedenen Sphingomyelinase-Typen können zu einem besseren Verständnis sowohl der Rolle dieser Enzyme als auch der biologischen Bedeutung von Ceramid bei der Signaltransduktion beitragen.

Während für A-SMase eine Reihe moderater Inhibitoren bekannt sind,^[1] wurde erst kürzlich der Naturstoff Scyphostatin **5**^[13, 14] isoliert und als potenter und kompetitiver Inhibitor der N-SMase identifiziert ($IC_{50} = 1.0 \mu M$). Allerdings inhibiert diese Verbindung auch A-SMase ($IC_{50} = 49.3 \mu M$).^[15]

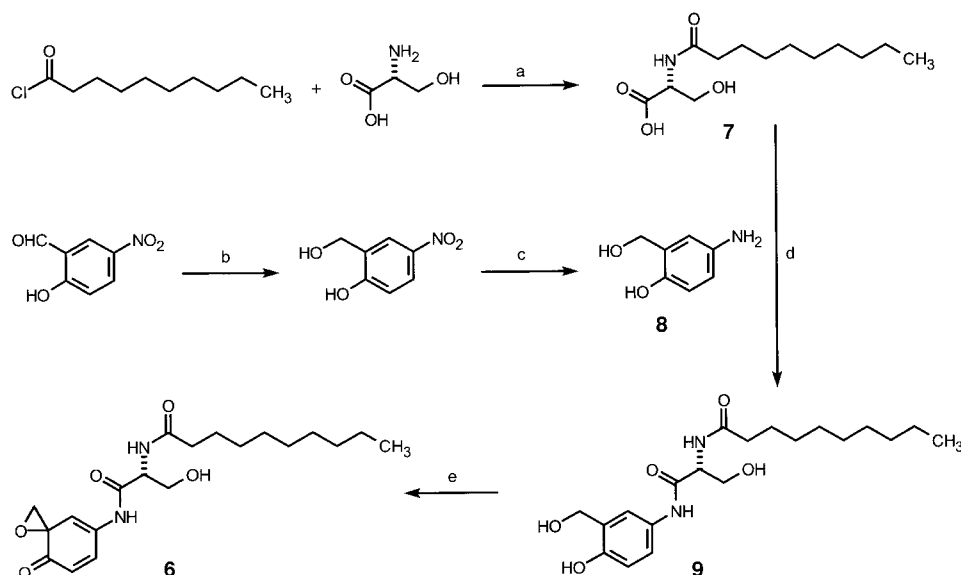


Wir berichten hier über die Synthese des ersten selektiven und irreversiblen Inhibitors der neutralen Sphingomyelinase. Eigene vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass kurzkettige Ceramid-Analoga, wie 2-N-Lauroylamido-1,3-

[*] Prof. Dr. A. Giannis, Dipl.-Chem. C. Arenz
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-608-7652
E-mail: giannis@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. C.A. dankt dem Land Baden-Württemberg für ein Stipendium aus der Landesgraduiertenförderung.

propandiol, N-SMase schwach inhibieren. Des Weiteren gingen wir davon aus, dass N-SMase in Analogie zu anderen Phosphodiesterasen^[16] nucleophile Gruppen (wie z.B. die Seitenketten von Arginin, Serin oder Cystein) im aktiven Zentrum aufweisen würde, die mit geeigneten Elektrophilen in der Kopfgruppe der zu synthetisierenden Ceramid-Analoga reagieren könnten. So vermuteten wir, dass die Verbindung **6** mit einer im Vergleich zu Scyphostatin reaktiveren Epoxidfunktion diese Voraussetzungen erfüllen könnte.^[17] Die Umsetzung von D-Serin mit Decanoylchlorid unter Schotten-Baumann-Bedingungen lieferte *N*-Decanoyl-D-Serin **7** (Schema 2). Der in einer zweistufigen Reaktionssequenz hergestellte 5-Amino-2-hydroxybenzylalkohol **8** wurde an **7** unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) unter Bildung des Derivat **9** gekuppelt, welches nach Umsetzung mit Natriumperiodat das Spiroepoxid **6** als 53:47-Diastereomengemisch gab.^[18] Diese Verbindung erwies sich im nachfolgenden Enzym-Assay als ein kovalenter Inhibitor von N-SMase (Abbildung 1). Darüber hinaus zeigte sich, dass



