

**Entwicklung und Bewertung verschiedener Methoden zur
Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen und zur
Identifizierung von Inhibitoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Amelie Fiene (geb. Zech)

aus

Hannover

Bonn, Januar 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Gutachter: PD Dr. Anke Schiedel

Tag der Promotion: 4. Mai 2015

Erscheinungsjahr: 2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Enzyme	1
1.2	Enzymkinetik.....	1
1.3	Enzyminhibition	5
1.4	Purinrezeptoren.....	7
1.5	Ectonucleotidasen.....	9
1.5.1	Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen).....	10
1.5.1.1	Hydrolytische Eigenschaften der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8	10
1.5.1.2	Struktureller Aufbau der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8	12
1.5.1.3	Expression und (patho)physiologische Rolle der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8 ...	13
1.5.1.4	Bakterielle Lp1NTPDase aus <i>Legionella pneumophila</i>	15
1.5.1.5	Kristallstrukturen	16
1.5.1.6	Therapeutisches Potential.....	21
1.5.1.7	Inhibitoren	21
1.5.2	Alkalische Phosphatasen	27
1.5.2.1	Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP).....	27
1.5.2.1.1	Molekularer Reaktionsmechanismus.....	29
1.5.2.1.2	Therapeutisches Potential.....	30
1.5.2.1.3	Inhibitoren der TNAP.....	31
1.6	Aktivitätsbestimmungen von NTPDasen und APs	33
1.7	Fluoreszenzpolarisation	35
1.7.1	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA).....	37
2	Material	38
2.1	Geräte.....	38
2.2	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	39
2.3	Puffer	40
2.4	Enzyme.....	41
2.5	Testverbindungen und Substanzbibliotheken	42
2.6	Hergestellte Lösungen	43
2.6.1	Substratlösungen	43
2.6.2	Enzymverdünnungen	43
2.6.3	Detektionsreagenz I für den Malachitgrün-Assay	44
2.6.4	Detektionsreagenz II für den Malachitgrün-Assay	44
2.6.5	Detektionsreagenz für den ADP-FP-Assay.....	44

2.6.6	Detektionsreagenz für den AMP-FP-Assay.....	44
2.6.7	Software	44
3	Methoden	46
3.1	Aktivitätsbestimmungen der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8.....	46
3.1.1	Malachitgrün-Assay	46
3.1.1.1	Allgemeine Durchführung	47
3.1.1.2	Kalibriergerade	48
3.1.1.3	K_M -Wert-Bestimmungen für die Substrate ADP und ATP.....	48
3.1.1.4	Enzymtitrationen.....	48
3.1.1.5	Übertragung auf ein Robotersystem	48
3.1.1.6	Validierung	49
3.1.1.7	High-throughput Screening	49
3.1.1.8	Konzentrations-Inhibitions-Kurven	50
3.1.1.9	Bestimmung des Hemmmechanismus.....	50
3.1.2	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays.....	50
3.1.2.1	Allgemeine Durchführung	51
3.1.2.2	Optimierung der Antikörperkonzentrationen.....	52
3.1.2.3	Standardkurven	53
3.1.2.4	Enzymtitrationen.....	53
3.1.2.5	Validierung	53
3.1.2.6	Screening	54
3.1.2.7	Konzentrations-Inhibitions-Kurven	54
3.2	Aktivitätsbestimmungen der bakteriellen Lp1NTPDase.....	54
3.2.1	Kapillarelektrophorese-Assay	54
3.2.1.1	Allgemeine Durchführung des CE-Assays	55
3.2.1.2	Kalibriergerade	57
3.2.1.3	K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat ADP	57
3.2.1.4	Screening einer Anthrachinon-Bibliothek	58
3.2.1.5	Konzentrations-Inhibitions-Kurven	58
3.3	Aktivitätsbestimmung der Gewebe-unspezifischen Alkalischen Phosphatase (TNAP).....	58
3.3.1	CDP-Star-Assay	58
3.3.1.1	Allgemeine Durchführung des CDP-Star-Assays	59
3.3.1.2	K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat CDP-Star.....	60
3.3.1.3	K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat DEA	60
3.3.1.4	Enzymtitration.....	61
3.3.1.5	Validierung	61

3.3.1.6	Screening.....	61
3.3.1.7	Konzentrations-Inhibitions-Kurven.....	62
4	Ergebnisse & Diskussion	63
4.1	Humane NTPDase1, -2, -3 und -8.....	63
4.1.1	Malachitgrün-Assay.....	63
4.1.1.1	Allgemeines	63
4.1.1.2	Etablierung der Methode	64
4.1.1.3	Übertragung auf das Robotersystem.....	67
4.1.1.4	Validierung	70
4.1.1.5	High-throughput Screening	70
4.1.1.6	Konzentrations-Inhibitions-Kurven.....	73
4.1.1.7	Hemmmechanismus	77
4.1.1.8	Diskussion der Ergebnisse.....	79
4.1.1.9	Screening einer Anthrachinon-Bibliothek.....	83
4.1.1.9.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	85
4.1.1.9.2	Humane NTPDase1	85
4.1.1.9.3	Humane NTPDase2	87
4.1.1.9.4	Humane NTPDase3	88
4.1.1.9.5	Humane NTPDase8	90
4.1.2	Fluoreszenzpolarisationsassays für den Nachweis von ADP oder AMP	91
4.1.2.1	Allgemeines	91
4.1.2.2	Etablierung der Methoden	91
4.1.2.3	Validierung.....	97
4.1.2.4	Screening.....	98
4.1.2.5	Konzentrations-Inhibitions-Kurven.....	99
4.1.2.6	Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindungen	102
4.2	Lp1 NTPDase	107
4.2.1	Kapillarelektrophorese-Assay.....	107
4.2.1.1	Allgemeines	107
4.2.1.2	Etablierung der Methode	107
4.2.1.3	Screening einer Anthrachinon-Bibliothek.....	109
4.2.1.4	Konzentrations-Inhibitions-Kurven.....	111
4.2.1.4.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	113
4.3	Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase.....	116
4.3.1	CDP-Star-Assay zur Aktivitätsbestimmung.....	116
4.3.1.1	Allgemeines	116

4.3.1.2	Etablierung der Methode.....	116
4.3.1.3	Validierung	118
4.3.1.4	Screening	119
4.3.1.5	Aktive Polyoxometalate	120
4.3.1.6	Hemmmechanismus der Polyoxometalate (POMs).....	122
4.3.1.7	Selektivitätsuntersuchungen der Polyoxometalate und Rheniumcluster- Verbindungen	123
4.4	Vor- und Nachteile verschiedener Assays zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen.....	126
4.4.1	Malachitgrün-Assay	126
4.4.2	Kapillarelektrophorese-Assay	127
4.4.3	Radioaktive Assays	128
4.4.4	Luciferase-Assay	128
4.4.5	Enzym-gekoppelte Assays.....	128
4.4.6	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	129
4.4.7	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays.....	129
4.4.8	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat-Assay.....	130
4.4.9	CDP-Star-Assay	130
4.4.10	Vergleich der Assays	130
5	Zusammenfassung	134
6	Abkürzungsverzeichnis	140
7	Literaturverzeichnis	143
8	Anhang	162
	Danksagung	185
	Publikationsverzeichnis	186
	Erklärung	187

1 Einleitung

1.1 Enzyme

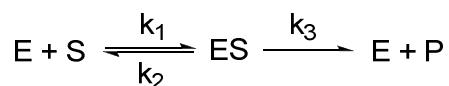
Ein Enzym ist ein Protein mit katalytischen Eigenschaften. Als Biokatalysatoren setzen Enzyme die Aktivierungsenergie vieler in Organismen ablaufenden Reaktionen herab und erhöhen so die Reaktionsgeschwindigkeit.^{1,2} Viele Enzyme benötigen für ihre katalytische Aktivität Cofaktoren wie Kationen oder Vitamine sowie spezifische Reaktionsbedingungen (z.B. pH-Wert und Temperatur). Sie besitzen spezifische Bindungsstellen, welche die selektive Anlagerung und Umsetzung von Substraten ermöglichen. Isoenzyme sind Enzyme unterschiedlicher Aminosäuresequenz, die aber die gleichen Substrate umsetzen und somit dieselbe Reaktion katalysieren.²

1.2 Enzymkinetik

Kinetisch lässt sich ein Enzym charakterisieren, indem die Reaktionsgeschwindigkeiten bei Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen gemessen werden. Dies kann über den Substratverbrauch oder die Produktzunahme pro Zeiteinheit, also die Umsatzgeschwindigkeit (v), erfolgen. Die Substratkonzentration ändert sich über die Reaktionszeit, sodass die Reaktionsgeschwindigkeiten lediglich in der Anfangsphase (v_0) einer Enzymreaktion bestimmt werden. Bei einem Substratumsatz bis etwa 10 % besteht noch ein linearer Zusammenhang zwischen Produktbildung und Reaktionszeit.^{3,4}

Ein Modell zur Erklärung der kinetischen Eigenschaften wurde 1913 von Leonor Michaelis und Maud Menten vorgeschlagen. Der entscheidende Schritt der Katalyse ist die Bildung eines Enzymsubstrat-Komplexes (ES-Komplexes) als Zwischenprodukt. Die Reaktionsgleichung lautet folgendermaßen:⁴

Gleichung 1:



Zuerst bindet das freie Enzym (E) reversibel an das Substrat (S) und bildet den Enzym-Substrat-Komplex (ES). Dieser kann nun wieder zu S und freiem E zerfallen oder in das Produkt (P) und freies E umgewandelt werden. Die Konstanten k_1 , k_2 und k_3 sind Geschwindigkeitskonstanten für die entsprechende Assoziationsreaktion (k_1) und die Dissoziationsreaktionen (k_2 und k_3).⁴ Der Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit einer Enzymreaktion und der eingesetzten Substratkonzentration wird durch die von

Michaelis und Menten beschriebene Gleichung ausgedrückt. Die Michaelis-Menten-Gleichung gilt als die Grundgleichung der Enzymkinetik und ist folgendermaßen definiert:^{3,4}

Gleichung 2:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

v_0 = Anfangsgeschwindigkeit

v_{\max} = Maximalgeschwindigkeit

[S] = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Konstante = $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Stellt man die Umsatzgeschwindigkeiten gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen grafisch dar, erhält man eine Sättigungskurve (Abbildung 1).

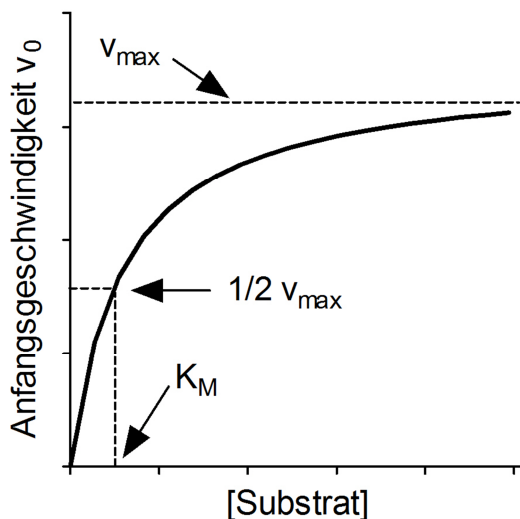


Abbildung 1: Michaelis-Menten-Kurve einer Enzymreaktion

Bei kleinen Substratkonzentrationen ($[S] \ll K_M$) trifft jedes Substratmolekül auf ein freies Enzym und die Reaktionsgeschwindigkeit steigt daher nahezu linear an. Bei höheren Substratkonzentrationen ($[S] \gg K_M$) wird die Kurve flacher, da es zu einer Sättigung der Enzyme kommt. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{\max}) wird üblicherweise nicht erreicht und kann aber durch Extrapolation der Kurve ermittelt werden.^{3,4} Die Substratkonzentration, die zu halbmaximalem Substratumsatz führt, entspricht dem K_M -Wert. Der K_M -Wert gibt somit die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Wenn die Geschwindigkeitskonstante k_2 viel größer ist als k_3 (siehe

Gleichung 1) entspricht der K_M -Wert der Dissoziationskonstanten des ES-Komplexes und ist ein Maß für dessen Stabilität. Ein kleiner K_M -Wert deutet auf eine hohe Substrataffinität des Enzyms hin. Der K_M -Wert ist sowohl substrat- als auch enzyspezifisch.^{3,4}

Für eine einfachere grafische Darstellung und die Ermittlung kinetischer Parameter wurden Linearisierungsverfahren entwickelt. Die dabei am häufigsten verwendete Methode wurde von Lineweaver und Burk (1984) beschrieben.⁴ Es handelt sich um eine doppelt-reziproke Darstellung, bei der $1/v$ gegen $1/[S]$ grafisch aufgetragen wird (siehe Abbildung 2). Die erhaltene Gerade kann durch folgende mathematische Gleichung beschrieben werden:

Gleichung 3:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{\max}}$$

Die kinetischen Parameter K_M und v_{\max} können aus der Steigung und den Achsenschnittpunkten bestimmt werden, wobei der Y-Achsenschnittpunkt $1/v_{\max}$ entspricht. Der K_M -Wert entspricht der Steigung K_M/v_{\max} (siehe Gleichung 3). Alternativ lässt sich der K_M -Wert aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ablesen, da der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse $-1/K_M$ entspricht.⁴

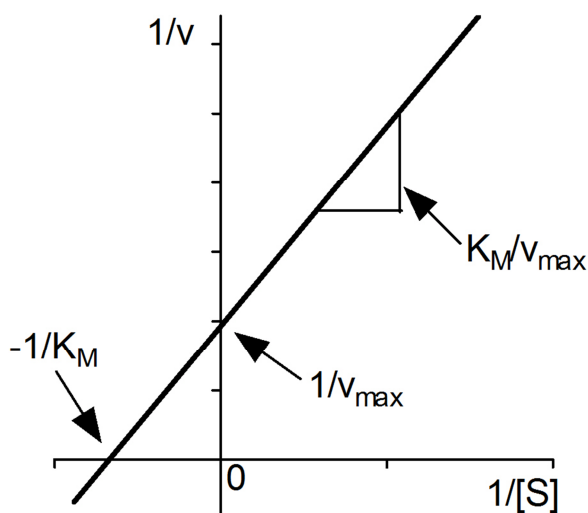


Abbildung 2: Lineweaver-Burk-Diagramm

Ein Nachteil der Linearisierung nach Lineweaver-Burk besteht darin, dass die erhaltenen Messwerte bei niedrigen Substratkonzentrationen, welche mit größeren Versuchsfehlern behaftet sind, verglichen mit den Messwerten bei hohen Substratkonzentrationen stärker gewichtet werden. Das kann zu einer Verzerrung der Messwerte führen. Daher sollten die

kinetischen Parameter durch nicht-lineare Regressionsanalysen bestimmt und das Lineweaver-Burk-Diagramm lediglich zur Datenpräsentation genutzt werden.^{4,5}

Neben dem Lineweaver-Burk-Diagramm gibt es beispielsweise noch das Eadie-Hofstee- oder das Hanes-Wolff-Diagramm als Linearisierungsmethoden zur grafischen Darstellung enzymkinetischer Daten.⁴

Nach der Methode von Eadie und Hofstee wird die Michaelis-Menten-Gleichung (vergleiche Gleichung 2) mit $(K_M + [S])$ multipliziert und liefert nach Umformung folgende Gleichung:

Gleichung 4:

$$v = -K_M \cdot \left(\frac{v}{[S]} \right) + v_{\max}$$

Trägt man v grafisch gegen $v/[S]$ auf erhält man das Eadie-Hofstee-Diagramm, aus dem sich v_{\max} als Y-Achsenabschnitt und K_M als negative Steigung der Regressionsgeraden ableiten lassen (siehe Abbildung 3).^{4,5}

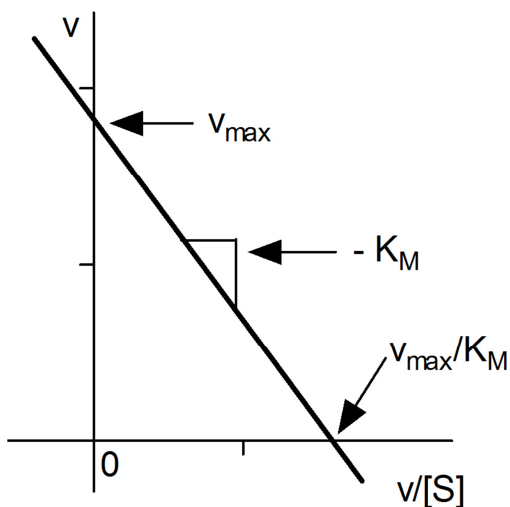


Abbildung 3: Eadie-Hofstee-Diagramm

Der Fehler nimmt mit steigendem $v/[S]$ zu. Da v jedoch bei beiden Koordinaten eingeht, variiert der Fehler eher in Bezug auf den Ursprung als auf die Achsen. Das Eadie-Hofstee-Diagramm vergrößert die Abweichungen von der Linearität, die bei dem Lineweaver-Burk-Diagramm möglicherweise nicht auffallen und wird daher häufig zur Darstellung der Daten bevorzugt.⁵

Das Hanes-Wolff-Diagramm stellt die beste der hier aufgeführten Linearisierungsmöglichkeiten dar.⁵ Bei Multiplikation beider Seiten der Lineweaver-Burk-Gleichung 3 mit [S] erhält man folgende Gleichung:

Gleichung 5:

$$\frac{[S]}{v} = [S] \cdot \left(\frac{1}{v_{\max}} \right) + \frac{K_M}{v_{\max}}$$

Wenn man $[S]/v$ entsprechend gegen $[S]$ aufträgt erhält man ebenfalls eine Gerade (siehe Abbildung 4). Aufgrund einer unverfälschten Spreizung der Messwerte entlang der X-Achse ($[S]$) wird das Ergebnis durch einzelne Ausreißer weniger verfälscht.

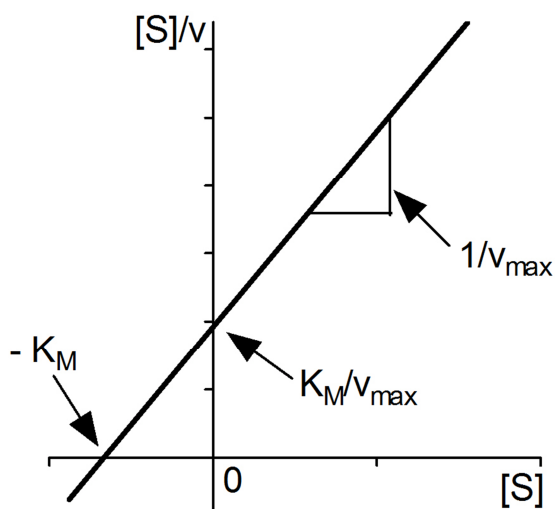


Abbildung 4: Hanes-Wolff-Diagramm

Die Steigung entspricht $1/v_{\max}$, der Y-Achsenabschnitt K_M/v_{\max} und der X-Achsenabschnitt $-K_M$.⁴

1.3 Enzyminhibition

Ein Inhibitor ist eine Verbindung, die in der Lage ist, die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion herabzusetzen. Allgemein kann man zwischen einer reversiblen und einer irreversiblen Hemmung unterscheiden. Zu den wichtigsten reversiblen Hemmmechanismen gehören die kompetitive, die unkompetitive und die nicht-kompetitive Inhibition, wobei für die nicht-kompetitive Hemmung in der Literatur häufig auch der Überbegriff „mixed inhibition“ verwendet wird.^{1,4}

Die Anwesenheit eines Inhibitors während der Enzymreaktion kann, je nach Hemmmechanismus, den K_M -Wert und die maximale Umsatzgeschwindigkeit unterschiedlich beeinflussen. Zur Bestimmung des Hemmmechanismus (kompetitiv,

unkompetitiv oder nicht-kompetitiv) eines Inhibitors wird daher die Substratkonzentration bei gleichbleibender Inhibitorkonzentration variiert und es werden die resultierenden Umsatzgeschwindigkeiten gemessen. Ein Michaelis-Menten-Diagramm wird erhalten, das sich durch eine doppelt-reziproke Auftragung in ein Lineweaver-Burk-Diagramm überführen lässt (Abbildung 5).⁴

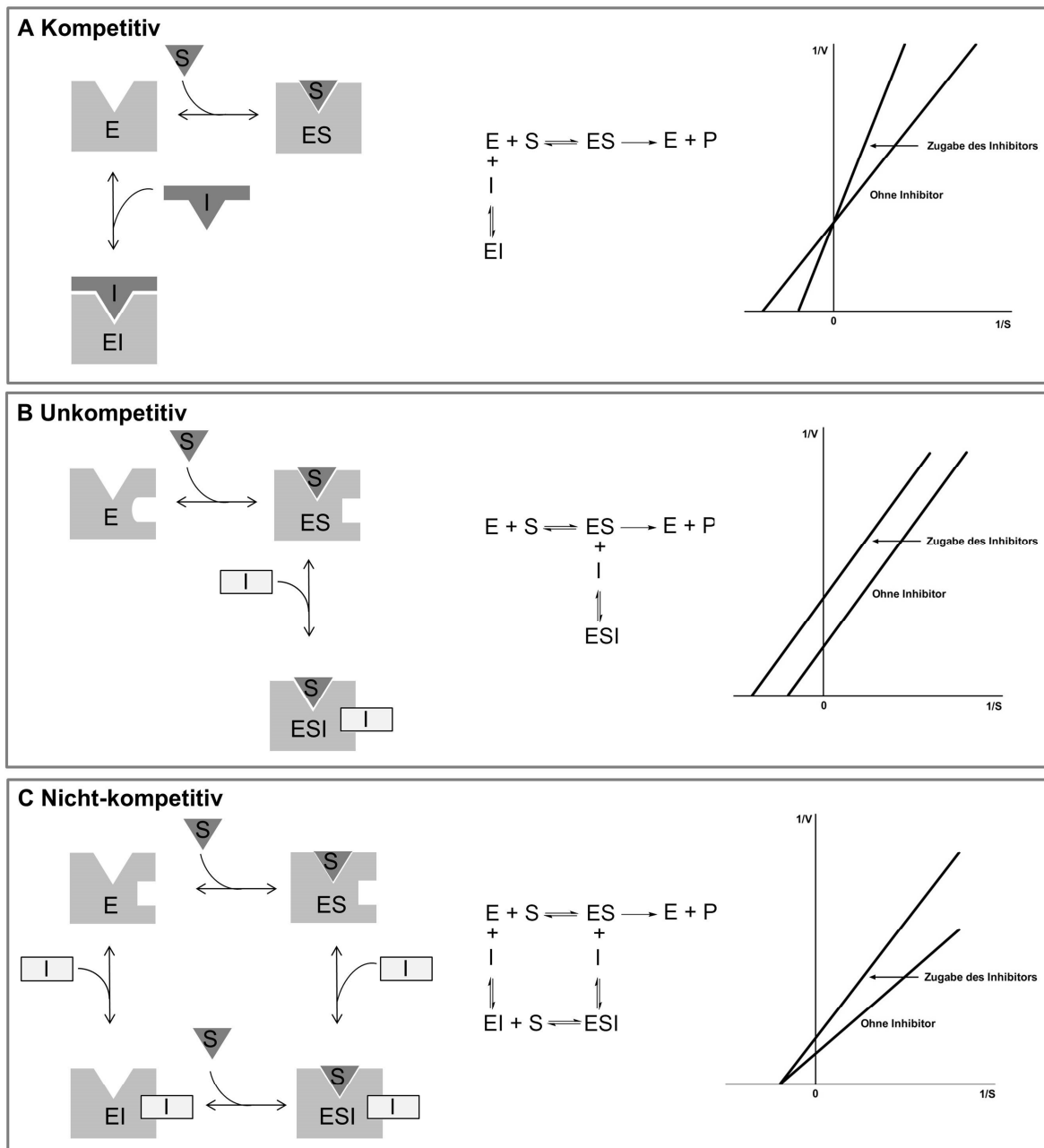


Abbildung 5 (modifiziert nach Copeland 2000)⁴: Schematische Darstellung der verschiedenen reversiblen Hemmmechanismen und Lineweaver-Burk-Diagramme mit und ohne Inhibitorzugabe (**A**, kompetitiv; **B**, unkompetitiv; **C**, nicht-kompetitiv). S = Substrat, I = Inhibitor, E = Enzym, ES = Enzym-Substrat-Komplex, EI = Enzym-Inhibitor-Komplex, ESI = Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex.

Bei einer kompetitiven Inhibition bindet der Inhibitor (I) an das freie Enzym (E). Der Inhibitor konkurriert mit dem Substrat (S) um die gleiche Bindungsstelle und kann daher bei steigender Substratkonzentration wieder verdrängt werden. Der gemessene K_M -Wert wird in Gegenwart des Inhibitors erhöht, die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} bleibt unverändert. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die beiden Geraden somit auf der Y-Achse (siehe Abbildung 5, A).^{1,4}

Bei einem unkompetitiven Hemmmechanismus bindet der Inhibitor an den Enzym-Substrat-Komplex (ES) an eine andere Bindungsstelle als das Substrat. Das Resultat ist eine Erniedrigung der K_M - und v_{max} -Werte. Die scheinbare Erhöhung der Substrataffinität (kleinerer K_M -Wert) lässt sich mit der „unproduktiven“ Substratbindung erklären. Dadurch kommt es zu einer Absenkung der freien Enzymmenge und die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit (= halbmaximale Sättigung) wird so bei einer niedrigeren Substratkonzentration erreicht. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegen die Geraden parallel zueinander (siehe Abbildung 5, B).^{1,4}

Hemmt ein Inhibitor nicht-kompetitiv („mixed inhibition“), kann die Verbindung sowohl an das freie Enzym binden als auch an den ES-Komplex an einer anderen Bindungsstelle. Durch eine Erhöhung der Substratkonzentration kann die Inhibition nicht aufgehoben werden und die maximale Umsatzgeschwindigkeit wird nicht erreicht (erniedrigter v_{max} -Wert). Der K_M -Wert kann entweder gleich bleiben, verringert oder erhöht sein, je nachdem ob der Inhibitor die gleiche, eine höhere oder eine geringere Affinität zum ES-Komplex gegenüber dem freien E aufweist. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden demnach entweder auf, oberhalb oder unterhalb der Abszisse. In der Literatur wird häufig der Überbegriff „mixed inhibition“ verwendet und nur dann von einem nicht-kompetitiven Hemmmechanismus gesprochen, wenn der Inhibitor die gleiche Affinität zum ES-Komplex wie zum freien Enzym aufweist (siehe Abbildung 5, C).⁴

1.4 Purinrezeptoren

Extrazellulär fungieren Nucleotide wie ATP (1), ADP (2), UTP (3) und UDP (4) und das Nucleosid Adenosin (5) (Abbildung 6) als wichtige Signalmoleküle, indem sie durch die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Körper beeinflussen.⁶ Sie spielen unter anderem eine Rolle bei der Hämostase, der Neurotransmission, bei Entzündungsprozessen, der Immunantwort und der Zellproliferation.^{7,8}

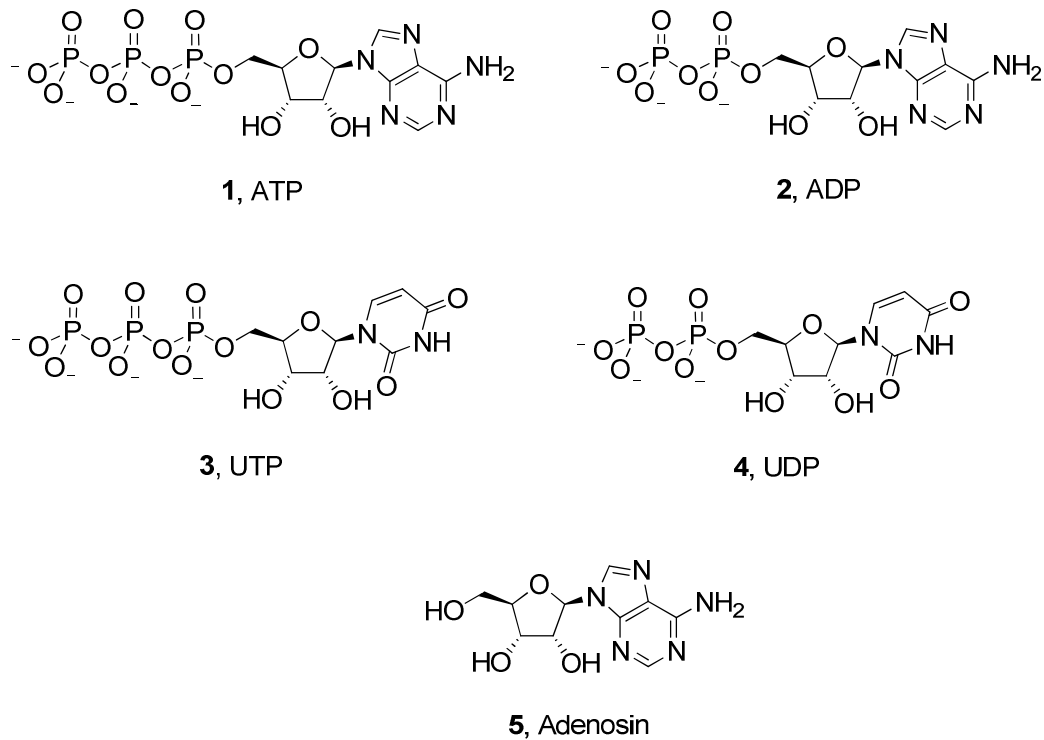


Abbildung 6: Strukturen von ATP (1), ADP (2), UTP (3), UDP (4) und Adenosin (5)

Die Entdeckung (1976) von Membranrezeptoren für das Nucleotid Adenosintriphosphat (ATP) führte zu dem Überbegriff Purinrezeptoren.⁹ Sie lassen sich weiter in P₀-, P₁- und P₂-Rezeptoren unterteilen.^{10,11} P₁-Rezeptoren werden im Körper ausschließlich von Adenosin aktiviert und daher auch Adenosinrezeptoren genannt. Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die sich weiter in die vier Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃-Rezeptoren unterteilen lassen.¹² P₂-Rezeptoren können durch ATP, ADP und/oder andere Nucleotide aktiviert werden. Während es sich bei den P_{2X}-Rezeptoren (P_{2X1} bis P_{2X7}) um ligandgesteuerte Ionenkanäle handelt, sind die P_{2Y}-Rezeptoren (P_{2Y1}, P_{2Y2}, P_{2Y4}, P_{2Y6}, P_{2Y11}, P_{2Y12}, P_{2Y13} und P_{2Y14}) GPCRs. P_{2X}-Rezeptoren werden physiologisch nur durch ATP stimuliert, P_{2Y}-Rezeptoren können, je nach Subtyp, durch unterschiedliche Nucleotide (z.B. ATP, ADP, UTP, UDP sowie UDP-Glucose) aktiviert werden.^{12,13} Neben P₁- und P₂-Rezeptoren wurden kürzlich GPCRs in der Maus, der Ratte und im chinesischen Streifenhamster beschrieben, dessen endogener Ligand die Nucleobase Adenin ist. Diese neue Familie der Purinrezeptoren wird als P₀-Rezeptoren bezeichnet.^{11,14,15,16} Obwohl es Hinweise auf seine Existenz gibt, wurde der humane Adenin-Rezeptor bisher noch nicht identifiziert.¹⁶

1.5 Ectonucleotidasen

Ectonucleotidasen sind membranständige Enzyme, die den extrazellulären Nucleotidspiegel beeinflussen, indem sie Nucleotide hydrolytisch zu den entsprechenden Nucleosiden und freien Phosphatgruppen spalten.^{7,17} Zu den Ectonucleotidasen gehören vier Familien: Die Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen), die Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs), die Alkalischen Phosphatasen (APs) und die Ecto-5'-Nucleotidase (eN).¹⁸ Die E-NTPDasen sind Nucleotid-spezifisch und hydrolysieren Nucleosidtri- und diphosphate bis hin zu dem entsprechenden Nucleosidmonophosphat. Auch die eN ist Nucleotid-spezifisch und spaltet Nucleosidmonophosphate wie AMP zu Adenosin. Die beiden anderen Familien sind hingegen in der Lage, auch andere Substrate zu spalten. Die E-NPPs können neben Nucleosidtri- und diphosphaten auch Dinucleosidpolyphosphate, ADP-Ribose, NAD⁺ und eine Reihe artifizierlicher Substrate hydrolysieren. Einige Subtypen dieser Proteinfamilie spalten auch Phospholipide. Die APs hydrolysieren Nucleosidtri-, di- und monophosphate, anorganisches Diphosphat (Pyrophosphat) und auch diverse weitere Monoester der Phosphorsäure.¹⁸

Die aus der Aktivität der Ectonucleotidasen resultierenden Konzentrationsänderungen von extrazellulären Nucleotiden und Nucleosiden haben einen Einfluss auf die Aktivierung von P1- und P2-Rezeptoren.¹⁸ Nucleoside als finale Hydrolyseprodukte können wiederum durch spezifische Transporter in die Zelle gelangen und wiederverwertet werden (Abbildung 7).¹⁹

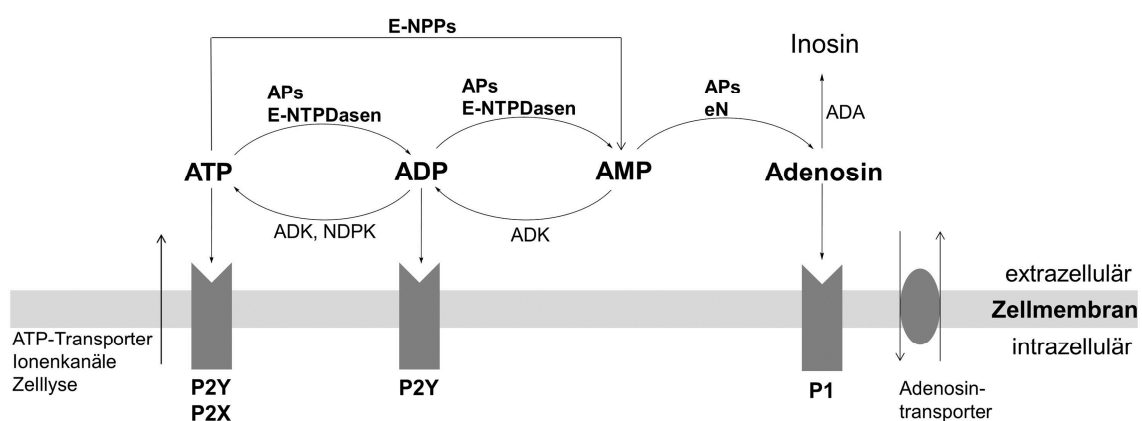


Abbildung 7 (modifiziert nach Brunschweiler 2007)²⁰: Extrazellulärer Metabolismus von ATP (ADA: Adenosin-Desaminase; ADK: Adenylatkinase; APs: Alkalische Phosphatasen; eN: Ecto-5'-Nucleotidase; NDPK: Nucleosiddiphosphokinase; ENPPs: Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen; E-NTPDase: Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase).

Die Struktur der in der vorliegenden Forschungsarbeit untersuchten Enzyme, ihre katalytischen Eigenschaften, ihre (patho)physiologische Bedeutung und das sich daraus ergebende therapeutische Potential werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben. Dazu gehören vor allem die membranständigen E-NTPDasen1, -2, -3 und -8, aber auch die bakterielle Lp1NTPDase aus *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) und die gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP).

1.5.1 Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen)

Die NTPDasen sind Nucleotid-spezifische Enzyme. Sie hydrolysieren Nucleosidtri- und diphosphate zu den entsprechenden Nucleosidmonophosphaten in Anwesenheit von Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen in millimolaren Konzentrationen bei physiologischem pH-Wert.¹⁸ Derzeit sind acht verschiedene Isoformen der NTPDasen im menschlichen Körper bekannt. Die NTPDase1, -2, -3 und -8 sind extrazellulär lokalisierte Enzyme mit zwei transmembranspannenden Domänen (TMD).^{8,17} Die NTPDase-Subtypen 4-7 hingegen sind intrazellulär lokalisierte Membranproteine, wobei die NTPDase4^{21,22,23} und -6^{24,25,26} im Golgi-Apparat, die NTPDase5^{25,27} im Endoplasmatischen Retikulum und die NTPDase7²⁸ in intrazellulären Vesikeln exprimiert werden.²⁹ Sie sind durch eine (NTPDase5 und -6) oder zwei (NTPDase4 und -7) transmembranäre Domänen in der Membran verankert, wobei die NTPDase5 und -6 auch als lösliche Enzyme im Zytosol vorkommen.^{8,18,29} Zudem können die NTPDase5 und -6 ebenfalls auf der Oberfläche von Plasmamembranen lokalisiert sein und auch von dort als lösliche Enzyme sekretiert werden. Allerdings lassen ihre hohen K_M -Werte und niedrigen spezifischen Aktivitäten (Umsatzgeschwindigkeiten pro Masseneinheit) nicht vermuten, dass sie auf purinerge Signalwege Einfluss nehmen können.^{17,24,27,30,31}

1.5.1.1 Hydrolytische Eigenschaften der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8

Bisher wurden die extrazellulär lokalisierten NTPDasen1, -2, -3 und -8 am besten untersucht. Sie können sowohl ATP als auch UTP über die Diphosphate zu den Monophosphaten hydrolysieren, wobei die Uracil-Nucleotide von der NTPDase1 und NTPDase2 mit einer niedrigeren Rate umgesetzt werden als die entsprechenden Adenin-Nucleotide.^{17,18} Die verschiedenen Isoformen der NTPDasen unterscheiden sich weitergehend in ihrer Substratspezifität (Nucleosidtriphosphat (NTP) oder

Nucleosiddiphosphat (NDP)) und ihrem Bedarf an zweiwertigen Kationen (siehe Tabelle 1).^{8,17}

Tabelle 1 (modifiziert nach Lee 2007):³² Überblick und funktionelle Eigenschaften der membranständigen E-NTPDasen1, -2, -3 und -8

Enzym	Weitere Bezeichnungen	Substrat ^a	Produkte ^a	Metallkation
NTPDase1	CD39, ATPDase, ecto-apyrase	NTP ~ NDP	NMP	Ca ²⁺ ~ Mg ²
NTPDase2	CD39L1, ecto-ATPase	NTP >>> NDP	NDP	Ca ²⁺ ~ Mg ²
NTPDase3	CD39L3, HB6	NTP > NDP	NDP, NMP	Ca ²⁺ > Mg ²
NTPDase8	hATPDase	NTP > NDP	NDP, NMP	Ca ²⁺ > Mg ²

^aNTP: Nucleosidtriphosphat, NDP: Nucleosiddiphosphat, NMP: Nucleosidmonophosphat

Die NTPDase1 hydrolysiert NTP und NDP in gleichem Maße, während die NTPDasen3 und -8 NTP gegenüber NDP als Substrat bevorzugen. Die NTPDase2 zeigt eine sehr starke Präferenz gegenüber ATP, sodass sie auch als Ecto-ATPase bezeichnet wird.^{8,17,33}

Die NTPDasen2, -3 und -8 hydrolysieren NTP zu NDP, welches vom Enzym freigesetzt wird und von der NTPDase3 und -8 anschließend weiter zu NMP umgesetzt wird. Gleiches gilt für die NTPDase1 im Fall von UTP als Substrat. ATP wird von der NTPDase1 über ADP zu AMP umgesetzt ohne eine messbare Freisetzung von ADP.^{17,29,34,35,36} Während bei der NTPDase3 und der NTPDase8 Ca²⁺ einen stärkeren Einfluss auf die katalytische Aktivität hat als Mg²⁺, lassen sich für die NTPDase1 und NTPDase2 keine Präferenzen für ein Kation erkennen.¹⁷

Zur kinetischen Charakterisierung von Enzymen kann der K_M-Wert bestimmt werden. Er entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit (vergleiche Kapitel 1.2).⁴ Die K_M-Werte für ATP, ADP, UTP und UDP als Substrate der humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 sind in der Literatur beschrieben und in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Katalytische Eigenschaften der E-NTPDasen^{17,34,37,38,39,40}

Rekombinantes humanes Enzym	K_M -Werte (μM)			
	ATP	ADP	UTP	UDP
NTPDase1	17	22	47	135
NTPDase2	70 – 394 ^a	n.d. ^b	393	n.d. ^b
NTPDase3	75 – 128 ^c	31 – 96 ^c	58	67
NTPDase8	81 – 221 ^d	127 – 177 ^d	480	241

^a Werte aus verschiedenen Untersuchungen.^{17,37,38}

^b Die Werte wurden nicht bestimmt, da es sich bei den Nucleosiddiphosphaten um schlechte Substrate der NTPDase2 handelt.

^c Werte aus verschiedenen Untersuchungen.^{17,39}

^d Werte aus verschiedenen Untersuchungen.^{34,40}

Die K_M -Werte der humanen E-NTPDasen1 und -3 für die Adeninnucleotide als Substrate liegen im niedrigen mikromolaren Bereich. Für die NTPDase2 und -8 sind auch höhere K_M -Werte beschrieben worden. Für die Hydrolyse der Uracilnucleotide liegen die bestimmten K_M -Werte für die NTPDase1 (UDP) und die NTPDase8 (UTP und UDP) ebenfalls höher.

1.5.1.2 Struktureller Aufbau der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8

Die E-NTPDasen1, -2, -3 und -8 sind 70-80 kDa große, glycosylierte Proteine mit zwei TMD, die sich jeweils in der Nähe des cytosolisch gelegenen C- und N-Terminus befinden. Die vier Isoenzyme liegen bevorzugt als Oligomere (Dimere bis Tetramere) vor und weisen untereinander eine Aminosäureidentität von 40 % auf.¹⁸ Die extrazelluläre, katalytisch aktive Schleife der E-NTPDasen enthält fünf Apyrase-konservierte Regionen (apyrase conserved regions, ACRs). Obgleich die genauen Funktionen der ACRs nicht bekannt sind, lässt ihre Homologie zu den Phosphatbindungs-Domänen der Actin/HSP70/Zuckerkinase-Familie darauf schließen, dass sie für die Phosphatbindung und Hydrolyse notwendig sind.^{18,41,42} Durch Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch verschiedener Aminosäuren in diesen Bereichen die Aktivität der Enzyme abnahm oder ganz verloren ging.^{39,43,44} Darüber hinaus wurden bisher vier weitere, konservierte Sequenzen sowie zehn konservierte Cystein-Reste identifiziert.⁴⁵ In der extrazellulären Domäne wird die Tertiärstruktur durch fünf Disulfidbrücken erhalten.

Ein Austausch der daran beteiligten Cysteine führte zu einer verringerten Aktivität oder einem vollständigen Aktivitätsverlust.⁴⁶ Darüber hinaus ist bekannt, dass die Glycosylierung der Proteine wichtig für die korrekte Faltung, den Transport zu der Zellmembran und die katalytische Aktivität ist.^{47,48,49} Auch die TMD haben einen Einfluss auf die katalytische Aktivität, was in verschiedenen Studien untersucht wurde. Für die NTPDase1 und -2 konnte gezeigt werden, dass es ohne die TMD (lösliche Mutanten) zu der Bildung von Monomeren und einem 90%igen Aktivitätsverlust kommt.^{18,50} Zudem haben die TMD einen Einfluss auf die Substratpräferenz und die schrittweise Spaltung von ATP über ADP zu AMP. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die mithilfe des Detergens Triton X-100 aus der Zellmembran gelösten Proteine gemacht. Die starke Substratpräferenz für ATP gegenüber ADP ist bei der nicht in der Membran verankerten Form der NTPDase2 nicht mehr gegeben und für die lösliche NTPDase1 konnte die Freisetzung von ADP als Intermediat bei der Hydrolyse von ATP gezeigt werden, welches bei der membrangebundenen Form nicht messbar ist.^{50,51,52} Basierend auf bisher publizierten Daten scheint es durch eine vorübergehende Interaktion der TMDs mit den Ecto-Domänen zu einer strukturellen Veränderung zu kommen, welche sich auf die Geometrie des aktiven Zentrums auswirken könnte. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Interaktionen besser verstehen zu können.^{45,53}

1.5.1.3 Expression und (patho)physiologische Rolle der E-NTPDasen1, -2, -3 und -8

NTPDasen werden ubiquitär exprimiert, wobei in einzelnen Zelltypen oder Organen bestimmte Subtypen verstärkt vorkommen, um entsprechend Nucleosidtri- und diphosphate zu hydrolysieren.^{8,6} Die physiologische Relevanz bezüglich verschiedener Expressionsorte und Substratpräferenzen der NTPDase-Subtypen ist bisher noch nicht gut aufgeklärt. Im Folgenden werden die bisher bekannten, wichtigsten Expressionsorte und die physiologische Relevanz der membranständigen NTPDasen1, -2, -3 und -8 näher erläutert.

Ursprünglich wurde die NTPDase1 als Marker für aktivierte B-Lymphozyten erkannt und CD39 genannt.^{18,54} Inzwischen weiß man aber, dass diese auch auf natürlichen Killerzellen, Monozyten, dendritischen Zellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird und zusammen mit CD73 (eN) eine Rolle bei der zellulären Immunantwort spielt.^{18,55,56,57} Bei inflammatorischen Prozessen kann es zu einem massiven Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration kommen. ATP kann über P2X- und P2Y-Rezeptoren proinflammatorische Immunantworten hervorrufen. Es wird von der NTPDase1 zu ADP

und weiter zu AMP hydrolysiert, welches schließlich von der eN zu Adenosin gespalten werden kann. Adenosin kann wiederum über P1-Rezeptoren antiinflammatorische Effekte auslösen.⁵⁷ Darüber hinaus wird die NTPDase1 vermehrt auf Endothelzellen exprimiert und spielt durch die Fähigkeit, das prothrombotisch wirksame ADP zu hydrolysieren, eine wichtige Rolle als Modulator der Hämostase.⁵⁸ So besteht ein Zusammenhang zwischen NTPDase1-Aktivität und der Thrombozytenaggregation.⁴⁵ Zudem scheint die NTPDase1 auch bei kardio- und zerebroprotektiven Prozessen eine Rolle zu spielen.⁵⁹ Des Weiteren ist die NTPDase1 ein wichtiges Enzym für die Kontrolle des Nucleotidmetabolismus auf glatten Gefäßmuskelzellen und nimmt so Einfluss auf die Regulierung des Gefäßtonus. ATP, das z. B. aus sympathischen Nervenenden freigesetzt wird, führt über die Aktivierung von P2X-Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion der Gefäßmuskelzellen. Wird jedoch unter hypoxischen Bedingungen ATP aus Endothelzellen freigesetzt, resultiert dies in der Aktivierung von P2Y-Rezeptoren und es kommt zu einer lokalen Vasodilatation.^{8,60,61}

Die NTPDase2 wird vermehrt in der Adventitia von Blutgefäßen und mikrovaskulären Pericyten exprimiert, hydrolysiert ATP zu ADP und erhöht somit im Gegensatz zur NTPDase1 die Thromboseneigung.^{58,62} Die gegensätzlichen Wirkungen beider Enzyme lassen sich anhand ihrer Lokalisation verstehen. Während die NTPDase1 in intakten Gefäßen die Thrombozytenaggregation verhindert, kann die NTPDase2 bei vermehrter ATP-Freisetzung, z. B. in Folge von Verletzungen der Gefäßwand, mit diesem in Kontakt kommen und ATP zu ADP umsetzen. Die Aktivierung von P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren fördert dann die Thrombozytenaggregation.⁵⁸ Des Weiteren wird die NTPDase2 zusammen mit der NTPDase3 und der eN in Speicheldrüsen und dem mehrschichtigen Epithel des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Weitere Forschungsarbeiten sind jedoch notwendig, um die Bedeutung dieser Enzyme in Bezug auf gastrointestinale Funktionen aufzuklären.⁶³ Die NTPDase2 ist darüber hinaus die einzige ecto-ATPase, die in Geschmacksknospen exprimiert wird. Mithilfe von NTPDase2-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es bei Fehlen des Enzyms zu einer Akkumulation von ATP kommt, welches die Desensibilisierung von P2X-Rezeptoren auf Nervenfasern nach sich zieht und zu einer verminderten Weiterleitung von Geschmackreizen führt.⁶⁴ Die Expression der NTPDase2 konnte zudem in Gliazellen nachgewiesen werden und scheint eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der durch Nucleotide hervorgerufenen Aktivierung von P2-Rezeptoren auf peripheren Nerven- oder Gliazellen und deren Kommunikation zu spielen.⁶⁵ Für den Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) konnte gezeigt werden, dass die NTPDase2 zusammen mit dem P2Y₁-Rezeptor unverzichtbar für die Entwicklung des Auges ist.⁶⁶

Die NTPDase3 ist die einzige Ectonucleotidase, die hauptsächlich in Nervenzellen des Gehirns exprimiert wird. Aufgrund ihres Verteilungsmusters in bestimmten Hirnregionen könnte sie an der Regulierung des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt sein.⁶⁷ Zudem findet sich die NTPDase3 in Epithelzellen des Verdauungssystems, des Fortpflanzungsapparates, der Niere und der Atemwege sowie in den Langerhans-Inseln des Pankreas, wo sie z. B. eine Rolle bei der Insulinausschüttung spielen könnte.^{6,63,68,69}

Die Expression der NTPDase8 scheint spezifisch für einige Gewebe zu sein. Sie wurde vermehrt in der Niere, der Leber und dem Darm nachgewiesen, wobei ihre physiologische Rolle bisher noch unbekannt ist.^{34,45,70,71}

Des Weiteren wurde für einige Tumorzellen eine Überexpression von Ectonucleotidasen beschrieben.^{45,72,73,74,75} Durch die Enzyme wird ATP, welches zytotoxische und proinflammatorische Effekte zeigt, zu Adenosin abgebaut. Adenosin fungiert wiederum als Gegenspieler, verhindert eine übermäßige Immunantwort und stimuliert Tumorstadium und Angiogenese.^{72,76}

1.5.1.4 Bakterielle Lp1NTPDase aus *Legionella pneumophila*

Für humane NTPDasen konnte bisher gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen, der Immunantwort und der Kontrolle der Hämostase spielen (vergleiche Kapitel 1.5.1.3). Auch einige Parasiten wie z. B. die Protozoen *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*, *Trichomonas vaginalis*, der Plattwurm *Schistosoma mansoni* und das Bakterium *L. pneumophila* verfügen über NTPDasen, die bei den Interaktionen zwischen dem menschlichem Organismus und dem Pathogen sowie der Virulenz wichtig zu sein scheinen.^{77,78} *L. pneumophila* ist ein gramnegatives Bakterium und Auslöser der Legionärskrankheit, die durch eine akute Lungenentzündung gekennzeichnet ist und einen schweren Verlauf annehmen kann. Durch das Einatmen kleinster Partikel (Tröpfchen) kontaminierten Wassers gelangen die Bakterien in die Lunge.^{78,79} In dem Atemtrakt werden sie von Makrophagen der Alveolen aufgenommen, dort jedoch nicht von den Abwehrzellen vernichtet. Sie vermehren sich und können schließlich die typischen Krankheitssymptome auslösen.^{78,79,80,81} Kürzlich wurde ein lösliches Enzym identifiziert, welches von *L. pneumophila in vitro* sezerniert wird und als Lpg1905 oder Lp1NTPDase bezeichnet wird.^{78,80,81,82} Die Lp1NTPDase weist bezüglich ihrer Struktur und Funktion große Ähnlichkeit zu den humanen NTPDasen auf und die NTPDase Subtyp-2 der Wanderratte konnte als Protein mit der größten strukturellen Homologie identifiziert werden.⁸² Neben ATP und ADP katalysiert das Enzym die Hydrolyse von GTP und GDP. Ebenso wie die humanen NTPDasen benötigt das

bakterielle Enzym für die Reaktionen zweiwertige Kationen. Neben Mg^{2+} und Ca^{2+} stimuliert auch Zn^{2+} die Aktivität des Enzyms. Zudem hängt die Aktivität stark vom pH-Wert ab. Das pH-Optimum für die Hydrolyse von ATP und ADP liegt bei einem pH von 7,4. Die K_M -Werte für ATP und ADP als Substrate sind in der Literatur mit 0,4 mM für ATP und 1,0 mM für ADP angegeben, welches auf eine höhere ATP-Substrataffinität hinweist.⁷⁸ Die Aktivität der bakteriellen NTPDase scheint die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in eukaryontischen Zellen zu erhöhen und für deren Virulenz in Mäusen verantwortlich zu sein.^{78,80} Möglicherweise können dafür sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Effekte eine Rolle spielen. Innerhalb der Zellen könnte *L. pneumophila* die NTPDase zur Spaltung von ATP zu AMP benötigen. Dies würde zu einer erhöhten AMP-Konzentration und somit zu einer Aktivierung von AMP-abhängigen Proteinkinasen führen.⁸³ Durch die von den Proteinkinasen ausgelösten Effekte könnten bessere intrazelluläre Überlebens- und Replikationsbedingungen für *L. pneumophila* geschaffen werden.⁷⁸ Zudem resultiert die Aktivierung der Kinasen in einer Produktionsinhibition proinflammatorischer Zytokine.⁸⁴ Des Weiteren könnte die Regulierung extrazellulärer ATP-Mengen durch die NTPDase für die Virulenz von *L. pneumophila* mitverantwortlich sein.⁷⁸ ATP setzt über P2-Rezeptoren Signalkaskaden in Gang, die unter anderem zu einer Immunantwort des Wirts z.B. durch vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führen und/oder Apoptose zur Folge haben.^{8,85} Die Lp1NTPDase könnte durch die Hydrolyse von ATP eben diese Wirkungen hinauszögern.

Neben ATP und ADP spaltet die Lp1NTPDase ebenfalls GTP und GDP. Die Umsetzung von GTP zu GDP innerhalb von Zellen ist wichtig für intrazelluläre Signal- und Transportprozesse. Daher könnte die Kontrolle von intrazellulären GTP- und GDP-Spiegeln durch die Lp1NTPDasen eine weitere Möglichkeit für das Bakterium darstellen, auf die Signaltransduktionswege in der Wirtszellen Einfluss zu nehmen.^{78,86}

1.5.1.5 Kristallstrukturen

Um Enzyme zu charakterisieren, ist die Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins, bzw. des mit einem Substrat oder Inhibitor co-kristallisierten Enzyms sehr hilfreich. Informationen, die man aus einer solchen Strukturen ziehen kann, ermöglichen z. B. das zielführende Design von neuen Hemmstoffen oder geben Aufschlüsse über den katalytischen Reaktionsmechanismus der Substratspaltung. In den letzten Jahren wurden die Kristallstrukturen von der Ecto-Domäne der Ratten-NTPDase1 und -2, der homologen Lp1NTPDase1 aus dem Bakterium *L. pneumophila* und der NTPDase aus dem Protozoon *Toxoplasma gondii* veröffentlicht.^{53,77,82,87,88} Anhand dieser Strukturen konnten einige neue

Erkenntnisse hinsichtlich der molekularen Struktur und Funktionalität der NTPDasen gewonnen werden (siehe Abbildung 8).

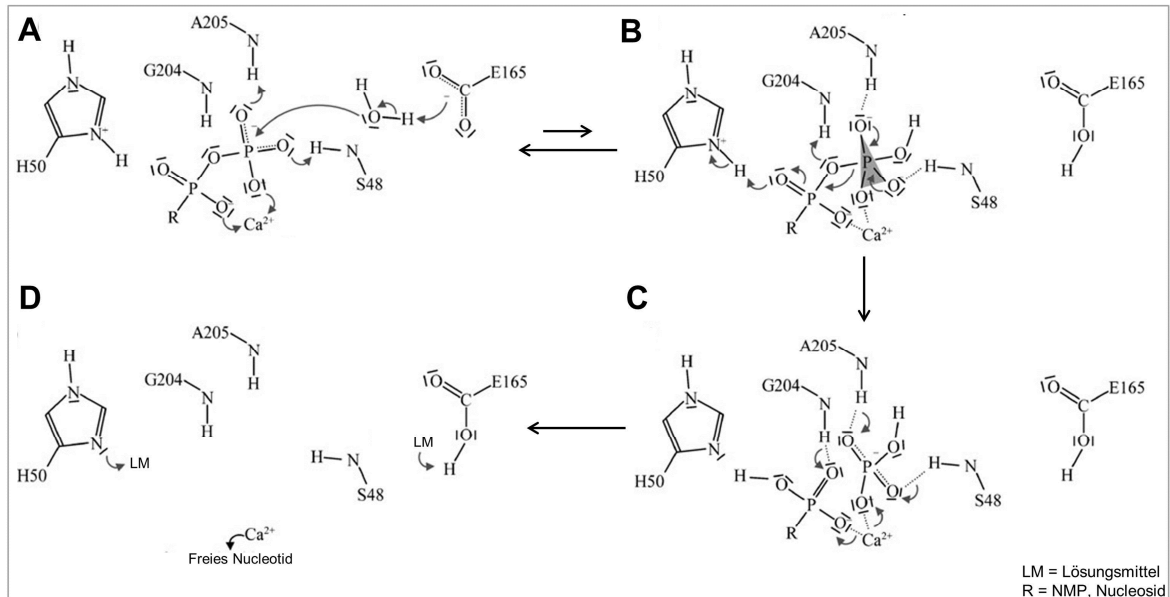


Abbildung 8 (aus Zimmermann 2012)¹⁸: Schematische Darstellung des postulierten Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von NTP (R = NDP) oder NDP (R = Nucleosid) durch NTPDasen. **(A)** Aktivierung des Wassermoleküls durch E165 und nucleophiler Angriff an der terminalen Phosphatgruppe. Die negative Ladung der Phosphatgruppen wird hierbei durch Komplexierung des zweiwertigen Kations reduziert. Der positiv geladene H50-Rest könnte eine Verschiebung der negativen Partialladung von der γ -Phosphatgruppe auf die β -Phosphatgruppe begünstigen. **(B)** Zerfall des trigonal-bipyrimidalen Übergangszustandes. Die negative Ladung wird durch Protonendonatoren der Phosphatbindungsschleifen (z.B. S48 und A205) stabilisiert. **(C)** Das Produkt wird freigesetzt. **(D)** Rekonstitution des aktiven Zentrums.

Das zweiwertige Kation liegt demnach in einem zweizähligen Komplex mit dem Nucleotid vor. Bei dem für die Substrathydrolyse vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus greift ein Wassermolekül in einem ersten Schritt nucleophil an dem terminalen Phosphatrest des Nucleotids an. Die Carboxylgruppe eines Glutamatrestes im aktiven Zentrum fungiert als katalytische Base und aktiviert das Wassermolekül zuvor. Die negativen Ladungen der Phosphatgruppen werden durch Komplexierung des zweiwertigen Kations reduziert. Nach dem Zerfall eines trigonal-bipyrimidalen Übergangszustandes wird das Produkt freigesetzt.^{18,53,88} Die Spezifität der NTPDasen für NTPs und NDPs wird erreicht, indem das NDP-Molekül eine gestreckte Konformation annimmt und die Bindungsstelle des α -Phosphatrestes des NTP-Moleküls übersprungen wird. Im Gegensatz zu NTP und NDP ist NMP kein Substrat der NTPDasen, da der α -Phosphatrest, nach Bindung der Base in der Bindungstasche, das katalytische Zentrum nicht mehr erreichen kann.^{18,53,88} Zudem

wurde gezeigt, dass die Enzyme in einer inaktiven offenen Form und einer aktiven geschlossenen Konformation existieren können.^{82,88}

Kristallstrukturen von NTPDasen im Komplex mit einem Inhibitor gibt es bisher nur von zwei Polyoxometalaten (POMs) (Ammoniumheptamolybdat ((NH₄)₆[Mo₇O₂₄]) und Decavanadat (V₁₀O₂₈⁶⁻)) zusammen mit der Ecto-Domäne der Ratten-NTPDase1 sowie von PSB-071, einem Anthrachinon-Derivat (Abbildung 10), zusammen mit der Ecto-Domäne der Ratten-NTPDase2.^{77,87,89} In Abbildung 9 ist die Kristallstruktur von der Ecto-Domäne der Ratten-NTPDase1 im Komplex mit Decavanadat dargestellt.