Schema 2. Synthese des Spiroepoxids **6**: a) H₂O, THF, 3 Äquiv. Na₂CO₃, 3 h, 68%; b) NaBH₄, EtOH, 1 d, 99%; c) In, NH₄Cl, EtOH, 90 °C, 3 h, 91%; d) DCC, HOBT, DMF, 16 h, 61%; e) NaIO₄, MeOH/H₂O, 3 h, 20 °C, 70%.

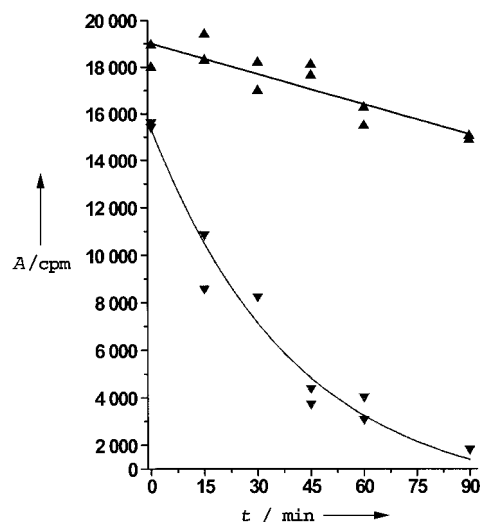


Abbildung 1. Zeitabhängigkeit der Inhibierung der neutralen Sphingomyelinase durch **6** (200 μ M in der Vorinkubationslösung). Mit Inhibitor **6**: ▼; Kontrolle: ▲. A = Aktivität; t = Vorinkubationszeit.

steigende Sphingomyelinkonzentrationen die inhibierende Wirkung des Epoxids **6** abschwächten (Abbildung 2), was vermuten lässt, dass der Inhibitor an das aktive Zentrum von N-SMase bindet. Unter den Bedingungen des Assays inhibierte das Epoxid **6** selbst in einer Konzentration von 500 μ mol L⁻¹ die A-SMase nicht (Abbildung 3). Um den

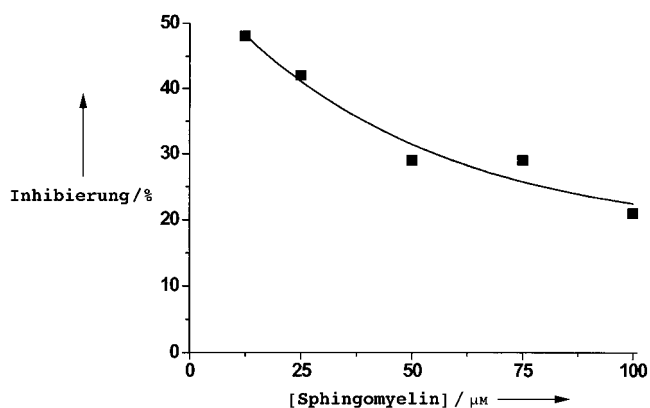


Abbildung 2. Inhibierung der N-SMase bei verschiedenen Sphingomyelinkonzentrationen (gemittelte Doppelbestimmung, bei einer Konzentration des Epoxids **6** von 100 μ M, ohne Vorinkubationszeit).

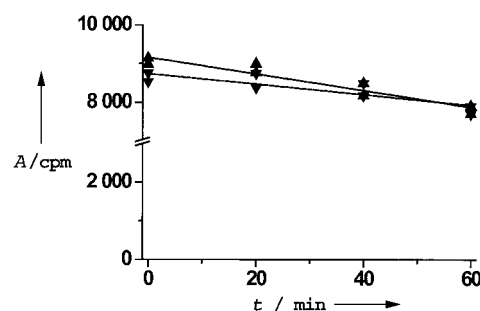


Abbildung 3. Effekt der Verbindung **6** (200 μ M in der Vorinkubationslösung) auf die saure Sphingomyelinase. Mit Inhibitor **6**: ▼; Kontrolle: ▲. A = Aktivität; t = Vorinkubationszeit.