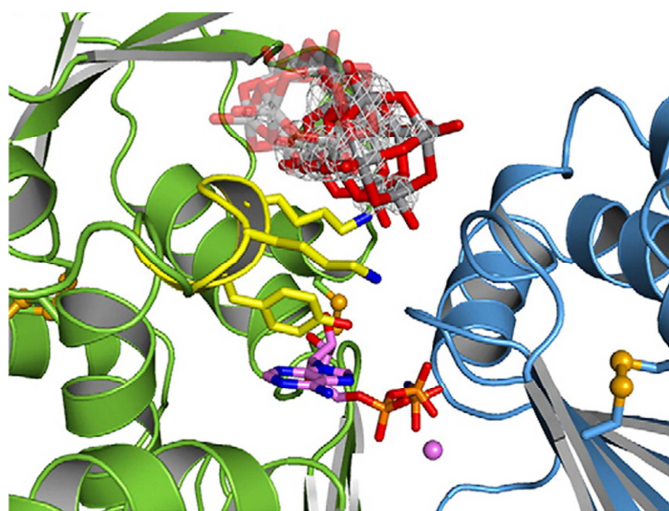


Abbildung 9: (aus Zebisch 2012).⁸⁷ Kristallstruktur der Ecto-Domänen (blau = Ecto-Domäne I, grün = Ecto-Domäne II) der Ratten-NTPDase1 co-kristallisiert mit Decavanadat (rot und grau). Zusätzlich ist der modellierte Bindungsmodus des Substratanalogons AMPPNP (rosa, blau; Phosphatgruppen: rot, orange) im Komplex mit Calciumionen (rosa Kugel) dargestellt. In gelb ist die Y409-enthaltende Substratbindungsschleife gezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die POMs elektrostatisch an eine Schleife des Enzyms binden, die an der Bindung der Nucleobase beteiligt ist. Nach der Bindung könnten die Verbindungen die NTPDase inhibieren, indem sie auf die räumliche Struktur dieser Schleife Einfluss nehmen oder ihre Beweglichkeit in Lösung einschränken.⁸⁷

PSB-071 (**6**) wurde kürzlich aus einer Reihe der in dieser Untersuchung getesteten Anthrachinon-Derivate als potentester Inhibitor der NTPDase2 identifiziert (K_i = 12,8 μM, **6**) und daher für die Röntgenstrukturanalyse ausgewählt (Abbildung 10). So sollte stellvertretend der Inhibitionsmechanismus aller von Reactive Blue 2 (RB-2, **7**) abgeleiteten Sulfoanthrachinone aufgeklärt werden (Abbildung 10), um anschließend entsprechend verbesserte Inhibitoren entwickeln zu können.^{89,90}

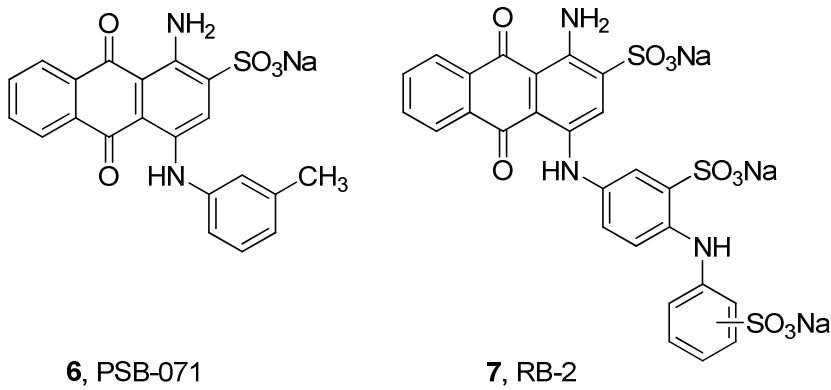


Abbildung 10: Strukturen von PSB-071 (**6**) und RB-2 (**7**, 1:2 meta/para)

Es wurde gezeigt, dass zwei Moleküle PSB-071 (**6**) an der Nucleotidbindungsstelle der Ratten-NTPDase2 binden, wobei nur für eines der beiden Moleküle die Orientierung in der Bindungstasche bestimmt werden konnte. Mithilfe der Röntgenstruktur konnten wichtige Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und dem Enzym aufgeklärt werden (siehe Abbildung 11).⁸⁹

Eine Sulfonatgruppe in der Position 2 des Anthrachinon-Grundgerüsts scheint für die inhibitorische Aktivität von Anthrachinon-Derivaten essentiell zu sein. Sie induziert eine Umorientierung der an der Bindung der Nucleosidpartialstruktur des Nucleotids beteiligten Proteinschleife bestehend aus den Aminosäuren R387-R394. Es wurde gezeigt, dass sich spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Nucleotidbindungsschleife des Enzyms und der Sulfonatgruppe von PSB-071 ausbilden. Hauptsächlich scheint eine Interaktion zwischen dem Inhibitor und Amidbindungen im Proteinerückgrat der Aminosäuren T393 und R394 bzw. den Hydroxylgruppen in der Seitenkette der Aminosäuren T393 und Y398 zu bestehen (vergleiche Abbildung 11).⁸⁹

Zusätzlich wurde beschrieben, dass der Methylphenyl-Substituent in Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüsts in der durch die Umorientierung neu entstandenen Bindungstasche zwischen R245 und R394 liegt, wobei letztere ausschließlich in der NTPDase Subtyp 2 vorkommt. Die Flexibilität dieser Reste erklärt, wieso sich auch andere Aryl-Substituenten gut in die Bindungstasche einpassen können. Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Anthrachinon-Grundgerüst und H50 in der ACR1, welche für die Bindung der Phosphatgruppen und die Katalyse von Nucleotiden wichtig zu sein scheint, konnte ebenfalls gezeigt werden.⁸⁹

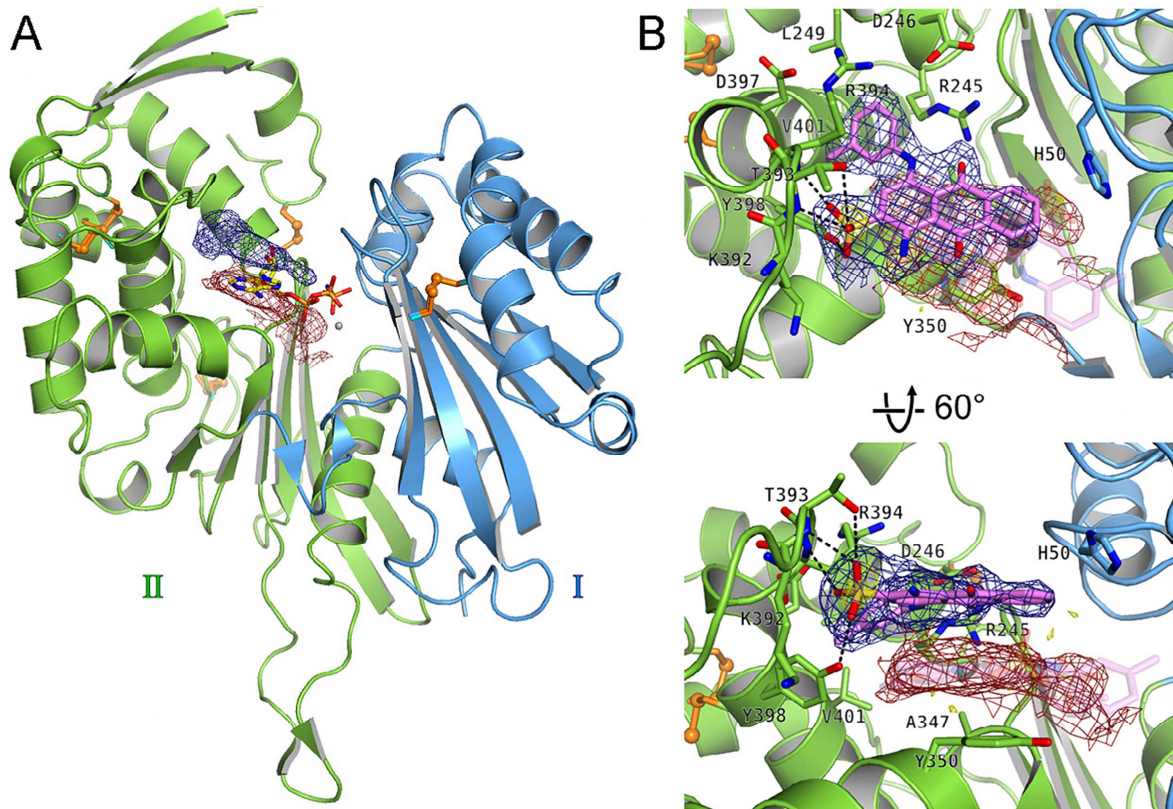


Abbildung 11 (aus Zebisch 2014)⁸⁹: Bindung von PSB-071 (**6**) an die Ecto-Domänen der Ratten-NTPDase2. **(A)** Dargestellt ist die Kristallstruktur der Ecto-Domänen der Ratten-NTPDase2 (blau = Ecto-Domäne I, grün = Ecto-Domäne II) co-kristallisiert mit PSB-071. Die Elektronendichteverteilung des einen Inhibitormoleküls ist als blaues Gitter und die des zweiten Inhibitormoleküls als rotes Gitter gezeigt. Zusätzlich ist der modellierte Bindungsmodus des Substratanalogons AMPPNP im Komplex mit Zinkionen (graue Kugeln) abgebildet.⁸⁸ **(B)** Dargestellt sind zwei Nahansichten auf die Bindungsstellen der PSB-071-Moleküle. Für das eine Inhibitormolekül konnte keine spezifische Orientierung bestimmt werden. Die mutmaßliche Orientierung und Elektronendichteverteilung des Moleküls sind transparent bzw. als rotes Gitter dargestellt. Für das andere Molekül ist die Struktur in magentafarben und die Elektronendichteverteilung als blaues Gitter gezeigt. Weiterhin sind die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sowie die Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelten Linie) zu der Sulfonatgruppe in Position 2 eingezeichnet.

Es sei darauf hingewiesen, dass bei allen bisher veröffentlichten Kristallstrukturen die für die katalytische Aktivität wichtigen TMD sowie die Oligomerisierung und Glycosylierungsmuster der Enzyme nicht berücksichtigt wurden. Daher ist die Kristallstrukturanalyse einer membranständigen NTPDase mit ihren zwei TMD bzw. deren Strukturaufklärung mit anderen Methoden ein wichtiges Ziel weiterer Forschungsarbeiten.⁴⁵

1.5.1.6 Therapeutisches Potential

E-NTPDasen spielen eine entscheidende Rolle bei der purinergen Signalweiterleitung und stellen vielversprechende Arzneimitteltargets dar. Die Inhibition von NTPDasen auf Krebszellen könnte z.B. einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen, da sie zusammen mit der eN Adenosin generieren, welches immunsuppressiv wirkt und die Angiogenese sowie das Tumorwachstum fördert.^{52,72,76}

Die Hemmung der NTPDasen könnte zudem die Immunantwort bei bakteriellen oder viralen Infektionen erhöhen. Lokale, inhalative Anwendungen könnten so bei der Behandlung der zystischen Fibrose oder infektiösen Erkrankungen der Lunge Einsatz finden.^{91,92}

CD39^{-/-}-Mäuse (NTPDase1-Knock-out-Mäuse) zeigen eine gestörte Hämostase mit stärkerer Thromboseneigung und nach experimentell herbeigeführtem Schlaganfall eine umfangreichere Schädigung des Gewebes im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.^{93,94} Umgekehrt konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass es bei einer Überexpression der NTPDase1 zu einer reduzierten Thrombusbildung und verlängerten Blutungszeiten kommt.⁹⁵ Als lösliche Mutante der NTPDase1 wurde solCD 39 generiert, die eine neue Möglichkeit zur Behandlung des Schlaganfalls und Herzinfarkts eröffnen könnte. In entsprechenden Tiermodellen konnten bisher vielversprechende Ergebnisse erhalten werden.^{42,94,96,97,98,99,100}

Des Weiteren könnten NTPDasen als Arzneistofftargets für eine antimikrobielle Therapie nützlich sein. So kann z.B. die selektive Inhibition der Lp1NTPDase aus *L. pneumophila* eine neue Strategie für die Behandlung der Legionärskrankheit (vergleiche Kapitel 1.5.1.4) sein.^{78,81}

1.5.1.7 Inhibitoren

Zurzeit spielen die E-NTPDasen noch keine klinische Rolle als Arzneistofftargets. Um das therapeutische Potential von E-NTPDase-Inhibitoren, z. B. für die Behandlung von Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen, näher untersuchen zu können, ist die Entwicklung von potenten und selektiven Inhibitoren erforderlich. Zudem könnten die Enzymeigenschaften der NTPDase-Subtypen und ihre (patho)physiologische Rolle mithilfe von Inhibitoren als pharmakologische Werkzeuge näher charakterisiert werden. Sie könnten auch dazu beitragen, die durch freigesetzte Nucleotide ausgelösten Effekte besser zu verstehen.^{101,102} Bisher sind jedoch nur wenige, moderat potente NTPDase-Inhibitoren beschrieben worden. Es ist allerdings schwierig, die veröffentlichten Daten zu

vergleichen, da an Enzymen getestet wurde, welche aus unterschiedlichen Spezies oder Organen isoliert wurden. Gleiche Enzyme aus verschiedenen Spezies können sich aber deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden.^{17,101} Auch Untersuchungen an Organpräparationen sind beschrieben, in welchen sicherlich noch andere Nucleotidabbauwege eine Rolle spielen.¹⁰³ In älterer Literatur wird auch oft die Bezeichnung „ATPase“ oder „ADPase“ verwendet, da eine einheitliche Nomenklatur der E-NTPDasen mit ihren Subtypen erst seit dem Jahr 2000 existiert. Somit ist es schwierig die veröffentlichten Inhibitionsdaten einem bestimmten Enzymsubtyp zuzuordnen.³³

Die bisher beschriebenen Inhibitoren lassen sich in Nucleotid-Derivate und Nicht-Nucleotid-Verbindungen einteilen.⁹⁰

Nucleotid-Derivate, die sich von ATP ableiten, sind i. d. R. metabolisch instabil, da sie schnell dephosphoryliert werden.¹⁰² Um das Problem zu lösen, sollten ATP-Analoga synthetisiert werden, die nicht hydrolysierbar sind. *N*⁶-Diethyl- β,γ -dibrommethyl-ATP (ARL67156, **8**) ist hydrolysestabil gegenüber den humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 sowie der NPP1 und NPP3 und darüber hinaus der bisher einzige kommerziell zu erwerbende NTPDase-Inhibitor, der nicht gleichzeitig an P2-Rezeptoren bindet (Abbildung 12).^{8,104,105} Die Verbindung ist ein schwacher, kompetitiver Inhibitor der humanen NTPDase1 ($K_i = 11 \mu\text{M}$) und der humanen NTPDase3 ($K_i = 18 \mu\text{M}$), nicht jedoch der humanen NTPDase2 und -8.¹⁰⁵ An den Ratten-NTPDasen1, -2 und -3 wurde ARL67156 in einer anderen Studie untersucht. Es wurden entsprechend K_i -Werte von $27 \mu\text{M}$, $\geq 1000 \mu\text{M}$ und $112 \mu\text{M}$ bestimmt, sodass auch bei den Rattenenzymen keine nennenswerte Inhibition der NTPDase2 feststellbar war.¹⁰⁶

Des Weiteren wurde 8-Thiobutyladenosin-5'-triphosphat (8-BuS-ATP, **9**) als kompetitiver Inhibitor ($K_i = 10 \mu\text{M}$) einer aus Rindermilz isolierten Ectonucleotidase identifiziert, welche Eigenschaften der NTPDase1 aufweist (Abbildung 12).^{107,108,109} Kürzlich wurde 8-BuS-ATP ebenfalls an den humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 bezüglich seiner inhibitorischen Aktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung zwar ein Inhibitor der humanen NTPDase1 ist ($K_i = 0,8 \mu\text{M}$), jedoch auch ein Substrat der NTPDasen2, -3 und -8 darstellt und somit der Einsatz nur eingeschränkt möglich ist.¹¹⁰ Durch die Synthese von 8-Thiobutyladenosin-5'-diphosphat (8-BuS-ADP, **10**) und 8-Thiobutyladenosin-5'-monophosphat (8-BuS-AMP, **11**) ist es aber dann gelungen potente, selektive NTPDase1-Inhibitoren (mit nicht-kompetitivem Hemmmechanismus) zu erhalten ($K_i = 0,8$ bzw. $0,9 \mu\text{M}$), die hydrolysestabil gegenüber den anderen E-NTPDasen sind und keine Affinität zu dem P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor aufweisen (Abbildung 12).¹¹⁰

Bei PSB-6426 (**12**) handelt es sich um eine metabolisch stabile, ungeladene Verbindung, die sich von Uridin-5'-carboxylat ableitet (Abbildung 12). Sie wurde als selektiver und kompetitiver Inhibitor der humanen NTPDase2 ($K_i = 8,2 \mu\text{M}$) identifiziert. PSB-6426 zeigt zudem keine Interaktion mit P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren, obgleich insbesondere Uracil-Nucleotide an diesen Rezeptoren als Agonisten fungieren.¹¹¹

Die potentesten bisher identifizierten Inhibitoren, die sich strukturell von Nucleotiden ableiten lassen, sind in Abbildung 12 dargestellt.

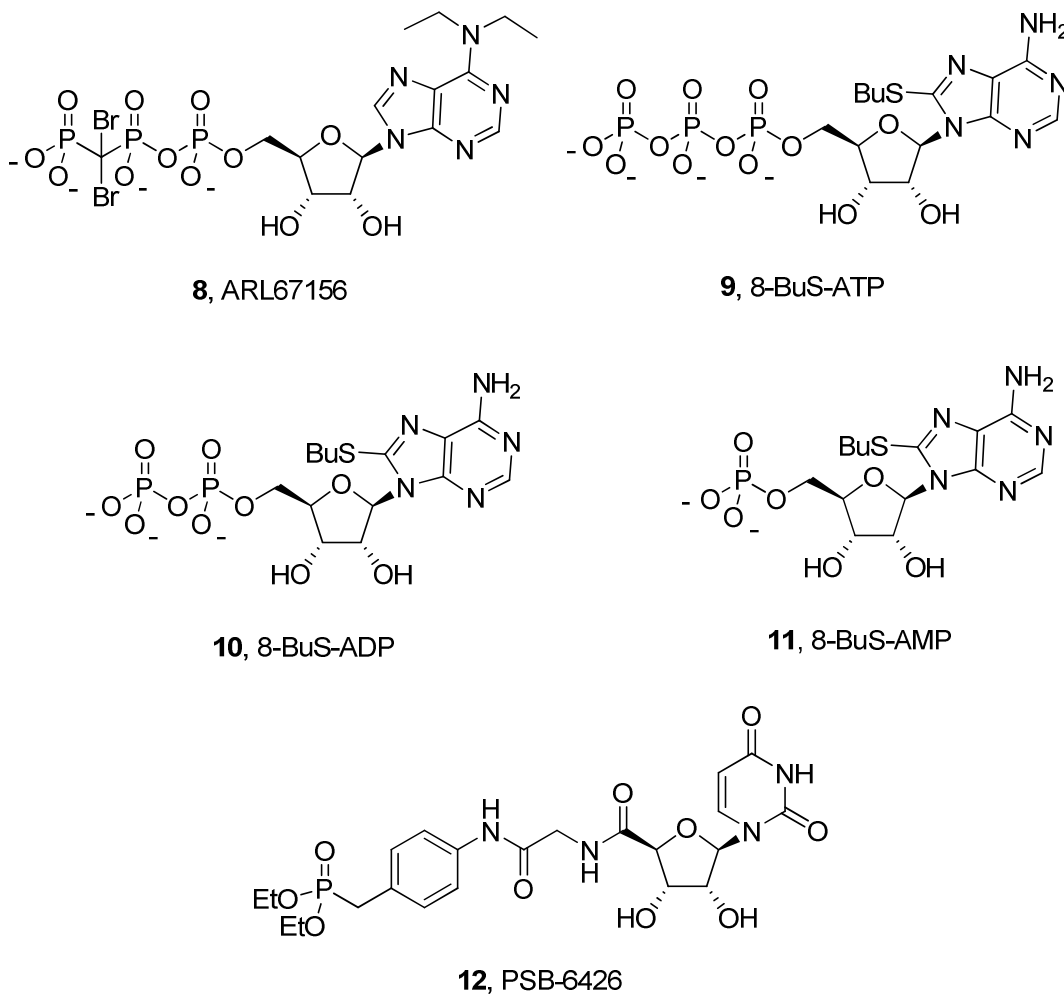
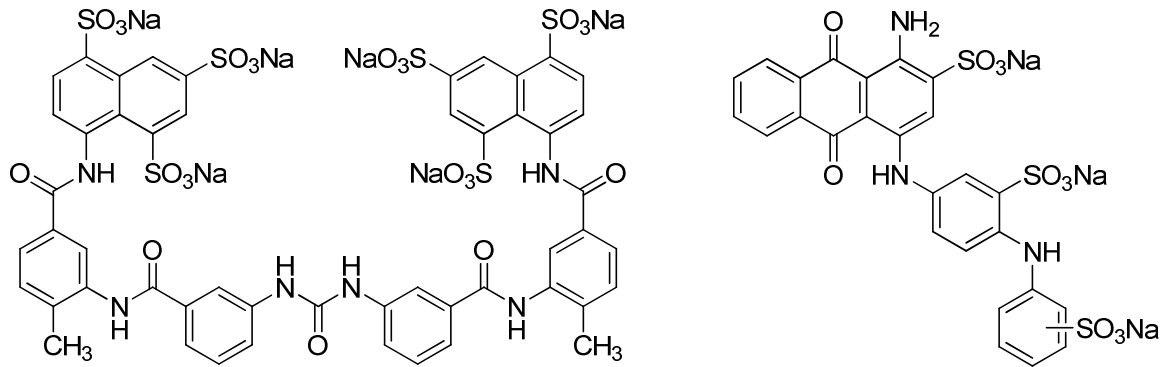


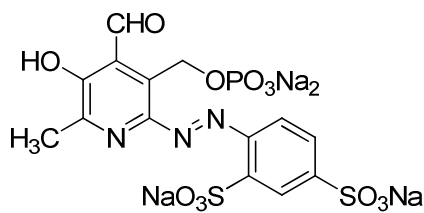
Abbildung 12: Die von Nucleotiden abgeleitete NTPDase-Inhibitoren ARL67156 (**8**), 8-BuS-ATP (**9**), 8-BuS-ADP (**10**), 8-BuS-AMP (**11**) und PSB-6426 (**12**).

Inhibitoren, die sich hinsichtlich ihrer Struktur nicht von Nucleotiden ableiten lassen, sind in Abbildung 13 dargestellt.

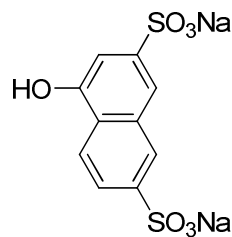


13, Suramin

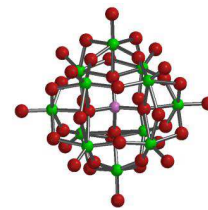
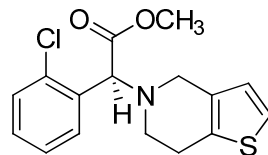
7, RB-2



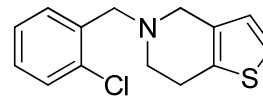
14, PPADS



15, BGO136

16, $[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}]^{8-}$ 

17, Clopidogrel



18, Ticlopidin

Abbildung 13: Die nicht von Nucleotiden abgeleitete NTPDase-Inhibitoren Suramin (**13**), RB-2 (**7**, 1:2 meta/para), PPADS (**14**), BG0136 (**15**), $[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}]^{8-}$ (**16**), Clopidogrel (**17**) und Ticlopidin (**18**).

Zu diesen gehören Suramin (**13**) und verwandte Verbindungen, der Farbstoff RB-2 (**7**) und die von RB-2 abgeleiteten Anthrachinon-Derivate sowie Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS, **14**) (Abbildung 13).^{90,106,112} Allerdings sind diese Verbindungen auch nur moderate Inhibitoren. Je nach Spezies und Subtyp inhibieren die potentesten Verbindungen lediglich im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich.^{90,106,112} Zudem sind die Inhibitoren nicht selektiv, da sie ebenfalls P2-Rezeptorantagonisten darstellen.⁹⁰

Gendron *et al.*¹⁰¹ synthetisierten eine Reihe von Naphtholen mit Sulfonsäuresubstituenten. Aus diesen Untersuchungen ging die Verbindungen BG0136 (**15**) hervor, welche als

selektiver Inhibitor der NTPDase1 (K_i -Wert = 103 μ M) und der NTPDase 2 (K_i -Wert = 150 μ M) beschrieben wurde (Abbildung 13).¹¹³

Eine weitere Gruppe von Inhibitoren stellen die POMs wie z. B. $[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}]^{8-}$ (**16**) dar, wobei es sich um anorganische, negativ geladene Metallkomplexe handelt (Abbildung 13). Die Metallatome sind Übergangsmetalle wie Vanadium, Wolfram, Niobium, Antimon oder Molybdän, die über Sauerstoffatome verbrückt sind und in ihren höchsten Oxidationsstufen vorliegen.^{114,115,116} Einige der Verbindungen hemmen die Ratten-NTPDasen1, -2 und -3 im submikromolaren Bereich.⁹¹ Die Verbindungen sind relativ stabil, einige sogar in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert.¹¹⁶ In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die POMs sehr gut als pharmakologische Werkzeuge einsetzbar sind.^{117,118,119} Allerdings haben sie hohe Molekularmassen und viele negative Ladungen, was ihre Anwendung als Arzneistoffe einschränken könnte, da nur eine parenterale Gabe möglich wäre.⁹⁰

Für die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel (Plavix[®], **17**) und Ticlopidin (Tiklyd[®], **18**) konnte gezeigt werden, dass sie die humane NTPDase1 hemmen (K_i -Werte von 10 μ M bzw. 14 μ M) (Abbildung 13).^{120,121} Die Verbindungen sind zwar auch irreversible P2Y₁₂-Antagonisten, dies jedoch erst nach metabolischer Aktivierung. Da Ticlopidin auch bei einer Konzentration von 100 μ M keine Inhibition der anderen NTPDase-Subtypen sowie NPP1 und -3 zeigt, könnte die Verbindung als selektiver NTPDase1-Inhibitor Einsatz finden.^{120,121}

In der Tabelle 3 (nächste Seite) sind die zuvor beschriebenen NTPDase-Inhibitoren mit den entsprechenden K_i -Werten nochmal zusammengefasst.

Neben kleinen Molekülen konnten auch monoklonale Antikörper als spezifische Hemmstoffe der NTPDase2 und NTPDase3 entwickelt werden.^{122,123}

Auch für die bakterielle Lp1NTPDase sind bisher kaum Inhibitoren beschrieben. ARL67156 (**8**) inhibiert das Enzym mit einem K_i -Wert von etwa 0,5 mM (Abbildung 12).⁸² Für POM-1 ($\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]$) und POM-6 ($(\text{NH}_4)_{18}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$) sind K_i -Werte von 267 μ M bzw. 67 μ M publiziert.⁷⁸

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bisher noch nicht gelungen ist, potente und selektive NTPDase-Inhibitoren zu identifizieren, die weiterführend als Leitstrukturen für die Arzneistoffentwicklung dienen könnten.

Tabelle 3: An den humanen E-NTPDasen untersuchte Inhibitoren

Verbindung	K _i -Wert (μM) (% Inhibition)			
	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
8-BuS-ADP (10) ¹¹⁰	0,9	(< 20 %) ^a	(< 5 %) ^a	(< 20 %) ^a
8-BuS-AMP (11) ¹¹⁰	0,8	(< 5 %) ^a	(< 5 %) ^a	(< 5 %) ^a
8-BuS-ATP (9) ¹¹⁰	0,8	(< 20 %) ^a	(< 5 %) ^a	(< 20 %) ^a
ARL67156 (8) ¹⁰⁵	11	(15 %) ^a	18	(20 %) ^a
BG0136 (15) ¹¹³	103 ^b	150 ^b	n.d. ^c	n.d. ^c
Clopidogrel (17) ¹²⁰	10	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
[TiW ₁₁ CoO ₄₀] ⁸⁻ (16) ⁹¹	0,140 ^d	0,910 ^d	0,563 ^d	n.d. ^c
PPADS (14) ¹⁰⁶	46,0 ^d	44,2 ^d	3,0 ^d	n.d. ^c
PSB-6426 (12) ¹¹¹	(50 %) ^e	8,20	(0 %) ^e	(0 %) ^e
RB-2 (7) ¹¹²	53 μM ^f	12 ^f	3,3 ^f	> 100 ^f
Suramin (13) ¹¹²	16 ^f	24 ^f	4,3 ^f	> 100 ^f
Ticlopidin (18) ¹²⁰	14	(0 %) ^a	(0 %) ^a	(0 %) ^a

^a % Inhibition bei 100 μM Inhibitor und 100 μM Substrat ATP

^b Getestet wurde an aufgereinigten Enzymen aus Schweinehirn

^c Keine Daten angegeben

^d Getestet wurde an den rekombinanten Rattenenzymen

^e % Inhibition bei 1 mM Inhibitor und 400 μM Substrat ATP

^f IC₅₀-Wert; Substrat: 100 μM ATP

1.5.2 Alkalische Phosphatasen

Die APs gehören zu der Enzymfamilie der Ectonucleotidasen, da sie extrazelluläres ATP über ADP und AMP zu Adenosin hydrolysieren können.¹⁸ Sie sind über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebundene glykosylierte Proteine, die ubiquitär in den meisten Organismen zu finden sind. Sie können aber auch als lösliche Enzyme freigesetzt werden. Die Aktivität der Enzyme hängt stark vom pH-Wert ab. Das pH-Optimum für die Hydrolyse von Phosphomonoestern liegt im Alkalischen. Zudem ist die Anwesenheit von drei Metallionen (zwei Zn^{2+} und ein Mg^{2+}) für die enzymatische Aktivität notwendig.^{124,125} Vier Isoformen der AP sind bisher beschrieben worden, wobei drei der Enzyme gewebespezifisch sind und untereinander eine Homologie von > 90 % aufweisen. Dazu gehören die intestinale (IAP), die in den Keimzellen vorkommende (GCAP) und die plazentare Alkalische Phosphatase (PLAP). Das vierte Isoenzym ist gewebeunspezifisch (TNAP), wird jedoch vermehrt in den Knochen, der Leber und den Nieren exprimiert und ist zu 50 % homolog zu den anderen drei Isoenzymen.^{126,127} Die APs sind typischerweise als Homodimere vorliegende Proteine mit einer Größe von etwa 80 kDa, aber auch Heterodimere zwischen der IAP, GCLP und PLAP sind beschrieben worden.^{18,128} Die Glykosylierungsmuster (N- und/oder O-Glykosylierungen) der APs können zwischen den verschiedenen Isoformen und auch bei dem gleichen Enzym in verschiedenen Geweben unterschiedlich sein. Die N-Glykosylierungen sind essentiell für die maximale Aktivität der TNAP, nicht aber für die der IAP, GCAP und PLAP.^{129,130} Von den vier humanen Isoenzymen wurde bisher die Kristallstruktur der PLAP im Komplex mit Phosphat und *L*-Phenylalanin veröffentlicht.^{131,132,133} *L*-Phenylalanin ist ein unkompetitiver Inhibitor des Enzyms und die Kristallstruktur zeigt die Bindungsstelle der Substanz im aktiven Zentrum.^{132,133}

1.5.2.1 Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)

Für die TNAP sind bisher nur Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) und Diphosphat (PP_i) als natürliche Substrate bestätigt worden.^{134,135,136} PLP ist die aktivierte Form von Vitamin B₆ und wird in neuronalen Zellen als Cofaktor für die Bildung von Neurotransmittern wie Dopamin, Serotonin, Histamin und GABA benötigt. Da PLP nicht in die Zellen transportiert werden kann, wird es von der TNAP extrazellulär zu Pyridoxal hydrolysiert, dieses gelangt in die Zelle und kann dort wieder zu PLP umgesetzt werden.¹³⁷

Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des TNAP-Gens (TNAP-Knock-out-Mäuse) zu Krampfanfällen und einer Hypomineralisierung des Skelettes führt.^{137,138,139} Zu

den Krampfanfällen kommt es aufgrund des gestörten PLP-Metabolismus, welcher eine verringerte Konzentration des Neurotransmitters GABA im Gehirn nach sich zieht.¹³⁸

TNAP ermöglicht eine normale Knochenmineralisierung durch die Hydrolyse des extrazellulär vorkommenden PP_i , welches ein potenter Inhibitor der Knochenmineralisierung ist.¹³⁷

Hypophosphatasie ist eine seltene, systemische Knochenerkrankung aufgrund von Mutationen des TNAP-Gens und somit defekter TNAP-Aktivität; sie führt zu schwerwiegender Osteomalazie.^{124,137}

Extrazelluläres PP_i verhindert auch Kalzifizierungen der Gefäße *in vitro* und *in vivo*.^{140,141,142} Es wurde gezeigt, dass Kalzifizierungen von Rattenaorten in Kultur durch die Gabe der TNAP induziert und durch Inhibition des Enzyms verhindert werden konnten.^{141,143} Ein Mangel an PP_i und vermehrte Gefäßkalzifizierungen konnten bei Patienten mit Niereninsuffizienz festgestellt werden. Untersuchungen an Aorten von urämischen Ratten konnten zeigen, dass eine Hochregulierung der TNAP dafür verantwortlich zu sein scheint.^{140,144}

Die AP-Konzentration steigt normalerweise an, wenn sich Knochen neu bildet. Knochenbrüche, Knochentumore oder andere Erkrankungen, die einen vermehrten Knochenumsatz nach sich ziehen, sind daher die häufigsten pathologischen Ursachen für einen Anstieg der AP-Spiegel.¹⁴⁵ Eine erhöhte AP-Konzentration kann daher auch bei Krebspatienten daraufhin deuten, dass der Primärtumor in die Leber oder die Knochen gestreut hat.^{145,146}

Bisher wurde dem möglichen Einfluss der APs auf purinerge Signalwege eher weniger Beachtung geschenkt.¹⁸ Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die TNAP eine entscheidende Rolle bei der Hydrolyse von ATP, ADP und AMP zu Adenosin in NG108-15-Nervenzellen und auf der Schleimhautoberfläche von Epithelzellen des Atemtraktes spielt.^{147,148,149}

Weiterhin kann die TNAP die ATP-Konzentration regulieren und dadurch Einfluss auf den Knochenumbau nehmen.¹⁵⁰ P2-Rezeptoren werden auf Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert und durch ATP-Aktivierung kommt es zu einer schnelleren Resorption der Knochensubstanz durch Osteoklasten und einer verminderten Knochenbildung durch Osteoblasten.¹⁵⁰

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die TNAP für das Axonwachstum von Nervenzellen im Hippocampus wichtig ist. Einerseits nimmt sie dort Einfluss auf die Expression des P2X7-Rezeptors, dessen Aktivierung inhibitorisch auf das Axonwachstum

und den Reaktionsbedingungen kann entweder die Hydrolyse von $E\cdot P_i$ oder die Freisetzung des Phosphates aus $E\cdot P_i$ geschwindigkeitsbestimmend sein. Dies kann dazu führen, dass das Enzym in den Enzym- P_i -Komplexen verbleibt. In Anwesenheit von Aminoalkoholen (AOH) kann der Phosphatrest durch eine Transphosphorylierungsreaktion jedoch vorzugsweise in Form des phosphorylierten AOH von dem Enzym freigesetzt werden. Der AOH fungiert somit als zweites Substratmolekül und durch die Zugabe kann die Freisetzung des Enzyms mehr als 100-fach beschleunigt werden. Die physiologische Bedeutung des AOH und ob ein Molekül *in vivo* in der Lage ist, diese Funktion zu übernehmen, ist jedoch noch unklar.^{125,153}

1.5.2.1.2 Therapeutisches Potential

Zu therapeutischen Zwecken könnte die Gabe von TNAP oder TNAP-Aktivatoren für die Behandlung von Hypophosphatasie und Osteoporose nützlich sein.¹⁵⁴

Die bisherigen Versuche, Hypophosphatasie zu behandeln, führten jedoch zu keinen ausreichend zufriedenstellenden Ergebnissen¹³⁷ So konnte bei einer Enzyersatztherapie keine Verminderung der progressiven Osteopenie oder eine Verbesserung rachitischer Defekte festgestellt werden.^{137,155} Jedoch war in einem TNAP-Knock-out-Mausmodell die Enzyersatztherapie mit einem TNAP-Fusionsmolekül, welches eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit aufweist, erfolgreich. Die Knock-out-Mäuse wuchsen normal und zeigten keine skelettalen Erkrankungen, Zahnerkrankungen oder epileptischen Anfälle. Die Calcium-, PP_i - und Pyridoxalkonzentrationen im Plasma waren im Normbereich.¹⁵⁶ Die Enzyersatztherapie mit dem TNAP-Fusionsmolekül (Asfotase Alfa von der Firma Alexion) wird derzeit im Rahmen einer klinischen Studie an Kindern (≤ 5 Jahre) mit Hypophosphatasie getestet und zeigt vielversprechende Ergebnisse. Im Juli 2014 wurde der Zulassungsantrag angenommen und mit dem Status eines beschleunigten Prüfverfahrens durch die Europäische Arzneimittel-Agentur bedacht.^{157,158} Allerdings ist für diese Therapie eine dreimal wöchentliche bis tägliche Injektion notwendig.¹³⁷

Auf der anderen Seite könnten Inhibitoren des Enzyms für die Behandlung von arteriellen Kalzifizierungen oder Ankylose sinnvoll sein.^{126,143,153} Da aber die Funktion der TNAP in vielen Organen und Geweben noch nicht ausreichend untersucht ist, könnten potente und selektive Inhibitoren zunächst vor allem als pharmakologische Werkzeuge dienen, um die Rolle der TNAP in verschiedenen (patho)physiologischen Prozessen besser zu verstehen.¹⁵³

1.5.2.1.3 Inhibitoren der TNAP

Zu den bisher am häufigsten beschriebenen, unkompetitiven Inhibitoren der TNAP gehören *L*-Homoarginin ($K_i = 1,4 \text{ mM}$, **19**)¹²⁶, Theophyllin ($K_i = 82 \text{ }\mu\text{M}$, **20**)¹²⁶ und Levamisol ($K_i = 16 \text{ }\mu\text{M}$, **21**)¹²⁶, welches in Aktivitätsassays als Standardinhibitor eingesetzt wird (Abbildung 15).^{126,153,159,160,161} Bei Theophyllin scheint das Fehlen einer Methylgruppe in Position 7 des Xantheringerüsts für die inhibitorische Aktivität essentiell. Andere Methylxanthine wie Coffein oder Pentoxifyllin zeigten eine deutlich schwächere Inhibition an der Alkalischen Phosphatase aus Ebersamenflüssigkeit.¹⁶²

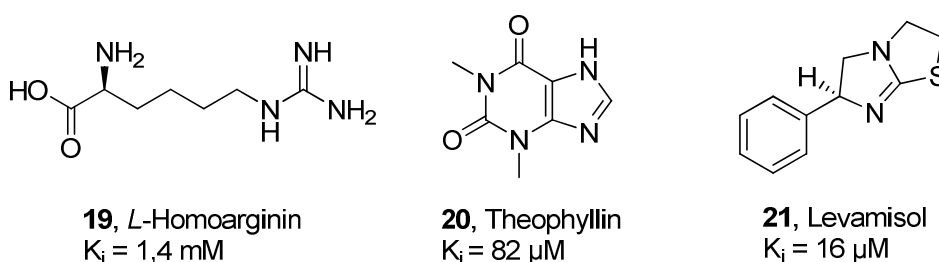


Abbildung 15: Strukturen von *L*-Homoarginin (**19**), Theophyllin (**20**) und Levamisol (**21**)

L-Homoarginin, Theophyllin und Levamisol sind allerdings weder sehr potent noch spezifisch für die humane TNAP.¹⁵³ Als weitere Inhibitoren von APs konnten einige Thiophen-3-yl-imidazo[2,1-*b*]thiazol-Derivate identifiziert werden, wobei für die potenteste Verbindung (**22**) ein IC_{50} -Wert von $42 \text{ }\mu\text{M}$ beschrieben wurde (Abbildung 16).¹⁶³ Strukturell ähnliche Benzo[*b*]thiophen-Derivate wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften gegenüber der TNAP untersucht und Benzothiophentetramisol (**23**) und Benzothiophen-2,3-dehydrotetramisol (**24**) konnten als potenteste Verbindungen der Serie mit entsprechenden K_i -Werte von $85 \text{ }\mu\text{M}$ bzw. $135 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt werden (Abbildung 16).¹⁶⁴

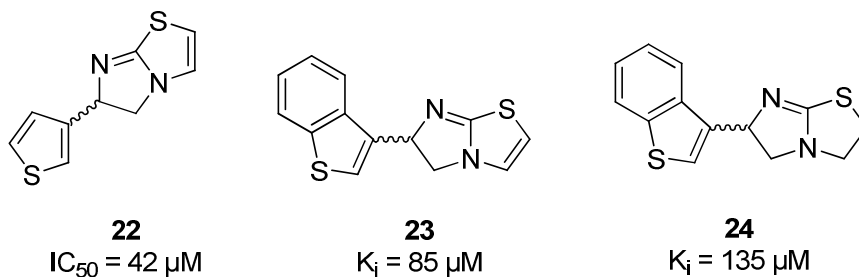


Abbildung 16: Strukturen der Imidazo[2,1-*b*]thiazol-Derivate **22**, **23** und **24**

Narisawa *et al.*¹⁴³ führten ein High-throughput Screening (HTS) mit *para*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) als artifizielles Substrat durch (~53000 Testsubstanzen) und identifizierten drei unkompetitive Inhibitoren mit K_i -Werten im niedrig mikromolaren Bereich (**25**, 5,6 μM ; **26**, 5,6 μM ; **27**, 6,5 μM ; Abbildung 17).¹⁴³ Durch weitere Optimierung konnte als potenteste Verbindung ein 2,3,4-Trichlorpyrazol-Derivat (**28**) mit einem IC_{50} -Wert von 5 nM erhalten werden, das als erster TNAP-Inhibitor einen kompetitiven Hemmmechanismus aufweist (Abbildung 17).^{102,165}

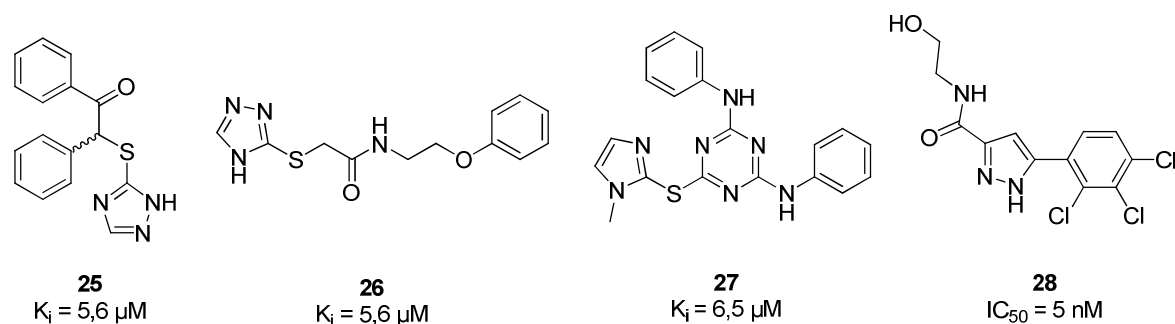


Abbildung 17: Strukturen der TNAP-Inhibitoren **25**, **26**, **27** und **28**

Durch ein weiteres HTS (~64000 Testsubstanzen) von Sergienko *et al.*¹⁵³ unter Verwendung eines neu entwickelten Lumineszenzassays mit CDP-Star als Substrat¹³⁴ konnten 53 Verbindungen als TNAP-Inhibitoren identifiziert werden. Weiterhin wurden die Struktur-Wirkungs-Beziehungen in dieser Studie näher untersucht. Alle potenten Verbindungen enthielten als Grundgerüst ein Biarylsulfonamid, einen substituierten Pyrazolring oder einen Triazolring. Weitere Biarylsulfonamide wurden daraufhin von Dahl *et al.*¹⁶⁶ untersucht. Demnach scheinen eine Alkoxy-Seitenkette an einem Benzenring und ein Pyridin- oder Chinolin-Ring essentiell für die inhibitorische Aktivität zu sein. Für die potenteste Verbindung (**29**) wurde ein IC_{50} -Wert von 0,19 μM beschrieben (Abbildung 18).^{153,166} Für die Pyrazol-Derivate konnte gezeigt werden, dass eine unsubstituierte Position 4 das inhibitorische Potential erhöht, wobei die Testverbindung **30** hierbei als potentestes Derivat mit einem IC_{50} -Wert von 0,98 μM identifiziert wurde (Abbildung 18). Bei den als Inhibitoren gefundenen Triazolen handelt es sich um Thiophenyltriazole und ein Succinimidyltriazol (**31**), welches mit einem IC_{50} -Wert von 0,24 μM die stärkste Inhibition zeigte (Abbildung 18).¹⁵³

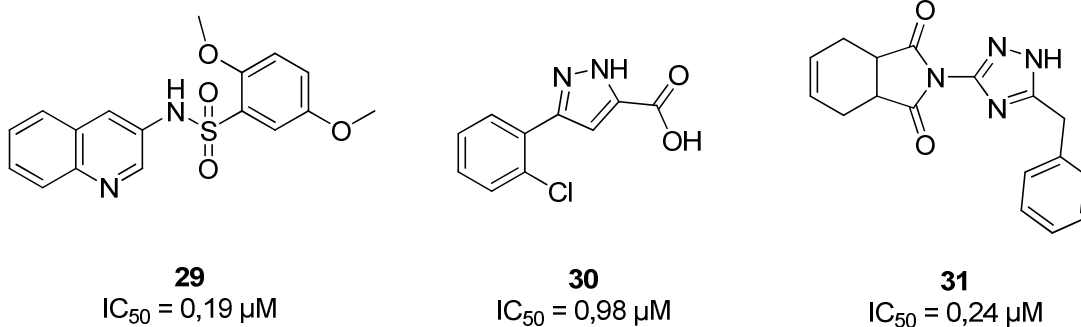


Abbildung 18: Strukturen der TNAP-Inhibitoren **29**, **30** und **31**

Kürzlich wurden auch einige POMs hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber der TNAP untersucht und zeigten vielversprechende Ergebnisse mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich.¹⁴⁵ Die potenteste Verbindung war dabei $Na_{33}[H_7P_8W_{48}O_{184}] \cdot 92 H_2O$ mit einem K_i -Wert von 135 nM.¹⁴⁵

1.6 Aktivitätsbestimmungen von NTPDasen und APs

Für die Identifizierung neuer, selektiver Inhibitoren von NTPDasen und APs sind Assays zur Aktivitätsbestimmung notwendig. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden werden ausführlich in Kapitel 4.4 diskutiert und bewertet.

Die im Folgenden aufgeführten Testmethoden ermöglichen die Verwendung der natürlichen Substrate ATP und/oder ADP für die Aktivitätsbestimmung der NTPDasen.

Der Malachitgrün-Assay beruht auf einer kolorimetrischen Bestimmung, die die Detektion des bei der Enzymreaktion freigesetzten Phosphats und dessen Quantifizierung ermöglicht.^{167,168} Durch Zugabe von Molybdat und Malachitgrün im Sauren kann die entstandene Phosphatmenge durch eine Absorptionmessung bei ~620 nm bestimmt werden.^{169,170} Ansteigende Enzymaktivität führt zu einer vermehrten Phosphatproduktion und somit zu einem höheren Absorptionssignal. Der Malachitgrün-Assay gehört zu den am häufigsten verwendeten Assays zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleidasen und wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Er wurde auf ein Robotersystem übertragen und validiert, um eine HTS-Kampagne zu ermöglichen (siehe Kapitel 4.1.1).

In den letzten Jahren ist die Kapillarelektrophorese (CE) als vielseitig einsetzbare Technik für Enzymassays beschrieben und verwendet worden.¹⁷¹ Durch die elektrophoretische Trennung der geladenen Substrate und Produkte und anschließende Quantifizierung über die gemessenen Peakflächen lassen sich z. B. Dephosphorylierungsreaktionen beobachten.¹⁰⁶ CE-Methoden wurden daher schon erfolgreich für die

Aktivitätsbestimmungen von verschiedenen Nucleosid- und Nucleotid-metabolisierenden Enzymen wie z.B. der Thymidinkinase¹⁷², der Adenosinkinase¹⁷³, der eN¹⁷⁴ und der E-NPP¹⁷⁵ eingesetzt. Auch die kinetische Charakterisierung von NTPDasen sowie die Bestimmung von K_i -Werten mittels CE-Assays wurde bereits beschrieben.^{90,106,176} In der vorliegenden Arbeit wurde eine CE-Methode entwickelt, welche die Identifizierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren der bakteriellen Lp1NTPDase ermöglicht (siehe Kapitel 4.2.1).

Auch radioaktive Assays, bei welchen Substrat und Produkt radioaktiv markiert sind, werden für die Aktivitätsbestimmung der NTPDasen eingesetzt. Nach der Enzymreaktion werden Substrat und Produkt mittels Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt und der Umsatz quantifiziert.^{177,178,179,180}

Des Weiteren kann der Verbrauch des Substrates ATP mithilfe eines Luciferase-Assays bestimmt werden. Bisher wurde diese Methode häufig verwendet, um die Enzymaktivität von Kinasen zu ermitteln.¹⁸¹

Eine Enzym-gekoppelte fluoreszenzbasierte Methode zur Quantifizierung der bei der Enzymreaktion entstandenen Phosphatmenge mithilfe der Meerrettichperoxidase und Amplex[®] Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) könnte ebenfalls zur Bestimmung der NTPDase-Aktivität genutzt werden.^{182,183}

Kürzlich wurde ein neuer Assay zur Bestimmung der NTPDase-Aktivität auf Grundlage der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) beschrieben.⁸⁷ Bei der ITC wird die Wärmefreisetzung während der enzymatischen Katalyse (Spaltung von ATP und ADP) gemessen.⁸⁷

Eine neue auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen beruhende Methode zur Aktivitätsbestimmung der NTPDasen unter Verwendung der natürlichen Substrate ATP oder ADP wurde in der vorliegenden Arbeit entwickelt (siehe Kapitel 4.1.2) und ermöglicht HTS im 384-Loch Format. Die Methode wird ausführlicher in Kapitel 1.7.1 vorgestellt.

Für die Aktivitätsbestimmung der APs werden häufig Assays verwendet, in denen artifizielle Substrate eingesetzt werden. So wird in der klinischen Praxis üblicherweise ein Assay genutzt, bei dem *para*-Nitrophenylphosphat als Substrat verwendet wird. Zusätzlich dient ein Aminoalkohol enthaltender Puffer (z.B. 2-Amino-2-methyl-1-propanol und Diethanolamin (DEA)) als Phosphat-Akzeptor-Substrat in der Transphosphorylierungsreaktion.¹⁸⁴ Nach Dephosphorylierung kann die Menge an entstandenem Produkt durch eine Absorptionmessung bei 405 nm quantifiziert werden.¹³⁴

Darüber hinaus wurde kürzlich ein Aktivitätsassay basierend auf dem Einsatz von CDP-Star als ultra-sensitives Chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan-Chemilumineszenz-Substrat beschrieben.^{134,153} Dieser Assay wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit etabliert und validiert, um neue Inhibitoren der TNAP zu identifizieren (siehe Kapitel 4.3.1).

1.7 Fluoreszenzpolarisation

Die Theorie der Fluoreszenzpolarisation (FP) wurde zum ersten Mal 1926 von Perrin¹⁸⁵ beschrieben.¹⁸⁶ Wenn ein Fluorophor durch polarisiertes Licht angeregt wird, emittiert es das Licht wieder in der gleichen Polarisationssebene, vorausgesetzt es bewegt sich während der Anregungszustandes nicht. Rotiert das Molekül jedoch, wird es Licht in einer anderen Polarisationssebene emittieren.¹⁸⁶ Die Rotationsrelaxationszeit (die Zeit, die für die Rotation um 68,5° nötig ist) hängt von der Viskosität des Lösungsmittels, der Temperatur, dem Molekulargewicht des Moleküls und der Gaskonstante ab. Hält man Temperatur und Viskosität des Lösungsmittels konstant, ist die FP demnach direkt proportional zur Molmasse.^{186,187} Wird vertikal polarisiertes Licht zu Anregung verwendet, kann die Intensität des emittierten Lichts in vertikaler (I_{vertikal}) und horizontaler ($I_{\text{horizontal}}$) Polarisationssebene gemessen werden und die resultierenden Polarisationswerte (P), die häufig in Millipolarisationswerten (mP) ausgedrückt werden, können mit nachfolgender Gleichung berechnet werden:¹⁸⁸

Gleichung 6:

$$P = \frac{I_{\text{vertikal}} - I_{\text{horizontal}}}{I_{\text{vertikal}} + I_{\text{horizontal}}}$$

Kleine Moleküle rotieren schneller, sodass das emittierte Licht depolarisiert ist im Vergleich zu der Anregungsebene (kleine mP-Werte). Ist ein Molekül hingegen groß, rotiert es langsamer während des angeregten Zustandes, sodass das emittierte Licht polarisiert bleibt (große mP-Werte) (Abbildung 19).^{186,187}

Auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen basierende Methoden ermöglichen die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen wie DNA-Protein-, Protein-Protein-, oder Antikörper-Antigen-Bindungen sowie die kinetische Analyse von Assoziations- und Dissoziationsreaktionen. Eine Trennung des gebundenen und freien fluoreszenzmarkierten Liganden ist nicht notwendig, so dass eine direkte Messung in Lösung möglich wird. FP-Assays sind somit schnell, einfach und präzise durchführbar.¹⁸⁹ So sind unter anderem Rezeptorbindungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Liganden denkbar, die Radioligand-Bindungsstudien ersetzen könnten. Die Umstellung von radioaktiven Assays auf fluoreszenzbasierte Methoden ist vorteilhaft bedenkt man die

Kosten, das Anfallen des zu entsorgendem radioaktiven Abfalls oder die Strahlenexposition der Mitarbeiter. Von Kecskés *et al.*¹⁹⁰ wurde z.B. kürzlich ein Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-FP-Assay etabliert, bei welchem der sonst im Radioassay verwendete Radioligand durch einen fluoreszenzmarkierten Antagonisten des Rezeptors ersetzt werden konnte.¹⁹⁰

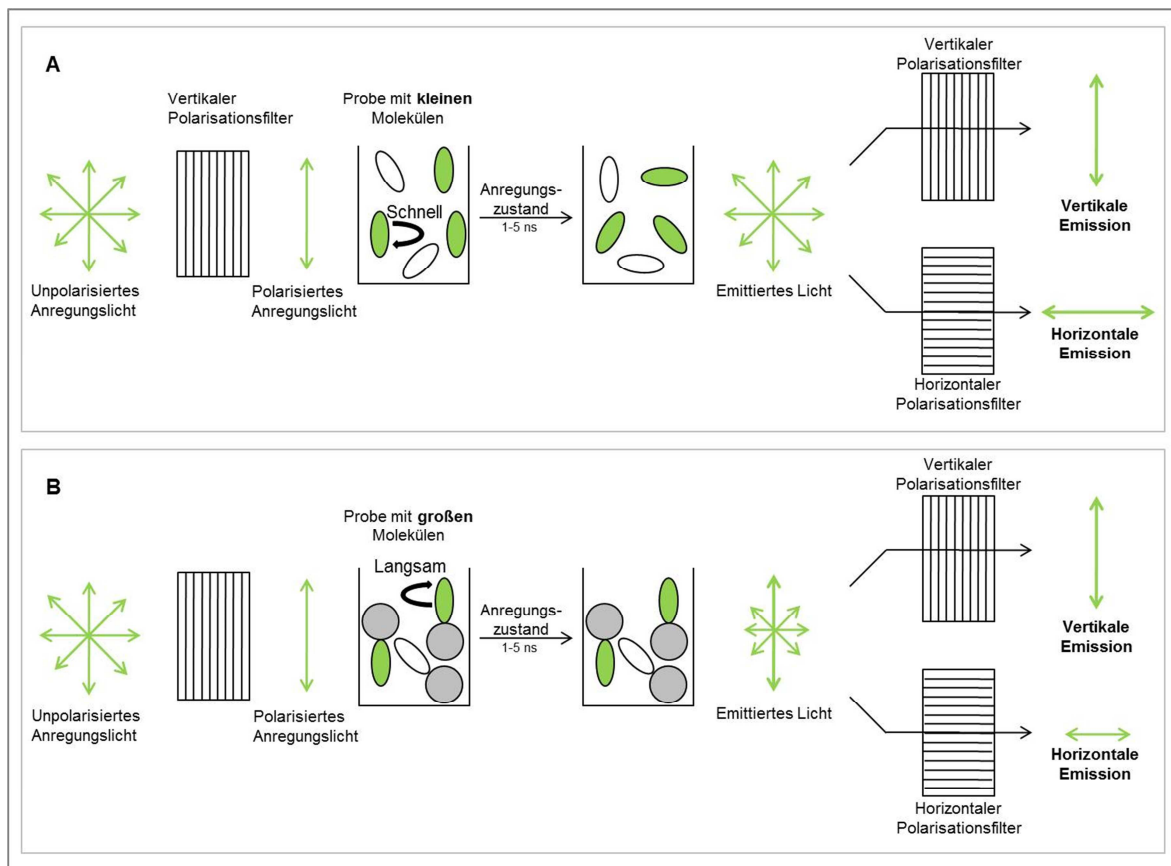


Abbildung 19: Prinzip der Fluoreszenzpolarisation. Werden fluoreszierende Moleküle mit polarisiertem Licht bestrahlt, absorbieren die Moleküle in der gleichen Polarisationsebene das Licht, werden angeregt und emittieren das Licht anschließend wieder. Die Intensität des emittierten Lichtes kann in vertikaler und horizontaler Ebene zu der Anregungsebene gemessen werden. (A) Kleine Moleküle rotieren schnell während des Anregungszustandes, sodass das emittierte Licht depolarisiert ist in Bezug auf die Anregungsebene (Messung kleiner mP-Werte). (B) Große Moleküle rotieren langsam während des Anregungszustandes und das emittierte Licht bleibt stärker polarisiert (Messung großer mP-Werte).

1.7.1 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA)

Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIAs) sind ähnlich zu anderen kompetitiven FP-Assays. Sie beruhen auf der Konkurrenz eines mit einem Fluorophor markierten Moleküls und dem freien (nicht markierten) Molekül um die Bindung an einen Antikörper (Abbildung 20).

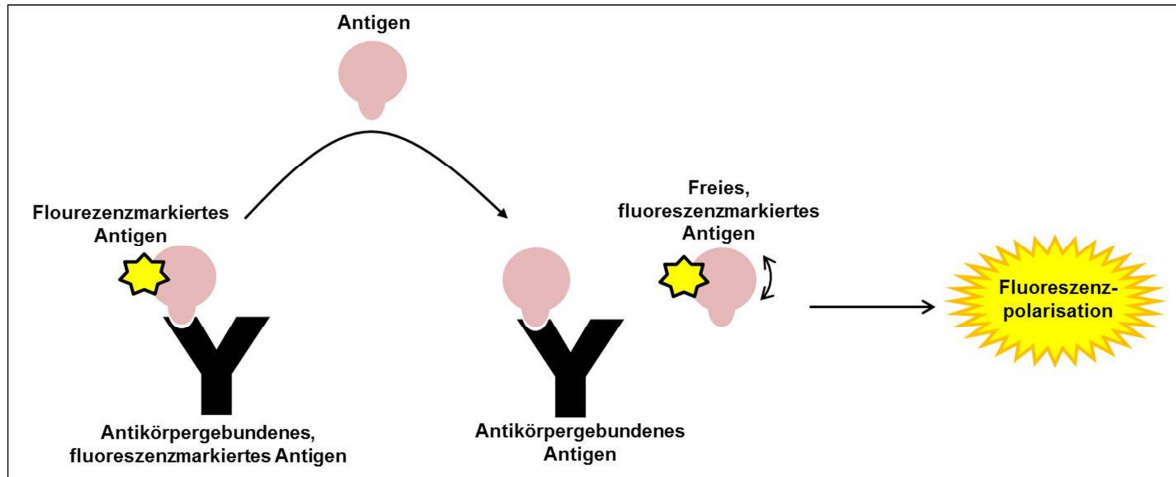


Abbildung 20: Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays. Die Bindung des Antikörpers an das fluoreszenzmarkierte Antigen führt zur Messung großer Fluoreszenzpolarisationswerte (großes Molekül = langsame Rotation). Durch Zugabe des nicht-markierten Antigens wird das fluoreszenzmarkierte Antigen kompetitiv verdrängt und es kommt zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte (kleines Molekül = schnelle Rotation).