Einfluss der Konfiguration der Aminosäure zu untersuchen, wurde ausgehend von L-Serin das Enantiomer *ent*-**6** hergestellt. Dieses führte zu einer ähnlichen zeitabhängigen Inaktivierung der N-SMase. Die Enzymaktivität der A-SMase wurde nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die Verbindung **6** ist aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften ein wertvolles Werkzeug zur Aufklärung der biologischen Funktion von N-SMase^[19] und Ceramid bei Signaltransduktionsprozessen. Sie könnte darüber hinaus zur Markierung des aktiven Zentrums der N-SMase herangezogen werden und somit Einblicke in den Mechanismus der Reaktion dieses Enzyms, über den kaum Erkenntnisse vorliegen, ermöglichen. Schließlich können unsere Ergebnisse zur Entwicklung weiterer N-SMase-Inhibitoren hilfreich sein, zumal der Syntheseweg den Einsatz einer Vielzahl von Fettsäuren, Aminosäuren und funktionalisierten Anilinderivaten ermöglicht. Die Tatsache, dass Scyphostatin in Modellstudien eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung aufweist, rechtfertigt die Entwicklung solcher Inhibitoren und macht N-SMase zu einem interessanten Target in der experimentellen Therapie entzündlicher Erkrankungen, einschließlich Autoimmunerkrankungen des Zentralnervensystems wie z. B. multiple Sklerose.^[20, 21]

Experimentelles

Die partielle Reinigung der Sphingomyelinasen erfolgte nach der von Hannun et al.^[22] beschriebenen Methode. Dazu wurden vier Ratten dekapitiert und die Gehirne in 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-(TRIS)/HCl-Puffer (pH 7.4), der je 20 mg mL⁻¹ Leupeptin, Chymostatin, Antipain und Pepstatin A sowie 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 5 mM 1,2-Di(2-aminoethoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) enthielt, homogenisiert und anschließend bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem oben beschriebenen Puffer, der zusätzlich 1 % Triton X-100 enthielt, solubilisiert. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter auf eine Anionenaustauschersäule (POROS20HQ, PerSeptive Biosystems Inc.) gegeben. Nach Äquilibration mit 20 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 7.4), der je 1 mM EDTA, EGTA und PMSF enthielt, und einem Wechsel auf 1 M Natriumchlorid im gleichen Puffer, wurden die Sphingomyelinasen mit einem Gradienten mit bis zu 1 % Triton X-100 im Äquilibrationpuffer eluiert.

Zur Messung der N-SMase-Aktivität wurden die entsprechenden Inhibitoren (Diastereomerenmisch) in Chloroform gelöst, ein Aliquot von 10 nmol wurde im Stickstoffstrom eingedampft, in 40 µL 75 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 7.4), der 0.05 % Triton X-100 und 2.5 mM MgCl₂ enthielt, aufgenommen und mit 10 µL der obigen Enzymaufbereitung versetzt. Diese Proben wurden parallel zu den entsprechenden Kontrollansätzen 90, 60, 45, 30 und 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zusatz von 10 nmol ¹⁴C-Sphingomyelin (ca. 40 000 cpm (counts per minute)) in 50 µL des gleichen Puffers wurde noch eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 750 µL Chloroform/Methanol, 1/1 (v/v)) abgebrochen. Nach Zugabe von 200 µL Wasser wurden die Lipide extrahiert und ein Aliquot der polaren oberen Phase, die das ¹⁴C-Phosphorylcholin enthält, wurde mit einem Szintillationszähler ausgewertet.

Die Aktivitätsbestimmung der sauren Sphingomyelinase erfolgte analog, jedoch unter Verwendung eines Mg²⁺-freien Natriumacetat-Puffers (pH 4.5).

Eingegangen am 6. Oktober 1999 [Z14115]

- [5] R. N. Kolesnick, M. Kronke, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 643–665.
- [6] Y. A. Hannun, *Science* **1996**, *274*, 1855–1859.
- [7] L. R. Ballou in *Sphingolipid-Mediated Signal Transduction* (Hrsg.: Y. A. Hannun), Springer, New York, **1997**, S. 35–51.
- [8] K. Hofmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 374–377.
- [9] K. Hofmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 227.
- [10] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3638–3643. Die Autoren berichten, dass die N-SMase-Aktivität im zentralen Nervensystem und im Darmgewebe am höchsten war.
- [11] R. Kolesnick, Y. A. Hannun, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 224–225 (Diskussion S. 227).
- [12] a) B. Liu, N. Andrieu-Abadie, T. Levade, P. Zhang, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11 313–11 320; b) S. Jayadev, C. M. Linardic, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5757–5763.
- [13] M. Tanaka, F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, T. Ogita, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7871–7872.
- [14] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 525–530.
- [15] Kürzlich wurde der bekannte Naturstoff Alutenusin als ein kompetitiver und spezifischer Inhibitor von N-SMase identifiziert (*K_i* = 25 µM): R. Uchida, H. Tomoda, Y. Dong, S. Omura, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 572–574.
- [16] W. P. Taylor, T. S. Widlanski, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 713–718.
- [17] Zur Synthese und Reaktivität ähnlicher Spiroepoxide siehe: a) H. D. Becker, T. Bremholt, E. Adler, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *41*, 4205–4208; b) S. Danishefsky, M. D. Shair, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 16–44; c) E. J. Corey, J. P. Dittami, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 256–257; d) H. Waldmann, K. Hinterding, P. Herrlich, H. J. Rahmsdorf, A. Knebel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1553–1555; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1541–1542; e) K. Hinterding, A. Knebel, P. Herrlich, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1153–1162.
- [18] Physikalische Daten von **6**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.85 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃), 1.23 (m, 12H, 6 × CH₂), 1.57 (m, 2H, CH₂), 2.21 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, COCH₂), 3.65 (m, 1H, CHH_{Epo}), 3.86 (m, 2H, COCHH_{Epo}, CHHOH), 4.31–4.49 (m, 3H, α-CH, OH, CHHOH), 6.29 (d, 0.47H, *J* = 3.5 Hz, H_{Ring}), 6.32 (d, 0.53H, *J* = 3.2 Hz, H_{Ring}), 6.77 (br., 0.47H, H_{Ring}), 6.79 (br., 0.53H, H_{Ring}), 6.93–7.05 (m, 2H, H_{Ring}, NH), 8.00 (s, 0.53H, NH), 8.03 (s, 0.47H, NH); ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, Hauptdiastereomer): δ = 14.1, 22.6, 25.6, 29.2, 29.3, 29.4, 31.8, 36.3, 54.7, 59.4, 62.5, 80.1, 130.6, 138.7, 140.3, 144.6, 170.1, 174.7, 185.2; charakteristische Signale für das Nebendiastereomer: δ = 54.8, 59.3, 62.6, 80.0, 130.4, 138.4, 144.4, 170.2, 174.8, 185.1; Hochauflösungs-EI-MS (155 °C): ber. für C₂₀H₃₀N₂O₅: 378.2139, gef.: 378.2194; *R_f* = 0.49 (Dichlormethan/Methanol, 10/1).
- [19] Zwei Mg²⁺-abhängige neutrale Sphingomyelinasen wurden bereits kloniert: a) Lit. [10]; b) S. Chatterjee, US-A 96-774104/961224, **1998**; S. Chatterjee, CAN 129:91437, **1998**.
- [20] F. Nara, M. Tanaka, S. Masuda-Inoue, Y. Yamasato, H. Doi-Yoshioka, K. Suzuki-Konagai, S. Kumakura, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 531–535.
- [21] R. W. Ledeen, G. Chakraborty, *Neurochem. Res.* **1998**, *23*, 277–289.
- [22] B. Liu, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16281–16287.

- [1] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568.
- [2] Y. A. Hannun in *Sphingolipid-Mediated Signal Transduction* (Hrsg.: Y. A. Hannun), Springer, New York, **1997**, S. 1–18.
- [3] G. van Echten-Deckert, A. Giannis, A. Schwarz, A. H. Futerman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1184–1191.
- [4] M. J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzelev, S. Spiegel, T. Hla, *Science* **1998**, *279*, 1552–1555.