Die Konzentrationen von Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Antigen wird so gewählt, dass die Mehrzahl der Antigene zunächst gebunden vorliegt (Messung großer mP-Werte). Durch ansteigende Konzentrationen des nicht markierten Antigens wird das markierte Antigen kompetitiv von dem Antikörper verdrängt, liegt frei vor und es kommt so zu einer Erniedrigung der gemessenen Polarisationswerte (kleines Molekül).¹⁸⁶ Die Sensitivität eines FPIA hängt hauptsächlich von der Affinität von Antikörper zu Antigen, der Sensitivität des Messinstrumentes und der Differenz der Polarisationswerte zwischen freier und gebundener Form (Molekülgröße) des markierten Antigens ab.¹⁸⁹

Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für die Aktivitätsbestimmung der NTPDasen etabliert (vergleiche Kapitel 4.1.2), wobei sehr sensitive und hoch selektive Antikörper gegen das bei der Enzymreaktion entstehende ADP oder AMP (= Antigen) eingesetzt wurden.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	CP225D	Sartorius
Autoklav	Dampfsterilisator VX-95	Systec
Cytomat Hotel		Thermo Scientific
Digital-pH-Meter	pH 197	WTW
Eismaschine		Ziegra
Gefrierschrank -20°C		Bosch
Gefrierschrank -80°C	Ultra Low Temperature Freezer V570 Premium	New Brunswick Scientific
Heizblock	Thermomixer comfort Thermomixer HBT 130	Eppendorf HLC
Inkubatoren Roboteranlage		Inheco
Kapillarelektrophorese	P/ACE MDQ	Beckman Coulter
Kühlschrank		Bosch
Mikroplatten-Messgeräte	Mithras LB 940 PheraStar FS	Berthold Technologies BMG Labtech GmbH
Mikroplattenschüttler		VWR
Pipetten	0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20- 200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettierroboter	Biomek NX ^P	Beckman Coulter
Ultraschallbad	Sonorex RK52	Bandelin
Vortexer	VV3	VWR
Waage	BP2215	Sartorius

2.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
ADP	Acros Organics
ADP, 5 mM (gereinigt)	BellBrook Labs
ADP Alexa633 Tracer, 400 nM	BellBrook Labs
ADP ² Antikörper, 3 mg/ml	BellBrook Labs
Ammoniummolybdat	Fluka
AMP	Sigma-Aldrich
AMP, 5 mM (gereinigt)	BellBrook Labs
AMP ² /GMP ² Alexa633 Tracer, 800 nM	BellBrook Labs
AMP ² /GMP ² Antikörper, 1,2 mg/ml	BellBrook Labs
ATP, 5 mM (gereinigt)	BellBrook Labs
ATP, 100 mM (gereinigt)	Sigma-Aldrich
Brij [®] L23	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka
<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure	Sigma-Aldrich
CDP-Star, 25 mM	New England BioLabs
Diethanolamin	Sigma-Aldrich
Dispenserspitzen Ritips [®] professional 1.0 ml, 2,5 ml	Labomedic
EDTA-Na	Roth
Fused Silica Kapillarsäule mit Polyacrylamid-Belegung (Innendurchmesser: 75 µm, Außendurchmesser: 360 µm, Länge: 30 cm)	CS-Chromatographie Service GmbH
HEPES	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Malachitgrün	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Sigma

2 Material

Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatte, 96-Loch, v-bottom, clear	Corning
Mikrotiterplatte, 96-Loch, F96, white	Thermo Electron LED GmbH
Mikrotiterplatte, 96-Loch, half-area, flat-bottom, clear	Greiner Bio-one
Mikrotiterplatte, 384-Loch, small volume, HiBase, non-binding, black	Greiner Bio-one
Multipette Plus	Eppendorf
Natriumchlorid	Roth
Phosphatstammlösung in Wasser (800 µM)	Enzo Life Science
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen Roboter P250	Beckman Coulter
Plastikwannen	VWR
Polyvinylalkohol 98%	Acros Organics
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2,0 ml	Sarstedt
Ritips professional (0,5 ml und 1 ml)	ritter
Rundlochplatten, 96-Loch, U-PP	Eppendorf
Schwefelsäure 95-97%	Merck
Tris-HCl	AppliChem
UMP	Roth
Wägeschalen	Roth
Zinkchlorid	Fluka

2.3 Puffer

Alle verwendeten Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Name	Zusammensetzung
Lp1NTPDase-Assaypuffer	2 mM MgCl ₂ 30 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Name	Zusammensetzung
CE-Laufpuffer	50 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,5)
DEA-Puffer (hoch konzentriert)	2,5 mM MgCl ₂ 50 µM ZnCl ₂ 2,5 M DEA (pH 9,8)
FP-Detektionspuffer (10x)	400 mM EDTA 0,2 % Brij [®] L23 200 mM HEPES (pH 7,5)
No-DEA-Puffer	2,5 mM MgCl ₂ 50 µM ZnCl ₂ 62,5 mM CAPS (pH 9,8)
NTPDase-Assaypuffer	5 mM CaCl ₂ 80 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TNAP-Assaypuffer	2,5 mM MgCl ₂ 50 µM ZnCl ₂ 125 mM DEA (pH 9,8)
TNAP-Verdünnungspuffer	1 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 20 µM ZnCl ₂ 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Rekombinante, humane Alkalische Phosphatase/ALPL; 0,4 mg/ml, 25 µl Gesamtmenge	R & D Systems GmbH, Borsigstr. 7, 65205 Wiesbaden, Deutschland
Bakterielle Lp1NTPDase; 0,170 mg/ml gelöst in 25 mM Tris-HCl (pH 8) und 100 mM NaCl-Lösung	Prof. Dr. E. Hartland, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia, 3010
Rekombinante, humane NTPDase1; 4,24 mg/ml (Membranpräparation)	Prof. Dr. J. Sévigny, Centre de Recherche du CHU de Québec und Université Laval, 2705 Laurier Blvd., Québec, QC, Canada G1V 4G2

Enzym	Hersteller
Rekombinante, humane NTPDase2; 4,13 mg/ml (Membranpräparation)	Prof. Dr. J. Sévigny, Centre de Recherche du CHU de Québec und Université Laval, 2705 Laurier Blvd., Québec, QC, Canada G1V 4G2
Rekombinante, humane NTPDase3; 10,75 mg/ml (Membranpräparation)	Prof. Dr. J. Sévigny, Centre de Recherche du CHU de Québec und Université Laval, 2705 Laurier Blvd., Québec, QC, Canada G1V 4G2
Rekombinante, humane NTPDase8; 10,30 mg/ml (Membranpräparation)	Prof. Dr. J. Sévigny, Centre de Recherche du CHU de Québec und Université Laval, 2705 Laurier Blvd., Québec, QC, Canada G1V 4G2

2.5 Testverbindungen und Substanzbibliotheken

Testverbindung/ Substanzbibliothek	Hersteller
Anthrachinon-Derivate	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Arzneistoff-Bibliothek	Interne Substanzbibliothek (http://mueller-group.pharma.uni-bonn.de/bibliothek)
CB-3GA	Sigma-Aldrich
Chembridge-Bibliothek	Aus dem AK Prof. Dr. Herdewjin, Universität Leuven
ChemDiv-Bibliothek	Aus dem AK Prof. Dr. Herdewjin, Universität Leuven
Herdewjin-Bibliothek	Interne Substanzbibliothek aus dem AK Prof. Dr. Herdewjin, Universität Leuven
Interbioscreen Bibliothek	Aus dem AK Prof. Dr. Herdewjin, Universität Leuven
Levamisol-HCl	AppliChem
Naturstoffextrakte	Aus dem AK Prof. Dr. König, Universität Bonn
Phenylbenzamidophenyl- sulfonamide	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Phenylbenzamidophenylsulfonate	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Phosphonsäure-Derivate	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Kurz, Universität Düsseldorf
Polyoxometalate	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Kortz, Universität Bremen und Dr. Stephan,

	Forschungszentrum Dresden-Rossendorf
RB-2	Sigma-Aldrich
RB-4	Sigma-Aldrich
Sulfonamide	Synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Tocriscreen Mini-Substanzbibliothek	Tocris
Xanthin-Bibliothek	Interne Substanzbibliothek (http://mueller-group.pharma.uni-bonn.de/bibliothek)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen aus einer internen Substanzbibliothek (<http://mueller-group.pharma.uni-bonn.de/bibliothek>) oder wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

2.6 Hergestellte Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser und/oder den entsprechend hergestellten Puffern angesetzt und bei 4°C gelagert.

2.6.1 Substratlösungen

Für den Malachitgrün-Assay und die FP-Assays wurden die Verdünnungen der Substratlösungen aus den gereinigten, kommerziell erworbenen Nucleotid-Stammlösungen in den benötigten Konzentrationen vor jedem Versuch frisch hergestellt (in dem entsprechenden Assaypuffer). Für den CE-Assay wurden die gewünschten Verdünnungen aus einer selbst hergestellten 10 mM Stammlösung (in Wasser) und für den CDP-Star-Assay aus der 25 mM CDP-Star-Stammlösung (in Wasser) hergestellt.

2.6.2 Enzymverdünnungen

Die benötigten Enzymverdünnungen wurden vor jedem Versuch frisch in dem entsprechenden Assaypuffer hergestellt. Für die TNAP-Verdünnungen wurden zusätzlich noch Zwischenverdünnungen in TNAP-Verdünnungspuffer hergestellt und diese weiter eingesetzt.

2.6.3 Detektionsreagenz I für den Malachitgrün-Assay

Für das Detektionsreagenz I (Malachitgrünlösung) wurden 100 ml Wasser auf 90°C erhitzt und 0,357 g Polyvinylalkohol gelöst. Anschließend wurden 35,2 mg Malachitgrün (0,76 mM) zugegeben.

2.6.4 Detektionsreagenz II für den Malachitgrün-Assay

Für das Detektionsreagenz II (Ammoniummolybdatlösung) wurden 3,46 g Ammoniummolybdat (28 mM) in 100 ml H₂SO₄ (2,1 M) gelöst.

2.6.5 Detektionsreagenz für den ADP-FP-Assay

Bestandteil	Konzentration
ADP Tracer	4 nM (1:100-Verdünnung)
ADP-Antikörper	23 µg/ml (optimierte Menge)
Detektionspuffer (10x)	1:10

2.6.6 Detektionsreagenz für den AMP-FP-Assay

Bestandteil	Konzentration
AMP ² /GMP ² Tracer	8 nM (1:100-Verdünnung)
AMP-Antikörper	8 µg/ml (optimierte Menge)
Detektionspuffer (10x)	1:10

2.6.7 Software

Software	Firma
32-Karat 5.0	Beckman Coulter
Biomek [®]	Beckman Coulter
ChemBioDraw Ultra 11.0	CambridgeSoft
Excel 2007	Microsoft [®]
Prism [®] 4.0	GraphPad

SAMI® Workstation EX Software 4.0

Beckman Coulter

Word 2010

Microsoft®

3 Methoden

3.1 Aktivitätsbestimmungen der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8

3.1.1 Malachitgrün-Assay

Bei dem Malachitgrün-Assay handelt es sich um einen auf dem Nachweis von Phosphat basierenden kolorimetrischen Assay.^{167,168} Aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Handhabung wird er häufig als Assay zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen verwendet. Die wichtigsten Bestandteile der Detektionsreagenzien sind Ammoniummolybdat, Malachitgrün und Schwefelsäure. In Anwesenheit von Phosphat bilden sich im Säuren mit Molybdat anionische Phosphormolybdat-Komplexe aus (Gleichung 7).¹⁷⁰

Gleichung 7:



Malachitgrün ist ein kationischer Triphenylmethanfarbstoff mit einem pK_a -Wert von 1,2 (Abbildung 21).¹⁷⁰

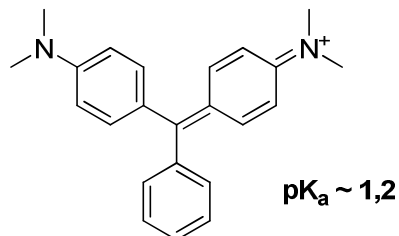


Abbildung 21: Struktur von Malachitgrün (deprotonierte Form)

Bei einem pH-Wert > 2 ist ein Großteil der Malachitgrünmoleküle deprotoniert mit einem Absorptionsmaximum von $\sim 623 \text{ nm}$ (blau-grüne Lösung).¹⁶⁹ Bei einem pH-Wert < 2 hingegen liegt Malachitgrün protoniert vor und die Lösung ist hellgelb. Da der Assay im Säuren durchgeführt wird, liegt der Großteil der Malachitgrünmoleküle somit in protonierter Form vor. Jedoch nur die deprotonierte Form kann an den anionischen Phosphormolybdat-Komplex binden, wodurch sie dem Gleichgewicht entzogen wird und die Lösung sich zunehmend blau-grün verfärbt. Zusammenfassend heißt das, dass sich

bei steigender Enzymaktivität die Menge an freigesetztem Phosphatmolekülen erhöht und somit die gemessene Farbintensität ansteigt.^{167,168,170}

3.1.1.1 Allgemeine Durchführung

Die Enzymreaktionen wurden direkt in der 96-Loch-Platte („half-area“, klar) mit einem Endvolumen von 50 μl pro Vertiefung durchgeführt. Die Substrat- und DMSO-Endkonzentrationen waren 100 μM ATP für die NTPDase2, -3 und -8 und 50 μM ATP für die NTPDase1 und 2 % DMSO. Der allgemeine Versuchsablauf zur Durchführung des Malachitgrün-Assays ist in Abbildung 22 dargestellt.

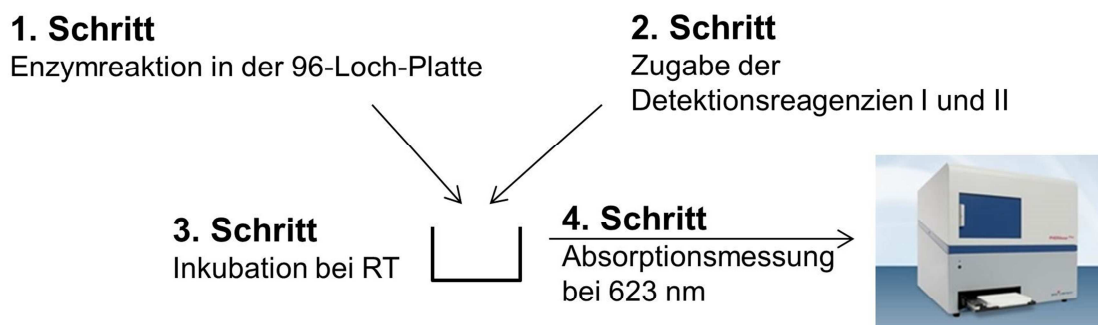


Abbildung 22: Schematischer Versuchsablauf des Malachitgrün-Assays

In einem ersten Schritt wurden 10 μl einer 10%igen DMSO- oder Testlösung (in 10 % DMSO) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte vorgelegt, 20 μl ATP (250 μM oder 125 μM) hinzugefügt und die Enzymreaktion durch die Zugabe von 20 μl der entsprechend benötigten Enzymsuspension (humane NTPDase1, -2, -3 oder -8) gestartet. Für die Positivkontrollen wurde denaturierte Enzymsuspension (Erhitzen bei 99 $^{\circ}\text{C}$ für 15 min) zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation der Platte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ auf einem Plattenschüttler wurde die Enzymreaktion beendet und die Bildung des zu detektierenden Farbkomplexes gestartet. Hierzu wurden 12,8 μl des Detektionsreagenzes I und 17,2 μl des Detektionsreagenzes II in jede Vertiefung gegeben. Nach Inkubation der Platte für 20 min bei RT wurden die Absorptionswerte (OD = Optische Dichte) mithilfe eines Mikroplatten-Messgerätes (PheraStar FS) bei einer Wellenlänge von 623 nm gemessen.

Die Detektionslösungen wurden wie von Cogan *et al.*¹⁷⁰ beschrieben hergestellt und die im Assay eingesetzten Mengen dem in dieser Arbeit verwendeten Endvolumen (50 μl) angepasst.

3.1.1.2 Kalibriergerade

Es wurde eine Kalibriergerade für Phosphat erstellt, indem jeweils 50 µl verschieden konzentrierte Phosphatlösungen (0 µM bis 50 µM) eingesetzt wurden, wobei die Verdünnungsreihe aus einer kommerziell erworbenen 800 µM Phosphatstammlösung hergestellt wurde. Die Assayplatte wurde entsprechend Kapitel 3.1.1.1 behandelt. Die detektierten Absorptionswerte wurden grafisch gegen die Phosphatkonzentrationen aufgetragen und mithilfe von GraphPad Prism 4.0 eine lineare Regression durchgeführt.

3.1.1.3 K_M -Wert-Bestimmungen für die Substrate ADP und ATP

Zur Bestimmung der K_M -Werte für ATP (humane NTPDase1, -2, -3 und -8) und ADP (humane NTPDase1, -3 und -8) wurden ansteigende Substratkonzentrationen eingesetzt (je nach Enzym-Subtyp von 0 bis 2000 µM Endkonzentration pro Vertiefung). Es wurden drei unabhängige Versuche wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben (Messung in Duplikaten) durchgeführt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden grafisch gegen die entsprechend eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen und mithilfe von GraphPad Prism 4.0 die K_M -Werte bestimmt.

3.1.1.4 Enzymtitrationen

Zur Bestimmung der optimalen Enzymkonzentrationen wurden Enzymtitrationen durchgeführt und die konzentrationsabhängigen Aktivitäten für jedes Enzym bestimmt. Es wurden 100 µM (humane NTPDase2, -3 und -8) oder 50 µM (humane NTPDase1) ATP eingesetzt. Für die Enzymtitrationen wurden die Enzyme in Assaypuffer verdünnt (0 ng/µl bis 18 ng/µl). Die Assays wurden wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden mithilfe der Kalibriergeraden in die Menge an gebildetem Phosphat umgerechnet und diese grafisch mithilfe von GraphPad Prism 4.0 gegen die eingesetzten Enzymkonzentrationen dargestellt.

3.1.1.5 Übertragung auf ein Robotersystem

Um HTS-Kampagnen zu ermöglichen, wurden die einzelnen Arbeitsschritte des in Abschnitt 3.1.1.1 beschriebenen Malachitgrün-Assays auf eine Pipettierroboteranlage der Firma Beckman Coulter übertragen. Dazu wurde der Roboter entsprechend programmiert und die verwendeten Reagenzien für den Ablauf einer Methode (6 - 12 Assayplatten) in 96-Loch-Platten vorgelegt (Substrat-, Enzym-, Test-, Detektionslösung I- und

Detektionslösung II-Platte). Von der Enzymsuspension wurde die entsprechend benötigte Menge in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (Spalten 1 - 11) und in vier Vertiefungen der Spalte 12 (= Negativkontrolle) pipettiert. In die weiteren vier Vertiefungen der Spalte 12 wurde die benötigte Menge denaturierte Enzymsuspension (= Positivkontrolle) gegeben. Die eingesetzten Testplatte enthielten in den Spalten 1 - 11 die zu untersuchenden Verbindungen (DMSO-Konzentration 10 %) und in der Spalte 12 eine 10%ige DMSO-Lösung.

Der Roboter wurde so programmiert, dass mit dem 96er Pipettierkopf zunächst 10 µl aus der Test-Platte und 20 µl aus der Substratplatte in die Assayplatte überführt wurden. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 20 µl aus der Enzymplatte (Kühlung bei 4 °C) gestartet und die Assayplatte 10 min bei 37°C in einem Inkubator geschüttelt. Durch Zugabe von 17,2 µl Detektionsreagenz I und 12,8 µl Detektionsreagenz II wurde die Reaktion gestoppt. Die Assayplatte wurde nach 20-minütiger Inkubationszeit bei RT am PheraStar (623 nm) vermessen.

3.1.1.6 Validierung

Die Validierung der Assays erfolgte, indem die Z'-Faktoren für jeden Enzymassay (NTPDase1, -2, -3 und -8) nach der folgenden Gleichung von Zhang *et al.*¹⁹¹ bestimmt wurden.

Gleichung 8:

$$Z' = 1 - \left| \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{\mu_+ - \mu_-} \right|$$

σ = Standardabweichung
 μ = Mittelwert
 + = Positivkontrolle
 - = Negativkontrolle

Für die Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils 16 Replikate pipettiert. Der Assay wurde wie in Kapitel 3.1.1.5 beschrieben in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt, für jedes Experiment der Z'-Faktor berechnet und der Mittelwert der Z'-Faktoren für jeden Enzymassay bestimmt.

3.1.1.7 High-throughput Screening

Aus den Feststoffen verschiedener Testverbindungen wurden 10 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt, mithilfe eines Pipettierroboters entsprechend auf 96-Loch-Platten verteilt (Mutterplatten). Zusätzlich wurden kommerziell zu erwerbende Substanzbibliotheken (96-Loch-Format, 10 mM Stammlösungen) verwendet. Die zwölfte

Spalte enthielt jeweils DMSO und konnte somit für die Positiv- und Negativkontrollen verwendet werden. Aus den Mutterplatten wurden entsprechend Tochterplatten generiert, die die Verbindungen mit einer Konzentration von 100 μM oder 10 μM (für die Anthrachinon-Bibliothek) in 10 % DMSO enthielten. Diese Tochterplatten wurden dann auf der Roboteranlage eingesetzt. Nach der Beladung des Robotersystems mit den entsprechenden Platten und Pipettenspitzen in das Cytomat Hotel wurde das HTS entsprechend Kapitel 3.1.1.5 gestartet. Nach dem Auslesen der Assayplatten am Messgerät wurde für jede Testverbindung die Inhibition in % und für jede Platte der Z'-Faktor berechnet.

3.1.1.8 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Testverbindung in 10 % DMSO hergestellt. 10 μl der entsprechenden Verdünnung wurden zusammen mit 20 μl Substratlösung (250 μM ATP oder 125 μM ATP) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Enzymsuspension gestartet und die Assays entsprechend 3.1.1.1 durchgeführt. Beim Auftragen der gemessenen Restaktivität des Enzyms gegen die Inhibitorkonzentration (logarithmische Darstellung) mithilfe von GraphPad Prism 4.0 wurde eine sigmoidale Kurve erhalten und der IC_{50} -Wert bestimmt. Die Aufnahme der Konzentrations-Inhibitions-Kurven erfolgte ohne Zuhilfenahme des Pipettierroboters.

3.1.1.9 Bestimmung des Hemmmechanismus

Für potente Testverbindungen sollte der Hemmtyp (kompetitiv, unkompetitiv oder nicht-kompetitiv) bestimmt werden. Hierzu wurden Michaelis-Menten-Kurven in Anwesenheit von unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen erstellt. Die Konzentrationen wurden im Bereich des ermittelten IC_{50} -Wertes gewählt. Mithilfe von GraphPad Prism 4.0 wurden Lineweaver-Burk- und Eadie-Hofstee-Diagramme erhalten und der Hemmmechanismus grafisch ermittelt. Die Versuche wurden wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt.

3.1.2 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays

Fluoreszenzpolarisationimmunoassays (FPIAs) beruhen auf der Konkurrenz eines mit einem Fluorophor markierten Moleküls und dem freien (nicht markierten) Molekül um die Bindung an einen Antikörper (siehe Kapitel 1.7.1). Die Firma BellBrook Labs entwickelte

zwei FPIA-Assays für den Nachweis von ADP und AMP.^{192,193} Bisher sind die Methoden für Aktivitätsbestimmungen von z. B. Kinasen, Phosphodiesterasen und Hitzeschockproteinen, bei denen ADP oder AMP als Produkte der Enzymreaktion entstehen, beschrieben.^{194,195,196}

Das Prinzip dieser Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays ist in Kapitel 1.7.1 bereits grafisch dargestellt.

Das Detektionsreagenz enthält den Tracer (mit dem Alexa Fluor 633 Farbstoff markiertes ADP oder AMP) und einen Antikörper, der spezifisch entweder ADP oder AMP bindet. In der Detektionslösung liegt der Tracer zunächst an den Antikörper gebunden vor. Dieser wird durch das bei der Enzymreaktion entstehende Nucleotidprodukt (ADP bei Einsatz von ATP als Substrat oder AMP bei Einsatz von ADP als Substrat) kompetitiv verdrängt. Der freie Tracer rotiert schneller (kleineres Molekül) als der an den Antikörper gebundene, welches zu einer Abnahme der Fluoreszenzpolarisierung und somit zu kleineren Polarisationswerten führt.^{192,193} Das bedeutet, dass bei steigender ADP- oder AMP-Produktion das Polarisationsignal abnimmt.

3.1.2.1 Allgemeine Durchführung

Die Enzymreaktionen wurden direkt in der 384-Loch-Platte („small volume“, schwarz) mit einem Endvolumen von 10 µl pro Vertiefung durchgeführt. Die Endkonzentrationen von Substrat und DMSO betragen 20 µM ATP oder 10 µM ADP und 2 % DMSO. Der allgemeine Versuchsablauf zur Durchführung der FPIA-Assays ist in Abbildung 23 dargestellt.

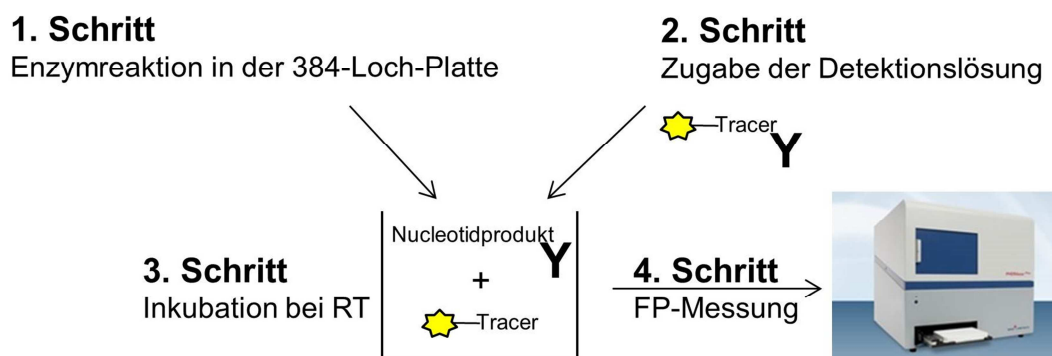


Abbildung 23: Schematischer Versuchsablauf der Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays

In einem ersten Schritt wurden 4 µl ATP (50 µM) oder ADP (25 µM) in eine Vertiefung einer 384-Loch-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl einer 10%igen DMSO- oder Test-Lösung hinzugefügt. Durch Zugabe von 4 µl der entsprechend verdünnten Enzymsuspension (humane NTPDase1, -2, -3 oder -8) wurde die Enzymreaktion gestartet und die Platte für 10 min bei 37°C geschüttelt. Zum Beenden der Enzymreaktion wurden in einem zweiten Schritt 10 µl der entsprechenden Detektionslösung in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde in einem dritten Schritt bei RT eine Stunde (ADP-Assay) oder zwei Stunden (AMP-Assay) auf einem Plattenschüttler inkubiert. In einem letzten Schritt wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte (mP) mithilfe eines Mikroplatten-Messgerätes (PheraStar FS, Anregungsfilter: 590 nm, Emissionsfilter: 675 ± 50 nm) gemessen.

3.1.2.2 Optimierung der Antikörperkonzentrationen

Zwischen der eingesetzten ATP-Substratkonzentration und der entsprechend optimalen ADP-Antikörpermenge besteht ein linearer Zusammenhang, der mit folgender Gleichung beschrieben werden kann: $y = mx + b$, wobei x der gewünschten ATP-Konzentration (µM) in dem Reaktionsansatz, y der ADP-Antikörperkonzentration (µg/ml) in der Detektionslösung, m der Steigung von 1,08 und b dem y-Achsenabschnitt von 1,0 entspricht.¹⁹² Somit ließ sich die optimale Antikörperkonzentration für die gewählte Substratkonzentration von 20 µM ATP mithilfe der Gleichung berechnen.

Für die Bestimmung der optimalen AMP-Antikörperkonzentration in dem AMP-Assay wurden zwei Antikörpertitrations durchgeföhrt. Eine Antikörpertitration wurde in Anwesenheit der Substratkonzentration von 10 µM ADP (entspricht 0% Umsatz) und eine in Anwesenheit eines 9:1 Verhältnisses von Substrat zu Produkt (9 µM ADP und 1 µM AMP) durchgeföhrt (entspricht 10 % Umsatz). Hierzu wurden zunächst zwölf Detektionsreagenzien mit Antikörperkonzentrationen zwischen 0,061 und 125 µg/ml in Kombination mit 8 nM AMP Tracer hergestellt. In eine Vertiefung einer 384-Loch-Platte wurden 10 µl Nucleotidlösung vorgelegt und anschließend 10 µl des entsprechenden Detektionsreagenz hinzugefügt (Messungen in Duplikaten). Der Assay wurde weiter entsprechend 3.1.2.1 durchgeföhrt und die gemessenen Polarisationswerte (mP) gegen den Logarithmus der entsprechenden Antikörperkonzentration mithilfe von GraphPad Prism 4.0 grafisch dargestellt (sigmoidale Dosis-Wirkungskurve). Zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration wurde schließlich die Konzentration ermittelt, bei der die maximale Differenz der Polarisationswerte (ΔmP) erhalten werden konnte.

3.1.2.3 Standardkurven

Mithilfe von Standardkurven lassen sich die Produktmengen (ADP oder AMP), die bei den Enzymreaktionen entstehen, berechnen. Um Standardkurven zu generieren, wurden sinkende Substratkonzentrationen (ATP oder ADP) und entsprechend steigende Produktkonzentrationen (ADP oder AMP) eingesetzt, wobei die Gesamtnucleotidkonzentration dabei konstant gehalten wurde. Die hergestellten Nucleotidlösungen imitierten 0%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 20%, 50% und 100% Substratumsatz. Zu 10 µl der Substrat/Produktlösung wurden 10 µl des entsprechenden Detektionsreagenz gegeben und wie in 3.1.2.1 beschrieben weiter verfahren und die gemessenen Polarisationswerte (mP) gegen den Logarithmus der entsprechenden Produktkonzentration mithilfe von GraphPad Prism 4.0 grafisch dargestellt.

3.1.2.4 Enzymtitrationen

Für die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration wurde für jedes Enzym eine Titration durchgeführt. Hierzu wurden steigende Enzymkonzentrationen in Anwesenheit von 20 µM ATP (humane NTPDase2, -3 und -8) oder 10 µM ADP (humane NTPDase1) und einer Endkonzentration von 2 % DMSO eingesetzt. Die Assays wurden entsprechend 3.1.2.1 durchgeführt, die resultierenden Polarisationswerte gemessen und die Ergebnisse grafisch mit GraphPad Prism 4.0 dargestellt (mP *versus* Logarithmus der Enzymkonzentration). Mithilfe der Standardkurven (siehe Kapitel 3.1.2.3) wurde die entstandene Produktmenge für die jeweils eingesetzte Enzymkonzentration berechnet und ebenfalls grafisch dargestellt (Produktmenge *versus* Enzymkonzentration).

3.1.2.5 Validierung

Für die Validierung der Enzymassays wurden die Z'-Faktoren bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung von Zhang *et al.*¹⁹¹ (siehe Abschnitt Kapitel 3.1.1.6). Für die Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils 16 Replikate pipettiert. Hierzu wurden für die Negativkontrollen 4 µl der entsprechenden Enzymsuspension zu 2 µl einer 10%igen DMSO-Lösung und 4 µl der entsprechenden Substratlösung in jeweils eine Vertiefung einer 384-Loch-Platte gegeben. Für die Positivkontrollen wurden die gleichen Mengen an Enzymsuspension, 10 % DMSO und Substrat in eine Vertiefung gegeben, welche schon 10 µl Detektionsreagenz enthielt, sodass die Enzymreaktion unmittelbar nach Zugabe der

Enzymsuspension gestoppt wurde. Die Assays wurden entsprechend 3.1.2.1 durchgeführt und die Z'-Faktoren berechnet.

3.1.2.6 Screening

Um in einem Screening Testverbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität bei einer Endkonzentration von 20 μM gegenüber den NTPDasen zu untersuchen, wurden 2 μl der Testlösung (100 μM in 10 % DMSO) und 4 μl der Substratlösung (50 μM ATP oder 25 μM ADP) in eine Vertiefung einer 384-Loch-Platte vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4 μl der entsprechenden Enzymsuspension gestartet und die Assays wie in 3.1.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Endkonzentration der Substrate lagen bei 20 μM ATP bzw. 10 μM ADP. Negativkontrollen enthielten 10%ige DMSO-Lösung anstatt der Testlösung und Positivkontrollen inaktivierte Enzymsuspension durch direkte Zugabe der Detektionsreagenzien zu Beginn der 37°C Inkubationsphase. Die Inhibition in % wurde für jede Testverbindung berechnet.

3.1.2.7 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die Bestimmung von IC_{50} -Werten wurden Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Testverbindung in 10 % DMSO hergestellt. 2 μl der entsprechenden Verdünnung wurden zusammen mit 4 μl Substratlösung in eine Vertiefung einer 384-Loch-Platte vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4 μl Enzymsuspension gestartet und die Assays entsprechend 3.1.2.1 durchgeführt. Beim Auftragen der gemessenen Enzymrestaktivität gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration wurde eine sigmoidale Kurve erhalten und der IC_{50} -Wert bestimmt.

3.2 Aktivitätsbestimmungen der bakteriellen Lp1NTPDase

3.2.1 Kapillarelektrophorese-Assay

Bei der CE werden geladene Teilchen durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer elektrolytgefüllten Kapillare entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilitäten getrennt. In Abbildung 24 ist der schematische Aufbau einer CE-Apparatur dargestellt.

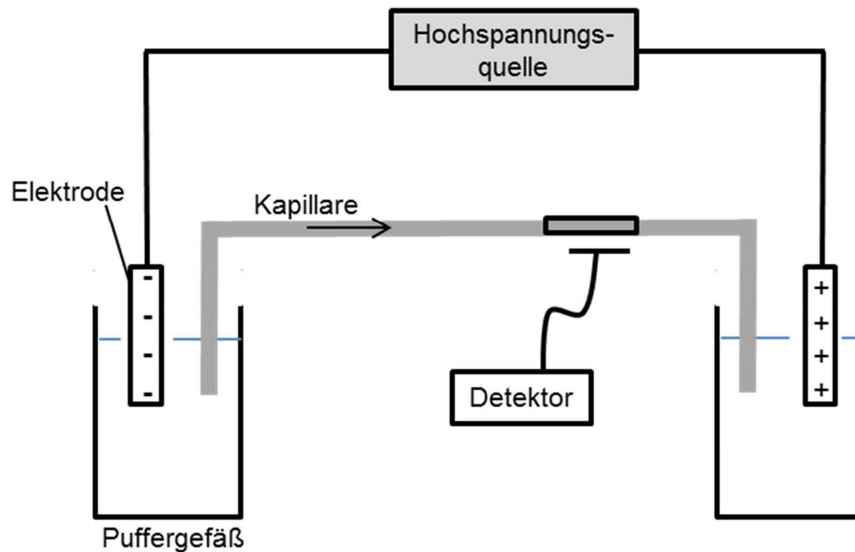


Abbildung 24: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese

Die wichtigsten Bestandteile einer Kapillarelektrophorese sind die Kapillare, zwei Elektroden, eine Hochspannungsquelle und ein Detektor. Nach Injektion der Probe werden der Kapillareinlass und der Kapillarauslass jeweils in ein Puffergefäß getaucht und ein elektrisches Feld angelegt. Die Teilchen aus der Probenlösung wandern entsprechend ihrer Ladung durch die Kapillare und können mithilfe eines Detektors nachgewiesen und anschließend quantifiziert werden. Die elektrophoretischen Mobilitäten resultieren aus den unterschiedlichen Verhältnissen von Masse zu Ladung der jeweiligen Moleküle. Je größer die Ladung und je kleiner die Masse, umso schneller wandert ein Teilchen.^{32,197}

In der in dieser Arbeit etablierten Methode wurde eine Neutralkapillare eingesetzt, sodass es nicht zu Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses kam. ADP (Substrat) und AMP (Produkt) liegen in dem Puffer als geladene Teilchen vor, wobei ADP durch die zwei negativ geladenen Phosphatreste schneller wandert und zuerst detektiert wird. Es wurde ein Diodenarraydetektor eingesetzt, der Spektren im Wellenlängenbereich von 190 bis 300 nm aufzeichnet. Die zu detektierenden Nucleotide besitzen ein Chromophor, das bei 210 nm und 260 nm absorbiert. Zur Auswertung wurde die Absorption bei 260 nm verwendet.

3.2.1.1 Allgemeine Durchführung des CE-Assays

Die Kapillare wurde vor der täglichen Verwendung 20 min mit Wasser und anschließend 5 min mit Laufpuffer bei einem Druck von 50 psi gewaschen.

Anschließend wurde der CE-Assay durchgeführt. Der allgemeine Versuchsablauf zur Durchführung ist in Abbildung 25 dargestellt.

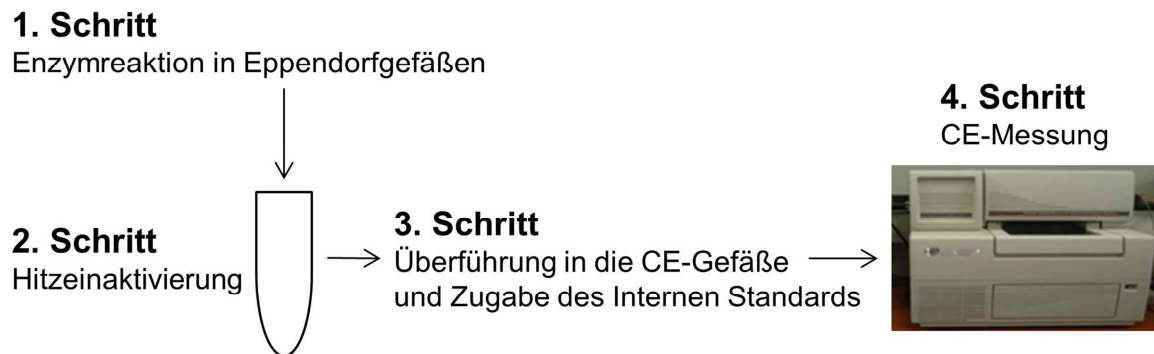


Abbildung 25: Allgemeiner Versuchsablauf zur Durchführung des CE-Assays

Die Enzymreaktion wurde in Eppendorfgläsern mit einem Endvolumen von jeweils 100 µl durchgeführt. Das Gemisch enthielt 50 µl 1 mM ADP-Lösung (Endkonzentration von 500 µM), 10 µl Testlösung (oder Assaypuffer) und 30 µl Assaypuffer. Durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung (0,85 – 1,7 ng/µl) wurde die Reaktion gestartet und die Eppendorfgläser für 10 min bei 37°C geschüttelt (1. Schritt). Die zu verwendende Enzymmenge, die zu < 20 % Substratumsatz führte, wurden an jedem Versuchstag in einem Vorversuch ermittelt. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch 5-minütige Inkubation bei 99°C gestoppt (2. Schritt). Die Probe wurde in ein CE-Gefäß überführt und 100 µl Interner Standard UMP (40 µM oder 50 µM) zugegeben (3. Schritt). In einem letzten Schritt (4. Schritt) wurden die Probengefäße in das CE-Gerät gestellt und die Messung gestartet. Für das Waschen und Konditionieren der Kapillare sowie die kapillarelektrophoretische Auftrennung wurde das in Tabelle 4 aufgeführte Programm verwendet.

Tabelle 4: Waschen und Konditionierung der Kapillare und Messung der Analytlösung

Schritt	Dauer	Lösung	Funktion	Treibkraft
1	2 min	Wasser	Spülen	50 psi
2	2 min	Laufpuffer	Konditionierung	50 psi
3	30 s	Probenlösung	Injektion der Analytlösung	-6 kV*
4	5 s	Wasser	Fokussierung der Analytlösung	0,5 psi
5	15 - 20 min	Laufpuffer	Messung der Analytlösung	-60 µA*

*„Minus-Zeichen“ für die Umpolung

Die Probenkomponenten (ADP, AMP und UMP) wurden mithilfe des Diodenarraydetektors nachgewiesen (260 nm) und die erhaltenen Peakflächen (area under the curve = AUC) mit der Analysensoftware 32 KARAT ausgewertet.

3.2.1.2 Kalibriergerade

Es wurde eine Kalibriergerade für verschiedene AMP-Konzentrationen und die korrigierten Peakflächen (auf den Internen Standard UMP bezogen) erstellt. Hierzu wurden jeweils 50 µl verschiedener AMP-Lösungen (0 µM bis 100 µM) eingesetzt und der Assay entsprechend Kapitel 3.2.1.1 durchgeführt. Die korrigierten Peakflächen wurden mithilfe von GraphPad Prism 4.0 grafisch gegen die AMP-Konzentrationen aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Mit den nachfolgenden Gleichungen wurden die Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) und die Detektionsgrenze (LOQ = limit of quantitation) bestimmt.

Gleichung 9:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \sigma}{\text{Steigung}}$$

Gleichung 10:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{Steigung}}$$

wobei σ der Standardabweichung der Regressionsgeraden entspricht.

3.2.1.3 K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat ADP

Zur Bestimmung des K_M -Wertes von ADP wurden ansteigende Substratkonzentrationen eingesetzt (0 - 3000 µM) und der Versuch wie in Kapitel 3.2.1.1 durchgeführt. Die erhaltenen, korrigierten Peakflächen wurden grafisch gegen die entsprechend eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen und der K_M - und v_{\max} -Wert mithilfe von GraphPad Prism 4.0 bestimmt.

3.2.1.4 Screening einer Anthrachinon-Bibliothek

Aus den Feststoffen der zu untersuchenden Anthrachinon-Derivate wurden 10 mM Stammlösungen in DMSO und dann 300 μ M Lösungen in Assaypuffer hergestellt (Endkonzentration der Testverbindung von 30 μ M). Der Versuch wurde entsprechend Kapitel 3.2.1.1 durchgeführt und die Inhibition in % für jede Verbindung berechnet.

3.2.1.5 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die Aufnahme von Konzentrations-Inhibitions-Kurven wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Testverbindung in Assaypuffer hergestellt. 10 μ l der entsprechenden Verdünnung wurden zusammen mit den anderen Probenkomponenten in einem Eppendorfgefäß gemischt und der Assay entsprechend Kapitel 3.2.1.1 durchgeführt. Beim Auftragen der gemessenen Restaktivität der Lp1NTPDase gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration wurde eine sigmoidale Kurve erhalten und der IC₅₀-Wert mithilfe von GraphPad Prism 4.0 bestimmt.

3.3 Aktivitätsbestimmung der Gewebe-unspezifischen Alkalischen Phosphatase (TNAP)

3.3.1 CDP-Star-Assay

Bei dem bereits von Sergienko *et al.*¹³⁴ beschriebenen Assay wird CDP-Star als ultrasensitives Chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan Chemilumineszenz-Substrat der TNAP eingesetzt (Abbildung 26).

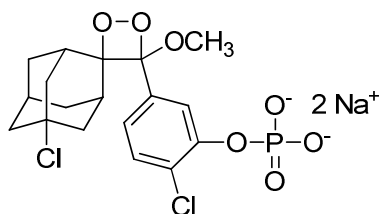


Abbildung 26: Struktur von CDP-Star

Die enzymatische Dephosphorylierung von CDP-Star führt zu der Bildung eines metastabilen Dioxetan-Phenolat-Anions. Bei dem Zerfall wird Licht (Emissionsmaximum bei 466 nm) emittiert (siehe Abbildung 27).

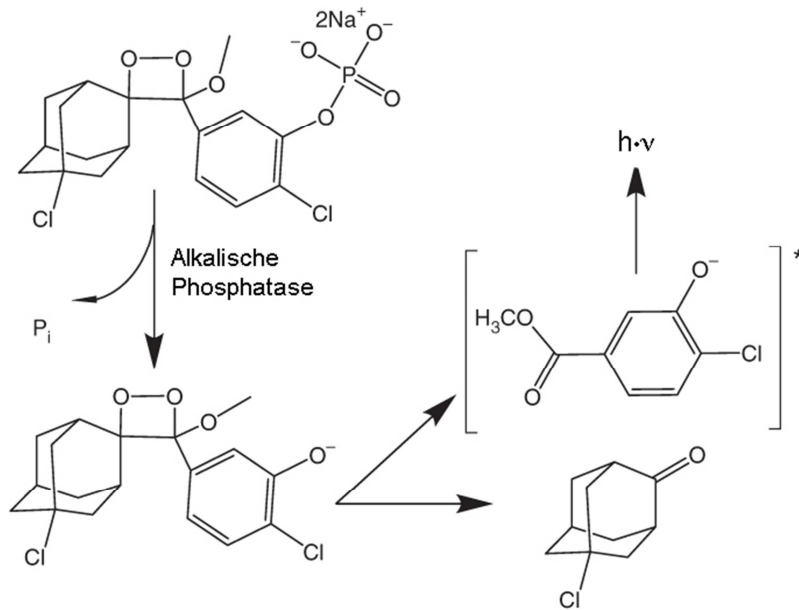


Abbildung 27:¹³⁴ Reaktionsmechanismus der Dephosphorylierung von CDP-Star durch die Alkalische Phosphatase

Die gemessene Lichtintensität, die in relativen Lumineszenzeinheiten (relative luminescence units = RLU) ausgedrückt wird, steigt proportional zu der Produktbildung und somit Enzymaktivität an. Bei der *in vitro* Reaktion der TNAP konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe eines Aminoalkohols wie Diethanolamin (DEA) beschleunigt werden kann. Dieser fungiert als Phosphatakzeptorsubstrat in einer Transphosphorylierungsreaktion (siehe Kapitel 1.5.2.1.1).^{134,153}

3.3.1.1 Allgemeine Durchführung des CDP-Star-Assays

Die Enzymreaktionen wurden direkt in der 96-Loch-Platte („flat bottom“, weiß) mit einem Endvolumen von 50 µl pro Vertiefung durchgeführt. Die Endkonzentrationen betrug 105 µM CDP-Star (= dem bestimmten K_M -Wert) und 2 % DMSO. Der allgemeine Versuchsablauf zur Durchführung des CDP-Star-Assays ist in Abbildung 28 dargestellt.

1. Schritt

Enzymreaktion in der 96-Loch-Platte



Abbildung 28: Schematischer Versuchsablauf des CDP-Star-Assays

In einem ersten Schritt wurden 10 μl einer 10%igen DMSO- oder Testlösung (in 10 % DMSO) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte vorgelegt, 20 μl CDP-Star-Lösung (263 μM) hinzugefügt und die Enzymreaktion durch die Zugabe von 20 μl der entsprechend benötigten TNAP-Verdünnung (je nach Enzymcharge zwischen 0,025 und 0,05 $\text{ng}/\mu\text{l}$) gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation der Platte auf einem Plattenschüttler bei RT wurden die resultierenden RLU mithilfe eines Mikropplatten-Messgerätes (Mithras LB 940, Emissionsfilter: $460 \pm 10 \text{ nm}$) gemessen.

3.3.1.2 K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat CDP-Star

Zur Bestimmung des K_M -Wertes für CDP-Star wurde die Aktivität von TNAP in dem hochkonzentrierten DEA-Puffer bei verschiedenen Substratkonzentrationen (CDP-Star) von 0 μM bis 600 μM ermittelt. Ausgehend von der 25 mM CDP-Star Stammlösung wurde entsprechend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde der Assay entsprechend Abschnitt 3.3.1.1 durchgeführt. Die RLU wurden grafisch gegen die ansteigenden CDP-Star-Konzentrationen aufgetragen, eine nicht-lineare Regression durchgeführt und der K_M -Wert für CDP-Star mithilfe von Graphpad Prism 4.0 bestimmt. Die Substratkonzentration von CDP-Star wurde dann für alle weiteren Versuche gleich dem ermittelten K_M -Wert gesetzt.

3.3.1.3 K_M -Wert-Bestimmung für das Substrat DEA

Zur Bestimmung des K_M -Wertes für DEA wurde die Aktivität von TNAP in dem No-DEA-Puffer bei ansteigenden DEA-Konzentrationen (0 mM - 1000 mM) bestimmt. Ausgehend von einer 10000 mM DEA-Lösung in Wasser/CDP-Star ($2,5 \times K_M$ -Wert) wurde entsprechend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde der Assay entsprechend Abschnitt 3.3.1.1 durchgeführt. Die RLU wurden grafisch gegen die

ansteigenden DEA-Konzentrationen aufgetragen, eine nicht-lineare Regression durchgeführt und der K_M -Wert für DEA mithilfe von Graphpad Prism 4.0 bestimmt.

3.3.1.4 Enzymtitration

Um die optimale TNAP-Konzentration zu ermitteln, wurde die konzentrationsabhängige Aktivität der TNAP (0 ng/ μ l - 0,05 ng/ μ l) bestimmt. Die Konzentrationen von CDP-Star und DEA wurden entsprechend ihren zuvor ermittelten K_M -Werten gewählt. Ausgehend von einer Enzymstammlösung mit einer Proteinkonzentration von 2,5 ng/ μ l wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und der Assay entsprechend Abschnitt 3.3.1.1. durchgeführt. Die erhaltenen RLU wurden grafisch gegen die ansteigenden Enzymkonzentrationen aufgetragen und mithilfe von GraphPad Prism 4.0 eine lineare Regression durchgeführt.

3.3.1.5 Validierung

Für die Validierung des CDP-Star-Assays wurde der Z' -Faktor bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung von Zhang *et al.*¹⁹¹ (siehe Abschnitt 3.1.1.6), wobei für die Positiv- und Negativkontrollen jeweils 12 Replikate in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert wurden. Der Versuch wurde entsprechend Kapitel 3.3.1.1 durchgeführt, wobei für die Positivkontrollen anstatt einer 10%igen DMSO-Lösung 10 μ l einer 5 mM Levamisol-Lösung (in 10 % DMSO) eingesetzt wurden (Endkonzentration von 1 mM).

3.3.1.6 Screening

Alle Testverbindungen wurden mit einer Konzentration von 20 μ M an der Alkalischen Phosphatase getestet, um erste Anhaltspunkte über die inhibitorische Aktivität der Verbindungen zu erhalten. Aus den Feststoffen der zu untersuchenden Testverbindungen wurden 10 mM Stammlösungen in DMSO und dann 100 μ M Lösungen in 10 % DMSO hergestellt (Endkonzentration der Testverbindung von 20 μ M). Der Versuch wurde entsprechend Kapitel 3.3.1.1 durchgeführt und für jede Verbindung die Inhibition in % berechnet.

3.3.1.7 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die Aufnahme von Konzentrations-Inhibitions-Kurven wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Testverbindung in 10 % DMSO hergestellt. 10 µl der entsprechenden Verdünnung wurden zusammen mit den anderen Probenkomponenten in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte gemischt und der Assay entsprechend Kapitel 3.3.1.1 durchgeführt. Beim Auftragen der gemessenen Restaktivität der TNAP gegen den Logarithmus der InhibitorKonzentration wurde eine sigmoidale Kurve erhalten und der IC₅₀-Wert mithilfe von GraphPad Prism 4.0 bestimmt.

4 Ergebnisse & Diskussion

Für die nähere Charakterisierung der pathophysiologischen und physiologischen Rolle der Ectonucleotidasen können Inhibitoren als pharmakologische Werkzeuge dienen. Auf der Suche nach neuen Hemmstoffen stellen HTS-Kampagnen einen vielversprechenden Ansatz dar. Sie ermöglichen die Identifizierung neuer Leitstrukturen für die nachfolgende Optimierung und Entwicklung potenter Inhibitoren. Bei einem HTS soll eine Vielzahl an Testverbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht werden. Es gibt eine Reihe von Parametern, die für die Wahl eines geeigneten Assays entscheidend sind. So spielen neben den Kosten und dem Probandurchsatz die hohe Zuverlässigkeit des Testergebnisses eine wichtige Rolle, schließlich wird jede Testverbindung meist nur einmal untersucht.

In der Einleitung wurden bereits die in dieser Arbeit neu etablierten und validierten Assays zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen vorgestellt. Hierzu gehören der Malachitgrün-Assay und die FP-Assays für die humanen NTPDasen, der CE-Assay für die bakterielle Lp1NTPDase und der CDP-Star-Assay für die TNAP. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und näher diskutiert. Die Vor- und Nachteile dieser und auch anderer zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen geeigneten Assays, insbesondere in Hinblick auf ihre Eignung für ein HTS, werden abschließend ausführlich in Kapitel 4.4 behandelt.

4.1 Humane NTPDase1, -2, -3 und -8

4.1.1 Malachitgrün-Assay

4.1.1.1 Allgemeines

Der Malachitgrün-Assay stellt die Standardmethode für die Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen dar und wurde auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzt. Durch Zugabe einer Malachitgrün- und Ammoniummolybdat-Lösung nach erfolgter Enzymreaktion in einer 96-Loch-Platte konnte durch eine Absorptionsmessung die Enzymaktivität über die entstandene Phosphatmenge quantifiziert werden. Für das Screening großer Substanzbibliotheken zur Identifizierung von Inhibitoren der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8 wurde der Malachitgrün-Assay erfolgreich auf eine Roboteranlage übertragen. Durch die neu etablierte Roboteranwendung wurde es möglich

einen sehr großen Durchsatz an Testverbindungen zu erreichen. Die Methode lässt sich problemlos durch das Einfügen weiterer Inkubatoren oder Pipettierplattformen quantitativ erweitern.

4.1.1.2 Etablierung der Methode

Zunächst wurde eine Kalibriergerade für Phosphat erstellt, um einen linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte (OD) und ansteigenden Phosphatkonzentrationen zu zeigen. Eine exemplarische Kalibriergerade ist in Abbildung 29 dargestellt.

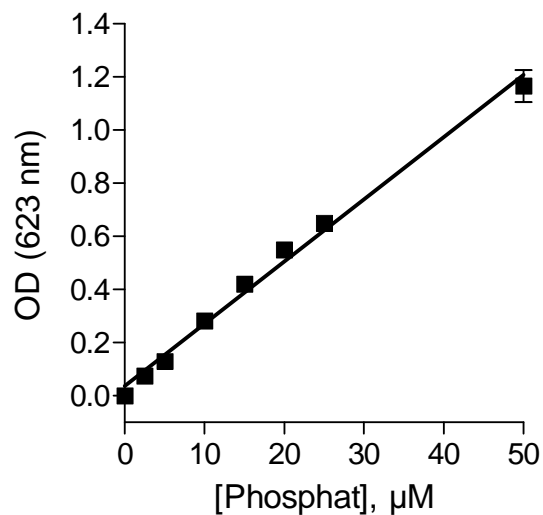


Abbildung 29: Kalibriergerade für Phosphat ($R^2 = 0,992$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Der Korrelationskoeffizient (R^2) der Geradengleichung beträgt 0,992 und deutet somit auf eine lineare Beziehung hin. Mithilfe der Geradengleichung ($y = 0,02343x + 0,03644$) lassen sich die in den Enzymassays erhaltenen Absorptionswerte in die entsprechenden Konzentrationen an gebildetem Phosphat umrechnen.

In einem nächsten Schritt wurden die humane NTPDase1, -2, -3 und -8 enzymkinetisch charakterisiert, indem die Michaelis-Menten Konstanten (K_M -Werte) für ATP und ADP als Substrate bestimmt wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: K_M -Werte der humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 für ATP und ADP als Substrate (n = 3)

Enzym	ATP	ADP
	$K_M \pm \text{SEM}$ (μM), n = 3	$K_M \pm \text{SEM}$ (μM), n = 3
Humane NTPDase1	4,96 \pm 0,82	7,70 \pm 0,29
Humane NTPDase2	22,4 \pm 2,5	n.d. ^a
Humane NTPDase3	26,1 \pm 1,2	17,7 \pm 2,0
Humane NTPDase8	15,1 \pm 0,8	146 \pm 38

^a Der Wert wurde nicht bestimmt, da es sich bei ADP um ein schlechtes Substrat der NTPDase2 handelt.

Die bestimmten K_M -Werte sind etwas niedriger als die in der Literatur^{17,34,37,38,39,40} beschriebenen Werte (vergleiche Kapitel 1.5.1.1, Tabelle 2), aber noch in der gleichen Größenordnung. Für ADP und die humane NTPDase2 wurde kein K_M -Wert bestimmt, da ADP in der Literatur als ein sehr schlechtes Substrat dieses Enzymsubtyps beschrieben ist.¹⁷ Innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführte Vorversuche konnten dies bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Anhand der ermittelten K_M -Werte wurden die Substratkonzentrationen für jeden Enzymassay gewählt. Um ein ausreichend großes Messfenster bei 10 - 20 % Substratumsatz zu gewährleisten, aber dennoch die Identifizierung von kompetitiven Inhibitoren in einem HTS zu ermöglichen (die Substratkonzentration sollte hierfür maximal 10-fach dem K_M -Wert entsprechen), wurden die Substratkonzentrationen auf 50 μM ATP und 50 μM ADP für die humane NTPDase1 festgelegt. Die ermittelten K_M -Werte für die anderen NTPDase-Subtypen waren höher, sodass die Substratkonzentrationen auf 100 μM ATP für die humanen NTPDasen2, -3 und -8 und auf 100 μM ADP für die humanen NTPDasen3 und -8 festgesetzt wurden (= größeres Messfenster).

Um in einem nächsten Schritt zu zeigen, dass bei Einsatz ansteigender Enzymkonzentrationen eine Zunahme der gebildeten Phosphatmenge und somit eine Zunahme der gemessenen Absorptionswerte detektiert werden kann, wurden Enzymtitrationen durchgeführt. Anhand der zu Beginn der Etablierung aufgenommenen Phosphatkalibriergeraden wurden die gemessenen Absorptionswerte für jede Enzymkonzentration in die entsprechend gebildete Phosphatmenge umgerechnet und

grafisch dargestellt (Abbildung 30 und Abbildung 31), wobei die Substratkonzentrationen konstant gehalten wurden. Die optimale Enzymkonzentration für die weiteren Versuche wurde dann so gewählt, dass sie zu einem Substratumsatz von etwa 10 - 20 % führte (gestrichelte Linien).

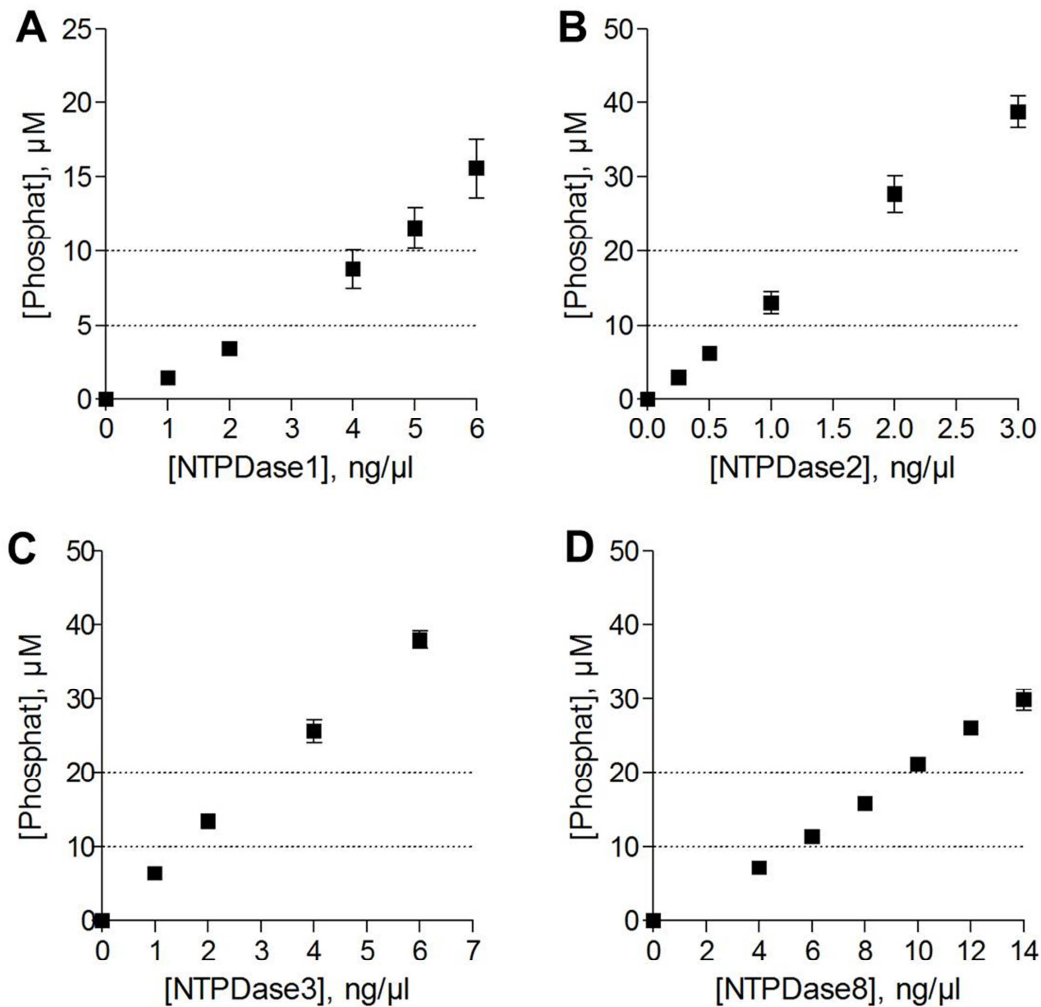


Abbildung 30: Enzymtitrationen für ATP als Substrat. Die während der Enzymreaktion gebildete Phosphatmenge wurde gegen die entsprechend verwendeten Enzymkonzentration aufgetragen; gestrichelte Linien: 10 % und 20 % Substratumsatz (**A**, humane NTPDase1: 50 μM ATP; **B**, humane NTPDase2: 100 μM ATP; **C**, humane NTPDase3: 100 μM ATP; **D**, humane NTPDase8: 100 μM ATP). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Für ATP als Substrat wurden für die weiteren Versuche Enzymkonzentrationen von 3 - 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase1), 0,8 - 1,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase2), 2 - 3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase3) und 6 - 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase8) gewählt.

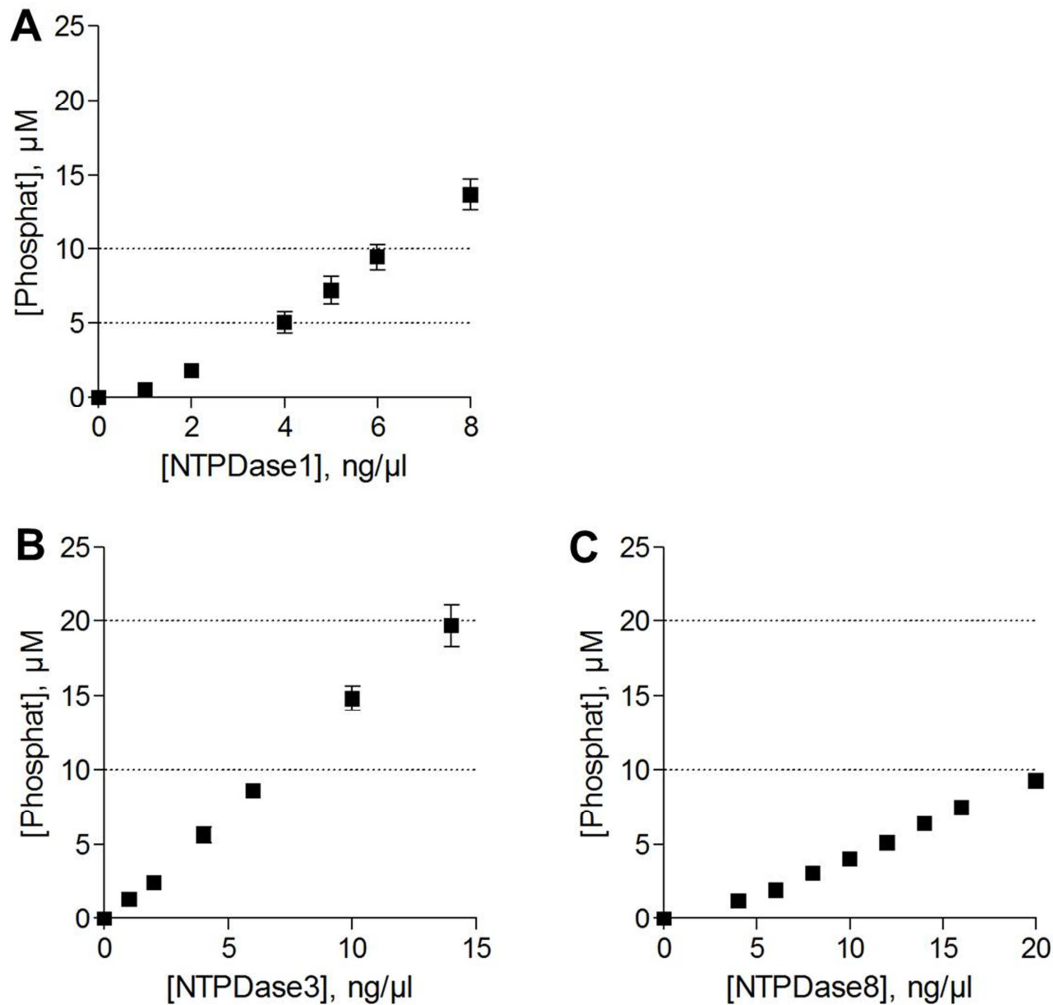


Abbildung 31: Enzymtitrationen für ADP als Substrat. Die während der Enzymreaktion gebildete Phosphatmenge wurde gegen die entsprechend verwendeten Enzymkonzentration aufgetragen; gestrichelte Linien: 10 % und 20% Substratumsatz (**A**, humane NTPDase1: 50 μM ADP; **B**, humane NTPDase3: 100 μM ADP; **C**, humane NTPDase8: 100 μM ADP). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Die Ergebnisse der Enzymtitrationen mit ADP als Substrat zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Phosphatbildung und ansteigenden Enzymkonzentrationen besteht. Allerdings müssten für die NTPDase8 Konzentrationen $> 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ gewählt werden, um 10 - 20 % Substratumsatz zu erreichen. Mit den Enzymen und ADP als Substrat wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Versuche durchgeführt.

4.1.1.3 Übertragung auf das Robotersystem

Die Assays wurden, nachdem nun die optimale Substrat- und Enzymkonzentration bestimmt worden war, auf das Robotersystem von Beckman Coulter übertragen. Die Roboteranlage wurde entsprechend programmiert und die benötigten Reagenzien

per Hand vorgelegt. In der Methode sind die für jeden Pipettiervorgang benötigten Pipettiertechniken (z. B. Mischen nach Zugabe oder die Geschwindigkeit der Abgabe) hinterlegt worden. Den programmierten Ablauf der Methode veranschaulicht Tabelle 6.

Tabelle 6: Ablauf der programmierten Roboter Methode des Malachitgrün-Assays für eine Assayplatte

	Arbeitsschritt	Details
1	Beladen des Robotersystems	Die für einen Durchlauf der Roboter Methode benötigten Platten, Detektionsreagenzien und Pipettenspitzen werden auf der Roboterplattform und in dem Cytomat ^a auf den entsprechenden Positionen platziert.
2	Starten der Methode	Nach Initialisierung aller Inkubatoren und dem PheraStar (Mikrotiterplattenmessgerät) startet das Programm. Die Anzahl der zu testenden Platten kann vorher festgelegt werden.
3	Vorbereitung für den ersten Pipettierschritt	Der Roboter platziert die für den ersten Pipettierschritt benötigten Platten und Pipettenspitzenboxen.
4	Erster Pipettierschritt	Die Substratlösung wird in die Assayplatte vorgelegt.
5	Vorbereitung für den zweiten Pipettierschritt	Der Roboter platziert die für den zweiten Pipettierschritt benötigten Platten und Pipettenspitzenboxen.
6	Zweiter Pipettierschritt	Die Test- bzw. 10%ige DMSO-Lösung wird in die Assayplatte gegeben und durch mehrfaches Aufziehen und Ablassen der Testlösung gemischt.
7	Vorbereitung für den dritten Pipettierschritt	Der Roboter platziert die für den dritten Pipettierschritt benötigten Platten und Pipettenspitzenboxen.
8	Dritter Pipettierschritt	Die Enzymsuspension wird in die Assayplatte gegeben.
9	Inkubation der Assayplatte bei 37°C für 10 min	Die Assayplatte wird von dem Roboter für die Inkubation zu einem der Inkubatoren gebracht, die Inkubation gestartet und die Platte anschließend wieder zu der Pipettierplattform transportiert. Während der Inkubationsphase werden nicht mehr benötigte Platten und Pipettenspitzenboxen von dem Roboter zu dem entsprechenden Lagerort transportiert.

Tabelle 6 (Fortsetzung)

10	Vorbereitung für den vierten Pipettierschritt	Der Roboter platziert die für den vierten Pipettierschritt benötigten Platten und Pipettenspitzenboxen.
11	Vierter Pipettierschritt	Die Malachitgrünlösung wird in die Assayplatte gegeben. Hierbei wird ein höheres Volumen der Lösung aufgenommen als dann abgegeben wird. So kann die Entstehung von Luftblasen stark minimiert werden.
12	Vorbereitung für den fünften Pipettierschritt	Der Roboter platziert die für den fünften Pipettierschritt benötigten Platten und Pipettenspitzenboxen.
13	Fünfter Pipettierschritt	Die Ammoniummolybdatlösung wird in die Assayplatte gegeben.
14	Inkubation der Assayplatte bei RT für 20 min	Die Assayplatte wird von dem Roboter für die Inkubation zu einem der Inkubatoren gebracht, die Inkubation gestartet und die Platte anschließend direkt zum PheraStar transportiert. Während der Inkubationsphase werden nicht mehr benötigte Platten und Pipettenspitzen von dem Roboter zu dem entsprechenden Lagerort transportiert.
15	Absorptionsmessung	Messen des Absorptionssignals in jeder Vertiefung der Assayplatte bei einer Wellenlänge von 623 nm.
16	Aufräumen	Rücktransport aller Platten und Pipettenspitzenboxen zu ihrem Ursprungslagerort.
17	Ende der Methode	Das Programm wird beendet und die Daten können entsprechend ausgewertet werden.

^a Ein Karussell, in welchem Platten und Pipettenspitzenboxen gestapelt werden können und so die Lagerung einer großen Menge möglich wird. Der Cytomat wird umgangssprachlich auch als Hotel bezeichnet.

Wichtige Zeitverläufe wurden ebenfalls erfolgreich programmiert, um Prioritäten für den Roboter festzulegen. Es konnte z. B. vorgegeben werden, dass die Assayplatte nach einem Pipettierschritt innerhalb der nächsten 140 s dem nächsten Pipettierschritt zugeführt werden muss. So konnte sichergestellt werden, dass der Roboter nicht zuerst verwendete Spitzenboxen und Platten wegräumt, sondern diesen Schritt zeitsparend während der Inkubationszeiten der Assayplatte durchführt. Durch die Programmierung der einzelnen Arbeitsschritte konnte der Ablauf so optimiert werden, dass bis zu

1056 Verbindungen (12 96-Loch-Platten) auf ihre inhibitorische Aktivität innerhalb von 4 Stunden und 40 Minuten untersucht werden konnten. Dies ermöglichte einen hohen Probendurchsatz.

4.1.1.4 Validierung

Der Z'-Faktor ist ein statistischer Parameter, der es ermöglicht, Aussagen über die Assayqualität zu treffen. Er berücksichtigt die Standardabweichungen der Messwerte (Positiv- und Negativkontrollen) und das Messfenster. Um entscheiden zu können, ob ein Assay ohne weitere Optimierungsschritte für ein HTS geeignet ist, muss der Z'-Faktor $\geq 0,5$ sein.¹⁹¹ Die Z'-Faktoren der vier etablierten Assays für die humanen NTPDasen wurden für 50 μM (NTPDase1) bzw. 100 μM ATP (NTPDase2, -3 und -8) als Substrat entsprechend mit 0,71, 0,75, 0,75 und 0,84 bestimmt. Diese Werte belegen die hohe Robustheit der Assays und zeigen damit, dass keine weitere Optimierung notwendig ist. Im nächsten Schritt wurde daher mit dem HTS begonnen.

4.1.1.5 High-throughput Screening

Mithilfe der neu etablierten Robotertermethode wurde eine HTS-Kampagne für die NTPDasen mit 50 μM ATP (NTPDase1) bzw. 100 μM ATP (NTPDase2, -3 und -8) als Substrat durchgeführt. Ca. 3800 Testverbindungen aus sieben verschiedenen Substanzbibliotheken (Arzneistoff-, Chembridge-, ChemDiv-, Herdewjin-, Interbioscreen-, Tocris- und Xanthin-Bibliothek) wurden bei einer Testkonzentration von 20 μM untersucht. Bei der Arzneistoff- und der Xanthin-Bibliothek handelt es sich um in unserem Arbeitskreis selbst zusammengestellte Substanzbibliotheken bestehend aus den im Institut für Forschung und Lehre vorhandenen Arzneistoffen bzw. in unserem Arbeitskreis synthetisierten Xanthin-Derivaten. Die Chembridge-, ChemDiv-, Interbioscreen- und Tocris-Bibliothek sind hingegen kommerziell erhältliche Substanzbibliotheken, die arzneistoff-artige und somit als Leitstrukturen geeignete Screeningverbindungen oder bereits bekannte, biologisch aktive Verbindungen enthalten. Die Herdewjin-Bibliothek wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. Herdewjin zur Verfügung gestellt und enthält die in dem Arbeitskreis selbst synthetisierten Verbindungen. Die Ergebnisse des HTS sind in Abbildung 32 dargestellt.

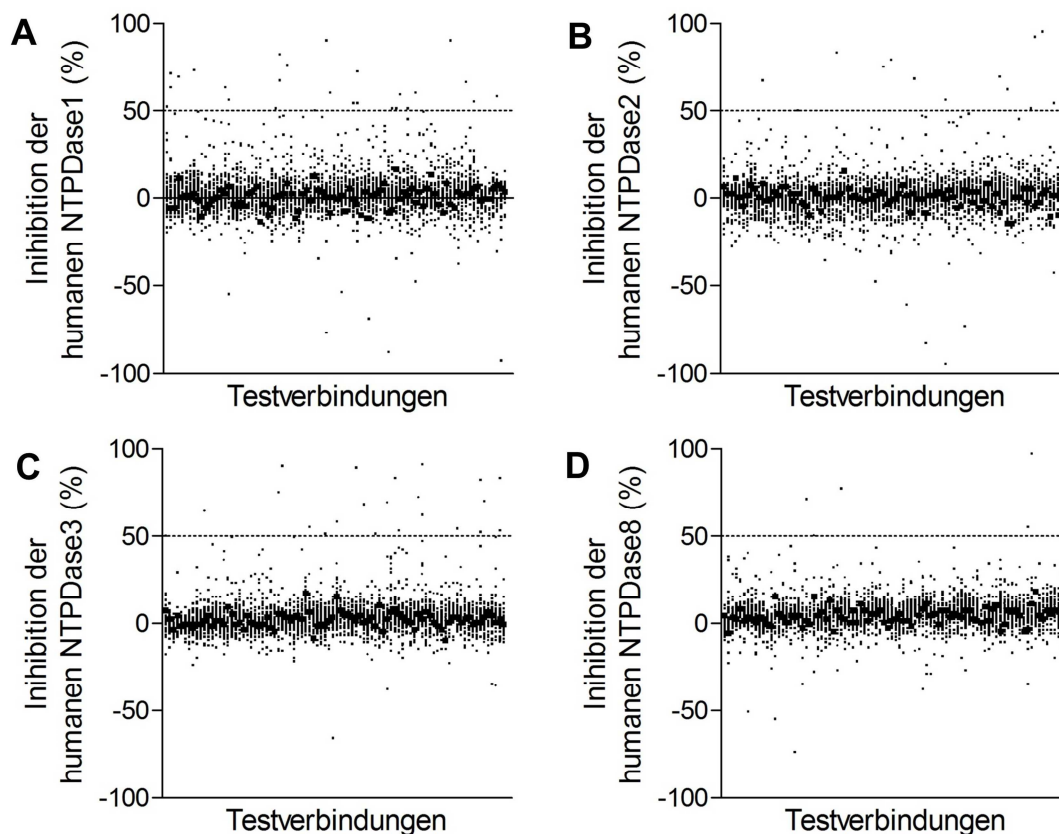


Abbildung 32: HTS-Ergebnisse verschiedener Substanzbibliotheken für die humane NTPDase1, -2, -3 und -8. ~3800 Testverbindungen wurden bei einer Endkonzentration von jeweils 20 μM getestet. Die Enzyminhibition (%) wurde berechnet und grafisch dargestellt. Gestrichelte Linie: Treffergrenze für potente Verbindungen bei 50 % Inhibition. **(A)** Humane NTPDase1, Substrat: 50 μM ATP. **(B)** Humane NTPDase2, Substrat: 100 μM ATP. **(C)** Humane NTPDase3, Substrat: 100 μM ATP. **(D)** Humane NTPDase8, Substrat: 100 μM ATP. Nicht dargestellt sind die Datenpunkte für Proben, bei welchen offensichtlich keine Detektionslösung zugegeben wurde (insgesamt ~50). Die durchschnittlichen Z'-Faktoren für alle getesteten Mikrotiterplatten wurden mit 0,79 (NTPDase1), 0,81 (NTPDase2), 0,86 (NTPDase3) und 0,84 (NTPDase8) bestimmt.

Mit einer gestrichelten Linie ist in Abbildung 32 der Grenzwert (50 % Inhibition bei 20 μM) markiert, oberhalb dessen eine Verbindung als Primärtreffer definiert wurde. Die meisten Primärtreffer wurden ein zweites Mal auf ihr inhibitorisches Potential per Hand überprüft. Auch Verbindungen, für welche aufgrund von fehlender Detektionslösungszugabe keine Inhibition berechnet werden konnte, wurden erneut untersucht. Die Trefferraten wurden mit 0,39 % (NTPDase1), 0,23 % (NTPDase2), 0,34 % (NTPDase3) und 0,13 % (NTPDase8) bestimmt, wobei ausschließlich bereits bekannte Arzneistoffe oder biologisch aktive Verbindungen aus der Tocris-Bibliothek als potentielle Inhibitoren der NTPDasen identifiziert werden konnten. Schließlich wurden, um Verwechslungen und/oder eine Zersetzung der Testverbindungen während der Lagerung auszuschließen,

massenspektrometrische Analysen potentieller Inhibitoren durchgeführt und Testverbindungen in Hinblick auf ihre Eignung als neue Leitstrukturen betrachtet. Vier Verbindungen wurden schließlich ausgewählt, die näher charakterisiert werden sollten. Dabei handelte es sich um LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**), Tamoxifen (**34**) und PSB-06126 (**35**). In der nachfolgenden Tabelle sind die Inhibitionswerte (%) der Verbindungen, die für die vier membranständigen NTPDase-Subtypen bei einer Konzentration von 20 μM bestimmt wurden, aufgeführt.

Tabelle 7: Durch die HTS-Kampagne identifizierte, potentielle NTPDase-Inhibitoren und die entsprechenden Inhibitionswerte (%) bei 20 μM

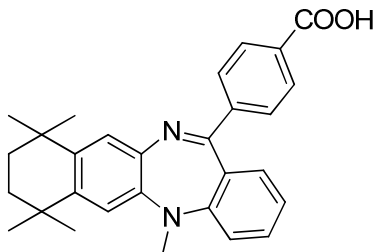
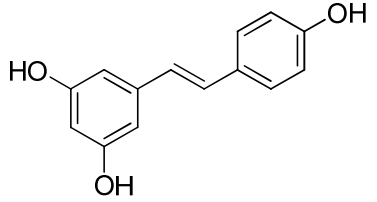
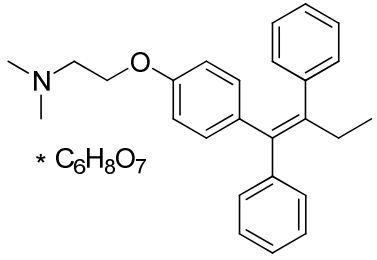
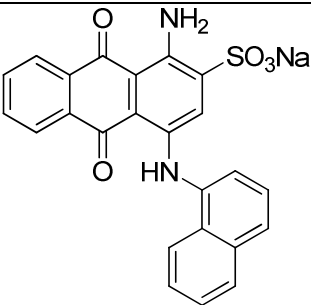
Testverbindung	% Inhibition (n = 1 - 2) ^a			
	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
 <p>32 LE 135</p>	-13	73 (56, 89)	74 (72, 76)	-9
 <p>33 Resveratrol</p>	-1	75 (74, 76)	-4	-12
 <p>34 Tamoxifencitrat</p>	81 (73, 89)	31	58 (75, 41)	55

Tabelle 7 (Fortsetzung)

	18	80 (79, 81)	67 (68, 65)	43
35 PSB-06126				

^a Bei n = 2 sind die Einzelwerte in Klammern angegeben.

LE 135 (**32**) inhibierte die humane NTPDase2 und -3 zu 73 % bzw. 74 % bei 20 μ M, wobei keine Hemmung der NTPDasen1 und -8 detektiert wurde. Bei Resveratrol (3, 5, 4'-Trihydroxy-*trans*-stilben, **33**) scheint es sich um einen selektiven Inhibitor (75 %) der humanen NTPDase2 zu handeln, da für die NTPDase1, -3 und -8 keine Inhibition bei 20 μ M messbar war. Tamoxifencitrat (**34**) inhibierte die NTPDase1, -2, -3 und -8 zu 81 %, 31 %, 58 % und 55 %. Das Anthrachinon-Derivat PSB-06126 (**35**) zeigte bei einer Assaykonzentration von 20 μ M hohe inhibitorische Aktivität gegenüber der humanen NTPDase2 (80 %) und NTPDase3 (67 %) und eine geringe Inhibition der humanen NTPDase1 (18 %) und NTPDase8 (43 %).

4.1.1.6 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die vier potentesten Testverbindungen LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**), Tamoxifencitrat (**34**) und PSB-06126 (**35**) wurden Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen. Konnte keine Inhibition von ≥ 50 % bei 20 μ M detektiert werden, so wurde auf die Aufnahme der Kurve für das entsprechende Enzym verzichtet und nur die Inhibition bei 20 μ M in der Grafik dargestellt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 33 zusammengefasst.

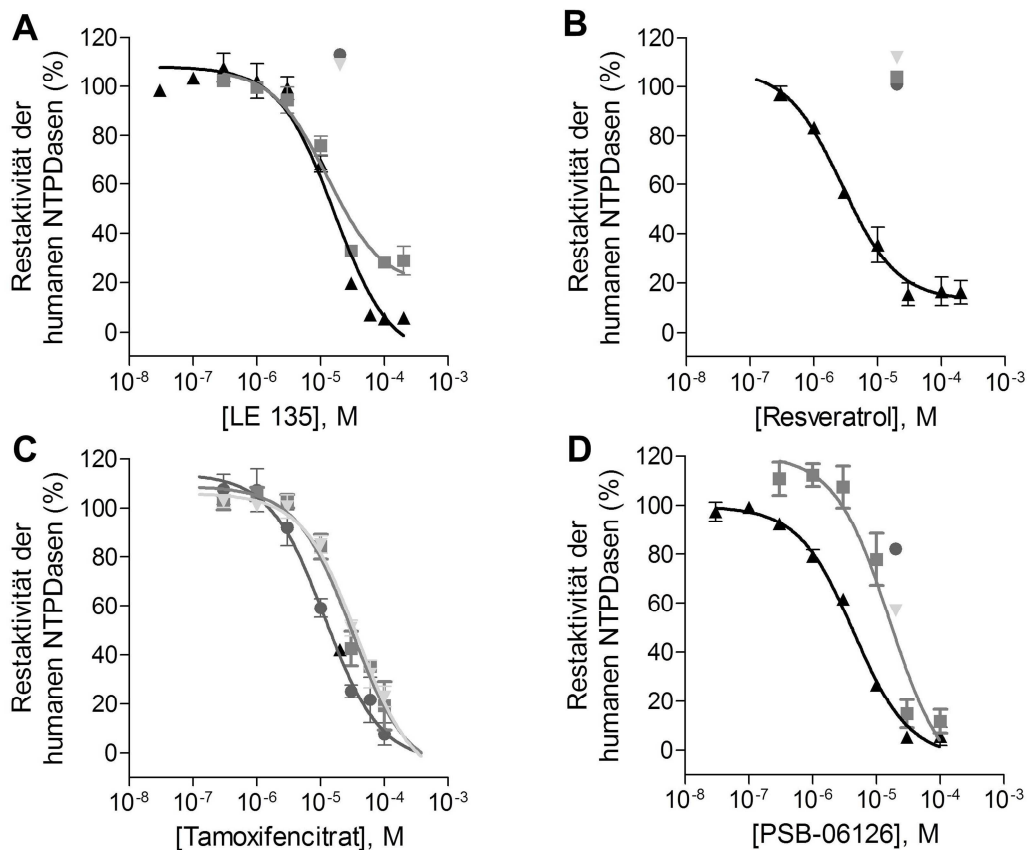


Abbildung 33: Konzentrations-Inhibitions-Kurven und Screeningergebnisse ausgewählter Testverbindungen für die humane NTPDase1 (●), NTPDase2 (▲), NTPDase3 (■) und NTPDase8 (▼). **(A)** LE 135 (**32**): Humane NTPDase1: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$); humane NTPDase2: $IC_{50} = 19,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase3: $IC_{50} = 13,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ($n = 3$), keine vollständige Hemmung detektierbar; humane NTPDase8: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$). **(B)** Resveratrol (**33**): Humane NTPDase1: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$); humane NTPDase2: $IC_{50} = 2,71 \pm 0,25 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase3: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$); humane NTPDase8: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$). **(C)** Tamoxifencitrat (**34**): Humane NTPDase1: $IC_{50} = 11,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase2: $IC_{50} \geq 20 \mu\text{M}$ ($n = 2$); humane NTPDase3: $IC_{50} = 30,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ($n = 3$), keine vollständige Hemmung detektierbar; humane NTPDase8: $IC_{50} = 49,5 \pm 7,7 \mu\text{M}$ ($n = 3$), keine vollständige Hemmung detektierbar. **(D)** PSB-06126 (**35**): Humane NTPDase1: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$); humane NTPDase2: $IC_{50} = 5,87 \pm 0,64 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase3: $IC_{50} = 16,5 \pm 2,5 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase8: $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ($n = 1$). Die eingesetzten Substratkonzentrationen waren $50 \mu\text{M}$ ATP (humane NTPDase1) oder $100 \mu\text{M}$ ATP (humane NTPDase2, -3 und -8). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

LE-135 (**32**) konnte als moderater Inhibitor der NTPDase2 ($IC_{50} = 19,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$) identifiziert werden. Die Verbindung inhibierte die humane NTPDase3 bei $20 \mu\text{M}$ zwar auch zu mehr als 50 % ($76 \pm 3 \%$), allerdings konnte bei Aufnahme der Konzentrations-Inhibitions-Kurve keine vollständige Hemmung erreicht werden ($IC_{50} = 13,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$). Keine Inhibition war gegenüber der NTPDase1 und NTPDase8 bei einer Endkonzentration von $20 \mu\text{M}$ messbar (Abbildung 33, A).

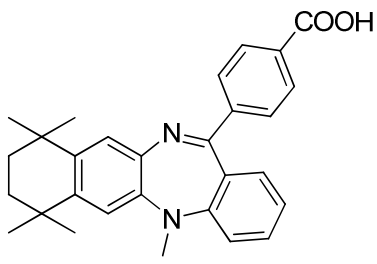
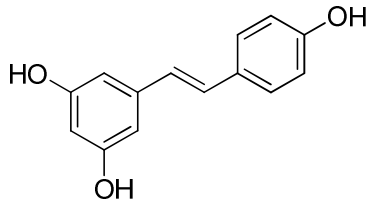
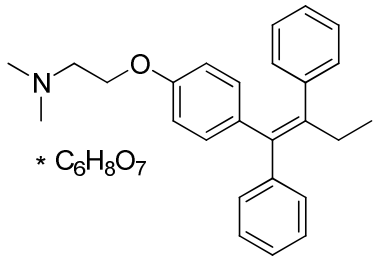
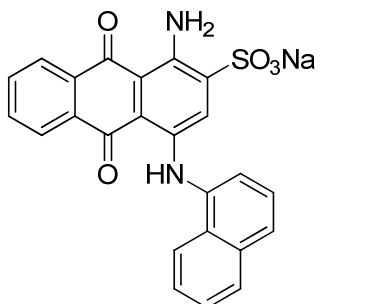
Die Testverbindung Resveratrol (**33**) wurde als potenter Inhibitor der humanen NTPDase2 identifiziert. Während Resveratrol die humane NTPDase2 mit einem IC_{50} -Wert von $2,71 \pm 0,25 \mu\text{M}$ hemmte, konnte für die anderen Isoenzyme bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ keine Inhibition detektiert werden (Abbildung 33, B).

Für Tamoxifencitrat (**34**) konnte die höchste inhibitorische Aktivität gegenüber der humanen NTPDase1 mit einem IC_{50} -Wert von $11,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Die ermittelten IC_{50} -Werte für die humane NTPDasen3 und 8 liegen mit $30,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$ und $49,5 \pm 7,7 \mu\text{M}$ deutlich höher. Allerdings mussten die Kurven für diese beiden Enzym-Subtypen extrapoliert werden. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Tamoxifen konnten aber keine höheren Konzentrationen als $100 \mu\text{M}$ eingesetzt werden, um eine vollständige Hemmung zu erreichen. Für die humane NTPDase2 wurde bei dem Screening zwar eine Inhibition von 58 % bei $20 \mu\text{M}$ detektiert, eine konzentrationsabhängige Inhibition konnte allerdings nicht detektiert werden, sodass kein IC_{50} -Wert ermittelt werden konnte und nur der Inhibitionswert bei $20 \mu\text{M}$ in der Grafik dargestellt ist (Abbildung 33, C).

Das Anthrachinon-Derivat PSB-06126 (**35**) wurde als Inhibitor der humanen NTPDasen2 und -3 identifiziert. Es wurden entsprechende IC_{50} -Werte von $5,87 \pm 0,64 \mu\text{M}$ und $16,5 \pm 2,5 \mu\text{M}$ ermittelt. PSB-06126 wurde in der Literatur⁹⁰ bereits als kompetitiver Inhibitor der Ratten-NTPDase3 beschrieben, sodass dieser Hemmmechanismus auch für das humane Enzym angenommen und mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung¹⁹⁸ die K_i -Werte von $1,06 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (humane NTPDase2) und $3,41 \pm 0,52 \mu\text{M}$ (humane NTPDase3) berechnet wurden. PSB-06126 (**35**) inhibierte die humane NTPDase1 und -8 bei $20 \mu\text{M}$ zu weniger als 50 % (IC_{50} -Werte $> 20 \mu\text{M}$), sodass auf die Messung von Konzentrations-Inhibitions-Kurven verzichtet wurde (Abbildung 33, D).

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC_{50} -Werte der vier bei dem HTS als Inhibitoren identifizierten Verbindungen (**32**, **33**, **34** und **35**) für die NTPDasen nochmal abschließend zusammengefasst.

Tabelle 8: Inhibitorische Aktivität der potenten Testverbindungen LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**), Tamoxifencitrat (**34**) und PSB-06126 (**35**) für die humane NTPDase1, -2, -3 und -8

Testverbindung	IC ₅₀ -Wert ± SEM (µM), n = 3			
	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
 <p>32 LE 135</p>	> 20 ^a	19,6 ± 0,5	13,2 ± 1,0 ^b	> 20 ^a
 <p>33 Resveratrol</p>	> 20 ^a	2,71 ± 0,25	> 20 ^a	> 20 ^a
 <p>34 Tamoxifencitrat * C₆H₈O₇</p>	11,9 ± 0,9	< 20 ^c	30,2 ± 1,2 ^b	49,5 ± 7,7 ^b
 <p>35 PSB-06126</p>	> 20 ^a	5,87 ± 0,64	16,5 ± 2,5	> 20 ^a

^a Keine Inhibition von ≥ 50 % bei 20 µM.^b Keine vollständige Inhibition messbar.^c > 50 % Inhibition bei 20 µM, aber keine konzentrationsabhängige Inhibition messbar.

4.1.1.7 Hemmmechanismus

Für die drei in Kapitel 4.1.1.6 als neue NTPDase-Inhibitoren identifizierte und durch Aufnahme der Konzentrations-Inhibitionskurven näher charakterisierte Verbindungen LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**) und Tamoxifencitrat (**34**) sollte im Folgenden der Hemmmechanismus stellvertretend für jeweils einen NTPDase-Subtyp bestimmt werden.

In der nachfolgenden Abbildung 34 sind das Lineweaver-Burk- und das Eadie-Hofstee-Diagramm für LE 135 (**32**) und die humane NTPDase3 dargestellt.

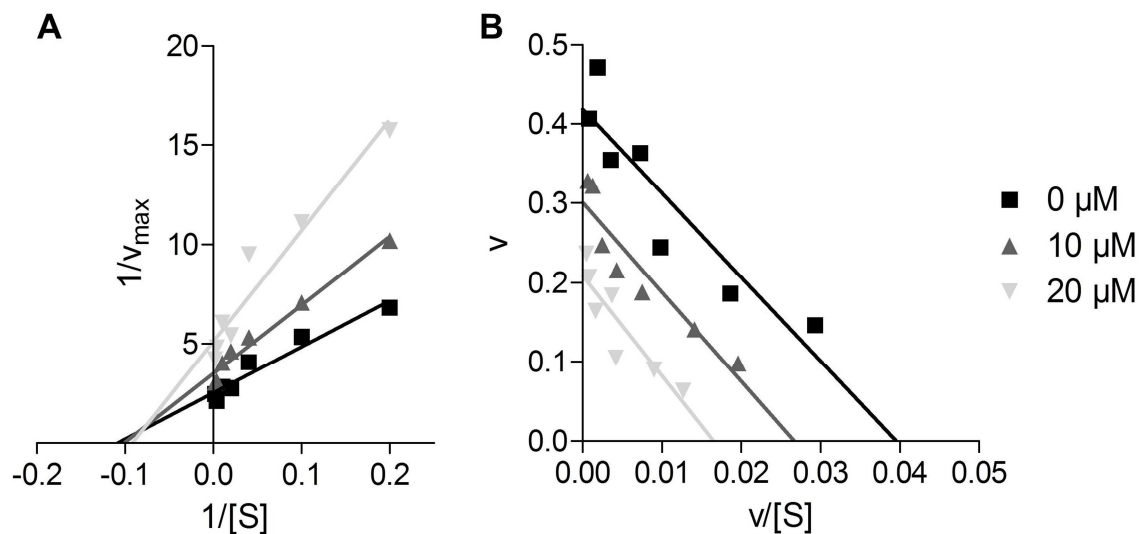


Abbildung 34: Lineweaver-Burk-Diagramm (A) und Eadie-Hofstee-Diagramm (B) zur Bestimmung des Hemmmechanismus von LE 135 (**32**) für die humanen NTPDase3 in Anwesenheit von 0 μM (■), 10 μM (▲) und 20 μM (▼) Inhibitor ($n = 1$).

Die drei Geraden schneiden sich im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 34, A) oberhalb der Abszisse und der v_{\max} -Wert wird bei steigender Inhibitorkonzentration kleiner. Im Eadie-Hofstee-Diagramm (Abbildung 34, B) verlaufen die Geraden parallel. Demnach scheint es sich um einen nicht-kompetitiven Hemmmechanismus zu handeln.

Resveratrol (**33**) inhibiert ausschließlich die NTPDase2. Das Lineweaver-Burk- und das Eadie-Hofstee-Diagramm sind in der Abbildung 35 dargestellt. Die drei Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 35, A) verlaufen parallel und schneiden sich im Eadie-Hofstee-Diagramm (Abbildung 35, B) auf Höhe der X-Achse, sodass ein unkompetitiver Hemmmechanismus angenommen werden kann. Demnach scheint Resveratrol ausschließlich an den ES-Komplex zu binden.

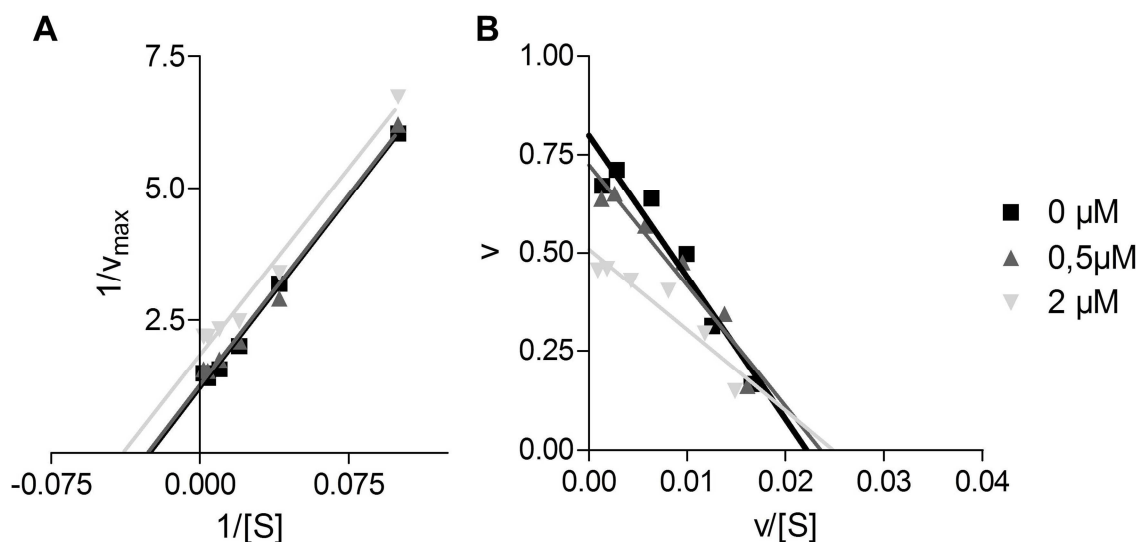


Abbildung 35: Lineweaver-Burk-Diagramm (A) und Eadie-Hofstee-Diagramm (B) zur Bestimmung des Hemmmechanismus von Resveratrol (33) für die humanen NTPDase2 in Anwesenheit von 0 μM (■), 0,5 μM (▲) und 2 μM (▼) Inhibitor (n = 1).

Der Hemmmechanismus für den Inhibitor Tamoxifencitrat (34) wurde stellvertretend an der humanen NTPDase3 bestimmt. Das Lineweaver-Burk- und das Eadie-Hofstee-Diagramm sind in der Abbildung 36 dargestellt. Die zwei Geraden schneiden sich im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 36, A) auf der Abszisse in einem gemeinsamen Schnittpunkt und verlaufen im Eadie-Hofstee-Diagramm (Abbildung 36, B) parallel, welches auf einen nicht-kompetitiver Hemmmechanismus hinweist.

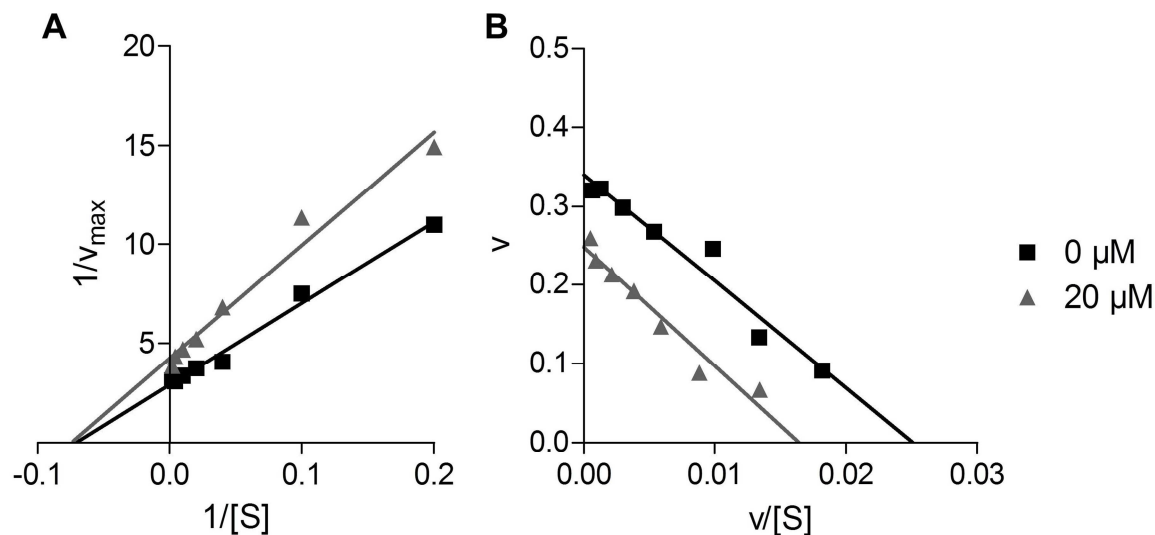


Abbildung 36: Lineweaver-Burk-Diagramm (A) und Eadie-Hofstee-Diagramm (B) zur Bestimmung des Hemmmechanismus von Tamoxifencitrat (34) für die humanen NTPDase3 in Anwesenheit von 0 μM (■) und 20 μM (▲) Inhibitor (n = 1).

Da die Versuche bisher nur einmal erfolgreich durchgeführt wurden, sind weitere Untersuchungen zur abschließenden Aufklärung der Hemmmechanismen notwendig.

4.1.1.8 Diskussion der Ergebnisse

LE-135 (**32**) ist ein Retinsäurerezeptor-Antagonist an den RAR β - (retinoic acid receptor β) und RAR α -Rezeptoren (K_i -Werte von 0,22 μ M bzw. 1,4 μ M).^{199,200} Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von LE 135 mit den Benzodiazepinen, die an GABA_A-Rezeptoren binden, könnte die Untersuchung dieser Substanzklasse ebenfalls neue Erkenntnisse und/oder Leitstrukturen für die Entwicklung potenter NTPDase-Inhibitoren liefern. Ebenso sollten in weiteren Versuchen Agonisten und Antagonisten der RARs bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität untersucht werden. Es konnte bereits in ersten Vorversuchen innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der potente RAR-Agonist Ch 55 (**36**)¹⁹⁹ (Abbildung 37) Inhibition der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8 von 72 %, 68 %, 69 % und 19 % bei 20 μ M zeigt. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig.

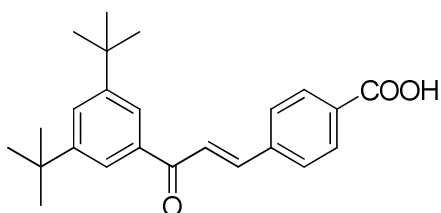


Abbildung 37: Struktur des RAR-Agonisten Ch 55 (**36**)

Ch 55 (**36**) weist auch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu dem in dieser Arbeit als potenten und selektiven NTPDase2-Inhibitor identifizierten Resveratrol (**33**) auf (vergleiche Tabelle 7). Interessanterweise konnte kürzlich ein Zusammenhang zwischen der Resveratrol-Gabe und der Expression der Retinsäurerezeptoren an Ratten gezeigt werden. Demnach sind in Rattenembryos mit Entwicklungsstörungen aufgrund von Diabetes der Muttertiere die Expression der RARs und RXRs (Retinoid X receptor) sowie die DNA-Bindungsaktivitäten der Rezeptoren herunterreguliert. Bei Behandlung der diabetischen Ratten mit Resveratrol (**33**) über einen längeren Zeitraum wiesen die Embryos jedoch eine normale Expression dieser Rezeptoren auf.²⁰¹

Resveratrol (**33**) ist ein Phytoestrogen, welches vermehrt in Weintrauben und rotem Wein zu finden ist.²⁰² Eine Reihe verschiedener biologische Effekte werden der Verbindung zugesprochen. Resveratrol (**33**) scheint antiinflammatorische²⁰³, antioxidative²⁰⁴, antitumorale²⁰⁵ und kardioprotektive²⁰⁶ Wirkungen zu besitzen.²⁰⁷ Zu den bisher für Resveratrol identifizierten somit für die Effekte verantwortlich gemachten Zielstrukturen gehören unter anderem das Enzym Sirtuin-1, die AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase), die COX (Cyclooxygenasen), der TNF α (Tumornekrosefaktor α), der NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen) und der PPAR γ (Peroxisomen-

Proliferator aktivierter Rezeptor γ).^{207,208,209} Allerdings existieren widersprüchliche Veröffentlichungen über die Wirkungen von Resveratrol (**33**). In einem Übersichtsartikel von Pirola *et al.*²¹⁰ wurden die *in vitro*-Daten für die als Zielstrukturen identifizierten Enzyme zusammengefasst (vergleiche Tabelle 9).

Tabelle 9 (modifiziert nach Pirola 2008)²¹⁰: Zusammenfassung der Inhibitions- und Aktivierungsdaten von Resveratrol (**33**) für verschiedene Enzyme.

Inhibierte Enzyme ^a	IC ₅₀ -Werte (<i>in vitro</i>)
COX	15 μ M
LOX	3,7 μ M
PKC	40 μ M
p56 ^{lck}	60 μ M
JNK1	50 μ M ^b
p38	50 μ M ^b
IKK β	1 μ M ^b
Tyrosinkinase Src	20 μ M ^b
STAT3	20 μ M ^b
Ribonucleotidreduktase	50 μ M
DNA-Polymerase α	3,3 μ M
DNA-Polymerase δ	5 μ M
PKD	35 - 50 μ M
PKC α	< 10 μ M
Chinonreduktase 2	35 – 50 nM
Aromatase	25 μ M
Aktivierte Enzyme ^a	Getestete Konzentration von Resveratrol
Sirtuin-1	100 μ M
Adenylylcyclase	0,8 μ M
AMPK	50 μ M

^a Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis; ^b Effekt bei dieser Konzentration messbar

Die unterschiedlichen Konzentrationen, die eingesetzt wurden, um die beschriebenen Effekte von Resveratrol zu erzielen, lassen viele Fragen in Bezug auf die *in vivo* erreichten oder erreichbaren Konzentrationen aufkommen. Resveratrol (**33**) wird schnell im Körper metabolisiert und weist somit eine geringe Bioverfügbarkeit auf (Halbwertszeit von ~8 - 14 min).²⁰⁷ Bei einer oralen Aufnahme von 0,5 g Resveratrol werden beispielsweise Blutkonzentrationen von höchstens 0,32 μ M erreicht.²⁰⁸ Demnach sind

weitere Forschungsarbeiten notwendig, die zeigen sollen, ob sich Resveratrol oder seine Metabolite ausreichend in Gewebe anreichern. Die Verbindung **33** könnte auch hoch-affin an alternative Zielstrukturen binden, welche eine Schlüsselrolle für die beschriebenen Effekte einnehmen könnten.²⁰⁷

In einer Studie wurde kürzlich der *in vivo* Effekt von Resveratrol (**33**) auf die Ectonucleotidaseaktivität in Thrombozyten diabetischer Ratten untersucht, um den potentiellen therapeutischen Nutzen der Verbindung zur Behandlung hämostatischer Erkrankungen bei Diabetikern zu untersuchen.²¹¹ Hierzu wurde diabetischen und gesunden Ratten zunächst über 30 Tage peritoneal Resveratrol (10 oder 20 mg/kg Körpergewicht) verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine Salzlösung. Anschließend wurden aus dem Blut Thrombozyten isoliert und die Enzymaktivität der NTPDasen und eN mithilfe des Malachitgrün- und die der NPP mithilfe des *p*-Nitrophenol-Assays bestimmt. Ein erhöhter ATP-, ADP- und AMP-Umsatz war bei Gabe von Resveratrol (**33**) für die diabetischen und auch die gesunden Ratten messbar. Somit kamen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass die Gabe von Resveratrol (**33**) die Enzymaktivitäten erhöht.²¹¹ Dies steht im Widerspruch zu dem in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnis, nach dem Resveratrol (**33**) ein sehr potenter Inhibitor der humanen NTPDase2 zu sein scheint. Allerdings wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit an einer isolierten Enzympräparation humaner NTPDasen durchgeführt. Die in der Studie veröffentlichten Daten sind hingegen an dem aus Ratten isolierten Material erhoben worden, sodass ein direkter Vergleich nicht unbedingt möglich ist. Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um die Zusammenhänge besser bewerten zu können.

In den letzten Jahren wurden von Baell *et al.*^{212,213,214} einige Publikationen veröffentlicht, in welchen Verbindungen wie Resveratrol (**33**), die sehr häufig in verschiedenen Screeningassays eine Inhibition oder Aktivierung der entsprechend untersuchten Proteine zeigen, als „pan-assay interference compounds“ (PAINS) bezeichnet werden. Die Effekte der PAINS können nach Beschreibung der Autoren häufig nicht auf spezifische Bindungen an das entsprechend untersuchte Protein zurückgeführt werden.²¹⁴ Die Autoren gehen sogar soweit, dass der Einsatz von PAINS in HTS-Kampagnen und die Identifizierung solcher als neue Leitstrukturen vermieden werden sollte, was allerdings kritisch hinterfragt werden muss. Schließlich können Verbindungen (z. B. das Resveratrol), die an verschiedene Zielstrukturen binden, auch als „privileged structures“ angesehen werden, die über besondere biologisch aktive Teilstrukturen verfügen und entsprechend weiter optimiert werden können. Zudem kann durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse verdeutlicht werden, dass **33** durchaus sehr selektiv bindet, da nur eine

Hemmung der NTPDase2 und nicht der verwandten Isoenzyme gezeigt wurde. Baell und Walters²¹⁴ geben weiter an, dass sich 58 % dieser von ihnen als PAINS bezeichneten Verbindungen in 16 Strukturklassen wiederfinden lassen. Dazu gehören z. B. Catechole, Isothiazolone oder Phenol-Sulfonamide.^{212,214} Die Empfehlungen der aufmerksamen Beurteilung von neu identifizierten Verbindungen für ihre Eignung als neue Leitstrukturen erscheint natürlich sinnvoll. Der Blick in die zur Verfügung stehende Literatur und Datenbanken sollte erfolgen, um zu prüfen, ob für die als Treffer identifizierte Struktur oder ähnliche Verbindungen bereits Interaktionen mit anderen, nicht verwandten Proteinen gezeigt oder „non-drug-like“ Interaktionsmechanismen wie z. B. nicht konzentrationsabhängige Inhibition beschrieben worden sind. Auch der Identitäts- und Reinheitsnachweis einer Verbindung, die als Treffer identifiziert wurde, muss natürlich durchgeführt werden.²¹⁴ Würden aber die sogenannten PAINS aus Substanzbibliotheken herausgehalten werden, dann könnten womöglich neue Leitstrukturen für medizinisch-chemische Ansätze zur Entwicklung neuer Wirkstoffe unentdeckt bleiben. Es sei darauf hingewiesen, dass viele Arzneistoffe die Kriterien der PAINS erfüllen. So handelt es sich beispielsweise bei dem zur Behandlung der Parkinson-Krankheit eingesetzten Levodopa oder dem Sympathomimetikum Isoprenalin um Catechole.

Tamoxifen (**34**) ist ein selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM), der als Arzneistoff zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt wird.²¹⁵ Zwischen Tamoxifen (**34**) und Resveratrol (**33**) lässt sich ebenfalls eine strukturelle Ähnlichkeit erkennen (vergleiche Tabelle 7) und für Resveratrol (**33**) als Phytoestrogen wurden agonistische wie auch antagonistische Effekte an den Estrogenrezeptoren beschrieben.^{215,216} Für zukünftige Forschungsarbeiten könnte die Untersuchung weiterer SERMs in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den NTPDasen daher interessant sein.

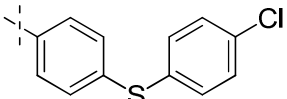
PSB-06126 (**35**) wurde kürzlich schon als potenter und kompetitiver Inhibitor der Ratten-NTPDase3 in unserer Arbeitsgruppe identifiziert.⁹⁰ Interessanterweise hemmt die Verbindung im Gegensatz zu den Ratten-Enzymen bei den humanen NTPDasen nicht nur den Subtyp 3, sondern auch den Subtyp 2. Die Untersuchung weiterer Anthrachinon-Verbindungen könnte dazu beitragen, Aussagen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen und die Selektivitäten für die unterschiedlichen humanen NTPDase-Subtypen treffen zu können. Solche Untersuchungen wurden in dieser Arbeit durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.1.9).

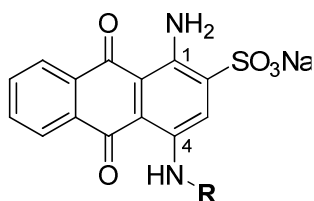
4.1.1.9 Screening einer Anthrachinon-Bibliothek

Da PSB-06126 (**35**) als potenter Inhibitor der humanen NTPDasen2 und -3 identifiziert werden konnte (vergleiche Kapitel 4.1.1.6), wurden 203 in unserem Arbeitskreis synthetisierte Anthrachinon-Derivate in Bezug auf ihre inhibitorischen Aktivitäten gegenüber den NTPDasen1, -2, -3 und -8 untersucht. Ziel war es, eine Aussage über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der schon als Inhibitoren der NTPDasen bekannten Verbindungsklasse treffen zu können und subtypspezifische Unterschiede zu ermitteln. Der Assay wurde aufgrund der geringen Zahl von 203 Verbindungen mit der Hand pipettiert und die Roboteranlage lediglich genutzt, um die Anthrachinon-Derivate in die Assayplatten vorzulegen und die Detektionsreagenzien zuzugeben. Die Verbindungen wurden bei einer Assaykonzentration von 2 μM getestet. Um nur sehr potente Verbindungen zu identifizieren, wurde die Treffergrenze für mögliche Inhibitoren auf 70 % Inhibition festgesetzt. Das Screening wurde einmal wiederholt und die Mittelwerte beider Screenings wurden berechnet (Gemittelter Z'-Faktor: 0,84). Für potente Verbindungen wurde an dem entsprechenden NTPDase-Subtyp eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve aufgenommen und der IC_{50} -Wert ermittelt.

Für die humane NTPDase2 und die humane NTPDase3 konnten bei dieser Treffergrenze potente Derivate (sieben bzw. zwei Verbindungen) identifiziert werden. Die Screeningergebnisse bzw. die ermittelten IC_{50} -Werte dieser neun Verbindungen sind in Tabelle 10 für alle untersuchten NTPDasen aufgeführt.

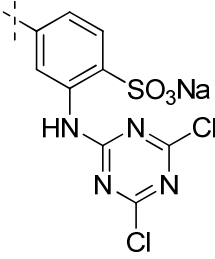
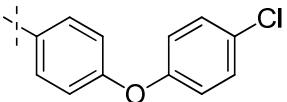
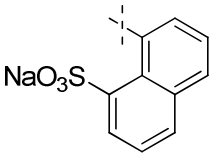
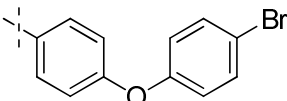
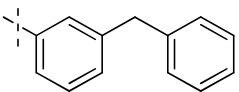
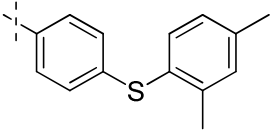
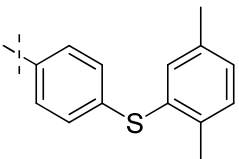
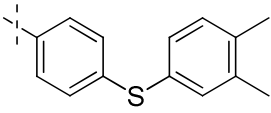
Tabelle 10: Inhibitorische Aktivität der potenten Anthrachinon-Derivate für die humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8

Test- verbindung	R	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
37		(52 %)	1,08 \pm 0,08	(42 %)	(21 %)



IC_{50} -Wert (μM) \pm SEM, n = 3
 (% Inhibition bei 2 μM , n = 2)

Tabelle 10 (Fortsetzung)

38 = RB-4		(-2 %)	(10 %)	0,39 ± 0,04	(-7 %)
39		(32 %)		1,39 ± 0,17	(23 %) (12 %)
40		(-1 %)	(15 %)	1,64 ± 0,26	(-11 %)
41		(33 %)		1,73 ± 0,29	(21 %) (10 %)
42		(36 %)		3,59 ± 0,85	(65 %) (28 %)
43		(46 %)		1,28 ± 0,34	(36 %) (27 %)
44		(38 %)		1,13 ± 0,27	(34 %) (17 %)
45		(51 %)		0,83 ± 0,05	(44 %) (27 %)

37, 39, 41, 42, 43, 44 und **45** wurden als potente Inhibitoren der NTPDase2 mit IC_{50} -Werten zwischen 0,83 und 3,59 μ M identifiziert. Für die NTPDase3 hingegen wurden RB-4 (**38**) und **40** als potente Verbindungen mit IC_{50} -Werten von 0,39 μ M und 1,64 μ M

bestimmt. Für die anderen beiden untersuchten Enzyme (NTPDase1 und NTPDase8) konnten keine Anthrachinon-Derivate identifiziert werden, die bei einer Endkonzentration von 2 μM zu > 70 % inhibierten.

4.1.1.9.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden anhand der Screeningergebnisse (% Inhibition) aller untersuchten 203 Anthrachinon-Derivate erstellt. Die Inhibitionswerte aller Verbindungen sind im Anhang aufgeführt, lediglich die für die Diskussion relevanten Werte werden im Folgenden angegeben. Für alle untersuchten NTPDasen gilt, dass eine Aminogruppe in 1-Position und eine Sulfonat-Gruppe in 2-Position wichtig für die inhibitorische Aktivität der Verbindungen zu sein scheint. Bei Untersuchungen einiger Desamino-Anthrachinon-Derivate und Verbindungen ohne Sulfonat-Gruppe konnten keine potenten Verbindungen identifiziert werden. Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Verbindungen sollten zur abschließenden Bewertung aber weitere Derivate getestet werden. Hierzu wäre die Synthese und Testung der in dieser Arbeit als potenteste Inhibitoren identifizierten Verbindungen ohne eine Amino- oder Sulfonat-Gruppe sinnvoll.

4.1.1.9.2 Humane NTPDase1

Da keine der Verbindungen eine sehr hohe inhibitorische Aktivität bei einer niedrigen Konzentration von 2 μM zeigte, können nur eingeschränkt Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Die Erkenntnisse, die aus den Screeningergebnissen gewonnen werden konnten, sind in Abbildung 38 zusammengefasst.

Die unsubstituierten 4-(Phenylthio)phenyl- und 4-(Phenoxy)phenyl-Derivate inhibierten die humane NTPDase1 bei einer Konzentration von 2 μM kaum (15 % und 6 %). Allerdings scheint ein Schwefelatom als Linker zu potenteren Verbindungen verglichen mit einem Sauerstoffatom zu führen (vergleiche auch **37** mit 52 % Inhibition und **39** mit 32 % Inhibition).

Die Einführung eines Methoxy- oder Chlorsubstituenten an der 4-Position des Phenylthio-Restes brachte eine deutliche Verbesserung der inhibitorischen Aktivität (34 % bzw. 52 % (**37**)). Eine Dimethylsubstitution wurde ebenfalls gut toleriert (**43**, 2,4-Position, 46 %; **44**, 2,5-Position, 38 % und **45**, 3,4-Position, 51 %).

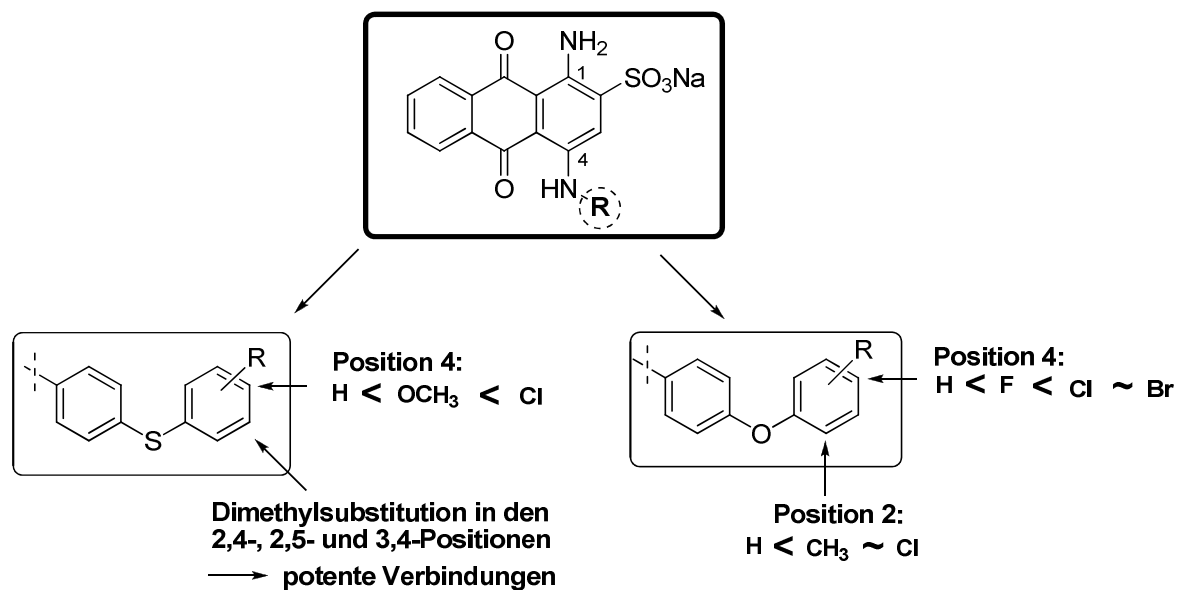


Abbildung 38: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate an der humanen NTPDase1

Für die 4-(Phenoxy)phenyl-Derivate konnte gezeigt werden, dass die Inhibition mit der Größe des substituierten Halogenatoms an Position 4 des Phenoxy-Restes zunahm ($H \sim F < Cl$ (**39**) = Br (**41**); 6 %, 10 %, 32 %, 33 %). Auch bei Substitution der Position 2 durch einen Methyl- (20 %) oder Chlorsubstituenten (26 %) konnten Derivate erhalten werden, die zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität verglichen mit dem unsubstituierten Derivat (6 %) führten.

Die Verbindung **37** (vergleiche Tabelle 10) wurde als potenteste Verbindung der untersuchten Serie identifiziert (52 % Inhibition). Daher wurde für **37** eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve aufgenommen und ein IC_{50} -Wert von $4,07 \pm 1,90 \mu M$ bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die humane NTPDase1 eine lipophile Bindungstasche zu haben scheint, in die sehr gut große, aromatische Strukturen und insbesondere ein 4-(Phenylthio)phenyl- und ein 4-(Phenoxy)phenyl-Rest mit verschiedenen Substituenten passen, die im Vergleich zu einem starren, planaren Anthracenyl-Rest (0 % Inhibition) eine höhere Flexibilität aufweisen. In zukünftigen Forschungsarbeiten sollten die Struktur-Wirkungs-Beziehungen noch gezielter untersucht werden. Es ist empfehlenswert z. B. zunächst den 4-(Phenylthio)phenyl-Substituenten am Anthrachinon-Grundgerüst beizubehalten und durch gezielte Variation verschiedener Mono- und Di-Substitutionen an dem Phenylthio-Rest noch potentere Inhibitoren der NTPDase1 zu erhalten. Weiterhin könnte auch die Anellierung eines weiteren Phenylringes vorteilhaft sein, da große Substituenten in Bezug auf die inhibitorische Aktivität favorisiert werden.

4.1.1.9.3 Humane NTPDase2

Die aus dem Screening einer Anthrachinon-Bibliothek gewonnenen Erkenntnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Verbindungen an der humanen NTPDase2 sind in der Abbildung 39 zusammengefasst.

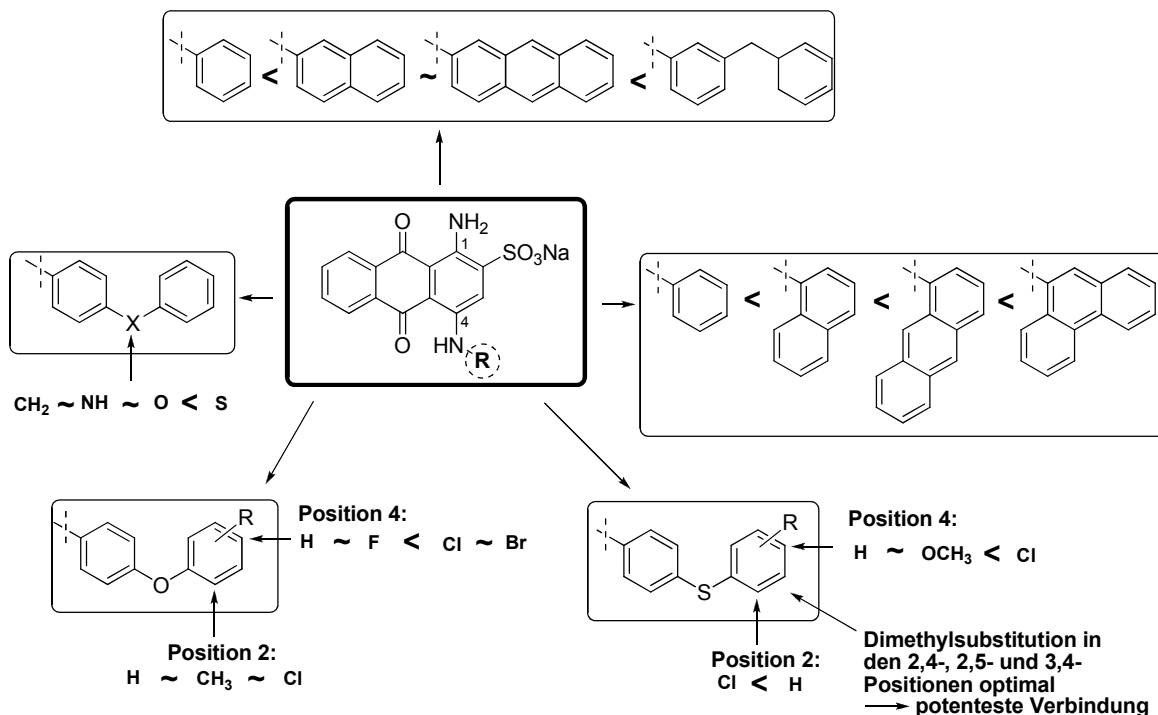


Abbildung 39: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate an der humanen NTPDase2

Die Potenz der Testverbindungen nahm mit der substituierten Ringgröße von Phenyl (15 %) zu Naphth-2-yl (34 %) und Anthracen-2-yl (35 %) zu. Die höchste Inhibition konnte mit einem 2-Benzylphenyl-Substituenten erreicht werden (81 %). Ebenso nahm die Potenz von Phenyl- (15 %), Naphth-1-yl (31 %) über Anthracen-1-yl (40 %) zu Phenanthren-9-yl (56 %) zu.

Auch die Testverbindung mit einem 4-Benzylphenylamino-Rest in 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts wurde gut toleriert (41 %). Ein Austausch der Methylengruppe durch die Heteroatome Stickstoff (41 %) und Sauerstoff (46 %) führte zu keiner Verbesserung, ein Schwefel-Atom hingegen erhöhte (auf 62 %) die inhibitorische Aktivität.

Durch Substitution großer Halogenatome an dem Phenoxy-Rest des 4-(Phenoxy)phenyl-Substituenten konnte die Potenz der Verbindungen steigern (H, 46 % ~ F, 49 % < Cl,

39, 71 % ~ Br, **41**, 74 %). Substituenten in 2-Position hingegen führten zu keiner Erhöhung der inhibitorischen Aktivität (H, 46 % ~ CH₃, 40 % ~ Cl, 48 %).

Bei den 4-(Phenylthio)phenyl-substituierten Anthrachinon-Derivaten schien die Substitution des Phenylthio-Restes in 2-Position mit einem Chlor-Atom allerdings zu einem leichten Aktivitätsverlust zu führen (H, 62 % > Cl, 41 %). Durch die Einführung eines Chlor-Substituenten in der 4-Position (**37**) konnte die inhibitorische Aktivität (78 %) gegenüber dem unsubstituierten Derivat (62 %) hingegen erhöht werden. Ein Methoxy-Rest führte zu keiner Verbesserung (64 %). Als sehr potente Testverbindungen der untersuchten Serie konnten die Dimethyl-substituierten 4-(Phenylthio)phenyl-Anthrachinon-Derivate identifiziert werden (**43**, 2,4-Position, 77 %, **44**, 2,5-Position, 71 % und **45**, 3,4-Position, 81 %). Für die potenteste Verbindung **45** wurde ein IC₅₀-Wert von 0,83 ± 0,05 µM ermittelt (vergleiche Tabelle 10).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die humane NTPDase2 ähnlich wie die humane NTPDase1 eine lipophile Bindungstasche zu haben scheint, in die sehr gut große, aromatische Strukturen und insbesondere ein 4-(Phenyl)thiophenyl- und ein 4-(Phenoxy)phenyl-Rest passen. Im Gegensatz zu der NTPDase1 ist die weitere Substitution dieser Reste nicht essentiell. Zudem werden von der NTPDase2 auch starre, polyzyklische Substituenten gut toleriert. Somit könnten durch Optimierung von Verbindungen mit polyzyklischen Resten (z.B. durch weitere Substitution dieser) Anthrachinon-Derivate erhalten werden, die noch potentere Inhibitoren darstellen und gleichzeitig NTPDase2-selektiv sind.

4.1.1.9.4 Humane NTPDase3

Für die humane NTPDase3 sind die wichtigsten aus dem Screening gewonnenen Erkenntnisse zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate in der nachfolgenden Abbildung 40 dargestellt.

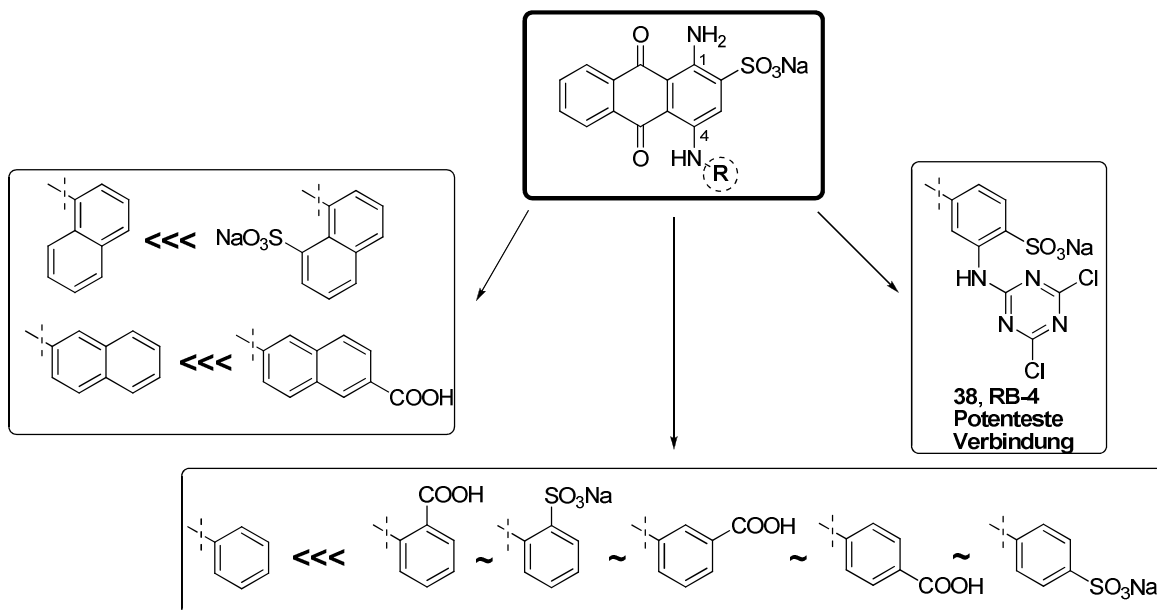


Abbildung 40: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate an der humanen NTPDase3

Nur Derivate mit einem substituierten Aromaten in 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts zeigten eine Inhibition, wobei die Art des Substituenten entscheidend war. Die Einführung saurer funktioneller Gruppen wie einer Carboxylat-Gruppe (~50 %) oder Sulfonat-Gruppe (~50 %) an dem Phenylring scheint optimal, wobei die Position der Substitution nicht so entscheidend ist. Ein Rest in 2-, 3- oder auch 4-Position wird gut toleriert. Der Austausch eines Phenylrings (0 %) gegen bicyklische Substituenten wie Naphth-1-yl und Naphth-2-yl brachte keine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität (0 %). Die Einführung von sauren funktionellen Gruppen wie einer Sulfonat- (73 %) oder Carboxylat-Gruppe (59 %) konnte allerdings auch die Potenz der bicyklischen Verbindungen erhöhen. Als potentestes Anthrachinon-Derivat der untersuchten Serie wurde RB-4 (**38**, 87 %, IC₅₀ = 0,39 ± 0,04 µM) identifiziert (vergleiche Tabelle 10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Bindungstasche der humanen NTPDase3 von den Bindungstaschen der NTPDasen Subtyp-1, und -2 deutlich zu unterscheiden scheint. Für eine hohe inhibitorische Aktivität eines Anthrachinon-Derivates ist eine saure funktionelle Gruppe essentiell und liefert selektive NTPDase3-Inhibitoren. Die Ringgröße der in 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts substituierten Reste scheint hingegen nicht so entscheidend zu sein. In zukünftigen Forschungsarbeiten sollten die Struktur-Wirkungs-Beziehungen noch gezielter durch systematisches Vorgehen aufgeklärt werden. So könnte die Synthese weiterer Verbindungen, welche saure Substituenten (Mono- oder auch Disubstitution) an einem Phenyl- oder Naphthylring

in 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts besitzen, hilfreich sein. Auch die Substitution eines zu einer Carboxylat-Gruppe bioisosteren Tetrazolrings könnte beispielsweise potente Verbindungen liefern.

4.1.1.9.5 Humane NTPDase8

Für die humane NTPDase8 können keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate diskutiert werden, da keine der getesteten Verbindungen bei 2 μM als potenter Inhibitor des Enzyms identifiziert werden konnte. Die höchste gemessene Inhibition lag bei 28 % des Enzyms für das Derivat **42** (vergleiche Tabelle 10). Auch die 4-(Phenylthio)phenyl-Derivate **43**, **44** und **45** scheinen nur schwache Inhibitoren der NTPDase8 zu sein (vergleiche Tabelle 10). Die Untersuchungen weiterer Anthrachinon-Derivate mit großen, flexiblen Substituenten in 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts erscheinen daher sinnvoll. Die Treffergrenze sollte niedriger (z. B. $\geq 40\%$) gewählt werden, um auch moderate Inhibitoren der NTPDase8 zu identifizieren, die dann gezielt optimiert werden können. Schließlich ist bisher noch kein potenter Hemmstoff dieses Isoenzym bekannt.

4.1.2 Fluoreszenzpolarisationsassays für den Nachweis von ADP oder AMP

4.1.2.1 Allgemeines

Neben dem zuvor beschriebenen Malachitgrün-Assay wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals erfolgreich fluoreszenzpolarisationsbasierte Aktivitätsbestimmungen für die humane NTPDase1, -2, -3 und -8 entwickelt, die einige Vorteile gegenüber dem Standardassay aufweisen und in Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert werden.²¹⁷

Werden kleine, fluoreszenzmarkierte Moleküle (Tracer) mit polarisiertem Licht angeregt, emittieren sie das Licht depolarisiert (kleine Polarisationswerte), da sie während des Anregungszustandes schnell rotieren. Große Moleküle hingegen rotieren langsamer, sodass das emittierte Licht polarisiert bleibt (große Polarisationswerte) (siehe Kapitel 1.7).^{188,218,219,220} Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisationsmessung bildet die Grundlage für die neu etablierten Aktivitätsbestimmungen. Die dabei eingesetzten Detektionslösungen enthalten mit dem Farbstoff Alexa-633 fluoreszenzmarkiertes ADP oder AMP (Tracer), welches an den entsprechenden ADP- oder AMP-Antikörper gebunden vorliegt. Das während der Enzymreaktion entstandene ADP oder AMP verdrängt den entsprechenden Tracer von dem Antikörper. Der freie Tracer (= kleineres Molekül) kann schneller rotieren und es kommt zu einer Abnahme der Polarisationswerte (vergleiche Kapitel 1.7.1).^{192,193}

Die FP-Assays ermöglichen die direkte Quantifizierung der enzymatischen Reaktionsprodukte ADP oder AMP im 384-Loch-Format. Zudem sind nur geringe Mengen an Enzymsuspensionen, Substrat- und Testlösungen notwendig. Dies sind gute Voraussetzungen für ein HTS, wenn Enzympräparationen und/oder Testverbindungen nur in geringen Mengen vorliegen. Das Beenden der Enzymreaktionen durch Zugabe der EDTA-enhaltenden Detektionslösung ist sehr schonend und nach nur einer Stunde (ADP-Assay) oder zwei Stunden (AMP-Assay) hat sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Tracer eingestellt und die Polarisations-signale können am Messgerät ausgelesen werden.

4.1.2.2 Etablierung der Methoden

Die in den Reaktionsansätzen enthaltene Antikörperkonzentration hat einen großen Einfluss auf das Messfenster der FP-Assays. Demnach wurden für die Etablierung der Methoden zunächst die optimalen Antikörperkonzentrationen in Anwesenheit der

gewünschten Substratkonzentrationen (20 μM ATP bzw. 10 μM ADP) ermittelt. Für die Bestimmung der optimalen ADP-Antikörperkonzentration bei Einsatz von ATP-Konzentrationen von 0,1 μM bis 1000 μM ist eine Geradengleichung veröffentlicht, sodass sich die optimale ADP-Antikörperkonzentration berechnen lässt. Sie wurde bei Einsatz von 20 μM ATP als Substrat mit 23 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt und lieferte bei Substratumsätzen von 10 % (Anfangsumsatzgeschwindigkeiten) ein gutes Messfenster von 159 mP.²¹⁷

Für die Bestimmung der optimalen AMP-Antikörperkonzentration ist bisher keine Geradengleichung veröffentlicht, sodass sie experimentell ermittelt wurde. Um die optimale AMP-Antikörperkonzentration für den AMP-Assay zu bestimmen, wurden Antikörpertitrations durchgeföhrt, wobei ein Substratumsatz von 0 % (10 μM ADP) und 10 % (9 μM ADP und 1 μM AMP) simuliert wurde. Die gemessenen Polarisationswerte wurden grafisch gegen die verschiedenen Antikörperkonzentrationen aufgetragen und in einer sigmoidalen Titrationskurve dargestellt (Abbildung 41, A). Wird die Differenz der Polarisationswerte beider Titrationskurven (Δ mP) gegen die Antikörperkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 41, B) erhält man eine glockenförmige Kurve. Die optimale Antikörperkonzentration entspricht der Konzentration des Kurvenmaximums (= größtes Messfenster) und wurde mit 8 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Diese wurde entsprechend für die weiteren Versuche eingesetzt. Bei einem Substratumsatz von 10 % konnte so ein Assayfenster von 176 mP erreicht werden.²¹⁷

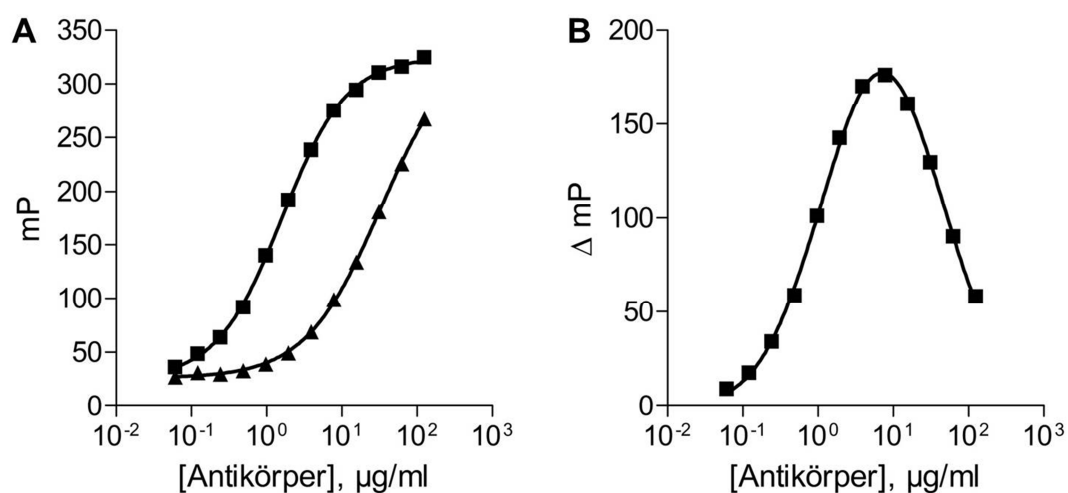


Abbildung 41:²¹⁷ AMP-Antikörpertitration. (A) Antikörpertitration in Anwesenheit von 10 μM ADP (■) und 9 μM ADP/1 μM AMP (▲). (B) Differenzplot der beiden Titrationskurven; die maximale Differenz wurde bei einer Antikörperkonzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ erhalten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 2$.

Bei Aktivitätsuntersuchungen von Enzymen ist es von Bedeutung im linearen Bereich der Umsatzgeschwindigkeiten zu arbeiten. Dies ist gewährleistet, wenn weniger als 10 % des Substrates zu dem entsprechenden Produkt umgesetzt werden. Durch die Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration für die gewählten Substratkonzentrationen konnten sehr sensitive Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten erhalten werden. Die niedrigen Substratkonzentrationen von 20 μM ATP (NTPDasen2, -3 und -8) und 10 μM ADP (NTPDase1) wurden gewählt, da diese Konzentrationen in der gleichen Größenordnung wie die mithilfe des Malachitgrün-Assays bestimmten K_M -Werte aller NTPDasen liegen (siehe Kapitel 4.1.1.2). Die Möglichkeit mit sehr niedrigen Substratkonzentrationen unterhalb der K_M -Werte von NTPDasen zu arbeiten vereinfacht die Identifizierung kompetitiver Inhibitoren, ermöglicht das Testen schwerlöslicher Verbindungen und die Durchführung von Fragment-basierten Screenings, welche in der Arzneimittelforschung in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus geraten sind. Die Identifikation von aktiven Molekülfragmenten kann gute Ansätze für die Entwicklung neuer Leitstrukturen liefern.²²¹ Die neuen Methoden können zudem problemlos für die Aktivitätsbestimmungen weiterer ADP- und AMP-produzierender Enzyme (z. B. E-NPPs) eingesetzt werden, da sich benötigte Antikörperkonzentration für die entsprechend eingesetzte Substratkonzentration anpassen lässt.

Nach der Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentrationen wurden Standardkurven generiert, um eine Korrelation zwischen der Produktbildung und dem FP-Signal zu zeigen. Die Enzymreaktion wurde dabei durch Abnahme der Substratkonzentration (ATP bzw. ADP) und entsprechende Zunahme der Produktmenge (ADP bzw. AMP) simuliert (Abbildung 42). Die Standardkurven können genutzt werden, um die während der Enzymreaktionen entstehenden Produktmengen an ADP (für das Substrat ATP) und AMP (für das Substrat ADP) über die gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte zu quantifizieren.²¹⁷

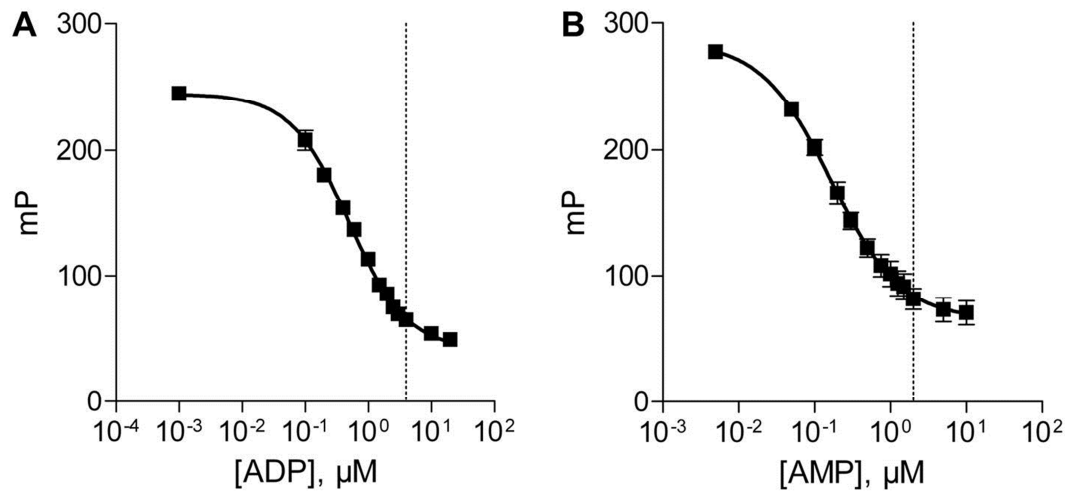


Abbildung 42:²¹⁷ Standardkurven. (A) ATP/ADP Standardkurve (Gesamtkonzentration von 20 µM); gestrichelte Linie: 20% Substratumsatz. (B) ADP/AMP Standardkurve (Gesamtkonzentration von 10 µM); gestrichelte Linie: 20% Substratumsatz. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3.

Ein linearer Zusammenhang zwischen gemessenen Polarisationswerten und Produktbildung konnte für Substratumsätze von 0,5 % bis 20 % gezeigt werden (gestrichelte Linie). Das ermöglicht das Arbeiten im linearen Bereich und zeigt die hohe Sensitivität der neu etablierten Methoden.

Um zu gewährleisten, dass während der Aktivitätsbestimmungen im linearen Bereich des Substratumsatzes gearbeitet wird, wurden im weiteren die Enzymkonzentrationen bestimmt, bei welchen maximal 10 % Substrat umgesetzt werden. Hierzu wurden Enzymtitrationen in Anwesenheit der entsprechenden Substratkonzentrationen von 10 µM ADP (humane NTPDase1) und 20 µM ATP (humane NTPDase2, humane NTPDase3 und humane NTPDase8) durchgeführt. Die Polarisationswerte (mP) wurden grafisch gegen die Enzymkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 43).²¹⁷

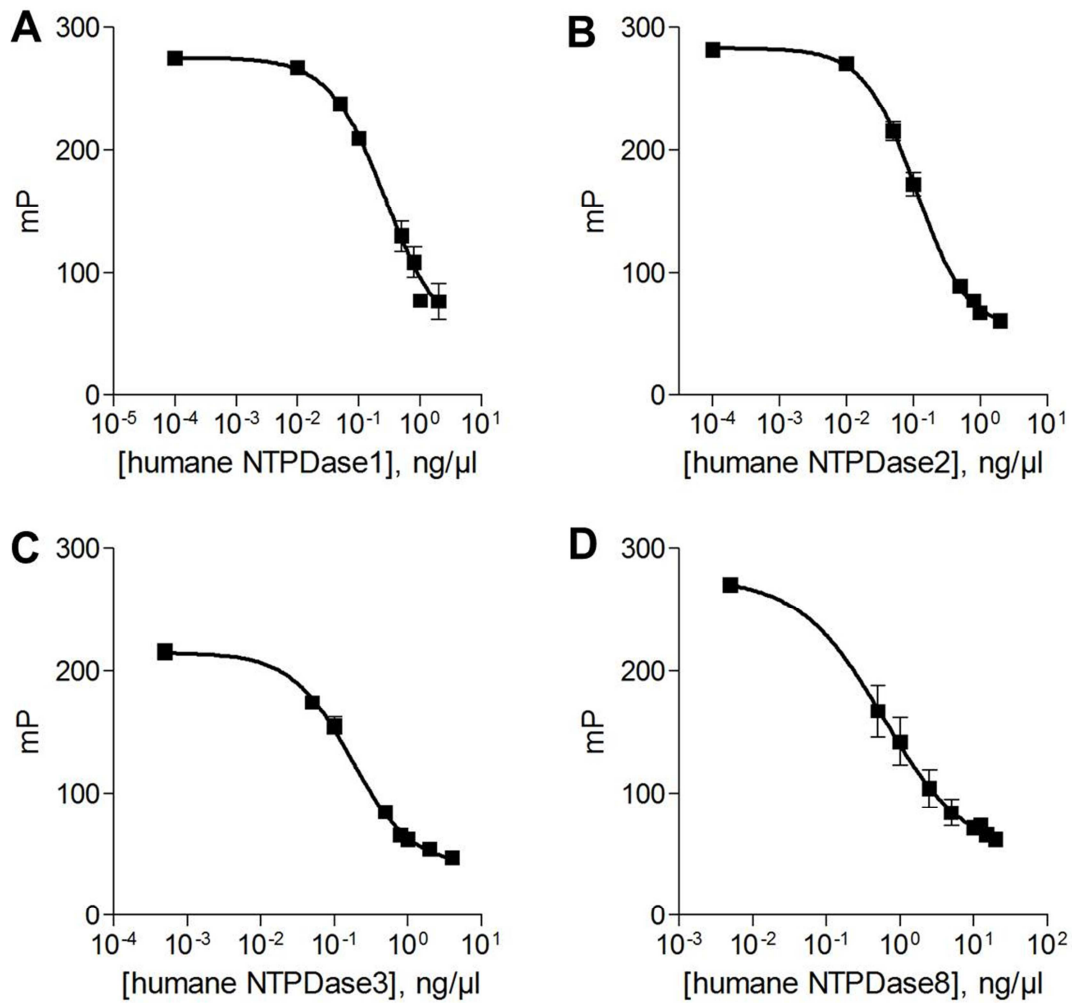


Abbildung 43:²¹⁷ Enzymtitrationen in der Anwesenheit von 10 μM ADP (**A**, humane NTPDase1) und 20 μM ATP (**B**, humane NTPDase2; **C**, humane NTPDase3; **D**, humane NTPDase8). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Mithilfe der Standardkurven wurde die entstandene Produktmenge (AMP oder ADP) aus den Polarisationswerten berechnet und gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Es lässt sich zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge an gebildetem Produkt und den zunehmenden Enzymkonzentrationen besteht (Abbildung 44).²¹⁷

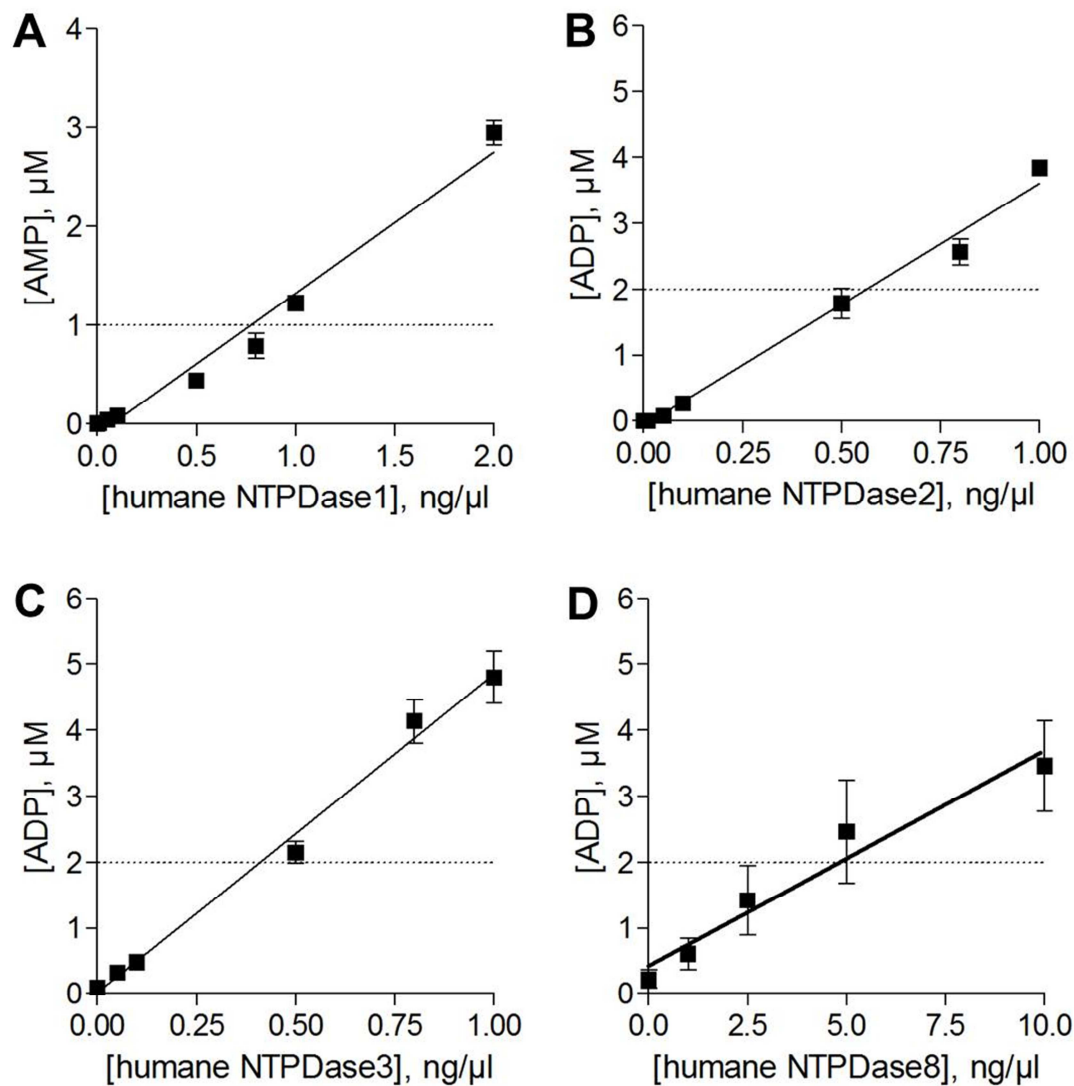


Abbildung 44:²¹⁷ Linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Produktmenge. Die während den Enzymreaktionen gebildete Produktmenge wurde gegen die entsprechend verwendeten Enzymkonzentrationen aufgetragen; gestrichelte Linie: 10 % Produktbildung von AMP (**A**, humane NTPDase1) und ADP (**B**, humane NTPDase2; **C**, humane NTPDase3; **D**, humane NTPDase8). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Die Enzymkonzentrationen, die zu einem Substratumsatz von etwa 10 % führten (gestrichelte Linien), wurden als optimal festgelegt. Sie wurden für 10 μM ADP mit 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase1) und für 20 μM ATP mit 0,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase2), 0,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase3) und 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (NTPDase8) bestimmt.²¹⁷ Allerdings variierte die Enzymaktivität geringfügig bei verschiedenen verwendeten Enzymproben, sodass vor Beginn einer Versuchsreihe die optimale Enzymkonzentration in einem Vorversuch ermittelt und angepasst wurde.

4.1.2.3 Validierung

Nach Optimierung der Assayparameter wurde untersucht, ob die Assays für ein HTS geeignet sind. Für die Validierung wurde der Z' -Faktor bestimmt, der nach der Gleichung von Zhang *et al.*¹⁹¹ (siehe Kapitel 3.1.1.6) berechnet werden kann. Für die NTPDase Assays mit ATP als Substrat wurden Z' -Faktoren von 0,77 (NTPDase2), 0,70 (NTPDase3) und 0,76 (NTPDase8) und mit ADP als Substrat von 0,71 (NTPDase1) bestimmt. Demnach sind die neuen Assays sehr robust, gut reproduzierbar und daher ausgezeichnet geeignet für ein HTS.²¹⁷

Für die weitere Validierung der FP-Assays sollte in einem nächsten Schritt gezeigt werden, dass es möglich ist, mithilfe der neuen Methoden Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufzunehmen. Exemplarisch wurde hierzu der FP-Assay zur Aktivitätsbestimmung der NTPDase3 ausgewählt. Es wurde eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve des Anthrachinon-Derivates PSB-06126 (**35**) aufgenommen (siehe Abbildung 45), welches bereits als potenter Inhibitor der humanen NTPDase3 (vergleiche Kapitel 4.1.1.6) mithilfe des Malachitgrün-Assays und der Ratten NTPDase3 (Baqi *et al.*⁹⁰) identifiziert wurde.

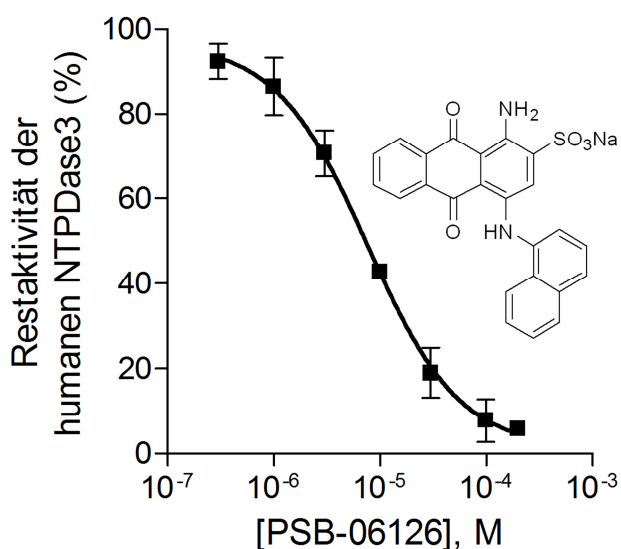


Abbildung 45:²¹⁷ Konzentrations-Inhibitions-Kurve von PSB-06126 (**35**). Bestimmung der Restaktivität der humanen NTPDase3 mithilfe des FP-Assays bei einer Substratkonzentration von 20 μ M ATP ($IC_{50} = 7,76 \pm 0,88 \mu$ M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Es wurde ein IC_{50} -Wert von $7,76 \pm 0,88 \mu\text{M}$ bestimmt und daraus ein K_i -Wert von $4,39 \pm 0,50 \mu\text{M}$ berechnet, welcher in der gleichen Größenordnung wie der mittels Malachitgrün-Assay bestimmte K_i -Wert liegt ($3,41 \pm 0,52 \mu\text{M}$).

Demnach konnte gezeigt werden, dass es mit den neu etablierten FP-Assays möglich ist, Enzyminhibition zu detektieren und Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufzunehmen.

4.1.2.4 Screening

Da bisher kaum oder nur schwach potente Inhibitoren der NTPDasen bekannt sind, ist das HTS von divers zusammengesetzten Substanzbibliotheken ein vielversprechender Ansatz zur Identifizierung neuer Leitstrukturen. In dieser Arbeit wurde nach erfolgreicher Etablierung der FP-Assays für alle membranständigen NTPDasen, zunächst der neu etablierte NTPDase3 FP-Assay verwendet, um eine Arzneistoffbibliothek (438 Testverbindungen) mit strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen bei einer Endkonzentration von $20 \mu\text{M}$ bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität zu testen. Verbindungen, die eine Inhibition von mindestens 30 % zeigten, wurden als Treffer und somit potentielle Inhibitoren definiert. Die Screeningergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.²¹⁷

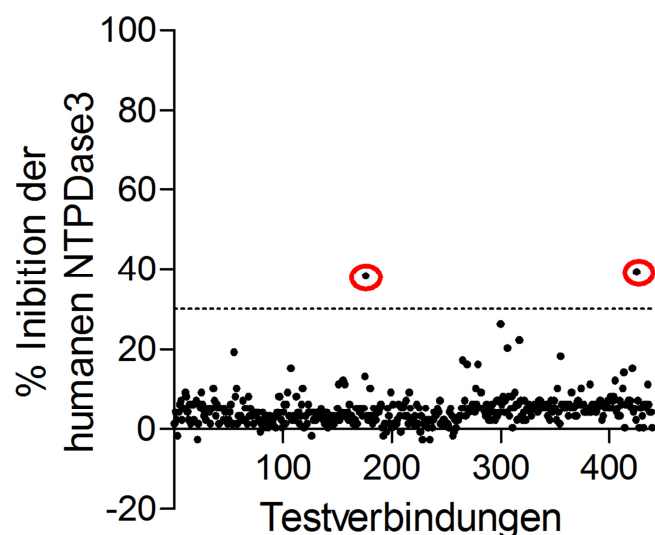


Abbildung 46:²¹⁷ Screeningergebnisse mit dem FP NTPDase3-Assay. 438 Testverbindungen einer Arzneistoffbibliothek wurden bei einer Endkonzentration von jeweils $20 \mu\text{M}$ bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber der NTPDase3 getestet und die Enzyminhibition (%) berechnet. Gestrichelte Linie: Treffergrenze bei 30 % Inhibition (Z' -Faktor: 0,87). Zwei Verbindungen (rot umkreist) konnten als potentielle Inhibitoren der NTPDase3 identifiziert werden.

Zwei Verbindungen (Trefferate von 0,5 %, Z'-Faktor 0,87) wurden als Inhibitoren der humanen NTPDase3 identifiziert (Abbildung 47).²¹⁷ Es handelte sich dabei um Liothyronin (Inhibition von 39 %, **46**) und Chloramin T (Inhibition von 38 %, **47**). Zur Identitätsprüfung und Reinheitsanalyse wurden die Verbindungen anschließend massenspektrometrisch untersucht. Für das instabile Chloramin T, das elementares Chlor freisetzt, konnten nur noch ein Zersetzungsprodukt identifiziert werden. Das Produkt *p*-Toluensulfonamid (**48**, Abbildung 47) wurde ebenfalls an der humanen NTPDase3 hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität untersucht, es konnte aber keine Hemmung gezeigt werden. Womöglich kommt es zu einer Chlorierung des Enzyms.

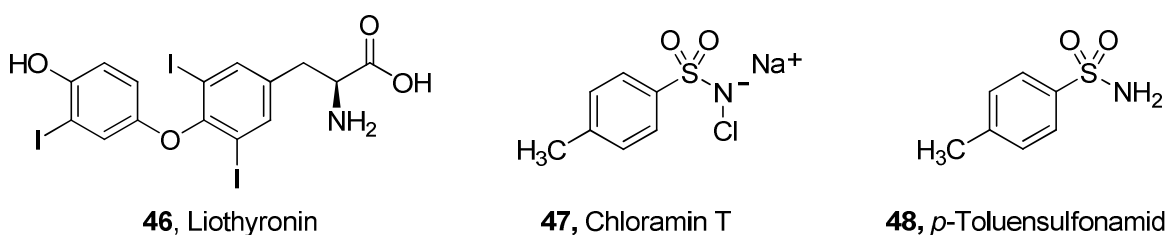


Abbildung 47: Struktur von Liothyronin (**46**), Chloramin T (**47**) und dem Abbauprodukt *p*-Toluensulfonamid (**48**)

Barreto *et al.*²²² zeigten bereits, dass Liothyronin einen Einfluss auf die NTPDase3-Aktivität und Expression in isolierten Herzmuskelzellen hat. Hier schien die Zugabe von bis zu 1 nM Liothyronin allerdings die Aktivität und Expressionsrate zu erhöhen. Für 10 nM war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.²²² In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen wurden deutlich höhere Konzentrationen der Verbindung (20 μ M) und zudem das rekombinante Enzym (Membranpräparationen) verwendet, sodass kein direkter Vergleich möglich ist. Anthrachinon-Derivate, die dem Liothyronin strukturell ähnliche Teilstrukturen enthalten (z.B. Verbindung **39** und **41**, vergleiche Tabelle 10), zeigten ebenfalls eine moderate Hemmung (23 % bzw. 21 %) der NTPDase3 (vergleiche Kapitel 4.1.1.9). Die Synthese der potenten Anthrachinon-Derivate ohne das Anthrachinon-Grundgerüst oder neuer strukturell von Liothyronin abgeleiteter Verbindungen könnte daher ein Ziel weiterer Forschungsarbeiten sein.

4.1.2.5 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die Testverbindungen PSB-06126 (**35**, NTPDase2 und -3), LE 135 (**32**, NTPDase2 und -3) und Resveratrol (**33**, NTPDase2) waren mithilfe des Malachitgrün-Assays Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen worden (vergleiche Kapitel

4.1.1.6). Um die inhibitorische Aktivität dieser Testverbindungen zu verifizieren, sollten zusätzlich die IC_{50} -Werte mithilfe der neuen FP-Assays ermittelt werden.

PSB-06126 (**35**) wurde als Standardinhibitor bereits zur Validierung des FP-Assays eingesetzt, indem eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve aufgenommen wurde (vergleiche Kapitel 4.1.2.3). Es wurde ein IC_{50} -Wert von $7,76 \pm 0,88 \mu\text{M}$ (K_i -Wert: $4,39 \pm 0,50 \mu\text{M}$) bestimmt. Die mit dem FP-Assay ermittelte Konzentrations-Inhibitions-Kurve für PSB-06126 (**35**) und die NTPDase3 ist nochmal zusammen mit der Konzentrations-Inhibitions-Kurve für die NTPDase2 in Abbildung 48 dargestellt.

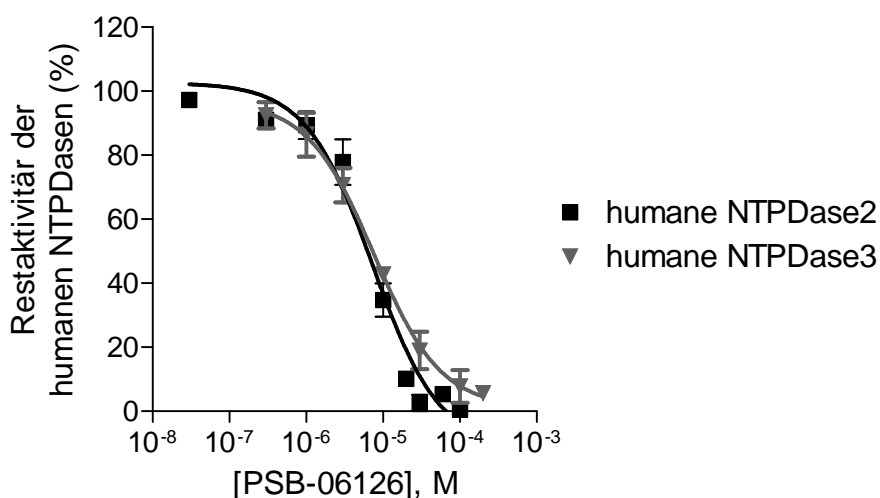


Abbildung 48: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von PSB-06126 (**35**). Bestimmung der Restaktivität der humanen NTPDase2 und -3 mithilfe des ADP-FP-Assays bei einer Substratkonzentration von $20 \mu\text{M}$ ATP. Humane NTPDase2: $IC_{50} = 5,77 \pm 0,41 \mu\text{M}$ und humane NTPDase3: $IC_{50} = 7,76 \pm 0,88 \mu\text{M}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Für die humane NTPDase2 wurde ein IC_{50} -Wert von $5,77 \pm 0,41 \mu\text{M}$ (K_i -Wert: $3,02 \pm 0,22 \mu\text{M}$) bestimmt. Die K_i -Werte, die aus dem Malachitgrün-Assay ($1,06 \pm 0,12 \mu\text{M}$ für die NTPDase2 bzw. $3,41 \pm 0,52 \mu\text{M}$ für die NTPDase3) und aus dem FP-Assay bestimmt wurden, sind sehr gut vergleichbar (Vergleiche Kapitel 4.1.1.6). Somit lässt sich PSB-06126 (**35**) als potenter Inhibitor der NTPDase2 und NTPDase3 verifizieren.

Die für LE 135 (**32**) aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven sind in Abbildung 49 dargestellt.

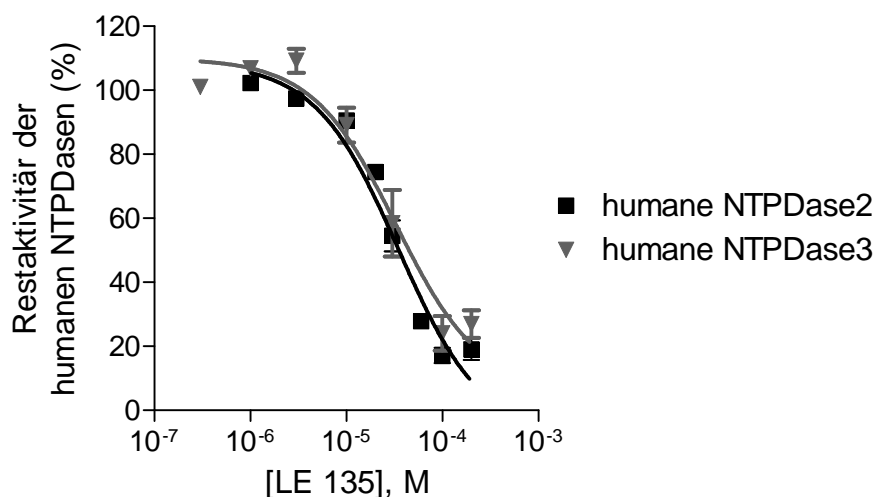


Abbildung 49: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von LE 135 (**32**). Bestimmung der Restaktivität der humanen NTPDase2 und -3 mithilfe des ADP-FP-Assays bei einer Substratkonzentration von 20 μ M ATP. Humane NTPDase2: $IC_{50} = 43,2 \pm 15,7 \mu$ M und humane NTPDase3: $IC_{50} = 35,9 \pm 8,3 \mu$ M. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Für LE 135 (**32**) wurden entsprechend IC_{50} -Werte von $43,2 \pm 15,7 \mu$ M für die humane NTPDase2 und $35,9 \pm 8,3 \mu$ M für die humane NTPDase3 ermittelt.

Die Konzentrations-Inhibitions-Kurve für den selektiven NTPDase2-Inhibitor Resveratrol (**33**) ist in Abbildung 50 dargestellt.

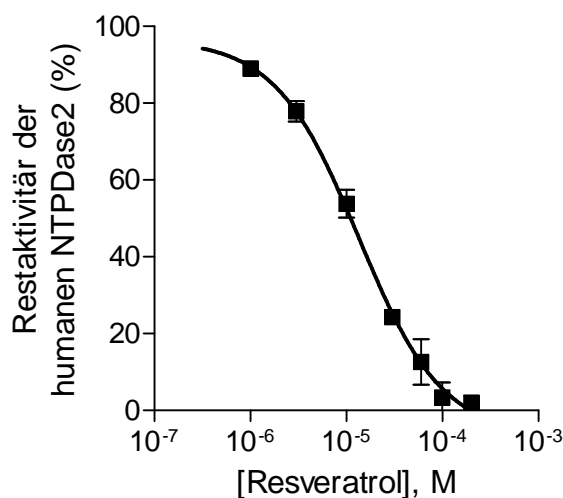


Abbildung 50: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von Resveratrol (**33**). Bestimmung der Restaktivität der humanen NTPDase2 mithilfe des ADP-FP-Assays bei einer Substratkonzentration von 20 μ M ATP ($IC_{50} = 14,0 \pm 2,2 \mu$ M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Für Resveratrol (**33**) wurde ein IC_{50} -Wert von $14,0 \pm 2,2 \mu\text{M}$ bestimmt. Da der Hemmmechanismus der untersuchten Testverbindungen LE 135 (**32**) und Resveratrol (**33**) in Kapitel 4.1.1.7 jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte, ist die Berechnung der K_i -Werte nicht möglich. IC_{50} -Werte, die mithilfe verschiedener Assays bestimmt wurden, lassen sich nicht gut vergleichen, da die Substratkonzentrationen und auch die Assaybedingungen anders sein können.

Allerdings lässt sich zumindest feststellen, dass die erhaltenen IC_{50} -Werte aus beiden Assays in der gleichen Größenordnung liegen ($2,71 \pm 0,25 \mu\text{M}$ mit dem Malachitgrün-Assay und $14,0 \pm 2,2 \mu\text{M}$ mit dem FP-Assay für Resveratrol gegenüber der NTPDase2, vergleiche Kapitel 4.1.1.6).

Somit lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die neu etablierten FP-Assays sehr gut für die Aufnahme von Konzentrations-Inhibitions-Kurven und die Bestimmung von IC_{50} -Werten geeignet sind. Sie liefern vergleichbare Ergebnisse zu dem Malachitgrün-Assay (Vor- und Nachteile der Assays siehe Kapitel 4.4).

4.1.2.6 Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindungen

POMs sind negativ geladene, anorganische Metallkomplexe (vergleiche Einleitung Kapitel 1.5.1.7).¹¹⁴ Sie zeigen antitumorale^{223,224}, antibakterielle^{225,226}, antivirale^{227,228} und antidiabetische^{114,229} Aktivität. Allerdings ist ihr molekularbiologischer Wirkungsmechanismus noch nicht gut untersucht. Aufgrund ihrer vielen negativen Ladungen bei physiologischem pH-Wert können POMs schwierig Zellmembranen überwinden. Daher wurde spekuliert, dass die Metallkomplexe ihre Wirkung möglicherweise über die Inhibition extrazellulär vorkommender Enzyme hervorrufen.²³⁰ Kürzlich wurden POMs bereits in unserer Arbeitsgruppe als potente Inhibitoren der Ratten-NTPDasen mit K_i -Werten zwischen $0,140 - 37,4 \mu\text{M}$ identifiziert.⁹¹ Weiterhin wurden die Verbindungen in vielen biologischen Studien zur Inhibition von NTPDasen eingesetzt. Die Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen einer Hemmung der Enzyme durch die POMs und den für POMs beschriebenen Wirkungen schließen.^{231,232,233,234} Da bisher nur Inhibitionsstudien dieser Verbindungsklasse gegenüber den isolierten Ratten-Enzymen veröffentlicht wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit entsprechende Untersuchungen an den humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 erfolgen. Hierfür wurden 12 POMs und vier strukturell verwandte Rheniumcluster-Verbindungen eingesetzt. In der nachfolgenden Tabelle 11 sind die untersuchten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 11:²³⁵ Untersuchte Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindungen

Verbindung	Summenformel
49	$\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 21\text{H}_2\text{O}$
50	$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot \text{H}_2\text{O}$
51	$\text{K}_7[\text{Ti}_2\text{W}_{10}\text{PO}_{40}] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
16	$\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \cdot 13\text{H}_2\text{O}$
52	$\text{K}_{10}[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2] \cdot 22\text{H}_2\text{O}$
53	$(\text{NH}_4)_{18}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$
54	$\text{Na}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
55	$\text{Na}_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 30\text{H}_2\text{O}$
56	$\text{Na}_{20}[\text{P}_6\text{W}_{18}\text{O}_{79}] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$
57	$\text{Na}_{33}[\text{H}_7\text{P}_8\text{W}_{48}\text{O}_{184}] \cdot 92\text{H}_2\text{O}$
58	$\text{Na}_{16}[(\text{O}_3\text{POPO}_3)_4\text{W}_{12}\text{O}_{36}] \cdot 38\text{H}_2\text{O}$
59	$\text{Na}_{16}[(\text{O}_3\text{PCH}_2\text{PO}_3)_4\text{W}_{12}\text{O}_{36}] \cdot 16\text{H}_2\text{O}$
60	$\text{K}_4[(\text{Re}_6\text{S}_8)(\text{OH})_6] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
61	$\text{K}_4[(\text{Re}_6\text{Se}_8)(\text{OH})_6] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
62	$\text{K}_4[(\text{Re}_6\text{S}_8)(\text{CH}_3\text{COO})_6] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
63	$\text{K}_4[(\text{Re}_6\text{S}_8)(\text{HCOO})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Die POMs bilden verschiedene dreidimensionale Strukturen wie die Keggin-Struktur (**16**, **49**, **50**, **51** und **54**). Der Komplex ist aus einem zentralen Tetraeder, umgeben von vier trimetallischen Gruppen, zusammengesetzt. Die Verbindung **52** ist ein von der Keggin-Struktur abgeleiteter Sandwichkomplex. Bei der Testverbindung **53** handelt es sich um ein Kryptat (mit Natrium im zentralen Hohlraum). Einige POMs sind auch scheiben- (**55**) bananen- (**56**), rad- (**57**) oder sattelförmige (**58** und **59**) Komplexe. Die Strukturen der POMs und der untersuchten Rheniumcluster-Verbindungen **60** - **63** sind in Abbildung 51 dargestellt.^{235,236}

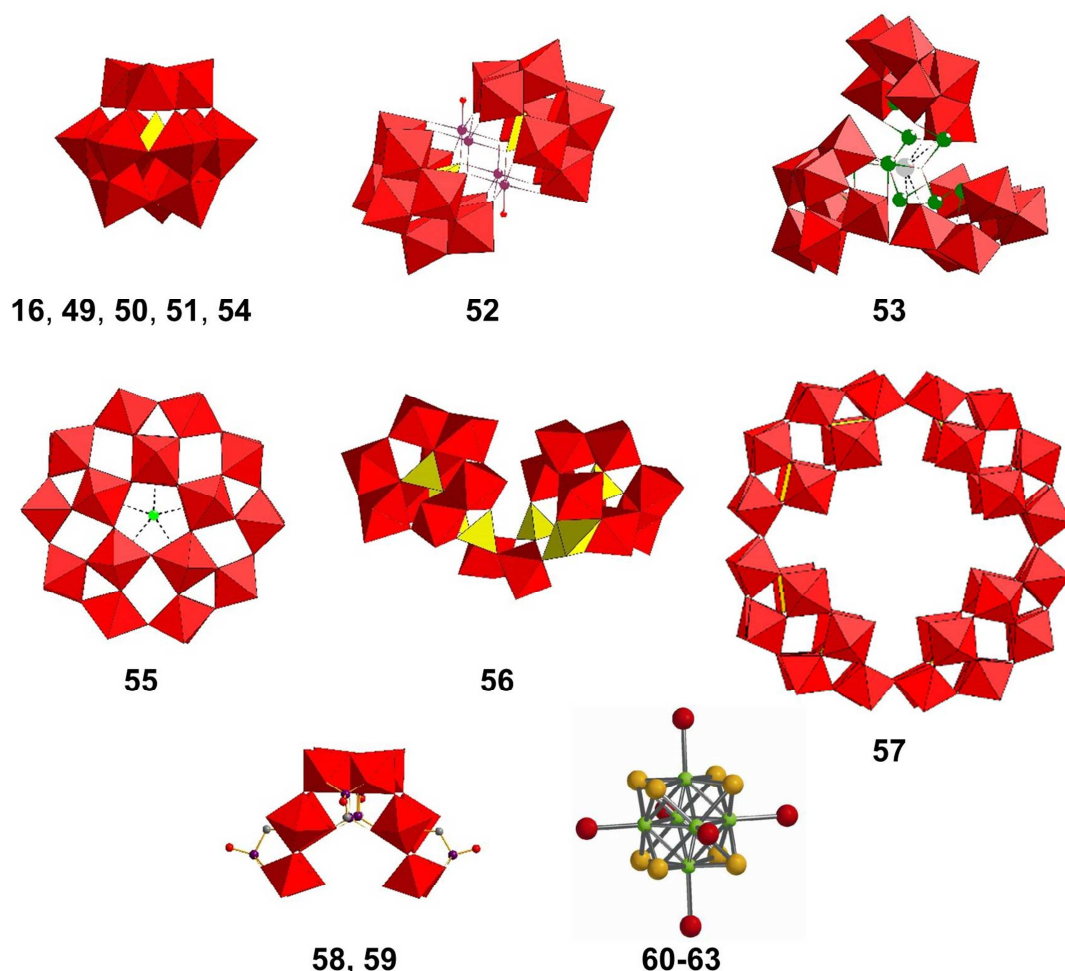


Abbildung 51:²³⁵ Strukturen der in dieser Studie untersuchten Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindungen: Keggin-Struktur der Verbindungen **16**, **49**, **50**, **51**, und **54**; der von der Keggin-Struktur abgeleitete Sandwichkomplex **52**; das Kryptat **53**, die scheibenförmige Struktur der Verbindung **55**; die bananenförmige Verbindung **56**, die radförmige Struktur der Verbindung **57**; die sattelförmige Struktur der Verbindungen **58** und **59**; die Struktur der anionischen Clusterkomplexe $[\text{Re}_6\text{Q}_8)\text{L}_6]^{14-}$ von **60** (Q = S, L = OH), **61** (Q = Se, L = OH), **62** (Q = S, L = CH_3COO) und **63** (Q = S, L = HCOO).

Die POMs und die Rheniumcluster-Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 20 μM in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den NTPDasen1, -2, -3 und -8 untersucht. Für Verbindungen, die eine Inhibition > 50 % zeigten, wurden Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen und der IC_{50} -Wert bestimmt. Der Hemmmechanismus der POMs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt. Auf Grundlage bereits publizierter Daten von Zebisch *et al.*⁸⁷ und Wall *et al.*²³² kann aber von einem nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus ausgegangen und somit der K_i -Wert gleich dem IC_{50} -Wert gesetzt werden (Annahme: $\alpha = 1$)⁴. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 12:²³⁵ Inhibitorische Aktivität der Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindung gegenüber den humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8

Verbin- dung	$K_i \pm \text{SEM} (\mu\text{M})^a$			
	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
49	0,800 ± 0.210	3,29 ± 0,16	0,663 ± 0,056	> 20 (12 %) ^b
50	6,87 ± 1,81	6,64 ± 0,70	1,17 ± 0,30	> 20 (11 %) ^b
51	1,28 ± 0.50	3,03 ± 0.40	0,596 ± 0.179	> 20 (9 %) ^b
16	0,173 ± 0.036	0,0882 ± 0.0362	0,110 ± 0.031	> 20 (4 %) ^b
52	0,00388 ± 0,00140	0,0184 ± 0,0035	0,0596 ± 0,0092	> 20 (-2 %) ^b
53	> 20 (38 %) ^b	3.80 ± 0.34	0,782 ± 0,116	> 20 (5 %) ^b
54	3,70 ± 0,88	3,65 ± 0,36	0,820 ± 0,074	> 20 (12 %) ^b
55	0,0280 ± 0,0046	0,0218 ± 0,0058	0,0777 ± 0,0126	> 20 (15 %) ^b
56	7,85 ± 0,66	4,21 ± 0,54	1,99 ± 0,86	> 20 (15 %) ^b
57	0,626 ± 0,200	0,194 ± 0,051	0,310 ± 0,103	> 20 (4 %) ^b
58	8,81 ± 2,65	10,4 ± 2,2	3,29 ± 0,54	> 20 (19 %) ^b
59	15,6 ± 2,4	9,59 ± 1,59	18,5 ± 5,3	> 20 (24 %) ^b
60	> 20 (26 %) ^b	> 20 (11 %) ^b	> 20 (28 %) ^b	> 20 (20 %) ^b
61	> 20 (17 %) ^b	> 20 (7 %) ^b	> 20 (20 %) ^b	> 20 (3 %) ^b
62	> 20 (12 %) ^b	> 20 (-1 %) ^b	> 20 (-2 %) ^b	> 20 (1 %) ^b
63	2,44 ± 0,43	0,680 ± 0,151	0,582 ± 0,050	> 20 (2 %) ^b

^a Die K_i -Werte wurden in drei bis fünf unabhängigen Experimenten ermittelt.

^b Mittelwerte der Inhibition (%) bei 20 μM (n = 2)

Im Allgemeinen ließ sich feststellen, dass keine der untersuchten Verbindungen die humane NTPDase8 signifikant bei 20 μM hemmte, wobei potente Inhibitoren für die anderen Subtypen identifiziert werden konnten.²³⁵ Die POMs **16** und **49 - 59** waren potenter gegenüber den NTPDasen1, -2 und -3 als die Rheniumcluster-Verbindungen (**60 - 63**), welche mit Ausnahme der Verbindung **63** keine inhibitorische Aktivität zeigten.²³⁵

Nur die Verbindung **53** aus der untersuchten Serie zeigte eine geringe Inhibition der humanen NTPDase1 (36 %), während für alle anderen POMs K_i -Werte im niedrigen nanomolaren bis mikromolaren Bereich bestimmt wurden (0,00388 – 15,6 μM). Im Gegensatz zur NTPDase1 wurden die NTPDase2 und -3 auch von der Verbindung **53** inhibiert (entsprechend K_i -Werte von 3,80 μM und 0,782 μM). POM **52** wurde als potentester Inhibitor der NTPDase1, -2 und -3 identifiziert (Konzentrations-Inhibitions-Kurven siehe Abbildung 52).²³⁵

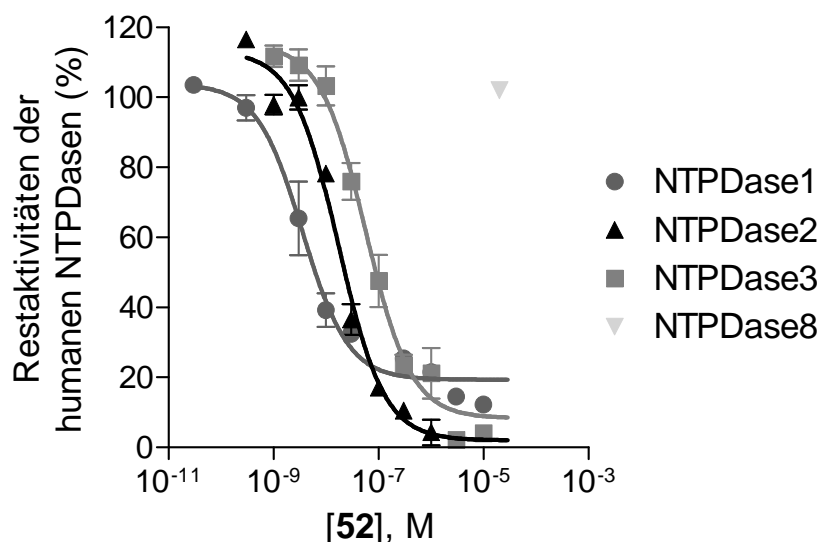


Abbildung 52:²³⁵ Konzentrations-Inhibitions-Kurven des potentesten POM **52** für die humanen NTPDasen. Humane NTPDase1: K_i -Wert = $0,00388 \pm 0,00140 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase2: K_i -Wert = $0,0184 \pm 0,0035 \mu\text{M}$ ($n = 3$); humane NTPDase3: K_i -Wert = $0,0596 \pm 0,0092 \mu\text{M}$ ($n = 4$); humane NTPDase8: K_i -Wert $> 20 \mu\text{M}$ ($n = 2$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Die K_i -Werte der Verbindung **52** an den NTPDasen1, -2 und -3 wurden entsprechend mit $3,88 \pm 1,4 \text{ nM}$, $18,4 \pm 3,5 \text{ nM}$ und $59,6 \pm 9,2 \text{ nM}$ bestimmt. Somit ist Verbindung **52** der potenteste, bisher identifizierte Inhibitor dieser Ectonucleotidasen.

Die für die Verbindungen **16** und **49 - 53** an den humanen NTPDasen erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mit den bereits publizierten Daten an den Rattenenzymen⁹¹ verglichen. Im Allgemeinen waren die untersuchten POMs potenter gegenüber den humanen Enzymen. Die K_i -Werte wurden mit $0,00388 - 3,80 \mu\text{M}$ bestimmt, während die K_i -Werte dieser Verbindungen bei Testung an den Ratten NTPDasen zwischen $0,140 - 37,4 \mu\text{M}$ lagen.^{91,235} Für die Verbindung **52**, die als der potenteste Inhibitor der humanen NTPDase1 ($K_i = 0,00388 \mu\text{M}$), NTPDase2 ($K_i = 0,0184 \mu\text{M}$) und NTPDase3 ($K_i = 0,0596 \mu\text{M}$) aus der untersuchten Serie identifiziert wurde, wurden entsprechend für die Rattenenzyme K_i -Werte von $0,480 \mu\text{M}$, $1,53 \mu\text{M}$ und $2,61 \mu\text{M}$ veröffentlicht.^{91,235} Somit zeigt POM **52** eine mindestens 124-, 83- und 44-fach höhere inhibitorische Aktivität gegenüber den humanen NTPDasen1, -2 und -3.²³⁵ Interessanterweise inhibierte die Verbindung **53** sowohl die humane als auch die Ratten NTPDase1 bei $20 \mu\text{M}$ nur schwach ($K_i > 20 \mu\text{M}$).^{91,235}

Zu Selektivitätsuntersuchungen der POMs und Rheniumcluster-Verbindungen gegenüber anderen Ectonucleotidasen siehe Kapitel 4.3.1.7.

4.2 Lp1 NTPDase

4.2.1 Kapillarelektrophorese-Assay

4.2.1.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine CE-Methode zur Detektion der Lp1NTPDase-Aktivität etabliert. Die Methode wurde ausgewählt, um einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Aktivitätsassay für das bakterielle Enzym zu beschreiben und seine Vor- und Nachteile gegenüber dem Malachitgrün-Assay (= Standardassay) zu untersuchen (vergleiche Kapitel 4.4). Die enzymatische Reaktion wurde außerhalb der Kapillare in einem Reaktionsgefäß gestartet und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C durch Hitzeinaktivierung gestoppt. So können sehr schnell und einfach viele Proben gleichzeitig inkubiert werden. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung von Substrat (ADP) und Reaktionsprodukt (AMP) konnte mit einer neuen Methode erreicht werden, wobei AMP nach weniger als 14 Minuten und ADP nach weniger als 11 Minuten eluiert wurde.

Zwar ist die Methode aufgrund des geringen Probendurchsatzes nicht für ein HTS geeignet, sie kann jedoch sehr gut zur Testung kleiner Substanzbibliotheken oder der Verifizierung von Screening-Treffern eingesetzt werden.

4.2.1.2 Etablierung der Methode

Ziel war es einen Kapillarelektrophorese-Assay für das Screening einer in unserem Arbeitskreis erstellten Anthrachinon-Bibliothek zur Identifizierung von Inhibitoren der bakteriellen Lp1NTPDase zu etablieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Kalibriergerade für AMP, welches als Produkt aus der enzymatischen Reaktion hervorgeht, erstellt. Die aus den Elektropherogrammen ermittelten korrigierten Peakflächen des AMP wurden auf den Internen Standard (UMP) bezogen. Für jede neu verwendete Kapillare wurde eine Kalibriergerade erstellt. In Abbildung 53 ist eine Kalibriergerade exemplarisch dargestellt.

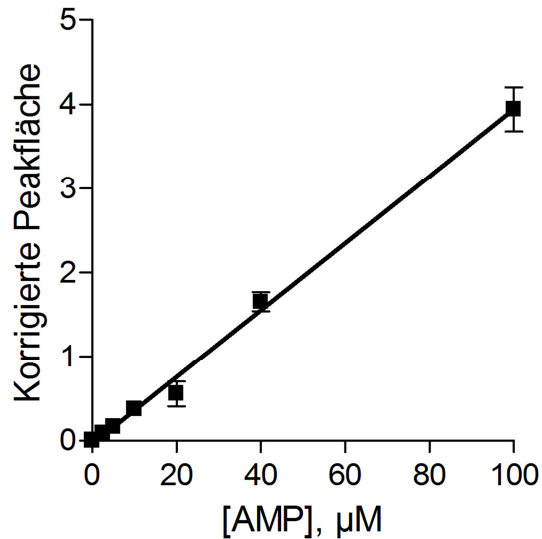


Abbildung 53: Kalibriergerade für AMP ($R^2 = 0,996$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 2$.

Der Korrelationskoeffizient (R^2) beträgt 0,996 und deutet somit auf eine gute Linearität zwischen korrigierter Peakfläche und AMP-Konzentration hin.

In einem nächsten Schritt wurde die bakterielle Lp1NTPDase enzymkinetisch charakterisiert, indem der K_M - und v_{max} -Wert für ADP als Substrat bestimmt wurde. Das Michaelis-Menten-Diagramm ist in Abbildung 54 dargestellt.

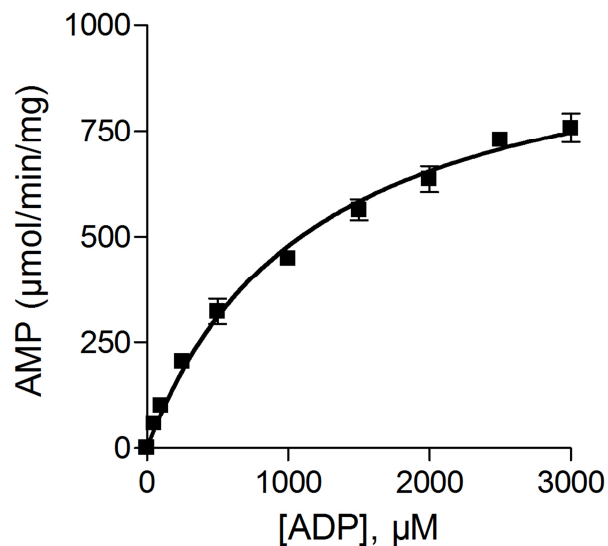


Abbildung 54: Michaelis-Menten-Diagramm für ADP ($K_M = 1190 \pm 161 \mu\text{M}$, $v_{max} = 1040 \pm 59 \mu\text{mol AMP/min/mg Protein}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Für die Maximalgeschwindigkeit wurden $1040 \pm 59 \mu\text{mol AMP}/\text{min}/\text{mg}$ Enzym und für die Michaelis-Konstante eine Konzentration von $1190 \pm 161 \mu\text{M}$ bestimmt. Die ermittelten Parameter liegen in der gleichen Größenordnung wie die bereits in der Literatur⁷⁸ mithilfe des Malachitgrün-Assays bestimmten Werte ($v_{\text{max}} = 996 \mu\text{mol AMP}/\text{min}/\text{mg}$ Protein, $K_M = 1000 \mu\text{M}$). Anhand des ermittelten K_M -Wertes wurde die Substratkonzentration für die weiteren Versuche auf $500 \mu\text{M}$ ($\sim 0,5 \times K_M$) festgelegt. Die Aktivität der Lp1NTPDase schwankte je nach verwendeter Enzymprobe und der Auftau- und Einfrierzyklen. Die optimale Enzymkonzentration, die zu $< 20\%$ Substratumsatz führte, wurde daher an jedem Messtag in einem Vorversuch ermittelt.

Für die Bestimmung der Sensitivität der Methode wurden die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze für das Produkt (AMP) der enzymatischen Reaktion anhand der in Kapitel 3.2.1.2 aufgeführten Gleichungen berechnet. Sie entsprechen $3,88 \mu\text{M}$ bzw. $11,8 \mu\text{M}$ AMP. Die Methode ist mit dieser Bestimmungsgrenze sensitiv genug. Bei einer gewählten Substratkonzentration von $500 \mu\text{M}$ und einem Umsatz von $10 - 20\%$ werden optimaler Weise zwischen $50 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ AMP gebildet.

4.2.1.3 Screening einer Anthrachinon-Bibliothek

Der neu etablierte CE-Assay wurde für das Screening einer kleinen, in unserem Arbeitskreis erstellten Anthrachinon-Bibliothek (bestehend aus 24 Testverbindungen) verwendet. Die Verbindungen wurden ausgewählt, da Anthrachinon-Derivate bereits als Inhibitoren der Ratten-NTPDasen und in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als Inhibitoren der humanen NTPDasen beschrieben wurden. Zusätzlich wurden der NTPDase-Standardinhibitor RB-2 (**7**) und die verwandten Verbindungen Blue 3GA (CB-3GA, **64**) und Reactive Blue 4 (RB-4, **38**) untersucht (Abbildung 55).

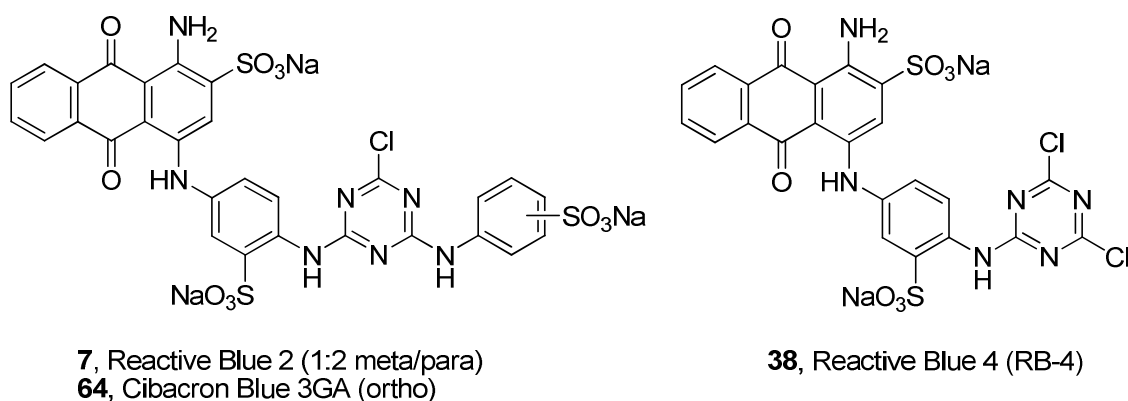
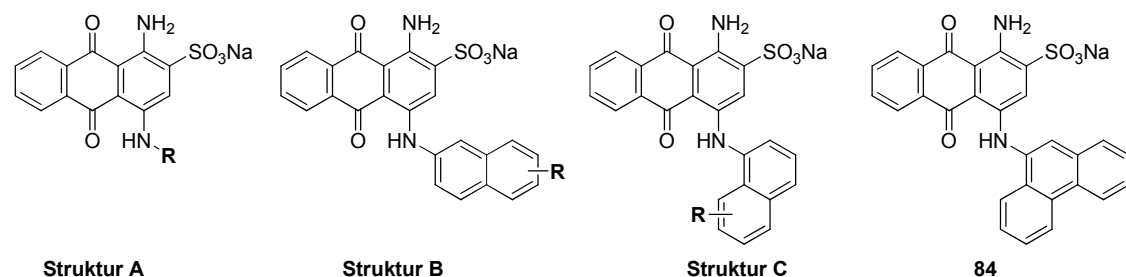


Abbildung 55: Strukturformeln von RB-2 (**7**), CB-3GA (**64**) und RB-4 (**38**)

Alle Verbindungen wurden bei einer Assaykonzentration von 30 μM getestet und die Inhibition der Lp1NTPDase in % ermittelt. Vier Verbindungen (**65**, **67**, **69** und **76**) lieferten negative Inhibitionswerte (-78 %, -67 %, -19 % und -20 %), wobei die Schwankungen zwischen den in zwei unabhängigen Messungen ermittelten Werten auch sehr groß waren. Anhand der Testverbindung **65** wurde dennoch stellvertretend für die vier Verbindungen untersucht, ob sie in der Lage ist, das Enzym zu aktivieren. Es konnte jedoch keine konzentrationsabhängige Aktivierung festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Inhibitorische Aktivität (%) der untersuchten Anthrachinon-Derivaten gegenüber der Lp1NTPDase bei einer Endkonzentration von 30 μM



Testverbindung	R	% Inhibition \pm SEM (n = 3) bzw. % Inhibition (n = 2) ^a
7, RB-2	Strukturformel Abbildung 55	75 \pm 4
38, RB-4	Strukturformel Abbildung 55	8 \pm 8 (n = 4)
64, CB-3GA	Strukturformel Abbildung 55	45 \pm 9

Struktur A

65	Propyl	-78 (-150, -6)
66	Cyclohexyl	22 \pm 4
67	Phenethyl	-67 (-96, -38)
68	Phenyl	31 \pm 5
69	2-Fluorphenyl	-19 \pm 74
70	4-Chlorphenyl	66 \pm 7
71	3-Bromphenyl	44 \pm 14

Tabelle 13 (Fortsetzung)

72	2-Methylphenyl	44 ± 3
73	3-Methylphenyl	53 ± 12
74	2-Ethylphenyl	39 ± 11
75	3-Nitrophenyl	44 ± 11
76	4-(Diethoxyphosphoryl)methylphenyl	-20 ± 17
77	2,4,6-Trimethylphenyl	44 ± 11
78	4-(2-Methoxyphenoxy)phenyl	28 ± 13
Struktur B		
79	H	51 ± 13
80	6-Carboxyl	32 ± 13
Struktur C		
35 (PSB-06126)	H	62 ± 7
81	2-Methyl	76 ± 8 (n = 4)
82	5-Sulfonat	26 ± 6
83	6-Sulfonat	30 ± 8
84	Strukturformel oben dargestellt	90 ± 8

^a Bei n = 2 sind die Einzelwerte in Klammern angegeben

Testverbindungen, welche das bakterielle Enzym bei einer Konzentration von 30 µM ≥ 60% inhibierten, wurden als potente Verbindungen definiert. Fünf Anthrachinon-Derivate (RB-2, **7** (75 %); **35** (62 %); **70** (66 %); **81** (76 %) und **84** (90 %)) konnten so als Inhibitoren der Lp1NTPDase identifiziert und in nachfolgenden Untersuchungen als solche bestätigt werden.

4.2.1.4 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Die in Kapitel 4.2.1.3 durch ein Screening identifizierten Inhibitoren der Lp1NTPDase wurden weiterführend charakterisiert, indem Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen wurden (siehe Abbildung 56).

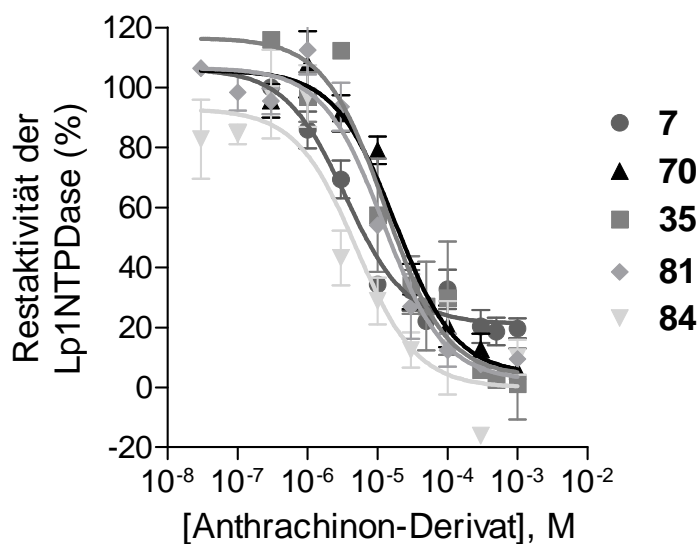
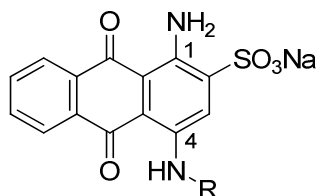


Abbildung 56: Konzentrations-Inhibitions-Kurven der inhibitorisch aktiven Anthrachinon-Derivate. **7** ($IC_{50} = 5,04 \pm 2,09 \mu\text{M}$, $n = 3$), **35** ($IC_{50} = 12,1 \mu\text{M}$, $n = 2$), **70** ($IC_{50} = 17,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$, $n = 3$), **81** ($IC_{50} = 13,6 \mu\text{M}$, $n = 2$) und **84** ($IC_{50} = 4,24 \pm 0,54 \mu\text{M}$, $n = 4$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: IC_{50} -Werte der potenten Anthrachinon-Derivate gegenüber der bakteriellen Lp1NTPDase

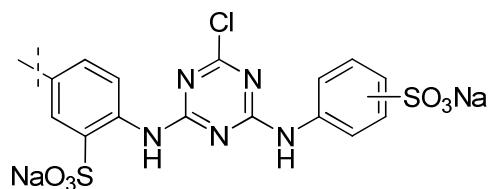


Testverbindung

R

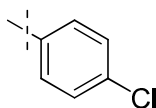
$IC_{50} \pm \text{SEM}$ ($n = 3$) bzw.
 IC_{50} ($n = 2$)^a

7, RB-2



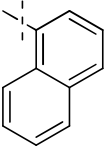
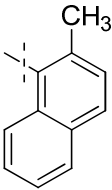
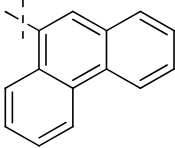
5,04 \pm 2,09 μM

70



17,6 \pm 5,1 μM

Tabelle 14 (Fortsetzung)

35		12,1 (14,0; 10,3) μM
81		13,6 (12,8; 14,3) μM
84		4,24 \pm 0,54 μM (n = 4)

^a Bei n = 2 sind die Einzelwerte in Klammern angegeben

Neben RB-2 (**7**) mit einem IC_{50} -Wert von $5,04 \pm 2,09 \mu\text{M}$ konnten ähnlich potente (**70**, $\text{IC}_{50} = 17,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$; **35**, $\text{IC}_{50} = 12,1 \mu\text{M}$, **81**, $\text{IC}_{50} = 13,6 \mu\text{M}$, **84**, $\text{IC}_{50} = 4,24 \pm 0,54 \mu\text{M}$) identifiziert werden. Diese Verbindungen weisen nur eine Teilstruktur von RB-2 auf und sind somit deutlich kleiner und arzneistoff-artiger (M: 712 g/mol für **7** und M: 517 g/mol für **84**). Durch die erfolgreiche Aufnahme von Konzentrations-Inhibitions-Kurven konnte gezeigt werden, dass die etablierte Methode optimal zur Aktivitätsbestimmung der Lp1NTPDase geeignet und einsetzbar ist.

4.2.1.4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Anthrachinon-Derivaten als Inhibitoren der bakteriellen Lp1NTPDase untersucht. Die getesteten Verbindungen unterschieden sich in Bezug auf den Substituenten in der 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts.

In einem ersten Schritt sind mithilfe des neu etablierten CE-Assays die kommerziell erhältliche Farbstoffe RB-2 (**7**), RB-4 (**38**) und CB-3GA (**64**) hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität bei $30 \mu\text{M}$ untersucht worden (vergleiche Kapitel 4.2.1.3). Von **7** (75 %, $\text{IC}_{50} = 5,04 \pm 2,1 \mu\text{M}$) über **64** (45 %) bis **38** (8 %) nahm die Inhibition der Lp1NTPDase immer weiter ab. Demnach scheint ein zweiter Sulfonat-Rest am Phenylring

(**7** und **64**) günstig in Bezug auf die inhibitorische Aktivität im Vergleich zu dem unsubstituierten Derivat **38** zu sein. Da **7** die Lp1NTPDase verglichen mit **64** stärker hemmte, scheint eine Sulfonat-Gruppe in meta/para-Position von der Lp1NTPDase besser toleriert zu werden als in ortho-Position.

In einem nächsten Schritt wurde eine Reihe kleinerer Anthrachinon-Derivate der zuvor beschriebenen Farbstoffe als Lp1NTPDase Inhibitoren untersucht. Diese Anthrachinon-Derivate sind alle innerhalb unserer Arbeitsgruppe synthetisiert worden. Verschiedene Substituenten an der 4-Aminoposition des Anthrachinon-Grundgerüsts, einschließlich aliphatischer (**65** - **67**) und verschiedener aromatischer Reste (**35** und **68** - **84**), wurden eingeführt. Die Derivate mit aliphatischen Substituenten zeigten eine geringere Inhibition des Enzyms verglichen mit den kommerziell erhältlichen Farbstoffen. Die Substitution mit einem Propyl- und Phenethyl-Substituenten führte sogar zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (0 %). Einfache aromatische Phenyl-Substitutionen wurden toleriert (28 - 66 % Inhibition) ausgenommen die 2-Fluorphenyl- (**69**) und 4-(Diethoxyphosphoryl)methylphenyl-Reste (**76**) (0 % Inhibition). Die potenteste Verbindung aus dieser Reihe war das 4-Chlorphenyl-Derivat (**70**), welches die Lp1NTPDase bei 30 μM zu 66 % ($\text{IC}_{50} = 17,6 \pm 7,1 \mu\text{M}$) hemmte. Dies deutet darauf hin, dass ein lipophiler Substituent in der para-Position des Phenylrings gut toleriert wird. Die Einführung eines weiteren aromatischen Rings (**78**) brachte keine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität (28 %). Der Austausch eines Phenylrings gegen bipyklische Substituenten wie Naphth-1-yl (PSB-06126 = **35**, 62 % Inhibition, $\text{IC}_{50} = 12,1 \mu\text{M}$) und Naphth-2-yl (**79**, 51 % Inhibition) konnte die Potenz der Verbindungen hingegen erhöhen. Die Einführung von sauren funktionellen Gruppen wie einer Sulfonat-Gruppe in 5- und 6-Position des Naphth-1-yl-Restes (entsprechend **82** und **83**) oder einer Carboxyl-Gruppe in 6-Position des Naphth-2-yl-Restes (**80**) waren nachteilig (Inhibitionen von 26 %, 30 % und 32 %), wohingegen eine Methyl-Gruppe in der 2-Position des Naphth-1-yl-Restes (**81**) ebenfalls sehr gut von der Lp1NTPDase toleriert wurde (76 % Inhibition, $\text{IC}_{50} = 13,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$). Die Substitution an der 4-Aminoposition des Anthrachinon-Grundgerüsts mit einem Phenanthren-9-yl-Restes (**84**) führte zu der potentesten Verbindung (90 % Inhibition, $\text{IC}_{50} = 4,24 \pm 0,54 \mu\text{M}$) aus der untersuchten Serie.

Die Potenz der Testverbindungen nahm bei Zunahme der Ringgröße von Phenyl (**68**, 37 %) über Naphth-1-yl (**35**, 62 %) zu Phenanthren-9-yl (**84**, 90 %) substituierten Verbindungen deutlich zu. Demnach scheint das bakterielle Enzym eine lipophile Bindungstasche zu haben, in die sich sehr gut polyzyklische, aromatische Strukturen und insbesondere ein Phenanthren-9-yl Rest (**84**) einpassen. Die wichtigsten Struktur-

Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate sind nochmal in Abbildung 57 zusammengefasst.

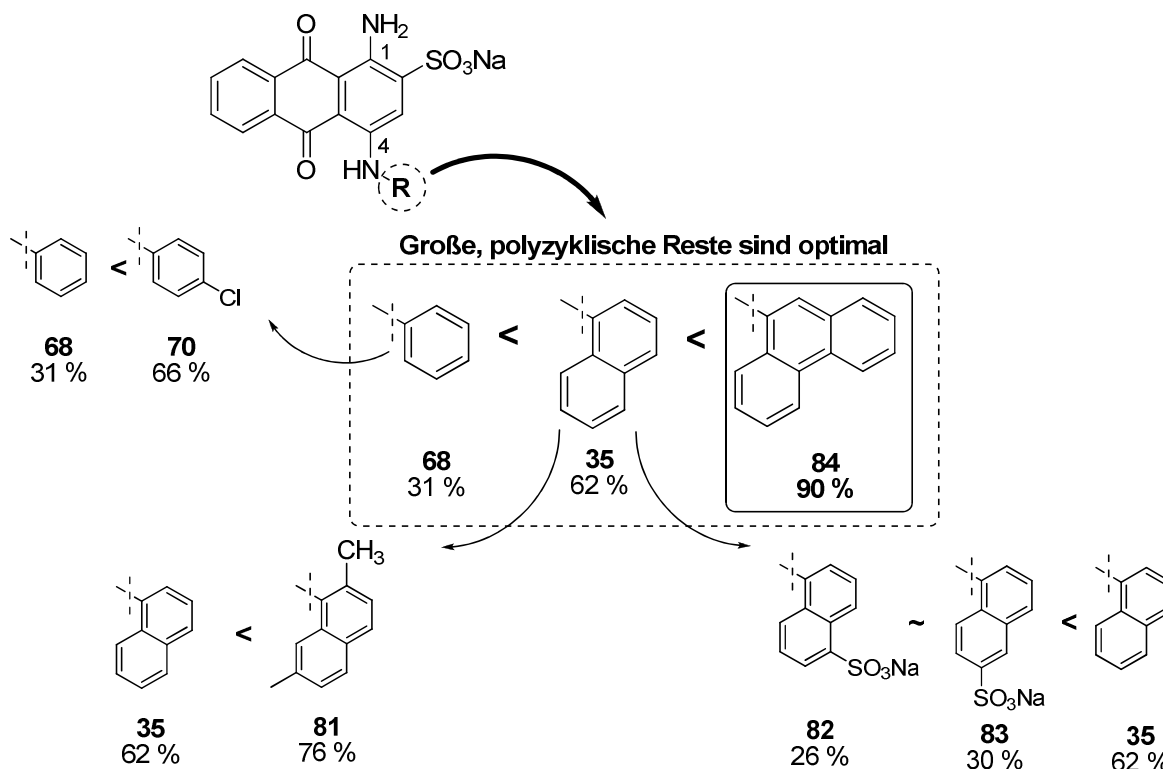


Abbildung 57: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Anthrachinon-Derivate an der bakteriellen Lp1NTPDase. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lp1NTPDase-Inhibition (%) bei 30 μ M, n = 3.

Die Einführung von noch größeren, raumfüllenden, unpolaren Resten an der Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüsts könnte zu einer weiteren Steigerung der inhibitorischen Aktivität führen. Daher scheint die Synthese solcher Verbindungen ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Forschungsarbeiten. Da die Lp1NTPDase bezüglich ihrer Struktur große Ähnlichkeit zu der NTPDase2 aufweist⁸², ist es nicht verwunderlich, dass gleiche Anthrachinon-Derivate (z. B. **84**) als Inhibitoren identifiziert wurden. Die Untersuchung weiterer, raumfüllender Derivate mit unterschiedlichen Substituenten sollte nähere Informationen über den Erhalt von selektiven Verbindungen gegenüber der NTPDase2 liefern. Auch die Untersuchung potenter Verbindungen in Bezug auf die Hemmung des bakteriellen Wachstums von *L. pneumophila* könnte ein interessantes Ziel folgender Forschungsarbeiten darstellen. Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die Verbindung **84** aber als der potenteste bisher beschriebene Lp1NTPDase Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von $4,24 \pm 0,54 \mu$ M identifiziert wurde, der selektiv gegenüber den humanen NTPDasen1, -3 und -8 ist.

4.3 Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase

4.3.1 CDP-Star-Assay zur Aktivitätsbestimmung

4.3.1.1 Allgemeines

Für die Aktivitätsbestimmung der TNAP sind eine Reihe von Screeningassays mit ihren Vor- und Nachteilen geeignet (vergleiche Kapitel 4.4). In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung des CDP-Star-Assays, einer auf Lumineszenzmessung beruhenden und daher sehr sensitiven Methode, zur Aktivitätsbestimmung der TNAP und der Identifizierung neuer Inhibitoren ausgewählt. Die im Folgenden aufgeführten Parameter des Assays wurden nach der Beschreibung von Sergienko *et al.*¹³⁴ optimiert, sodass sich entsprechend die einzusetzenden Substratkonzentrationen und die optimale Enzymkonzentration von der bereits veröffentlichten Methode unterscheiden.

4.3.1.2 Etablierung der Methode

Für die Etablierung des CDP-Star-Assays sollte zunächst die optimale Substratkonzentration von CDP-Star bestimmt werden. Es ist bekannt, dass kompetitive Inhibitoren bei hohen Substratkonzentrationen schwieriger zu identifizieren sind, da das Substrat mit dem Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle konkurriert (vergleiche Kapitel 1.3). Die Identifizierung nicht-kompetitiver und unkompetitiver Hemmstoffe ist hingegen leichter bei Enzymsättigung durch das Substrat und entsprechend hohen Substratkonzentrationen.¹³⁴ Um mit dem in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten Assay möglichst alle Inhibitorenklassen identifizieren zu können, sollte die CDP-Star-Konzentration gleich der ermittelten Michaelis-Menten-Konstante (K_M) gesetzt werden. Um den K_M -Wert für das Substrat CDP-Star zu bestimmen, wurde bei konstanter Enzym- und DEA-Konzentration (Überschuss) die Aktivität der TNAP mit ansteigenden CDP-Star-Konzentrationen ermittelt. Die Auftragung der gemessenen RLU gegen die CDP-Star-Konzentrationen (μM) lieferte eine Sättigungskurve (siehe Abbildung 58).

Nach nichtlinearer Regression der erhaltenen Daten wurde ein K_M -Wert von $103 \pm 3 \mu\text{M}$ bestimmt. Die CDP-Star-Konzentration wurde daher für die weiteren Versuche auf $105 \mu\text{M}$ festgesetzt.

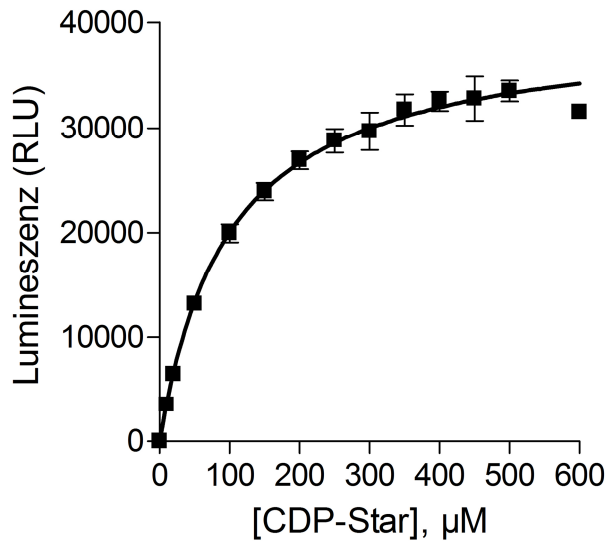


Abbildung 58: Michaelis-Menten-Diagramm für CDP-Star (K_M -Wert = $103 \pm 3 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 2$.

Neben dem Substrat CDP-Star wurde DEA als Phosphatakzeptorsubstrat eingesetzt. Auch für dieses Substrat wurde der K_M -Wert bestimmt, um die geeignete Konzentration im Assay einsetzen zu können. Dafür wurde bei konstanter Enzym- und CDP-Star-Konzentration (= dem zuvor ermittelten K_M -Wert) die Aktivität der TNAP mit ansteigenden DEA-Konzentrationen gemessen. Die Darstellung der gemessenen RLU gegen die DEA-Konzentrationen (mM) lieferte eine Sättigungskurve (siehe Abbildung 59).

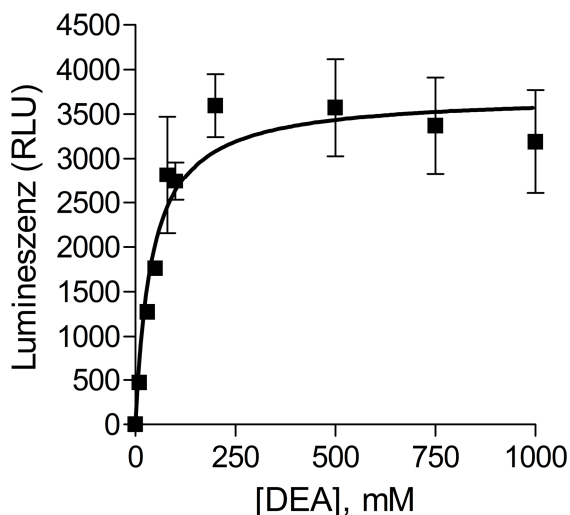


Abbildung 59: Michaelis-Menten-Diagramm für DEA (K_M -Wert = $46,7 \pm 11,7 \text{ mM}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 4$.

Nach nichtlinearer Regression der erhaltenen Daten wurde ein K_M -Wert von $46,7 \pm 11,7$ mM ($n = 4$) bestimmt. Die DEA-Konzentration wurde daher für die weiteren Versuche auf 50 mM festgesetzt.

In einem nächsten Schritt wurde der letzte Parameter, die optimale Enzymkonzentration, festgelegt. Hierzu wurde für jede neue Enzymcharge eine Enzymtitration durchgeführt (siehe exemplarisch Abbildung 60).

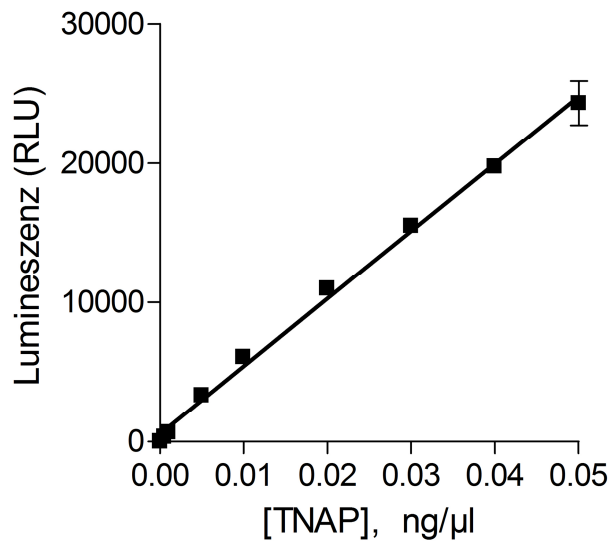


Abbildung 60: TNAP-Titration in Anwesenheit der optimalen CDP-Star- und DEA-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Die Enzymkonzentration für die weiteren Versuche wurde so gewählt, dass ein ausreichend großes Messfenster erhalten werden konnte, aber auch noch im linearen Bereich des Substratumsatzes gearbeitet wurde. So wurden Enzymkonzentrationen zwischen 0,01 und 0,02 ng/µl (je nach Charge) eingesetzt.

4.3.1.3 Validierung

Für die Validierung des CDP-Star-Assays wurde zunächst der Z' -Faktor entsprechend Kapitel 3.1.1.6 bestimmt. Es konnte für jede verwendete Enzymcharge ein Z' -Faktor von $> 0,6$ ermittelt werden, sodass keine weiteren Optimierungen des Assays vorgenommen werden mussten. Um zu zeigen, dass der neu etablierte Assay in unserem Labor zuverlässige Ergebnisse liefert, wurde für die weitere Validierung eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve für Levamisol aufgenommen und der IC_{50} -Wert bestimmt (Abbildung 61).

Levamisol (**21**) ist in der Literatur¹³⁴ als ein unkompetitiver Inhibitor der TNAP (vergleiche Kapitel 1.5.2.1.3) mit einem IC_{50} -Wert von 20 μ M beschrieben.

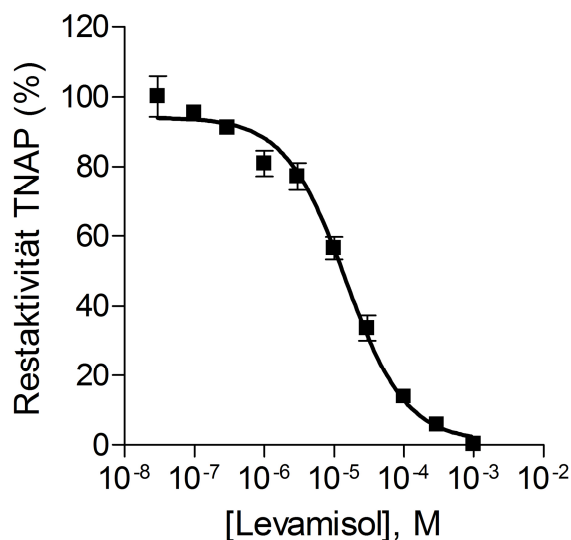


Abbildung 61: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von Levamisol (**21**), $IC_{50} = 15,2 \pm 4,3 \mu$ M. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Es wurde ein IC_{50} -Wert von $15,2 \pm 4,3 \mu$ M ermittelt, der in der gleichen Größenordnung wie der in der Literatur beschriebene Wert liegt. Dies bestätigt, dass der neu etablierte Assay reproduzierbare Ergebnisse liefert und für die Identifizierung von Inhibitoren eingesetzt werden kann.

4.3.1.4 Screening

In ersten Screeningversuchen wurden 192 Testverbindungen in Bezug auf ihre inhibitorischen Aktivitäten bei einer Endkonzentration von 20 μ M untersucht. Es handelte sich um verschiedene in unserem Arbeitskreis synthetisierte Anthrachinon-Derivate, Sulfonamide, Phenylbenzamidophenyl-sulfonate und -sulfonamide, Xanthin-Derivate und einige aus anderen Arbeitskreisen zur Verfügung gestellte POMs, Rheniumcluster-Verbindungen, Naturstoffextrakte und Phosphonsäure-Derivate. Verbindungen, die eine Inhibition von $\geq 70 \%$ zeigten, wurden als Treffer definiert. Die Treffergrenze wurde so hoch gewählt, da nur sehr potente Verbindungen als neue Hemmstoffe identifiziert werden sollten. Die Screeningergebnisse (Mittelwerte aus zwei bis fünf Experimenten) sind in Abbildung 62 dargestellt.

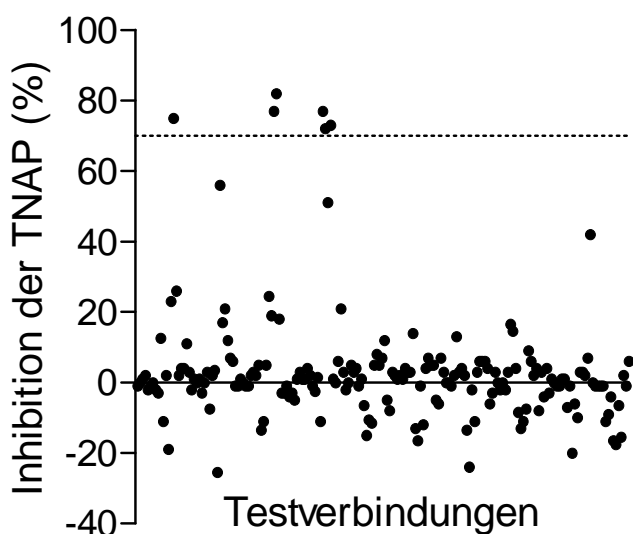


Abbildung 62: Testergebnisse eines Screenings mit dem CDP-Star-Assay für die TNAP. 192 Testverbindungen wurden bei einer Endkonzentration von 20 μM getestet und die Enzyminhibition (%) berechnet (Mittelwert, $n = 2 - 5$). Substrat: 105 μM CDP-Star. Gestrichelte Linie: Treffergrenze potenter Verbindungen (70 % Inhibition). Sechs Verbindungen konnten als Inhibitoren der TNAP identifiziert werden.

Von den 192 Testverbindungen wurden sechs POMs (**16**, **50**, **54**, **56**, **58** und **59**) als potentielle Inhibitoren der TNAP identifiziert und näher charakterisiert. Für die Strukturen der Metallkomplexe siehe Abbildung 51.

4.3.1.5 Aktive Polyoxometalate

Für die POMs **16**, **50**, **54**, **56**, **58** und **59** wurden Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen und die K_i -Werte mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung¹⁹⁸ bestimmt, da ein kompetitiver Hemmmechanismus angenommen werden kann (vergleiche Kapitel 4.3.1.6). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 15 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 15:²³⁵ K_i -Werte der untersuchten POMs für die humane TNAP

Verbindung	$K_i \pm \text{SEM} (\mu\text{M}), n = 3$	Verbindung	$K_i \pm \text{SEM} (\mu\text{M}), n = 3$
49	$> 10 (23 \%)^a$	56	$2,27 \pm 0,12$
50	$3,45 \pm 0,17$	57	$\geq 10 (51 \%)^a$

Tabelle 15 (Fortsetzung)

51	> 10 (34 %) ^a	58	3,06 ± 0,04
16	5,35 ± 0,35	59	3,33 ± 0,38
52	> 10 (26 %) ^a	60	> 10 (17 %) ^a
53	≥ 10 (56 %) ^a	61	> 10 (21 %) ^a
54	3,85 ± 0,12	62	> 10 (12 %) ^a
55	> 10 (18 %)	63	> 10 (19 %) ^a

^a Mittelwerte der Inhibition (%) bei 20 µM (n = 3)

Für die sechs POMs wurden IC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt (4,54 bis 10,7 µM), wobei die Verbindung **56** als potentester Inhibitor identifiziert wurde (Konzentrations-Inhibitions-Kurve siehe Abbildung 63). Die zehn weiteren POMs und Rheniumcluster-Verbindungen, die bereits in Kapitel 4.1.2.6 beschrieben wurden, inhibierten die TNAP zu < 70 % bei einer Konzentration von 20 µM, sodass für sie keine Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen wurden.

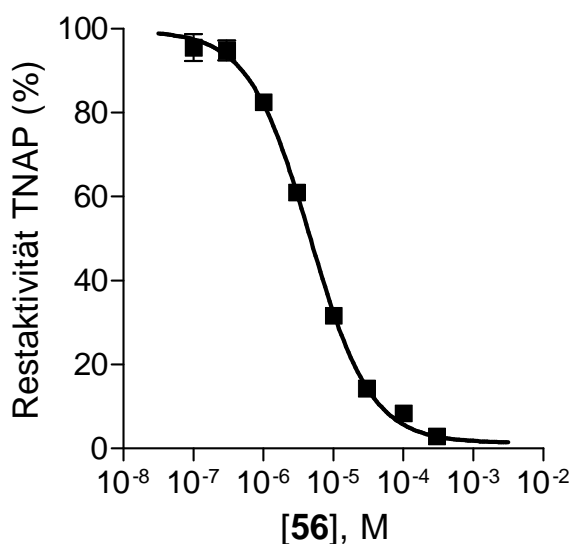


Abbildung 63: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von POM **56** an der humanen TNAP (K_i-Wert = 2,27 ± 0,12 µM). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3.

Die Verbindung **56** zeigt mit einem K_i -Wert von $2,27 \pm 0,12 \mu\text{M}$ eine höhere inhibitorische Aktivität als der bisher bekannte Standardinhibitor Levamisol.

Der Einfluss von POMs auf die Aktivität der humanen TNAP wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht. Bisher wurden Testergebnisse für fünf POMs (**49**, **56**, **57**, **58** und **59**) bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber der alkalischen Phosphatase aus der Schweineniere veröffentlicht.¹⁴⁵ Die Untersuchungen wurden mithilfe des spektroskopischen Standardassays mit *para*-Nitrophenylphosphat als Substrat im Plattenformat durchgeführt. Im Vergleich zu den Testergebnissen an der humanen TNAP, zeigten die Verbindungen stärkere Inhibition der alkalischen Phosphatase aus der Schweineniere mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich ($0,135 \mu\text{M}$ - $0,315 \mu\text{M}$). Die Unterschiede könnten eventuell durch Speziesunterschiede erklärbar sein. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, da in beiden Assays ein Alternativsubstrat und nicht das natürliche Substrat zum Einsatz kam.

4.3.1.6 Hemmmechanismus der Polyoxometalate (POMs)

Die Verbindung **56** wurde als potentestes POM der untersuchten Serie identifiziert und daher ausgewählt, um stellvertretend den Hemmmechanismus der POMs gegenüber der TNAP zu untersuchen. Das Lineweaver-Burk-Diagramm ist in Abbildung 64 dargestellt.

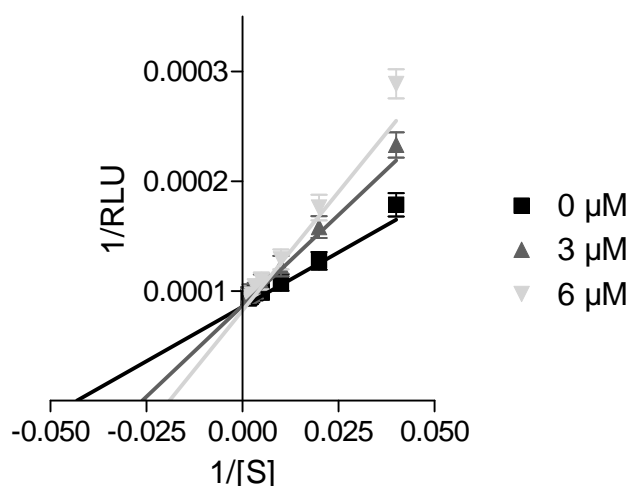


Abbildung 64: Lineweaver-Burk-Plot in Anwesenheit unterschiedlicher **56**-Konzentrationen ($0 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und $6 \mu\text{M}$). Der Schnittpunkt der drei Geraden auf der Y-Achse deutet auf einen kompetitiven Hemmmechanismus hin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$.

Die drei Geraden (verschiedene Inhibitorkonzentrationen) im Lineweaver-Burk-Plot schneiden die Ordinate im gleichen Schnittpunkt (gleicher v_{\max}), sodass ein kompetitiver Hemmmechanismus angenommen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals der Hemmmechanismus der POMs an der humanen TNAP ermittelt.

4.3.1.7 Selektivitätsuntersuchungen der Polyoxometalate und Rheniumcluster-Verbindungen

Für Selektivitätsuntersuchungen wurden die 16 POMs und Rheniumcluster-Verbindungen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität an den humanen NTPDasen1, -2, -3 und -8 (siehe Kapitel 4.1.2.6), den NPPs 1-3 und der eN in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Ergebnisse wurden ausführlich zusammen mit Lee *et al.*²³⁵ in einer Publikation zusammengefasst und diskutiert. Für die Untersuchungen wurden die durch Konzentrations-Inhibitions-Kurven erhaltenen IC_{50} -Werte mithilfe der Cheng-Prusoff Gleichung¹⁹⁸ in die K_i -Werte umgerechnet.

Für kompetitive Inhibition:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m)$$

(wobei $[S]$ = Substratkonzentration (μM) und K_m = Michaelis-Menten Konstante (μM))

Für nicht-kompetitive Inhibition (Annahme $\alpha = 1$)⁴:

$$K_i = IC_{50}$$

Für schwach potente Verbindungen wurden keine Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen, die IC_{50} -Werte gleich der maximal getesteten Inhibitorkonzentration gesetzt und die entsprechenden K_i -Werte berechnet.²³⁵

Um die Selektivität jeder Testverbindung für ein bestimmtes Enzym zu bewerten und grafisch darzustellen, wurden die K_i -Werte in pK_i -Werten ($= -\log K_i$) ausgedrückt. Die Abbildung 65 veranschaulicht die Ergebnisse.

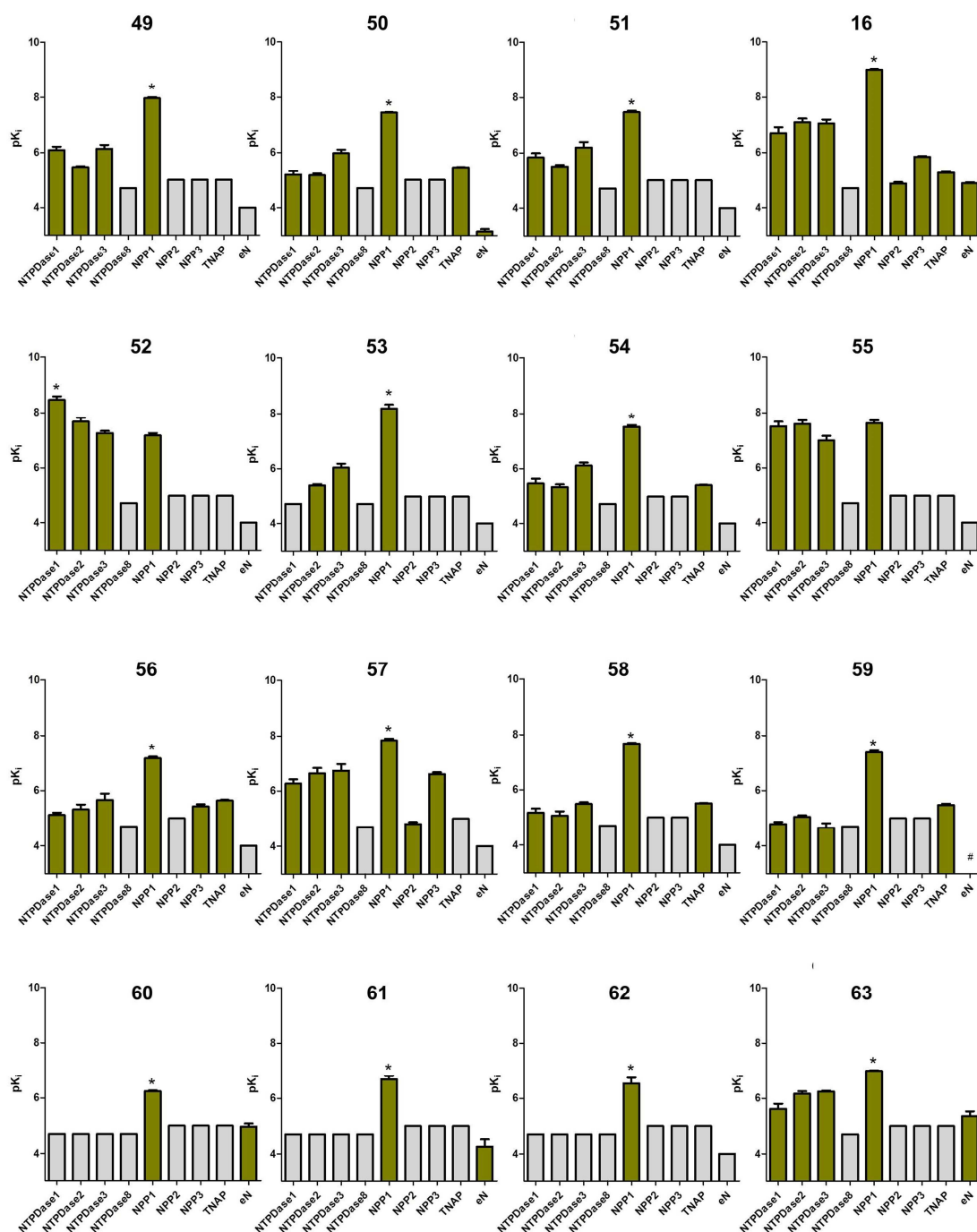


Abbildung 65:²³⁵ Selektivität der Inhibition verschiedener Ectonucleotidasen durch die POMs **16** und **49 - 59** und die Rheniumcluster-Verbindungen **60 - 63**. Dargestellt sind die Mittelwerte der p_{K_i}-Werte ± Standardfehler. Die grünen Balken zeigen die aus den IC₅₀-Werten berechneten p_{K_i}-Werte. Die grauen Balken demonstrieren die maximal möglichen p_{K_i}-Werte, die aus den jeweils höchsten eingesetzten Inhibitorkonzentrationen mithilfe der Cheng-Prusoff Gleichung für kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren berechnet worden sind (maximale p_{K_i}-Werte für die humanen NTPDasen, 4,70 μM; humane NPPs, 5,00 μM; humane TNAP, 5,00 μM; Ratten eN, 4,00 μM). # Keine Daten verfügbar, da die Verbindung **59** die eN aktiviert. * p < 0,05.

Mit Ausnahme der Verbindungen **52** und **55** inhibierten alle untersuchten Verbindungen die humane NPP1 selektiv gegenüber den anderen Ectonucleotidasen ($P < 0,05$). Der Metallkomplex **52** inhibierte die humane NTPDase1 selektiv ($P < 0,05$) mit einem K_i -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich ($K_i = 3,88 \pm 1,4$ nM). Diese Verbindung ist somit der potenteste bisher identifizierte NTPDase1-Inhibitor. Für die NTPDase2, NTPDase3, NTPDase8, NPP2, NPP3, TNAP und eN konnte aus den untersuchten Verbindungen kein selektiver Inhibitor identifiziert werden. Die Verbindung **55** zeigte eine sehr hohe inhibitorische Aktivität gegenüber der NTPDase1 ($K_i = 28,0 \pm 4,6$ nM), der NTPDase2 ($K_i = 21,8 \pm 5,8$ nM), der NTPDase3 ($K_i = 77,7 \pm 13$ nM) und der NPP1 ($K_i = 24,5 \pm 0,9$ nM) und könnte daher in zukünftigen Forschungsarbeiten als nicht-spezifischer Pan-Inhibitor dieser Ectonucleotidasen eingesetzt werden.²³⁵

Die Ergebnisse der Untersuchung liefern neue grundlegende Erkenntnisse über die Interaktion zwischen POMs und strukturell ähnlichen Rheniumcluster-Verbindungen und den Ectonucleotidasen. Die als potente Inhibitoren der NTPDase1 und NPP1 identifizierten Verbindungen könnten darüber hinaus als pharmakologische Werkzeuge dienen, um die pathophysiologische und physiologische Rolle dieser Ectonucleotidasen besser zu verstehen.²³⁵

4.4 Vor- und Nachteile verschiedener Assays zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen

Kürzlich wurde von Yegutkin²³⁷ ein Übersichtsartikel der Assays zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen und ihren Vor- und Nachteilen veröffentlicht. Allerdings sind dort die in der vorliegenden Arbeit etablierten FP-Assays und der CDP-Star-Assay nicht diskutiert. Demnach sollen im Folgenden die Vor- und Nachteile der bisher häufig verwendeten und in der vorliegenden Arbeit etablierten Assays zur Aktivitätsbestimmung von NTPDasen und APs (Malachitgrün-, CE-, Radioaktiv-, Luciferase-, Enzymgekoppelter-, Titrationskalorimetrie-, FP-, *para*-Nitrophenylphosphat- und CDP-Star-Assay) ausführlicher diskutiert und abschließend (Kapitel 4.4.10) einander vergleichend gegenüber gestellt werden.

4.4.1 Malachitgrün-Assay

Der Malachitgrün-Assay ermöglicht es, die bei der Enzymreaktion freigesetzte Phosphatmenge mittels einer Absorptionsmessung zu quantifizieren (vergleiche Kapitel 3.1.1). Aufgrund der einfachen Handhabung lässt er sich in Mikrotiterplatten durchführen und erlaubt somit einen hohen Probendurchsatz, da eine Platte schon nach nur insgesamt 30-minütiger Inkubationszeit gemessen werden kann. Zudem sind die Kosten der zu verwendenden Reagenzien sehr gering. Allerdings weist der Assay auch einige Nachteile auf. So wird nur das bei der enzymatischen Reaktion als Nebenprodukt entstehende Phosphat detektiert, nicht aber das Hauptprodukt, die Nucleotide. Phosphatkontaminationen (= hohe Hintergrundsignale) sind nicht vollständig vermeidbar, da Phosphat beispielsweise bereits in großen Mengen in Wasser enthalten sein kann. Es ist ein hoher Substratumsatz notwendig, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten; somit ist der Einsatz hoher Substratkonzentrationen erforderlich. Aufgrund der Absorptionsmessung bei 623 nm können zudem farbige Testverbindungen oder Pflanzenextrakte die Messung stören. Kürzlich wurde von Feng *et al.*²³⁸ beschrieben, dass hydrophobe Amine wie Papaverin, Sildenafil oder Chinin mit dem klassischen Malachitgrünassay interferieren. Bei diesem wird die Malachitgrünlösung nach der schwefelsauren Ammoniummolybdatlösung zu der Phosphat enthaltenden Reaktionslösung gegeben. So können viele Falsch-Positive Ergebnisse erzeugt werden. In der sauren Reaktionslösung bilden sich zwischen dem hydrophoben Amin (protoniert) und dem Phosphormolybdat reversible Komplexe über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen. Diese Komplexe aggregieren irreversibel vor der Zugabe der Malachitgrünlösung. Als Folge ist das Phosphormolybdat nicht mehr zugänglich für das

Malachitgrünmolekül, und trotz des Vorhandensein von Phosphat ist keine Grünblaufärbung der Lösung detektierbar.²³⁸ Somit wird eine Substanz fälschlicherweise als potenter Inhibitor identifiziert. Auch in den ersten Versuchen dieser Arbeit mit dem Malachitgrün-Assay wurde die klassische Methode verwendet. Es soll hier beispielhaft eine vermeintliche Konzentrations-Inhibitions-Kurve des Chinin-HCl gezeigt werden (siehe Abbildung 66).

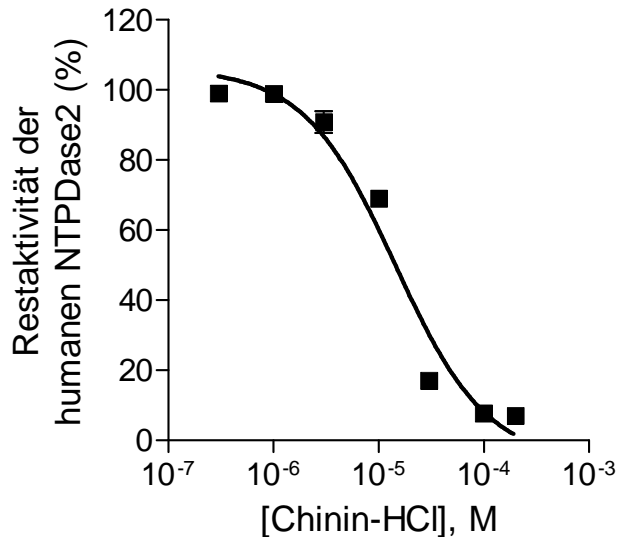


Abbildung 66: Mit dem klassischen Malachitgrün-Assay aufgenommene, vermeintliche Konzentrations-Inhibitions-Kurve von Chinin-HCl für die humane NTPDase2.

Gibt man jedoch zunächst die Malachitgrünlösung und anschließend die Ammoniummolybdatlösung zu dem Reaktionsansatz, dann lässt sich keine Inhibition mehr detektieren. Bei der neu vorgeschlagenen Assaydurchführung²³⁸ konkurriert Malachitgrün mit dem Amin um die Komplexbildung mit dem Phosphormolybdat. Der Komplex zwischen Malachitgrün und Phosphormolybdat wird vorzugsweise gebildet bevor es zur Aggregation des Phosphormolybdat und des hydrophobenamins kommen kann.²³⁸ Der Malachitgrün-Assay wurde in dieser Arbeit dementsprechend umgestellt und so für alle gezeigten Ergebnisse eingesetzt.

4.4.2 Kapillarelektrophorese-Assay

Bei CE-Assays werden Substrate und Produkte einer Enzymreaktion elektrophoretisch getrennt und über ihre Peakflächen quantifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Trennung von ADP und AMP etabliert (vergleiche Kapitel 4.2.1). Es sind nur

minimale Volumina der Testproben notwendig, die natürlichen Substrate und Produkte werden detektiert und ein automatisiertes HTS ist möglich.¹⁰⁶ Dennoch ist es eine sehr zeitaufwendige Methode und aufgrund geringer Sensitivität der häufig verwendeten CE-UV-Detektoren, müssen hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden. Daher stellt die CE-Methode zur Zeit noch nicht die optimale Wahl für HTS-Kampagnen dar.

4.4.3 Radioaktive Assays

Der Vorteil radioaktiver Assays, bei welchen das Substrat radioaktiv markiert ist, liegt in einer hohen Sensitivität, was das Arbeiten mit Substratkonzentrationen im niedrig nanomolaren Bereich ermöglicht. Allerdings möchten immer mehr Pharmaunternehmen und akademische Institute Radioassays aufgrund des damit verbundenem Radioaktivabfalls, der vielen Sicherheitsauflagen und der Strahlenexposition der Mitarbeiter vermeiden.^{182,218} Die radioaktive DC-Methode ist zudem sehr zeitaufwendig und teuer, sodass sie nicht gut für HTS-Kampagnen geeignet ist. Eine neue Methode zur Aktivitätsbestimmung der eN wurde kürzlich von Freundlieb *et al.*²³⁹ beschrieben, bei welcher [³H]AMP als Substrat eingesetzt wird. Das bei der Enzymreaktion entstehende radioaktive Adenosin wird durch das Ausfällen des nach der Reaktion noch übrig gebliebenen Substrates getrennt und quantifiziert. Das Screening von Verbindungen im Hochdurchsatz könnte so möglich werden.

4.4.4 Luciferase-Assay

Vorteile des Luciferase-Assays zur Detektion des ATP-Verbrauchs sind, dass die Signale selten durch Testverbindungen gestört werden und der Assay sehr einfach und kostengünstig im Mikrotiterplattenformat durchführbar ist.^{240,241} Allerdings ist bei dieser Methode eine hoher Substratumsatz notwendig, um ein ausreichend großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.^{218,239}

4.4.5 Enzym-gekoppelte Assays

Bei der Verwendung Enzym-gekoppelter Assays, wie der fluoreszenzbasierten Methode zur Quantifizierung der bei der Enzymreaktion entstandenen Phosphatmenge mithilfe der Meerrettichperoxidase und Amplex[®] Red, kann die zu untersuchende Testverbindung neben dem untersuchten Enzym von Interesse auch mit einem der anderen Enzyme interferieren und somit zu falschen Ergebnissen führen. Daher ist dieser gekoppelte

Enzymassay für HTS-Kampagnen nicht unbedingt empfehlenswert.^{194,218} Zudem wird wie beim Malachitgrün-Assay nicht das eigentliche Produkt der Enzymreaktion detektiert. Vorteilhaft ist allerdings, dass der Assay im Mikrotiterplattenformat durchführbar ist und somit einen hohen Probendurchsatz ermöglicht.

4.4.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

Ein großer Vorteil der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) liegt darin, dass die natürlichen Substrate und nativen Enzyme unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden können. Zudem stören weder farbige Inhibitoren das Assaysignal noch müssen Substrat und Produkt getrennt werden (wie z. B. bei der DC oder CE). Auch die Aktivitäten verschiedener Enzyme oder ganzer Enzym-Signalwege sind gleichzeitig messbar.²⁴² Allerdings ist die ITC-Methode aufgrund des Zeitaufwandes und einem geringen Probendurchsatz bei den bisher zur Verfügung stehenden Messgeräten nicht optimal für ein HTS geeignet, könnte aber für die Verifizierung von aktiven Verbindungen verwendet werden.^{87,243}

4.4.7 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays

Eine neue auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen beruhende Methode zur Aktivitätsbestimmung der NTPDasen wurde in dieser Arbeit etabliert. Im Allgemeinen lässt sich die Methode für alle ADP-, AMP- oder GMP-bildende Enzyme anwenden. Die FP-Assays ermöglichen die direkte Detektion der Reaktionsprodukte im Mikrotiterplattenformat. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ist der Einsatz sehr geringer Substratkonzentrationen ($< K_M$ -Werte) möglich. Die natürlichen Substrate sind verwendbar und das geringe Probenvolumen von 10 μ l spart kostbare Enzympräparationen und Testverbindungen. Z' -Faktoren ≥ 0.70 zeigen, dass die FP-Assays sehr robust und somit optimal für HTS-Kampagnen geeignet sind. Nachteilig bei Verwendung dieser Methode ist, dass die Antikörper und Tracer zur Herstellung der Detektionslösungen relativ teuer sind ($\sim 0,30$ €/Datenpunkt). Zudem ist die kinetische Charakterisierung der Enzyme mit den FP-Assays zwar möglich, allerdings nicht sehr genau. Die FP-Assays sind hoch sensitiv, da die notwendige Antikörperkonzentration der verwendeten Substratkonzentration optimal angepasst wird. Werden für die kinetische Charakterisierung eines Enzyms nun verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt bedeutet dies, dass auch entsprechend für jede Substratkonzentration die optimale Antikörperkonzentration ermittelt und verwendet werden muss. Die benötigte

Antikörpermenge für den ADP-FP-Assay lässt sich mithilfe einer Geradengleichung (siehe Kapitel 3.1.2.2) noch relativ leicht berechnen. Für den AMP-FP-Assay jedoch muss die optimale Antikörperkonzentration für jede Substratkonzentration mittels Titration ermittelt werden, sodass eine große Menge des teuren Antikörpers eingesetzt werden muss.

4.4.8 *para*-Nitrophenylphosphat-Assay

Bei dem zur Aktivitätsbestimmung der APs häufig verwendeten *para*-Nitrophenylphosphat-Assay wird das Substrat zu dem gelben *para*-Nitrophenolat umgesetzt. Der Assay ermöglicht zwar ein Screening im Mikrotiterplattenformat und somit einen hohen Durchsatz, allerdings weist er auch erhebliche Nachteile auf. Viele kleine Moleküle absorbieren bei der Auswertungswellenlänge von 405 nm, welches bei einem HTS fehlerhafte Ergebnisse liefern kann. Zudem ist die spezifische Aktivität der TNAP gegenüber dem nicht natürlichen Substrat sehr gering, sodass der Einsatz hoher Enzymkonzentrationen notwendig ist.¹³⁴

4.4.9 CDP-Star-Assay

Der sehr sensitive CDP-Star-Assay, der ebenfalls zur Aktivitätsbestimmung von APs Einsatz findet und in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert wurde, ist schnell und einfach in Mikrotiterplatten durchführbar und ermöglicht somit HTS. Zudem ist es ein sensitiver Lumineszenzassay, sodass Störungen von Testverbindungen unwahrscheinlich sind. Allerdings muss die Konkurrenz eines Inhibitors mit dem relativ großen CDP-Star-Substrat nicht zwingend bedeuten, dass die Verbindung auch in der Lage ist die Bindung des viel kleineren, natürlichen Substrates PP_i kompetitiv zu inhibieren.¹³⁴ Daher könnten weitere Tests erforderlich sein, um dann abschließend einen potentiellen Inhibitor der APs mit dem natürlichen Substrat als solchen zu verifizieren.¹⁵³

4.4.10 Vergleich der Assays

Nicht jeder der zuvor aufgeführten Assays ist für die Aktivitätsbestimmungen von NTPDasen, APs, eN und NPPs geeignet. Die folgende Tabelle soll eine Übersicht geben, wobei die Eignung eines Assays zur Aktivitätsbestimmung des entsprechenden Enzyms mit einem (+) und die Nichteignung entsprechend mit einem (-) markiert ist.

Tabelle 16 (modifiziert nach Yegutkin 2014)²³⁷: Eignung der wichtigsten Assays zur Aktivitätsbestimmung verschiedener Ectonucleotidasen.

Enzymassays	NTPDasen	APs	eN	NPPs
Malachitgrün-Assay	+	+	+	-
FP-Assay	+	+	-	+
CE-Assay	+	+	+	+
CDP-Star-Assay	-	+	-	-
Radioaktiv-Assays	+	+	+	+
Luciferase-Assays	+	+	+	+
Enzym-gekoppelter Resorufin-Assay	+	+	+	-
ITC	+	+	+	+
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat-Assay	-	+	-	-

FP, Fluoreszenzpolarisation; CE, Kapillarelektrophorese; ITC, isotherme Titrationskalorimetrie

Die zwei Enzymassays mit den Alternativsubstraten CDP-Star und *p*-Nitrophenylphosphat sind ausschließlich für die Aktivitätsbestimmung der APs geeignet. Des Weiteren ermöglichen die Assays zum Nachweis von Phosphat (Malachitgrün- und Enzymgekoppelter Resorufin-Assay) keine Aktivitätsbestimmung von NPPs, da aus den enzymatischen Reaktionen Diphosphat (Substrat = ATP) als Reaktionsprodukt hervorgeht.

Neben der Eignung eines Assays zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms von Interesse sind einige Parameter für ein HTS wichtig. Neben den Kosten, der Durchführbarkeit im Plattenformat (= hoher Probendurchsatz in kurzer Zeit) und der Sensitivität spielen die Verwendung des natürlichen Substrates und die Möglichkeit des direkten Produktnachweises eine entscheidende Rolle. In der nachfolgenden Tabelle sind die für ein HTS wichtigen Parameter eines Assays aufgeführt und für die in dieser Arbeit näher vorgestellten Assays als zutreffend (+) oder nicht zutreffend (-) bewertet.

Tabelle 17:²³⁷ Übersicht der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Enzymassays und der Beurteilung der für ein HTS wichtigen Parameter

Enzymassays	Kostengünstig ^a	Plattenformat	Sensitiv ^b	Natürliches Substrat	Direkter Nachweis des Produktes
Malachitgrün-Assay	+	+	-	+	-
FP-Assay	-	+	+	+	+
CE-Assay	+	-	-	+	+
CDP-Star-Assay	+	+	+	-	+
Radioaktiv-Assays	-	-/+ ^c	+	+	+
Luciferase-Assays	+	+	-	+	-
Enzymgekoppelter Resorufin-Assay	-	+	-	+	-
ITC	+	-	-	+	-
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat-Assay	+	+	-	-	+

^a < 0,10 €/Datenpunkt für die Substrate und Detektionsreagenzien (falls erforderlich);

^b Substratkonzentration < K_M -Wert einsetzbar und trotzdem eine sensitive Messung der Enzymaktivität möglich; ^c Während ein TLC-Assay nicht für eine Anwendung im HTS geeignet ist, kann der kürzlich beschriebene Assay von Freundlieb *et al*²³⁹ zur Aktivitätsbestimmung der eN durchaus in einem Hochdurchsatzscreening mit der entsprechend dafür benötigten Laborausstattung Anwendung finden.

Jeder der in dieser Arbeit vorgestellten und verwendeten Assays zeigt Vor- und Nachteile. Welcher Assay für die Testung von Verbindungen in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den NTPDasen und APs verwendet werden sollte, muss demnach individuell für die entsprechend gewünschte Anwendung und die Ziele ausgewählt werden. Für HTS großer Substanzbibliotheken bei Verwendung der isolierten Enzyme sind sicherlich der kostengünstige Malachitgrün- und CDP-Star-Assay empfehlenswert, die beide einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Zudem beruht der CDP-Star-Assay auf einer Lumineszenzmessung, welche weitaus sensitiver ist als die Absorptionsmessung bei Verwendung des *p*-Nitrophenylphosphat-Assays. Für die Verifizierung potenter Verbindungen hingegen kann der CE-Assay optimal geeignet sein, da er den Einsatz der

natürlichen Substrate und den direkten Nachweis des Produktes ermöglicht. Die neu etablierten FP-Assays vereinen die meisten Vorteile. Allerdings könnten die (zur Zeit noch) relativ hohen Kosten den Einsatz als neuen Standardassay erschweren.

5 Zusammenfassung

Ectonucleotidasen werden ubiquitär im Körper exprimiert und sind an vielen physiologischen und (patho)physiologischen Prozessen beteiligt. Sie sind daher als potentielle **Arzneistofftargets** von großem Interesse (z. B. in der Krebsbehandlung oder der antimikrobiellen Therapie). Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es jedoch wichtig, die genaue Funktion der unterschiedlichen Enzymsubtypen zu kennen und zu verstehen. Inhibitoren können hierbei als pharmakologische Werkzeuge dienen und zur Target-Validierung verwendet werden. Bisher sind nur wenige und nicht sehr potente Inhibitoren beschrieben worden. Um neue Hemmstoffe zu identifizieren, werden geeignete **Methoden zur Aktivitätsbestimmung** benötigt.

Malachitgrün-Assay

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der **Malachitgrün-Assay** für die **Aktivitätsbestimmung** der humanen **NTPDase1, -2, -3 und -8** etabliert, erfolgreich auf eine Roboteranlage übertragen und validiert (**Z'-Faktoren > 0,70**). Er ermöglicht die Detektion des bei der Enzymreaktion entstehenden Phosphats. In einem ersten **High-throughput Screening** (HTS) wurden verschiedene Substanzbibliotheken (insgesamt 3800 Testverbindungen) zur Identifizierung inhibitorisch aktiver Verbindungen getestet (**Z'-Faktoren $\geq 0,79$**). Vier Treffer wurden näher charakterisiert: LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**), Tamoxifencitrat (**34**) und PSB-06126 (**35**) wurden als selektive **Inhibitoren** einzelner NTPDase-Subtypen mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich **identifiziert** (siehe Abbildung 67).

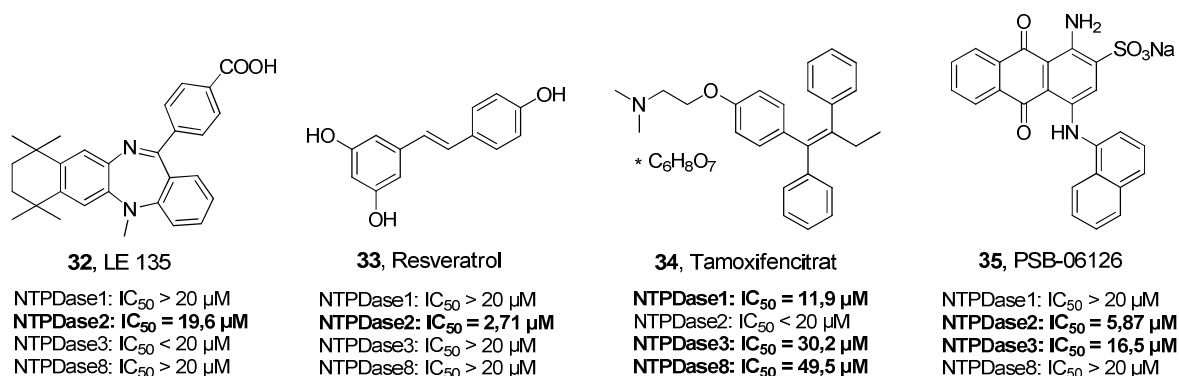
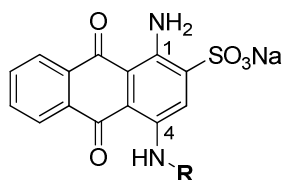


Abbildung 67: Die neu identifizierten Inhibitoren der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8 LE 135 (**32**), Resveratrol (**33**), Tamoxifencitrat (**34**) und PSB-06126 (**35**) (IC_{50} = Mittelwerte, n = 3).

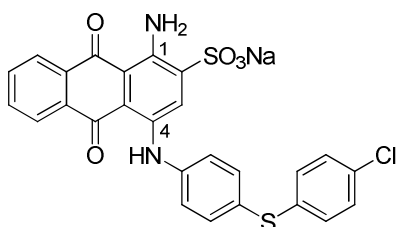
Als **potentester** und **selektiver Inhibitor** der humanen **NTPDase2** mit unkompetitivem Hemmmechanismus wurde **Resveratrol (33)** mit einem **IC₅₀-Wert** von **2,71 µM** charakterisiert. Aufgrund der Identifizierung von PSB-06126 als Inhibitor der humanen NTPDase2 und -3, wurden weitere **Anthrachinon-Derivate** auf ihre inhibitorische Aktivität an den NTPDasen untersucht. Darauf basierend konnten erste **Struktur-Wirkungs-Beziehungen** für Verbindungen, die sich in ihrer Substitution an der 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts unterscheiden, für die humanen NTPDasen1, -2 und -3 abgeleitet werden (die Verbindungen waren inaktiv an der NTPDase8). In Tabelle 18 sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei die für die inhibitorische Aktivität wichtigen Strukturmerkmale mit einem Häkchen markiert sind.

Tabelle 18: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Anthrachinon-Derivaten an den humanen NTPDasen1, -2 und -3.



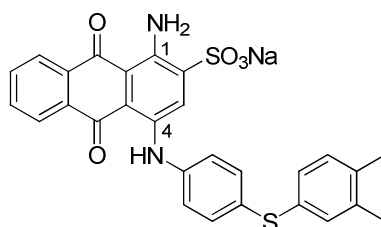
R	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3
Große Reste	✓	✓	-
Flexible aromatische Reste mit lipophilen Substituenten	✓	✓	-
Starre, polyzyklische Aromaten	-	✓	-
Saure, funktionelle Gruppen	-	-	✓

Als **potenteste Anthrachinon-Derivate** der untersuchten Serie wurde **37** für die humane NTPDase1 (IC₅₀ = 4,07 µM), **45** für die humane NTPDase2 (IC₅₀ = 0,83 µM) und **38** für die humane NTPDase3 (IC₅₀ = 0,39 µM) identifiziert (siehe Abbildung 68).



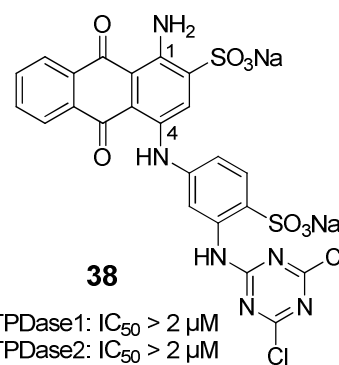
37

NTPDase1: IC₅₀ = 4,07 µM
 NTPDase2: IC₅₀ = 1,08 µM
 NTPDase3: IC₅₀ > 2 µM
 NTPDase8: IC₅₀ > 2 µM



45

NTPDase1: IC₅₀ < 2 µM
NTPDase2: IC₅₀ = 0,83 µM
 NTPDase3: IC₅₀ > 2 µM
 NTPDase8: IC₅₀ > 2 µM



38

NTPDase1: IC₅₀ > 2 µM
 NTPDase2: IC₅₀ > 2 µM
NTPDase3: IC₅₀ = 0,39 µM
 NTPDase8: IC₅₀ > 2 µM

Abbildung 68: Die potentesten, identifizierten Anthrachinon-Derivate an der humanen NTPDase1 (**37**), NTPDase2 (**45**) und NTPDase3 (**38**) (IC₅₀ = Mittelwerte, n = 2 - 3).

Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays

Neben dem Malachitgrün-Assay konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit neue, auf **Fluoreszenzpolarisationsmessungen** beruhende Methoden zur Aktivitätsbestimmung der **NTPDase1, -2, -3 und -8** entwickelt und validiert (**Z'-Faktor ≥ 0.70**) werden. Diese Assays ermöglichen die **direkte Quantifizierung** der bei der Enzymreaktion entstehenden **Produkte** ADP oder AMP im **384-Loch-Format**. Das gebildete Nucleotid verdrängt einen entsprechenden Fluoreszenz-markierten Nucleotidtracer von einem spezifischen Antikörper, wodurch es zu einer Änderung der Fluoreszenzpolarisation (FP) kommt. Diese neu etablierte Methode ist **sehr sensitiv** und der Einsatz von Substratkonzentrationen (20 μM ATP oder 10 μM ADP) im Bereich oder unterhalb der für die Enzyme ermittelten K_M -Werte ist dadurch problemlos möglich. Dies erleichtert die Identifizierung kompetitiver Hemmstoffe und ermöglicht die Durchführung Fragment-basierter Screeningansätze in zukünftigen Forschungsarbeiten. Durch optimierte Antikörper- und Enzymkonzentrationen können 2 μM ADP und 1 μM AMP reproduzierbar detektiert werden (bei 10 % Substratumsatz). In einem ersten exemplarischen **Screening** wurden **> 400 Arzneistoffe** in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der humanen NTPDase3 (Z'-Faktor: 0,87) untersucht und zwei Verbindungen als potentielle **Inhibitoren identifiziert**, wobei eine als Inhibitor bestätigt werden konnte (Liothyronin (**46**)). Die vorgestellten Ergebnisse wurden bereits von uns publiziert (Fiene *et al.*²¹⁷). Auch die mithilfe des Malachitgrün-Assays als Inhibitoren identifizierten und näher charakterisierten Verbindungen konnten mit den FP-Assays bestätigt werden. Des Weiteren führten Untersuchungen von **Polyoxometalaten** (POMs) und Rheniumcluster-Verbindungen zur Identifizierung des **potentesten, bisher beschriebenen NTPDase1-Inhibitors 52** ($\text{K}_{10}[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$) mit einem **K_i -Wert von 3,88 nM**. Die gezeigten Ergebnisse wurden ebenfalls bereits von uns publiziert (Lee und Fiene *et al.*)²³⁵. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Resultate zeigen, dass die neuen FP-Assays optimal für das Screening von Substanzbibliotheken sowie die Aufnahme von Konzentrations-Inhibitions-Kurven geeignet sind.

Kapillarelektrophorese-Assay

Für die Aktivitätsbestimmung der bakteriellen **Lp1NTPDase** aus *Legionella pneumophila* wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich ein Kapillarelektrophorese-Assay (**CE-Assay**) entwickelt. Er ermöglicht es, das bei der Enzymreaktion gebildete AMP elektrophoretisch vom Substrat ADP (500 μM) zu trennen und die entsprechenden Konzentrationen über die Peakflächen zu quantifizieren. Kommerziell erhältliche „Reactive Blue“-Farbstoffe (**7**,

38, 64) und strukturell verwandte **Anthrachinon-Derivate (65 - 84)** wurden in Hinblick auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der Lp1NTPDase untersucht und **Struktur-Wirkungs-Beziehungen** analysiert. Fünf Testverbindungen konnten als neue Lp1NTPDase-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im niedrig mikromolaren Bereich identifiziert werden. Große, lipophile Reste in der 4-Position des Anthrachinon-Grundgerüsts erhöhen die inhibitorische Aktivität. Die **Verbindung 84** mit einem 9-Phenanthryl-Rest in der 4-Position wurde als **potentester Inhibitor** der Lp1NTPDase mit einem IC_{50} -Wert von 4,24 μ M identifiziert (siehe Abbildung 69). Sie ist selektiv gegenüber den humanen NTPDase3 und -8 und ebenfalls ein potenter Inhibitor der humanen NTPDase2, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zu der Lp1NTPDase aufweist.

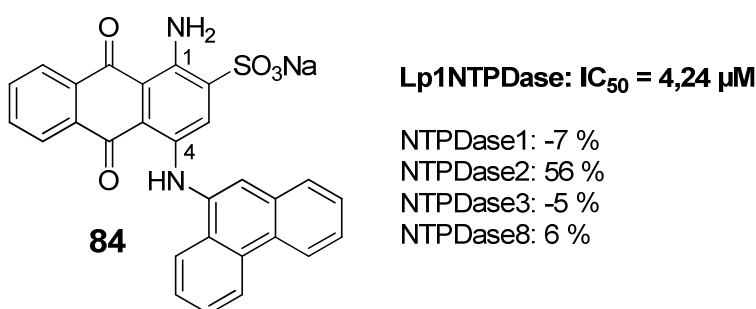


Abbildung 69: Potentester identifizierter Lp1NTPDase-Inhibitor **84** (IC_{50} = Mittelwert, $n = 3$; % Inhibition bei 2 μ M = Mittelwert, $n = 2$).

Demnach scheint das bakterielle Enzym (ähnlich zu der NTPDase2) eine lipophile Bindungstasche zu haben, in die sich sehr gut große, lipophile Reste (z. B. polyzyklische Aromaten) einpassen.

CDP-Star-Assay

Der bereits in der Literatur¹³⁴ beschriebene **Lumineszenzassay** zur Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatasen mit CDP-Star als Substrat wurde erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe für die gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (**TNAP**) etabliert. Der Assay lässt sich problemlos in 96-Loch-Format durchführen und liefert sehr robuste und gut reproduzierbare Ergebnisse (**Z'-Faktor > 0,60**). In einem ersten **Screening** von 192 Testverbindungen konnten fünf POMs erstmals als Inhibitoren der humanen TNAP identifiziert werden. Der **Metallkomplex 56** ($Na_{20}[P_6W_{18}O_{79}] \cdot 37H_2O$) wurde als **potentester Inhibitor** (kompetitiver Hemmmechanismus) mit einem K_i -Wert von 2,27 μ M bestimmt. Der neu etablierte CDP-Star-Assay eignet sich aufgrund der Durchführung im **Mikrotiterplattenformat**, der **geringen Kosten** und der **hohen Sensitivität**

(Lumineszenzmessung) optimal für die Testung großer Substanzbibliotheken und kann für zukünftige HTS-Kampagnen problemlos auf das Robotersystem übertragen werden.

Vergleich verschiedener Methoden

Insbesondere in Bezug auf die **Eignung** für ein **HTS** zeigt jeder Assay zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen **Vor- und Nachteile**. Diese konnten erstmals in der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet werden und sind in der nachfolgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 19:²³⁷ Übersicht der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Enzymassays und der Beurteilung der für ein HTS wichtigen Parameter

Enzymassays	Kostengünstig ^a	Plattenformat	Sensitiv ^b	Natürliches Substrat	Direkter Nachweis des Produktes
Malachitgrün-Assay	+	+	-	+	-
FP-Assay	-	+	+	+	+
CE-Assay	+	-	-	+	+
CDP-Star-Assay	+	+	+	-	+
Radioaktiv-Assays	-	-/+ ^c	+	+	+
Luciferase-Assays	+	+	-	+	-
Enzymgekoppelter Resorufin-Assay	-	+	-	+	-
Isotherme Titrationskalorimetrie	+	-	-	+	-
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat-Assay	+	+	-	-	+

^a < 0,10 €/Datenpunkt für die Substrate und Detektionsreagenzien (falls erforderlich);

^b Substratkonzentration < K_M -Wert einsetzbar und trotzdem eine sensitive Messung der Enzymaktivität möglich; ^c (-) für den Dünnschichtchromatographie-Assay und (+) für den von Freundlieb *et al.*²³⁹ beschriebenen Assay.

Die ausführlich dargestellte Bewertung verschiedener Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Ectonucleotidasen erleichtert die Wahl eines geeigneten Assays in zukünftigen Forschungsarbeiten. Die Identifizierung und Charakterisierung von potenten und

selektiven NTPDase-, TNAP- und Lp1NTPDase-Inhibitoren kann in weiteren HTS-Kampagnen mithilfe der neu etablierten Assays ermöglicht werden. Darüber hinaus können die bereits in der vorliegenden Arbeit identifizierten Inhibitoren als pharmakologische Werkzeuge eingesetzt werden, um die (patho)physiologische Rolle der Ectonucleotidasen besser zu verstehen. Durch die neu gewonnenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen können durch gezielte Optimierung noch potentere Hemmstoffe entwickelt werden, die Potential als Arzneistoffe zur Behandlung von z.B. Krebs oder bakteriellen Infektionen besitzen.

6 Abkürzungsverzeichnis

8-BuS-ADP	8-Thiobutyladenosin-5'-diphosphat
8-BuS-AMP	8-Thiobutyladenosin-5'-monophosphat
8-BuS-ATP	8-Thiobutyladenosin-5'-triphosphat
ACR	Apyrase-konservierte Regionen
ADA	Adenosin-Desaminase
ADK	Adenylatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Arbeitskreis
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMPNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)diphosphat
AMPPNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat
AOH	Aminoalkohol
AP	Alkalische Phosphatase
ARL67156	N^6 -Diethyl- β - γ -dibromomethylen-ATP
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CD39	Differenzierungsantigen 39 („cluster of differentiation 39“)
CD39L1	CD39-ähnliches Protein („cluster of differentiation 39-like 1“)
CD39L3	CD39-ähnliches Protein („cluster of differentiation 39-like 3“)
CDP-Star	2-chlor-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlortricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenylphosphat Dinatriumsalz
CE	Kapillarelektrophorese
COX	Cyclooxygenase
DEA	Diethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eN	Ecto-5'-Nucleotidase
E-NPP	Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterase
E-NTPDase	Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPIA	Floureszenzpolarisationsimmunoassay
GABA	γ -Aminobuttersäure

GCAP	In den Keimzellen vorkommende alkalische Phosphatase („germ cell alkaline phosphatase“)
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HTS	High-throughput Screening
IAP	Intestinale Alkalische Phosphatase
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IKK β	I κ B Kinase β
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
JNK1	C-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LOD	Nachweisgrenze („limit of detection“)
LOQ	Detektionsgrenze („limit of quantitation“)
LOX	Lipoxygenase
min	Minute
mP	Millipolarisationswert
n.d.	nicht bestimmt
NDP	Nucleosiddiphosphat
NDPK	Nucleosiddiphosphokinase
NMP	Nucleosidmonophosphat
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p38	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
p56 ^{lck}	Lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase p56
P _i	inorganisches Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PPAR γ	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor γ
PP _i	Diphosphat (veraltet Pyrophosphat)
PLAP	Plazentare Alkalische Phosphatase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
p-NPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat

POM	Polyoxometalate
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
R ²	Korrelationskoeffizient
RAR	Retinsäurerezeptor
RB-2	Reactive Blue 2 (1-Amino-4-[[4-[[4-chloro-6-[[3 (or 4)-sulfophenyl]amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfophenyl]amino]-9,10-dihydro-9,10-dioxo-2-anthracensulfonsäure)
RLU	Relative Lumineszenzeinheiten
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
Src	Sarkom
STAT	Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription
TMD	Transmembranspannende Domäne(n)
TNAP	Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase („tissue-nonspecific alkaline phosphatase“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v	Umsatzgeschwindigkeit

7 Literaturverzeichnis

1. Marangoni, A. G. *Enzyme kinetics - A modern approach* (Hrsg.: Wiley-Interscience), 2003, S. 1-226.
2. Löffler, G.; Schölmerich, J. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie* (Hrsg.: Springer Medizin Verlag), **2008**, 7. Aufl., Kapitel 4, S.33-48.
3. Müller-Esterl, W. *Biochemie* (Hrsg.: Spektrum Akademischer Verlag), **2004**, 1. Aufl., Kapitel 13, S. 172–175.
4. Copeland, R. A. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (Hrsg. Wiley-Interscience), **2000**, 2. Aufl., S. 1–390.
5. Leskovac, V. *Comprehensive Enzyme Kinetics*. (Hrsg.: Kluwer Academic Publisher), **2003**, S. 1–451.
6. Kukulski, F.; Lévesque, S. A.; Sévigny, J. *Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling*. *Adv. Pharmacol.* **2011**, 61, 263–299.
7. Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1783, 673–694.
8. Robson, S. C.; Sévigny, J.; Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* **2006**, 2, 409–430.
9. Burnstock, G. Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* **1976**, 62, 491–503.
10. Burnstock, G. *In Cell Membrane Receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach*, Straub, R.W. **1978**, 107–108.
11. Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Alsdorf, B. B. A.; Gorzalka, S.; Brüssel, H.; Müller, C. E. [³H]Adenine is a suitable radioligand for the labeling of G protein-coupled adenine receptors but shows high affinity to bacterial contaminations in buffer solutions. *Purinergic Signal.* **2007**, 3, 347–358.
12. Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* **2007**, 87, 659–797.
13. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, 64, 445–475.
14. Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H.-Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 8573–8578.

15. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; Kügelgen, I. Von; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955–964.
16. Thimm, D. T. Medizinische Chemie und molekulare Pharmakologie G-Protein-gekoppelter Purin- und verwandter Waisen-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Universität Bonn **2013**.
17. Kukulski, F.; Lévesque, S. A.; Lavoie, E. G.; Lecka, J.; Bigonnesse, F.; Knowles, A. F.; Robson, S. C.; Kirley, T. L.; Sévigny, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 193–204.
18. Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 437–502.
19. King, A. E.; Ackley, M. a; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trens Pharm Sci* **2006**, *27*, 416–425.
20. Brunschweiger, A. Darstellung und Charakterisierung von Uracil- und Adennucleotid-Mimetika als selektive Ectonucleotidase-Inhibitoren. *Dissertationsschrift*, Universität Bonn **2007**.
21. Wang, T.-F.; Guidotti, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11392–11399.
22. Biederbick, A.; Rose, S.; Elsässer, H. P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 2473–2484.
23. Biederbick, A.; Kosan, C.; Kunz, J.; Elsässer, H. P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19018–19024.
24. Braun, N.; Fengler, S.; Ebeling, C.; Zimmermann, H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* **2000**, *647*, 639–647.
25. O’Keeffe, M. G.; Thorne, P. R.; Housley, G. D.; Robson, S. C.; Vlajkovic, S. M. Distribution of NTPDase5 and NTPDase6 and the regulation of P2Y receptor signalling in the rat cochlea. *Purinergic Signal.* **2010**, *6*, 249–261.
26. Yeung, G.; Mulero, J. J.; McGowan, D. W.; Bajwa, S. S.; Ford, J. E. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12916–12923.
27. Trombetta, E. S.; Helenius, A. Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **1999**, *18*, 3282–3292.
28. Shi, J. D.; Kukar, T.; Wang, C. Y.; Li, Q. Z.; Cruz, P. E.; Davoodi-Semiromi, A.; Yang, P.; Gu, Y.; Lian, W.; Wu, D. H.; She, J. X. Molecular cloning and

- characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17474–17478.
29. Lavoie, E. G.; Kukulski, F.; Lévesque, S. A.; Lecka, J.; Sévigny, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1917–1926.
30. Hicks-Berger, C. A.; Chadwick, B. P.; Frischauf, A. M.; Kirley, T. L. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34041–34045.
31. Mulero, J. J.; Yeung, G.; Nelken, S. T.; Ford, J. E. CD39-L4 Is a Secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20064–20067
32. Lee, S. Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Ectonucleotidase-Inhibitoren mittels Kapillarelektrophorese. *Diplomarbeit*, Universität Bonn **2007**.
33. Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 44–56.
34. Fausther, M.; Lecka, J.; Kukulski, F.; Lévesque, S. A.; Pelletier, J.; Zimmermann, H.; Dranoff, J. A.; Sévigny, J. Cloning , purification , and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* **2007**, *292*, 785–795.
35. Heine, P.; Braun, N.; Heilbronn, A.; Zimmermann, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262*, 102–107.
36. Vorhoff, T.; Zimmermann, H.; Pelletier, J.; Sévigny, J.; Braun, N. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 259–270.
37. Mateo, J.; Harden, T. K.; Boyer, J. L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 396–402.
38. Knowles, A. F.; Chiang, W.-C. Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *418*, 217–227.
39. Smith, T. M.; Kirley, T. L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. *Biochemistry* **1999**, *38*, 321–328.
40. Knowles, A. F.; Li, C. Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7323–7333.
41. Handa, M.; Guidotti, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1996**, *218*, 916–923.

42. Haller, C. A.; Cui, W.; Wen, J.; Robson, S. C.; Chaikof, E. L. Reconstitution of CD39 in liposomes amplifies nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity and restores thromboregulatory properties. *J. Vasc. Surg.* **2006**, *43*, 816–823.
43. Smith, T. M.; Lewis Carl, S. A.; Kirley, T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5849–5857.
44. Kirley, T. L.; Crawford, P. A.; Smith, T. M. The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 379–389.
45. Knowles, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal.* **2011**, *7*, 21–45.
46. Ivanenkov, V. V.; Meller, J.; Kirley, T. L. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8998–9012.
47. Smith, T. M.; Kirley, T. L. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1509–1516.
48. Murphy, D. M.; Kirley, T. L. Asparagine 81, an invariant glycosylation site near apyrase conserved region 1, is essential for full enzymatic activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *413*, 107–115.
49. Wu, J. J.; Choi, L. E.; Guidotti, G. N-linked oligosaccharides affect the enzymatic activity of CD39: diverse interactions between seven N-linked glycosylation sites. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1661–1672.
50. Grinthal, A.; Guidotti, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1947–1956.
51. Chen, W.; Guidotti, G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 90–95.
52. Zebisch, M.; Sträter, N. Characterization of rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochem.* **2007**, *46*, 11945–11956.
53. Zebisch, M.; Sträter, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6882–6887.
54. Maliszewski, C. R.; Guy, J.; Schoenborn, M. A.; Armitage, R. J.; Fanslow, W. C.; Nakajima, T.; Baker, E.; Sutherland, G. R.; Poindexter, K.; Birks, C.; Alpert, A.; Friend, D.; Gimpel, S. D.; Gayle III, R. B. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* **1994**, *153*, 3574–3583.

55. Koziak, K.; Sévigny, J.; Robson, S. C.; Siegel, J. B.; Kaczmarek, E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 1538–1544.
56. Dwyer, K. M.; Deaglio, S.; Gao, W.; Friedman, D.; Strom, T. B.; Robson, S. C. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* **2007**, *3*, 171–180.
57. Antonioli, L.; Pacher, P.; Vizi, E. S.; Haskó, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 355–67.
58. Sévigny, J.; Sundberg, C.; Braun, N.; Guckelberger, O.; Csizmadia, E.; Qawi, I.; Imai, M.; Zimmermann, H.; Ribson, S. C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* **2002**, *99*, 2801–2809.
59. Marcus, A. J.; Broekman, M. J.; Drosopoulos, J. H. F.; Olson, K. E.; Islam, N.; Pinsky, D. J.; Levi, R. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 234–246.
60. Kauffenstein, G.; Fürstenau, C. R.; D'Orléans-Juste, P.; Sévigny, J. The ectonucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 576–585.
61. Kauffenstein, G.; Drouin, A.; Thorin-Trescases, N.; Bachelard, H.; Robaye, B.; Orléans-Juste, P. D.; Marceau, F.; Thorin, É.; Sévigny, J. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 204–213.
62. Robson, S. C.; Ph, D.; Wu, Y.; Sun, X.; Knosalla, C.; Dwyer, K.; Enjyoji, K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 217–233.
63. Lavoie, E. G.; Gulbransen, B. D.; Martín-Satué, M.; Aliagas, E.; Sharkey, K. A.; Sévigny, J. Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* **2011**, *300*, 608–620.
64. Vandenbeuch, A.; Anderson, C. B.; Parnes, J.; Enjyoji, K.; Robson, S. C.; Finger, T. E.; Kinnamon, S. C. Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *PNAS* **2013**, *110*, 14789–14794.
65. Braun, N.; Sévigny, J.; Robson, S. C.; Hammer, K.; Hanani, M.; Zimmermann, H. Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **2004**, *45*, 124–132.
66. Massé, K.; Bhamra, S.; Eason, R.; Dale, N.; Jones, E. A. Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* **2007**, *449*, 1058–1062.
67. Belcher, S. M.; Zsarnovszky, A.; Crawford, P. A.; Hemani, H.; Spurling, L.; Kirley, T. L. Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat

- brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience* **2006**, *137*, 1331–1346.
68. Fausther, M.; Pelletier, J.; Ribeiro, C. M.; Sévigny, J.; Picher, M. Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2010**, *298*, L804–L818.
69. Lavoie, E. G.; Fausther, M.; Kauffenstein, G.; Kukulski, F.; Künzli, B. M.; Friess, H.; Sévigny, J. Identification of the ectonucleotidases expressed in mouse, rat, and human Langerhans islets: potential role of NTPDase3 in insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E647–E656.
70. Sévigny, J.; Robson, S. C.; Waelkens, E.; Csizmadia, E.; Smith, R. N.; Lemmens, R. Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5640–5647.
71. Bigonnesse, F.; Lévesque, S. A.; Kukulski, F.; Lecka, J.; Robson, S. C.; Fernandes, M. J. G.; Se, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5511–5519.
72. Stagg, J.; Smyth, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 5346–5358.
73. Dzhandzhugazyan, K. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 227–230.
74. Bergamin, L. S.; Braganhol, E.; Zanin, R. F.; Edelweiss, M. I. A.; Battastini, A. M. O. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: an overview. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–10.
75. Wang, L.; Tang, S.; Wang, Y.; Xu, S.; Yu, J.; Zhi, X.; Ou, Z.; Yang, J.; Zhou, P.; Shao, Z. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin. Exp. Metastas.* **2013**, *5*, 671–680.
76. Szychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 161–173.
77. Zebisch, M.; Schäfer, P.; Lauble, P.; Sträter, N. New crystal forms of NTPDase1 from the bacterium *Legionella pneumophila*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69*, 257–262.
78. Sansom, F. M.; Riedmaier, P.; Newton, H. J.; Dunstone, M. A.; Müller, C. E.; Stephan, H.; Byres, E.; Beddoe, T.; Rossjohn, J.; Cowan, P. J.; D'Apice, A. J. F.; Robson, S. C.; Hartland, E. L. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12909–12918.
79. Schuelein, R.; Ang, D. K. Y.; van Driel, I. R.; Hartland, E. L. Immune control of *Legionella* Infection: an in vivo perspective. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 1–6.
80. Sansom, F. M.; Newton, H. J.; Crikis, S.; Cianciotto, N. P.; Cowan, P. J.; D'Apice, A. J. F.; Hartland, E. L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to

- human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 1922–1935.
81. Sansom, F. M.; Robson, S. C.; Hartland, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 765–781.
 82. Vivian, J. P.; Riedmaier, P.; Ge, H.; Le Nours, J.; Sansom, F. M.; Wilce, M. C. J.; Byres, E.; Dias, M.; Schmidberger, J. W.; Cowan, P. J.; D'Apice, A. J. F.; Hartland, E. L.; Rossjohn, J.; Beddoe, T. Crystal structure of a *Legionella pneumophila* ecto-triphosphate diphosphohydrolase, a structural and functional homolog of the eukaryotic NTPDases. *Structure* **2010**, *18*, 228–238.
 83. Kemp, B. E.; Mitchelhill, K. I.; Stapleton, D.; Michell, B. J.; Chen, Z. P.; Witters, L. A. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 22–25.
 84. Giri, S.; Nath, N.; Smith, B.; Viollet, B.; Singh, A. K.; Singh, I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 479–487.
 85. Bours, M. J. L.; Swennen, E. L. R.; Di Virgilio, F.; Cronstein, B. N.; Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 358–404.
 86. Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 3014–3038.
 87. Zebisch, M.; Krauss, M.; Schäfer, P.; Sträter, N. Crystallographic evidence for a domain motion in rat nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) 1. *J. Mol. Biol.* **2012**, *415*, 288–306.
 88. Zebisch, M.; Krauss, M.; Schäfer, P.; Lauble, P.; Sträter, N. Crystallographic snapshots along the reaction pathway of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases. *Structure* **2013**, *21*, 1460–1475.
 89. Zebisch, M.; Baqi, Y.; Schäfer, P.; Müller, C. E.; Sträter, N. Crystal structure of NTPDase2 in complex with the sulfoanthraquinone inhibitor PSB-071. *J. Struct. Biol.* **2014**, *185*, 336–341.
 90. Baqi, Y.; Weyler, S.; Iqbal, J.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 91–106.
 91. Müller, C. E.; Iqbal, J.; Baqi, Y.; Zimmermann, H.; Röllich, A.; Stephan, H. Polyoxometalates - a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5943–5947.

92. Burch, L. H.; Picher, M. E-NTPDases in human airways: Regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinerg. Signal.* **2006**, *2*, 399–408.
93. Enjyoji, K.; Sévigny, J.; Lin, Y.; Frenette, P. S.; Christie, P. D.; Esch, J. S.; Imai, M.; Edelberg, J. M.; Rayburn, H.; Lech, M.; Beeler, D. L.; Csizmadia, E.; Wagner, D. D.; Robson, S. C.; Rosenberg, R. D. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1010–1017.
94. Pinsky, D. J.; Broekman, M. J.; Peschon, J. J.; Stocking, K. L.; Fujita, T.; Ramasamy, R.; Connolly, E. S.; Huang, J.; Kiss, S.; Zhang, Y.; Choudhri, T. F.; Mctaggart, R. A.; Liao, H.; Drosopoulos, J. H. F.; Price, V. L.; Marcus, A. J.; Maliszewski, C. R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39 / ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 1031–1040.
95. Dwyer, K. M.; Robson, S. C.; Nandurkar, H. H.; Campbell, D. J.; Gock, H.; Murraysegal, L. J.; Fiscaro, N.; Mysore, T. B.; Kaczmarek, E.; Cowan, P. J.; Apice, A. J. F. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1440–1446.
96. Marcus, A.; Broekman, M.; Drosopoulos, J.; Islam, N.; Pinsky, D.; Sesti, C.; Levi, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J. Thromb. Haemost.* **2003**, *1*, 2497–2509.
97. Gayle III, R. B.; Maliszewski, C. R.; Gimpel, S. D.; Schoenborn, M. A.; Caspary, R. G.; Richards, C.; Brasel, K.; Price, V.; Drosopoulos, J. H. F.; Islam, N.; Alyonycheva, T. N.; Broekman, M. J.; Marcus, A. J. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase / CD39. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1851–59.
98. Marcus, A. J.; Broekman, M. J.; Drosopoulos, J. H. F.; Islam, N.; Pinsky, D. J.; Sesti, C.; Levi, R.; M, D. M. A. J.; Pathology, A. J. M.; Pharmacology, C. S.; Medical, W. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39 / ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 9–16.
99. Belayev, L.; Khoutorova, L.; Deisher, T. A.; Belayev, A.; Busto, R.; Zhang, Y.; Zhao, W.; Ginsberg, M. D. Neuroprotective effect of SolCD39, a novel platelet aggregation inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **2003**, *34*, 758–763.
100. Buegler, J. M.; Maliszewski, C. R.; Broekman, M. J.; Kaluza, G. L.; Schulz, D. G.; Marcus, A. J.; Raizner, A. E.; Kleiman, N. S.; Ali, N. M. Effects of SolCD39, a novel inhibitor of platelet aggregation, on platelet deposition and aggregation after PTCA in a porcine model. *J. Thromb. Thrombolysis.* **2005**, *19*, 115–122.
101. Gendron, F. P.; Benrezzak, O.; Krugh, B. W.; Kong, Q.; Weisman, G. A.; Beaudoin, A. R. Purine signaling and potential new therapeutic approach: Possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr. Drug Targets.* **2002**, *3*, 229–245.
102. Al-Rashida, M.; Iqbal, J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2013**, *34*, 703–743.

103. Cechin, S. R.; Schetinger, M. R. C.; Zanatta, N.; Madruga, C. C.; Pacholski, I. L.; Flores, D. C.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Morsch, V. M. Inhibitory effect of novel pyrimidines on ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1433–1439.
104. Crack, B. E.; Pollard, C. E.; Beukers, M. W.; Roberts, S. M.; Hunt, S. F.; Ingall, A. H.; McKechnie, K. C.; IJzerman, A. P.; Leff, P. Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 475–481.
105. Lévesque, S. A.; Lavoie, E. G.; Lecka, J.; Bigonnesse, F.; Sévigny, J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 141–150.
106. Iqbal, J.; Vollmayer, P.; Braun, N.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 349–358.
107. Gendron, F.; Halbfinger, E.; Fischer, B.; Duval, M. Novel Inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. *J. Med. Chem* **2000**, 2239–2247.
108. Leclerc, M.; Grondin, G.; Gendron, F.; Se, J.; Beaudoin, A. R. Identification , characterization , and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *377*, 372–378.
109. Sévigny, J.; Levesque, F. P.; Grondin, G.; Beaudoin, A. R. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1334*, 73–88.
110. Lecka, J.; Gillerman, I.; Fausther, M.; Salem, M.; Munkonda, M. N.; Brosseau, J.-P.; Cadot, C.; Martín-Satué, M.; D'Orléans-Juste, P.; Rousseau, E.; Poirier, D.; Künzli, B.; Fischer, B.; Sévigny, J. 8-BuS-ATP derivatives as specific NTPDase1 inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 179–196.
111. Brunschweiler, A.; Iqbal, J.; Umbach, F.; Scheiff, A. B.; Munkonda, M. N.; Sévigny, J.; Knowles, A. F.; Müller, C. E. Selective nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) inhibitors: nucleotide mimetics derived from uridine-5'-carboxamide. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4518–4528.
112. Munkonda, M. N.; Kauffenstein, G.; Kukulski, F.; Lévesque, S. A.; Legendre, C.; Pelletier, J.; Lavoie, E. G.; Lecka, J.; Sévigny, J. Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1524–1534.
113. Kukulski, F.; Komoszynski, M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3447–3454.
114. Hasenknopf, B. Polyoxometalates: Introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 275–287.

115. Ogata, A.; Mitsui, S.; Yanagie, H.; Kasano, H.; Hisa, T.; Yamase, T.; Eriguchi, M. A novel anti-tumor agent, polyoxomolybdate induces apoptotic cell death in AsPC-1 human pancreatic cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 240–244.
116. Geisberger, G.; Paulus, S.; Carraro, M.; Bonchio, M.; Patzke, G. R. Synthesis, characterisation and cytotoxicity of polyoxometalate/carboxymethyl chitosan nanocomposites. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4619–4625.
117. Köhler, D.; Eckle, T.; Faigle, M.; Grenz, A.; Mittelbronn, M.; Laucher, S.; Hart, M. L.; Robson, S. C.; Müller, C. E.; Eltzschig, H. K. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **2007**, *116*, 1784–1794.
118. Grenz, A.; Zhang, H.; Hermes, M.; Eckle, T.; Klingel, K.; Huang, D. Y.; Müller, C. E.; Robson, S. C.; Osswald, H.; Eltzschig, H. K. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2863–2873.
119. Coppi, E.; Pugliese, A. M.; Stephan, H.; Müller, C. E.; Pedata, F. Role of P2 purinergic receptors in synaptic transmission under normoxic and ischaemic conditions in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Purinergic Signal.* **2007**, *3*, 203–219.
120. Lecka, J.; Rana, M. S.; Sévigny, J. Inhibition of vascular ectonucleotidase activities by the pro-drugs ticlopidine and clopidogrel favours platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 1150–1160.
121. Lecka, J.; Fausther, M.; Künzli, B.; Sévigny, J. Ticlopidine in Its Prodrug Form Is a Selective Inhibitor of Human NTPDase1. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–8.
122. <http://ectonucleotidases-ab.com/> (Stand: 30.12.2014).
123. Munkonda, M. N.; Pelletier, J.; Ivanenkov, V. V.; Fausther, M.; Tremblay, A.; Künzli, B.; Kirley, T. L.; Sévigny, J. Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3: partial characterization of the inhibitory epitope and potential applications. *FEBS J.* **2009**, *276*, 479–496.
124. Millán, J. L. Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 335–341.
125. Coleman, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 441–483.
126. Kozlenkov, A.; Le Du, M. H.; Cuniasse, P.; Ny, T.; Hoylaerts, M. F.; Millán, J. L. Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 1862–1872.
127. Harris, H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta.* **1990**, *186*, 133–150.
128. Le Du, M.-H.; Millan, J. L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49808–49814.

129. Nosjean, O.; Koyama, I.; Goseki, M.; Roux, B.; Komoda, T. Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 297–303.
130. Pan, C.; Sartwell, A. D.; Chou, J. Y. Transcriptional regulation and the effects of sodium butyrate and glycosylation on catalytic activity of human germ cell alkaline phosphatase. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2058–2062.
131. Le Du, M. H.; Stigbrand, T.; Taussig, M. J.; Menez, A.; Stura, E. A. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9158–9165.
132. Llinas, P.; Stura, E. A.; Ménez, A.; Kiss, Z.; Stigbrand, T.; Millán, J. L.; Le Du, M. H. Structural studies of human placental alkaline phosphatase in complex with functional ligands. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 441–451.
133. Stec, B.; Cheltsov, A.; Millán, J. L. Refined structures of placental alkaline phosphatase show a consistent pattern of interactions at the peripheral site. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66*, 866–870.
134. Sergienko, E. A.; Millán, J. L. High-throughput screening of tissue-nonspecific alkaline phosphatase for identification of effectors with diverse modes of action. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1431–1439.
135. Fedde, K. N. Alkaline Phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am. J. Hum. Gen.* **1990**, *47*, 767–775.
136. Smith, M.; Weiss, M. J.; Griffin, C. A.; Murray, J. C.; Buetow, K. H.; Emanuel, B. S.; Henthorn, P. S.; Harris, H. Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics* **1988**, *2*, 139–143.
137. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon. Med. Sch.* **2010**, *77*, 4–12.
138. Waymire, K. G.; Mahurem, J. D.; Jaje, J. M.; Guilarte, T. R.; Coburn, S. P.; MacGregor, G. R. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 45–51.
139. Narisawa, S. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev. Dyn.* **1997**, *208*, 432–446.
140. Villa-Bellosta, R.; Wang, X.; Millán, J. L.; Dubyak, G. R.; O'Neill, W. C. Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **2011**, *301*, 61–68.
141. Lomashvili, K. A. Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and osteopontin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1392–1401.

142. O'Neill, W. C.; Lomashvili, K. A.; Malluche, H. H.; Faugere, M.-C.; Riser, B. L. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **2011**, *79*, 512–517.
143. Narisawa, S.; Harmey, D.; Yadav, M. C.; Neill, W. C. O.; Hoylaerts, M. F.; Millán, J. L. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J. Bone Miner. Res.* **2007**, *22*, 1700–1710.
144. Lomashvili, K. A.; Garg, P.; Narisawa, S.; Millan, J. L.; O'Neill, W. C. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 1024–1030.
145. Raza, R.; Matin, A.; Sarwar, S.; Barsukova-Stuckart, M.; Ibrahim, M.; Kortz, U.; Iqbal, J. Polyoxometalates as potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases with profound anticancer and amoebicidal activities. *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 14329–14336.
146. Whitaker, K. B.; Eckland, D.; Hodgson, H. J. F.; Saverymuttu, S.; Williams, G.; Moss, W. A variant alkaline phosphatase in renal cell carcinoma. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 374–377.
147. Ohkubo, S.; Kimura, J.; Matsuoka, I. Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Brit. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 1667–1672.
148. Picher, M.; Burch, L. H.; Hirsh, A. J.; Sychala, J.; Boucher, R. C. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13468–13479.
149. Picher, M.; Burch, L. H.; Boucher, R. C. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20234–20241.
150. Kaunitz, J. D.; Yamaguchi, D. T. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 655–662.
151. Díez-Zaera, M.; Díaz-Hernández, J. I.; Hernández-Álvarez, E.; Zimmermann, H.; Díaz-Hernández, M.; Miras-Portugal, M. T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1014–1024.
152. Holtz, K. M.; Stec, B.; Kantrowitz, E. R. A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8351–8354.
153. Sergienko, E.; Su, Y.; Chan, X.; Brown, B.; Hurder, A.; Narisawa, S.; Millán, J. L. Identification and characterization of novel tissue-nonspecific alkaline phosphatase inhibitors with diverse modes of action. *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 824–837.
154. Chung, T. D. Y.; Sergienko, E.; Millán, J. L. Assay format as a critical success factor for identification of novel inhibitor chemotypes of tissue-nonspecific alkaline phosphatase from high-throughput screening. *Molecules* **2010**, *15*, 3010–3037.

155. Whyte, M. P.; McAlister, W. H.; Patton, L. S.; Magill, H. L.; Fallon, M. D.; Lorentz, W. B.; Herrod, H. G. Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients. *J. Pediatr.* **1984**, *105*, 926–933.
156. Millán, J.; Narisawa, S.; Lemire, I.; Loisel, T. P.; Boileau, G.; Leonard, P.; Gramatikova, S.; Terkeltaub, R.; Camacho, N. P.; McKee, M. D.; Crine, P.; Whyte, M. P. Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* **2008**, *23*, 777–787.
157. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01176266?term=NCT01176266&rank=1> (Stand: 7.10.2014).
158. <http://news.alexionpharma.com/press-release/product-news/improved-survival-observed-pediatric-patients-severe-hypophosphatasia-hpp> (Stand: 7.10.2014).
159. Lin, C.; Fishman, W. H. L-homoarginine: an organ-specific uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3082–3087.
160. Farley, J. R.; Joel, L.; Baylink, D. J. Human skeletal alkaline phosphatase. Kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4680–4686.
161. Van Belle, H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin. Chem.* **1976**, *22*, 972–976.
162. Glogowski, J. A. N.; Danforth, D. R.; Ciereszko, A. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *J. Androl.* **2002**, *23*, 783–792.
163. Chang, L.; Duy, D. Le; Mébarek, S.; Popowycz, F.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M.; Buchet, R. Synthesis and evaluation of thiophenyl derivatives as inhibitors of alkaline phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2297–2301.
164. Li, L.; Chang, L.; Pellet-Rostaing, S.; Liger, F.; Lemaire, M.; Buchet, R.; Wu, Y. Synthesis and evaluation of benzo[b]thiophene derivatives as inhibitors of alkaline phosphatases. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7290–7300.
165. Sidique, S.; Ardecky, R.; Su, Y.; Narisawa, S.; Brown, B.; Millán, J. L.; Sergienko, E.; Cosford, N. D. P. Design and synthesis of pyrazole derivatives as potent and selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 222–225.
166. Dahl, R.; Sergienko, E. a; Su, Y.; Mostofi, Y. S.; Yang, L.; Simao, A. M.; Narisawa, S.; Brown, B.; Mangravita-Novo, A.; Vicchiarelli, M.; Smith, L. H.; O'Neill, W. C.; Millán, J. L.; Cosford, N. D. P. Discovery and validation of a series of aryl sulfonamides as selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6919–6925.
167. Koichi, I.; Michio, U. I. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta* **1965**, *14*, 361–366.

168. Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 266–270.
169. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/M689> (Stand: 3.7.2014).
170. Cogan, E. B.; Birrell, G. B.; Griffith, O. H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 29–35.
171. Burns, K. L.; May, S. W. Separation methods applicable to the evaluation of enzyme–inhibitor and enzyme–substrate interactions. *J. Chromatogr. B* **2003**, *797*, 175–190.
172. Iqbal, J.; Scapozza, L.; Folkers, G.; Müller, C. E. Development and validation of a capillary electrophoresis method for the characterization of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) thymidine kinase substrates and inhibitors. *J. Chromatogr. B* **2007**, *846*, 281–290.
173. Iqbal, J.; Burbiel, J. C.; Müller, C. E. Development of off-line and on-line capillary electrophoresis methods for the screening and characterization of adenosine kinase inhibitors and substrates. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2505–2517.
174. Iqbal, J.; Jirovsky, D.; Lee, S.-Y.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. Capillary electrophoresis-based nanoscale assays for monitoring ecto-5'-nucleotidase activity and inhibition in preparations of recombinant enzyme and melanoma cell membranes. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 129–140.
175. Lee, S.-Y.; Lévesque, S. A.; Sévigny, J.; Müller, C. E. A highly sensitive capillary electrophoresis method using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate as a substrate for the monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activities. *J. Chromatogr. B* **2012**, *911*, 162–169.
176. Iqbal, J.; Knowles, A. F.; Müller, C. E. Development of a microreactor with ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase2) immobilized on a polyacrylamide-coated capillary at the outlet. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 600–604.
177. Yegutkin, G. G.; Henttinen, T.; Samburski, S. S.; Sychala, J.; Jalkanen, S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem. J.* **2002**, *367*, 121–128.
178. Yegutkin, G. G.; Marttila-Ichihara, F.; Karikoski, M.; Niemelä, J.; Laurila, J. P.; Elima, K.; Jalkanen, S.; Salmi, M. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 1231–1241.
179. Mercier, N.; Kiviniemi, T. O.; Saraste, A.; Miiluniemi, M.; Silvola, J.; Jalkanen, S.; Yegutkin, G. G. Impaired ATP-induced coronary blood flow and diminished aortic NTPDase activity precede lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 419–428.
180. Sesti, C.; Koyama, M.; Broekman, M. J.; Marcus, A. J.; Levi, R. Ectonucleotidase in sympathetic nerve endings modulates ATP and norepinephrine exocytosis in myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 238–244.

181. Koresawa, M.; Okabe, T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogenous assay for protein kinase. *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, *2*, 153–160.
182. Helenius, M.; Jalkanen, S.; Yegutkin, G. Enzyme-coupled assays for simultaneous detection of nanomolar ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and pyrophosphate concentrations in extracellular fluids. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 1967–1975.
183. Vazquez, M. J.; Rodriguez, B.; Zapatero, C.; Tew, D. G. Determination of phosphate in nanomolar range by an enzyme-coupling fluorescent method. *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 292–298.
184. Stinson, R. A. Kinetic parameters for the cleaved substrate, and enzyme and substrate stability, vary with the phosphoacceptor in alkaline phosphatase catalysis. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2293–2297.
185. Perrin, M. F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J. Phys. Radium* **1923**, *1*, 390–401.
186. Invitrogen: Fluorescence Polarization. *Technical Resourch Guide 4* **2006**.
187. Chen, X.; Levine, L.; Kwok, P. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res.* **1999**, *9*, 492–498.
188. Owicki, J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*, 297–306.
189. W. J. Checovich, R. E. Bolger, T. B. Fluorescence polarization - a new tool for cell and molecular biology. *Nature* **1995**, *373*, 254–256.
190. Kecskés, M.; Kumar, T. S.; Yoo, L.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. Novel Alexa Fluor-488 labeled antagonist of the A2A adenosine receptor: application to a fluorescence polarization-based receptor binding assay. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 506–511.
191. Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73.
192. BellBrook Labs: Transcreener ADP² FP assay. *Technical Manual* **2009**, 1–12.
193. BellBrook Labs: Transcreener AMP²/GMP² FP assay. *Technical Manual* **2011**, 1–11.
194. Staeben, M.; Kleman-Leyer, K. M.; Kopp, A. L.; Westermeyer, T. A.; Lowery, R. G. Development and validation of a transcreener assay for detection of AMP- and GMP-producing enzymes. *Assay Drug Dev. Technol.* **2010**, *8*, 344–355.
195. Kleman-Leyer, K. M.; Klink, T. A.; Kopp, A. L.; Thane, A.; Koeff, M. D.; Larson, B. R.; Worzella, T. J. Characterization and optimization of a red-shifted fluorescence polarization ADP detection assay. *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, *7*, 56–67.

196. Rowlands, M. G.; Newbatt, Y. M.; Prodromou, C.; Pearl, L. H.; Workman, P.; Aherne, W. High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 176–83.
197. Qurishi, R. Kapillarelektrophorese: Qualitative und quantitative kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Nukleosiden, Nukleotiden und deren Derivaten - Methodenentwicklung und Validierung. *Dissertationsschrift*, Universität Bonn **2002**.
198. Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
199. Umemiya, H.; Fukasawa, H.; Ebisawa, M.; Eyrolles, L.; Kawachi, E. Regulation of retinoidal actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR - RAR heterodimers. **1997**, *2623*, 4222–4234.
200. Li, Y.; Hashimoto, Y.; Agadir, A.; Kagechika, H.; Zhang, X.-K. Identification of a novel class of retinoic acid receptor β -selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15360–15366.
201. Singh, C. K.; Kumar, A.; Lavoie, H. A.; Dipette, D. J.; Singh, U. S. Resveratrol prevents impairment in activation of retinoic acid receptors and MAP kinases in the embryos of a rodent model of diabetic embryopathy. *Reprod. Sci.* **2012**, *19*, 949–961.
202. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **2000**, *66*, 663–673.
203. Zhu, J.; Yong, W.; Wu, X.; Yu, Y.; Lv, J.; Liu, C.; Mao, X.; Zhu, Y.; Xu, K.; Han, X.; Liu, C. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF-alpha-induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 471–477.
204. Fabris, S.; Momo, F.; Ravagnan, G.; Stevanato, R. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys. Chem.* **2008**, *135*, 76–83.
205. Singh, C. K.; Ndiaye, M. a; Ahmad, N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.004>.
206. Zordoky, B. N. M.; Robertson, I. M.; Dyck, J. R. B. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.016>.
207. Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 493–506.
208. Artero, A.; Artero, A.; Tarín, J. J.; Cano, A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.09.007>.

209. Smoliga, J. M.; Baur, J. a; Hausenblas, H. a Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1129–1141.
210. Pirola, L.; Fröjdö, S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 323–332.
211. Schmatz, R.; Schetinger, M. R. C.; Spanevello, R. M.; Mazzanti, C. M.; Stefanello, N.; Maldonado, P. A.; Gutierrez, J.; Corrêa, M. D. C.; Giroto, E.; Moretto, M. B.; Morsch, V. M. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **2009**, *84*, 345–350.
212. Baell, J. B. Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature. *Futur. Med. Chem.* **2010**, *2*, 1529–1546.
213. Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem* **2010**, *53*, 2719–2740.
214. Baell, J.; Walters, M. A. Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481–483.
215. Bowers, J. L.; Tyulmenkov, V. V; Jernigan, S. C.; Klinge, C. M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β^* . *Endocrinology* **2000**, *141*, 3657–3667.
216. Chakraborty, S.; Levenson, A. S.; Biswas, P. K. Structural insights into Resveratrol's antagonist and partial agonist actions on estrogen receptor alpha. *BMC Struct. Biol.* **2013**, *13*, 1–11.
217. Fiene, A.; Baqi, Y.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Müller, C. E. Fluorescence polarization immunoassays for monitoring nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) activity. *Analyst* **2015**, *140*, 140–148.
218. Lowery, R. G.; Kleman-Leyer, K. Transcreeener: screening enzymes involved in covalent regulation. *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10*, 179–190.
219. Held, P.; Amouretti, X. Fluorescence polarization: an introduction to homogeneous assay technology. *BioTek Appl. Note* **2006**, 1–12.
220. Vedvik, K. L.; Eliason, H. C.; Hoffman, R. L.; Gibson, J. R.; Kupcho, K. R.; Somberg, R. L.; Vogel, K. W. Overcoming compound interference in fluorescence polarization-based kinase assays using far-red tracers. *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, *2*, 193–203.
221. Schulz, M. N.; Hubbard, R. E. Recent progress in fragment-based lead discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 615–621.
222. Barreto-Chaves, M. L. M.; Carneiro-Ramos, M. S.; Cotomacci, G.; Júnior, M. B. C.; Sarkis, J. J. F. E-NTPDase 3 (ATP diphosphohydrolase) from cardiomyocytes, activity and expression are modulated by thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *251*, 49–55.

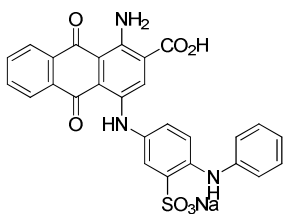
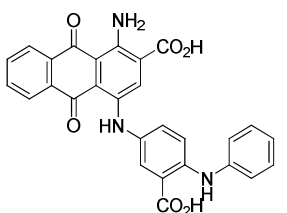
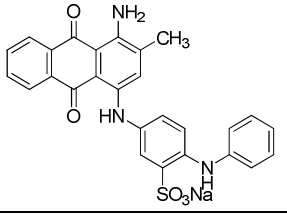
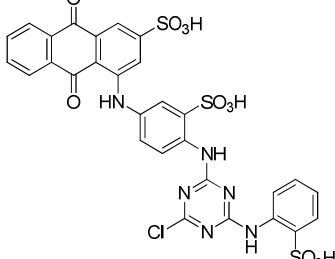
223. Wang, X.; Liu, J.; Li, J.; Yang, Y.; Liu, J.; Li, B.; Pope, M. T. Synthesis and antitumor activity of cyclopentadienyltitanium substituted polyoxotungstate $[\text{CoW}_{11}\text{O}_{39}(\text{CpTi})]^{7-}$ (Cp = $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$). *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 279–284.
224. Mitsui, S.; Ogata, A.; Yanagie, H.; Kasano, H.; Hisa, T.; Yamase, T.; Eriguchi, M. Antitumor activity of polyoxomolybdate, $[\text{NH}_3\text{Pr}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, against, human gastric cancer model. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60*, 353–358.
225. Seko, A.; Yamase, T.; Yamashita, K. Polyoxometalates as effective inhibitors for sialyl- and sulfotransferases. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1061–1066.
226. Inoue, M.; Segawa, K.; Matsunaga, S.; Matsumoto, N.; Oda, M.; Yamase, T. Antibacterial activity of highly negative charged polyoxotungstates, $\text{K}_{27}[\text{KAs}_4\text{W}_{40}\text{O}_{140}]$ and $\text{K}_{18}[\text{KSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$, and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori*. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1023–1031.
227. Qi, Y.; Xiang, Y.; Wang, J.; Qi, Y.; Li, J.; Niu, J.; Zhong, J. Inhibition of hepatitis C virus infection by polyoxometalates. *Antivir. Res.* **2013**, *100*, 392–398.
228. Rhule, J. T.; Hill, C. L.; Judd, D. A.; Schinazi, R. F. Polyoxometalates in medicine. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 327–357.
229. Nomiya, K.; Torii, H.; Hasegawa, T.; Nemoto, Y.; Nomura, K.; Hashino, K.; Uchida, M.; Kato, Y.; Shimizu, K.; Oda, M. Insulin mimetic effect of a tungstate cluster. Effect of oral administration of homo-polyoxotungstates and vanadium-substituted polyoxotungstates on blood glucose level of STZ mice. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 657–667.
230. Stephan, H.; Kubeil, M.; Emmerling, F.; Müller, C. E. Polyoxometalates as versatile enzyme inhibitors. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 1585–1594.
231. Köhler, D.; Eckle, T.; Faigle, M.; Grenz, A.; Mittelbronn, M.; Laucher, S.; Hart, M. L.; Robson, S. C.; Müller, C. E.; Eltzschig, H. K. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **2007**, *116*, 1784–1794.
232. Wall, M. J.; Wigmore, G.; Lopatár, J.; Frenguelli, B. G.; Dale, N. The novel NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate (POM-1) inhibits ATP breakdown but also blocks central synaptic transmission, an action independent of NTPDase inhibition. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 1251–1258.
233. Sun, X.; Wu, Y.; Gao, W.; Enjoji, K.; Csizmadia, E.; Müller, C. E.; Murakami, T.; Robson, S. C. CD39/ENTPD1 expression by $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* **2011**, *139*, 1030–1040.
234. Melani, A.; Corti, F.; Stephan, H.; Müller, C. E.; Donati, C.; Bruni, P.; Vannucchi, M. G.; Pedata, F. Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp. Neurol.* **2012**, *233*, 193–204.
235. Lee, S.-Y.; Fiene, A.; Li, W.; Hanck, T.; Brylev, K. A.; Fedovrov, V. E.; Lecka, J.; Haider, A.; Pietzsch, H.-J.; Zimmermann, H.; Sévigny, J.; Kortz, U.; Stephan, H.;

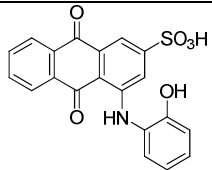
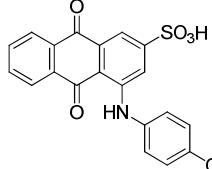
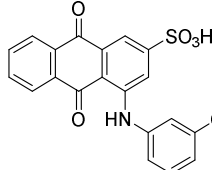
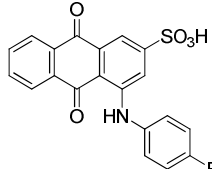
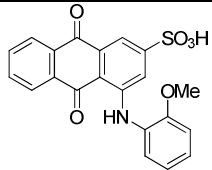
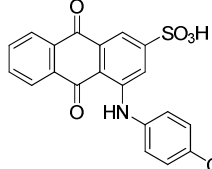
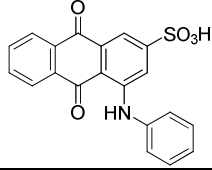
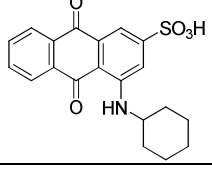
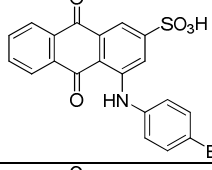
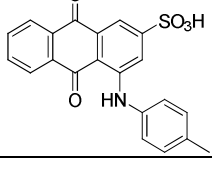
- Müller, C. E. Polyoxometalates—Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, DOI:10.1016/j.bcp.2014.11.002.
236. Malek, R. A. Interaktion von Polyoxometalaten und anderen Metallclusterverbindungen mit P2Y-Rezeptoren. *Masterarbeit*, Universität Bonn **2011**.
237. Yegutkin, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 473–497.
238. Feng, J.; Chen, Y.; Pu, J.; Yang, X.; Zhang, C.; Zhu, S.; Zhao, Y.; Yuan, Y.; Yuan, H.; Liao, F. An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 144–149.
239. Freundlieb, M.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. A new, sensitive ecto-5'-nucleotidase assay for compound screening. *Anal. Biochem.* **2014**, *446*, 53–8.
240. Koresawa, M.; Okabe, T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: A universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, *2*, 153–160.
241. Sachsenmeier, K. F.; Hay, C.; Brand, E.; Clarke, L.; Rosenthal, K.; Guillard, S.; Rust, S.; Minter, R.; Hollingsworth, R. Development of a novel ectonucleotidase assay suitable for high-throughput screening. *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17*, 993–998.
242. Todd, M. J.; Gomez, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 179–187.
243. Torres, F. E.; Recht, M. I.; Coyle, J. E.; Bruce, R. H.; Williams, G. Higher throughput calorimetry: opportunities, approaches and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 598–605.

8 Anhang

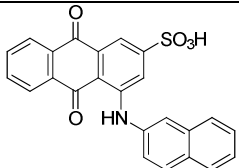
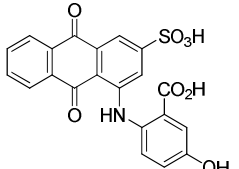
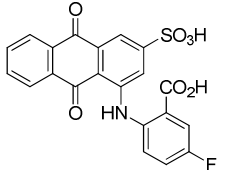
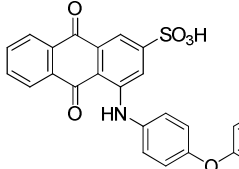
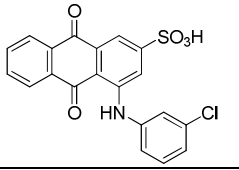
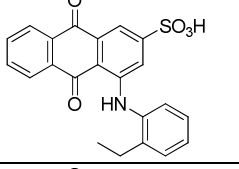
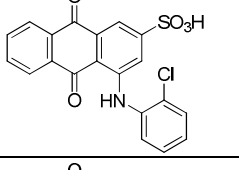
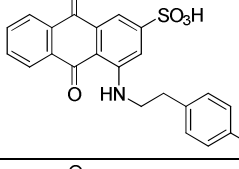
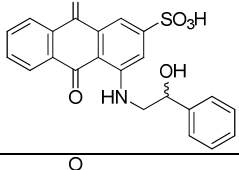
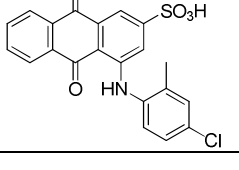
In der nachfolgenden Tabelle sind die mithilfe des Malachitgrün-Assays ermittelten Inhibitionswerte (%) der getesteten Anthrachinon-Derivate an den humanen NTPDasen1, -2, -3, und -8 aufgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen. Alle Verbindungen wurden von Dr. Younis Baqi oder Frau Enas M. Malik aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. C. E. Müller synthetisiert.

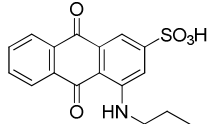
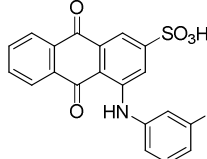
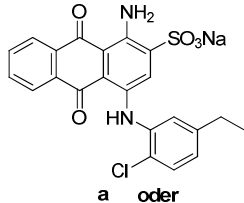
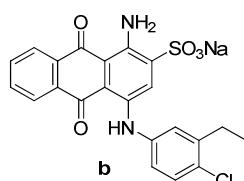
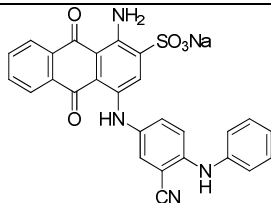
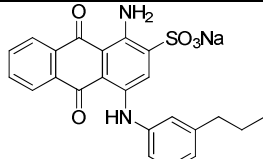
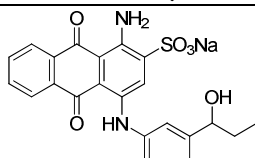
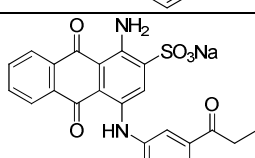
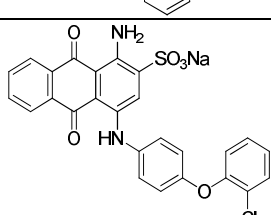
Tabelle 20: Inhibitorische Aktivität (%) der untersuchten Anthrachinon-Derivate gegenüber den NTPDasen1, -2, -3, und -8 bei einer Endkonzentration von 2 μ M.

Verbindung	% Inhibition (n = 2)			
	Humane NTPDase1	Humane NTPDase2	Humane NTPDase3	Humane NTPDase8
	-3	8	25	-5
	-2	7	4	1
	-6	18	-42	2
	3	8	41	-2

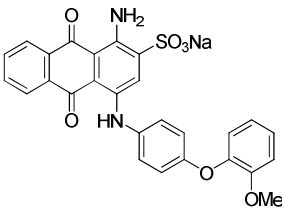
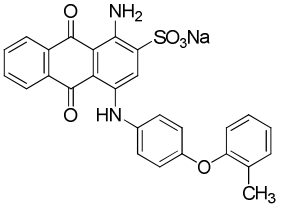
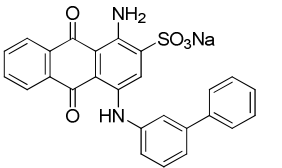
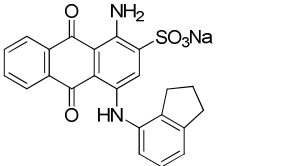
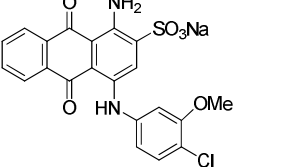
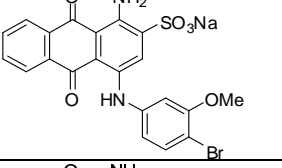
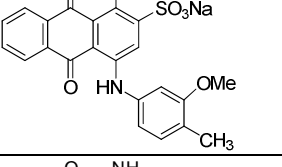
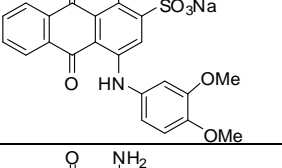
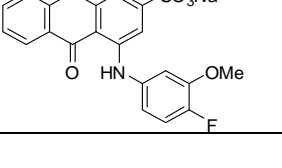
	-2	10	19	2
	2	4	1	-7
	-4	-2	-18	1
	3	-5	26	-6
	-8	6	-8	-8
	-10	39	29	-13
	1	3	3	-3
	10	17	-3	13
	10	19	14	13
	7	13	13	5

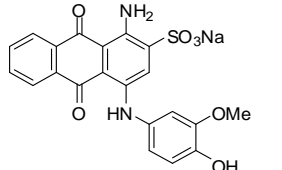
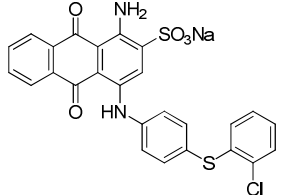
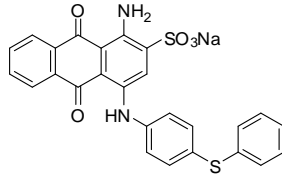
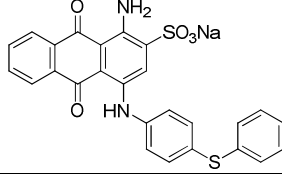
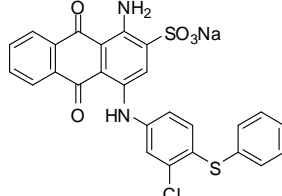
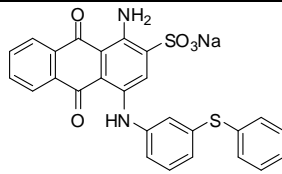
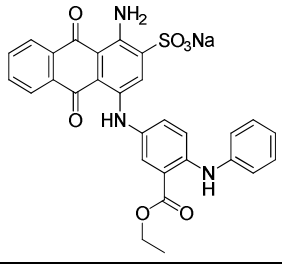
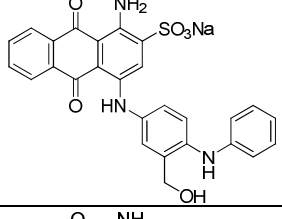
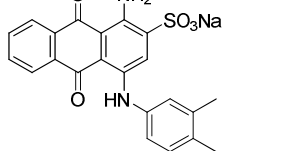
8 Anhang

	7	11	9	5
	1	5	32	5
	4	3	27	0
	8	8	11	2
	1	3	11	-3
	-2	7	9	2
	0	2	11	0
	-1	15	8	-1
	-3	1	3	-2
	-2	3	6	-3

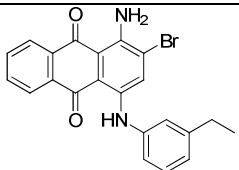
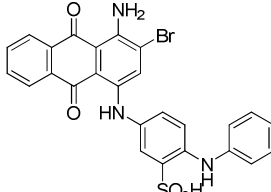
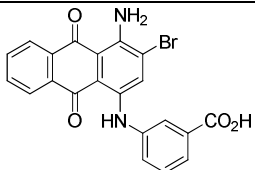
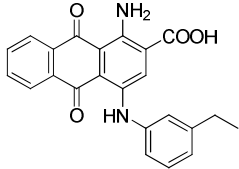
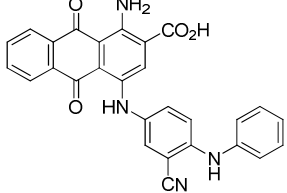
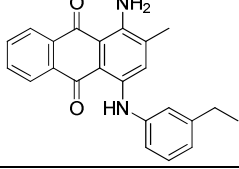
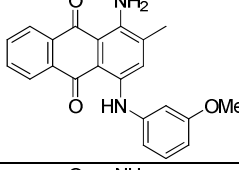
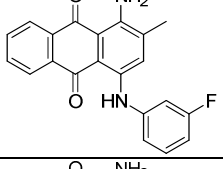
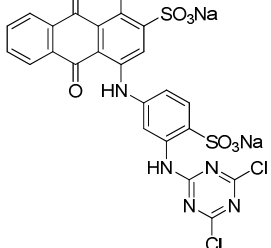
	0	0	8	-3
	14	-6	9	-1
 a oder  b	6	28	4	3
	4	21	-21	-1
	1	22	-8	2
	-8	0	-11	-1
	-3	5	-4	1
	26	48	11	-2

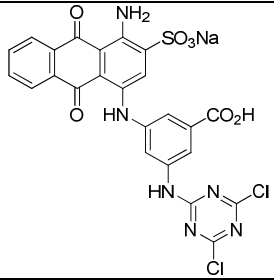
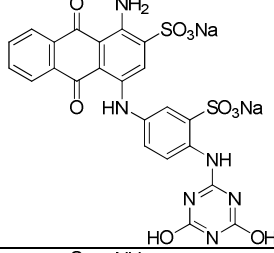
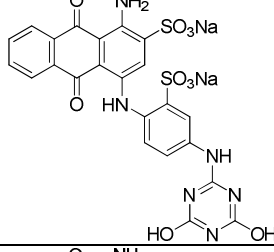
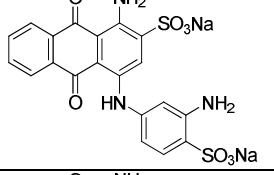
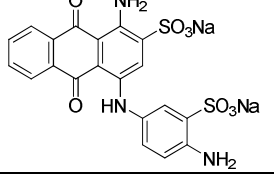
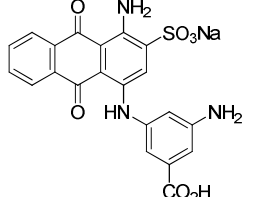
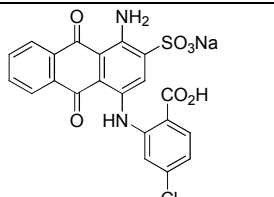
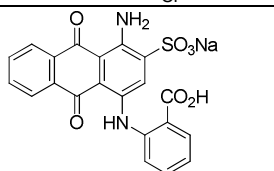
8 Anhang

	2	19	-11	-3
	20	40	12	1
	6	46	-13	7
	-4	16	-3	6
	-5	12	-4	-1
	1	15	-1	-3
	-7	10	-8	-2
	-9	-5	-13	-17
	-10	6	4	1

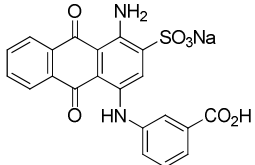
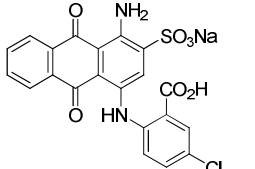
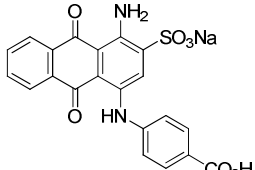
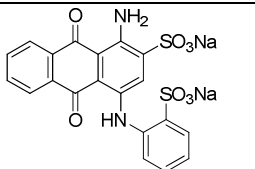
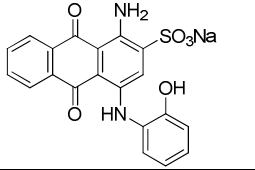
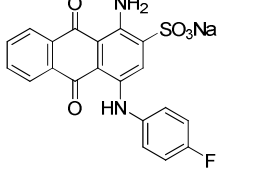
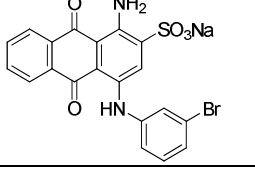
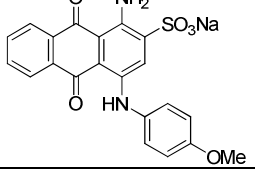
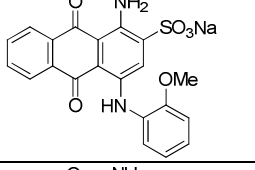
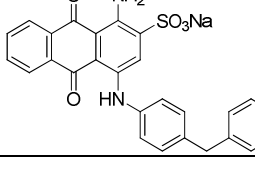
	-16	4	-9	-10
	10	41	6	5
	52	78	42	21
	34	64	16	4
	29	67	20	14
	1	51	10	6
	23	45	7	9
	-1	6	-23	-2
	-11	21	-7	4

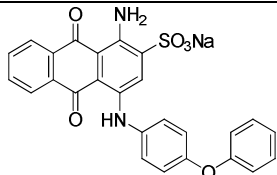
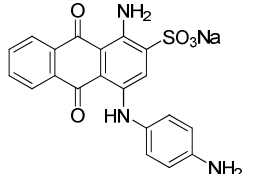
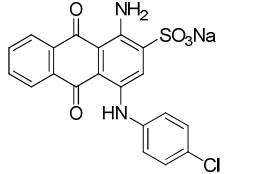
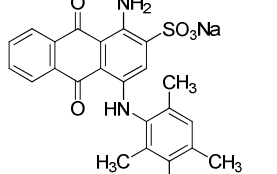
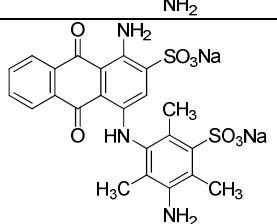
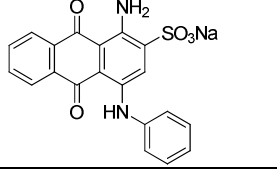
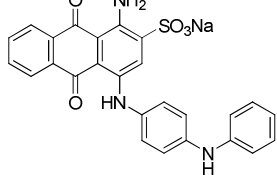
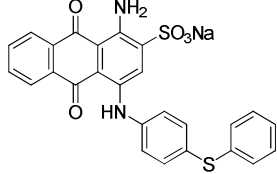
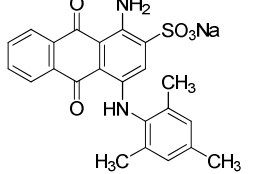
8 Anhang

	-4	5	-2	-4
	13	36	-24	5
	-2	-5	1	3
	-10	7	-6	-3
	-17	8	-11	-5
	-54	6	-1	-3
	-6	3	0	-2
	-4	7	-2	-2
	-2	10	87	-7

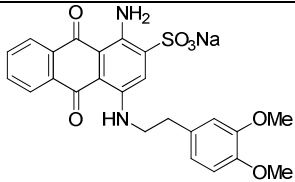
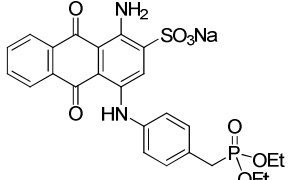
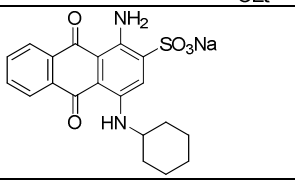
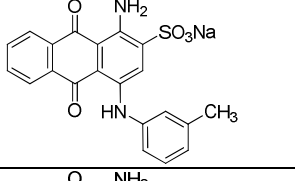
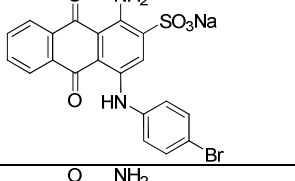
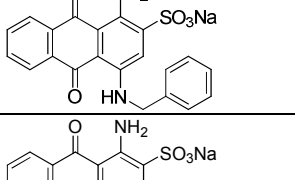
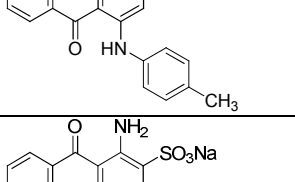
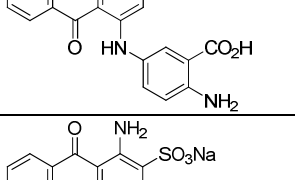
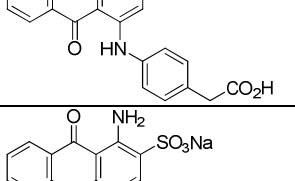
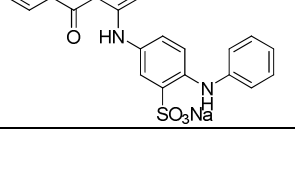
	0	3	34	4
	-2	3	46	2
	-1	8	41	-1
	-15	1	61	-19
	10	5	51	-20
	-5	10	33	-15
	-6	5	32	-18
	-10	2	42	-19

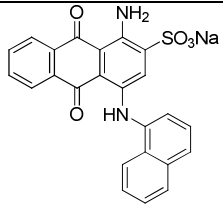
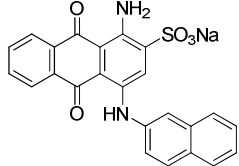
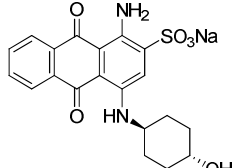
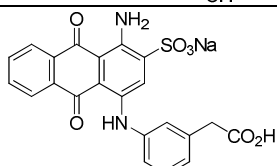
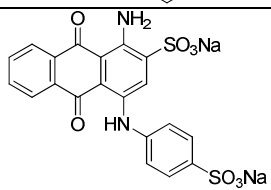
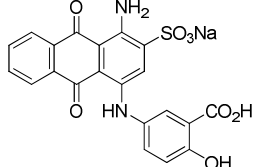
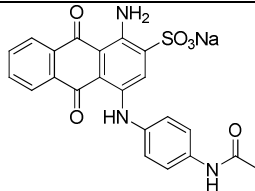
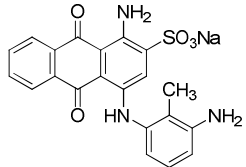
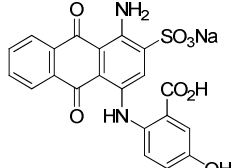
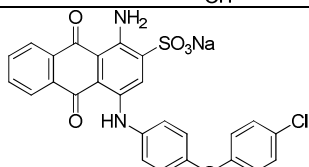
8 Anhang

	-17	2	63	-17 1
	-20	-2	51	-17
	-11	4	39	-21
	-10	2	50	-21
	-19	10	-21	-12
	-19	16	50	-18
	-4	12	64	-26
	-9	11	-22	-13
	-6	10	-14	-7
	7	56	3	3

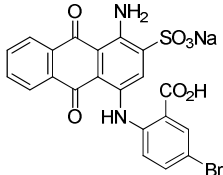
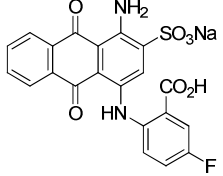
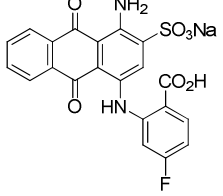
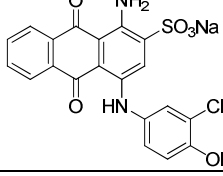
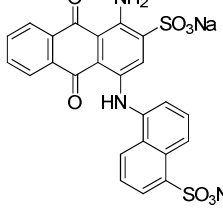
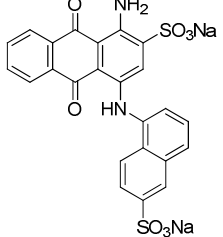
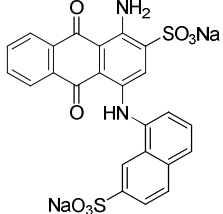
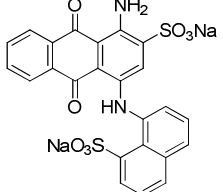
	6	46	1	6
	-41	17	-25	-12
	-6	21	3	-2
	-4	4	-15	-9
	-4	0	3	-9
	-13	15	-10	-15
	-8	41	-21	2
	15	62	7	6
	2	42	-18	-13

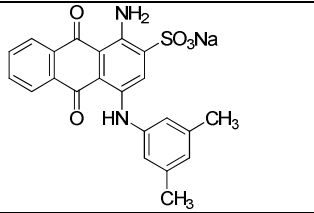
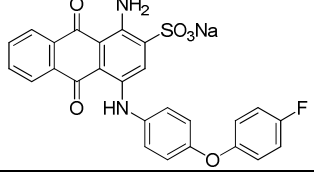
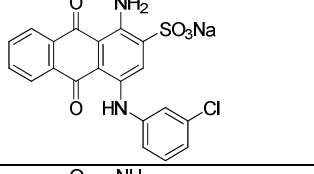
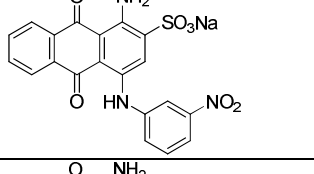
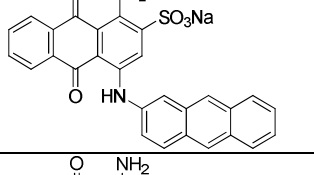
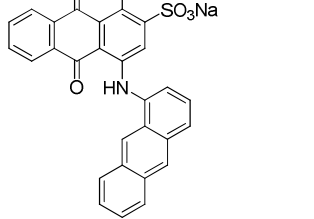
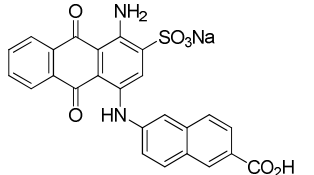
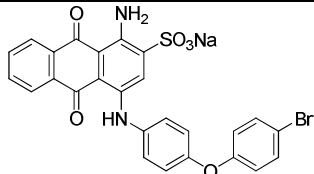
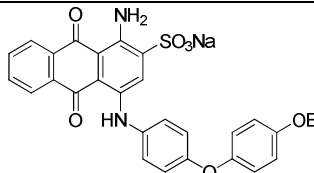
8 Anhang

	-6	8	-12	-10
	-7	4	-18	-11
	-9	14	5	3
	-9	17	-16	-4
	0	24	-7	-9
	-10	11	6	3
	-5	14	-16	-8
	-3	7	31	-15
	-11	8	38	-14
	-6	32	67	-16

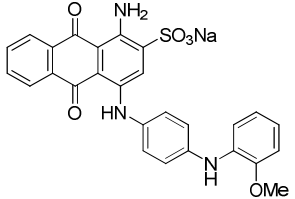
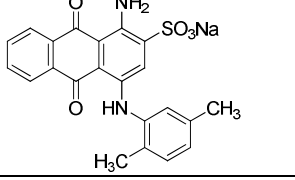
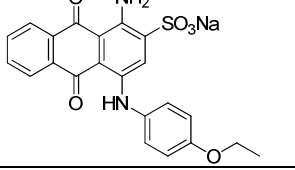
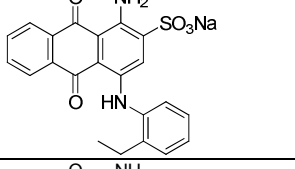
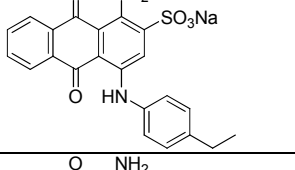
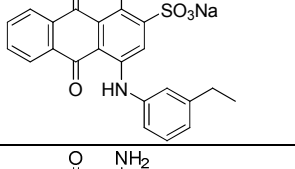
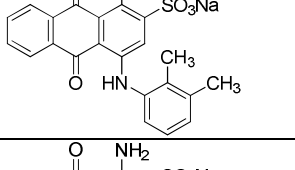
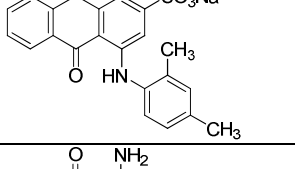
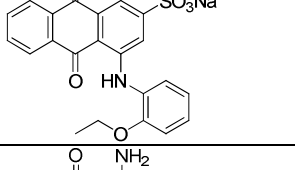
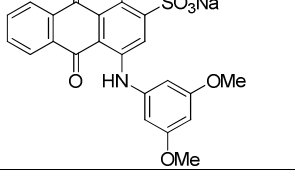
	-19	31	-4	9
	-8	34	-9	3
	-2	12	0	-8
	-6	7	55	-11
	-15	5	48	-20
	-12	12	62	-9
	-5	9	-20	-17
	-7	19	-9	0
	-11	13	33	-11
	32	71	23	12

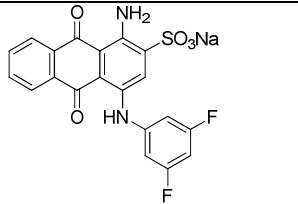
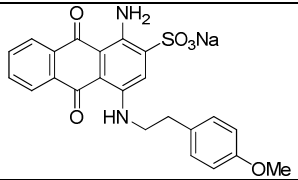
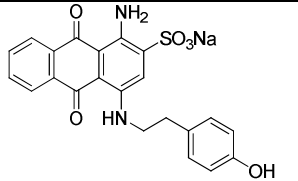
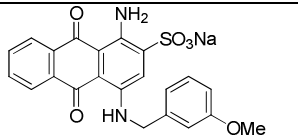
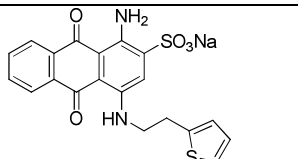
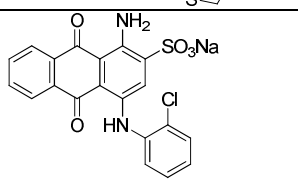
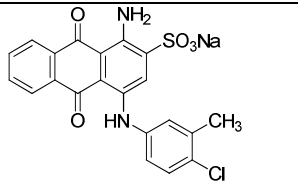
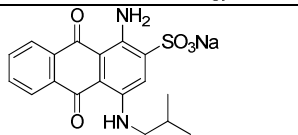
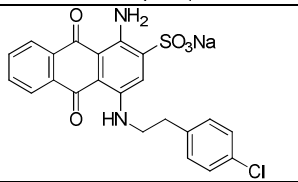
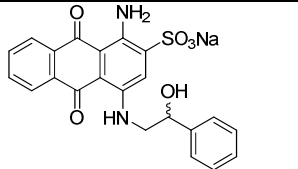
8 Anhang

	-21	5	25	-2
	-4	11	20	-11
	-13	4	27	-4
	-7	21	20	-10
	-9	14	29	-10
	-4	11	45	-13
	-1	6	-13	-10
	-1	15	73	-11

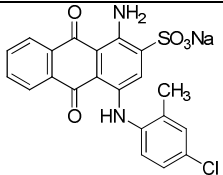
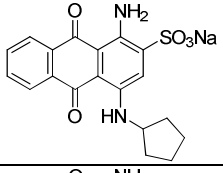
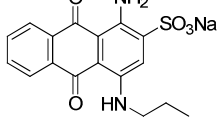
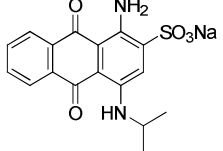
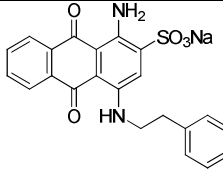
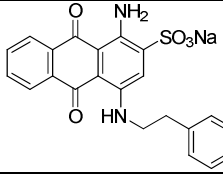
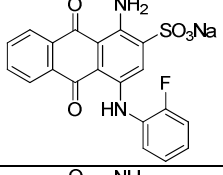
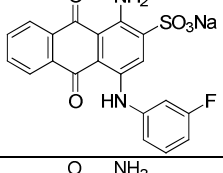
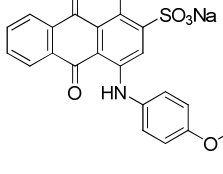
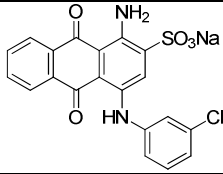
	-9	46	31	-4
	10	49	6	2
	-18	19	-1	3
	-32	19	58	-41
	-12	35	-27	-1
	-30	40	-13	5
	0	13	59	-35
	33	74	21	10
	5	45	1	-1

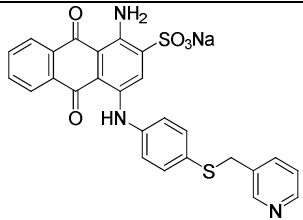
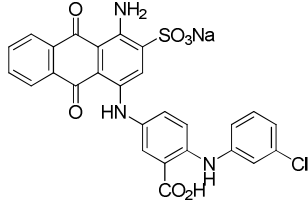
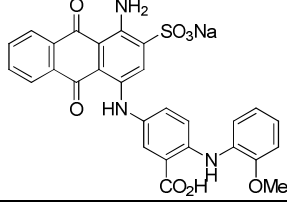
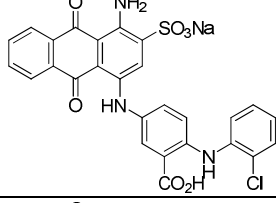
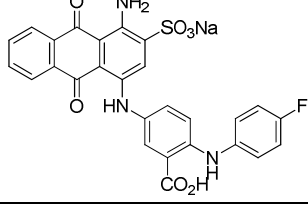
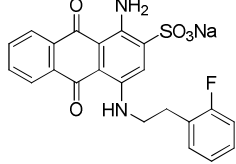
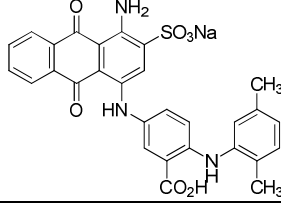
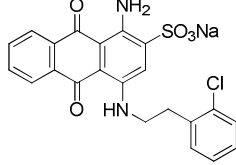
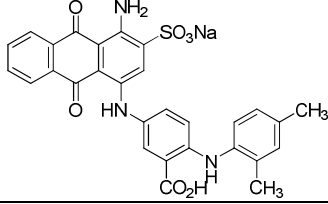
8 Anhang

	-12	14	-15	-3
	-6	40	-2	-8
	0	4	-8	-10
	0	8	-11	-5
	2	39	-10	5
	1	16	-12	-2
	-6	27	-15	5
	-5	30	-17	-3
	-19	18	-19	-6
	-8	12	-19	2

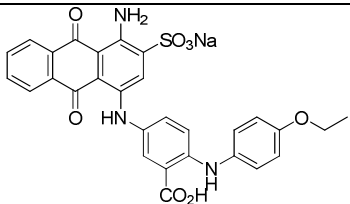
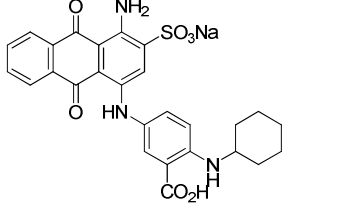
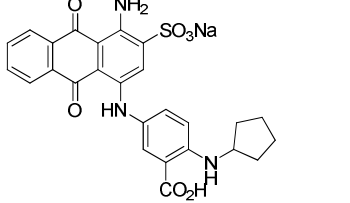
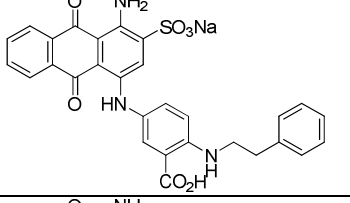
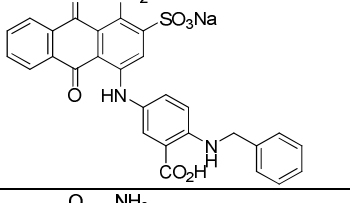
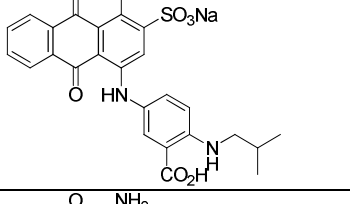
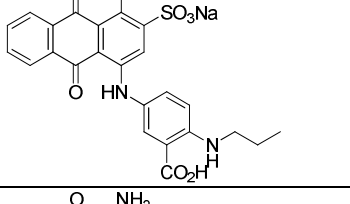
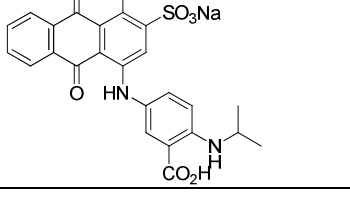
	-1	9	-6	-1
	-15	13	-1	-3
	-18	-1	-14	-7
	-12	7	8	1
	-16	4	0	-7
	-3	8	-17	-6
	1	34	4	-4
	-5	5	-2	-6
	-10	28	-3	3
	-11	5	1	-3

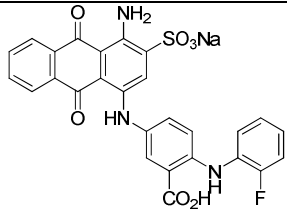
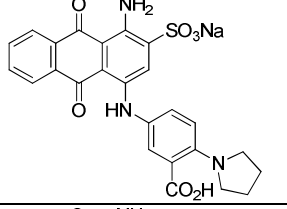
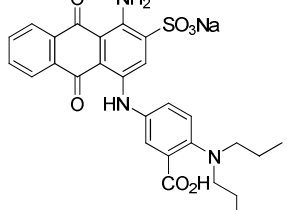
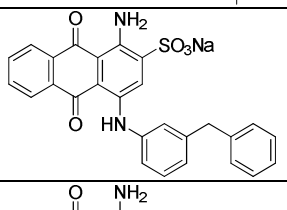
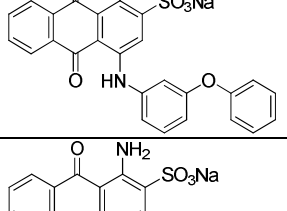
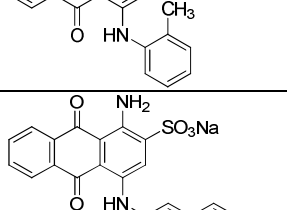
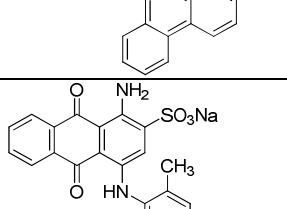
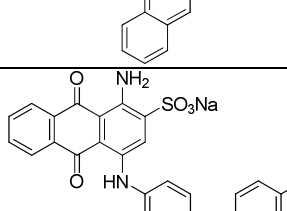
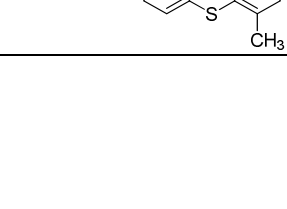
8 Anhang

	2	52	9	-1
	-8	9	9	-3
	-3	0	6	-4
	-41	2	2	-8
	-12	12	-5	-4
	-12	12	-3	-3
	-7	7	-12	-4
	-8	15	0	-1
	-1	26	-7	-2
	0	7	-14	-3

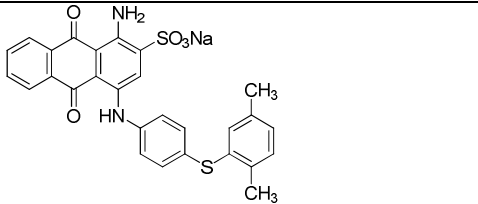
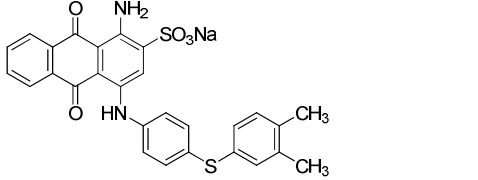
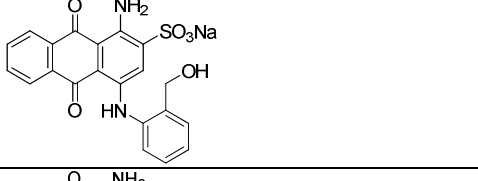
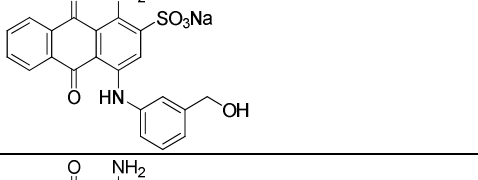
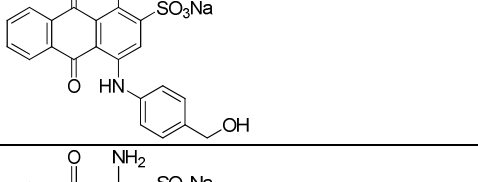
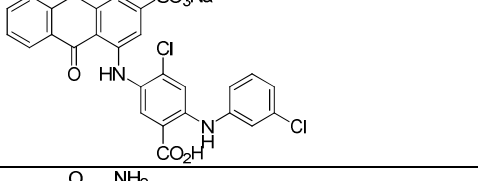
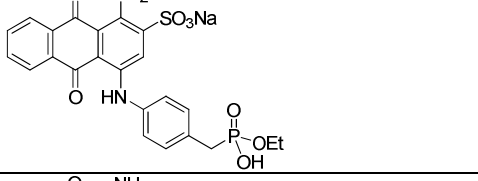
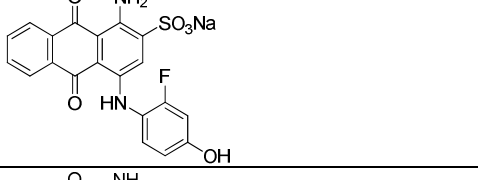
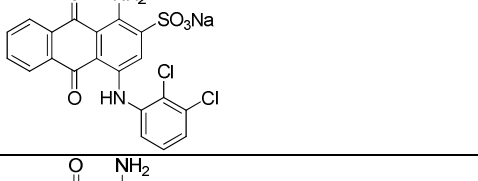
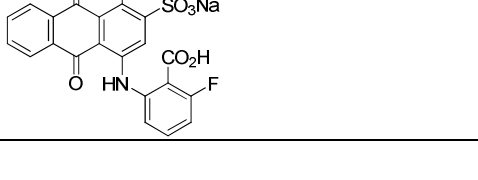
	-5	13	-7	-2
	-3	29	13	-1
	-8	19	10	-4
	-5	19	12	-6
	-9	23	17	-4
	-8	5	-3	-1
	-3	27	3	-1
	-8	5	0	-2
	-7	22	-7	-6

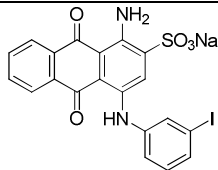
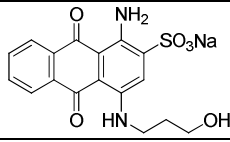
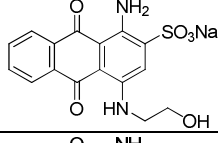
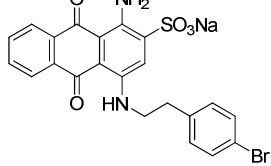
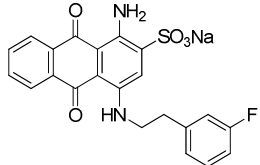
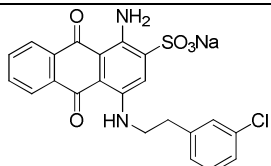
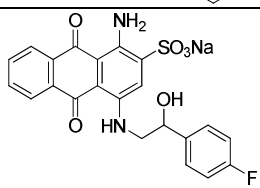
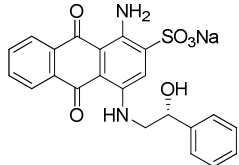
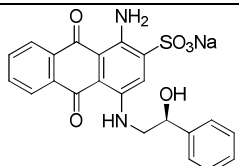
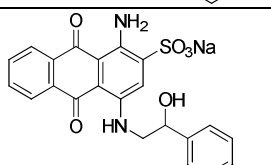
8 Anhang

	-1	20	2	-6
	1	6	13	-9
	-11	6	27	-5
	-6	17	13	-8
	-9	9	39	-8
	-6	0	41	-11
	-5	7	36	-6
	-14	9	40	-8

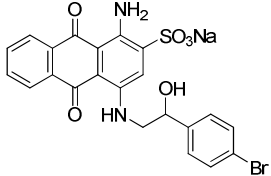
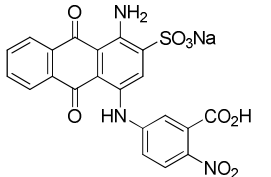
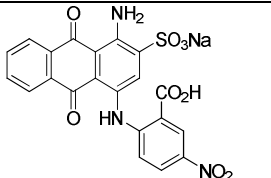
	-1	14	26	-3
	-5	1	45	-6
	-1	-1	-1	-4
	36	81	65	28
	12	67	18	9
	-1	3	-11	-6
	-7	56	-5	6
	3	52	-21	3
	46	77	36	27

8 Anhang

	38	71	34	17
	51	81	44	27
	-1	12	11	4
	-2	7	-9	1
	-4	5	-3	-4
	19	50	-2	3
	-7	-4	40	-10
	-8	5	-12	-6
	1	16	-2	7
	-21	-3	32	-10

	0	21	2	4
	1	1	6	-1
	-1	2	8	-1
	-3	31	1	-1
	-6	12	-3	0
	-11	-1	-5	-3
	-3	0	4	-1
	-10	-2	0	-4
	-4	1	-1	4
	-3	2	0	2

8 Anhang

 <p>Chemical structure: A naphthalene ring system with a sulfonate group (-SO₃Na) at position 1, an amino group (-NH₂) at position 2, and a secondary amine group (-NH-) at position 3. The secondary amine is attached to a 4-bromophenyl ring via a methylene group (-CH₂-).</p>	-7	4	-1	-1
 <p>Chemical structure: A naphthalene ring system with a sulfonate group (-SO₃Na) at position 1, an amino group (-NH₂) at position 2, and a secondary amine group (-NH-) at position 3. The secondary amine is attached to a 3-nitrobenzoic acid ring via a methylene group (-CH₂-).</p>	-4	-2	43	-3
 <p>Chemical structure: A naphthalene ring system with a sulfonate group (-SO₃Na) at position 1, an amino group (-NH₂) at position 2, and a secondary amine group (-NH-) at position 3. The secondary amine is attached to a 3-nitrobenzoic acid ring via a methylene group (-CH₂-).</p>	33	-3	32	-4

Danksagung

Zunächst gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Christa E. Müller dafür, dass ich diese Arbeit in den letzten Jahren in ihrem Arbeitskreis anfertigen konnte. Die große Offenheit und das Interesse gegenüber neuen Ideen haben es mir möglich gemacht viele neue Methoden auszuprobieren und eigenständig zu arbeiten. Durch die vielen hilfreichen Anregungen wurde ich stets unterstützt.

Zudem danke ich Frau PD Dr. Anke Schiedel für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens und die schöne Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Rainer Manthey herzlich für ihr Mitwirken bei der Promotionskommission danken.

Des Weiteren bin ich unseren Kooperationspartnern für die Herstellung der rekombinanten Enzyme sowie das zur Verfügung stellen von Testsubstanzen und Naturstoffextrakten dankbar.

Bei dem gesamten Arbeitskreis und insbesondere meinen direkten Büro-, Labor-, Roboter- und Mensacrewkollegen Anne, Christin, Dominik, Heidi, Marianne, Mario, Sabrina, Sangyong, Simone, Thomas, Wenjin und Wessam danke ich für die tolle Zeit und die wunderbare Arbeitsatmosphäre. Es hat großen Spaß gemacht!

Besonderer Dank gilt Dominik, Heidi und Isa für die hilfreichen Tipps und die Unterstützung bei meinen Versuchen molekularbiologisch zu arbeiten sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Vielleicht wird aus pinky und brain ja nochmal was...

Ich freue mich, dass aus meinen Kollegen Dominik, Mario, Sabrina und Simone Freunde geworden sind, ich hatte großen Spaß an allen verrückten Unternehmungen und freue mich auf zukünftige Aktionen! Danke für Eure Unterstützung und die lustige Zeit!

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Ralf Mayer und dem ganzen Team aus dem 7. Semester bedanken. Es war mir eine Freude dieses Semester mit Euch zu betreuen.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für die uneingeschränkte Unterstützung dankbar. Ohne Euch wäre ich sicherlich nicht so weit gekommen. Ganz besonders möchte ich mich bei Linda, Friederike (+ Tatzki) und Martina bedanken. Es ist so schön, dass es Euch gibt und ich freue mich auf zukünftige Texelbesuche, Lamawanderungen oder einfach nur Kaffeerunden.

Der sicherlich größte Dank gilt meiner Schwester Isa, Philip und meinem Ehemann Mathias. Ihr habt mich oft aushalten müssen, mich aufgebaut, unterstützt und angetrieben. Ich bin sehr dankbar, dass ich Euch habe und gebe Euch auch nicht mehr her. Danke für alles!

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Fiene, A.; Baqi, Y.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Müller, C. E. Fluorescence polarization immunoassays for monitoring nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) activity. *Analyst* **2015**, *140*, 140–148.

Lee, S.-Y.*; Fiene, A.*; Li, W.; Hanck, T.; Brylev, K. A.; Fedovrov, V. E.; Lecka, J.; Haider, A.; Pietzsch, H.-J.; Zimmermann, H.; Sévigny, J.; Kortz, U.; Stephan, H.; Müller, C. E. Polyoxometalates—Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, DOI:10.1016/j.bcp.2014.11.002.

* geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge

Baqi, Y.; Zech, A.; Malik, E. M.; Riedmaier, P.; Hartland, E. L.; Müller, C. E. Design, synthesis and structure-activity relationships of anthraquinone derivatives as bacterial NTPDase inhibitors. *Purines 2012, Fukuoka*, Juni **2012** (Poster).

Zech, A.; Müller, C. E. High-throughput screening of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: search for novel inhibitors. *German-Italian Purine Club Meeting, Bonn*, Oktober **2011** (Poster).

Zech, A.; Hockemeyer, J.; Tzvetkov, N.; Köse, M.; Radjainia, H.; Müller, C. E. 8-Phenylethynylxanthines – highly potent and selective adenosine A_{2A} receptor antagonists. *German-Italian Purine Club Meeting, Bonn*, Oktober **2011** (Poster).

Küppers, P.; Zech, A.; Siebers, S.; Paschkowiak, J.; Hockemeyer, J.; Müller, C. E. [³H]PSB-1010 - a new, optimized antagonist radioligand for adenosine A_{2A} receptors. *German-Italian Purine Club Meeting, Bonn*, Oktober **2011** (Poster).

Fiene, A.; Baqi, Y.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Müller, C. E. Establishment of novel fluorescence polarization immunoassay- (FPIA-) based NTPDase assays for high-throughput inhibitor screening. *Purines 2014, Bonn*, Juli **2014** (Poster).

Malik, E. M.; Baqi, Y.; Fiene, A.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Müller, C. E. Design, synthesis and structure-activity relationship of anthraquinone derivatives as NTPDase3 inhibitors. *Purines 2014, Bonn*, Juli **2014** (Poster).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift