

Aus dem Institut für Lebensmitteltoxikologie und  
Chemische Analytik der  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

---

**Struktur-Teratogenitäts-Studien  
von Valproinsäure-Analogen**

$\frac{3}{4}$

Inhibierung von Histondeacetylasen und  
Pharmakokinetik ausgewählter Derivate im Mausmodell

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

**Diplom-Chemiker**

**Daniel Eikel**

geboren am 9. Mai 1974  
in 59755 Arnsberg-Neheim

Hannover 2005

## **Wissenschaftlicher Betreuer**

Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau

Zentrum für systemische Neurowissenschaften Hannover  
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik  
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

## **Referenten der Dissertation**

Prof. Dr. Carla Vogt

Institut für Anorganische Chemie  
– Arbeitskreis Analytik –  
der Universität Hannover

Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau

Zentrum für systemische Neurowissenschaften Hannover  
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik  
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

## **Prüfungskollegium**

Priv.-Doz. Dr. Nina Ulrich (Vorsitzende)

Institut für Anorganische Chemie  
– Arbeitskreis Analytik –  
der Universität Hannover

Prof. Dr. Carla Vogt

Institut für Anorganische Chemie  
– Arbeitskreis Analytik –  
der Universität Hannover

Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau

Zentrum für systemische Neurowissenschaften Hannover  
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik  
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Datum der Disputation: 04.05.2005

In Dankbarkeit meinen Eltern

**Schlagworte:**

Valproinsäure, Teratogenität, Histondeacetylasen

**Key words:**

Valproic acid, teratogenicity, histonedecetylases

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Kurzdarstellung der Arbeit (Short Summary)</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Anwendung und Bedeutung der Valproinsäure	7
2.2	Allgemeine Nebenwirkungen der Valproinsäuretherapie	9
2.3	Teratogene Nebenwirkungen der Valproinsäure	10
2.4	Pharmakokinetische Eigenschaften von Valproinsäure	12
2.5	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Valproinsäure	15
2.6	Valproinsäure als Histondeacetylaseinhibitor	18
2.7	Die Struktur des Chromatins und Einflüsse auf die Genexpression	20
2.8	Histondeacetylasen	22
2.9	Inhibitoren der Histondeacetylasen	24
<b>3</b>	<b>Arbeitshypothese und Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1	Synthese und reproduktionstoxische Effekte enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure	31
4.2	Auswahl geeigneter Valproinsäurederivate und Entwicklung von Entscheidungskriterien zur semi-quantitativen Graduierung des teratogenen Potenzials	35
4.3	In vitro Untersuchungen am F9-Mauszellsystem	41
4.3.1	Evaluierung des F9-Mauszell-Testsystems	41
4.3.2	Western-Blot-Analyse von hyperacetyliertem Kernhiston H4 (AcH <sub>4</sub> ) - Screening der Strukturvarianten der Valproinsäure	45
4.3.3	Western-Blot-Analyse von zellulärer Histondeacetylase 2 und 3 - Untersuchung ausgewählter Strukturvarianten der Valproinsäure	51

<b>4.4</b>	<b>In vitro Untersuchung der HDAC-Inhibierung an einem humanen HDAC-Enzym-Assay - Bestimmung der IC<sub>50</sub>(HDAC)</b>	<b>53</b>
4.4.1	Evaluierung und Randbedingungen des enzymatischen Assays	53
4.4.2	Dosis-Inhibierungs-Kurven und Bestimmung der IC <sub>50</sub> (HDAC) – Screening der Valproinsäure-Derivate	55
4.4.3	Testung der VPA-Derivate auf Interaktion mit dem Entwicklungsprozess des HDAC-Enzym-Assays – Ausschluss falsch positiver Inhibitoren	61
<b>4.5</b>	<b>Verfahrensentwicklung zur Bestimmung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure aus humanen und tierischen Matrices</b>	<b>63</b>
4.5.1	Linearität und Kalibrierfunktion	63
4.5.2	Probenblindwerte und Wiederfindungsraten	64
4.5.3	Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit	66
4.5.4	Ergebnisunsicherheit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze	68
<b>4.6</b>	<b>Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure</b>	<b>69</b>
4.6.1	Plasmabindungsraten in Maus und Mensch	69
4.6.2	Plasma-Konzentrations-Zeit Kurven in drei Mausstämmen - Pharmakokinetische Parameter	70
4.6.3	Konzentrations-Zeit-Kurven von Gehirnproben - Blut-Hirn-Schranke	73
4.6.4	Konzentrationsverläufe in weiteren Geweben der Maus	74
4.6.5	Stereokonversion und Metabolisierung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im Mausmodell	76
<b>4.7</b>	<b>Verfahrensentwicklung zur Bestimmung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure aus humanen und tierischen Matrices</b>	<b>77</b>
4.7.1	Linearität und Kalibrierfunktion	77
4.7.2	Probenblindwerte und Wiederfindungsraten	78
4.7.3	Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit	80
4.7.4	Ergebnisunsicherheit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze	82
<b>4.8</b>	<b>Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure</b>	<b>83</b>
4.8.1	Plasmabindungsraten in Maus und Mensch	83
4.8.2	Plasma- und Gehirn-Konzentrations-Zeit-Kurven - Pharmakokinetische Parameter und Blut-Hirn-Schranke	85
4.8.3	Stereokonversion und Metabolisierung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	87
4.8.4	Plasma-Konzentrations-Zeit Kurven des Metaboliten	88
4.8.5	Konzentrationsverläufe des Metaboliten in weiteren Geweben der Maus	90
<b>4.9</b>	<b>Untersuchungen zum metabolischen Verhalten von 3-Propyl-Heptansäure als Modellschubstanz für b-verzweigte VPA-Derivate</b>	<b>91</b>

<b>4.10</b>	<b>Korrelation der teratogenen Potenz von Valproinsäure-Analoga mit der Fähigkeit zur HDAC-Inhibition</b>	<b>97</b>
<b>4.11</b>	<b>Ausweitung der Arbeitshypothese auf weitere Stoffklassen</b>	<b>99</b>
4.11.1	Untersuchung bekannter teratogener Substanzen auf Histondeacetylase-Inhibition	99
4.11.2	Untersuchung von Lebensmittelinhaltsstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln, insbesondere weiterer Fettsäuren, auf Histondeacetylase-Inhibition	102
<b>5</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse und Ausblick</b>	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>Entscheidungssystem zur Beurteilung des teratogenen Potenzials von Strukturanaloga der VPA</b>	<b>107</b>
<b>5.2</b>	<b>Synthese enantiomerer VPA-Hydroxamsäurederivate mit chiralem Zentrum an C2 und reproduktionstoxikologische Untersuchung</b>	<b>108</b>
<b>5.3</b>	<b>Untersuchung der HDAC-Inhibition im F9-Zellsystem</b>	<b>109</b>
<b>5.4</b>	<b>Untersuchung der HDAC-Inhibition im Enzym-Assay</b>	<b>111</b>
<b>5.5</b>	<b>Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure und ihres Metaboliten</b>	<b>113</b>
<b>5.6</b>	<b>Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure</b>	<b>115</b>
<b>5.7</b>	<b>Metabolische Untersuchung von 3-Propyl-Heptansäure</b>	<b>117</b>
<b>5.8</b>	<b>Korrelation der HDAC-Halbwirkkonzentration mit der teratogenen Potenz von VPA-Derivaten</b>	<b>118</b>
<b>5.9</b>	<b>Untersuchung bekannter Teratogene auf HDAC-Inhibition</b>	<b>119</b>
<b>5.10</b>	<b>Untersuchung von Lebensmittelinhaltsstoffen auf HDAC-Inhibition</b>	<b>120</b>
<b>5.11</b>	<b>Ausblick</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Arbeitsmethodiken und verwendete Materialien</b>	<b>123</b>
<b>6.1</b>	<b>Organisch-präparative Synthese enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure</b>	<b>123</b>
6.1.1	Darstellung von 2-Propyl-Pentanhydroxamsäure	123
6.1.2	Darstellung von (±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure	125
6.1.3	Darstellung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure	126

6.1.4	Darstellung von R-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure	128
6.1.5	Bestimmung der chemischen Reinheit von Valproinsäurederivaten	129
6.1.6	Bestimmung der optischen Reinheit chiraler Karbonsäure- und Hydroxamsäureanaloge der Valproinsäure	131
6.1.7	Weitere chemisch-physikalische Charakterisierungstechniken	132
6.1.8	Bestimmung reproduktionstoxischer Effekte im Tiermodell	133
<b>6.2</b>	<b>Beurteilung und Graduierung reproduktionstoxischer Effekte</b>	<b>135</b>
<b>6.3</b>	<b>In vitro Untersuchungen am F9 Mauszellsystem</b>	<b>137</b>
6.3.1	Kultivierung und Behandlung des F9-Zellsystems	137
6.3.2	Western-Blot-Analysen von nukleärem acetylierten Histon 4 (AcH <sub>4</sub> )	139
6.3.3	Western-Blot-Analysen von zellulärer Histondeacetylase 3 (HDAC 3)	141
6.3.4	Western-Blot-Analysen von zellulärer Histondeacetylase 2 (HDAC 2)	142
6.3.5	Western-Blot-Analysen von zellulärem $\beta$ -Actin	143
6.3.6	Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten	143
<b>6.4</b>	<b>In vitro Untersuchungen am enzymatischen HDAC-Testsystem</b>	<b>145</b>
6.4.1	Durchführung des enzymatischen Testverfahrens	145
6.4.2	Bestimmung der Halbwirksamkeit IC <sub>50</sub> (HDAC)	146
6.4.3	Ausschluss interferierender HDAC-Inhibitoren	148
<b>6.5</b>	<b>Pharmakokinetische Untersuchungen im Mausmodell</b>	<b>149</b>
6.5.1	Haltung und Behandlung der Versuchstiere	149
6.5.2	Metabolische Untersuchung von Testsubstanzen	150
6.5.3	Bestimmungsmethode für S-2-Pentyl-4-Pentinsäure	151
6.5.4	Bestimmungsmethode für S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure	152
6.5.5	Bestimmung von Plasmabindungsdaten der Testsubstanzen	154
6.5.6	Bestimmung pharmakokinetischer Parameter	154
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>Anhänge</b>	<b>173</b>
<b>8.1</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>173</b>
<b>8.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>175</b>
<b>8.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>179</b>
<b>8.4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>181</b>
<b>8.5</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>182</b>
<b>8.6</b>	<b>Erklärung zur wissenschaftlichen Arbeit</b>	<b>183</b>
<b>8.7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>184</b>

# 1 Kurzdarstellung der Arbeit (Short Summary)

## **Struktur-Teratogenitäts-Studien von Valproinsäure-Analogen:**

Inhibierung von Histondeacetylasen und Pharmakokinetik ausgewählter Derivate im Mausmodell

Daniel Eikel - Dissertation Universität Hannover 2005

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit eine quantitative Korrelation von Histondeacetylase-Inhibition und teratogener Potenz von Valproinsäure-Derivaten dargestellt, die auf Histondeacetylasen (histone deacetylases, HDACs) als molekulare Zielstrukturen der Induktion von Neuralrohrdefekten (neural tube defects, NTDs) deutet. S-2-Pentyl-4-Pentinsäure stellt sich dabei als VPA-Derivat dar, das sowohl eine 10fach höhere Aktivität an HDACs als auch eine im Vergleich zu VPA im Mausmodell vorteilhafte Pharmakokinetik besitzt. Weitere bekannte Teratogene wie Retinsäure und Thalidomid zeigen keine HDAC-Inhibition, was die komplexe molekulare Kausalität von teratogenen Effekten unterstreicht, wobei verschiedene Lebensmittelinhaltsstoffe wie längerkettige Fettsäuren ebenfalls eine Aktivität an HDAC-Enzymen zeigen, was zu neuen Fragen in Bezug auf mögliche teratogene Risiken und anti-karzinogene Eigenschaften von konjugierten Linolsäuren (CLAs), Furanfettsäuren (FFAs) und Liponsäuren führt.

Valproinsäure (2-Propyl-Pentansäure, valproic acid, VPA), eine seit Jahrzehnten in der Behandlung von Epilepsien verwendete kurz- und verzweigt-kettige Fettsäure, wird aktuell in neuen Indikationsgebieten eingesetzt (Krebstherapie, Migräneprophylaxe, bipolare Erkrankungen). Ihrer guten Verträglichkeit stehen zwei seltene aber schwere Nebenwirkungen in Form der akuten Lebertoxizität und der Teratogenität gegenüber. Das klinische Erscheinungsbild der beim Menschen induzierten Fehlbildungen ist die *spina bifida aperta* („offener Rücken“), welche einen Defekt im Neuralrohrschluss darstellt. Frühere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen im Maus-Tiermodell zeigten, dass anti-krampflösende Eigenschaften der VPA-Analoga strukturell wenig spezifisch sind und nicht mit den molekularen Merkmalen der Teratogenität korrelieren, die wie folgt zusammengefasst werden können:

- Die Säurefunktion und das Wasserstoffatom an C2 ( $\alpha$ -Wasserstoffatom) sind essentiell.
- Die teratogene Wirkung ist stereoselektiv, wenn an Position C2 ein chirales Zentrum vorliegt.
- Die Kettenverlängerung einer Seitenkette und die Einführung einer Dreifachbindung an C4-C5 der anderen Seitenkette erhöhen das teratogene Potenzial, während die Verkürzung einer bzw. Verlängerung beider Seitenketten oder eine weitere Strukturverzweigung es verringern.

Molekulare Signalkaskaden der VPA sind noch weitgehend unbekannt, wobei 2001 erstmals die Proteinklasse der HDACs als direkte molekulare Zielstruktur von VPA identifiziert wurde (PHIEL et al. 2001 und GÖTTLICHER et al. 2001). HDACs haben durch die Beeinflussung des Chromatin-Remodeling eine elementare Bedeutung für die Genexpression von Zellen, sodass ihre Inhibierung zu Apoptose, Proliferationsinhibierung und Differenzierung führen kann. Diese

zellulären Effekte können die Grundlage sowohl für teratogene Nebeneffekte als auch anti-karzinogene Wirkungen von HDAC-Inhibitoren sein.

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass NTDs durch eine HDAC-Inhibition verursacht werden, war es zunächst das Ziel dieser Arbeit, Zusammenhänge zwischen HDAC-Inhibition und der teratogenen Nebenwirkung von VPA anhand von Strukturanaloga aufzudecken sowie Metabolismus und pharmakokinetische Eigenschaften ausgewählter VPA-Derivate im Mausmodell zu untersuchen. Anschließend sollte die Arbeitshypothese auf weitere bekannte teratogene Substanzen ausgeweitet und die Frage untersucht werden, ob HDACs generell eine molekulare Zielstruktur teratogener Substanzen darstellen. Darüber hinaus sollten Lebensmittelinhaltsstoffe, insbesondere Fettsäuren wie konjugierte Linolsäuren, auf ihr Potenzial zur HDAC-Inhibition getestet werden, da diese, wie auch VPA, im Zusammenhang mit der Prävention von Krebserkrankungen aktuell diskutiert werden.

Nach der hier erstmaligen Darstellung zweier enantiomerer Hydroxamsäurederivate der VPA mit chiralem Zentrum an C2 und Bestimmung ihrer teratogenen Potenz wurden diese zusammen mit 25 weiteren VPA-Derivaten, unter Berücksichtigung obiger Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen sowie einer maximalen strukturellen Diversifizierung, zu einem Testset zusammengestellt und ihr HDAC-Inhibitions-Potenzial zunächst qualitativ in einem F9-Mauszellsystem bestimmt. Ausschließlich VPA-Derivate mit teratogener Potenz zeigten durch Hyperacetylierung des Kernhistons 4 eine Beeinflussung der HDAC-Enzymfunktion an, wohingegen sie keine Veränderung des HDAC-Proteingehaltes der Zellen verursachten.

Weiterhin wurde ein Graduierungssystem entwickelt, das die semi-quantitative Klassifizierung der teratogenen Potenz von VPA-Derivaten in sechs Kategorien auch anhand weniger Dosis-Messwerte (bis zu  $n=1$ ) aus Versuchen im Maus-Tiermodell ermöglichte. Es erfolgte zunächst die quantitative Untersuchung des HDAC-Inhibitions-Potenzials der VPA-Derivate durch Bestimmung der  $IC_{50}(\text{HDAC})$  in einem humanen HDAC-Enzym-Assay. Die anschließende Korrelation der logarithmierten  $IC_{50}$ -Werte mit der teratogenen Potenz der VPA-Derivate zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen HDAC-Inhibition und teratogener Potenz an.

Zwei Substanzgruppen folgten dieser Korrelation zunächst scheinbar nicht. Sowohl Amide und Hydroxamsäuren als auch  $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate zeigten keine Aktivität an HDACs, waren jedoch als Substanzen mit teratogenem Potenzial klassifiziert worden. Mittels GC-MS durchgeführte metabolische Untersuchungen von S-2-Pentyl-4-Penthydroxamsäure als Modellschubstanz für Hydroxamsäuren demonstrierten in vivo eine signifikante Biotransformation zur korrespondierenden Säure. Hydroxamsäurederivate der VPA können daher als intrinsisch nicht teratogen angesehen werden, da sie, wie von Valpromid bekannt, in vivo zum Teratogen metabolisiert werden. Untersuchungen zum Metabolismus von 3-Propyl-Heptansäure als Modellschubstanz für  $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate konnten die erste Hypothese widerlegen, diese Derivate würden analog der Phytansäure durch  $\alpha$ -Oxidation zu  $\alpha$ -verzweigten VPA-Derivaten

aktiviert. Ein nachzuweisender Metabolit mit geringer Konzentration im Blutplasma zeigte vielmehr eine ( $\omega$ -1)-Oxidation dieser Verbindungsklasse an. Ein Erklärungsansatz für die bisher fehlende Korrelation zwischen teratogener Potenz und HDAC-Inhibition dieser Substanzgruppe könnte eine außergewöhnlich hohe Aktivität dieser Metaboliten an HDACs sein.

Nach Entwicklung zweier quantitativer Bestimmungsverfahren für S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure und S-2-Pentyl-4-Pentinsäure konnte das pharmakokinetische Profil dieser VPA-Derivate im Mausmodell bestimmt werden. Beide zeigten bei schneller Verteilung in die untersuchten Organgewebe von Leber, Niere, Milz und Gehirn keine Stereokonversion. Die Hydroxamsäure besaß eine kurze Halbwertszeit von nur 20 min bei einer hervorragenden Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von rechnerisch 200 %. Auf Grund der notwendigen Aktivierung in vivo ist dieses VPA-Derivat als Modellsubstanz für die Entwicklung metabolisch kompetenter in vitro Testmethoden von großem Interesse.

Im Vergleich hierzu besitzt die Karbonsäure eine auffallend lange Halbwertszeit von 200 min (vergl.  $t_{1/2}$ (VPA) = 50 min) bei einer Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von 45 %. Dieses VPA-Derivat ist für die Forschung im Bereich der Krebstherapie besonders interessant, weil es im Vergleich zu VPA ein vorteilhaftes pharmakokinetisches Profil und eine um den Faktor 10 höhere Aktivität an HDACs ( $IC_{50}$ (HDAC) = 50  $\mu$ mol/L) besitzt.

Nach Bestätigung der Arbeitshypothese durch die sehr gute Korrelation des teratogenen Potenzials von VPA-Derivaten mit der Halbwirkkonzentration der Derivate an HDACs wurde nachfolgend untersucht, ob es sich bei HDACs um eine generelle molekulare Zielstruktur teratogener Substanzen handelt. Es wurden daher all-trans-Retinsäure, Thalidomid sowie ausgewählte Derivate dieser zwei bekannten Teratogene bezüglich der Hyperacetylierung von Kernhistonen im Zellsystem sowie der Inhibition humaner HDAC-Enzyme untersucht. Die eingesetzten Substanzen waren jedoch keine HDAC-Inhibitoren. Teratogene Effekte bleiben daher substanzspezifische Eigenschaften, deren molekulare Kausalität komplex ist und derzeit nicht auf ein einzelnes molekulares Target reduziert werden können.

Die wegen der strukturellen Ähnlichkeit zur Valproinsäure getesteten Lebensmittelinhaltsstoffe zeigten überwiegend keine Aktivität an HDAC-Enzymen (z.B. Vitamin C, Pantothenensäure etc.); allerdings konnte gezeigt werden, dass sowohl Liponsäuren als auch CLAs und ihre Oxidationsprodukte die FFAs einen Einfluss auf die HDAC-Enzymaktivität nehmen. Liponsäuren zeigten sowohl eine Hyperacetylierung von Zellkernhistonen bei einer Konzentration von 1,00 mM als auch eine  $IC_{50}$ (HDAC) zwischen 2,00 und 4,00 mM. CLAs und FFAs wiesen demgegenüber im Zelltestsystem bei einer Konzentration bis 0,20 mM keine Hyperacetylierung auf, während die  $IC_{50}$ (HDAC) zu 0,30 mM bestimmt wurde. Dies ist eine Konzentration nahe der Löslichkeitsgrenze der untersuchten CLAs 10Z,12E-18:2 und 9E,11Z-18:2 in wässrigen Medien. Die Befunde zeigen, dass es in Lebensmitteln Fettsäuren mit HDAC-Aktivität gibt, woraus sich neue Fragen bezüglich eines teratogenen Risikos dieser Verbindungen, aber auch Fragen bezüglich möglicher krebs-präventiver Eigenschaften ergeben.

**Structure-teratogenicity-relationship of valproic acid analogues:**

Inhibition of histone-deacetylases and pharmacokinetic profiles of selected derivatives in the mice model

Daniel Eikel – University Hanover Dissertation 2005

In summary: this work demonstrates a quantitative correlation between histone deacetylase inhibition properties of valproic acid derivatives (VPA) and their teratogenic potencies thus clearly indicating histone deacetylases (HDACs) as a molecular target structure for the induction of neural tube defects (NTDs). S-2-Pentyl-4-pentynoic acid was shown to be a VPA derivative with a 10-fold higher  $IC_{50}$ (HDAC) and a favorable pharmacokinetic profile compared to VPA. However, other teratogens (e.g. retinoids and thalidomides) do not inhibit HDACs clearly demonstrating the complex molecular causality of teratogenic side effects. Additionally, some food ingredients, especially fatty acids, can be shown to possess HDAC inhibition abilities, which raises new questions concerning anti-cancer effects and possible teratogenic risks of conjugated linoleic acids (CLAs), furanoic fatty acids (FFAs) and lipoic acids in foodstuffs.

Valproic acid (VPA), an antiepileptic drug used in the treatment of seizures for decades, is actually investigated for use in treating cancer diseases, bipolar disorders and in migraine prophylaxis. Generally, VPA is a well-tolerated drug with two rare but severe side effects: acute liver toxicity and teratogenicity. The teratogenic effects induced in humans is the *spina bifida aperta*, which is caused by a defect in the closure of the neural tube (NTDs). Studies of the structure-activity-relationship in the mice model reveal that the anti-convulsive effects of VPA are structurally unspecific and do not correlate with the well-investigated structural prerequisites of its teratogenic effects. These have been investigated in the NMRI-exencephaly-mice-model in detail before and showed the following coherences:

- The acid function and the hydrogen atom at C2 ( $\alpha$ -Hydrogen) are essential.
- The teratogenic effects are stereoselective if the chiral centre is located at position C2.
- The chain elongation of one side chain and the introduction of a triple bond at C4-C5 enhances the teratogenic potential whereas the shortening of one, the elongation of both or further branching of the side chains diminishes the teratogenic effect.

Although the molecular signaling pathways of both VPA effects and adverse effects are still not fully understood, it was demonstrated that VPA is directly targeting HDACs (PHIEL et al. 2001 and GÖTTLICHER et al. 2001). Due to their fundamental importance in the chromatin remodeling and gene expression of cells, the inhibition of HDACs can lead to cellular effects such as apoptosis, inhibition of proliferation and differentiation. These cellular influences might ultimately lead to anti-cancer as well as to teratogenic side-effects of HDAC inhibitors.

Starting with the hypothesis that neural tube defects are mediated by HDAC inhibition, the aim of this study was to reveal structural relations between the HDAC inhibition potential and the teratogenic side-effects of VPA analogues and to study the pharmacokinetic profile of selected derivatives. After confirming this first aspect, the hypothesis was to be expanded to other known teratogens resulting in the question if HDACs generally are target structures for teratogenic compounds. Furthermore, because of the fatty acid nature of VPA, food ingredients with structural relation to VPA such as linoleic acids or lipoic acids, were also screened for HDAC inhibition. Fatty acid food ingredients were of high interest because of their actual surveillance in cancer prevention and cancer prophylaxis that might be mediated by HDAC inhibition.

After synthesising two enantiomeric hydroxamic acid derivatives of VPA with the chiral centre at position C2 for the first time and determining their stereoselective teratogenic potential, these were combined with further 25 derivatives to form a test-set of VPA analogues with respect to the above-mentioned structure teratogenicity prerequisites and the highest structural diversity possible. This test-set of VPA derivatives was qualitatively investigated for HDAC inhibition in an *in vitro* F9-mice-cell-line. Only VPA-derivatives showing teratogenic potential induced hyperacetylation of the core histone 4 indicating an inhibition of the HDAC enzyme function but were not altering the HDAC protein content of the cells.

Subsequently, several decision criteria were developed to establish a grading system which allowed the classification of the teratogenic potential of VPA derivatives based on only few data (even  $n=1$ ) from dose-exencephaly experiments in the NMRI-mice-model published before. After semi-quantitatively classifying the teratogenic potential within six defined categories, the quantitative HDAC inhibition potential of each VPA derivative was determined by investigating the  $IC_{50}(\text{HDAC})$  value in a human HDAC inhibition assay. The correlation of the  $\log IC_{50}$  value with the teratogenic potential measured within the grading system revealed a linear relation between these two properties.

At first, two groups of VPA derivatives did not correspond to this correlation. Both amides and hydroxamates as well as  $\beta$ -branched VPA derivatives did not show a HDAC inhibition potential but proved to possess a teratogenic potency. Metabolic investigations via GC-MS of S-2-Pentyl-4-pentynoic hydroxamic acid as a model compound for VPA hydroxamic acids in mice revealed a significant biotransformation to the corresponding carboxylic acid S-2-Pentyl-4-pentynoic acid. Therefore it can be concluded that hydroxamic acid derivatives of VPA, the same is already known for Valpromide, do not have an intrinsic teratogenic potential but are metabolically activated *in vivo*. Investigating the metabolic pattern of 3-Propyl-heptanoic acid as a model substance of  $\beta$ -branched VPA derivatives in mice could refute the first hypothesis of these compounds undergoing an  $\alpha$ -oxidation process like phytanic acid. In fact, it could be demonstrated that there was one metabolite at a low concentrations that was ( $\omega$ -1)-oxidated. The lack of correlation between teratogenic potential and HDAC activity within this group of VPA derivatives might be caused by a high activity of these metabolites.

After developing two quantification methods to measure *S*-2-Pentyl-4-pentynoic hydroxamic acid and *S*-2-Pentyl-4-pentynoic acid by LLE-GC-NPD analysis, the pharmacokinetic profiles of these chiral derivatives were determined in mice. The two compounds were rapidly distributed to the organ tissues of liver, kidney, spleen and brain without any stereoconversion. The hydroxamic acid demonstrated a relatively short half-life of only 20 min with a remarkable passage of the blood-brain-barrier by a computed factor of 200 %. Due to the required activation this VPA derivative is highly interesting as a model compound for the development of in vivo test systems with metabolic capacities.

In contrast to this hydroxamic acid the 2-Pentyl-4-pentynoic carboxylic acid showed a remarkably long half-life of 200 min (VPA  $t_{1/2}$  = 50 min) in mice with a blood-brain-barrier passage of 45 %. Because of the favorable pharmacokinetic properties and the 10 fold higher intrinsic activity at HDAC enzymes ( $IC_{50}$ (HDAC) of 50  $\mu$ mol/L) compared to VPA, this derivative is highly interesting for further investigations in the field of anti-cancer effects.

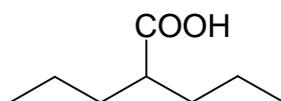
Having confirmed the working hypothesis by demonstrating an quantitative correlation between HDAC inhibition properties and teratogenic potencies of VPA derivatives, this hypothesis was expanded towards other teratogenic substances. The aim was to find out if HDACs were also molecular target structures of other known teratogens. Investigation of retinoic acid, thalidomide and their derivatives regarding the ability to induce hyperacetylation of core histone 4 in the cell culture and inhibition of human HDACs revealed that these teratogens do not influence the HDAC activity. Thus, the expanded hypothesis could be disproved: teratogenic effects remain substance specific properties, whose molecular causalities are highly complex and cannot yet be referred to only one biological target.

Finally the hypothesis was expanded to other fatty acids and food ingredients with the question if food ingredients structurally related to VPA do possess HDAC inhibition properties. Despite a majority of investigated compounds not showing any HDAC inhibition potential, there were two groups of substances with enzyme activity. Both Lipoic acids as well as CLAs and their oxidation products the FFAs displayed HDAC inhibition abilities. In F9-cells lipoic acids showed a hyperacetylation of core histone 4 at concentrations of 1,00 mM with  $IC_{50}$ (HDAC) values between 2,00 and 4,00 mM in the human HDAC enzyme assay. In contrast, CLAs and FFAs do not reveal hyperacetylation effects at concentrations as high as 0,20 mM, whereas the  $IC_{50}$ (HDAC) value could be determined to be around 0,30 mM, which is a concentration close to the maximum solubility of the investigated 10Z, 12E CLA 18:2 and 9E, 11Z CLA 18:2 in water based media. So, according to the expanded hypothesis, there are indeed food ingredients with an activity to inhibit HDACs. This raises new questions concerning the possible risk of teratogenic effects of these compounds as well as the possible anti-cancer effects of fatty acids.

## 2 Einleitung

### 2.1 Anwendung und Bedeutung der Valproinsäure

Valproinsäure (valproic acid, VPA), korrekt als 2-Propyl-Pentansäure zu bezeichnen, ist eine Substanz mit vergleichsweise einfacher chemischer Struktur, die aus acht Kohlenstoffatomen aufgebaut ist. Sie kann als kurz- und verzweigt-kettige Fettsäure klassifiziert werden (Abbildung 2-1). Die Synthese der VPA gelang erstmals Burton 1882 (BURTON 1882), der sie durch Verseifung des 2-n-Propylpentansäureethylesters mit Kaliumhydroxidlösung darstellte. Die Entdeckung ihrer antikonvulsiven Eigenschaften und die schlussendliche Verwendung als antiepileptisches Medikament basierten auf einer eher zufälligen Entdeckung: 1963 untersuchten MEUNIER et al. die antikonvulsive Wirkung von Khellin-Derivaten und nutzten dabei die VPA als Lösemittel für diese eher schwerlöslichen Verbindungen. Bei der Auswertung der Experimente am Tiermodell stellte sich heraus, dass alle Verbindungen genau dieselbe antikonvulsive Wirkung zeigten, was auf die Eigenschaften der VPA zurückgeführt werden konnte (MEUNIER et al. 1963). Infolge dieser Experimente wurde VPA, zumeist in Form ihrer Natriumsalze (z.B. Divalproex<sup>®</sup>), als Antiepileptikum 1967 in der europäischen Union zugelassen.



**Abbildung 2-1:** Strukturformel von Valproinsäure (2-Propyl-Pentansäure,  $M_w = 144,21$  g/mol)

Heute ist VPA weltweit eines der am häufigsten verschriebenen Antikonvulsiva mit einem Gesamtumsatz über 1 Milliarde US Dollar (PERUCCA 2002, BIALER 2002) und erfüllt damit die Kriterien eines klassischen Blockbuster-Medikamentes. Klinische Studien konnten die hohe Wirksamkeit der VPA bei generalisierten und partiellen Krampfanfällen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern nachweisen (HELLER et al. 1995, DESILVA et al. 1996). Im direkten Vergleich zu anderen Antiepileptika zeigte sich, dass VPA ein Medikament mit sehr breitem Wirkspektrum ist. In diesem Sinne ist es anderen antikonvulsiv wirksamen Medikamenten überlegen und daher bei vielen Patienten die erste Behandlungswahl (DAVIS et al. 1994).

Neben diesem seit über 35 Jahren bekannten Anwendungsgebiet werden aktuell weitere Indikationsgebiete der VPA erforscht. Nach ersten Erkenntnissen zu positiven Einflüssen von VPA in der Behandlung und Prävention von Migräneanfällen (SORENSEN 1988) konnten weitere Studien an Erwachsenen und Kindern eine gute Wirksamkeit zeigen (KLAPPER 1997, SERDAROGLU et al. 2002). Die für die Behandlung von Migräne eingesetzten therapeutischen Blutplasmaspiegel liegen bei etwa 50  $\mu\text{g/mL}$  (350  $\mu\text{mol/mL}$ ) (KINZE et al. 2001), während zur

Behandlung von Epileptikern Blutplasmaspiegel von ca. 100 µg/mL (700 µmol/mL) erreicht werden.

Ein weiteres Indikationsgebiet der VPA ist die Behandlung von bipolaren Erkrankungen wie Depressionen und Psychosen. Bereits vereinzelt seit Ende der 70er Jahre zur Behandlung schwerer Psychosen eingesetzt, konnte eine gute Wirksamkeit sowohl von Lithium als auch VPA bei der Behandlung von akuten Psychosen gezeigt werden (BOWDEN et al. 1994). Dem Indikationsgebiet der bipolaren Erkrankungen kommt dabei derzeit eine immer größere Bedeutung zu, da eine Vielzahl von Todesfällen (Suizide) aus dieser Erkrankungsform resultieren. Die Welt-Gesundheits-Organisation (World-Health-Organisation, WHO) beurteilt die bipolaren Erkrankungen daher als eine der sechs schwerwiegendsten Erkrankungsformen (MURRAY AND LOPEZ 1996). Neben Valproinsäure und Lithium wird in diesem Indikationsgebiet in geringerem Umfang auch das antiepileptisch wirksame Carbamazepin als Behandlung eingesetzt.

Aktuell wird VPA als Chemotherapeutikum zur Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen intensiv erforscht. Neben den proliferationsinhibierenden Eigenschaften der VPA selbst, insbesondere an neuronalen Zellen (MARTIN AND REGAN 1991, BACON et al. 2002), konnte in ersten Untersuchungen auch ein Zusammenhang zwischen teratogenen Effekten von VPA-derivaten und ihren proliferationsinhibierenden Eigenschaften festgestellt werden (COURAGE-MAGUIRE et al. 1997), die zur Patentierung dieser Substanzklasse als mögliche neue Chemotherapeutika führte (NAU AND REGAN 1997). Der Beschreibung antitumorale Wirkungen von VPA auf humane Neuroblastomzellen in vitro von CINATL JR. et al. 1996 folgten schnell weitere ermutigende Befunde zur antineoplastischen Wirkung in unterschiedlichen Zellgeweben (CINATL JR. et al. 1996). Insbesondere die positive Wirkung von VPA im Neuroblastomtragenden-Mausmodell (CINATL et al. 1997) führte schlussendlich zum Vorschlag ihrer Verwendung als Chemotherapeutikum.

Im Rahmen der Hirntumorstudie „HIT-GBM-C: Hirntumore im Kindesalter“ wurde VPA daher in einer klinischen Phase I Studie an Patienten mit therapie-refraktärem malignem Gliom angewandt. Innerhalb dieser Studie konnte zunächst bei zwei von 15 Patienten eine Remission bzw. Teilremission des Tumors beobachtet werden. Die beobachteten Blutplasmaspiegel lagen bei diesen Patienten zeitweise bei dem Fünffachen der zur Behandlung von Epilepsien benötigten Konzentrationen (PD Dr. O. Witt - mündliche Mitteilung 2003). Auf Grund der insgesamt guten Verträglichkeit der VPA wurde ihre Verwendung in der Behandlung von Gliomen im Kindesalter als erfolgreich bewertet, sodass sie in der Folgestudie HIT-GBM-D zur dritten Behandlungswahl vorgerückt ist (DEUTSCHE KINDERKREBS STIFTUNG 2004).

## 2.2 Allgemeine Nebenwirkungen der Valproinsäuretherapie

VPA ist bei allen derzeit eingesetzten Indikationsgebieten ein gemeinhin gut verträgliches Therapeutikum, durch dessen langjährige und umfangreiche klinische Verwendung die Informationslage als sehr gut zu bewerten ist. Verschiedentlich auftretende Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Tremor, Kopfschmerz, Schwindelanfälle und Haarausfälle sind von geringfügiger Schwere und treten im Allgemeinen nur in der frühen Phase der Indikation auf, ohne dass die Therapie unterbrochen werden muss (SCHMIDT 1999, DAVIS et al. 1994). Weitere oft beobachtete Nebenwirkungen sind einerseits die Zunahme des Gewichtes (weight-gain), deren Zusammenhang mit der VPA-Therapie umstritten ist (EASTER et al. 1997), sowie gastrointestinale Störungen (SCHMIDT 1984). Bei weiblichen Patienten wurden zudem endokrinologische Störungen wie polycystische Ovarien und Hyperandrogenismus beobachtet (ISOJARVI et al. 1996, HUFNAGEL 2004).

Neben diesen als nicht lebensbedrohlich einzustufenden Nebenwirkungen ist die Valproat-Therapie mit zwei seltenen aber schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden: Die akute Hepatotoxizität konnte in Studien nachgewiesen werden (CLARKSON AND CHOONARA 2002) und tritt in Form einer mikrovaskulären Steatose auf (FROMENTY AND PESSAYRE 1997). Sie betrifft insbesondere jüngere Kinder bis zu zwei Jahren, die daher als besondere Risikogruppe eingestuft wurden (DREIFUSS et al. 1987). Bei Untersuchung des Leberversagens unter VPA-Therapie konnten im Blutplasma besonders erhöhte Werte eines metabolischen Abbauproduktes der VPA, die einfach ungesättigte 2-Propyl-4-Pentensäure, nachgewiesen werden (BAILLIE 1988). Inwiefern dieser Metabolit an hepatotoxischen Wirkungen beteiligt ist oder hepatotoxische Dysfunktionen anzeigt, ist genauso ungeklärt wie die auslösenden Mechanismen des Leberversagens (SIEMENS et al. 1993).

### 2.3 Teratogene Nebenwirkungen der Valproinsäure

Als zweite seltene, aber schwerwiegende Nebenwirkung ist die teratogene Wirkung (Fruchtschädigung) der VPA zu nennen. Erst fünfzehn Jahre nach der Erstzulassung als Antiepileptikum in Europa konnten NAU et al. 1981 ein Maustiermodell vorstellen, bei dem Föten behandelter NMRI (Naval Medical Research Institute) Muttertiere Fehlbildungen in Form der Exenzephalie zeigten (NAU et al. 1981). Noch im selben Jahr wurde auch ein Zusammenhang von Valproat-Therapie und Abnormalitäten bei Neugeborenen aufgezeigt (NAU et al. 1981, GOMEZ 1981). Die Befunde zu teratogenen Effekten der VPA konnten wenig später durch Studien bestätigt werden, die zu einer Risikoabschätzung von Fehlbildungen neugeborener Kinder bei Müttern unter VPA-Therapie von 1-5 % führten (ROBERT AND GUIBAUD 1981, BJERKEDAHN et al. 1982, LINDHOUT AND MEINHARDI 1984).

Bei der Ausprägung der teratogenen Effekte beim Menschen handelt es sich überwiegend um die *spina-bifida-aperta* („offener Rücken“), die, wie auch die Exenzephalie im NMRI-Maus-Modell, einen Defekt der Neuralrohrentwicklung darstellt. Die für die Schädigung sensible Phase liegt bei der Maus zeitlich bei Tag 8 der Embryonalentwicklung, was der menschlichen Embryonalentwicklung zwischen Tag 20 und 30 entspricht. Dieses zeitliche Fenster der maximalen Empfindlichkeit ist problematisch, da unter Valproat-Therapie stehenden Frauen oftmals erst zu diesem Zeitpunkt, durch Ausbleiben der Menstruationsblutungen, eine Schwangerschaft bewusst wird. Eine Veränderung der Valproat-Therapie zum Schutze des Embryos, z.B. durch Dosisreduktion, Veränderung des Dosisregime oder Wechsel des Medikamentes ist damit bereits nicht mehr sinnvoll.

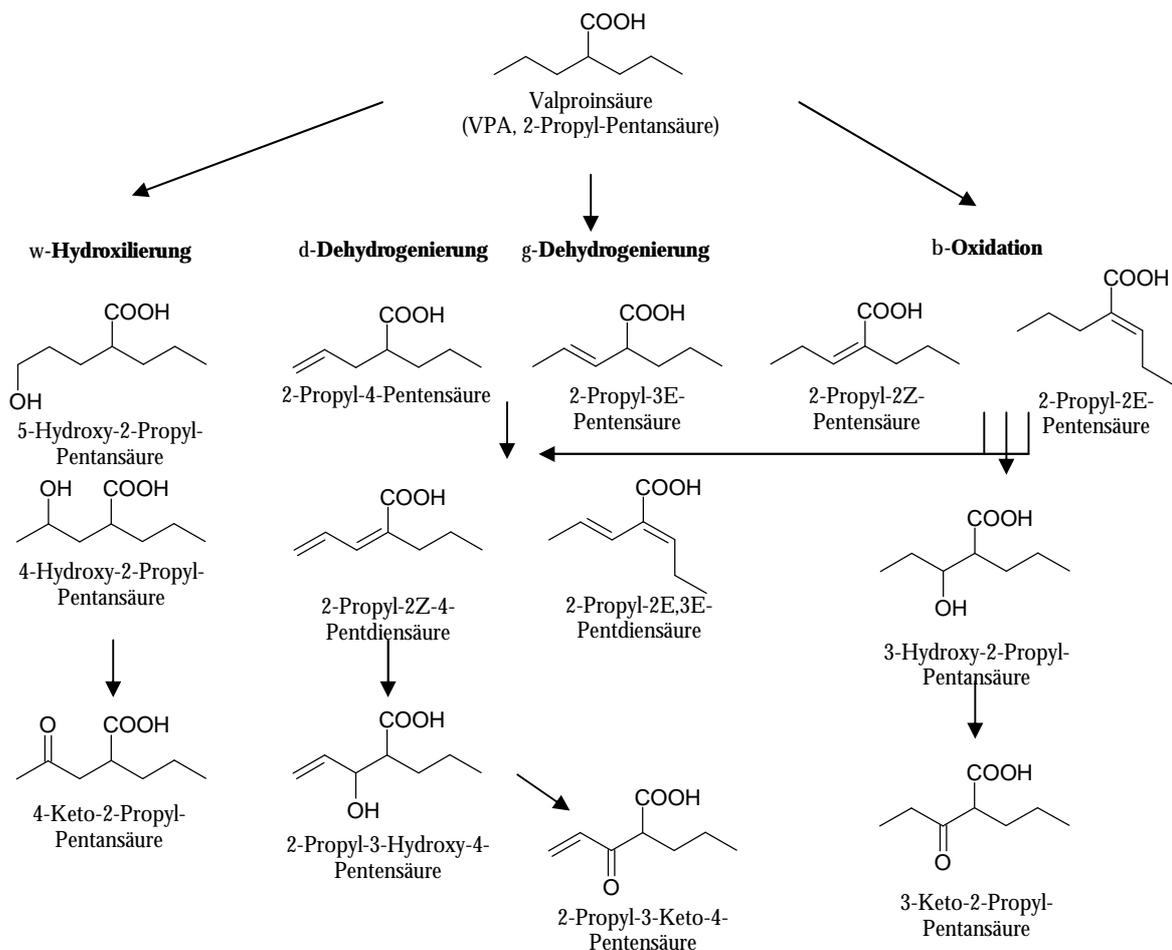
Im Hinblick auf die Auslösung von Neuralrohrdefekten und anderen Fehlbildungen ist derzeit umstritten, ob und in welchem Maße eine epileptische Erkrankung an sich, z.B. durch vereinzelte Anfälle während der Schwangerschaft bzw. eine genetische Prädisposition epilepsieerkrankter Mütter, einen Ursachenanteil an embryonalen Fehlbildungen hat. Die Gesamtinzidenz von Neuralrohrdefekten (neural tube defects, NTDs) in der allgemeinen Bevölkerung liegt beispielsweise bei 1,5 Fällen pro 1000 geborener Kinder (Beispiel Sachsen-Anhalt: RÖSCH et al 2001), wobei sich das Risiko einer Fehlbildung um das Zwanzigfache bei Müttern unter Valproat-Therapie bzw. um das Zehnfache bei Therapie mit anderen Antikonvulsiva erhöht (LINDHOUT et al. 1992). Eine aktuelle Studie von HOLMES et al. konnte dabei prinzipiell keinen Zusammenhang zwischen Fehlbildungen und einer epileptischen Erkrankung feststellen. Signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe zeigten ausschließlich Mütter, die mit Antiepileptika (Carbamazepine, Phenytoin und Phenobarbital) in Mono- oder Mehrfachtherapie behandelt worden waren (HOLMES et al. 2001). Die teratogene Wirkung von Antiepileptika im Allgemeinen (anticonvulsant embryopathy), aber insbesondere der VPA, scheint daher eine Substanzeigenschaft zu sein, die möglicherweise noch durch eine genetische Prädisposition zur Epilepsieerkrankung verstärkt wird.

Die Frage der Ursachen von embryonalen Fehlbildungen durch VPA ist im Sinne einer Risikoabschätzung auf Grund ihrer neuen Anwendungsgebiete im Bereich der bipolaren Erkrankungen und der Migräneprophylaxe von Bedeutung. Im Bereich der chemotherapeutischen oder chemopräventiven Anwendung von VPA ist die teratogene Nebenwirkung als weniger relevant einzustufen, da eine Schwangerschaft im Rahmen einer Chemotherapie immer kontraindiziert ist. Im Zusammenhang mit einer Gefährdungsanalyse von Patienten unter Valproat-Therapie in den neuen Indikationsgebieten sind Ergebnisse von embryonalen Fehlentwicklungen in Abhängigkeit des VPA Blutplasmaspiegels im Mausmodell von Bedeutung (NAU 1985). Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Ausprägung von Exenzephalien durch VPA von der maximal erreichten Blutplasmakonzentration des Muttertieres ( $c_{\max}$ ) und nicht von der Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area-under-curve, AUC) abhängig ist. Durch ein geeignetes Dosisregime unter Vermeidung hoher Blutplasma-Spitzenkonzentrationen kann daher das Auftreten von Fehlbildungen vermindert werden, wie dies auch bereits bei der klinischen Anwendung von VPA in der Epilepsiebehandlung von Frauen mit Schwangerschaftswunsch berücksichtigt wird (ZAHN et al. 1998). Da bei Verwendung von VPA in der Migräneprophylaxe und zur Behandlung von bipolaren Erkrankungen derzeit VPA-Blutplasmakonzentrationen von ca. 50 % der Plasmaspiegel zur Behandlung von Epilepsieerkrankungen ausreichend erscheinen, ist hier bereits eine deutliche Risikoverringerung zu erwarten.

## 2.4 Pharmakokinetische Eigenschaften von Valproinsäure

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die teratogenen Nebenwirkungen der VPA sowie die pharmakokinetischen und metabolischen Eigenschaften ausgewählter VPA-Derivate. Im Folgenden sollen daher zunächst die pharmakokinetischen Aspekte der VPA und einiger Strukturanaloga zusammengefasst dargestellt werden.

VPA kann trotz der Säurefunktion als eine lipophile Substanz ( $\log P = 2,7$ ) bezeichnet werden, die nach Applikation beim Menschen oder im Versuchstier eine schnelle Verteilung in alle Körperkompartimente erfährt. Studien mit radiomarkierter VPA konnten aber eine Anreicherung im Neuroepithelgewebe von Mausembryonen im Vergleich zum Muttergewebe, sowie eine erhöhte Konzentration von VPA in Leber und Nierengewebe der Muttertiere nachweisen (DENCKER et al. 1990). Neben einer raschen Metabolisierung mit einer Vielzahl von Metaboliten (Abbildung 2-2) nach subkutaner (s.c.) oder intraperitonealer (i.p.) Applikation bei Mensch oder Versuchstier führt insbesondere die orale Gabe von Valproinsäure zu einem ausgeprägten First-Pass-Effekt (NAU AND LÖSCHER 1984).



**Abbildung 2-2:** Schematische Darstellung von Metaboliten und Metabolisierungswegen nach Dosisgabe von Valproinsäure (nach OMTZIGT et al. 1992)

Eine normale Stoffwechselfunktion vorausgesetzt, ist der Metabolit mit der höchsten Plasmakonzentration beim Menschen die 2-Propyl-2E-Pentensäure, eine Substanz, die im Tierversuch keine teratogene Wirkung zeigt (NAU AND LÖSCHER 1986). Die Teratogenität der VPA ist daher eine ihrer intrinsischen Eigenschaften, da kein weiterer Metabolit ausreichend hohe Konzentrationen im Mensch oder Versuchstier erreicht um diese Nebenwirkung zu induzieren.

Aufgrund des pKs-Wertes von 4,6 der VPA (schwache Säure) liegt diese bei physiologischem pH-Wert zu 99,9 % in ionischer Form vor. Gleichzeitig beträgt die Plasmabindungsrate von VPA beim Menschen ca. 90 % (Tabelle 2-1) und das bei therapeutischen Plasmakonzentrationen erreichte Konzentrationsverhältnis von Gehirn zu Blutplasma etwa 1/6 – 1/10. Ausgehend von der Voraussetzung, dass ausschließlich nicht an Proteine gebundene VPA die Blut-Hirn-Schranke durch Diffusionsprozesse oder einen aktiven Transport überwinden kann, bedeutet dies einen praktisch ungehinderten Übergang der VPA ins Gehirn. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfolgt dabei sowohl durch Diffusion als auch durch einen aktiven Transport mittels verschiedener Fettsäuretransporter in das Gehirn hinein, sowie durch einen Probenecid®-sensitiven Transporter aus dem Gehirn heraus (FREY AND LÖSCHER 1987, HUAI-YUN et al. 1998). Ebenfalls erfolgt eine Überwindung der Plazentaschranke, wobei der humane Embryo im zeitlichen Verlauf seiner Entwicklung einen zur maternalen Umgebung unterschiedlichen pH-Wert annehmen kann und hierdurch eine Anreicherung von VPA im embryonalen Gewebe möglich wird (NAU AND SCOTT 1986).

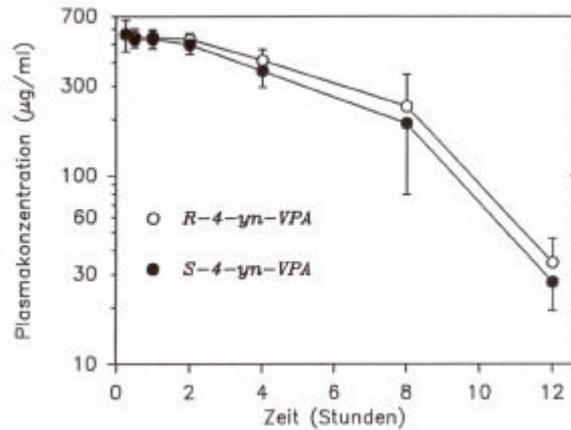
**Tabelle 2-1:** Pharmakokinetische Parameter von Valproinsäure in Mensch und Maus (LÖSCHER 1999)

Spezies	Verteilungsvolumen $V_{ss}$ (L/kg)	Halbwertszeit $t_{1/2}$ (h)	Proteinbindung (%)	Gehirn/Plasma
				Konzentrationsverhältnis (%) <sup>a</sup>
<b>Mensch</b>	0,13 – 0,19	9 – 18	80-95	7 – 28
<b>Maus</b>	0,33	0,8	12	15 - 20

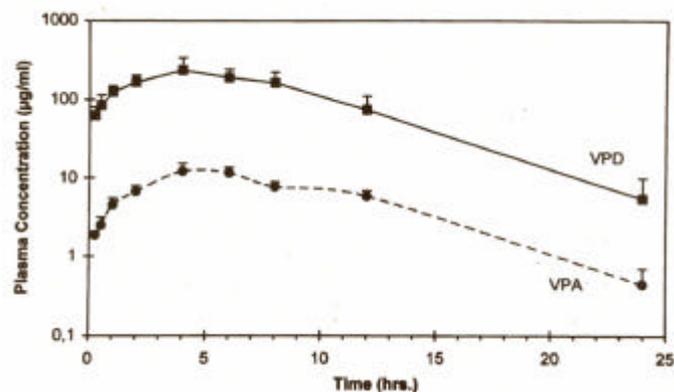
<sup>a</sup> bei Plasmakonzentrationen von 50-80 µg/mL

VPA besitzt in der Maus mit ca. 50 Minuten eine deutlich geringere Halbwertszeit als beim Menschen mit ca. 13 Stunden. Im Vergleich hierzu konnten bereits verschiedene andere VPA-Derivate untersucht werden, die im Mausmodell eine deutlich längere Halbwertszeit aufwiesen. Dies galt insbesondere für VPA-Derivate mit einer Dreifachbindung an Position C4-C5 (Abbildung 2-3, HAUCK et al. 1992). Die untersuchten enantiomeren VPA-Derivate zeigten eine im Vergleich zu VPA deutlich verlängerte Halbwertszeit im Mausmodell von ca. sechs Stunden. Das pharmakokinetische Profil war unabhängig von der Stereokonfiguration an C2, was für die Struktur-Aktivitäts-Betrachtungen enantiomerer VPA-Derivate von Bedeutung ist (vergleiche Kapitel 2.5).

Durch RADATZ et al. konnte die metabolische Aktivierung von Valpromid, dem Amid-Derivat der VPA, demonstriert werden (Abbildung 2-4, RADATZ et al. 1998). Valpromid ist auch im Menschen als Pro-Drug für VPA bekannt und zeigt mit ca. fünf Stunden im Tierversuch eine deutlich längere Halbwertszeit als VPA selbst. Diese Biotransformation ist ebenfalls für die Betrachtung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Valproinsäure und die Beurteilung der intrinsischen Teratogenität von VPA-Derivaten von Bedeutung.



**Abbildung 2-3:** Pharmakokinetisches Profil von R- und S-2-Propyl-4-Pentinsäure (R-4-yn-VPA und S-4-yn-VPA) im NMRI-Mausmodell nach einer s.c. Dosis von 3,00 mmol/kg (HAUCK 1992).



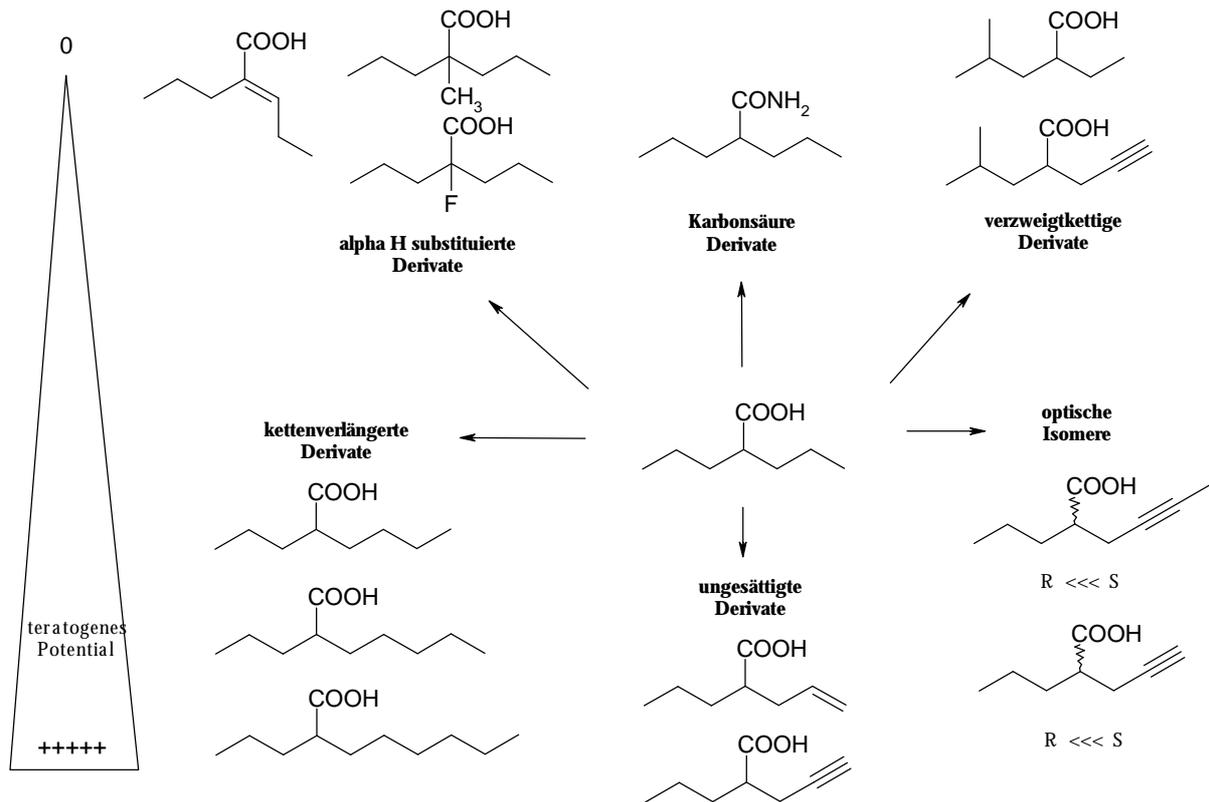
**Abbildung 2-4:** Metabolische Aktivierung von Valpromid (VPD) zu Valproinsäure (VPA) im NMRI-Mausmodell nach einer s.c. Dosis von 3,00 mmol/kg (RADATZ et al. 1998)

## 2.5 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Valproinsäure

Trotz der über 30jährigen klinischen Verwendung von VPA sind ihre molekularen Mechanismen weder bezüglich der Wirkungen noch der Nebenwirkungen vollständig aufgeklärt. Während für die gewünschten positiven Wirkungen im Bereich der Anwendung als Antiepileptikum ein vergleichsweise profundes Wissen über die Wirkmechanismen vorhanden ist (vergleiche zusammenfassende Arbeiten von LÖSCHER 2002 und PERUCCA 2002), sind die molekularen Wirkmechanismen in den neuen Indikationsgebieten der bipolaren Erkrankungen, der Migräneprophylaxe und der Chemotherapie noch unbekannt. Dies gilt umso mehr für die molekulare Toxikologie und speziell der teratologischen Effekte.

Bisherige Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass die Wirkmechanismen, die zu antikonvulsiven, hepatotoxischen oder teratogenen Wirkungen führen, nicht miteinander gekoppelt sind. Die antikonvulsiven Wirkungen der VPA werden von einer Vielzahl von Strukturanaloga (z. B. kurz-, mittel- und verzweigtkettigen Fettsäuren, Amid- und Hydroxamsäurederivaten) im Tierversuch in nahezu gleichwertiger Qualität erreicht, was die geringe Strukturspezifität dieser Wirkung demonstriert (CHAPMAN et al. 1983, LÖSCHER AND NAU 1985, Levi et al. 1997).

Im Gegensatz hierzu zeigten Untersuchungen zur strukturellen Vorraussetzung der VPA zur Induktion von teratogenen Nebenwirkungen (Neuralrohrdefekten) im NMRI-Exenzephalie-Mausmodell (NAU et al. 1981) eine sehr hohe Strukturelektivität. Ausgehend von der VPA als Kernstruktur konnte in bisherigen Arbeiten gezeigt werden, dass die Karbonsäurefunktion als freie Säure vorliegen muss um eine teratogene Wirkung der Substanz zu entfalten. Eine Derivatisierung dieser Funktion zum Amid oder zum Ester führte zum fast vollständigen Verlust des teratogenen Potenzials (LÖSCHER AND NAU 1985, NAU AND LÖSCHER 1986). Die verbliebene teratogene Wirkung konnte zudem mit der Aktivierung dieser Derivate in vivo und der Biotransformation zur Säure erklärt werden (vergleiche Kapitel 2.4, RADATZ et al. 1998). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das Wasserstoffatom an C2 ( $\alpha$ -Wasserstoff-Atom) entscheidend für die teratogene Wirkung der VPA ist. Eine Substitution durch Fluor, Hydroxyl oder eine Methylgruppe sowie Abstraktion zur Doppelbindung führte zu Analoga mit geringem oder keinem teratogenen Potenzial (NAU AND LÖSCHER 1984, ELLERBECK et al. 1998). Die Verlängerung einer der zwei Seitenketten der VPA steigerte die teratogene Potenz der Derivate, während bei Verlängerung beider Seitenketten die Aktivität verringert wurde. Ebenso führte eine zusätzliche Verzweigung des Moleküls an C4 zum Verlust der Teratogenität, während die Einführung einer Dreifachbindung in Position C4-C5 eine deutliche Verstärkung des teratogenen Effektes bewirkte (BOJIC et al. 1996, BOJIC et al. 1998, NAU et al. 1991, HAUCK et al. 1991, GRAVEMANN 2002, VOLLAND 2002).



**Abbildung 2-5:** Übersicht der bisher bekannten Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen von Valproinsäure-Derivaten

Die in Abbildung 2-5 gezeigten Veränderungen der Kernstruktur von VPA bewirken den teilweise vollständigen Verlust der teratogenen Potenz. Von besonderem Interesse ist die Abhängigkeit des teratogenen Potenzials von der Stereokonfiguration des Kohlenstoffatoms C2: Ist im Molekül an dieser Position ein chirales Zentrum vorhanden, so zeigte sich in bisherigen Untersuchungen ein deutlicher Unterschied in der teratogenen Wirkung der jeweiligen Enantiomere (HAUCK 1992). Während bei der Verbindung 2-Ethyl-Hexansäure (EHXA) zunächst nur ein geringer Unterschied zwischen den optischen Isomeren zu beobachten war, konnten für die potenteren VPA-Derivate 2-Propyl-4-Pentinsäure und 2-Propyl-4-Hexinsäure eine hohe Stereoselektivität der teratogenen Wirkung festgestellt werden (HAUCK et al. 1991, RADATZ et al. 1999). Dies stimmt überein mit der Pfeifferschen Regel (PFEIFFER 1956), die einen größeren Aktivitätsunterschied zweier Enantiomere bei ansteigender biologischer Wirkung des Moleküls postuliert. Die Beobachtungen der Abhängigkeit der teratogenen Wirkung im Mausmodell von der Stereokonfiguration an C2 bestätigt die wichtige Rolle, die das  $\alpha$ -Wasserstoffatom an C2 spielt und sprechen insgesamt für eine Interaktion der VPA-Derivate mit einem, zunächst hypothetischen, stereoselektiven Rezeptor (BOJIC et al. 1998). Als Ursache für die differenzierte Aktivität der Stereoisomere im Mausmodell konnten Unterschiede im

pharmakokinetischen Verhalten der Enantiomere von EHXA und 2-Propyl-4-Pentinsäure ausgeschlossen werden (Kapitel 2.4, HAUCK 1992).

Neben den differenziert untersuchten Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen der VPA lassen erste Untersuchungen zu ihrem Wirkmechanismus bei Behandlung bipolarer Erkrankungen eine Beeinflussung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) und des Inositol-triphosphat (InsP<sub>3</sub>) Signalweges vermuten (WILLIAMS et al. 2002). Unter der Voraussetzung, dass es sich hierbei um die molekularen Wirkmechanismen bei der Behandlung bipolarer Erkrankungen handelt, konnte in ersten Untersuchungen eine Strukturspezifität der Wirkung von VPA-Derivaten in entsprechenden in vitro-Testsystemen demonstriert werden. Die beobachtete Strukturelektivität weicht jedoch deutlich von den strukturellen Voraussetzungen der teratogenen Wirkungen ab (EICKHOLT et al. 2005), sodass vermutlich kein Zusammenhang zwischen diesen zwei Wirkungen besteht.

Während strukturspezifische Untersuchungen zur Wirkung der VPA im Bereich der Migräneprophylaxe mangels Kenntnissen über eine molekulare Zielstruktur der Wirkung bislang nicht vorliegen, wurden die zellulären und molekularen Auswirkungen von VPA insbesondere im Hinblick auf ihre antineoplastischen/antitumoralen Wirkungen intensiv untersucht. Generell lässt sich feststellen, dass VPA je nach verwendetem Zell-Testsystem sowohl anti-proliferative, differenzierende als auch apoptotische Wirkungen zeigte. Die zellulären Auswirkungen einer VPA-Behandlung spiegeln sich in der veränderten Genexpression der Zellen wieder (für eine aktuelle Übersicht siehe BLAHETA AND CINATL JR. 2002).

Im Bereich der antitumoralen Wirkungen von VPA konnten erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von VPA-Derivaten bei Untersuchungen zur in vitro Aktivität gegen Leukämiezellen (DEUBZER et al. 2005) und der Zytomegalie-Virusreplikation (MICHAELIS et al. 2004/a) durchgeführt werden. Diese ersten Untersuchungen zeigten Parallelen zu den Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen, jedoch ist noch ungeklärt, welche molekularen Ziele und Wirkmechanismen die Relation dieser Effekte verursachen.

Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen zur Wirkung der VPA bei der Heransprossung von Blutgefäßen (Angiogenese), die bei der weiteren Entwicklung und schlussendlichen Metastasierung von Tumorgewebe beobachtet wurden (MICHAELIS et al. 2004/b). Im in vitro matrigel-plug-Assay sowie im CAM-Assay (chick-chorioallantoic-membrane-assay) konnte gezeigt werden, dass VPA eine Störung in der Bildung von Blutgefäßen und in der Blugefäßdichte bewirkte. Dies entsprach histologischen Befunden von Störungen in der Vaskularisierung der Blutgefäße im Lebergewebe von Mausembryonen nach VPA-Behandlung des Muttertieres. Die morphologisch ähnlichen Effekte im CAM-Assay und im Embryo-Lebergewebe in vivo sind Hinweise auf einen möglichen gemeinsamen Wirkmechanismen der VPA bei anti-tumoralen, speziell anti-angiogenetischen und teratogenen Effekten.

## 2.6 Valproinsäure als Histondeacetylaseinhibitor

Trotz umfangreicher in vitro Untersuchungen zur Beeinflussung der Genexpression und des Proteingehaltes von Zellen nach VPA-Behandlung, insbesondere aus der Verwendung von VPA in der Krebstherapie (KULTIMA et al. 2004, BLAHETA AND CINATL JR. 2002), ist das Wissen überwiegend fragmentarisch. Die direkten Zielgene, -enzyme und -proteine sind noch weitgehend unbekannt. Vor allem die molekularen Signalkaskaden, sowohl der Wirkungen als auch der Nebenwirkungen von VPA, werden derzeit intensiv untersucht.

LAMPEN et al. konnten zeigen, dass PPARs (peroxisomale proliferations-aktivierte Rezeptoren, peroxisome proliferator-activated receptors), speziell PPAR $\delta$ , selektiv von teratogenen VPA-Derivaten aktiviert werden. Hierbei wurde in F9-Teratokarzinomzellen der Maus und in CHO-(Chinese-Hamster-Ovary) Zellen eine Differenzierung ausgelöst, die ausschließlich teratogene VPA-Derivate aufwiesen (LAMPEN et al. 1999). PPARs gehören zur Familie der Kernrezeptoren, die nach der Aktivierung über ihre DNA-Bindungsstelle die Expression spezieller Gene auslösen können. Eine direkte Bindung von VPA an PPARs konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden (LAMPEN et al. 2001, LAGACE AND NACHTIGAL 2004), sodass PPARs vermutlich nicht direkt mit Valproinsäure interagieren, sondern im Verlauf der VPA ausgelösten Signalkaskade aktiviert werden.

Als direktes Target von VPA wurde 2001 von PHIEL et al. die Enzymklasse der Histondeacetylasen (HDACs) beschrieben und im selben Jahr von GÖTTLICHER et al. bestätigt. PHIEL et al. konnten zeigen, dass VPA die HDAC-Isoform 1 mit einer  $IC_{50}$ (HDAC1) von 400  $\mu$ mol/L inhibierte und in Neuro2A-Zellen eine Hyperacetylierung von Kernhiston H<sub>4</sub> auslöste. Diese Effekte wurden von zwei nicht teratogenen VPA-Derivaten (Valpromid und 2-Methyl-2-Propyl-Pentensäure) nicht gezeigt. Weiterhin konnte der klassische HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) in einem Froschtiermodell (*Xenopus laevis*) ähnliche teratogene Effekte auslösen wie VPA. Die teratogene Wirkung von Trichostatin A ist jedoch derzeit umstritten. Während SVENSSON et al. bei explantierten Embryonen von CZECH II - NMRI Hybridtieren ebenfalls teratogene Effekte von TSA beobachteten (Neuralrohrdefekte bei  $c = 100$  nmol/L, SVENSSON et al. 1998), konnten NERVI et al. bei trächtigen CD1 Mäusen nach Behandlung mit TSA weder maternal-toxische Effekte noch embryonale Fehlbildungen bei einer TSA Dosierung von  $2 \times 15$   $\mu$ g pro Maus nachweisen (Absolutgabe pro Tier entspricht einer Dosis von ca. 1,5 nmol/kg, NERVI et al. 2001).

GÖTTLICHER et al. konnten mittels einer Verdrängung von radio-markierter VPA durch Trichostatin A eine direkte Bindung von VPA an HDACs demonstrieren (GÖTTLICHER et al. 2001) und eine unterschiedliche Inhibierungspotenz von VPA an einzelnen Isoformen der HDACs zeigen. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen teratogener Wirkung von VPA-Derivaten und HDAC-Inhibierung konnte mit den Enantiomerenpaaren von

---

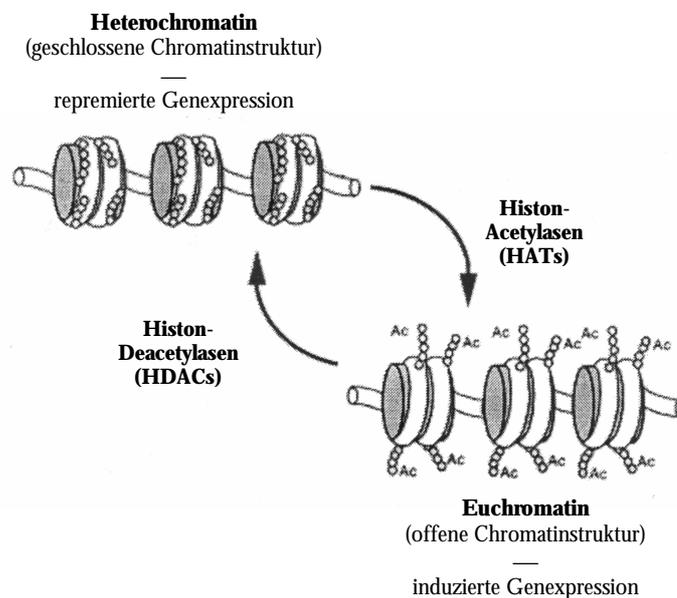
2-Ethyl-Hexansäure (EHXA) und 2-Propyl-4-Pentinsäure demonstriert werden. Eine HDAC-Inhibierung zeigte nur das jeweilige Enantiomer mit höherer teratogener Potenz.

Die differenzierte Analyse der Inhibierungspotenz von VPA an unterschiedlichen HDAC-Isoformen zeigte, dass VPA die Isoformen 6 und 10 in ihrer Funktion nicht beeinflusste, während HDAC 1 und HDAC 2 mit einer  $IC_{50}$  von 0,5 – 1 mmol/L inhibiert wurden (GURVICH et al. 2004). VPA ist daher einerseits ein deutlich schwächerer Inhibitor als z.B. Trichostatin A ( $IC_{50}(\text{HDAC}) = 50 \text{ nmol/L}$ ), andererseits aber bietet die differenzierte Inhibierung einzelner HDAC-Isoformen neue Ansätze zum Verständnis des Wirkmechanismus, der durch die HDAC-Inhibition vermittelt wird.

Aktuell konnte gezeigt werden, dass VPA nicht nur ein Inhibitor der Enzymfunktion der HDACs ist, sondern auch selektiv einen Ubiquitin-gesteuerten proteosomalen Abbau von HDAC 2 verursacht, während die Isoform 3 hiervon unberührt bleibt (KRÄMER et al. 2003). Eine Verringerung des Proteingehaltes an HDAC selbst konnte auch durch den HDAC-Inhibitor Suberoylanilinhydroxamsäure (SAHA) anhand der HDAC Isoform 3 gezeigt werden (XU et al 2005). HDAC-Inhibitoren und hier speziell VPA scheinen daher einerseits selektiv in die enzymatische Funktion von bereits vorhandenen HDACs einzugreifen, andererseits aber auch regulierende Funktion auf den Proteingehalt von zellulären HDACs zu nehmen. Die Bedeutung und Funktion von Histondeacetylasen sowie die Auswirkung einer Funktionsbeeinflussung durch HDAC-Inhibitoren (HDAIs) wird daher in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

## 2.7 Die Struktur des Chromatins und Einflüsse auf die Genexpression

Die Gesamtlänge zellulärer DNA übersteigt bei prokariotischen und eukariotischen Zellen den Durchmesser der jeweiligen Zelle um ein Vielfaches. Möglich wird dies durch die spezielle Anordnung der DNA im Zellkern. Die Erbinformation ist in Windungen um oktamere Proteinkomplexe angeordnet (Abbildung 2-6), die aus jeweils zwei Proteinen der Kernhistone H4, H3, H2A und H2B aufgebaut sind. Diese Struktur der DNA um ein Oktamer wird als Proteosom, die Summe aller Proteosome als Chromatin-Struktur oder Chromatin bezeichnet. Während alle bekannten Kernhistone zwischen den Spezies und Zelltypen stark konserviert sind, zeigen sich insbesondere die Histonproteine H3 und H4 als die am höchsten konservierten Proteine der Evolution (STREYER 1999).



**Abbildung 2-6:** Schematische Darstellung von Proteosomen und eines Ausschnitts des Chromatins in Abhängigkeit des Acetylierungsgrades als eine Möglichkeit der post-translationalen Modifikation von Histonen (modifiziert nach YOSHIDA et al. 2001)

Die Dichte des Chromatins, respektive Packungsdichte der DNA um die Kernhistone, ist direkt mit der Fähigkeit der Zelle zur Genexpression gekoppelt, da Transkriptionsfaktoren nur mit einer aufgelockerten bzw. aufgeweiteten Chromatin-Struktur, dem Euchromatin, interagieren können. In diesem Zusammenhang sind post-translationalen Modifikationen der Kernhistone, speziell ihrer flexiblen N-terminalen Enden, wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung von Bedeutung.

Von den möglichen Histonmodifikationen sind insbesondere die Auswirkungen der Acetylierung und Deacetylierung der Kernhistone intensiv untersucht worden. Ein hoher Acetylierungsgrad

---

von Lysingruppen der Kernhistone sorgt für eine Verringerung der positiven Ladungsdichte der Kernhistone; dies führt zu einer Verringerung der Anziehungskräfte zwischen Histon und DNA sowie zu einer offeneren Chromatin-Struktur. Das Euchromatin korreliert mit einer gesteigerten Transkription und Genexpression, während umgekehrt eine gesteigerte Deacetylierung zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an den Histonen und zu einer stärkeren Wechselwirkung mit der DNA führt. Dies verursacht eine dichtere Chromatin-Struktur (Heterochromatin) und damit eine Repression der Genexpression (Gene-Silencing). Exogene Substanzen, die die Dichte der Chromatinstruktur dergestalt verändern können, haben daher einen großen Einfluss auf die Genexpression der Zelle und schlussendlich auf den Proteinstatus und die Funktionalität des Zellverbandes.

Die Modifikation der Kernhistone durch Acetylierung und Deacetylierung wird in pro- und eukaryotischen Zellen von Proteinen der Klassen der Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetylasen (HATs) durchgeführt. Der Grad an Acetylierung wird durch eine empfindliche Gleichgewichtsreaktion dieser beiden Enzymklassen erreicht. Zusätzlich entsteht ein enormer Grad an Komplexität, da in einem einzelnen Nukleosom (Oktamer von Kernhistonen) durchschnittlich mehr als 25 Acetylierungsstellen vorhanden sind und gleichzeitig die Kernhistone H3, H4, H2A und H2B in 32 theoretischen Kombinationen ein Oktamer bilden können. In Kombination mit weiteren chemischen Modifikationen der Kernhistone wie der Phosphorylierung und Methylierung spricht man vom Histon-Code.

Die Modifizierungsreaktionen der Kernhistone sind nicht zufallsbedingt, sondern vielmehr spezifisch ausgelöst und können durch die Codierung gezielt die Transkription und Expression einzelner Gene induzieren oder reprimieren. Das derzeit akzeptierte Modell des Histon-Codes geht davon aus, dass die lysinreichen N-terminalen Enden der Kernhistone inklusive ihrer Modifikationen die Erkennungsstellen (recognition sites) von Transkriptionsfaktoren sind, die die Expression einzelner Gene aktivieren oder deaktivieren können (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Diese Theorie wird unterstützt durch die Beobachtung, dass HDACs und HATs oftmals als co-Aktivatoren oder co-Repressoren angesehen werden und in logischer Konsequenz auch in entsprechenden Proteinkomplexen zusammen mit Transkriptionsfaktoren aktiv sind (ALBERTS et al. 2002).

## 2.8 Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDACs) sind, wie im obigen Kapitel beschrieben, am Zellzyklus, der Proliferation und Differenzierung einer Zelle entscheidend beteiligt. Natürlich vorkommende Fehlfunktionen im Sinne einer von der Norm abweichenden Acetylierungs- und Deacetylierungsdichte der Kernhistone werden mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert, insbesondere mit Tumorerkrankungen (Tabelle 2-2).

**Tabelle 2-2:** Fehlfunktionen im Bereich des Acetylierungsgleichgewichtes der Kernhistone und hiermit assoziierte Krankheitsbilder

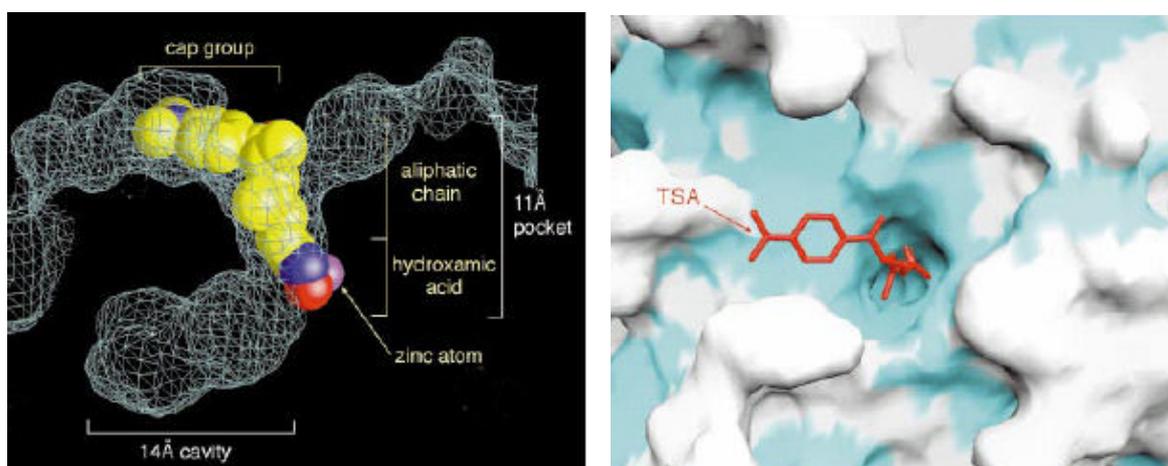
Beeinflusste Komponente des HAT – HDAC Gleichgewichts	Assoziiertes Erkrankungsbild
HAT-Verlust	Glioblastom (MARKS et al. 2001/a)
HAT-Inaktivierung	myelodisplastisches Syndrom (ROWLEY et al. 1997) Rubinstein-Taybi-Syndrom (MURATA et al. 2001) verschiedene Tumore (DANG 1999)
HDAC-Rekrutierung	Non-Hodgkin-Lymphom (HUYNH AND BARSWELL 1998) akute myeloische Leukämie (WANG et al. 1998)

Die Klasse der HDAC-Enzyme umfasst mehr als 25 Isoformen, die auf Grund ihrer Sequenzhomologie zu Hefeenzymen derzeit in drei Unterklassen eingeteilt werden (DERUIJTER 2003). Klasse I HDACs (Isoformen 1, 2, 3 und 8) waren die ersten identifizierten HDACs und sind in ihrer Sequenz dem Hefeenzym RPD 3 ähnlich. Mit Ausnahme von HDAC 3, welches auch im Zellzytosol festgestellt wurde (DERUIJTER et al. 2003), sind die HDACs der Klasse I bisher ausschließlich im Zellkern lokalisiert worden (GRAY AND EKSTROM 2001). Zu dieser Klasse wird in der Regel auch die Isoform 11 gezählt, obwohl die Sequenzhomologie nicht sehr ausgeprägt ist (GAO et al. 2002). Die HDACs der Klasse I beeinflussen überwiegend Gene, die einen Einfluss auf den Zellzyklus nehmen (DANGOND et al. 2001), wobei das Expressionsmuster von HDACs dieser Klasse zwischen verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist.

Die Klasse II der HDACs beinhaltet die Isoformen 4, 5, 6, 7, 9 und 10; sie ähneln im Sequenzaufbau dem Hefeenzym HDA 1 (FISCHLE et al. 1999) und wurden sowohl im Zellkern als auch im Zytosol lokalisiert (GRAY AND EKSTROM 2001). In bisherigen Untersuchungen zeigten sie ein sehr Zelltypen-spezifisches Expressionsmuster mit insgesamt hohen Expressionsraten in Herz-, Gehirn- und Muskelgewebszellen (GROZINGER et al. 1999). Diese Enzymklasse beeinflusst insbesondere Gene, die mit dem Differenzierungsgrad von Zellen assoziiert sind, aber auch Gene, die für die Proliferation der Zellen verantwortlich sind (WADE

2001). Nach ZHOU et al. wird die Translokation von HDAC 4 vom Zytosol zum Zellkern durch MAP-Kinasen (MAPKs) vermittelt wird (ZHOU et al. 2000). Dies ist möglicherweise ein Mechanismus, der auch für die Translokation anderer HDACs gelten könnte.

HDACs können auf Grund des Zinkatoms im Zentrum des Enzyms als Zinkmetalloproteinasen klassifiziert werden. Dieses befindet sich sowohl bei bakteriellen HDACs als auch bei dem humanen HDAC 8 am Ende eines zylindrischen Bindungskanals (Abbildung 2-7, FINNIN et al. 1999, SOMOZA et al. 2004, VANNINI et al. 2004) und katalysiert die Deacetylierung von natürlichen Substraten wie der Lysingruppen der N-terminalen Enden der Kernhistone.



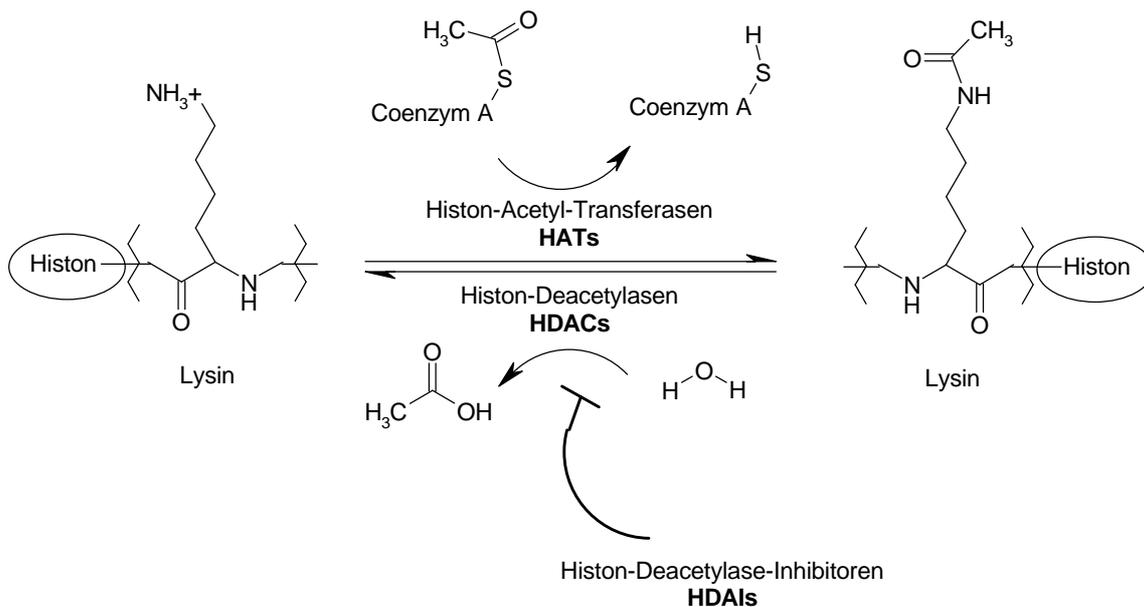
**Abbildung 2-7:** Kristallstrukturanalyse und Energiehyperflächen eines bakteriellen HDAC Homologen mit dem exogenen Inhibitor Trichostatin A in der Bindungstasche (FINNIN et al. 1999)

HDACs der Klasse I und II können ihre Funktion der Genrepression sowohl als Bestandteile von homo- und heterodimeren Komplexen als auch von Co-Repressor-Proteinkomplexen wie Sin3a und NCoR ausüben (GROZINGER et al. 1999, LI et al. 2000). Sie können aber auch allein oder in Proteinkomplexen den Acetylungsgrad anderer Proteine beeinflussen, wie dies beispielhaft für das Protein p53 gezeigt wurde (ITO et al. 2002). Der Acetylungsgrad von p53 beeinflusst die Stabilität des Enzyms gegen den Ubiquitin-induzierten proteosomalen Abbau. HDACs haben daher nicht nur einen Einfluss auf die Struktur des Chromatins, sondern möglicherweise auch auf Funktion und Stabilität anderer Enzyme.

Klasse III HDACs sind die bisher am wenigsten erforschten Histondeacetylasen. Auf Grund der Sequenzhomologie zum Hefeenzym Sir2 werden sie als Sirtuine bezeichnet und sind als einzige der bisher bekannten HDACs mit dem Stoffwechsel und Energiehaushalt der Zelle verbunden (LANDRY et al. 2000), da ihre Aktivität von der gleichzeitigen Umsetzung von Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) abhängig ist. Die genaue Rolle und Funktion der Sirtuine in normalen oder entarteten Zellen ist neben der Repression von Genen derzeit unbekannt (GROZINGER AND SCHREIBER 2002). Sirtuine werden von klassischen Inhibitoren der Klasse I und II HDACs, z.B. Trichostatin A, in ihrer Funktion nicht beeinflusst (FRYE 2000, LANDRY et al. 2000).

## 2.9 Inhibitoren der Histondeacetylasen

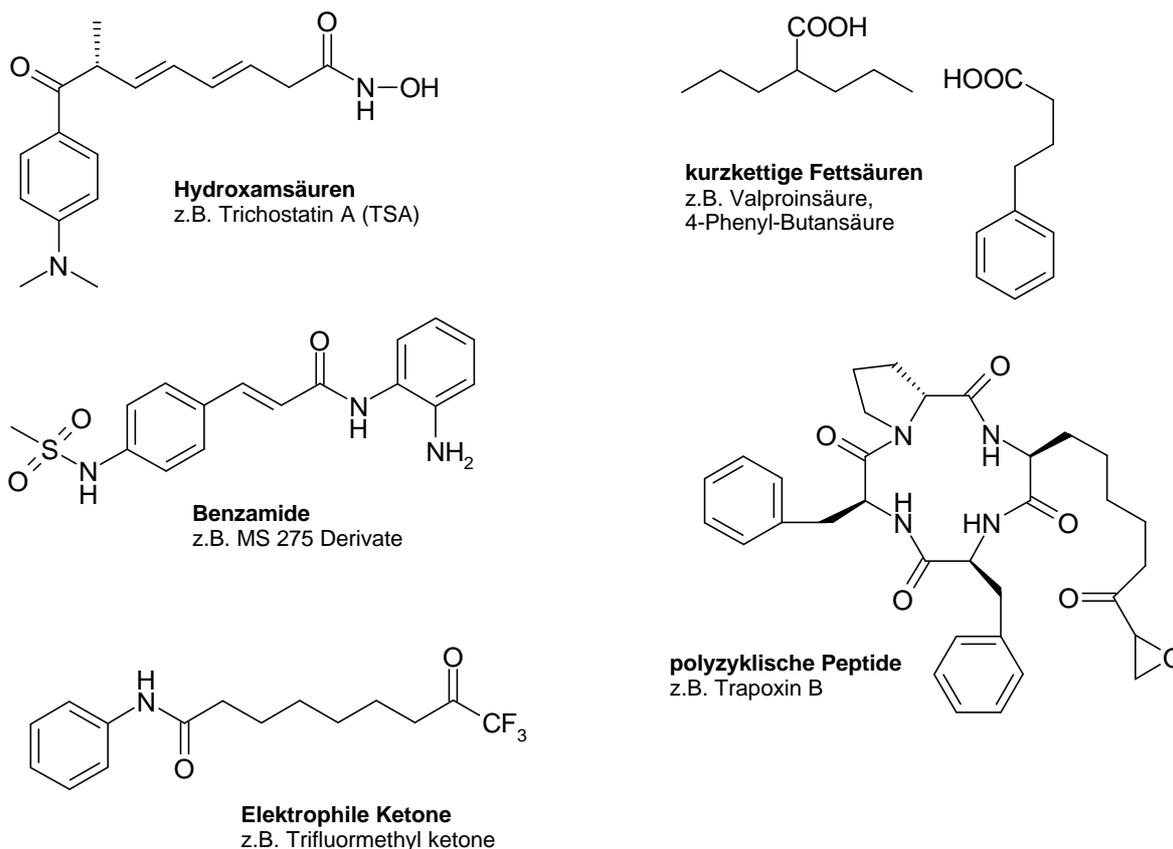
Die Modulation der Chromatin-Struktur, ausgelöst durch die post-translationale Modifikation der Acetylierung von nukleosomalen Histonen, ist einer der elementarsten Mechanismen, die in der Genregulierung beteiligt sind. Das Gleichgewicht des Acetylierungsgrades der Histone normal funktionaler Zellen wird durch die zwei antagonistischen Enzymklassen von HATs und HDACs in einem sensiblen Gleichgewicht determiniert (Abbildung 2-8).



**Abbildung 2-8:** Schematisierte Gleichgewichtsreaktion der Acetylierung- und Deacetylierung von Lysinresten der Kernhistone durch HATs und HDACs

Eine klinische Behandlung der mit einer Störung im Acetylierungsgrad von Kernhistonen assoziierten Erkrankungen, insbesondere von Tumorerkrankungen, kann durch synthetische und natürliche Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAIs) erfolgen (vergleiche Abbildung 2-9). Die Verwendung von HDAIs im Sinne einer pharmakologischen Differenzierungstherapie bei malignen Tumorerkrankungen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (MARKS et al. 2001/b, VIGUSHIN AND COOMBES 2002) und zeigt, dass eine Tumorregression bei geringen Nebenwirkungen erreicht werden kann (KIM et al. 2001). Identifikation und Erforschung neuer synthetischer und natürlicher HDAIs erfolgte bis dato fast ausschließlich im Bereich der Tumorforschung.

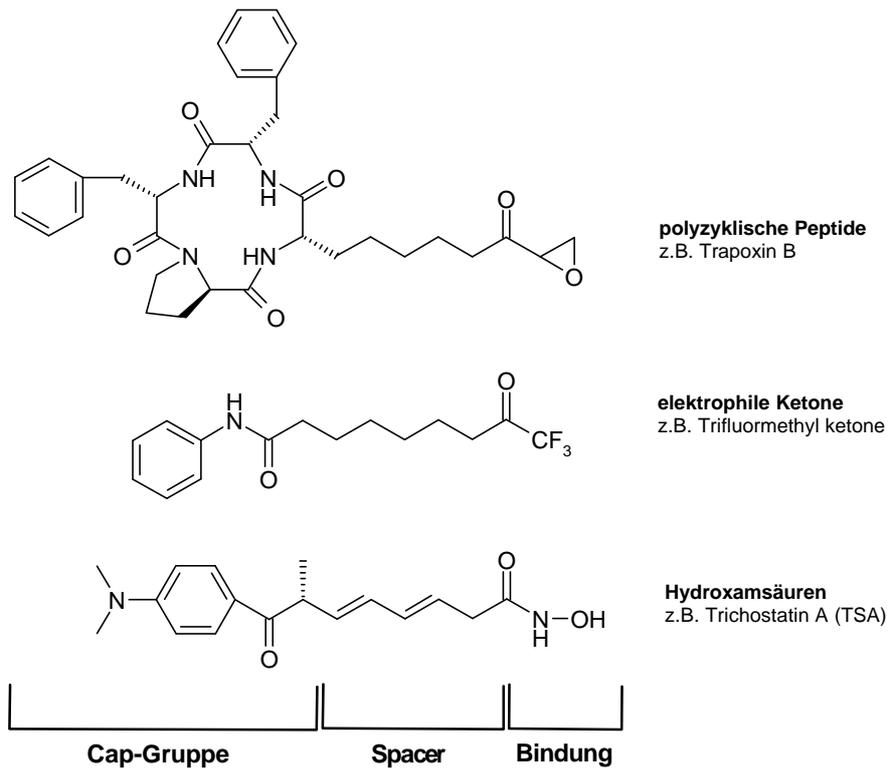
Auffällig ist die große strukturelle Vielfalt der bisher entdeckten Inhibitoren und die beobachtete große Spannweite in der Potenz der Substrate zur Inhibition der HDACs, die einen Konzentrationsbereich von nmol/L bis mmol/L abdeckt (REMISZEWSKI 2002).



**Abbildung 2-9:** Beispielhafte Gruppen von bisher bekannten HDACs der Klasse I und II (CURTIN AND GLASER 2003, REMISZEWSKI 2002)

Auffällig ist weiterhin, dass Klasse I- und II-HDACs in der Regel von denselben chemischen Verbindungen inhibiert werden, wenn auch die einzelnen Isoformen in durchaus unterschiedlicher Potenz, während die HDACs der Klasse III (Sirtuine) bisher eine vollständig andere Strukturabhängigkeit zeigen.

Die große strukturelle Variabilität der bisher bekannten HDAC-Inhibitoren gibt nur wenig Anhaltspunkte für das strukturelle Grundgerüst (Abbildung 2-10). Den Inhibitoren gemeinsam ist jedoch eine aktive Bindungsfunktion (Komplexierungsfunktion), eine scheinbar passive Verbindungsgruppe mit einer Länge von etwa sechs Kohlenstoffatomen (Spacer oder Linker), sowie eine größere hydrophobe Endgruppe, die eine allgemeine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Protein eingeht (Cap-Gruppe, MARKS et al. 2001/b). Gut untersucht ist in diesem Sinne der äußerst potente HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA), dessen Bindung entlang einer zylindrischen Bindungstasche verläuft, an deren Ende die Hydroxamsäurefunktion der TSA das katalytische Zinkatom im Zentrum koordiniert und so die natürliche Funktion der Deacetylierung von Lysingruppen der Kernhistone unterbindet (Kapitel 2.8 Abbildung 2-7, FINNIN et al. 1999, SOMOZA et al. 2004, VANNINI et al. 2004).



**Abbildung 2-10:** Gemeinsame Strukturmerkmale bisheriger HDACIs (modifiziert nach MARKS et al. 2001/b)

Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von TSA-Derivaten lieferten erste Hinweise auf die benötigten Molekülmerkmale zur Inhibition der HDAC-Aktivität. Bei dieser Substanzgruppe ist die Hydroxamsäurefunktion für eine Aktivität zwingend erforderlich. Trichostatin als freie Säure zeigte keine Aktivität (YOSHIDA et al. 1990, JUNG et al. 1999), während die Spacer-Gruppe eine größere strukturelle Vielfalt erlaubte und die hydrophobe Benzylgruppe zwar eine deutliche Steigerung der Aktivität bewirkte, in ihrem Aufbau aber variiert werden konnte. Die drei strukturellen Voraussetzungen haben zu einer Reihe von synthetischen HDAC-Inhibitoren geführt und sind derzeit als strukturelle Kriterien für eine HDAC-Inhibition akzeptiert, gleichwohl eine Reihe anderer HDAC-Inhibitoren diese strukturellen Voraussetzungen nicht erfüllen (z. B. kurzkettige Fettsäuren wie VPA). Es sind bisher nur Kristallstrukturuntersuchungen von TSA und vergleichbarer Substrate bekannt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass HDACIs unterschiedliche Bindungsmechanismen an HDACs aufweisen.

Neben der unterschiedlichen Bindungspotenz der strukturell verschiedenen HDACIs konnte auch eine strukturabhängige Wirkung an einzelnen HDAC-Isoformen festgestellt werden. Während Trichostatin A Klasse I- und II-HDACs mit etwa der gleichen Konzentration inhibiert ( $IC_{50} = 5-50$  nM, jedoch keinerlei Wirkung an Sirtuinen), zeigte der Inhibitor Trapoxin B eine um den Faktor 3000 unterschiedliche  $IC_{50}$  von Isoform 1 im Vergleich zu Isoform 6. Ein weiterer Inhibitor namens CHAP31 zeigte eine abgestufte Wirkung um den Faktor 30 (YOSHIDA et al. 2001).

Auch für VPA konnte ein ähnlich differenziertes Verhalten gezeigt werden (Kapitel 2.6), sodass es möglich erscheint, durch strukturelle Veränderung der Substrate die Inhibition einzelner HDAC-Isoformen zu induzieren. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur selektiven Beeinflussung des Gleichgewichts aus Acetylierung und Deacetylierung der Kernhistone und somit möglicherweise einen selektiven Einfluss auf Expression bzw. Repression spezieller Zielgene.



### 3 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Valproinsäure (VPA) ist eine seit Jahrzehnten zur Behandlung epileptischer Anfälle klinisch eingesetzte kurz- und verzweigt-kettige Fettsäure. Die antikonvulsiv wirksame VPA wird weiterhin in der Behandlung bipolarer Erkrankungen wie Depressionen und schwerer Psychosen sowie in der Prophylaxe von Migräneanfällen erfolgreich eingesetzt. Aktuell befindet sich VPA in klinischen Studien zur Nutzung als Chemotherapeutikum, was ein außergewöhnlich breites Wirkspektrum dieser vergleichsweise einfachen Fettsäure demonstriert. VPA ist allgemein gut verträglich, zeigt jedoch zwei seltene, lebensbedrohliche Nebenwirkungen: die akute Hepatotoxizität und die fruchtschädigende Wirkung (Teratogenität). Bisherige Untersuchungen zu strukturellen Voraussetzungen der VPA-induzierten Wirkungen und Nebenwirkungen zeigten, dass die anti-convulsive Wirkung wenig strukturspezifisch ist und sich deutlich von der sehr spezifischen Struktur-Teratogenitäts-Beziehung unterscheidet. Trotz der langjährigen klinischen Verwendung sind VPA-relevante Wirkmechanismen und Zielstrukturen auf molekularer Ebene noch immer weitgehend unbekannt; dies gilt insbesondere für die molekulare Teratogenität.

Aktuell konnte erstmals ein direktes molekulares Target von VPA beschreiben werden (PHIEL et al. 2001 und GÖTTLICHER et al. 2001). Die Proteinklasse der Histondeacetylasen (HDACs) wurde in Zellkulturversuchen und enzymatischen Assays von VPA inhibiert und die direkte Bindung durch Verdrängung radio-markierter VPA mit Hilfe eines bekannten HDAC-Inhibitors demonstriert. Die Enzymklasse der HDACs ist funktionell mit dem Chromatin-Remodeling des Zellkerns gekoppelt und besitzt eine elementare Bedeutung für die Expression und Repression von Genen. Ihre Inhibierung kann daher zu zellulären Effekten wie Apoptose, Proliferationsinhibierung oder Differenzierung führen, die die Grundlage für anti-karzinogene, aber auch teratogene Effekte sein könnten.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese formuliert, dass die beim Menschen und im Versuchstier nach Behandlung mit VPA beobachteten teratogenen Effekte durch Inhibition von HDACs induziert werden und diese somit den Ausgangspunkt der molekularen Teratogenität der VPA darstellen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, war es das Ziel dieser Arbeit, Struktur-Wirkungs-Beziehungen von VPA an Histondeacetylasen aufzuzeigen und quantitativ mit den Wirkungen bzw. Nebenwirkungen der VPA zu korrelieren. Zur Untersuchung der Arbeitshypothese und Verfolgung der gesetzten Ziele wurden folgende Aufgabenbereiche definiert:

- A) Auswahl eines Testsets von ca. 30 Valproinsäure-Derivaten aus einem bestehenden Pool von Strukturanaloga unter Berücksichtigung bereits bekannter Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen und einer möglichst hohen strukturellen Diversifizierung. Zur sinnvollen Ergänzung des Substanzpools sollten weitere VPA-Derivate organisch-präparativ synthetisiert und im etablierten NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell (NAU et al. 1981) auf ihre teratogene Potenz hin untersucht werden.

- B) Qualitative Untersuchung der HDAC-Inhibition der Strukturanaloga des Testsets in einem F9-Mauszellsystem mittels Western-Blot-Analyse von hyperacetyliertem Kernhiston H4 als Marker der inhibierten HDAC-Enzymfunktion. Zusätzlich sollte der Behandlungseinfluss auf den Gehalt ausgewählter Histondeacetylaseproteine selbst bestimmt werden.
- C) Entwicklung eines semi-quantitativen Graduierungssystems der teratogenen Potenz von VPA-Derivaten auf Basis bereits veröffentlichter Untersuchungen im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell. Hier war insbesondere die uneinheitliche Datenlage zu berücksichtigen (Unterschiede in Dosierung, Applikation, Lösemittel etc.).
- D) Bestimmung des quantitativen Inhibitionspotentials der VPA-Derivate des Testsets in Form der  $IC_{50}$ (HDAC) mittels eines humanen HDAC-Enzym-Assays und Korrelation der Werte mit der zuvor bestimmten teratogenen Potenz der Verbindungen.
- E) Metabolische Untersuchung ausgewählter Derivate im Mausmodell mittels massenselektiver, analytischer Bestimmungsmethoden zur Ermittlung der intrinsischen Aktivität der getesteten VPA-Derivate in Unterscheidung zu einer möglichen metabolischen Aktivierung in vivo.
- F) Untersuchung des pharmakokinetischen Profils ausgewählter VPA-Derivate im Mausmodell mittels quantitativer Analysemethoden nach stereoselektiver Derivatisierung, insbesondere von Derivaten mit hoher Aktivität an HDAC-Enzymen mit der Fragestellung der möglichen Verwendung solcher Derivate in der Krebstherapie.

Bei Bestätigung der Ausgangshypothese durch eine Korrelation der Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen der VPA mit den strukturellen Voraussetzungen zur HDAC-Inhibition sollte diese um zwei weitere Aspekte erweitert werden. Erstens sollte die Frage untersucht werden, ob HDACs eine allgemeine molekulare Zielstruktur zur Auslösung teratogener Effekte darstellen oder auf VPA beschränkt bleiben. Zweitens sollten Lebensmittelinhaltsstoffe, insbesondere längerkettige Fettsäuren, auf HDAC-Inhibition untersucht werden. Zur Verfolgung dieser erweiterten Fragestellung wurde der zusätzliche Aufgabenbereich definiert:

- G) Screening auf HDAC-Inhibition von sowohl Retinsäure, Thalidomid und ausgewählter Derivate dieser bekannten Teratogene als auch von Lebensmittelinhaltsstoffen, insbesondere von konjugierten Linolsäuren und Liponsäuren als Modellsubstanzen für längerkettige Fettsäuren mit Strukturbezug zu VPA.

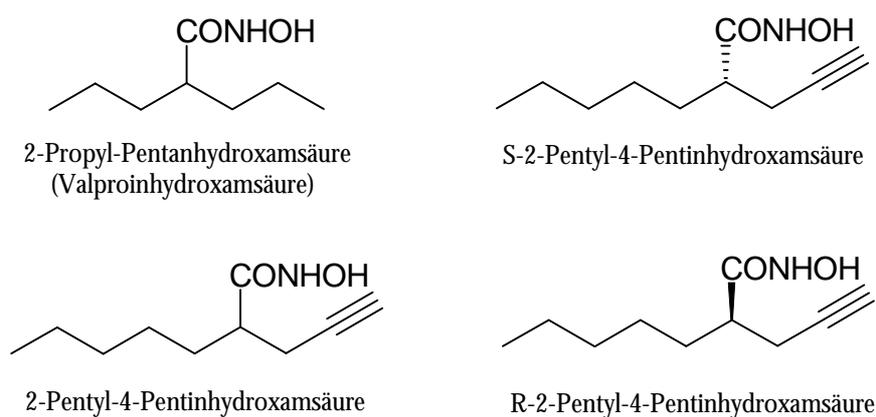
HDACs als allgemeine Targets teratogener Substanzen könnten möglicherweise die Grundlage zur Entwicklung einer neuen Ersatz- und Ergänzungsmethode bei Tierversuchen darstellen, während Lebensmittelinhaltsstoffe mit HDAC-Inhibitionspotential zu neuen Fragen bezüglich möglicher anti-karzinogener Wirkeigenschaften und teratogener Nebeneffekte führen würden.

## 4 Darstellung der Ergebnisse

### 4.1 Synthese und reproduktionstoxische Effekte enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure

Die bisher bekannten Hydroxamsäure-Derivate der VPA und analoger Verbindungen zeigten mit Ausnahme von ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure keine teratogenen Effekte im Mausmodell (LEVI et al. 1997, VOLLAND 2002). Die Untersuchungen anderer aliphatischer Hydroxamsäuren demonstrierte, dass ausschließlich kurz-kettige Verbindungen wie Formhydroxamsäure und Aceto-hydroxamsäure in vergleichsweise hohen Dosen im Rattenmodell (6,5 mmol/kg bzw. 1,3 mmol/kg) einen teratogenen Effekt induzierten. Langkettige Hydroxamsäuren wiesen bei diesen Untersuchungen kein teratogenes Potenzial auf (VONKREYBIG et al. 1968).

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob bei ( $\pm$ )-rac-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure ein differenzierter teratogener Effekt in Abhängigkeit von der Stereochemie vorliegt und ob pharmakokinetische und metabolische Effekte für die beobachtete Teratogenität dieser Verbindung verantwortlich gemacht werden können, wurden beide Stereoisomere in enantiomerenreiner Form dargestellt. Die organisch-präparative Synthese geschah auch im Sinne einer Vervollständigung des Pools an Strukturvarianten der VPA, der in den weiteren Struktur-Aktivitätsuntersuchungen eingesetzt werden sollte (Kapitel 4.2). Neben den zwei hier erstmals dargestellten enantiomeren Hydroxamsäurederivaten mit chiralem Zentrum an C2 wurde auch die Synthese des Racemates von 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure sowie von Valproinhydroxamsäure selbst nachvollzogen (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1:** Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Hydroxamsäurederivate mit den zwei erstmals dargestellten Stereoisomeren R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure

Die beiden Stereoisomere der ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure konnten ausgehend von den enantiomerenreinen Karbonsäuren (GRAVEMANN 2001) durch Überführung in die Säurechloride und Umsetzung mit Hydroxylaminhydrochlorid mit Ausbeuten von 80 % im Gramm-Maßstab erfolgreich dargestellt werden (Arbeitsvorschrift nach LEVI et al. 1997). Die chemische Reinheit aller vier dargestellten Hydroxamsäurederivate lag bei über 99 %, die optische Reinheit der hier erstmals dargestellten Enantiomere bei über 99 % (98 %ee, enantiomeric excess).

Die Untersuchung reproduktionstoxischer Effekte der beiden neu synthetisierten Hydroxamsäurederivate erfolgte im etablierten NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell nach NAU et al. 1981. Die Substanzen wurden bei einem pH Wert von  $7,4 \pm 0,2$  sowohl als wässrige Lösung als auch als 25 %ige Cremophor EL Lösung appliziert und untersucht, da die Löslichkeit von R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in Wasser bereits bei 0,08 mol/L erreicht wurde.

Es zeigte sich, dass ausschließlich das S-Enantiomer der chiralen Testsubstanz mit 2-5 % eine von den Kontrollgruppen abweichende Exenzephalierate der Föten aufwies, während das R-Enantiomer im getesteten Dosisbereich von 0,80 bis 1,50 mmol/kg keine Fehlbildungen auslöste. Dies korreliert mit einer ansteigenden Embryoletalität des S-Enantiomer mit signifikanter Erhöhung auf 19 % bei einer Dosisgabe von 0,80 mmol/kg im Vergleich zur Kontrollgruppe II. Die embryonale Toxizität wirkt sich jedoch nicht auf die durchschnittlichen Fetengewichte bei Dosisgaben von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure aus. Das R-Enantiomer zeigte keine erhöhten Lethalitätsraten der Föten an, das Fötengewicht weicht statistisch signifikant bei einer Dosisgabe von 0,80 mmol/kg sogar nach oben ab, was die im Vergleich zum S-Enantiomer geringere embryonale Toxizität demonstriert (Tabelle 4-1).

Dosisgaben von 1,50 mmol/kg beider Enantiomere verursachte bei den Muttertieren eine starke Sedierung von teilweise über 60 min. Oberhalb einer Dosis von 1,50 mmol/kg traten erste toxische Wirkungen wie anhaltende Krämpfe auf, die einer weiteren Dosiserhöhung entgegenstehen. Zudem ist die Löslichkeit von R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure auch bei Verwendung von Cremophor EL 25 % als Lösemittel mit einem pH-Wert von  $7,4 \pm 0,2$  bei 0,18 bis 0,20 mol/L erreicht.

Interessant ist die Beobachtung, dass eine Verdoppelung der Dosis von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure bei Veränderung des Lösemittels von Wasser zu CremEL 25% praktisch nur eine geringe Steigerung der Exenzephalierate bewirkt, obwohl aus bisherigen Arbeiten zur teratogenen Wirkung von VPA Derivaten sehr steile Dosis-Wirkungsbeziehung bekannt sind (z.B. NAU 1985 und BOJIC et al. 1996). Dieser Effekt kann durch eine abschwächende Wirkung des Cremophor EL verursacht sein, wie er bereits zuvor bei einem direkten Vergleich der teratogenen Wirkung von VPA nach subkutaner Dosisgabe von wässrigen Lösungen im Vergleich zu Lösungen in Cremophor EL beobachtet werden konnte (VOLLAND 2002).

**Tabelle 4-1:** Reproduktionstoxische Untersuchung zweier enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure (R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure).

Substanzname	Dosis (mmol/kg)	Fetengewichte $\pm$ SD (g)	Muttertiere (N)	Exzengphallexwürfe (N)	Lebende Feten (N)	Feten mit Ex. (N)	Embryolethalität (%)	Exzengphallex (%)
S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	1,50 <sup>a</sup>	1,12 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	6	1	66	3	21 <sup>c</sup>	5
	1,00 <sup>a</sup>	1,16 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	5	0	69	0	9 <sup>c</sup>	0
	0,80 <sup>b</sup>	1,19 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	5	1	54	1	19 <sup>f</sup>	2
R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	1,50 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	5	0	53	0	11 <sup>e</sup>	0
	1,00 <sup>a</sup>	1,18 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	3	0	44	0	3 <sup>c</sup>	0
	0,80 <sup>b</sup>	<b>1,23 <math>\pm</math> 0,12<sup>d</sup></b>	6	0	80	0	3 <sup>c</sup>	0
Kontrolle I	<sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,14	13	0	159	0	13	0
Kontrolle II (NaCl, 8,0 g/l)	<sup>b</sup>	1,15 $\pm$ 1,13	6	0	77	0	5	0

<sup>a</sup>: Substanz in CremEL 25 % (v/v), neutralisiert  
<sup>b</sup>: Substanz in Wasser, neutralisiert  
<sup>c</sup>: nicht normal verteilte Daten (Kolmogorov-Smirnov), nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (ANOVA on Ranks, Dunns Method)  
<sup>d</sup>: nicht normal verteilte Daten (Kolmogorov-Smirnov), signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit  $p < 0.05$  (ANOVA on Ranks, Dunns Method)  
<sup>e</sup>: nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (z-Test)  
<sup>f</sup>: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $p < 0.05$ , z-Test)



## 4.2 Auswahl geeigneter Valproinsäurederivate und Entwicklung von Entscheidungskriterien zur semi-quantitativen Graduierung des teratogenen Potenzials

Die Auswahl geeigneter VPA-Derivate aus einem vorhandenen Pool von Strukturanaloga erfolgte im Hinblick auf eine möglichst hohe Diversifizierung der Strukturvarianten unter gleichzeitiger Einbeziehung bereits bekannter struktureller Abhängigkeiten der teratogenen Wirkung der VPA. Gleichzeitig wurden die ausgewählten VPA-Derivate in sechs Gruppen zusammengefasst, die den folgenden Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen Rechnung trugen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Karbonsäurefunktion der VPA als auch das Wasserstoff-Atom an C2 ( $\alpha$ -Wasserstoff) für die teratogene Wirkung von VPA-Derivaten essenziell ist. Die Kettenverlängerungen einer Seitenkette und die Einführung einer Dreifachbindung in C4-C5 führten zu einer gesteigerten teratogenen Wirkung, während die Verkürzung einer Seitenkette, die Verlängerung beider Seitenketten oder eine weitere Verzweigung an C4 die teratogene Wirkung dieser VPA-Derivate verringerte. Besonders interessant waren Untersuchungen zur Stereoselektivität der teratogenen Wirkung. Befand sich ein chirales Zentrum an C2, so wurde eine ausgeprägte Differenzierung zwischen den Enantiomeren der Verbindung festgestellt, was erneut die besondere Bedeutung des  $\alpha$ -Wasserstoffatoms demonstrierte. Die Substanzgruppe der in Position C3 verzweigten VPA-Derivate ( $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate) zeigte eine im Vergleich zu  $\alpha$ -verzweigten VPA-Derivaten verringerte teratogene Wirkung im Mausmodell (NAU AND LÖSCHER 1986, HAUCK 1992, BOJIC et al. 1996, BOJIC et al. 1998, RADATZ et al. 1998, GRAVEMANN 2002, VOLLAND 2002).

Unter Berücksichtigung dieser strukturellen Aspekte wurden in dieser Arbeit folgende sechs Gruppen von VPA-Derivaten definiert:

- |          |   |
|----------|---|
| Gruppe 1 | kettenverlängerte, gesättigte und $\alpha$ -verzweigte Derivate |
| Gruppe 2 | in Position 4 dreifach-ungesättigte Analoga                     |
| Gruppe 3 | $\alpha$ -Wasserstoff substituierte Verbindungen                |
| Gruppe 4 | enantiomere Paare von VPA-Derivaten                             |
| Gruppe 5 | amid- und Hydroxamsäurederivate                                 |
| Gruppe 6 | kettenverlängerte, $\beta$ -verzweigte Analoga                  |

Um die beim Menschen nachgewiesene Teratogenität der VPA von den im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell (NAU et al. 1981) beobachteten teratogenen Fehlbildungen der VPA-Derivate zu unterscheiden, wird im Folgenden vom teratogenen Potenzial der VPA-Derivate im Unterschied zur Teratogenität der VPA gesprochen.

Für die bereits bekannten VPA-Derivate wie auch für das in dieser Arbeit neu dargestellte enantiomere Hydroxamsäurepaar ist die Datenlage zu teratogenen Effekten im Tiermodell uneinheitlich. Insbesondere die verschiedenen Applikationsformen, Dosisgaben und Lösemittel machen einen direkten Vergleich der teratogenen Wirkung im Mausmodell schwierig. Ein besonderes Problem stellt die Tatsache dar, dass bisher zumeist nur ein oder zwei Dosis-Exenzephalie-Datenpunkte des jeweiligen Derivates aus dem NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell bekannt sind, sodass die Bestimmung einer quantitativen Halbwirkkonzentration teratogener Effekte ( $TeraD_{50}$ ) für die überwiegende Zahl der VPA-Derivate nicht möglich ist (Bestimmungsmethode von LITCHFIELD AND WILKINSON 1949).

Da es zudem ein generelles Bestreben war, sowohl Anzahl als auch Intensität der für diese Arbeit notwendigen Tierversuche so gering wie möglich zu halten, wurden Entscheidungskriterien entwickelt, die eine semi-quantitative Graduierung des teratogenen Potenzials anhand bereits veröffentlichter Dosis-Exenzephalie-Werte der einzelnen Derivate ermöglichten. Durch das Graduierungssystem war es, unter Berücksichtigung definierter Randbedingungen, möglich jeder Testsubstanz ein teratogenes Potenzial auf einer Skala von 0 (kein teratogenes Potenzial) bis +++++ (sehr starkes teratogenes Potenzial) auch auf Basis nur eines Dosis-Exenzephalie-Meßwertes zuzuordnen (Kapitel 6.2).

**Tabelle 4-2:** Entscheidungskriterien zur Graduierung des teratogenen Potenzials von VPA-Derivaten anhand von Untersuchungen im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell nach Nau et al. 1981.

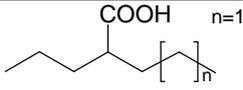
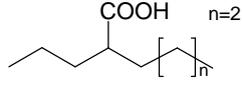
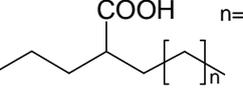
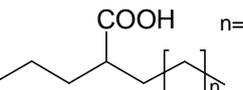
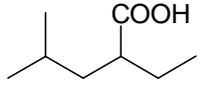
Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	Beurteilung	Graduierung
= 3,00	0	kein teratogenes Potenzial	<b>0</b>
2,00 – 3,00	1 – 5	teratogenes Potenzial sehr schwach	+
2,00 – 3,00	5 – 25	teratogenes Potenzial schwächer als VPA	++
2,00 – 3,00	25 – 60	teratogenes Potenzial äquivalent zu VPA	+++
1,00 – 2,00	40 – 60	teratogenes Potenzial stärker als VPA	++++
0,25 – 1,00	40 – 60	sehr starkes teratogenes Potenzial	+++++

Randbedingungen:

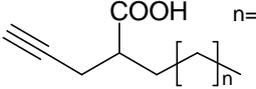
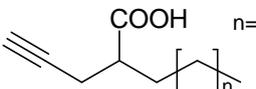
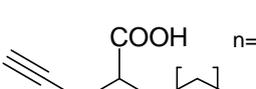
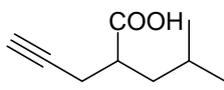
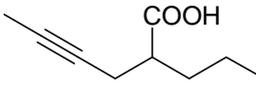
- Die Testdosis ist limitiert durch maternal toxische Effekte.
- Subkutane und intraperitoneale Applikationen zeigen vergleichbare Exenzephalieraten, orale Applikationen weichen hiervon stark ab und können nicht berücksichtigt werden können (NAU 1986).
- Dosis-Teratogenitäts-Kurven verlaufen sehr steil (NAU 1985).
- Die Exenzephalie-Spontanrate beträgt im NMRI-Maus-Modell  $\leq 0,8\%$  (BOJIC et al. 1996).
- Exenzephalieraten sind bei Verwendung von Cremophor EL 25 % als Lösemittel deutlich reduziert (um ca. – 10 - 15 %) (VOLLAND 2002).
- pH-Wert-Verschiebungen von Injektionslösungen haben einen Einfluss auf die Exenzephalierate (Dr. K. Hoffmann – mündl. Mitteilung). Es können daher nur Daten von neutralisierten Substanzlösungen mit  $pH\ 7,4 \pm 0,2$  berücksichtigt werden.

Mit Hilfe des entwickelten Graduierungssystems wurde jedes der ausgewählten VPA-Derivate des Testsets den in Tabelle 4-2 aufgeführten Entscheidungskriterien unterworfen und die in den folgenden Tabellen gelistete Graduierung und Bewertung auf der Skala von 0 - +++++ vorgenommen. Zur Verdeutlichung wurden die zu Grunde liegenden Dosis-Exenzephalie-Werte der jeweiligen Publikationen ebenfalls in den Tabellen dargestellt.

**Tabelle 4-3:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 1 (a: GRAVEMANN 2002,b: BOJIC et al. 1996)

Substanzname	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	teratogenes Potenzial
2-Propyl-Pentansäure (VPA)		3,00 <sup>a</sup>	42	+++
(±)-2-Propyl-Hexansäure		3,00 <sup>a</sup> 2,00 <sup>a</sup>	52 4	+++
(±)-2-Propyl-Heptansäure		3,00 <sup>a</sup> 2,00 <sup>a</sup>	100 7	+++
(±)-2-Propyl-Octansäure		2,00 <sup>a</sup> 1,25 <sup>a</sup>	54 8	++++
(±)-2-Ethyl-4-Methyl-pentansäure		3,00 <sup>b</sup>	0	<b>0</b>

**Tabelle 4-4:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 2 (a: BOJIC et al. 1998, b: BOJIC et al. 1996, c: HAUCK AND NAU 1990)

Substanz	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	teratogenes Potenzial
(±)-2-Butyl-4-Pentinsäure		1,25 <sup>a</sup>	71	++++
(±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure		1,25 <sup>a</sup>	60	++++
(±)-2-Hexyl-4-Pentinsäure		1,25 <sup>a</sup> 1,00 <sup>a</sup> 0,75 <sup>a</sup>	79 70 23	+++++
(±)-2-Heptyl-4-Pentinsäure		1,25 <sup>a</sup>	80	+++++
(±)-2-Isobutyl-4-Pentinsäure		3,00 <sup>b</sup>	3	+
(±)-2-Propyl-4-Hexinsäure		3,00 <sup>c</sup>	3	+

**Tabelle 4-5:** Teratogenes Potenzial der VPA Derivate aus Gruppe 3 (a: NAU AND LÖSCHER 1986, b: BOJIC et al. 1996, c: ELLERBECK et al. 1998, d: RADATZ et al. 1999)

Substanz	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	teratogenes Potenzial
2-Propyl-2E-Pentensäure		3,70 <sup>a</sup>	0	<b>0</b>
(±)-2-Propyl-4-Pentensäure		3,00 <sup>b</sup> 2,40 <sup>a</sup>	35 7	++
(±)-2-Isobutyl-4-Pentensäure		3,00 <sup>b</sup>	0	<b>0</b>
(±)-2-Fluor-2-Propyl-4-Pentensäure		3,00 <sup>c</sup>	0	<b>0</b>
2-Propyl-2-Hydroxy-Pentensäure		3,00 <sup>d</sup>	3	+

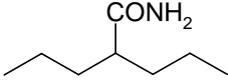
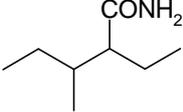
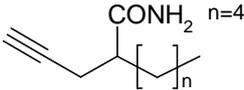
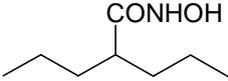
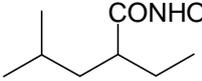
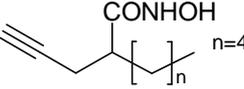
**Tabelle 4-6:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 4 (a: VOLLAND 2002, b: HAUCK et al. 1992)

Substanz	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	teratogenes Potenzial
R-2-Pentyl-4-Pentensäure		1,88 <sup>a</sup> 1,00 <sup>a</sup>	14 2	+++
S-2-Pentyl-4-Pentensäure		1,25 <sup>a</sup> 1,00 <sup>a</sup> 0,75 <sup>a</sup>	80 70 54	+++++
R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure		1,50 1,00	0 0	<b>0</b>
S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure		1,50 1,00	5 0	++ <sup>c</sup>
R-2-Propyl-4-Hexensäure		3,00 <sup>b</sup>	3	<b>0<sup>d</sup></b>
S-2-Propyl-4-Hexensäure		2,00 <sup>b</sup> 3,00 <sup>b</sup>	1 35	++

<sup>c</sup> Unter Berücksichtigung der Randbedingungen durch das verwendete Lösemittel CremEL 25%.

<sup>d</sup> Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die optische Reinheit dieser Verbindung nur 93 % betrug und somit 7 % des aktiven Enantiomers vorlagen.

**Tabelle 4-7:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 5 (a: RADATZ et al. 1998, b: VOLLAND 2002)

Substanzname	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	teratogenes Potenzial
Valpromid (VPD)		3,00 <sup>a</sup>	6	+
(±)-2-Ethyl-3-Methyl- Pentansäureamid (Valnoctamid)		3,00 <sup>a</sup>	1	+
(±)-2-Pentyl-4- Pentinsäureamid		1,50 <sup>b</sup> 1,25 <sup>b</sup>	8 0	++
Valproin- hydroxamsäure (VPA-HS)		3,00 <sup>b</sup>	0	<b>0</b>
(±)-2-Ethyl-4-Methyl- Pentan- hydroxamsäure		3,00 <sup>b</sup>	0	<b>0</b>
(±)-2-Pentyl-4-Pentin- hydroxamsäure		1,50 <sup>b</sup> 1,25 <sup>b</sup>	14 1	+++

**Tabelle 4-8:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 6 (a: VOLLAND 2002, b: Dr. K. Hoffmann – mündliche Mitteilung, c: GRAVEMANN 2002)

Substanzname	Strukturformel	Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	Teratogenes Potenzial
(±)-3-Methyl-Pentansäure		3,00 <sup>a</sup>	1	+
3-Ethyl-Pentansäure		3,00 <sup>a</sup>	0	<b>0</b>
(±)-3-Methyl-Hexansäure		3,00 <sup>a</sup>	1	+
(±)-3-Ethyl-Hexansäure		3,00 <sup>a</sup>	5	+
3-Propyl-Hexansäure		2,00 <sup>a</sup>	44	+++
		1,25 <sup>a</sup>	5	
(±)-3-Propyl-Heptansäure		1,50 <sup>a</sup>	67	+++++
		1,25 <sup>a</sup>	26	
(±)-3-Propyl-Oktansäure		1,25 <sup>a</sup>	29	+++++
		1,00 <sup>a</sup>	0	
(±)-3-Propyl-5-Hexinsäure		1,50 <sup>b</sup>	Maternal toxisch	+++++
		1,00 <sup>c</sup>	14	
(±)-3-Pentyl-5-Hexinsäure		1,00 <sup>b</sup> 0,75 <sup>b</sup>	Maternal toxisch 1	+

Im Anschluss an die Klassifizierung der teratogenen Potenz jeder Substanz im Testset wurden Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Inhibition von Enzymen der Klasse der Histondeacetylasen durchgeführt und schlussendlich eine semi-quantitative Korrelation der teratogenen Potenz der VPA-Analoga mit ihrem HDAC-Inhibitions-Potenzial berechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

### 4.3 In vitro Untersuchungen am F9-Mauszellsystem

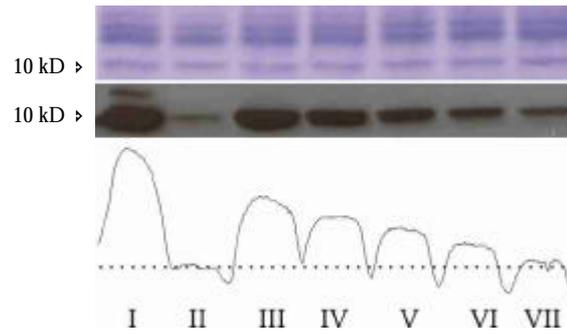
Entsprechend der Hypothese dieser Arbeit, dass die VPA-induzierten Neuralrohrdefekte bei Mensch und Tier durch die Störung der Enzymfunktion von Histondeacetylasen ausgelöst werden, wurden die im Testset zuvor ausgewählten VPA-Derivate zunächst semi-quantitativ auf ihre Fähigkeit zur Inhibition von Histondeacetylasen untersucht. Auf Grund der Gleichgewichtsreaktion von Acetylierung der Zellkernhistone durch HATs und der Deacetylierung der Kernhistone durch HDACs ist bei einer Inhibition der HDACs durch exogene Substanzen mit einem verstärkten Auftreten von acetylierten Kernhistonen zu rechnen (Hyperacetylierung). Als Untersuchungsziel in der verwendeten F9-teratokarzinomen Mauszelllinie wurde daher das evolutionär hoch konservierte Kernhiston H4 ausgewählt und der Proteinstatus der F9-Zellen hinsichtlich des acetylierten Kernhistons ( $^A\text{cH}_4$ ) in Abhängigkeit der Behandlung mit Testsubstanzen durch Western-Blot-Analysentechnik bestimmt. Da auch der Proteinstatus der HDACs selbst einen Einfluss auf das Acetylierungsgleichgewicht der Kernhistone haben könnte, wurde für ausgewählte VPA-Derivate repräsentativ der Proteinstatus von HDAC Isoform 2 und 3 mittels Western-Blot Analysentechnik untersucht.

#### 4.3.1 Evaluierung des F9-Mauszell-Testsystems

Zur Evaluierung der Arbeitsmethodik wurden in ersten Untersuchungen die Dosis-Wirkungsbeziehung von VPA und S-2-Pentyl-4-Pentinsäure bei einer Behandlungsdauer der Zellen von sechs Stunden untersucht (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3).

Unter Berücksichtigung des semi-quantitativen Ansatzes kann sowohl bei VPA als auch bei S-2-Pentyl-4-Pentinsäure eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden, wobei S-2-Pentyl-4-Pentinsäure bei gleichen Konzentrationen einen deutlich stärkeren Effekt auslöst. Bei VPA kann eine signifikante Inhibierung der HDAC-Funktion bereits ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  beobachtet werden, bei S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ist hierzu bereits die niedrigste getestete Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  ausreichend.

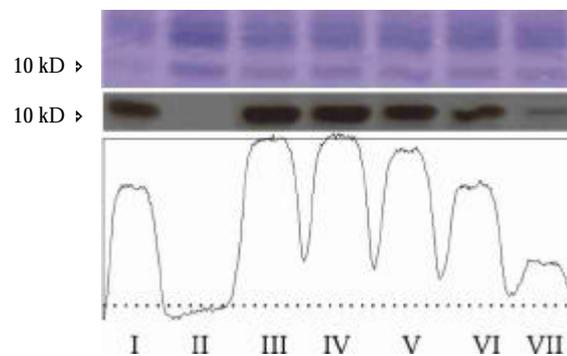
Unter der Voraussetzung, dass die HDAC-Inhibition mit teratogenen Effekten korreliert, sollten auf Grund dieser Daten auch Teratogene mit schwächerem Potenzial als VPA bei einer Testkonzentration von 1,00 mM eine ausreichende Reaktion des Testsystems bewirken. Es wurde daher eine Konzentration von 1,00 mM für die späteren Untersuchungen weiterer VPA-Derivate verwendet.



**Abbildung 4-2:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^A\text{C}\text{H}_4$ ) nach konzentrationsabhängiger VPA-Behandlung.

Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zelle)

I	Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)	
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium)	
III	3,00 mM	
IV	1,50 mM	
V	0,50 mM	VPA
VI	0,20 mM	
VII	0,05 mM	



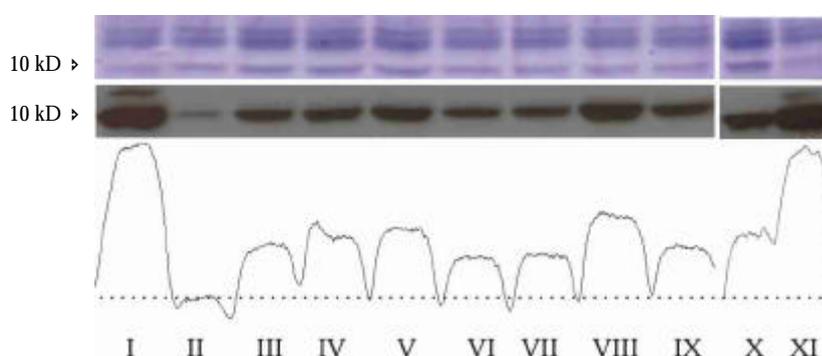
**Abbildung 4-3:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^A\text{C}\text{H}_4$ ) nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.

Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zelle)

I	Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)	
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium)	
III	3,00 mM	
IV	1,50 mM	
V	0,50 mM	S-2-Propyl-4-Pentinsäure
VI	0,20 mM	
VII	0,05 mM	

Als ein weiterer systemimmanenter Parameter wurde die notwendige Zeitdauer der Behandlung untersucht. Hierzu wurden 0,25 mM VPA, 0,25 mM S-2-Propyl-Pentinsäure und 200 nM Trichostatin A (TSA), ein klassischer HDAC-Inhibitor, als Modellsustanzen verwendet und nach Behandlung der F9-Zellen erneut der Proteinstatus der Zellen mittels Western-Blot Analysetechnik auf  $^{14}\text{C}$  hin untersucht (Abbildungen 4-4, 4-5 und 4-6). Die zeitabhängige Analyse zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen VPA und ihrem Derivat der S-2-Pentyl-4-Pentinsäure: Während bei Behandlung mit VPA bereits nach 15 - 30 Minuten ein deutlich erhöhter Level an acetyliertem Kernhiston H4 festzustellen ist, wird bei S-2-Propyl-4-Pentinsäure erst nach einer Expositionszeit von über einer Stunde die Hyperacetylierung des Kernhistons deutlich. Ähnlich verhält es sich mit dem klassischen HDAC-Inhibitor Trichostatin A. Hier zeigt sich zunächst nach 15 Minuten ein leicht erhöhter Messwert, der erst nach vier weiteren Stunden signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle ist. Mögliche Ursache für diesen Verzögerungseffekt könnte eine langsamere Aufnahme längerer Substanzen in den Zellkern und somit eine geringere Bioverfügbarkeit langkettiger Verbindungen für die Zelle darstellen.

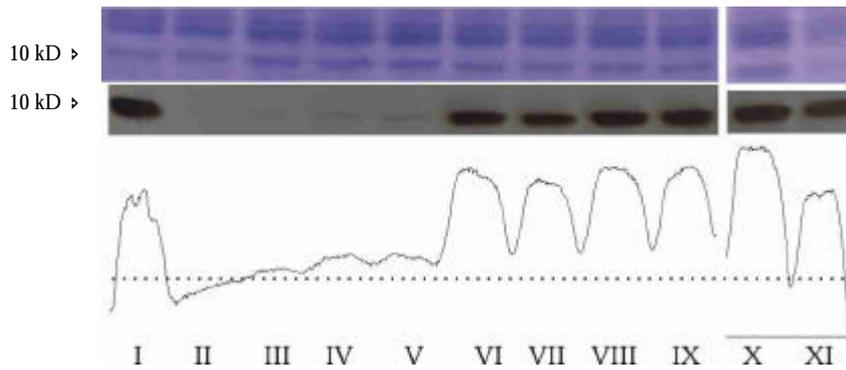
Um eine vergleichbare Bioverfügbarkeit bei unterschiedlichen Testsubstanzen zu gewährleisten, wurde für das weitere Substanzscreening von VPA-Derivaten und anderer Verbindungen eine Behandlungszeit der F9-Zellen von mindestens sechs Stunden festgelegt.



**Abbildung 4-4:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{14}\text{C}$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit Valproinsäure. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zellen)

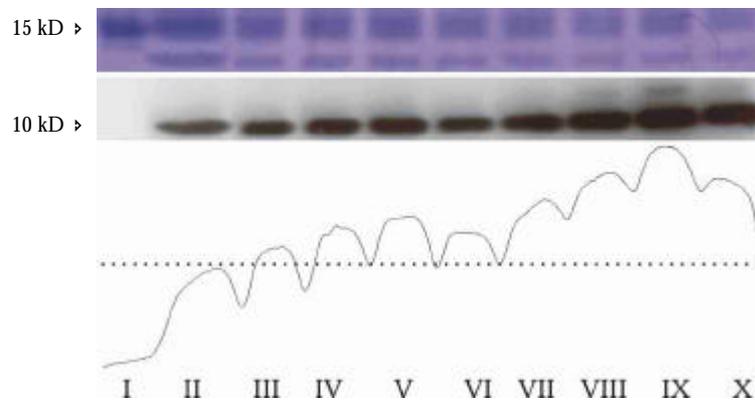
I, XI	Positivkontrollen (200 nM Trichostatin A, 6h)
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium, 6h)
III	15 min
IV	30 min
V	60 min
VI	2 h
VII	4 h
VIII	6 h
IX	8 h
X	24 h

Valproinsäure 0,25 mM



**Abbildung 4-5:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{Ac}H_4$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit S-2-Pentyl-4-Pentinsäure. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

I, XI	Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)	
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium)	
III	15 min	
IV	30 min	
V	60 min	
VI	2 h	S-2-Propyl-4-Pentinsäure 0,25 mM
VII	4 h	
VIII	6 h	
IX	8 h	
X	24 h	



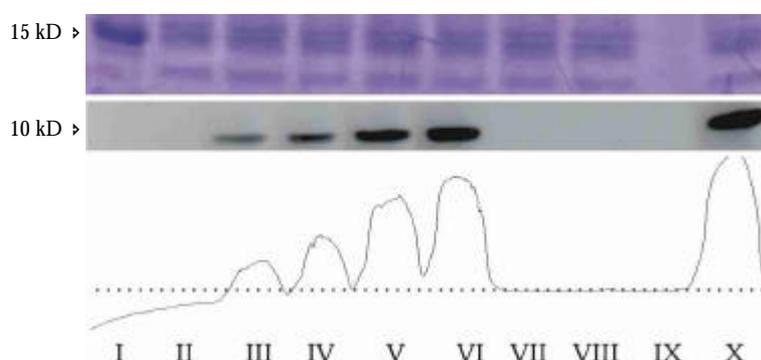
**Abbildung 4-6:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{Ac}H_4$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit Trichostatin A (TSA). Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

I	Rainbow Marker (Proteinleiter)	
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium, 6h)	
III	15 min	
IV	30 min	
V	60 min	
VI	2 h	Trichostatin A (TSA) 200 nM
VII	4 h	
VIII	6 h	
IX	8 h	
X	24 h	

### 4.3.2 Western-Blot Analyse von hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) – Screening der Strukturvarianten der Valproinsäure

Zur semi-quantitativen Untersuchung der HDAC-Inhibition durch die VPA-Derivate des Testsets wurden die in den sechs Gruppen ausgewählten Strukturvarianten der VPA im zuvor etablierten F9-Mauszellsystem auf Auslösung von Hyperacetylierung des Kernhistons H4 untersucht.

Bei den VPA-Derivaten der Gruppe 1 ( $\alpha$ -verzweigte, gesättigte und kettenverlängerte Derivate) konnte gezeigt werden, dass mit steigender Kohlenstoffanzahl in einer Seitenkette der Anteil an hyperacetyliertem Kernhiston H4 deutlich anstieg (Abbildung 4-7). Bei ( $\pm$ )-2-Ethyl-4-Methyl-Pentansäure als Modellschubstanz für eine weitere Seitenkettenverzweigung konnte dagegen keinerlei Effekt auf den Proteinstatus an  $^{\text{Ac}}\text{H}_4$  beobachtet werden. Trotz des semi-quantitativen Ansatzes der durchgeführten Western-Blot Analyse lässt sich erkennen, dass eine verstärkte Inhibition der HDACs bei steigender Kettenlänge eintritt, während die weitere Seitenkettenverzweigung keinerlei Effekte auslöst. Dies entspricht den bereits bekannten Strukturvoraussetzungen teratogener Effekte der VPA.



**Abbildung 4-7:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 1.

Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zellen)

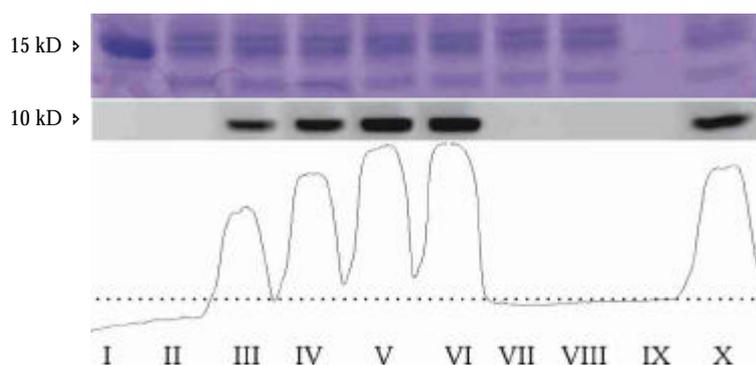
I	Rainbow Marker (Proteinleiter)
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium)
III	2-Propyl-Pentansäure (Valproinsäure) 1,00 mM
IV	( $\pm$ )-2-Propyl-Hexansäure 1,00 mM
V	( $\pm$ )-2-Propyl-Heptansäure 1,00 mM
VI	( $\pm$ )-2-Propyl-Oktansäure 1,00 mM
VII	negativ Kontrolle (DMSO-Medium)
VIII	( $\pm$ )-2-Ethyl-4-methyl-Pentansäure 1,00 mM
IX	leer
X	Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)

Zur weiteren Untersuchung der Effekte der Kettenverlängerung wurden die ausgesuchten VPA-Derivate der Gruppe 2 (Derivate mit einer Dreifachbindung an C4-C5) im F9-Zellsystem untersucht (Abbildung 4-8).

Auch bei dieser Substanzgruppe wird deutlich, dass eine Kettenverlängerung der gesättigten Seitenkette eine verstärkte Hyperacetylierung des Kernhistons H4 verursacht. Zudem bewirkt die weitere Seitenkettenverzweigung an C4' erneut einen Verlust des HDAC-Inhibitions-Potenzials. Im direkten Vergleich zwischen den Derivaten der Gruppe 1 und 2 lässt sich zeigen, dass die Verbindungen mit einer Dreifachbindung zwischen C4-C5 deutlich stärkere Messwerte verursachen, was auf eine größere Potenz in der Inhibition der Histondeacetylasen hindeutet. Auch diese Befunde entsprechen den strukturellen Voraussetzungen für teratogene Effekte der VPA.

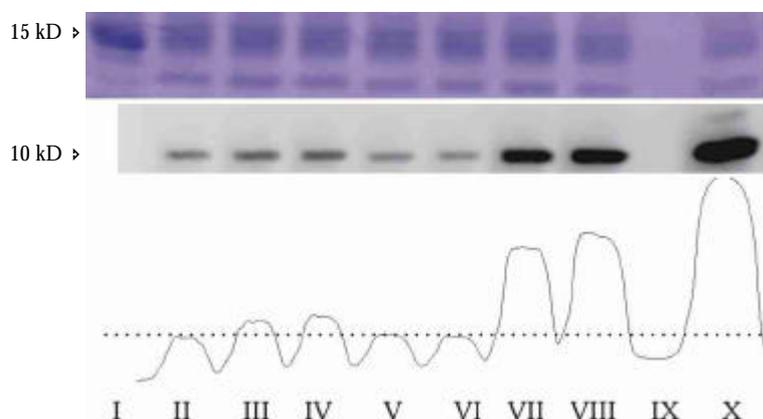
Die Untersuchung der Substanzgruppe 3 ( $\alpha$ -Wasserstoff substituierte VPA-Derivate) zeigt, dass ausschließlich die als Kontrollen untersuchten Substanzen VPA und 2-Propyl-4-Pentensäure eine Hyperacetylierung im Zellsystem auslösen können. Eine Substitution des Wasserstoffs durch Fluor oder durch die Hydroxylgruppe bewirkt ebenso einen Verlust der HDAC-Inhibition wie die Abstrahierung zur Doppelbindung in Form der 2-Propyl-2E-Pentensäure und die erneute Seitenkettenverzweigung an C4' in Form der 2-Isobutyl-4-Pentensäure (Abbildung 4-9). Die leichte Erhöhung des Messwertes bei den Verbindungen III und IV ist nicht signifikant, könnte jedoch den Beginn einer leichten Inhibition andeuten. Genaue Aussagen lassen sich hier erst nach quantitativer Bestimmung der HDAC-Inhibition treffen. Erneut stimmt die beobachtete Hyperacetylierung im F9-Zellsystem mit den Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen dieser Gruppe überein.

Die Untersuchung des HDAC-Inhibitionspotentials der VPA-Derivate in Gruppe 4 (Enantiomerenpaare mit chiralem Zentrum an C2) kann einen deutlichen Unterschied in der Induktion von hyperacetyliertem Kernhiston H4 in Abhängigkeit der Stereochemie zeigen (Abbildung 4-10). Von den drei untersuchten Enantiomerenpaaren zeigen die Stereoisomere von 2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure nur einen geringen und nicht signifikanten Anstieg des Acetylierungsgrades von H4 an. Dieser Befund für die beiden enantiomeren Hydroxamsäuren steht im Gegensatz zur bestimmten teratogenen Potenz dieser Verbindung, da zumindest das S-Enantiomer eine, wenn auch geringe, teratogene Potenz aufweist. Bei beiden untersuchten Karbonsäuren wird die jeweils intensivere Hyperacetylierung (entsprechend einer stärkeren HDAC-Inhibition) bei dem S-Enantiomer beobachtet, was sowohl die teratogenen Potenziale der Stereoisomere untereinander als auch der unterschiedlichen Verbindungen selbst widerspiegelt.



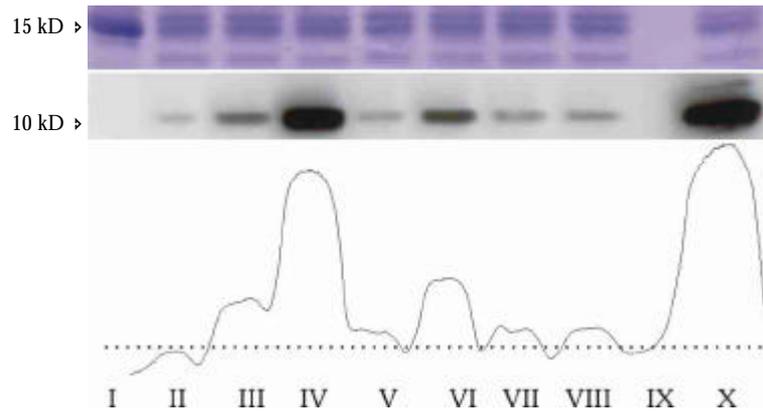
**Abbildung 4-8:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 2. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: Densidometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

- I Rainbow Marker (Proteinleiter)
- II, VII Negativkontrolle (DMSO-Medium)
- III ( $\pm$ )-2-Butyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
- IV ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
- V ( $\pm$ )-2-Hexyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
- VI ( $\pm$ )-2-Heptyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
- VIII ( $\pm$ )-2-Isobutyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
- IX leer
- X Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)



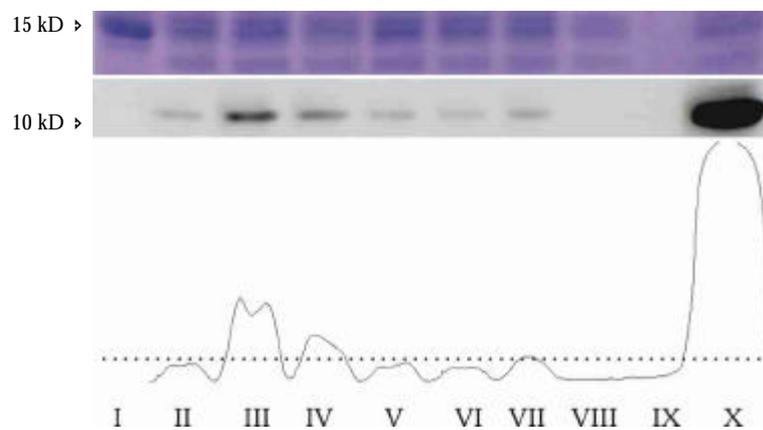
**Abbildung 4-9:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 3. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densidometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

- I Rainbow Marker (Proteinleiter)
- II Negativkontrolle (DMSO-Medium)
- III 2-Isobutyl-4-Pentensäure 1,00 mM
- IV 2-Hydroxy-2-Propyl-4-Pentensäure 1,00 mM
- V 2-Fluor-2-Propyl-4-Pentensäure 1,00 mM
- VI 2-Propyl-2E-Pentensäure 1,00 mM
- VII 2-Propyl-4-Pentensäure 1,00 mM
- VIII 2-Propyl-Pentensäure (Valproinsäure) 1,00 mM
- IX leer
- X Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)



**Abbildung 4-10:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 4. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

- |      |  |
|------|--|
| I    | Rainbow Marker (Proteinleiter)           |
| II   | Negativkontrolle (DMSO-Medium)           |
| III  | R-2-Pentyl-4-Pentinsäure 1,00 mM         |
| IV   | S-2-Pentyl-4-Pentinsäure 1,00 mM         |
| V    | R-2-Propyl-4-Hexinsäure 1,00 mM          |
| VI   | S-2-Propyl-4-Hexinsäure 1,00 mM          |
| VII  | R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure 1,00 mM |
| VIII | S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure 1,00 mM |
| IX   | leer                                     |
| X    | Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A) |



**Abbildung 4-11:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 5. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand

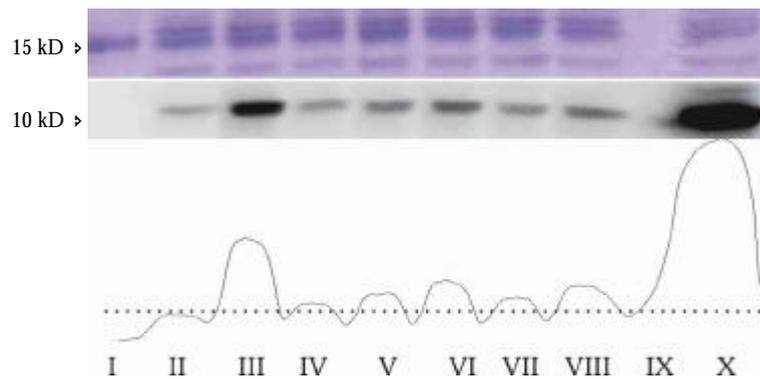
- |      |  |
|------|--|
| I    | Rainbow Marker (Proteinleiter)                         |
| II   | Negativkontrolle (DMSO-Medium)                         |
| III  | Valproinhydroxamsäure 1,00 mM                          |
| IV   | ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure 1,00 mM       |
| V    | ( $\pm$ )-2-Ethyl-4-Methyl-Pentanhydroxamsäure 1,00 mM |
| VI   | Valpromid 1,00 mM                                      |
| VII  | ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäureamid 1,00 mM           |
| VIII | ( $\pm$ )-3-Propyl-Oktansäureamid 1,00 mM              |
| IX   | leer   |
| X    | Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)               |

Zum besseren Verständnis der zuvor beobachteten Abweichung von der Arbeitshypothese wurden die VPA-Derivate der Gruppe 5 (Amid- und Hydroxamsäurederivate) untersucht (Abbildung 4-11). Keines der getesteten Amid- und Hydroxamsäurederivate kann eine signifikante Erhöhung des Acetylierungsgrades von Kernhiston H4 induzieren. Ausschließlich Valproinhydroxamsäure zeigt eine leichte Erhöhung des Messwertes an. Diese Befunde stehen erneut im Kontrast zur Arbeitshypothese, da sowohl Valpromid als auch ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäureamid ein, wenn auch schwaches, teratogenes Potenzial besitzen. Ein Erklärungsansatz wäre die von RADATZ et al. beobachtete Metabolisierung von VPA-Amiden zu ihren korrespondierenden Säuren, die selbst ein teratogenes Potenzial tragen (RADATZ et al. 1998). Es ist davon auszugehen, dass VPA-Amide keine intrinsische Potenz zur Inhibition von HDAC besitzen, in vivo jedoch zu den teratogenen Karbonsäuren biotransformiert und aktiviert werden.

Aktivierende Einflüsse können wegen der mangelnden metabolischen Kompetenz des hier verwendeten Testsystems in vitro nicht nachgestellt werden. Im Gegensatz zur bekannten und sehr potenten Hydroxamsäure Trichostatin A besitzen VPA-Hydroxamsäuren daher scheinbar keine intrinsische Aktivität an HDACs. Dies erklärt auch, der Pfeifferschen Regel folgend (PFEIFFER 1956), den zuvor beobachteten Mangel an Stereodifferenzierung bei R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure. Von Valproinhydroxamsäure als Modellsubstanz dieser Gruppe ist bisher keine Metabolisierung zur Karbonsäuren bekannt (LEVI et al. 1997), jedoch kann in Kapitel 4.8 gezeigt werden, dass S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in vivo intensiv zur Karbonsäure S-2-Pentyl-4-Pentinsäure metabolisiert wird.

Als abschließende Gruppe von VPA-Derivaten wurde die Gruppe 6 ( $\beta$ -verzweigte und kettenverlängerte Derivate) im F9-Testzellensystem untersucht (Abbildung 4-12). Erneut zeigte sich eine deutliche Abweichung von der Arbeitshypothese, da die  $\beta$ -verzweigten Derivate keinen Effekt auf den Proteinstatus des acetylierten Kernhistons H4 der Zellen zeigten, obwohl sie ein teratogenes Potenzial besitzen. Einzig die Verbindung ( $\pm$ )-3-Methyl-Hexansäure konnte einen signifikanten Effekt auslösen. Ob hier erneut metabolische Ursachen die Gründe für eine Abweichung von der Hypothese darstellen, werden weitere Untersuchungen in Kapitel 4.9 ergeben; die VPA-Derivate mit  $\beta$ -Verzweigung zeigen jedoch keine intrinsische Aktivität an HDACs.

Insgesamt wird bereits bei diesen qualitativen Untersuchungen auf HDAC-Inhibition deutlich, dass die Struktur-Teratogenitäts-Beziehung der VPA weitgehend mit den Strukturvoraussetzungen für eine HDAC-Inhibition übereinstimmen. Ausnahmen können vermutlich, wie bereits bei dem Amid-Derivat der VPA von Radatz et al. 1998, durch die metabolische Aktivierung in vivo erklärt werden. In den folgenden Kapiteln werden daher sowohl weitere Untersuchungen zur quantitativen HDAC-Inhibition der VPA-Derivate des Testsets als auch Erklärungsansätze für die beobachteten Abweichungen von der Arbeitshypothese dargestellt.



**Abbildung 4-12:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^A\text{C}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 6.

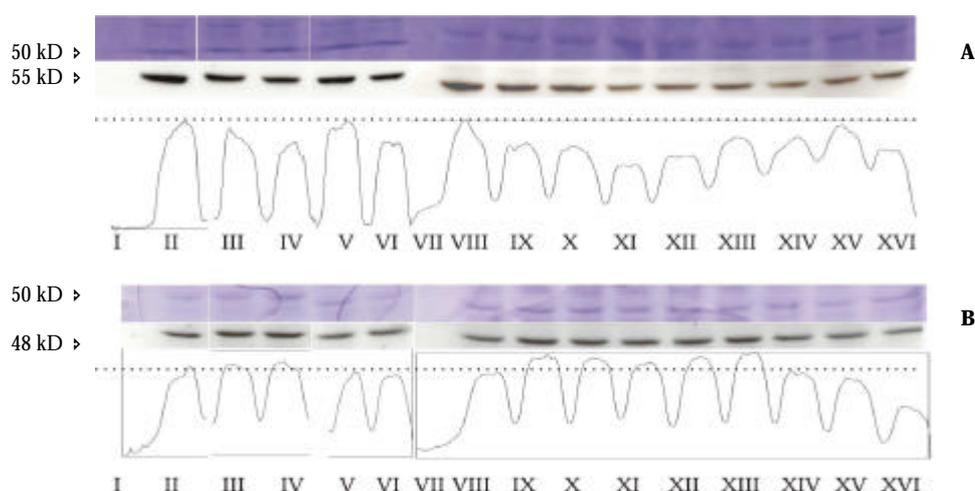
Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zelle)

I	Rainbow Marker (Proteinleiter)
II	Negativkontrolle (DMSO-Medium)
III	(±)-3-Methyl-Hexansäure 1,00 mM
IV	3-Ethyl-Pentansäure 1,00 mM
V	(±)-3-Propyl-Hexansäure 1,00 mM
VI	(±)-3-Propyl-Oktansäure 1,00 mM
VII	(±)-3-Propyl-5-Hexinsäure 1,00 mM
VIII	(±)-3-Pentyl-5-Hexinsäure 1,00 mM
IX	leer
X	Positivkontrolle (200 nM Trichostatin A)

### 4.3.3 Western-Blot Analyse von zellulärer Histondeacetylase 2 und 3 – Untersuchung ausgewählter Strukturvarianten der Valproinsäure

Neben der Inhibition der Enzymfunktion der Histondeacetylasen und der daraus resultierenden Hyperacetylierung der Kernhistone besteht auch die Möglichkeit des Einflusses vom HDACs auf den Zell-Proteingehalt an HDACs selbst, wie KRÄMER et al. 2003 für VPA und HDAC 2 sowie XU et al 2005 für SAHA und HDAC 3 zeigen konnten. Da eine Reduktion des Proteingehaltes an HDACs ebenfalls die Hyperacetylierung der Kernhistone beeinflussen könnte, wurden ausgewählte VPA-Derivate aus allen Substanz-Gruppen auf ihren Einfluss bezüglich HDAC 2 und HDAC 3 in Abhängigkeit der Expositionszeit untersucht.

Die Western-Blot Analysen von HDAC 2 und 3 nach einer Behandlungszeit von zunächst sechs Stunden zeigten, dass die untersuchten VPA-Derivate den Proteingehalt an Histondeacetylasen nicht signifikant verändern. Unter Beachtung des qualitativen Versuchsdesigns konnte allenfalls eine leichte Verringerung des Proteingehaltes von HDAC 2 festgestellt werden, während HDAC 3 im Vergleich zur Kontrolle leicht überrepräsentiert erscheint (Abbildung 4-13).

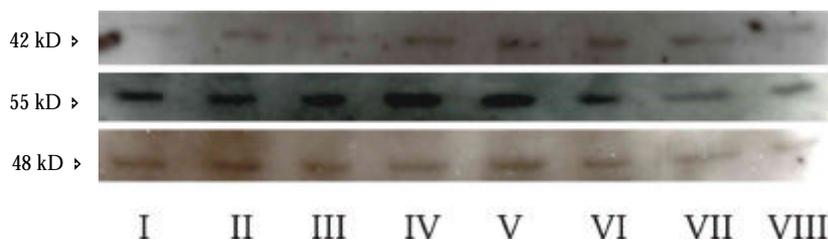


**Abbildung 4-13:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an HDAC 2 (oberes Bild - A) und HDAC 3 (unteres Bild - B) nach Behandlung mit ausgewählten VPA-Derivaten für sechs Stunden.

Jeweils Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand (Grundzustand der Zellen)

I, VII	Rainbow Marker (Proteinleiter)
II, V, VIII	Negativkontrollen (DMSO-Medium)
III	Valproinsäure 1,00 mM
IV	2-Propyl-2E-Pentensäure 1,00 mM
VI, XVI	Trichostatin A (TSA) 200 nM
IX	Valproinhydroxamsäure 1,00 mM
X	Valpromid 1,00 mM
XI	(±)-3-Methyl-Hexansäure 1,00 mM
XII	(±)-3-Propyl-Oktansäure 1,00 mM
XIII	(±)-2-Isobutyl-4-Pentensäure 1,00 mM
XIV	R-2-Pentyl-4-Pentensäure 1,00 mM
XV	S-2-Pentyl-4-Pentensäure 1 mM

Zur weiteren Untersuchung wurden die F9 Zellen mit den ausgewählten VPA-Derivaten sowohl für 12 als auch für 24 Stunden inkubiert und auf den Proteingehalt von HDAC 2 und 3 hin untersucht. Nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden konnten bei verschiedenen VPA-Derivaten, insbesondere bei S-2-Pentyl-4-Pentinsäure, bereits optisch deutliche Effekte auf die Zellen ausgemacht werden (z.B. Änderungen der Zellmorphologie, Abnahme der Zelldichte, abgelöste Zellen), sodass bei diesen Proben zur Absicherung einer äquivalenten Proteinbeladung des Trenngels zusätzlich zur Färbung des Acrylamidgels auch eine Bestimmung des Proteingehaltes jeder Probe durchgeführt wurde. Als zweite Kontrolle einer äquivalenten Proteinbeladung des Gels und eines gleichmäßigen Blots auf die Membran wurden Western-Blot-Analysen von  $\beta$ -Actin als unbeeinflusstem Kontrollprotein durchgeführt. Diese wiesen eine äquivalente Proteinbeladung des Trenngels auf, die Zellysate zeigten gleichzeitig auch nach 24-stündiger Behandlungszeit keine signifikanten Abweichungen im Proteingehalt von HDAC 2 oder HDAC 3 im Vergleich zur Kontrolle (ebenfalls keine Änderung nach 12-stündiger Behandlung zu beobachten, Daten hier nicht explizit gezeigt, Abbildung 4-14).



**Abbildung 4-14:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an  $\beta$ -Actin (oberes Bild), HDAC 2 (mittleres Bild) und HDAC 3 (unteres Bild) nach Behandlung mit ausgewählten VPA-Derivaten für 24 Stunden. Röntgenfilmschwärzung ohne densitometrische Auswertung

I	negativ Kontrolle (DMSO-Medium)
II	Valproinsäure 1,00 mM
III	Valproinhydroxamsäure 1,00 mM
IV	2-Propyl-2E-Pentensäure 1,00 mM
V	( $\pm$ )-2-Isobutyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
VI	S-2-Pentyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
VII	R-2-Pentyl-4-Pentinsäure 1,00 mM
VIII	( $\pm$ )-3-Propyl-Oktansäure 1,00 mM

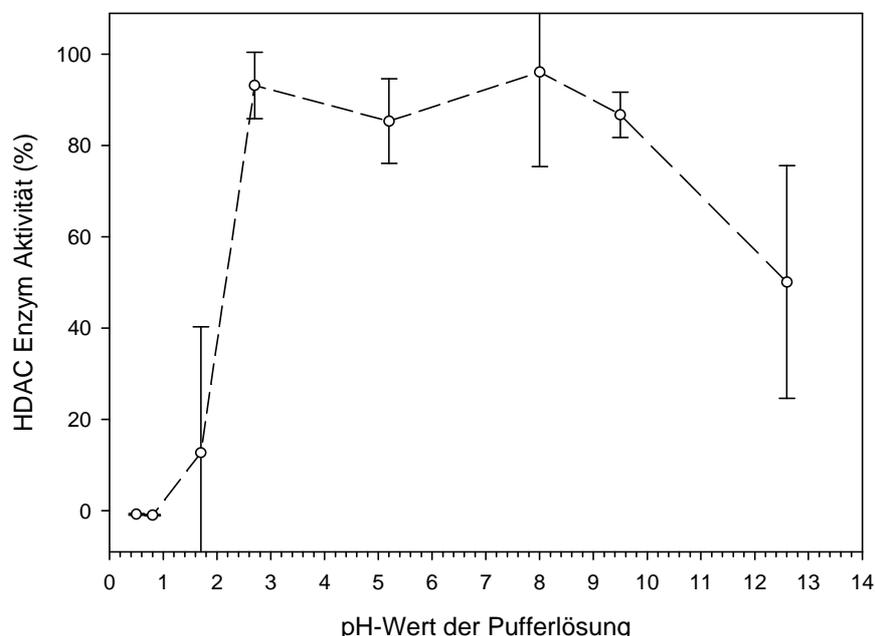
Entgegen den Beobachtungen von KRÄMER et al. 2003 und XU et al. 2005 kann somit keine selektive Einflussnahme auf den HDAC Proteingehalt der Zellen festgestellt werden. Da die zuvor qualitativ bestimmte Hyperacetylierung des Kernhistones H4 bereits nach nur sechs Stunden Behandlungszeit auftritt (für Valproinsäure kann eine signifikante Erhöhung sogar bereits nach 15 Minuten Behandlungszeit gezeigt werden – Kapitel 4.3.1) kann davon ausgegangen werden, dass nicht ein möglicher Ubiquitin vermittelter Abbau von HDACs mit den teratogenen Effekten der VPA-Derivate korreliert ist, sondern ausschließlich die Inhibition der HDAC-Enzymfunktion selbst.

## 4.4 In vitro Untersuchungen der HDAC-Inhibition an einem humanen HDAC-Enzym-Assay – Bestimmung der $IC_{50}$ (HDAC)

Zur späteren semi-quantitativen Korrelation der teratogenen Potenz der VPA-Derivate mit ihrer Inhibitionsfähigkeit von HDACs wurde der  $IC_{50}$ (HDAC)-Wert jeder Substanz im Test-Set anhand eines enzymatischen Assays bestimmt. Der kommerziell erhältliche Assay verwendet hierbei die Nuklearzellextrakte humaner HeLa-Zellen (Krebszelllinie Helene Lange), die als Quelle für die HDAC-Aktivität dienen und eine Mischung aus allen bekannten HDAC Isoformen darstellen (HDAC-Cocktail).

### 4.4.1 Evaluierung und Randbedingungen des enzymatischen Assays

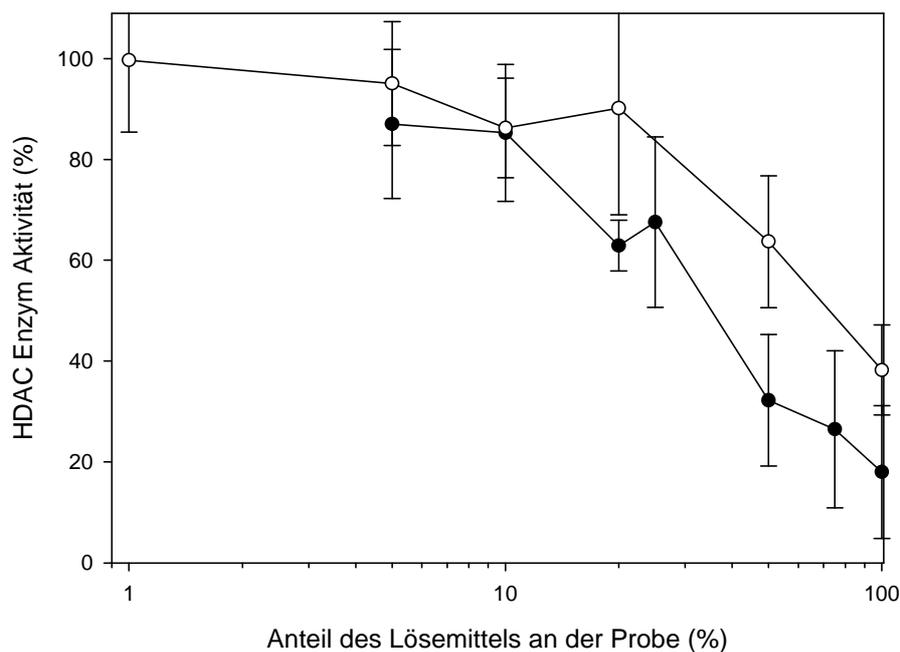
Zur Evaluierung des enzymatischen Testsystems und des Auswerteverfahrens wurde zunächst die pH-abhängige enzymatische Aktivität des HDAC-Assays bestimmt. Hierzu wurde die standardmäßig zu verwendende HDAC-Assay-Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 8,0 mittels Natronlauge und Salzsäure auf abweichende pH-Werte eingestellt und die Lösungen analysiert (Abbildung 4-15).



**Abbildung 4-15:** HDAC-Enzym-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes einer Pufferlösung ( $c = 25 \text{ mmol/L}$  Tris-Cl) zur Untersuchung der Stabilität des Testsystems ( $n = 4 \pm \text{SD}$ ).

Die enzymatische Aktivität des Assays ist bei Verwendung von Testlösungen mit einem pH-Wert zwischen 3,0 und 9,5 von der enzymatischen Leistung bei Verwendung des Kontrollpuffers nicht zu unterscheiden. Dieser erstaunlich große Stabilitätsbereich sollte jedoch für weitere Untersuchungen nicht ausgeschöpft werden; vielmehr wurden die im Folgenden eingesetzten Testlösungen von VPA-Derivaten und anderen Testsubstanzen vor Verwendung im Assay zunächst neutralisiert und anschließend mittels HDAC-Enzym-Puffer (pH 8,0) weitere Verdünnungen angesetzt.

Als weiterer Systemparameter wurde die Abhängigkeit der HDAC-Enzymaktivität von Art und Anteil eines Lösevermittlers anhand von Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) bestimmt (Abbildung 4-16). Signifikante Abweichungen der Enzymleistung von der Kontrolle wurden bei Volumenanteilen der Testlösung von über 10 % (Ethanol) bzw. über 20 % (DMSO) deutlich, weswegen in allen folgenden Versuchen zur Bestimmung der  $IC_{50}$ (HDAC) schwerlöslicher Verbindungen die Lösevermittler DMSO oder Ethanol mit einem Maximalvolumen in der Probe von 10 % (v/v) verwendet wurden.



**Abbildung 4-16:** HDAC-Enzym-Aktivität in Abhängigkeit des Volumenanteils Lösevermittler in der Probe anhand einer Pufferlösung pH 8,0 ( $c = 25 \text{ mmol/L Tris-Cl}$ ) ( $n = 4 \pm \text{SD}$ ).

Schwarze Kreise: Ethanol als Lösungsvermittler

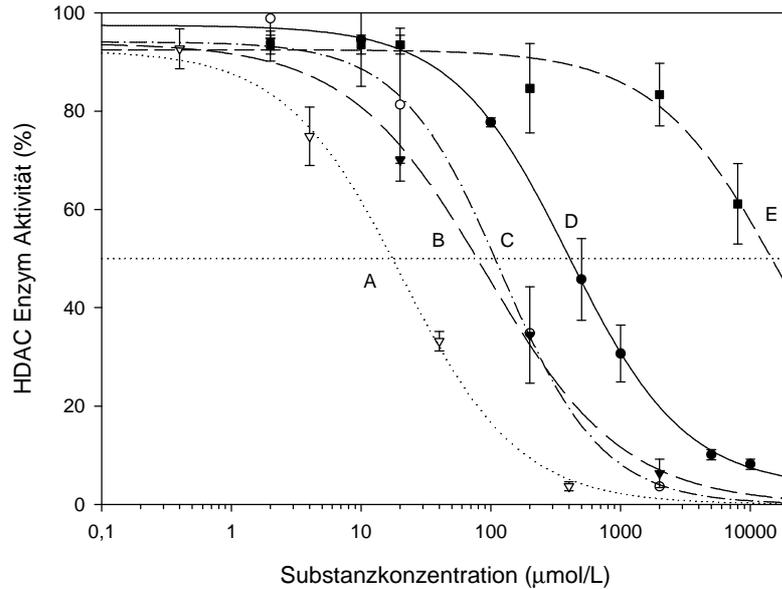
Helle Kreise: Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler

#### 4.4.2 Dosis-Inhibierungs-Kurven und Bestimmung der $IC_{50}$ (HDAC) – Screening der Valpainsäure-Derivate

Die Strukturanaloga der VPA wurden in den bereits zuvor definierten Gruppen auf ihre Dosis-Inhibierungs-Aktivität im HDAC-Enzym-Assay untersucht, graphisch dargestellt und durch mathematisch-iterative Funktionsanpassung der  $IC_{50}$ (HDAC)-Wert bestimmt. Die Untersuchung der Derivate aus Gruppe 1 ( $\alpha$ -verzweigte, gesättigte und kettenverlängerte Derivate) zeigte einen Anstieg der Inhibierungspotenz mit steigender Seitenkettenlänge von 398  $\mu\text{mol/L}$  bei VPA bis zu 25  $\mu\text{mol/L}$  bei ( $\pm$ )-2-Propyl-Oktansäure. Eine zusätzliche Verzweigung der Seitenkette an C4 führte zu einem Verlust der HDAC-Inhibition. Eine Dosis von 10 000  $\mu\text{mol/L}$  führte bei 2-Ethyl-4-Methyl-Pentansäure zwar noch zu einer Abnahme der Enzymaktivität auf ca. 60 %, jedoch wurden solch hohen Konzentrationen nicht mehr als toxikologisch relevant betrachtet (Abbildung 4-17).

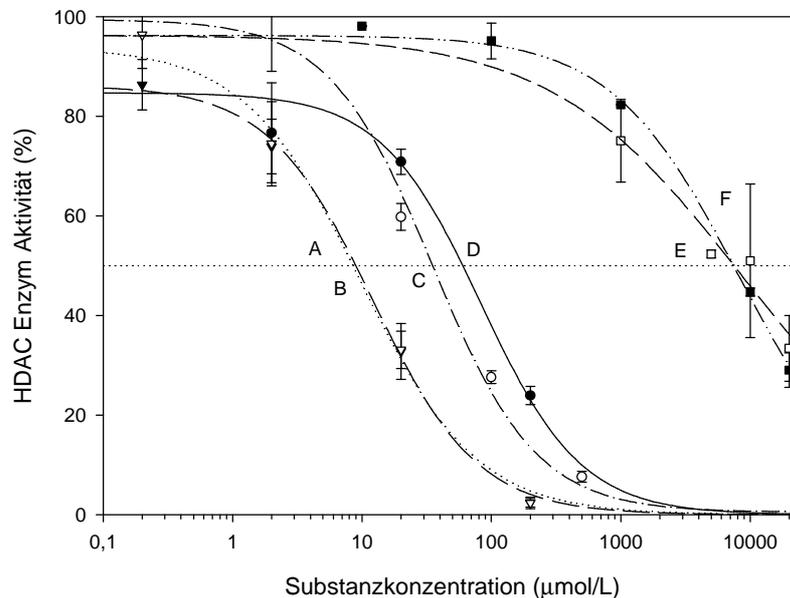
Bei Untersuchung der VPA-Derivate aus Gruppe 2 (Derivate mit Dreifachbindung in Position C4-C5) konnte eine im Vergleich zu Gruppe 1 generell deutlich stärkere HDAC-Inhibition beobachtet werden. Dieser Trend wurde bereits zuvor bei Experimenten zur qualitativen HDAC-Inhibition dieser zwei Gruppen in der F9-Zellkultur vermutet (Kapitel 4.3.2). Die  $IC_{50}$ (HDAC)-Werte reichten in Gruppe 2 von 100  $\mu\text{mol/L}$  bei ( $\pm$ )-2-Butyl-4-Pentinsäure bis zu 12  $\mu\text{mol/L}$  bei ( $\pm$ )-2-Heptyl-4-Pentinsäure und stellten damit im Vergleich zu Valproinsäure eine Aktivitätssteigerung am Enzym um den Faktor 50 dar. Eine Verzweigung an C4 führte hier ebenso zu einem Aktivitätsverlust wie die Einführung einer Methylgruppe an Position C5 der Dreifachbindung (Abbildung 4-18).

Die Untersuchung der VPA-Derivate der Gruppe 3 ( $\alpha$ -Wasserstoff substituierte Derivate) konnte quantitativ zeigen, dass eine Substitution des Wasserstoffatoms an C2 durch Fluor oder eine Abstraktion zur Doppelbindung einen vollständigen Verlust der HDAC-Inhibition bewirkte. Die Substitution durch eine Hydroxylfunktion in 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure führte rechnerisch zu einem  $IC_{50}$ (HDAC)-Wert von 5000  $\mu\text{mol/L}$ ; auffällig war jedoch die ungewöhnlich steil verlaufende Dosis-Wirkungsfunktion. Die möglicherweise auftretende Interferenz dieser Substanz mit den Entwicklungsreagenzien des HDAC-Enzym-Assays wird in Kapitel 4.4.3 dargestellt. Der steile Kurvenverlauf und die vergleichsweise hohe  $IC_{50}$  lässt vermuten, dass auch das 2-Hydroxy-Derivat der VPA intrinsisch keine HDAC-Aktivität besitzt. Die Einführung einer Doppelbindung in Position C4-C5 führte im Vergleich zu Valproinsäure zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität an HDACs um den Faktor 5 und stellte eine Aktivitätsverringering im Vergleich zu Derivaten mit einer Dreifachbindung in dieser Position dar (Faktor 50) (Abbildung 4-19). Dies ist überraschend, da die 2-Propyl-4-Pentensäure im Tierversuch eine zu VPA vergleichbare teratogene Potenz zeigt. Möglicherweise wird die geringere intrinsische Aktivität am Rezeptor durch günstigere pharmakokinetische Parameter wie Proteinbindungsrate, Kinetik oder Metabolismus kompensiert.



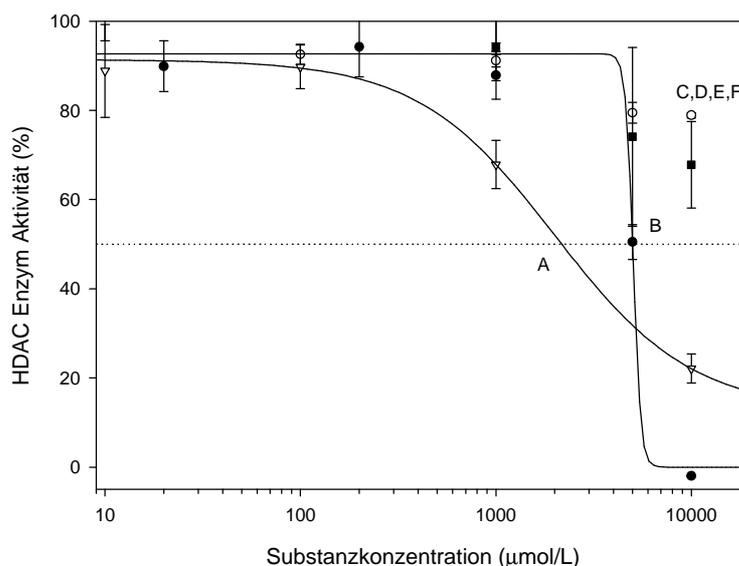
**Abbildung 4-17:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 1 und Angabe der  $IC_{50}$ (HDAC) nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm SD$ ).

A	(±)-2-Propyl-Oktansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 25 µmol/L	SE: 4 µmol/L
B	(±)-2-Propyl-Heptansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 103 µmol/L	SE: 21 µmol/L
C	(±)-2-Propyl-Hexansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 144 µmol/L	SE: 34 µmol/L
D	Valproinsäure, VPA	$IC_{50}$ (HDAC) = 398 µmol/L	SE: 50 µmol/L
E	(±)-2-Ethyl-4-Methyl-Pentansäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 µmol/L	



**Abbildung 4-18:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 2 und Angabe der  $IC_{50}$ (HDAC) nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm SD$ ).

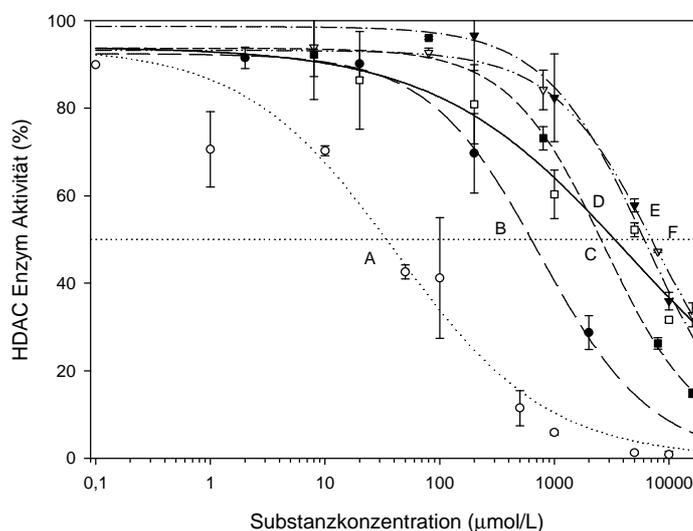
A	(±)-2-Heptyl-4-Pentinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 12 µmol/L	SE: 2 µmol/L
B	(±)-2-Hexyl-4-Pentinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 13 µmol/L	SE: 2 µmol/L
C	(±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 35 µmol/L	SE: 10 µmol/L
D	(±)-2-Butyl-4-Pentinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 98 µmol/L	SE: 18 µmol/L
E	(±)-2-Isobutyl-4-Pentinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 µmol/L	
F	(±)-2-Propyl-4-Hexinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 µmol/L	



**Abbildung 4-19:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 3 und Angabe der  $IC_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).

A	(±)-2-Propyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 2620 \mu\text{mol/L}$	SE: 3170 $\mu\text{mol/L}$
B	2-Hydroxy-2-Propyl-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 5300 \mu\text{mol/L}$	SE: 365 $\mu\text{mol/L}$
C	(±)-2-Isobutyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) > 10000 \mu\text{mol/L}$	
D	(±)-2-Fluor-2-Propyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) > 1000 \mu\text{mol/L}^a$	
E	2-Propyl-2E-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) > 10000 \mu\text{mol/L}$	
F	(±)-2-Fluor-2-Pentyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) > 2000 \mu\text{mol/L}^a$	

a: Löslichkeitsgrenze im Testsystem überschritten



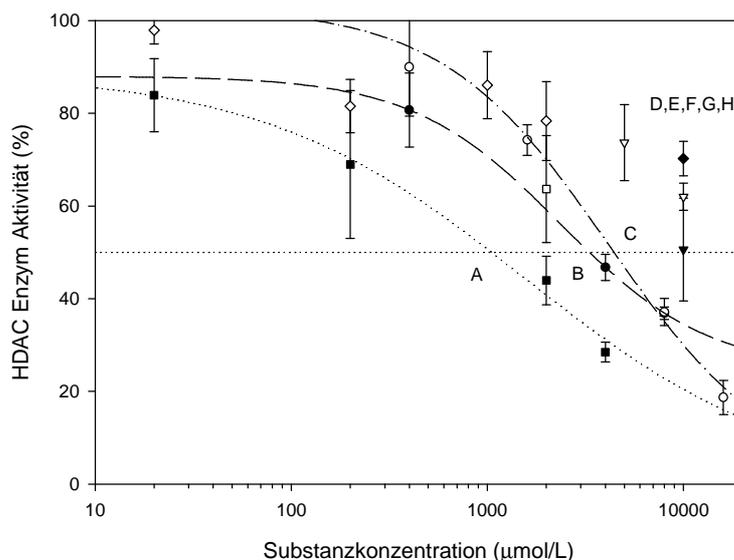
**Abbildung 4-20:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 4 und Angabe der  $IC_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).

A	S-2-Pentyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 48 \mu\text{mol/L}$	SE: 12 $\mu\text{mol/L}$
B	R-2-Pentyl-4-Pentensäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 869 \mu\text{mol/L}$	SE: 183 $\mu\text{mol/L}$
C	S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 2720 \mu\text{mol/L}$	SE: 1010 $\mu\text{mol/L}$
D	S-2-Propyl-4-Hexinsäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 5840 \mu\text{mol/L}$	SE: 19380 $\mu\text{mol/L}$
E	R-2-Propyl-4-Hexinsäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 7360 \mu\text{mol/L}$	SE: 10050 $\mu\text{mol/L}$
F	R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	$IC_{50}(\text{HDAC}) = 7560 \mu\text{mol/L}$	SE: 4660 $\mu\text{mol/L}$

Die Untersuchung der Gruppe 4 (Enantiomerenpaare von VPA-Derivaten) zeigte, dass die an Position C2 chiralen Moleküle in Abhängigkeit ihrer Stereokonformation eine deutlich unterschiedliche Aktivität an HDACs aufwiesen. Die insgesamt sehr potenten Enantiomere von 2-Pentyl-4-Pentinsäure zeigten einen stereoselektiven Unterschied von Faktor 20 zugunsten des S-Enantiomers, während sich dieser Faktor bei 2-Propyl-4-Pentinsäure über 2,8 zu Faktor 1,3 bei den Enantiomeren von 2-Propyl-4-Hexinsäure reduzierte. Diese Beobachtung bestätigt quantitativ die bereits zuvor beobachtete Hyperacetylierung in der F9-Zellkultur und stimmt mit der Pfeiferschen Regel überein (vergleiche Kapitel 4.3.2). Das VPA-Derivat S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ist damit eines der aktivsten Derivate an HDAC-Enzymen und unterstreicht sowohl die essenzielle Bedeutung des Wasserstoffatoms an C2 allgemein als auch die Interaktion an einem stereoselektiven Enzymzentrum. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die beobachtete Enzym-Aktivität der Hydroxamsäurenantiomere und der Enantiomere von 2-Propyl-4-Hexinsäure mit einer  $IC_{50}$ (HDAC) von über 3000  $\mu\text{mol/L}$  physiologisch relevant sind.

Die insgesamt geringe Inhibierungspotenz der enantiomeren VPA-Hydroxamsäurederivate stellte einen im Sinne der Arbeitshypothese überraschenden Befund dar, weil im Vergleich zum sehr potenten HDAC-Inhibitor Trichostatin A (ebenfalls eine Hydroxamsäure) die Derivatisierung der Karbonsäurefunktion von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure offensichtlich keine Steigerung der Aktivität verursachte. Es wurden daher weitere Amid- und Hydroxamsäurederivate der VPA als Gruppe 5 im HDAC-Enzym-Assay untersucht (Abbildung 4-21). Die getesteten Amid- und Hydroxamsäurederivate zeigten keinerlei Aktivität an HDAC-Enzymen. Allein das Amid- und Hydroxamsäurederivat der ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäure wiesen eine vergleichsweise geringe  $IC_{50}$ (HDAC) von 1650 bzw. 4390  $\mu\text{mol/L}$  auf. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Amid- und Hydroxamsäurederivate der VPA keine intrinsische Aktivität an HDAC-Enzymen zeigen.

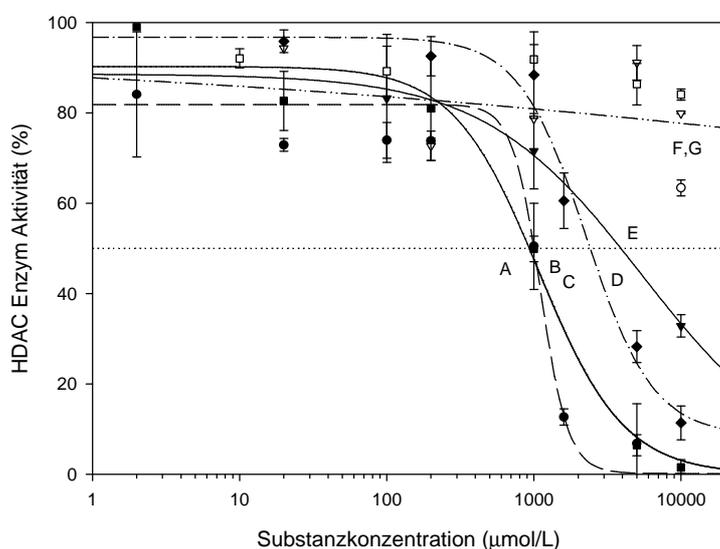
Als abschließende Strukturvarianten wurden die VPA-Derivate der Gruppe 6 (an Position C3 verzweigte Derivate,  $\beta$ -verzweigte Derivate) auf HDAC-Inhibition quantitativ untersucht (Abbildung 4-22). Diese Strukturvariation führt in Summe zu Derivaten mit deutlich geringerer Aktivität an HDAC-Enzymen als die korrespondierenden  $\alpha$ -verzweigten Karbonsäuren der Gruppen 1 und 2. Einzige Ausnahme ist 3-Methyl-Hexansäure mit einer zu VPA vergleichbaren Aktivität von 800  $\mu\text{mol/L}$ . Wie schon bei den Amid- und Hydroxamsäure-Derivaten sind diese Befunde überraschend, da sowohl die Seitengruppe, bestehend aus nur einer Methylgruppe bei 3-Methyl-Hexansäure, als Strukturvoraussetzung bei  $\alpha$ -verzweigten Karbonsäuren bekanntermaßen zu einem Verlust der Teratogenität führt, als auch den VPA-Derivaten dieser Gruppe eine geringe teratogene Potenz zugewiesen wurde. Insgesamt stellt diese Gruppe von VPA-Derivaten daher eine Ausnahme der Korrelation von HDAC-Inhibition und teratogener Potenz dar.  $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate haben intrinsisch keine oder nur eine geringe Aktivität an HDAC-Enzymen.



**Abbildung 4-21:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 5 und Angabe der  $IC_{50}$ (HDAC) nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm SD$ ).

A	(±)-2-Pentyl-4-Pentinsäureamid	$IC_{50}$ (HDAC) = 1650 $\mu\text{mol/L}$	SE: 3770 $\mu\text{mol/L}$
B	(±)-2-Pentyl-4-Penthydroxamsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 4390 $\mu\text{mol/L}$	SE: 5820 $\mu\text{mol/L}$
C	Valproinhydroxamsäure, VPA-HS	$IC_{50}$ (HDAC) = 5040 $\mu\text{mol/L}$	SE: 6740 $\mu\text{mol/L}$
D	2-Ethyl-4-Methyl-PentanHS	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 $\mu\text{mol/L}$	
E	Valproinsäureamid, VPD	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 $\mu\text{mol/L}$	
F	Valnoctamid, VCD	$IC_{50}$ (HDAC) > 10000 $\mu\text{mol/L}$	
G	3-Propyl-Octansäureamid	$IC_{50}$ (HDAC) > 2000 $\mu\text{mol/L}^a$	
H	3-Methyl-Hexansäureamid	$IC_{50}$ (HDAC) > 2000 $\mu\text{mol/L}^a$	

a: Löslichkeitsgrenze im Testsystem überschritten



**Abbildung 4-22:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 6 und Angabe der  $IC_{50}$ (HDAC) nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm SD$ ).

A	(±)-3-Methyl-Hexansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 781 $\mu\text{mol/L}$	SE: 221 $\mu\text{mol/L}$
B	(±)-3-Propyl-Oktansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 1250 $\mu\text{mol/L}$	SE: 530 $\mu\text{mol/L}$
C	(±)-3-Pentyl-5-Hexinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 2831 $\mu\text{mol/L}$	SE: 1726 $\mu\text{mol/L}$
D	(±)-3-Propyl-Hexansäure	$IC_{50}$ (HDAC) = 5600 $\mu\text{mol/L}$	SE: 6600 $\mu\text{mol/L}$
E	(±)-3-Ethyl-Pentansäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 10 000 $\mu\text{mol/L}$	
F	(±)-3-Propyl-Heptansäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 20 000 $\mu\text{mol/L}$	
G	(±)-3-Propyl-5-Hexinsäure	$IC_{50}$ (HDAC) > 10 000 $\mu\text{mol/L}$	

Auf Grund der Befunde im humanen HDAC-Enzym-Assay wird im folgenden Kapitel zunächst die mögliche Interferenz der VPA-Derivate mit den Entwicklungsreagenzien des HDAC-Enzym-Assays untersucht. Eine solche chemische oder physikalische Interferenz würde zu fälschlicherweise positiven Ergebnissen bezüglich der HDAC-Inhibition führen. Besonders verdächtig auf Grund des ungewöhnlich steilen Kurvenverlaufs war hier das VPA-Derivat 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure (vergleiche Kapitel 4.4.3).

In den darauf folgenden Kapiteln 4.5 bis 4.9 werden dann Untersuchungen dargestellt, die eine mögliche Erklärung der bisher beobachteten Abweichungen (Amid-, Hydroxamsäure sowie  $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate) von der Arbeitshypothese geben, bevor im Kapitel 4.10 die mathematische Korrelation der HDAC-Inhibition mit der teratogenen Eigenschaft der Derivate anhand eines reduzierten Datensatzes durchgeführt wird.

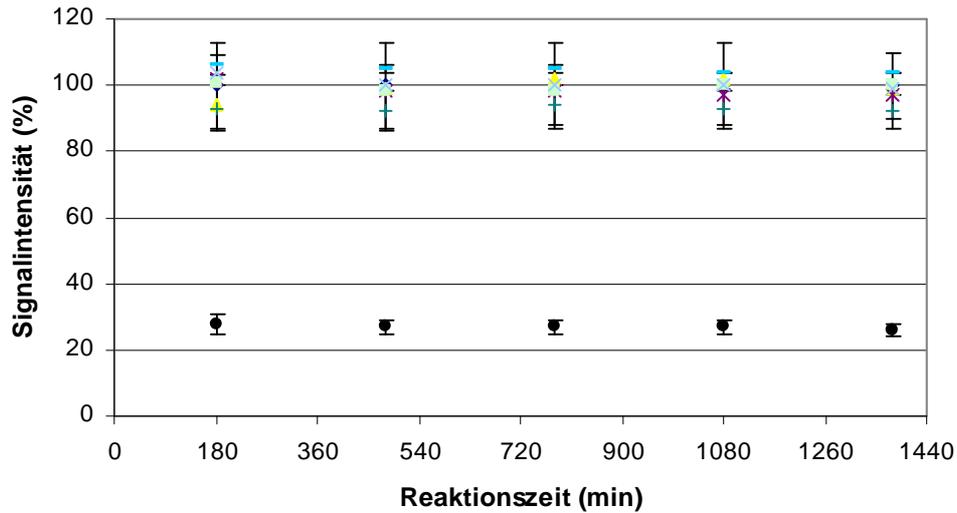
#### **4.4.3 Test der VPA-Derivate auf Interaktion mit dem Entwicklungsprozess des HDAC-Enzym-Assay – Ausschluss falsch positiver Inhibitoren**

Bei dem durchgeführten HDAC-Enzym-Assay handelt es sich letztlich um die chemische Umsetzung eines durch HDAC-Enzyme deacetylierten Substrates mit einem Farbreagenz zur Bildung eines fluorophoren Moleküls, welches mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden kann. Ein Ausbleiben der Farbreaktion würde dann als Inhibition der Enzymfunktion interpretiert, könnte jedoch theoretisch auch durch chemische oder physikalische Interferenz mit dem Entwicklungsprozess selbst ausgelöst werden (z.B. durch chemische Reaktion mit dem Substrat oder dem Farbreagenz). Um Substanzen auszuschließen, die einen solchen Effekt verursachen könnten und somit als falsch-positive HDAC-Inhibitoren gelten würden, wurden unter Anwesenheit oder Abwesenheit der Testsubstanz in einer Konzentration nahe der bestimmten  $IC_{50}$ (HDAC) die Reaktionsentwicklung anhand eines bereits deacetylierten Standardsubstrates durchgeführt und im zeitlichen Verlauf verfolgt. Sowohl eine Abweichungen vom maximal erreichten Fluoreszenzsignal als auch eine zeitliche Verzögerung der Ausbildung des Signals im Vergleich zu einer Kontrollprobe würde eine Interferenz anzeigen und ermöglichte die Identifikation eines falsch-positiven HDAC-Inhibitors.

Es wurde eine Vielzahl repräsentativer VPA-Derivate auf eine mögliche Interferenz untersucht (Abbildung 4-23), wobei zunächst keines der untersuchten Strukturanaloga einen Einfluss auf die zeitliche Entwicklung oder die maximale Intensität des Fluoreszenzsignals nahm. Zur besseren Veranschaulichung eines falsch positiven HDAC-Inhibitors wurde auch eine Lösung von Vitamin C (2,00 mmol/L) untersucht. Diese zeigte eine deutliche Verringerung des Fluoreszenzsignals auf ca. 35 % des Kontrollsignals.

Von besonderem Interesse war die Untersuchung des VPA-Derivates 2-Propyl-2-Hydroxy-Pentansäure, da diese Substanz im HDAC-Enzym-Assay zuvor eine ungewöhnlich steile Dosis-Aktivitäts-Kurve aufwies. Diese Substanz wurde daher in zwei Konzentrationen von 4000  $\mu\text{mol/L}$  und 20 mmol/L auf Interferenz mit dem Entwicklungsreagenz getestet (Abbildung 4-24). Es wurde deutlich, dass die Konzentrationsstufe kurz unterhalb der zuvor bestimmten  $IC_{50}$ (HDAC) dieser Verbindung von 5300  $\mu\text{mol/L}$  noch keinerlei Einfluss auf die Entwicklungsreaktion nimmt, während eine Konzentration von 20000  $\mu\text{mol/L}$  die Fluoreszenz-Signalintensität auf weniger als 5 % reduziert. Dieses VPA-Derivat ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zuvor falsch-positiv bewertete Substanz, die nicht die HDAC-Enzymfunktion hemmt, sondern vielmehr die Farbreaktion des Assays empfindlich stört.

Andere getestete VPA-Derivate zeigten keine solche konzentrationsabhängige Wirkung auf den Entwicklungsprozess bis zu Konzentrationen von 20 mmol/L, sodass alle übrigen VPA-Derivate echte HDAC-Inhibitoren darstellen.

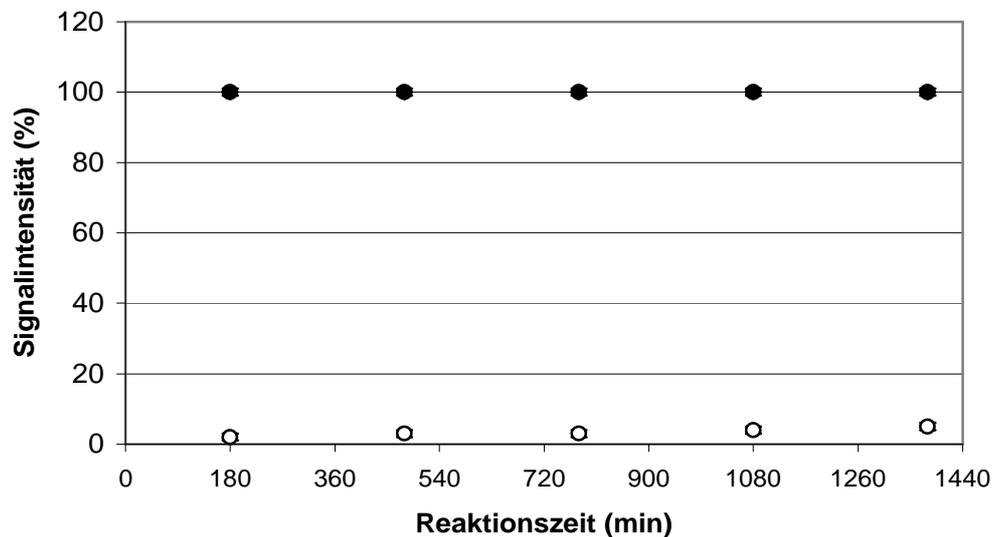


**Abbildung 4-23:** Einfluss auf die Entwicklungsreaktion des HDAC-Enzym-Assays durch ausgewählte VPA-

Derivate ( $n = 4 \pm SD$ ).

Schwarze Kreise Vitamin C ( $c = 2 \text{ mmol/L}$ )

Helle Symbole VPA-Derivate (Valproinsäure, Valpromid, Valproinhydroxamsäure, S-2-Pentyl-4-Pentinsäure, ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäureamid, S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure) und Kontrolllösung



**Abbildung 4-24:** Einfluss auf die Entwicklungsreaktion des HDAC-Enzym-Assays durch 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure ( $n=4 \pm SD$ ).

Schwarze Kreise Kontrolllösung und 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure bei  $c = 4 \text{ mmol/L}$

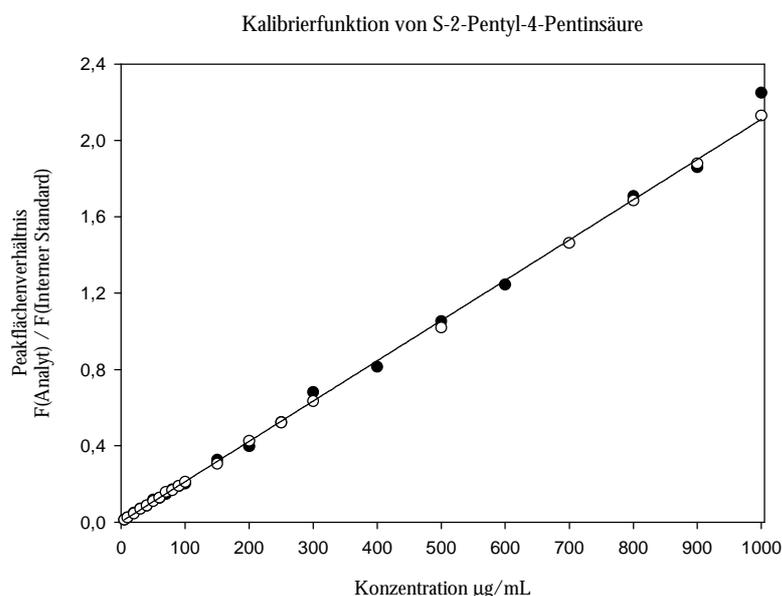
Offene Kreise 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure bei  $c = 20 \text{ mmol/L}$

## 4.5 Verfahrensentwicklung zur Bestimmung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure aus humanen und tierischen Matrices

Die Entwicklung der enantioselektiven und quantitativen Bestimmungsmethode von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure basierte schematisch auf der Derivatisierung der chiralen Karbonsäure mit Hilfe eines chiralenamins zum diastereomeren Amid. Diese Vorgehensweise war notwendig, da sich das stereogene Zentrum an C2 in direkter Nachbarschaft zur reaktiven Karbonsäurefunktion befand und eine Stereokonversion *in vivo* nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Derivatisierungsstrategie mittels chiraalem Amin war bereits früher zur Untersuchung der optischen Reinheit enantiomerer VPA-Derivate von HAUCK et al. 1992 verwendet worden (Kapitel 6.1.6) und wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmungsmethode von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure optimiert, validiert und im akkreditierten Laborqualitätsmanagementsystem eingefügt. Die Aufarbeitung der untersuchten Gewebe- und Plasmaproben erfolgte wie in Kapitel 6.5.3 beschrieben.

### 4.5.1 Linearität und Kalibrierfunktion

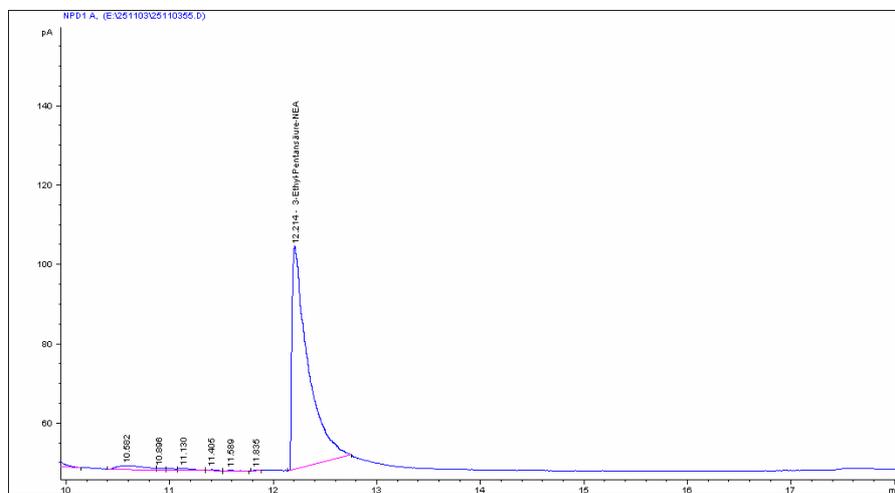
Die Linearität der Kalibrierfunktion wurde durch Bestimmung von dotierten Lithium-Heparin-Mausplasmaproben in einem Konzentrationsbereich von 5 – 1000 µg/mL und Aufarbeitung der Proben nach Methode 6.5.3 ermittelt. Die Auswertung der jeweils doppelt bestimmten Proben erfolgte mittels der Software Valoo<sup>®</sup> und zeigte einen linearen Funktionsionszusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal im Konzentrationsbereich von 5 – 1000 µg/mL mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0,998 und einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 4,7 % (Abbildung 4-25).



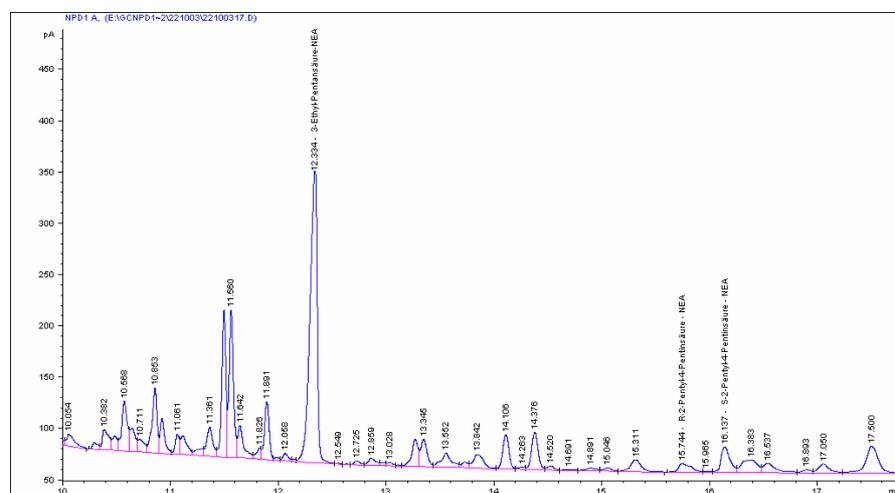
**Abbildung 4-25:** Kalibrierfunktion von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure mit  $f(x) = 0,0021 * x - 0,0015$ ;  $r^2 = 0,998$ .

## 4.5.2 Probenblindwerte und Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Blindwerte wurden Plasma- und Gewebeprobe unbehandelter Mäuse sowie Plasmaproben freiwilliger Humanprobanden analysiert; zur Bestimmung der Wiederfindung in einem Konzentrationsbereich von 30 – 700 µg/mL bzw. 30 - 700 µg/g sowie der Ermittlung der Präzision des Verfahrens wurden dotierte Plasma- und Gewebeprobe nach dem Analysenprotokoll aufgearbeitet und quantifiziert (Tabelle 4-9). Die Selektivität des Verfahrens war gegeben, weil zum Elutionszeitpunkt des derivatisierten Analyten kein Störpeak in den Chromatogrammen der Blindwerte von Humanplasma, Mausplasma, Gehirn, Milz und Niere der Maus auftrat. Bei Maus-Leberproben konnte jedoch reproduzierbar ein Störpeak in Blindproben gemessen werden, der in der Wiederfindungsrate dotierter Maus-Leberproben als Leerwert berücksichtigt wurde (Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27).



**Abbildung 4-26:** Chromatogramm einer Blindwertprobe von Humanplasma. Kein Störpeak zum Elutionszeitpunkt des Analyten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure von  $t = 16.2$  Minuten.



**Abbildung 4-27:** Chromatogramm einer Blindwertprobe von Maus-Leber. Ein quantifizierbarer Störpeak zum Elutionszeitpunkt des Analyten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ( $t = 16.2$  Minuten) von 16 µg/mL.

**Tabelle 4-9:** Probenblindwerte und Wiederfindungsraten von derivatisierter S-2-Propyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen Matrices von Mensch und Maus.

HP: Humanplasma; MP: Mausplasma; MG: Mausgehirn; ML: Mausleber;  
 MN: Mausniere; MM: Mausmilz

Matrix	Dotierung (µg/mL)	Anzahl (n)	Messwert ± SD (µg/mL) bzw. (mg/g)	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
HP	0	8	< LOD		
HP	30	8	22 ± 2	73	9
HP	70	8	49 ± 4	70	8
HP	300	8	262 ± 6	87	2
HP	700	8	686 ± 23	98	3
MP	0	8	< LOD		
MP	30	8	32 ± 1	107	3
MP	70	8	70 ± 2	100	3
MP	300	8	291 ± 7	97	2
MP	700	8	786 ± 38	112	5
MG	0	6	< LOD		
MG	30	6	30 ± 1	100	3
MG	70	6	62 ± 1	89	2
MG	300	6	253 ± 8	84	3
MG	700	6	598 ± 14	85	2
ML	0	6	16 ± 13*		
ML	30	6	56 ± 9	133*	16
ML	70	6	114 ± 5	140*	4
ML	300	6	421 ± 12	135*	3
ML	700	6	913 ± 68	128*	7
MN	0	6	< LOD		
MN	30	6	29 ± 4	97	14
MN	70	6	76 ± 2	109	3
MN	300	6	277 ± 16	92	6
MN	700	6	628 ± 21	90	3
MM	0	3	< LOD		
MM	30	3	36 ± 3	120	8
MM	70	3	72 ± 6	103	8
MM	300	3	293 ± 20	98	7
MM	700	3	733 ± 28	105	4

\* Bei Maus-Leberproben wurde ein quantifizierbarer Störpeak gemessen (16 µg/mL), der in der Wiederfindungsrate dotierter Maus-Leberproben als Leerwert berücksichtigt wurde.

Die mittlere Wiederfindungsrate von 2-Pentyl-4-Pentinsäure im Konzentrationsbereich von 30 - 700 µg/mL bzw. µg/g in den untersuchten Matrices wurde aus dem Mittelwert der einzelnen Konzentrationswerte bestimmt und lag zwischen 82 und 134 % (Tabelle 4-10). Auffällig war hier insbesondere die sehr hohe Wiederfindung aus Maus-Lebergewebe von ca. 130 %. Die genaue Ursache für diesen Befund bleibt unklar, eventuell handelt es sich hier um eine Signalverstärkung (*signal enhancement*) durch einen Leberinhaltsstoff. Der mittlere Variationskoeffizient der Analysen lag bei einer Dotierung zwischen 30 und 700 µg/ml bzw. µg/g bei allen untersuchten Matrices unterhalb von 10 %, womit eine hohe Präzision des Analyseverfahrens gegeben war. Das entwickelte Bestimmungsverfahren erfüllt damit die Richtlinien der FEDERAL DRUG ADMINISTRATION 2001 für bioanalytische Bestimmungsmethoden im Bereich der Pharmazeutischen Industrie.

**Tabelle 4-10:** Zusammenfassung der Wiederfindung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in Abhängigkeit der Matrix

<b>Matrix</b>	<b>Æ - Wiederfindung (%)</b>	<b>Æ - Variationskoeffizient (%)</b>
Human – Plasma	<b>82</b>	5
Maus – Plasma	<b>104</b>	3
Maus – Gehirn	<b>90</b>	3
Maus – Leber	<b>134</b>	8
Maus – Niere	<b>97</b>	7
Maus – Milz	<b>107</b>	7

### 4.5.3 Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit

Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit (*day-to-day repeatability*) wurden Plasma- und Gewebeproben unbehandelter Mäuse bzw. Plasmaproben freiwilliger Humanprobanden als Leerwerte bzw. dotierte Proben nach dem Analysenprotokoll aufgearbeitet und quantifiziert. Die Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit wurde in je vier Konzentrationsstufen an acht bzw. sechs verschiedenen Tagen in einem Zeitraum von drei Wochen bestimmt (Tabelle 4-11).

Die Selektivität des Analyseverfahrens konnte noch einmal bestätigt werden, da zum Elutionszeitpunkt der derivatisierten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure kein Störpeak in den Chromatogrammen von Humanplasma, Mausplasma, Gehirn und Niere der Maus auftrat. Bei Maus-Leberproben wurde reproduzierbar ein Störpeak gemessen, der in der Wiederfindungsrate der Matrix Maus-Leber als Leerwert berücksichtigt wurde.

**Tabelle 4-11:** Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit bei Analyse von derivatisierter S-2-Pentyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen tierischen und humanen Matrices.

HP: Humanplasma; MP: Mausplasma; MG: Mausgehirn; ML: Mausleber; MN: Mausniere;  
MM: Mausmilz

Matrix	Dotierung ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Anzahl (n)	Messwert $\pm$ SD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bzw. ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Wiederfindung (%)	Variations- koeffizient (%)
HP	0	8	< LOD		
HP	30	8	$22 \pm 3$	73	14
HP	70	8	$53 \pm 7$	76	13
HP	300	8	$268 \pm 31$	89	12
HP	700	8	$645 \pm 26$	92	4
MP	0	8	< LOD		
MP	30	8	$34 \pm 2$	113	6
MP	70	8	$76 \pm 6$	109	8
MP	300	8	$323 \pm 24$	108	7
MP	700	8	$747 \pm 35$	107	5
MG	0	6	< LOD		
MG	30	6	$31 \pm 1$	103	3
MG	70	6	$64 \pm 2$	91	3
MG	300	6	$258 \pm 10$	86	4
MG	700	6	$614 \pm 23$	88	4
ML	0	6	$20 \pm 9^*$		
ML	30	6	$55 \pm 18$	117*	33
ML	70	6	$107 \pm 18$	124*	17
ML	300	6	$379 \pm 41$	120*	11
ML	700	6	$867 \pm 77$	121*	9
MN	0	6	< LOD		
MN	30	6	$33 \pm 5$	110	15
MN	70	6	$77 \pm 3$	110	4
MN	300	6	$307 \pm 23$	102	8
MN	700	6	$681 \pm 64$	97	9

\* Bei Maus-Leberproben wurde ein quantifizierbarer Störpeak von  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  gemessen, der in der Wiederfindungsrate dotierter Maus-Leberproben als Leerwert berücksichtigt wurde.

Die durchschnittliche Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit und der mittlere Variationskoeffizient dieser Messungen sind in Tabelle 4-12 dargestellt. Mit Ausnahme der Matrix Maus-Leber mit einem Variationskoeffizienten von  $< 20$  % lag der mittlere Variationskoeffizient der Tag-zu-Tag-Analysen bei einer Dotierung zwischen 30 und 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw.  $\mu\text{g}/\text{g}$  bei unter 15 %. Eine sehr gute Präzision des Analysenverfahrens konnte damit bestätigt werden. Auch bei diesen Messungen konnten ungewöhnlich hohe Wiederfindungsraten für die Matrix Maus-Leber von ca. 120 % bestimmt werden, deren Ursachen unklar bleiben.

**Tabelle 4-12:** Mittlere Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit (*day-to-day repeatability*) und mittlerer Variationskoeffizient von derivatisierter S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in verschiedenen Matrices

<b>Matrix</b>	<b><math>\bar{x}</math>-Wiederfindung (Tag-zu-Tag) (%)</b>	<b><math>\bar{x}</math>-Variationskoeffizient (Tag-zu-Tag) (%)</b>
Human – Plasma	<b>83</b>	11
Maus – Plasma	<b>109</b>	7
Maus – Gehirn	<b>92</b>	3
Maus – Leber	<b>121</b>	18
Maus – Niere	<b>105</b>	9

#### 4.5.4 Ergebnisunsicherheit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (*Limit of Detection, LOD; Limit of Quantification, LOQ*) wurde anhand der Kalibrierfunktion nach DIN 32645 rechnerisch mit der Software Valoo<sup>®</sup> berechnet. Hierzu wurden im Konzentrationsbereich von 5 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dotierte Mausplasma-proben bei 20 Konzentrationen je dreifach bestimmt und mittels der Kalibriermethode ausgewertet. Für das beschriebene Verfahren betrug die Bestimmungsgrenze (LOQ) 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und die Nachweisgrenze (LOD) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Die Ergebnisunsicherheit wurde aus dem Doppelten der mittleren Tag-zu-Tag-Variationskoeffizienten abgeleitet und auf einen Wert von 20 % festgelegt. Unter Berücksichtigung der erhöhten Verfahrensvariationskoeffizienten für die Matrix Maus-Leber wurde für diese Matrix eine Ergebnisunsicherheit von 40 % bestimmt.

## 4.6 Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure

### 4.6.1 Plasmabindungsraten in Maus und Mensch

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindungsrate der S-2-Pentyl-4-Pentinsäure wurde die unter 6.5.5 beschriebene Methode angewandt. Als Extraktionskartusche wurde die Vivaspin 500 mit Polyethersulfon-(PES)-Membran ausgewählt. Um Adsorptionseffekte am Membranmaterial der Kartusche auszuschließen, wurden parallel zu dotierten Plasmaproben auch dotierte Pufferproben (0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH=7,4) analysiert (Tabelle 4-13). Die verwendete Kartusche zeigte keine Adsorptionseffekte, sodass PES-Membranen zur Bestimmung dieses Analyten geeignet erscheinen.

Aus den analysierten Plasmaproben konnte eine mittlere Proteinbindungsrate für den Konzentrationsbereich von 30 - 900 µg/mL von 91 % für Humanplasma und 69 % für Mausplasma berechnet werden. Wie erwartet nahm die Plasmabindung mit steigender Konzentration dabei leicht ab. Im Vergleich zu VPA mit einer Plasmabindungsrate von 12 % (Maus) und 90 % (Mensch) (Kapitel 2.4) zeigt die lipophile S-2-Pentyl-4-Pentinsäure erwartungsgemäß eine gesteigerte Plasmaproteinbindung, insbesondere in der Maus.

**Tabelle 4-13:** Proteinbindungsraten von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in Mensch und Maus

Spezies	Konzentration der Probe ± SD# (mg/mL)	Konzentration des Zentrifugats ± SD# (mg/mL)	Proteinbindung (%)
<b>Kontrolle*</b>	670 ± 19	681 ± 8	0 <sup>a</sup>
	65 ± 3	66 ± 3	0 <sup>a</sup>
<b>Maus</b>	951 ± 49	464 ± 36	51
	852 ± 57	236 ± 37	72
	221 ± 6	61 ± 7	72
	72 ± 12	15 ± 2	80
	821 ± 19	202 ± 6	76
<b>Human</b>	684 ± 24	128 ± 7	82
	261 ± 7	17 ± 2	95
	60 ± 3	< LOQ	100 <sup>b</sup>
	25 ± 1	< LOQ	100 <sup>b</sup>

# berechnet aus n=4 unabhängigen Analysen

\* dotierte Phosphatpufferlösung (0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH = 7,4)

<sup>a</sup> vollständiger Übergang des Analyten in das Zentrifugat angenommen

<sup>b</sup> für eine angenommene Konzentration im Zentrifugat von 0 µg/mL

#### 4.6.2 Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven in drei Mausstämmen - Pharmakokinetische Parameter

Zur Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure wurden die zeitabhängigen Blutplasmakonzentrationen nach subkutaner Gabe von 1,5 mmol/kg in drei unterschiedlichen Mäusestämmen nach der entwickelten Analysenmethode bestimmt (Kapitel 6.5.3). Der Hsd:Win NMRI Auszuchtstamm wurde dabei als das klassische Tiermodell zur Bewertung des teratogenen Potentials von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure herangezogen, während die St8SiaIV knock-out-Mäuse im Rahmen eines zweiten Forschungsprojektes untersucht wurden. St8SiaIV knock-out und Wildtyp basierten genetisch auf dem C57/BL6-Inzuchtstamm. Die Ergebnisse der Pharmakokinetik dieser Tiere wurden im Rahmen der Untersuchung des Einflusses des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (N-CAM) und der Polysialinsäure in der Entstehung von VPA induzierten Neuralrohrdefekten verwendet (HOFFMANN 2004). Im Rahmen dieser Arbeit dienten der Wildtyp und knock-out Stamm als Tiermodell mit unterschiedlichen genetischen Hintergrund zu NMRI, da Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten zwischen einzelnen Mäusestämmen nicht auszuschließen waren. Die zeitabhängigen Plasmakonzentrationen sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst und in Abbildung 4-28 graphisch dargestellt.

**Tabelle 4-14:** Zeitabhängige Plasmakonzentrationen nach s.c. Gabe einer Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in drei Mausstämmen (n=3 ± SD).

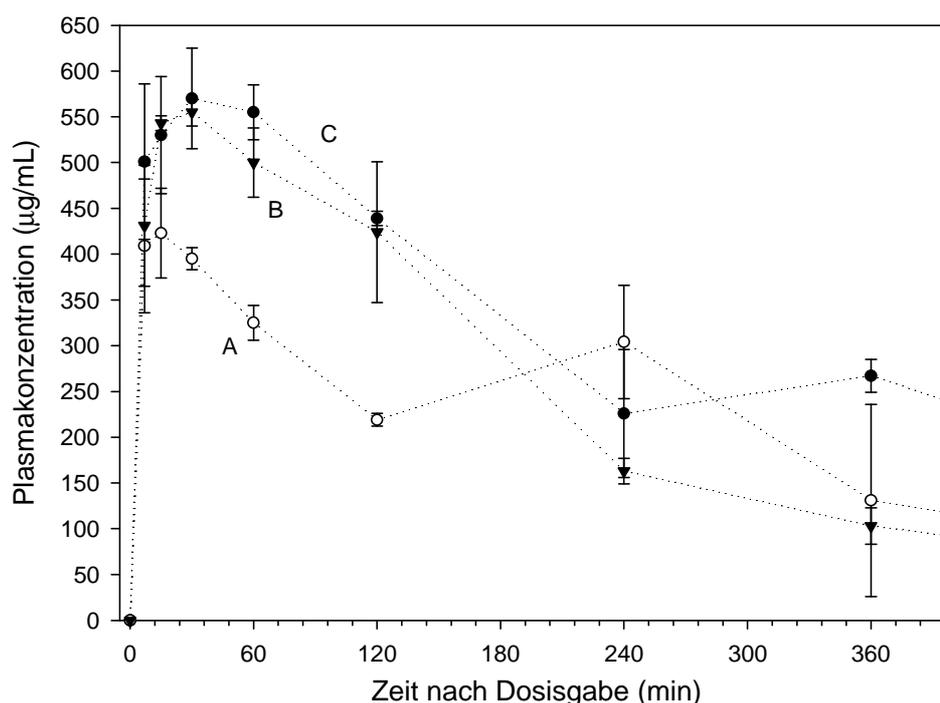
Zeitpunkt nach Dosisgabe (min)	Plasmakonzentration ± SD <sup>a</sup>		
		(mg/mL)	
	Hsd:Win NMRI	St8SiaIV <sup>(+/+)</sup>	St8SiaIV <sup>(-/-)</sup>
<b>7</b>	501 ± 85	409 ± 73	431 ± 66
<b>15</b>	530 ± 64	423 ± 49	543 ± 8
<b>30</b>	570 ± 55	395 ± 12	555 ± 15
<b>60</b>	555 ± 30	325 ± 19	500 ± 38
<b>120</b>	439 ± 8	219 ± 7 <sup>b</sup>	424 ± 77
<b>240</b>	226 ± 70	304 ± 62	163 ± 14
<b>360</b>	267 ± 18	131 ± 105	103 ± 20
<b>720</b>	< LOQ	< LOD	< LOD

<sup>a</sup>Mittelwert und Standardabweichung berechnet von je drei Versuchstieren, wobei jede Plasmaprobe doppelt analysiert wurde.

<sup>b</sup> n=2 Tiere

Der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentration verhält sich in allen drei Mausstämmen sehr ähnlich mit einem leicht verringerten Plasmamaximum für den C57/BL6-Wildtypstamm. Die Plasmaspitzenkonzentration wurde nach einer Zeit von 30 Minuten mit Konzentrationen von ca. 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  erreicht. Auffällig war die im Vergleich zu VPA (Kapitel 2.4) deutlich längere Verweilzeit von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im Blutplasma der untersuchten Mäuse.

Ebenfalls auffällig ist, dass kein Unterschied im pharmakokinetischen Profil zwischen NMRI Mäusen und knock-out-Mäusen festzustellen war. Die genetische Veränderung zeigt daher keinen Einfluss auf die Kinetik der Testsubstanz, während eine leicht abweichende Pharmakokinetik (leicht erniedrigte Plasmalevel) zwischen knock-out und Wildtypstamm festgestellt werden konnte. Die weitere Auswertung bezüglich pharmakokinetischer Parameter erfolgte mit Hilfe des Softwareprogrammes WinNonLin<sup>®</sup> 4.2 unter Voraussetzung eines non-compartment models nach extravaskulärer Dosisgabe (Kapitel 6.5.6). Alle Datenpunkte wurden hierbei gleich gewichtet; zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde die linear-trapezoide Meßmethode herangezogen und die Daten in Tabelle 4-15 zusammengefasst.



**Abbildung 4-28:** Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven dreier Mausstämmen nach s.c. Gabe einer Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.

A	offene Kreise	St8SiaIV <sup>(+/+)</sup> -Mausstamm
B	schwarze Dreiecke	St8SiaIV <sup>(-/-)</sup> -Mausstamm
C	schwarze Kreise	Hsd:Win NMRI-Mausstamm

Mit Hilfe der pharmakokinetischen Analyse konnten Unterschiede zwischen den Mausstämmen festgestellt werden. Die maximale Plasmakonzentration variierte deutlich zwischen den drei Mausstämmen mit Werten von 480 und 630  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , trat aber zu einem vergleichbaren Zeitpunkt von ca. 30 min nach Dosisgabe auf. Ebenfalls unterschiedlich sind die Halbwertszeiten und hieraus abgeleitet die Mean-Residence-Time (MRT). Insbesondere zwischen knock-out und Wildtyp-Stamm wird deutlich, dass S-2-Pentyl-4-Pentinsäure eine längere Verweilzeit im Wildtypstamm zeigt, jedoch ist interessanterweise die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area-under-Curve, AUC) bei beiden Mausstämmen nahezu identisch. Alle diese Parameter sind im NMRI-Mausstamm im direkten Vergleich deutlich erhöht.

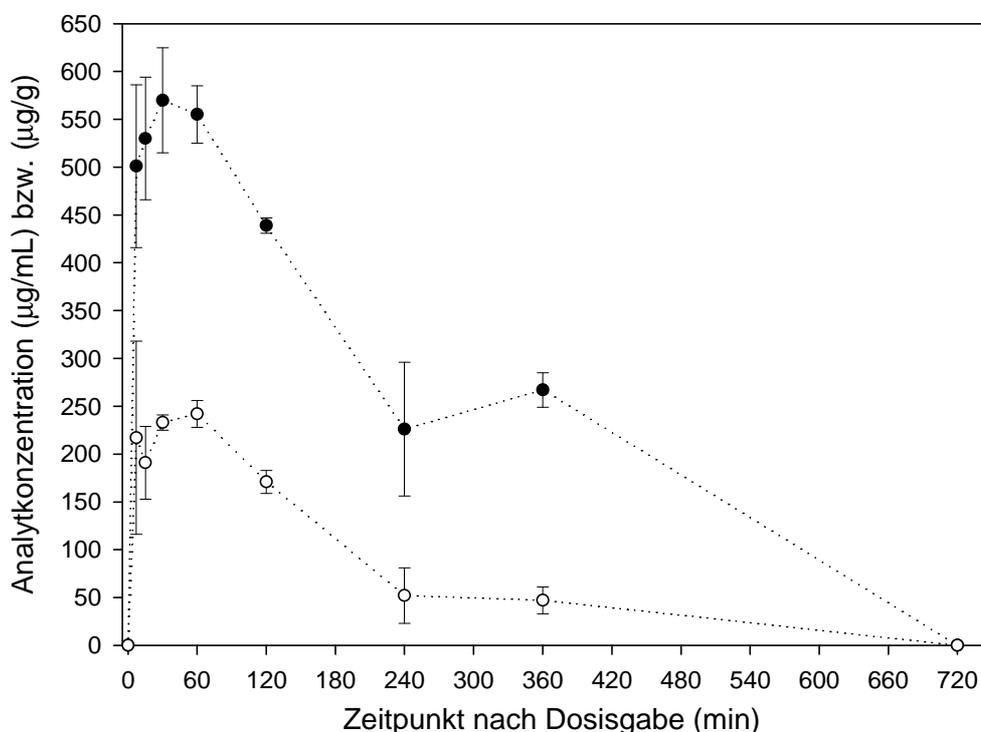
In Relation zur bekannten Pharmakokinetik von VPA besitzt S-2-Pentyl-4-Pentinsäure eine um den Faktor 5 verlängerte Halbwertszeit. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf strukturelle Eigenschaften des Moleküls zurückzuführen, da die MRT im Vergleich zu VPA sehr viel größer ist. Vermutliche Ursache ist die Dreifachbindung des Moleküls an C4, da bereits bei einer analogen Strukturvariante, der ( $\pm$ )-2-Propyl-4-Hexinsäure, ein solcher Effekt beobachtet werden konnte (HAUCK 1992).

**Tabelle 4-15:** Pharmakokinetische Parameter nach s.c. Gabe von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in drei Mausstämmen (Non-compartment-Analyse).

Parameter	Hsd:Win NMRI	Mausstamm	
		St8SiaIV <sup>(+/+)</sup>	St8SiaIV <sup>(-/-)</sup>
$t_{\max}$ (min)	30	15	30
$c_{\max}$ (mg/mL)	633	476	568
$l_z$ (1/h)	0,163	0,202	0,330
$t_{1/2}$ (h)	4,24	3,44	2,10
$AUC_{0-\infty}$ (h*mg/mL)	3443	2068	2015
$V_z$ (L/kg)	0,454	0,605	0,387
Cl (mL/h/kg)	67	118	118
MRT (h)	6,22	5,01	3,01

### 4.6.3 Konzentrations-Zeit-Kurven von Gehirnproben - Blut-Hirn-Schranke

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob und in welchem Maße S-2-Propyl-4-Pentinsäure die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, wurden an den bereits bekannten Zeitpunkten nach Dosisbehandlung mit 1,5 mmol/kg Gehirnproben der Tiere entnommen, analysiert und mit dem entsprechenden Plasmalevel verglichen. Beispielhaft wird dies in Abbildung 4-29 für den NMRI Mausstamm gezeigt. Eine Zusammenfassung der Werte für die drei Mausstämme wird in Tabelle 4-16 dargestellt. Maximale Gehirnkonzentrationen von 150 – 250 µg/g Gehirn wurden nach einem Zeitpunkt von etwa 60 Minuten erreicht und traten somit zeitlich leicht verzögert zum Blutplasmamaximum bei 30 Minuten auf. Der Gehirnkonzentrationspiegel betrug zwischen 35 und 46 % der Plasmakonzentration, wobei unter Berücksichtigung der zuvor bestimmten Plasmabindungsrate von 70 % und der Annahme, dass ausschließlich die im Plasma ungebunden vorliegende 2-Pentyl-4-Pentinsäure in das Gehirn übertreten kann, ein rechnerischer Durchtritt von 104 – 115 % bestimmt wurde. Die gute Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zeigt sich auch im direkten Vergleich zu Valproinsäure Gehirnkonzentrationen, die nur ca. 10 % der Plasmakonzentration erreichen. Die Blut-Hirn-Schranke ist für S-2-Pentyl-4-Pentinsäure somit keine Barriere.



**Abbildung 4-29:** Konzentrations-Zeit-Kurve von Plasma und Gehirnproben des NMRI-Mausstammes nach s.c. Gabe von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.  
offene Kreise: Gehirn  
schwarze Kreise: Plasma

**Tabelle 4-16:** Plasma- und Gehirnkonzentrationen von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nach Gabe von 1,5 mmol/kg in drei verschiedenen Mausstämmen.

Parameter	Mausstamm		
	Hsd:Win NMRI	St8SiaIV <sup>(+/+)</sup>	St8SiaIV <sup>(-/-)</sup>
<b>c<sub>max</sub>(Plasma)</b> (mg/mL)	570	423	555
<b>c<sub>max</sub>(Gehirn)</b> (mg/g)	242	150	254
<b>C<sub>Gehirn</sub> / C<sub>Plasma</sub></b> (%)	42	35	46
<b>Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke (%)<sup>a</sup></b>	111	104	115

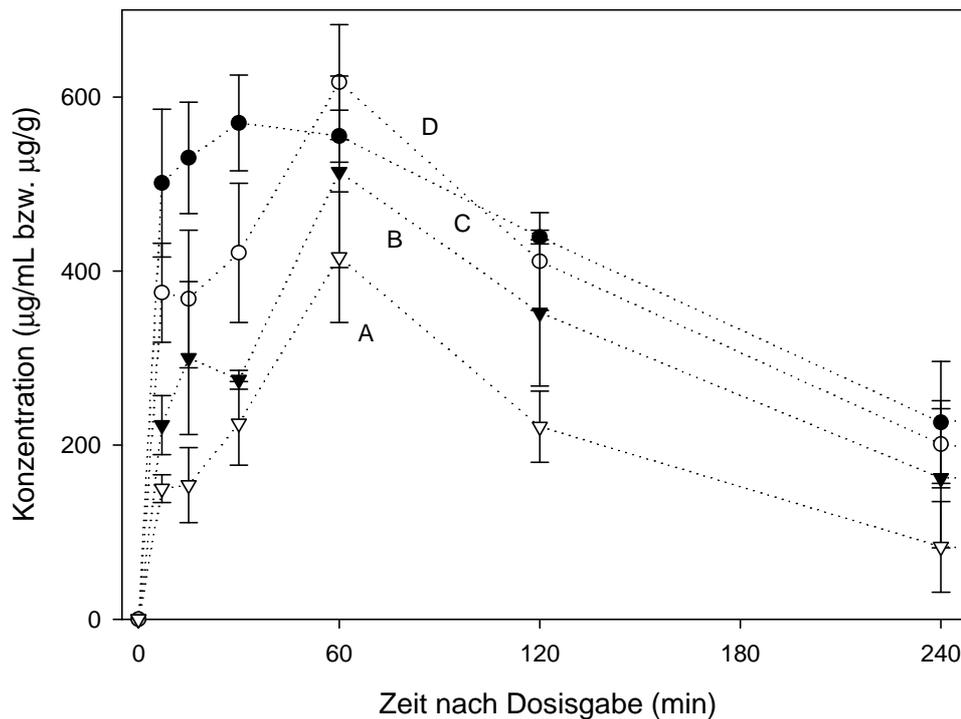
<sup>a</sup>Unter der Voraussetzung einer Plasmabindungsrate von 70 % und der Annahme, dass nur ungebundene S-2-Pentyl-4-Pentinsäure durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden kann.

#### 4.6.4 Konzentrationsverläufe in weiteren Geweben der Maus

Zur Untersuchung der Verteilung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im Organismus der Maus wurden auch die zeitlichen Konzentrationsverläufe dieses VPA-Derivates in den Geweben Leber, Niere und Milz der drei Mausstämmen bestimmt. Da alle drei Gewebe gut durchblutete Organe darstellen, wurde mit einer annähernd identischen Konzentration wie im Blutplasma gerechnet. Der Vergleich der jeweiligen Maximalkonzentrationen ist in Tabelle 4-17 für alle drei Mausstämmen zusammengefasst und die zeitlichen Konzentrationsverläufe in Abbildung 4-30 exemplarisch für den NMRI-Mausstamm graphisch dargestellt.

**Tabelle 4-17:** Vergleich der maximalen Konzentrationen in den Geweben der untersuchten Mausstämmen nach Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure zum angegebenen Zeitpunkt.

Parameter	Mausstamm		
	Hsd:Win NMRI	St8SiaIV <sup>(+/+)</sup>	St8SiaIV <sup>(-/-)</sup>
<b>c<sub>max</sub>(Plasma)</b> (mg/mL)	570 (30 min)	423 (15 min)	555 (30 min)
<b>c<sub>max</sub>(Leber)</b> (mg/g)	617 (60 min)	299 (30 min)	463 (30 min)
<b>c<sub>max</sub>(Niere)</b> (mg/g)	514 (60 min)	237 (60 min)	378 (60 min)
<b>c<sub>max</sub>(Milz)</b> (mg/g)	416 (60 min)	222 (30 min)	317 (60 min)



**Abbildung 4-30:** Konzentrations-Zeit Verlauf in unterschiedlichen Organen der NMRI-Maus nach s.c. Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.

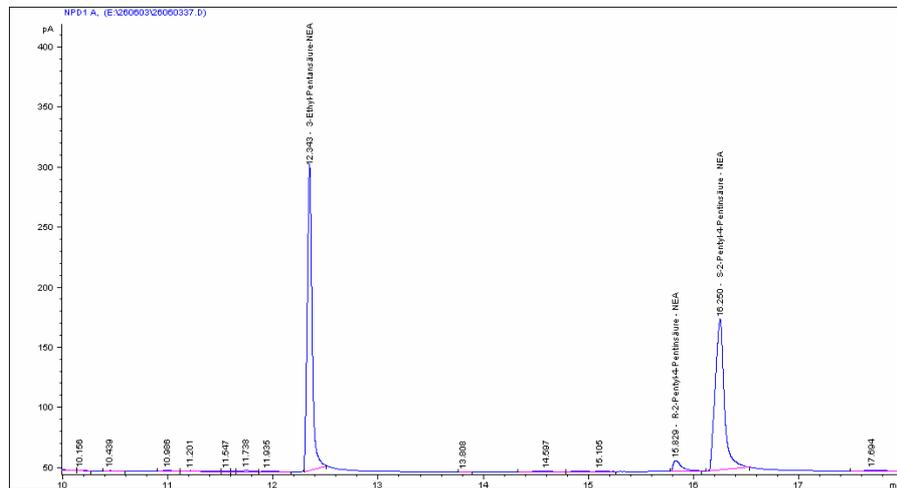
A	offene Dreiecke	Milz
B	schwarze Dreiecke	Niere
C	offene Kreise	Leber
D	schwarze Kreise	Plasma

Die maximalen Gewebekonzentrationen wurden im Vergleich zur Plasmakonzentration zeitlich um ca. 30 Minuten versetzt erreicht. Es fiel auf, dass entgegen der Annahme die Konzentration im Gewebe der Milz deutlich geringer als im Blutplasma war. Bei allen anderen Organen wurde erwartungsgemäß ein mit dem Blutplasma vergleichbarer Konzentrationsspiegel erreicht. Der Vergleich zwischen den drei Mausstämmen weist erneut Unterschiede in den Gewebekonzentrationen auf. Die Gewebe von St8SiaIV knock-out und Wildtypstamm zeigen insgesamt niedrigere Konzentrationen als der NMRI-Stamm, in Relation werden aber auch bei diesen Tieren in Leber und Nierengewebe ein Konzentrationslevel ca. 60 – 80 % der Plasmakonzentration erreicht.

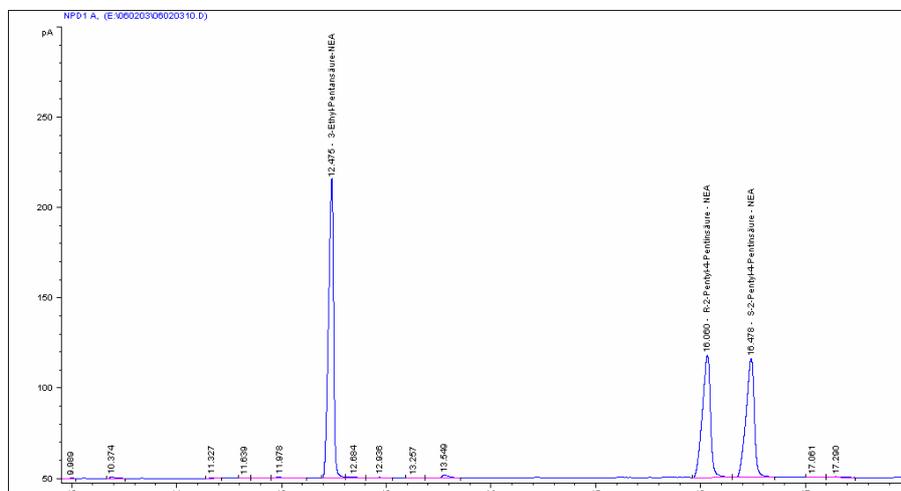
Insgesamt scheint der genetische Hintergrund von C57/BL6 die Verteilung und Kinetik von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im Vergleich zu NMRI zu beeinflussen, wobei auch das knock-out Gen (St8SiaIV) hat einen signifikanten Einfluss zeigt.

#### 4.6.5 Stereokonversion und Metabolisierung von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im Mausmodell

Die Untersuchung von Plasmaproben behandelter Mäuse der drei Stämme zeigte 2 Stunden nach Applikation von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nur sehr geringe Mengen des Stereoisomers R-2-Pentyl-4-Pentinsäure (ca. 20 µg/mL, Abbildung 4-31, Abbildung 4-32). Es handelt sich hierbei um ca. 5 % der Analytkonzentration (Peakflächenvergleich), so dass unter der Annahme einer optischen Reinheit der Ausgangsverbindung von 96 %ee (GRAVEMANN 2002) davon ausgegangen werden kann, dass R-2-Pentyl-4-Pentinsäure nicht in vivo durch Stereokonversion gebildet wurde sondern als optische Verunreinigung bereits appliziert wurde. Die weitergehende GC-MS-Analytik von Plasmaproben behandelter Mäuse konnte keine Hinweise auf weitere Metabolite feststellen. Die teratogenen Effekte von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im NMRI-Mausmodell sind daher auf eine intrinsische Aktivität dieses VPA-Analogen zurückzuführen.



**Abbildung 4-31:** Chromatogramm einer NMRI-Plasmaprobe 2 Stunden nach i.p. Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.



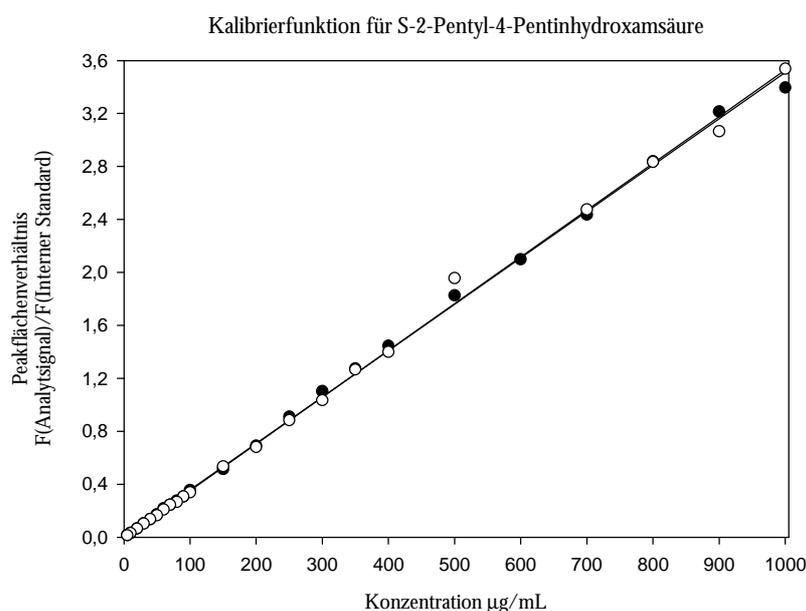
**Abbildung 4-32:** Chromatogramm einer Mausplasmaprobe mit (±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure (500 µg/mL).

## 4.7 Verfahrensentwicklung zur Bestimmung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure aus humanen und tierischen Matrices

Die Entwicklung der enantioselektiven und quantitativen Bestimmungsmethode von 2-S-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure basiert auf der Derivatisierung der Hydroxamsäurefunktion mittels eines chiralen Chlorameisensäurementhylesters (MCF) zum diastereomeren Karbonsäureester. Die Derivatisierung mittels MCF wurde bisher überwiegend zur Derivatisierung chiraler Alkohole verwendet und konnte in dieser Arbeit erfolgreich auf die Hydroxyaminfunktion übertragen werden. Die entwickelte Bestimmungsmethode wurde in das akkreditierte Laborqualitätsmanagementsystem implementiert, die Aufarbeitung der untersuchten Gewebe und Plasma-proben erfolgte wie in Kapitel 6.5.4 beschrieben. Während der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass Maus-Nierenproben nicht mit der entwickelten Methode zu quantifizieren sind. Bei Aufarbeitung dieser Matrix kristallisierte eine farblose Substanz im Injektorblock der Gaschromatographie aus, die zu einem sofortigen Ausfall des Gerätes führte. Die Beschaffenheit dieser Substanz und die Ursache dieser Reaktion bleiben unklar, möglicherweise handelt es sich jedoch um Harnsäurederivate.

### 4.7.1 Linearität und Kalibrierfunktion

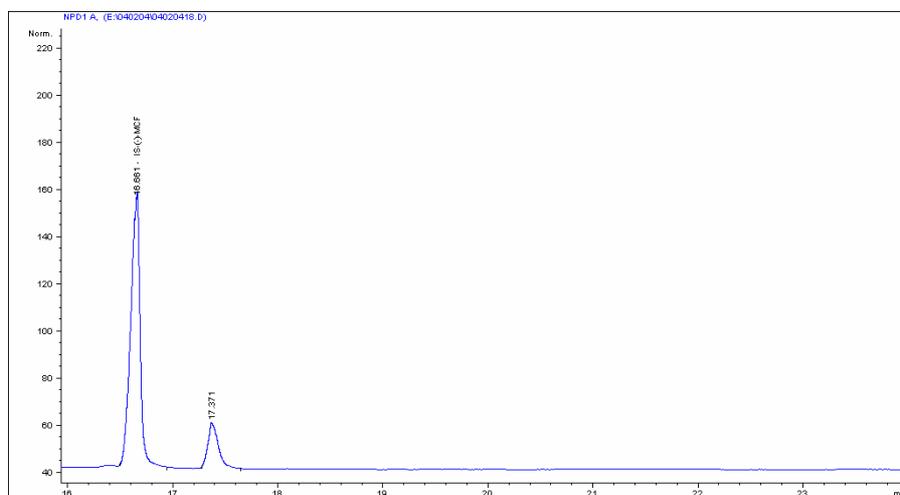
Die Linearität der Kalibrierfunktion wurde durch Bestimmung von dotierten Lithium-Heparin-Mausplasmaproben in einem Konzentrationsbereich von 5 – 1000 µg/mL und Aufarbeitung der Proben nach Methode 6.5.4 ermittelt. Die Auswertung der jeweils doppelt bestimmten Proben erfolgte mittels der Software Valoo<sup>®</sup> und zeigte Linearität in einem Konzentrationsbereich von 5 – 1000 µg/mL mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0,997 und einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 5,5 % (Abbildung 4-33).



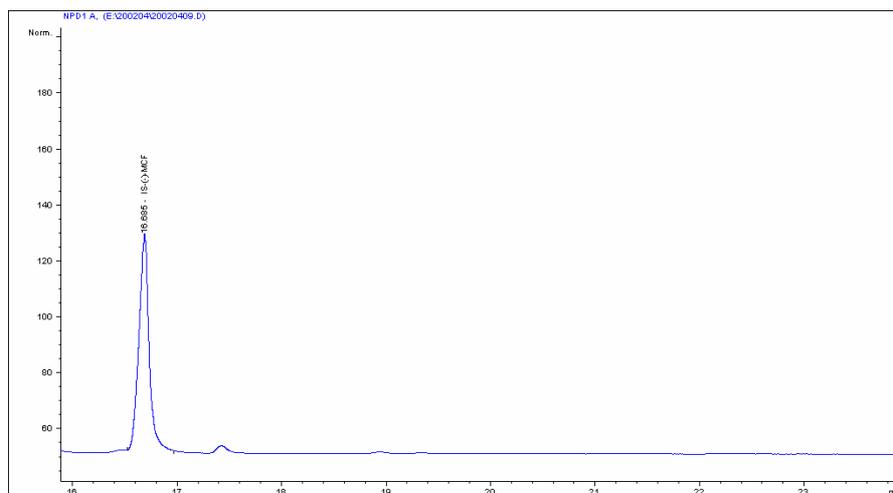
**Abbildung 4-33:** Kalibrierfunktion von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure mit  $f(x) = 0,0035 \cdot x + 0,0033$ ;  $r^2 = 0,997$ .

### 4.7.2 Probenblindwerte und Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Probenblindwerte wurden Plasma- und Gewebeproben unbehandelter Mäuse sowie Plasmaproben freiwilliger Humanprobanden analysiert, zur Bestimmung der Wiederfindung und Präzision entsprechend dotierte Plasma- und Gewebeproben nach dem Analysenprotokoll aufgearbeitet und quantifiziert (Tabelle 4-18). Die Selektivität des Verfahrens ist gegeben, da zum Elutionszeitpunkt der derivatisierten 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure kein Störpeak in den Chromatogrammen der getesteten Matrices auftrat (Abbildung 4-34, Abbildung 4-35).



**Abbildung 4-34:** Chromatogramme einer Blindwertproben aus Humanplasma, kein Störpeak zum Zeitpunkt der Elution von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure von 20,00 Minuten.



**Abbildung 4-35:** Chromatogramme einer Blindwertproben aus Maus-Leber, kein Störpeak zum Zeitpunkt der Elution von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure von 20,00 Minuten.

**Tabelle 4-18:** Probenblindwerte und Wiederfindungsraten von S-2-Propyl-4-Pentinhydroxamsäure aus unterschiedlichen Matrices.

HP: Humanplasma; MP: Mausplasma; MG: Mausgehirn; ML: Mausleber; MM: Mausmilz

<b>Matrix</b>	<b>Dotierung (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>Messwert <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>	<b>Variations- koeffizient (%)</b>
HP	0	8	< LOD		
HP	30	8	$29 \pm 3$	97	10
HP	70	8	$65 \pm 2$	93	3
HP	300	8	$293 \pm 7$	98	2
HP	700	8	$769 \pm 46$	110	6
MP	0	8	< LOD		
MP	30	8	$29 \pm 1$	97	3
MP	70	8	$71 \pm 3$	101	4
MP	300	8	$320 \pm 10$	107	3
MP	700	8	$746 \pm 15$	107	2
MG	0	6	< LOD		
MG	30	6	$26 \pm 2$	87	8
MG	70	6	$64 \pm 3$	91	5
MG	300	6	$288 \pm 7$	96	2
MG	600	6	$568 \pm 20$	95	4
ML	0	6	< LOD		
ML	30	6	$24 \pm 1$	80	8
ML	70	6	$64 \pm 5$	91	8
ML	300	6	$282 \pm 30$	94	11
ML	600	6	$631 \pm 63$	105	10
MM	0	3	< LOD		
MM	30	3	$31 \pm 2$	105	6
MM	70	3	$75 \pm 4$	107	5
MM	300	3	$351 \pm 11$	117	3
MM	700	3	$802 \pm 75$	115	8

**Tabelle 4-19:** Durchschnittliche Wiederfindung und Variationskoeffizient von S-2-Propyl-4-Pentinhydroxamsäure in Abhängigkeit der Probenmatrix.

<b>Matrix</b>	<b>Æ - Wiederfindung (%)</b>	<b>Æ - Variationskoeffizient (%)</b>
Human – Plasma	<b>100</b>	5
Maus – Plasma	<b>103</b>	3
Maus – Gehirn	<b>92</b>	5
Maus – Leber	<b>93</b>	8
Maus – Milz	<b>111</b>	6

Die mittlere Wiederfindung von 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure im Konzentrationsbereich von 30 – 700 µg/mL bzw. µg/mg in den untersuchten Matrices wurde aus dem Mittelwert der einzelnen Wiederfindungen bei vier Konzentrationen bestimmt (Tabelle 4-19) und betrug 92 – 111 %, bei einem gemittelten Verfahrensvariationskoeffizienten unter 10 %, womit eine hohe Präzision des Analyseverfahrens gegeben ist. Das entwickelte Bestimmungsverfahren erfüllt damit die Richtlinien der FEDERAL DRUG ADMINISTRATION 2001 für bioanalytische Bestimmungsmethoden im Bereich der Pharmazeutischen Industrie.

### 4.7.3 Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit

Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit (*day-to-day repeatability*) wurden Plasma- und Gewebeprobe unbehandelte Mäuse und freiwilliger Humanprobanden als Leerwerte bzw. dotierte Proben nach dem Analysenprotokoll aufgearbeitet und quantifiziert. Die Tag-zu-Tag-Wiederholbarkeit wurde in je vier Konzentrationsstufen an acht bzw. sechs verschiedenen Tagen in einem Zeitraum von drei Wochen bestimmt und die Ergebnisse in Tabelle 4-20 zusammengefasst.

Die Selektivität des Analyseverfahrens kann erneut bestätigt werden, da zum Elutionszeitpunkt der derivatisierten 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure kein Störpeak in den Chromatogrammen der untersuchten Matrices zu diesem Zeitpunkt eluierte. Die jeweils gemittelten Wiederfindungen und Verfahrensvariationskoeffizienten sind in Abhängigkeit der Matrix in Tabelle 4-21 dargestellt. Es wurden Wiederfindungsraten von 96 – 105 % bei einem Verfahrensvariationskoeffizienten von < 10 % erreicht.

**Tabelle 4-20:** Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit und Verfahrensvariationskoeffizienten bei Analyse von S-2-Propyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen humanen und tierischen Matrices.

HP: Humanplasma; MP: Mausplasma; MG: Mausgehirn; ML: Mausleber

Matrix	Dotierung (µg/mL)	Anzahl (n)	Messwert ± SD (µg/mL)	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
HP	0	8	< LOD		
HP	30	8	27 ± 3	90	11
HP	70	8	67 ± 5	96	8
HP	300	8	294 ± 13	98	4
HP	700	8	689 ± 63	98	9
MP	0	8	< LOD		
MP	30	8	29 ± 3	97	10
MP	70	8	70 ± 5	100	7
MP	300	8	321 ± 17	107	5
MP	700	8	745 ± 45	106	6
MG	0	6	< LOD		
MG	30	6	27 ± 3	90	10
MG	70	6	71 ± 8	101	11
MG	300	6	321 ± 39	107	12
MG	700	6	823 ± 57	118	7
ML	0	6	< LOD		
ML	30	6	30 ± 3	100	10
ML	70	6	73 ± 10	104	14
ML	300	6	315 ± 42	105	13
ML	700	6	748 ± 103	107	14

**Tabelle 4-21:** Durchschnittliche Tag-zu-Tag Wiederfindung und Variationskoeffizienten von S-2-Propyl-4-Pentin-hydroxamsäure in Abhängigkeit der Matrix.

Matrix	Æ - Wiederfindung (day-to-day) (%)	Æ - Variationskoeffizient (day-to-day) (%)
Human – Plasma	<b>96</b>	8
Maus – Plasma	<b>103</b>	7
Maus – Gehirn	<b>104</b>	10
Maus – Leber	<b>104</b>	13

#### **4.7.4 Ergebnisunsicherheit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (*Limit of Detection - LOD; Limit of Quantification - LOQ*) der Methode zur Bestimmung von 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure wurde anhand der Kalibrierfunktion nach DIN 32645 rechnerisch bestimmt (Kalibriermethode). Hierzu wurden im Konzentrationsbereich von 5-1000 µg/mL dotierte Mausplasmaproben bei 20 Konzentrationen je dreifach bestimmt und mittels der Software Valoo® und der Kalibriermethode ausgewertet. Für das beschriebene Verfahren betrug die Bestimmungsgrenze (LOQ) 10 µg/mL und die Nachweisgrenze (LOD) 3 µg/mL. Die Ergebnisunsicherheit wurde aus den mittleren Tag-zu-Tag Variationskoeffizienten abgeleitet und auf einen Wert von 30 % festgelegt.

## 4.8 Pharmakokinetische Untersuchung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure

### 4.8.1 Plasmabindungsraten in Maus und Mensch

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindungsrate der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure wurde die unter 6.5.5 beschriebene Methode angewandt. Aus Voruntersuchungen zum Adsorptionsverhalten der Hydroxamsäure an den Membranen der Extraktionskartuschen ging hervor, dass nicht alle zur Verfügung stehenden Membranen geeignet waren. Zunächst wurde daher der Einsatz unterschiedlicher Membranmaterialien anhand der Extraktion dotierter Pufferproben untersucht (Tabelle 4-22).

Die zuvor bei der Bestimmung der Plasmabindungsrate von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure verwendete Extraktionskartusche (Vivaspin 500; 5000 kDa cutt-off, Polyethersulfon-Membran) zeigte bei Versuchen zur Extraktion der Hydroxamsäure aus dotierten Pufferlösungen (0,1 mol/L Dinatriumhydrogenphosphat, pH = 7,4) eine Adsorption von ca. 12 %, sodass diese Kartuschen/Membran Kombination für die Untersuchung zur Proteinbindungsrate hier nicht geeignet erschien. Als ebenso ungeeignet stellten sich die Kartuschen Vivaspin 2 mit einer Membran aus Cellulose Triacetat (Adsorptionsrate von ca. 75 %) sowie die Kartusche Centrisart 1 mit einer Membran aus Cellulose Triacetat (Adsorption von ca. 20 %) heraus. Nur die Kartusche Vivaspin 2 mit einer Membran aus regenerierter Cellulose oder einer Hydrosart<sup>®</sup> Membran erschienen bei einer rechnerischen Adsorption von ca. 2 % zur Bestimmung der Plasmabindungsrate von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure geeignet.

Auf Grund der zuvor beobachteten Adsorption an Zellulose als Extraktionsmembran wurde ausschließlich die Vivaspin 2 Kartusche mit Hydrosart-Membran (Mw-cutt-off: 5000 kDa) verwendet. Aus den dotierten und quantifizierten Plasmaproben von Mensch und Maus kann eine mittlere Proteinbindungsrate für den Konzentrationsbereich von 70 – 900 µg/mL von 77 % für Humanplasma und 45 % für Mausplasma abgeleitet werden (Tabelle 4-23). Die Plasmabindungsrate ist damit größer als die von Valproinsäure, jedoch um ca. 20 % geringer als die Plasmabindungsrate der korrespondierenden Säure S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.

**Tabelle 4-22:** Bestimmung der Adsorptionsrate von S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure an unterschiedlichen Extraktionsmembranen (n=4).

<b>Kartusche (Membran)</b>	<b>Konzentration der Pufferprobe ± SD (mg/mL)</b>	<b>Konzentration des Zentrifugats ± SD (mg/mL)</b>	<b>Adsorptionsrate (%)</b>
Vivaspin 500 (Polyethersulfon)	704 ± 25	658 ± 11	7
	618 ± 30	567 ± 38	8
	336 ± 12	281 ± 11	16
	72 ± 10	61 ± 2	15
Vivaspin 2 (Hydrosart)	281 ± 8	278 ± 17	1
Vivaspin 2 (Cellulose Triacetat)	281 ± 8	71 ± 8	75
Vivaspin 2 (regenerierte Cellulose)	331 ± 11	326 ± 23	2
Centrisart 1 (Cellulose Triacetat)	331 ± 11	259 ± 9	22

**Tabelle 4-23:** Plasmaproteinbindungsrate von S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure bei Mensch und Maus (n=4).

<b>Spezies</b>	<b>Konzentration der Plasmaprobe ± SD (mg/mL)</b>	<b>Konzentration des Zentrifugats ± SD (ug/mL)</b>	<b>Proteinbindungsrate (%)</b>
<b>Maus</b>	326 ± 5	188 ± 12	42
	73 ± 3	38 ± 1	48
<b>Human</b>	889 ± 17	309 ± 5	65
	366 ± 6	84 ± 3	77
	84 ± 3	11 ± 1	87

#### 4.8.2 Plasma- und Gehirn-Konzentrations-Zeit-Kurven - Pharmakokinetische Parameter und Blut-Hirn-Schranke

Zur Untersuchung pharmakokinetischer Parameter der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure wurden NMRI Mäuse mit einer intraperitonealen Dosis von 0,8 mmol/kg behandelt sowie Plasma und Gewebelevel bestimmt (Kapitel 6.5.3). Die gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 4-24 für alle untersuchten Gewebe dargestellt. Auffällig ist die nur kurze Verweilzeit von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in der Maus. Bereits nach 15 Minuten wurde mit ca. 160 µg/mL der Blutplasmapeak erreicht. Spitzenkonzentrationen in den anderen Geweben werden ebenfalls nach 15 Minuten erreicht und lagen zwischen 70 und 190 µg/mL bzw. µg/g. Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang der hohe Gehirnspiegel, der ca. 190 µg/mL beträgt. Unter Berücksichtigung der bereits zuvor ermittelten Plasmabindungsrate in der Maus von ca. 45 % und unter der Annahme, dass ausschließlich ungebunden vorliegende Hydroxamsäure durch aktiven Transport oder Diffusion in das Gehirn übergehen kann, liegt rechnerisch eine Anreicherung im Gehirngewebe von nahezu 200 % vor (Abbildung 4-36). S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zeigt also einen wesentlich stärkeren Übergang in das Gehirn als das direkte Struktur analogon, die S-2-Pentyl-4-Pentinsäure und auch als VPA. Der Grund für diese ungewöhnlich gute Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dürfte in der Hydroxamsäurefunktion liegen, die für eine basische Verschiebung des  $pK_s$ -Wertes der Verbindung sorgt und die Lipophilie der Verbindung im Vergleich zu VPA erhöht.

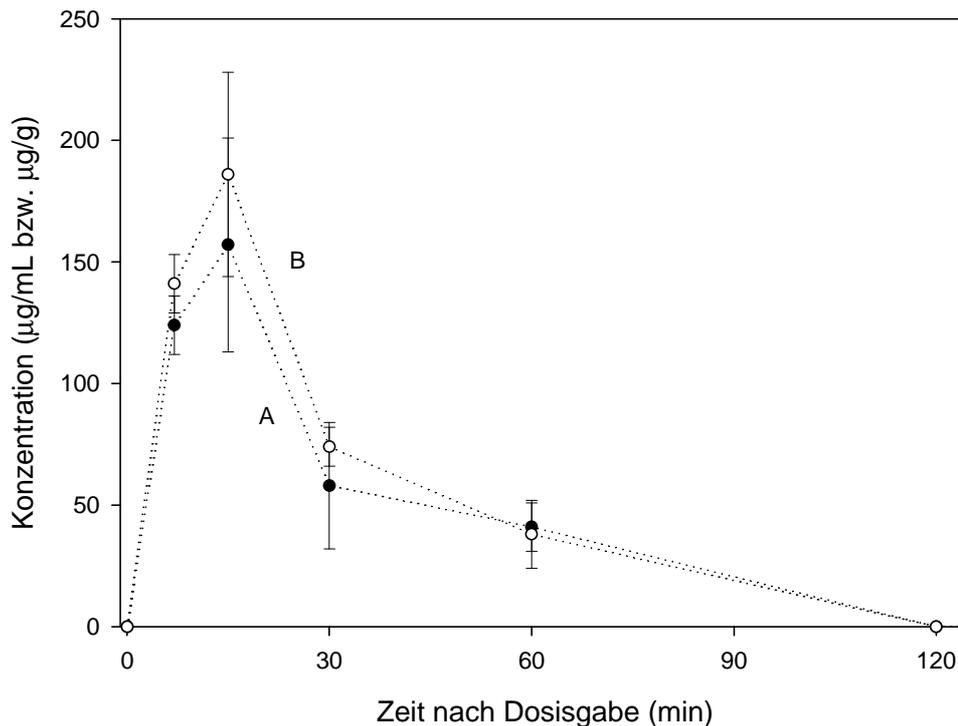
**Tabelle 4-24:** Konzentrations-Zeit-Werte von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach intraperitonealer Dosis von 0,8 mmol/kg in Plasma und verschiedenen Geweben der NMRI-Maus (n=3).

Zeitpunkt nach Dosisgabe (min)	Konzentration in NMRI Maus ± SD <sup>a</sup>			
	Plasma	Gehirn (mg/mL) bzw. (mg/g)	Leber	Milz
<b>7</b>	124 ± 12	141 ± 12	72 ± 6	106 ± 11
<b>15</b>	157 ± 44	186 ± 42	67 ± 35	120 ± 67
<b>30</b>	58 ± 26	74 ± 8	23 ± 16	51 ± 38
<b>60</b>	41 ± 10 <sup>b</sup>	38 ± 14 <sup>b</sup>	< LOQ	25 <sup>c</sup>
<b>120</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>240</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>360</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>720</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

<sup>a</sup> Mittelwert und Standardabweichung berechnet von je drei Versuchstieren (n=3), wobei jede Probe doppelt analysiert wurde.

<sup>b</sup> n = 2 Tiere

<sup>c</sup> n = 1 Tier



**Abbildung 4-36:** Konzentrations-Zeit-Kurve von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach intraperitonealer Dosisgabe von 0,8 mmol/kg in NMRI Mäusen in Plasma und Gehirn  
 A schwarze Kreise Plasma  
 B offene Kreise Gehirn

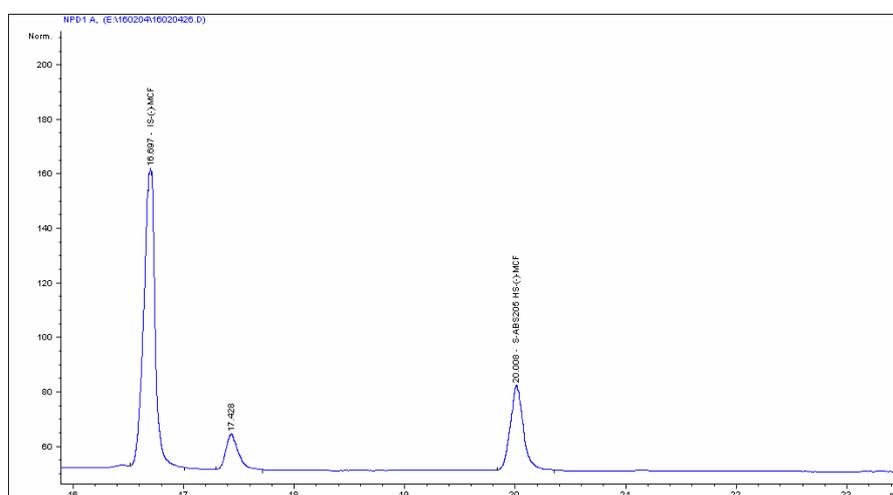
Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure wurde die Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve mittels der Software WinNonLin 4.1 ausgewertet (Kapitel 6.5.6). Es wurden die in Tabelle 4-25 dargestellten Parameter in einem non-compartment model berechnet und die Halbwertszeit nach dem linear-trapezoidalen Modell bestimmt. Bereits auf Grund der mit 0,33 Stunden sehr geringen Halbwertszeit und der hieraus resultierenden Mean-Residence-Time (MRT) von nur 0,54 Stunden kann vermutet werden, dass S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in vivo umfangreich metabolisiert oder direkt eliminiert wird.

**Tabelle 4-25:** Pharmakokinetische Parameter von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach i.p. Behandlung von NMRI-Mäusen mit 0,8 mmol/kg.

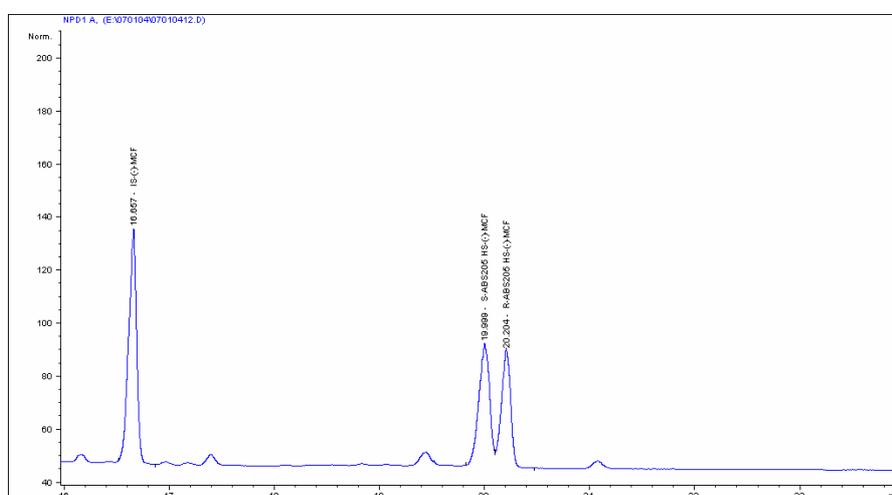
Parameter	$t_{\max}$ (min)	$c_{\max}$ (mg/mL)	$l_z$ (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ (h*mg/mL)	$V_z$ (L/kg)	Cl (mL/h/kg)	MRT (h)
NMRI-Maus	15	228	2,092	0,33	100	0,733	1466	0,54

### 4.8.3 Stereokonversion und Metabolisierung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure

In Plasma- und Gewebeproben der Maus konnte nach Applikation einer Dosis von 0,80 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zu keiner Zeit eine Konversion des Stereozentrums in vivo festgestellt werden (Abbildung 4-37, Abbildung 4-38). Auf Grund der geringen Mean-Residence-Time (MRT) von nur 0,5 Stunden wurde eine Metabolisierung der Ausgangsverbindung unterstellt und anhand von Mausplasmaproben untersucht. Die gaschromatographische Trennung gekoppelt mit massenselektiver Detektion (GC-MSD) konnte vergleichsweise hohe Konzentrationsspiegel eines Metaboliten zeigen. Die massenspektrometrische Analyse charakterisierte diesen Metaboliten als 2-Propyl-4-Pentinsäure. Im Folgenden wurden daher dessen Plasma- und Gewebespiegel aus den bereits zuvor analysierten Proben bestimmt und ausgewertet. Weitere Metaboliten konnten in Mausplasmaproben bisher nicht festgestellt werden.



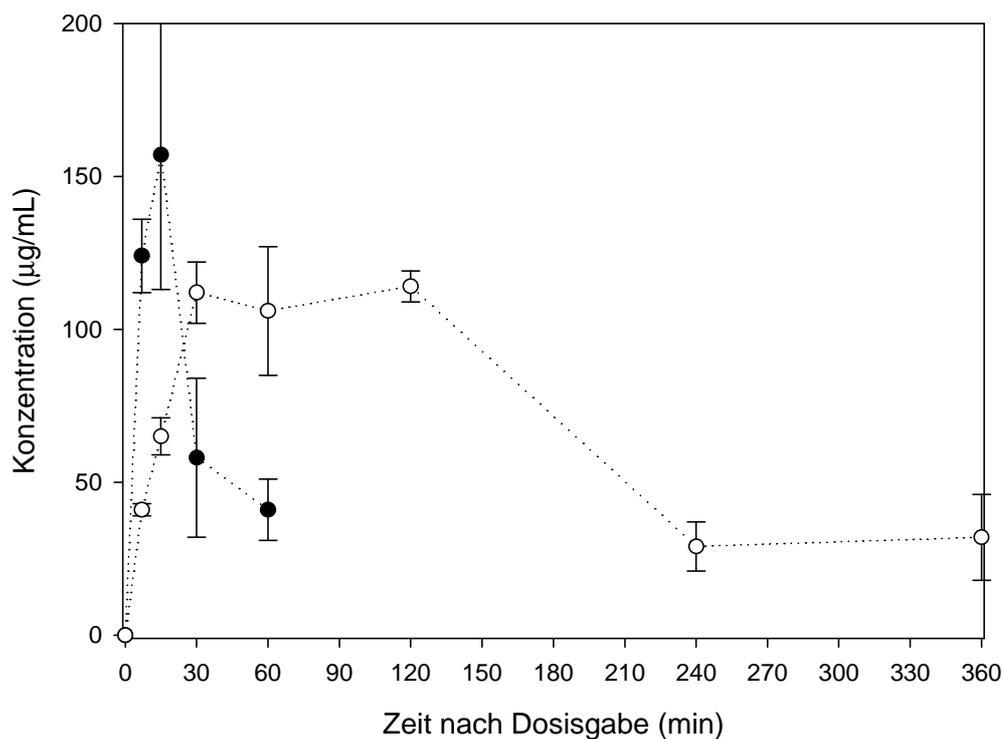
**Abbildung 4-37:** Chromatogramm einer NMRI-Mausplasmaprobe 30 min nach i.p. Applikation von 0,80 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure.



**Abbildung 4-38:** Chromatogramm einer dotierten Mausplasmaprobe von (±)-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (c= 300 µg/mL).

#### 4.8.4 Plasma-Konzentrations-Zeit Kurven des Metaboliten

In Abbildung 4-39 ist der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure und des Metaboliten, der korrespondierenden Säure, nach intraperitonealer Dosierung von 0,8 mmol/kg der Ausgangssubstanz graphisch dargestellt. Während die Plasmaspiegel der Hydroxamsäure schnell abfallen und bereits nach 120 Minuten nicht mehr quantifizierbar waren, konnten deutlich ausgeprägte Blutplasmakonzentrationen des Metaboliten, der S-2-Pentyl-4-Pentinsäure, detektiert werden. Nach einer Anflutungszeit von 30 Minuten hielt sich eine Konzentration von ca. 120 µg/mL über einen Zeitraum von zwei Stunden. Damit erreichte der Metabolit beinahe die Spitzenkonzentrationen der Ausgangsverbindung. Die insgesamt deutlich langsamere Verstoffwechslung des Metaboliten drückte sich auch darin aus, dass noch nach sechs Stunden ein Plasmaspiegel von ca. 30 µg/mL bestimmt werden konnte, während S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure als Ausgangsverbindung zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 4-39:** Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure und ihres Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinkarbonsäure nach intraperitonealer Dosis von 0,8 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (n=3 NMRI Mäuse ± SD).

schwarze Kreise    Plasmaspiegel der Hydroxamsäure  
 offene Kreise     Plasmaspiegel des Metaboliten

In den Untersuchungen zur Bestimmung der teratogenen Potenz von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure wurde bereits festgestellt, dass diese Hydroxamsäure ein teratogenes Potenzial aufweist. Entgegen der Ausgangshypothese dieser Arbeit zeigten jedoch Hydroxamsäurederivate der VPA allgemein, und hier speziell die S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure, keine bzw. nur eine sehr schwache intrinsische Aktivität an HDAC-Enzymen im Bereich von 3-5 mmol/L. In diesem Sinne stellte die S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zunächst eine Ausnahme von der Arbeitshypothese dar.

Die pharmakokinetische Untersuchung demonstrierte die umfangreiche Verstoffwechslung der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zur korrespondierenden Karbonsäure S-2-Pentyl-4-Pentinsäure, welche ein sehr starkes teratogenes Potenzial besitzt und mit einer  $IC_{50}(\text{HDAC})$  von 50  $\mu\text{mol/L}$  eines der aktivsten VPA-Derivate an HDAC Enzymen darstellt.

Es ist daher wahrscheinlich, dass nicht die Ausgangsverbindung selbst, sondern der gebildete Metabolit die Ursache für die beobachteten teratogenen Effekte der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure ist. Eine solche metabolische Aktivierung zum ultimativen Teratogen konnte analog bereits für Valpromid, dem Amid-Derivat der VPA, gezeigt werden (RADATZ et al. 1998). Um die Plausibilität dieser Hypothese zu untersuchen, wurde eine Äquivalentdosis-betrachtung durchgeführt. Voraussetzung hierfür sind folgende zwei Beobachtungen: Die maximale Konzentration an VPA im Plasma behandelter Mäuse steigt linear mit der applizierten Dosis an und die beobachteten Exenzephalieraten im NMRI-Mausmodell sind mit der maximalen Plasmakonzentration der Testsubstanz korreliert und nicht mit ihrer Area-under-Curve (AUC) (NAU 1985). Diese zwei Randbedingungen können in guter Näherung auch für die hier zu untersuchenden VPA-Analoga angenommen werden.

Der nach Dosis von 0,80 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure gemessene Plasmaspiegel des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure beträgt 110  $\mu\text{g/mL}$  und entspricht damit ca. 20 % des erreichten Blutplasmaspiegels bei einer applizierten Dosis von 1,50 mmol/kg der S-2-Pentyl-4-Pentinsäure. Die Äquivalentdosis entspricht daher einem Wert von ca. 0,3 mmol/kg. Tatsächlich wurde S-2-Pentyl-4-Pentinsäure bei einer Dosisgabe von 0,25 mmol/kg im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell untersucht und eine Exenzephalierate von 4 % bestimmt (Dr. U. Gravemann – mündliche Mitteilung 2002). Die bei Applikation von 0,80 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure beobachtete Exenzephalierate von 2 % kann also durch die Metabolisierung der Hydroxamsäure zur korrespondierenden Säure ausreichend begründet werden.

Diese Betrachtung lässt den Schluss zu, dass bei dem beobachteten teratogenen Potential der Ausgangsverbindung S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (1,5 mmol/kg – 5 % Exencephalie, Kapitel 4.1) die teratogenen Effekte im Mausmodell erst nach Aktivierung und Metabolisierung der Verbindung verursacht werden. Hydroxamsäurederivate der VPA besitzen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit intrinsisch keine teratogene Potenz und zeigen dementsprechend keine inhibitorische Wirkung auf HDACs.

#### 4.8.5 Konzentrationsverläufe des Metaboliten in weiteren Geweben der Maus

Die in Tabelle 4-26 zusammengefassten Konzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nach intraperitonealer Dosisgabe von 0,8 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zeigten, dass die maximalen Konzentrationswerte in den Organen zu unterschiedlichen Zeiten erreicht wurden. Während in der Leber als dem wahrscheinlichen Ort der Metabolisierung eine Maximalkonzentration von 160 µg/g bereits nach sieben Minuten gemessen werden konnte, wurde die Maximalkonzentration im Gehirn (30 µg/g) erst nach 30 Minuten erreicht. Entsprechend dem erwarteten Eliminierungsweg über die Niere, wird in diesem Organ eine maximal Konzentration von ca. 75 µg/g über einen Zeitraum von gut zwei Stunden nach Dosisgabe der Hydroxamsäure erreicht.

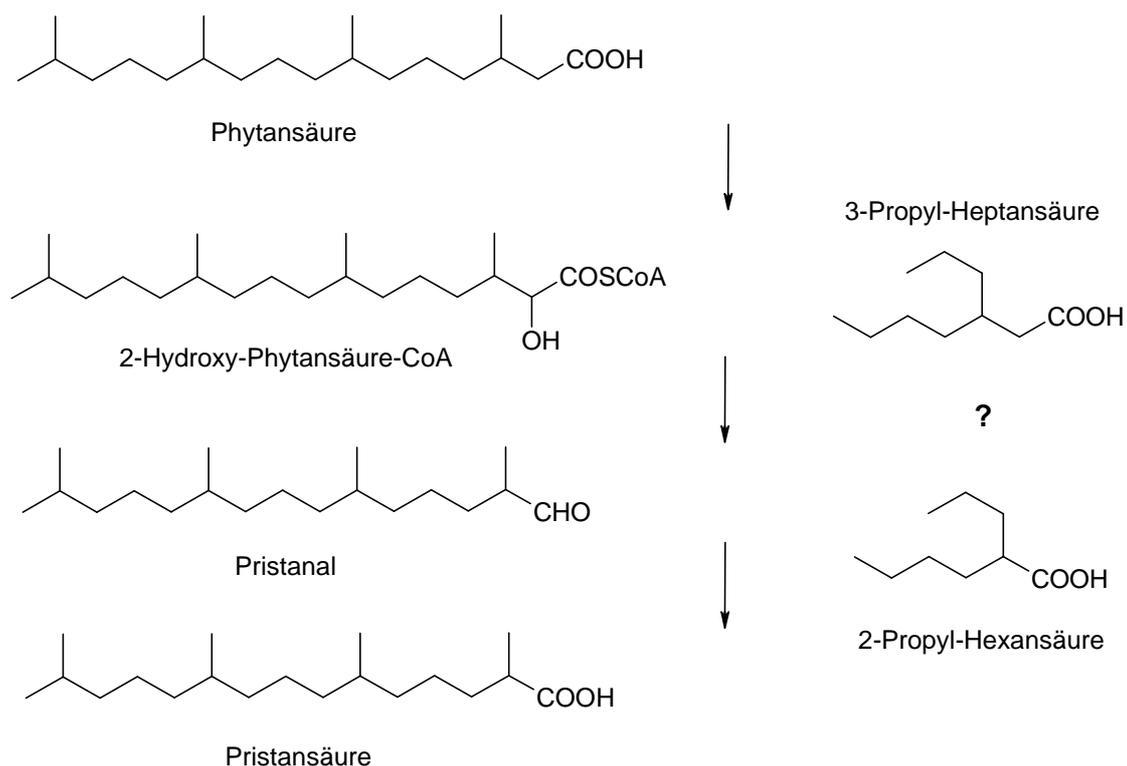
**Tabelle 4-26:** Konzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nach intraperitonealer Dosisgabe von 0,8 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in NMRI Mäusen (n=3 Tiere).

Zeitpunkt nach Dosisgabe (min)	Metabolitenkonzentration ± SD <sup>a</sup> (mg/mL) bzw. (mg/g)				
	Plasma	Gehirn	Leber	Niere	Milz
7	41 ± 2	14 ± 3	156 ± 2	65 ± 7	16 ± 8
15	65 ± 6	18 ± 8	122 ± 28	61 ± 13	24 ± 13
30	112 ± 10	29 ± 11	123 ± 18	78 ± 14	42 ± 18
60	106 ± 21	24 ± 7	95 ± 3	75 ± 14	42 ± 28
120	114 ± 5	20 ± 2	58 ± 5	74 ± 8	65 ± 14
240	29 ± 8	5 ± 0	28 ± 8	14 ± 4	< LOQ
360	32 ± 14	< LOQ	34 ± 15	44 ± 31	< LOQ
720	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD

<sup>a</sup> Mittelwert und Standardabweichung berechnet von je drei Versuchstieren (n=3), wobei jede Probe doppelt analysiert wurde.

## 4.9 Untersuchungen zum metabolischen Verhalten von 3-Propyl-Heptansäure als Modellsubstanz für $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate

Die VPA-Derivate der Gruppe 6 ( $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate) bildeten eine Ausnahme im Sinne der Arbeitshypothese. Diese Verbindungen besaßen in Analogie zu Hydroxamsäuren und Amiden ein geringes teratogenes Potential, waren jedoch keine bzw. sehr schwache (3-Methyl-Hexansäure und 3-Propyl-Oktansäure) Inhibitoren der HDACs. Es wurde daher zunächst vermutet, dass auch diese VPA-Derivate in vivo zu teratogenen Substanzen metabolisiert und aktiviert werden. Die verfolgte Hypothese ging davon aus, dass die  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivate durch einen  $\alpha$ -Oxidationsprozess zu den korrespondierenden  $\alpha$ -verzweigten VPA-Derivaten metabolisiert werden können. Einem solchen Oxidationsprozess unterliegen natürlich vorkommende Fettsäuren wie zum Beispiel die Phytansäure (Abbildung 4-40), aber auch 3-Methyl verzweigte synthetische Fettsäuren (CASTEELS et al. 2003).

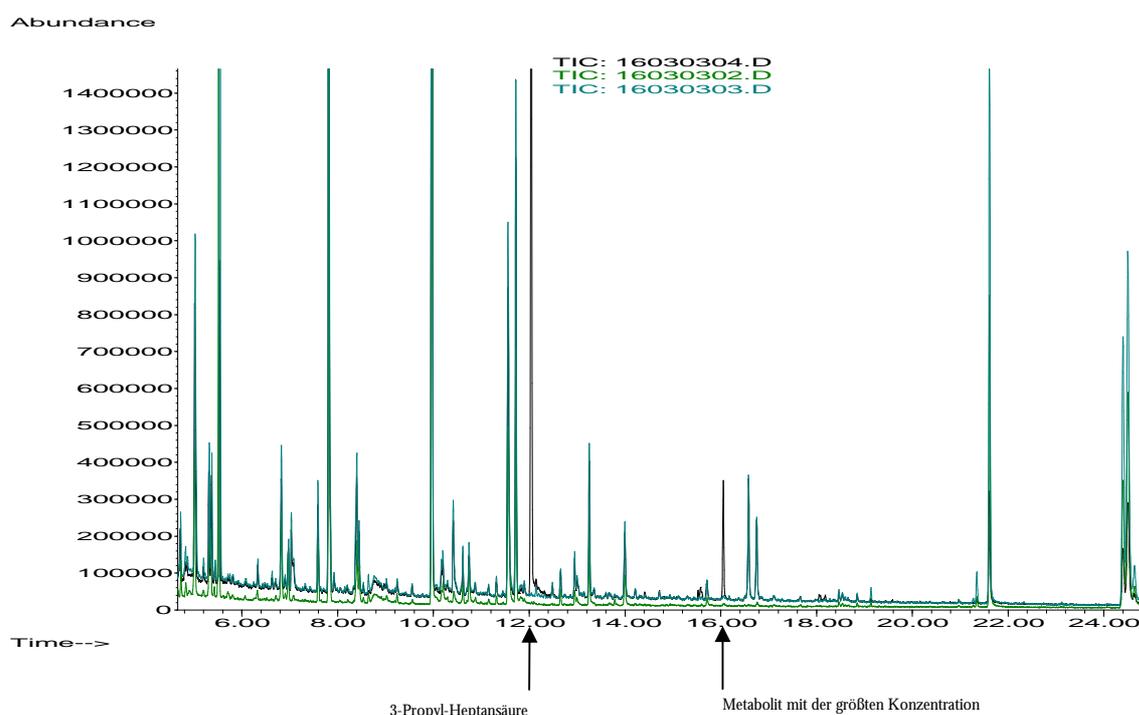


**Abbildung 4-40:**  $\alpha$ -Oxidationsprozess der Phytansäure und Hypothese einer möglichen Metabolisierung von  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivaten in Analogie hierzu (ergänzt nach CASTEELS et al. 2003).

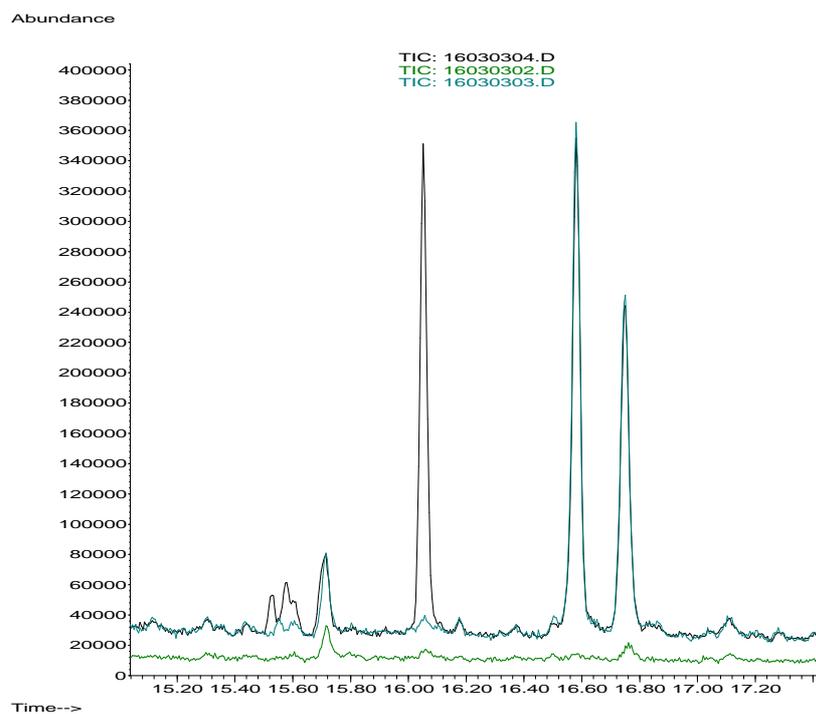
Zur Überprüfung dieser Hypothese und Bestimmung möglicher Metabolite von  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivaten wurde als Modellsubstanz die 3-Propyl-Heptansäure ausgewählt und exemplarisch untersucht. Die mit einer intraperitonealen Dosis von 1,25 mmol/kg behandelten Mäuse zeigten keinerlei akut toxische Wirkungen; die Probenentnahme von Blutplasma und Geweben erfolgte nach 30 und 60 Minuten.

Ausgehend von der in Kapitel 6.5.2 beschriebenen Methodik wurden die Proben extrahiert, zu Trimethylsilylestern (TMS-Derivaten) derivatisiert und mittels der gaschromatographischen Trennung gekoppelt mit massenselektiver Detektion auf Metabolite der 3-Propyl-Heptansäure untersucht. Im Vergleich zu Proben unbehandelter Kontrolltiere wurden neben der injizierten Ausgangssubstanz 3-Propyl-Heptansäure insgesamt drei weitere chromatographische Signale bestimmt, die ausschließlich in den Plasma- und Gewebeproben behandelter Tiere nachzuweisen waren.

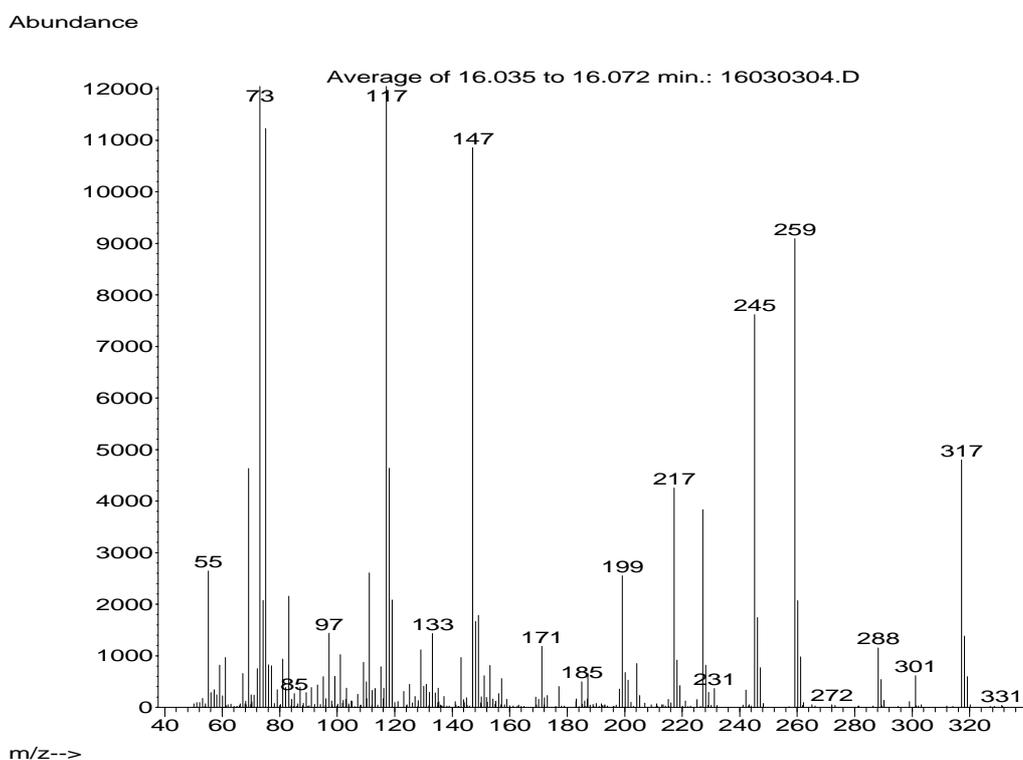
Von diesen Signalen lag allerdings nur eines in ausreichender Stärke vor um Ansätze für eine Strukturaufklärung zu ermöglichen (Abbildung 4-41, Abbildung 4-42). Bei diesem Metaboliten handelte es sich definitiv nicht um die 2-Propyl-Hexansäure, die nach Vergleich mit einem entsprechenden analytischen Standard eine Retentionszeit zeigte, welche keines der beobachteten Differenzsignale aufwies. Somit konnte die hypothetische  $\alpha$ -Oxidation als Metabolisierungsweg der  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivate ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung der chemischen Struktur des genannten Metaboliten wurde ein Massenspektrum im Bereich von  $m/z = 45 - 500$  aufgenommen und analysiert (Abbildung 4-43).



**Abbildung 4-41:** Chromatogramm einer Plasmaprobe von NMRI-Mäusen nach intraperitonealer Behandlung mit 1,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure.



**Abbildung 4-42:** Ausschnittsvergrößerung des Chromatogramms: Metabolitensignal mit der größten Plasmakonzentration bei 16,05 min nach Applikation von 1,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure im Vergleich zu zwei Plasmaproben un behandelter Tiere.

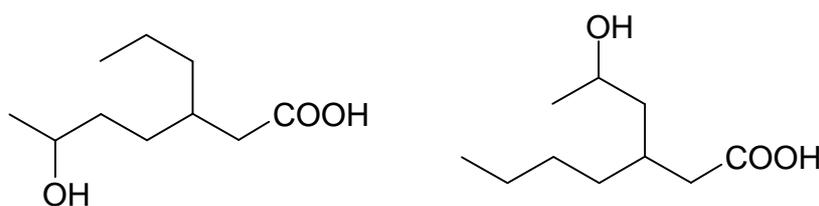


**Abbildung 4-43:** Untergrundkorrigiertes Massenspektrum des Metaboliten mit der größten Plasmakonzentration nach Dosisgabe von 1,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure in NMRI Mäusen (TMS Derivat).

Der untersuchte Metabolit eluierte im Vergleich zur Ausgangssubstanz 3-Propyl-Heptansäure ( $t_{\text{Ret}}=12,00$  min) zu einem späteren Zeitpunkt ( $t_{\text{Ret}}=16,05$  min) und deutete damit bereits an, dass es sich bei dieser Verbindung um eine massenreichere Substanz handeln musste. Ein Vergleich des Massenspektrums mit verschiedenen Datenbanken führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, alle gelisteten Strukturvorschläge zeigten jedoch übereinstimmende Fragmentierungsmuster einer zusätzlichen TMS-Alkohol-Gruppe im Molekül an.

Die Oxidation des Substrats als typische Phase I Metabolisierung würde zu einem Produkt mit einer rechnerischen Masse  $M^+$  von 332,2 m/z führen (zusätzliche O-TMS Gruppe). Das Massenspektrum des unbekanntes Metaboliten zeigte diese Masse selbst nicht an, es wurde jedoch sowohl ein hypothetisches  $M-H^+$  bei 331,1 m/z als auch ein Signal 317,2 m/z detektiert, was einem  $M-CH_3^+$  entsprechen könnte.

Ausgehend von dieser Überlegung wurden Referenzspektren der Substanzen 2-OH-VPA, 3-OH-VPA und 5-OH-VPA aufgearbeitet und analysiert, um anhand der charakteristischen Fragmentierungsmuster die Lage der Oxidation am Molekül bestimmen zu können. Es konnte festgestellt werden, dass alle drei hydroxylierten Valproinsäure-Derivate einen Molekülmassensignal von 331,1 ( $M-H^+$ ) und 317,2 ( $M-CH_3^+$ ) aufwiesen, jedoch weitere charakteristische O-TMS-Fragmentmuster besaßen, die der unbekanntes Metabolit nicht aufwies. Sollte es sich bei dem beobachteten Metaboliten von 3-Propyl-Heptansäure tatsächlich um einen hydroxylierten Metaboliten handeln, so muss er durch ( $\omega$ -1)-Oxidation entstanden sein und die OH-Gruppe an C6 oder C2` tragen (vergleiche Abbildung 4-44), da nur eine solche Positionierung der OH-Gruppe signifikant unterschiedliche Massenfragmente im Vergleich zu den drei getesteten hydroxylierten Standards bewirken kann.



**Abbildung 4-44:** Strukturvorschlag für den beobachteten Metaboliten von 3-Propyl-Heptansäure: 3-Propyl-6-Hydroxy-Heptansäure oder 3-(2-Hydroxy)-Heptansäure

In diesem Zusammenhang charakteristisch für ( $\omega$ -1)-hydroxylierte Karbonsäuren ist die Masse 117 m/z, welche eine  $C_3H_{13}OSi^+$ -Gruppe repräsentiert. Theoretisch könnte dieses Massenfragment auch durch  $C_4H_9O_2Si^+$  der Karbonsäurefunktion selbst entstanden sein, wurde jedoch bei keinem der untersuchten hydroxylierten VPA-Standards beobachtet. Weitere Strukturmerkmale, insbesondere die Unterscheidung zwischen 3-Propyl-6-Hydroxy-Heptansäure und 3-(2-Hydroxy-Propyl)-Heptansäure, waren aus dem Massenspektrum nicht ableitbar. Hierzu

---

wären die entsprechenden Standardsubstanzen zum Vergleich der Retentionszeiten und spezifischen Massensignale (Fingerprint) notwendig gewesen.

Die beobachtete Abweichung der Substanzgruppe der  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivate von der Arbeitshypothese, dass teratogene VPA-Derivate die Enzymklasse der Histondeacetylasen inhibieren, kann somit noch nicht abschließend beantwortet werden. Sollten  $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate in vivo zu einer Verbindung mit teratogener Potenz metabolisiert werden, so könnte es sich um einen der oben genannten hydroxilierten Metaboliten der ( $\omega$ -1)-Oxidation handeln. Da die im Tierversuch beobachtete Konzentration dieses Metaboliten im Vergleich zur Ausgangssubstanz 3-Propyl-Heptansäure nur ca. 1/20 beträgt, müsste dieser Metabolit eine ungewöhnlich hohe Aktivität an Histondeacetylasen aufweisen.

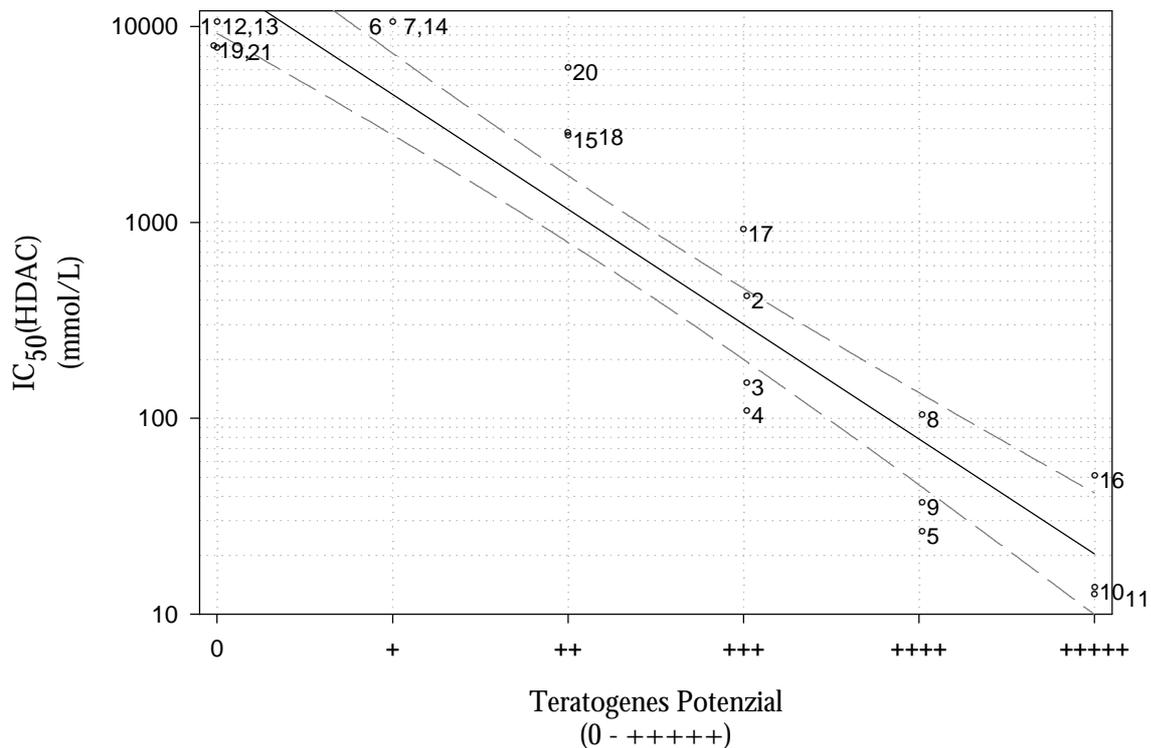


#### **4.10 Korrelation der teratogenen Potenz von Valproinsäure-Analoga mit der Fähigkeit zur HDAC-Inhibition.**

Die Analyse des pharmakokinetischen Profils von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure zeigte, dass diese Substanz in vivo zur korrespondierenden Säure metabolisiert wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die im Tierversuch beobachtete teratogene Potenz nicht auf die Ausgangssubstanz, sondern wie schon bei Valpromid beobachtet (RADATZ 1998), auf den Metaboliten zurückzuführen ist. Für die Gruppe der in Position C3 verzweigten VPA-Derivate ( $\beta$ -verzweigte Derivate) konnte die Aktivierung in vivo zu einem teratogenen Metaboliten nicht abschließend nachgewiesen werden; es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch diese Substanzgruppe keine intrinsische teratogene Potenz besitzt. Die VPA-Derivate der Gruppen 4 (Hydroxamsäuren und Amide) und 5 ( $\beta$ -verzweigte Karbonsäuren) werden daher für die folgende Korrelation nicht berücksichtigt.

In Abbildung 4-45 ist die graduierte teratogene Potenz von 21 der getesteten VPA-Derivate in Abhängigkeit der logarithmierten Halbwirksamkeit an Histondeacetylasen ( $IC_{50}(\text{HDAC})$ ) graphisch dargestellt. Es ergibt sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen teratogenem Effekt im Tierversuch und der an einem humanen Enzymassay bestimmten HDAC-Inhibition mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2=0,89$  einer linearen Korrelation (Darstellung und Berechnung erfolgten mit Hilfe der Software SigmaPlot 8.0). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass hier intrinsische Aktivitäten an einem humanen Enzym schlussendlich mit den systemischen Ergebnissen aus einem Maus-Tiermodell verglichen wurden, ohne die individuellen pharmakokinetischen/metabolischen Aspekte jeder einzelnen Substanz zu berücksichtigen, handelt es sich um eine hervorragende Korrelation.

Die zuvor formulierte Hypothese, dass die durch VPA ausgelösten Neuralrohrdefekte beim Menschen und auch die durch ihre Derivate ausgelösten Exenzephalien im Mausmodell mit der Inhibition der Enzymklasse der HDACs funktionell verknüpft sind konnte damit bestätigt werden.



**Abbildung 4-45:** Lineare Korrelation der teratogenen Potenz ausgewählter Valproinsäure-Analoga mit ihren intrinsischen logarithmierten Halbwirksamkeiten an HDAC Enzymen -  $IC_{50}(HDAC)$ .  $r^2=0,89$ , Konfidenzintervall 95 %

Nummer	Name der Verbindung	Teratogenes Potenzial	$IC_{50}(HDAC)$	
1	(±)-2-Ethyl-4-Methyl-Pentansäure	0	> 10000 $\mu M$	
2	Valproinsäure	+++	398 $\mu M$	SE: 50 $\mu M$
3	(±)-2-Propyl-Hexansäure	+++	144 $\mu M$	SE: 34 $\mu M$
4	(±)-2-Propyl-Heptansäure	+++	103 $\mu M$	SE: 21 $\mu M$
5	(±)-2-Propyl-Oktansäure	++++	25 $\mu M$	SE: 4 $\mu M$
6	(±)-2-Propyl-4-Hexinsäure	+	> 10000 $\mu M$	
7	(±)-2-Isobutyl-4-Pentinsäure	+	> 10000 $\mu M$	
8	(±)-2-Butyl-4-Pentinsäure	++++	98 $\mu M$	SE: 18 $\mu M$
9	(±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure	++++	35 $\mu M$	SE: 10 $\mu M$
10	(±)-2-Hexyl-4-Pentinsäure	+++++	13 $\mu M$	SE: 2 $\mu M$
11	(±)-2-Heptyl-4-Pentinsäure	+++++	12 $\mu M$	SE: 2 $\mu M$
12	2-Propyl-2E-Pentensäure	0	> 10000 $\mu M$	
13	(±)-2-Isobutyl-4-Pentensäure	0	> 10000 $\mu M$	
14	2-Hydroxy-2-Propyl-Pentensäure	+	n.b. (> 10000 $\mu M$ )	
15	(±)-2-Propyl-4-Pentensäure	++	2620 $\mu M$	SE: 3170 $\mu M$
16	S-2-Pentyl-4-Pentinsäure	+++++	48 $\mu M$	SE: 12 $\mu M$
17	R-2-Pentyl-4-Pentinsäure	+++	869 $\mu M$	SE: 183 $\mu M$
18	S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	++	2720 $\mu M$	SE: 1010 $\mu M$
19	R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure	0	7560 $\mu M$	SE: 4660 $\mu M$
20	S-2-Propyl-4-Hexinsäure	++	5840 $\mu M$	SE: 19000 $\mu M$
21	R-2-Propyl-4-Hexinsäure	0	7363 $\mu M$	SE: 10000 $\mu M$

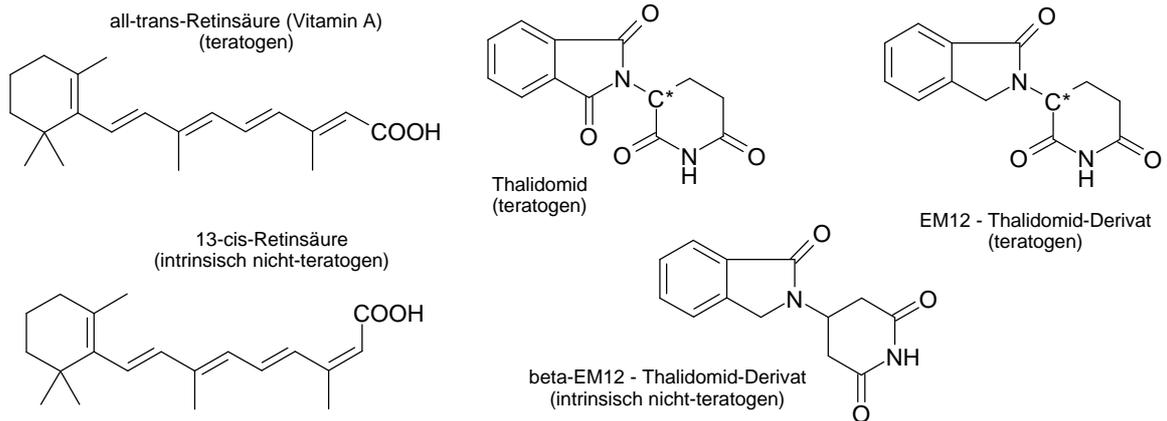
## **4.11 Ausweitung der Arbeitshypothese auf weitere Stoffklassen**

Nachdem der Zusammenhang von VPA-induzierten Neuralrohrdefekten und HDAC-Inhibition nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.10), sollte die erweiterte Hypothese untersucht werden, ob auch andere bekannte Teratogene die Enzymklasse der Histondeacetylasen als molekulare Zielstrukturen in ihrer Funktion beeinflussen können. Zunächst wurden daher ausgehend von den zwei bekannten teratogenen Substanzen all-trans-Retinsäure und Thalidomid (Wirkstoff des bekannten Contergan®) verschiedene im Tierversuch teratogene und nicht teratogene Derivate auf HDAC-Inhibition in vitro in einem humanen HDAC-Enzym-Test sowie in einem F9-Mauszellsystem auf Auslösung der Hyperacetylierung von Kernhiston H4 untersucht.

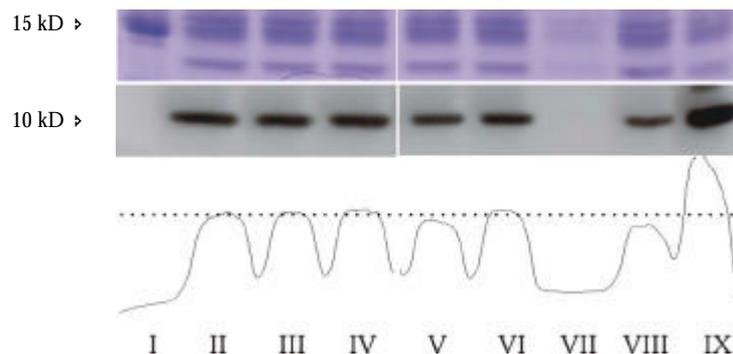
Darüber hinaus wurde die Hypothese untersucht, ob auch Lebensmittelinhaltsstoffe eine Inhibition der Enzymfunktion der Histondeacetylasen bewirken können. Hier wurde eine Vielzahl typischer aktueller oder geplanter Lebensmittelkomponenten (auch im Sinne des functional-food) untersucht. Insbesondere wurde hier auf die Untersuchung weiterer Fettsäuren wie Liponsäure und längerkettiger Fettsäuren wie konjugierter Linolsäuren abgezielt, da diese eine gewisse strukturelle Vergleichbarkeit mit VPA besitzen. Sollten sich Lebensmittelinhaltsstoffe mit HDAC-Inhibitions-Potential nachweisen lassen, so würde dies neue Fragen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Induktion von fruchtschädigenden Nebenwirkungen aufwerfen. Da HDAC-Inhibitoren aber auch als Chemotherapeutika untersucht werden und die HDAC-Inhibition als molekularer Startpunkt antineoplastischer Wirkungen gilt, könnten sich auch neue Fragen bezüglich der Krebsprävention durch Lebensmittelinhaltsstoffe ergeben.

### **4.11.1 Untersuchung bekannter teratogener Substanzen auf Histondeacetylase-Inhibition**

Untersucht wurden die in Abbildung 4-46 gezeigten Strukturderivate der zwei bekannten teratogenen Substanzen Thalidomid und all-trans-Retinsäure (Vitamin A), die zunächst auf qualitative Beeinflussung des Acetylierungsgrades von Kernhiston H4 in einem F9-Zellsystem untersucht wurden (Abbildung 4-47). Keines der untersuchten teratogenen und intrinsisch nicht-teratogenen Derivate löste bei einer Konzentration von 200 µmol/L (Thalidomidderivate) bzw. 100 µmol/L (Retinoide) und einer Einwirkzeit von sechs Stunden im Testzellsystem eine Hyperacetylierung von Kernhiston H4 aus. Die nachfolgende quantitative Analyse der HDAC-Inhibition zeigte, dass die Substanzen bis zur Grenze ihrer Löslichkeit im Testsystem von ca. 200 µmol/L keinerlei Beeinflussung der HDAC-Enzymfunktion aufwiesen.



**Abbildung 4-46:** Auswahl geeigneter Strukturderivate der beiden bekannten teratogenen Substanzen Thalidomid und all-trans-Retinsäure.



**Abbildung 4-47:** Proteinstatus der F9-Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^3\text{H}$ ) nach Behandlung mit teratogenen und nicht-teratogenen Derivaten von Vitamin A und Thalidomid. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand der Zellen (Grundzustand der Zellen)

I	Rainbow Marker (Proteinleiter)
VIII	Negativkontrolle (DMSO-Medium)
IX	Positivkontrolle (TSA 200 nM)
II	Thalidomid 200 $\mu\text{M}$ 6h
III	beta-EM 12 200 $\mu\text{M}$ 6h
IV	EM 12 200 $\mu\text{M}$ 6h
V	all-trans-Retinsäure 100 $\mu\text{M}$ 6h
VI	13-cis-Retinsäure 100 $\mu\text{M}$ 6h
VII	leer

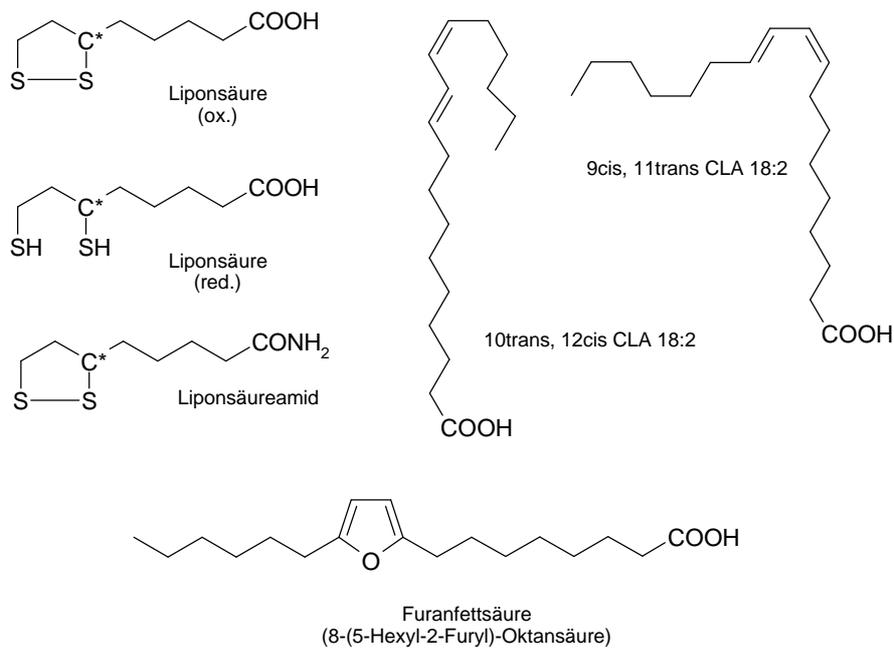
Damit ist vorläufig die Hypothese widerlegt, dass HDACs eine allgemeine molekulare Zielstruktur für teratogene Substanzen darstellen. Interessant sind in diesem Zusammenhang jedoch Untersuchungen zu teratogenen Effekten von Trichostatin A, einem gut untersuchten HDAC-Inhibitor. Während SVENSSON et al. bei explantierten und behandelten Mausembryonen ähnliche Entwicklungsdefekte wie bei Behandlung mit VPA feststellen (SVENSSON et al. 1998), so konnten NERVI et al. bei Behandlung trächtiger CD-1 Mäuse weder maternal-toxische, embryonal-toxische noch teratogene Effekte durch TSA beobachten (NERVI et al. 2001).

Teratogene Effekte bleiben damit zunächst substanzspezifisch und in ihrer molekularen Kausalität komplex. Die Untersuchung weiterer bekannter teratogener Substanzen könnte Aufschluss darüber geben, ob auch andere als die hier untersuchten Teratogene eine Beeinflussung der HDAC-Aktivität verursachen.

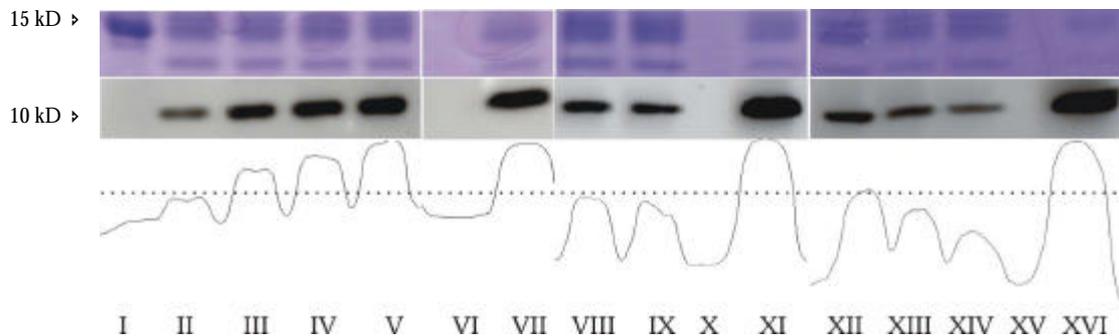
#### **4.11.2 Untersuchung von Lebensmittelinhaltsstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln, insbesondere weiterer Fettsäuren, auf HDAC-Inhibition**

Es wurde eine Vielzahl von Lebensmittelinhaltsstoffen sowie aktuellen oder geplanten Lebensmitteladditiven (functional-food) auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Enzymaktivität von Histondeacetylasen untersucht. Hierzu wurde erneut das F9-Zellkultursystem und der humane HDAC-Enzym-Assay verwendet. Die weit überwiegende Anzahl der getesteten Substanzen zeigte keinerlei Potenz zur Inhibition der HDACs in Konzentrationsbereichen bis zur Löslichkeitsgrenze der jeweiligen Substanz, dies waren: Vitamin C, Folsäure, Biotin, Pantothenensäure, Flavon, Stigmasterol, beta-Sitosterol sowie die Fettsäuren Phytansäure, trans-Vaccensäure oder Docosahexaensäure (DHA).

Auffällig waren jedoch Untersuchungen zu kurzkettigen Fettsäuren wie z.B. Liponsäure und langkettigen Fettsäuren wie den konjugierten Linolsäuren (CLAs). Bei den in Abbildung 4-48 gezeigten Fettsäuren handelte es sich um Substanzen mit HDAC-Inhibitions-Potenzial. Während bereits bei der qualitativen Untersuchung zur Beeinflussung der HDAC-Enzym-Aktivität im F9-Zellsystem die Liponsäure sowohl in reduzierter als auch oxidierte Form bei einer Testkonzentration von 1,00 mmol/L eine Hyperacetylierung des Kernhistons H4 induzierte, wurden in diesem Testsystem bei einer Konzentration von 200 µmol/L die konjugierten Linolsäuren C18:2 10E,12Z CLA sowie 9Z, 11E CLA und ein typisches Oxidationsprodukt der CLAs die Furanfettsäure 8-(5-Hexyl-2-furyl)-Oktansäure nicht als positive Substanzen identifiziert (Abbildung 4-49). Die im Anschluss daran untersuchten Halbwirkkonzentrationen  $IC_{50}$ (HDAC) sind in Abbildung 4-50 graphisch dargestellt und in Tabelle 4-27 für diese Testsubstanzen zusammengefasst.

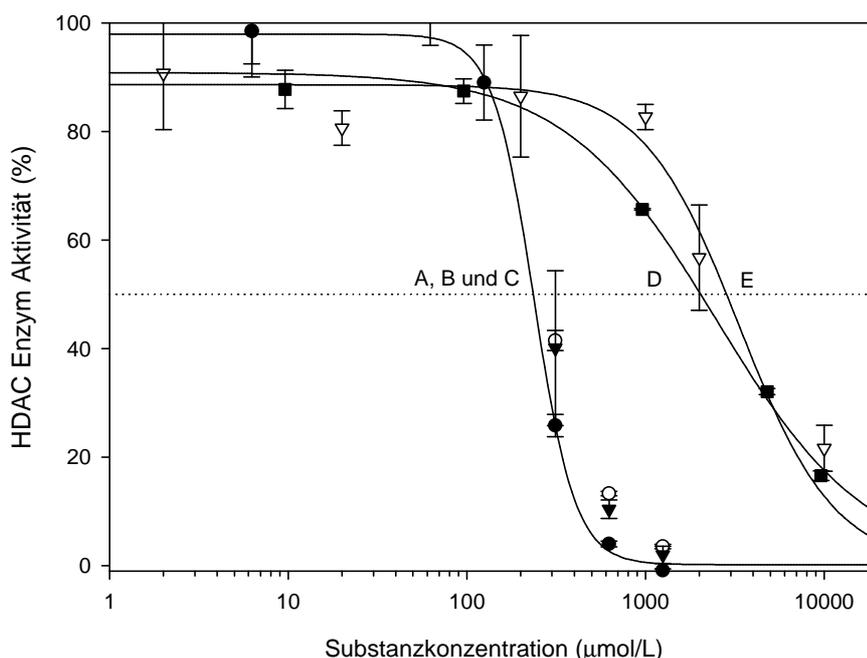


**Abbildung 4-48:** Strukturen der untersuchten Fettsäuren und konjugierten Linolsäuren mit Potenzial zur HDAC-Inhibition.



**Abbildung 4-49:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $\text{AcH}_4$ ) nach Behandlung mit Fettsäuren, konjugierten Linolsäuren und oxidativen Abbauprodukten der CLAs. Oben: gefärbtes Acrylamidgel; Mitte: Röntgenfilmschwärzung; Unten: densitometrische Auswertung (%max); gestrichelte Linie: Basalzustand der Zellen (Grundzustand).

I	Rainbow Marker (Proteinleiter)
II, IX, XII	Negativkontrolle (DMSO-Medium)
VI, X, XV	leer
VII, XI, XVI	Positivkontrolle (TSA 200 nM)
III	Liponsäure (oxid) 1,00 mM 6h
IV	Liponsäure (red.) 1,00 mM 6h
V	Liponsäureamid 1,00 mM 6h
VIII	Furanfettsäure 200 $\mu\text{M}$ 24 h
XIII	9cis, 11trans CLA 18:2 200 $\mu\text{M}$ 24 h
XIV	10trans, 12cis CLA 18:2 200 $\mu\text{M}$ 24h



**Abbildung 4-50:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der positiv getesteten Liponsäuren, konjugierten Linolsäuren und der Furanfettsäure und Angabe der  $IC_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).

A	8-(5-Hexyl-2-Furyl)-Oktansäure (Furanfettsäure)	$IC_{50}(\text{HDAC})=240 \mu\text{M}$	SE: $20 \mu\text{M}$
B	9Z, 11E CLA 18:2	$IC_{50}(\text{HDAC})=290 \mu\text{M}$	SE: $820 \mu\text{M}$
C	10E, 12Z CLA 18:2	$IC_{50}(\text{HDAC})=290 \mu\text{M}$	SE: $430 \mu\text{M}$
D	Liponsäure (red.)	$IC_{50}(\text{HDAC})=2800 \mu\text{M}$	SE: $770 \mu\text{M}$
E	Liponsäure (oxid.) Liponsäureamid	$IC_{50}(\text{HDAC})=4300 \mu\text{M}$ $IC_{50}(\text{HDAC}) > 5000 \mu\text{M}^*$	SE: $1600 \mu\text{M}$

\*Löslichkeit im Testsystem überschritten

Während die Dosis-Wirkungs-Kurven der Liponsäuren eine normale Steilheit aufwiesen, fielen die getesteten CLAs und die Furanfettsäure durch eine besonders steile Kurvenform auf. Analog zu der bereits in Kapitel 4.3 gezeigten 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure bestand daher die Möglichkeit einer falsch positiven Bestimmung im Enzym-Assay durch eine Interferenz dieser getesteten Substanzen mit der Farbreaktion des Assays. Dies erschien umso wahrscheinlicher, da im F9-Zellkulturversuch bei einer nur geringfügig kleineren Konzentration von  $200 \mu\text{mol/L}$  keine Effekte beobachtet werden konnten. Untersuchungen zur Interferenz sowohl von 10trans, 12 cis CLA 18:2 als auch 9cis, 11trans CLA 18:2 und der Furanfettsäure zeigten jedoch bei einer Testkonzentration von jeweils  $890 \mu\text{mol/L}$  keinerlei Einfluss auf die Entwicklungsreaktion.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die hier untersuchten konjugierten Linolsäuren und die Furanfettsäure in Konzentrationen nahe ihrer Löslichkeitsgrenze (ca.  $600\text{-}800 \mu\text{mol/L}$ ) einen enzyminhibierenden Effekt auf HDACs ausüben können. Inwiefern dieser Effekt eine physiologische Relevanz hat bzw. ob nicht andere molekulare Zielstrukturen durch konjugierte

Linolsäuren bereits bei geringeren Konzentrationen beeinflusst werden, bleibt zunächst ungeklärt und ist Gegenstand aktueller Forschungen im Arbeitskreis.

Interessant ist die beobachtete HDAC-Inhibition der verschiedenen Liponsäuren. Bereits KRISHNA et al. konnten 2002 eine schwache Inhibition der HDACs bei 24 stündiger Behandlung von FaDu-Zellen mit 2 mM alpha-Liponsäure beobachten, ohne jedoch eine konkrete  $IC_{50}$  zu bestimmen (KRISHNA et al. 2002). Dieser Konzentrationsbereich konnte von VAN DE MARK et al. 2003 mit 5 mM an K562 Zellen bestätigt werden (VAN DE MARK et al. 2003). Während in Analogie zu VPA-Derivaten das Liponsäureamid in der vorliegenden Arbeit intrinsisch keine Aktivität trägt, zeigt die reduzierte Form der Liponsäure mit ca. 3 mmol/L eine um den Faktor 1,5 höhere  $IC_{50}$ (HDAC) als die Liponsäure in oxidierte Form. Insgesamt ist die benötigte Konzentration zur Beeinflussung der HDAC Aktivität im Vergleich zu VPA deutlich erhöht (Faktor 5-10).

Derzeit sind keine Untersuchungen der als Nahrungsergänzungsmittel angebotenen Liponsäure zu möglichen teratogenen Effekten bei Mensch oder Tier bekannt (MORELIFE 2003, HIGDON 2003). Toxische Effekte treten beim Menschen bei einer Tagesdosis von 600 mg/Tag über 3 Jahre und einem hieraus resultierendem Blutplasmaspiegel im mM Konzentrationsbereich nicht auf, die  $LD_{50}$ (Hund) liegt mit 300-600 mg/kg vergleichsweise hoch, die Einnahme während der Schwangerschaft und Stillzeit wird dennoch nur unter ärztlicher Aufsicht empfohlen.

Bis zur endgültigen Klärung der Frage, ob und in welchem Maße die HDAC-Inhibition von Fettsäuren wie Liponsäuren und konjugierten Linolsäuren physiologische Relevanz hat, werden noch weitere Untersuchungen notwendig sein. Insbesondere die möglicherweise differenzielle Aktivität dieser Substanzen an einzelnen HDAC-Isoformen könnte weitere Hinweise zur Klärung dieser Frage geben.

## 5 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Trotz der langjährigen klinischen Verwendung von VPA im Indikationsfeld der epileptischen Erkrankungen und ihrer neuen Anwendungsgebiete im Bereich der bipolaren Erkrankungen, der Migräneprophylaxe und der Verwendung in der Krebstherapie sind die molekularen Zielstrukturen und Signalkaskaden der VPA sowohl bei Wirkungen als auch bei ihren Nebenwirkungen derzeit noch immer weitgehend unbekannt. Dies gilt insbesondere für die zwei seltenen aber lebensbedrohlichen Nebenwirkungen der VPA: der akuten Lebertoxizität und der Teratogenität.

Bisherige Untersuchungen zu Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen von VPA-Derivaten erfolgten, wie auch in dieser Arbeit für neue Strukturanaloga, überwiegend im NMRI-Exenzephalie-Modell nach NAU et al. 1981. Bei der in NMRI-Mäusen induzierbaren Exenzephalie handelt es sich ebenso wie bei der im Menschen verursachten *spina-bifida-aperta* („offener Rücken“) um einen Defekt im Neuralrohrschluss (neural tube defect, NTD). Auch die *spina-bifida-aperta* kann im NMRI-Mausmodell induziert werden (EHLERS et al. 1992), jedoch ist das Exenzephalie-Modell auf Grund der geringeren Embryoletalitäten und der einfachen Endpunktsbestimmung das geeignetere Tiermodell zum Substanzscreening von VPA-Derivaten.

Anhand dieses Tiermodells bereits untersuchte strukturelle Voraussetzungen für eine teratogene Wirkung der VPA können wie folgt zusammengefasst werden: Das an C2 lokalisierte Wasserstoffatom der VPA-Derivate ist für die teratogene Wirkung von essentieller Bedeutung, was sowohl durch den Verlust der Teratogenität bei Abstraktion oder Substitution als auch durch die stereoselektive teratogene Wirkung bei enantiomeren VPA-Derivaten mit chiralem Zentrum an C2 deutlich wird. Weiterhin ist die Karbonsäurefunktion selbst sowie eine Seitenkettenlänge von mindestens drei Kohlenstoffatomen eine Grundvoraussetzung zur Induktion von NTDs. Die Einführung einer Dreifachbindung in Position C4-C5 verstärkt dabei die teratogenen Effekte ebenso wie die weitere Verlängerung einer der beiden Seitenketten (NAU AND LÖSCHER 1984, LÖSCHER AND NAU 1985, HAUCK AND NAU 1990, HAUCK et al. 1991, HAUCK et al. 1992, BOJIC et al. 1996, BOJIC et al. 1998, ELLERBECK et al. 1998, GRAVEMANN 2002, VOLLAND 2002).

Erste Ergebnisse von LAMPEN et al. zur molekularen Toxizität der VPA konnten eine vergleichbare Struktur-Wirkungs-Beziehung teratogener VPA-Derivate an peroxisomalen proliferationsaktivierten Rezeptoren (PPARs), insbesondere PPAR $\delta$ , demonstrieren (LAMPEN et al. 1999), was diese nukleären Rezeptoren als molekulare Zielstrukturen auswies. Bis heute war es jedoch nicht möglich eine direkte Bindung von VPA oder ihren Derivaten an diesen Rezeptoren zu zeigen (LAGACE AND NACHTIGAL 2004), sodass es sich bei PPARs vermutlich nicht um direkte Zielstrukturen der VPA handelt (LAMPEN et al. 2001).

2001 konnten unabhängig voneinander zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass Histondeacetylasen (HDACs) ein direktes molekulares Target von VPA darstellen (PHIEL et al. 2001 und GÖTTLICHER et al. 2001). Der Bindungsnachweis an HDACs gelang durch die Verdrängung von radiomarkierter VPA durch Trichostatin A, einen bekannten HDAC-Inhibitor. HDACs besitzen durch ihren Einfluss auf das Chromatin-Remodeling der Zellen eine elementare Wirkung auf Expression und Repression spezieller Gene. Sie sind evolutionär stark konserviert und stellen sowohl im Sinne der molekularen Toxizität als auch im Bereich der Krebsforschung eine sehr interessante molekulare Zielstruktur dar (STREYER 1999). Die Inhibition der HDACs kann zu zellulären Effekten wie Proliferationsinhibierung, Differenzierung und Apoptose führen, welche die biologische Grundlage für die Entwicklung sowohl anti-karzinogener als auch teratogener Effekte darstellen. Forschungen zu Tumorerkrankungen zeigen, dass diese häufig mit einer Fehlfunktion im enzymatischen Gleichgewicht von HATs und HDACs verknüpft sind (Kapitel 2.8).

Ziel dieser Arbeit war es daher, Struktur-Wirkungs-Beziehungen von VPA an der Enzymklasse der Histondeacetylasen anhand von Strukturanaloga zu definieren und mögliche Parallelen zu den bereits bekannten strukturellen Voraussetzungen der VPA bezüglich ihrer Wirkungen und speziell der teratogenen Nebenwirkungen aufzuzeigen. Bereits PHIEL et al. konnten zeigen, dass das als nicht-teratogen geltende Valpromid keine HDAC-Inhibition verursachte (PHIEL 2001), während GÖTTLICHER et al. anhand zweier Stereoisomere eine unterschiedliche Aktivität der VPA-Derivate an HDACs zeigen konnten (GÖTTLICHER et al. 2001). Die anti-convulsiven Wirkungen der VPA zeigten dagegen bisher eine geringe Strukturspezifität (HAUCK et al. 1991), während Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Bereich der Migränaprophylaxe mangels molekularer Targets bisher nicht bekannt sind. Erste Arbeiten zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Indikationsfeld der bipolaren Erkrankungen deuten eine Strukturspezifität an, die weder mit Strukturvoraussetzungen für teratogene noch anti-convulsiver Effekte korreliert (WILLIAMS et al. 2002, EICKHOLT et al. 2005), erste Arbeiten im Bereich der anti-karzinogenen und anti-angiogenetischen Effekte deuten einen Zusammenhang mit teratogenen Effekten an (DEUBZER et al. 2005, MICHAELIS et al. 2004/a, MICHAELIS et al. 2004/b).

## 5.1 Entscheidungssystem zur Beurteilung des teratogenen Potenzials von Strukturanaloga der VPA

Zur Untersuchung der Ausgangshypothese, dass VPA verursachte Neuralrohrdefekte (NTDs) durch Inhibition von HDACs induziert werden, wurde in dieser Arbeit zunächst aus einem bestehenden Pool von Strukturanaloga ein Testset von VPA-Derivaten definiert, das bei einer strukturell möglichst hohen Diversifizierung die bereits bekannten Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen berücksichtigte. Anschließend wurden die Einflüsse dieser Derivate auf HDACs untersucht und mit ihren teratogenen Eigenschaften verglichen.

Um eine Korrelation durchführen zu können, war es jedoch zuvor notwendig die bis dato bekannten teratogenen Wirkungen der Strukturanaloga im NMRI-Tiermodell einheitlich zu charakterisieren und zu quantifizieren. Hierzu wurden die seit 1981 durchgeführten und publizierten reproduktionstoxikologischen Untersuchungen der VPA-Derivate am NMRI-Tiermodell herangezogen und analysiert. Es stellte sich heraus, dass für viele der ausgewählten Strukturanaloga nur ein oder zwei Dosis-Wirkungs-Messwerte aus dem NMRI-Exenzephalie-Maus-Model vorlagen, so dass es nicht möglich war für diese VPA-Derivate eine quantitative Halbwirkkonzentration der Teratogenität ( $TeraD_{50}$ ) zu berechnen. Für eine solche Bestimmung wären mindestens drei Dosis-Wirkungs-Messwerte im Bereich von 90 % bis 10 % der maximalen Wirkung notwendig gewesen (Auswertungsverfahren nach LITCHFIEL AND WILCOXON 1949).

Weiter wurde festgestellt, dass sich sowohl die Applikationsarten als auch insbesondere die Lösemittel der Untersuchungen unterschieden und einen direkten Vergleich der Messwerte untereinander erschwerten. Als Alternative hierzu wurden daher in dieser Arbeit Entscheidungskriterien erarbeitet, die es unter definierten Randbedingungen ermöglichten die VPA-Derivate semi-quantitativ zu klassifizieren und in sechs Gruppen von teratogener Potenz einzuteilen. Mit Hilfe der entwickelten Entscheidungskriterien war es möglich jedem VPA-Derivat des Test-Sets eine teratogene Potenz auf einer Skala von 0 (kein teratogenes Potenzial) bis +++++ (sehr starkes teratogenes Potenzial) auch anhand nur eines einzigen Dosis-Wirkungs-Messwertes aus dem NMRI-Exenzephalie-Model zuzuordnen.

Kritisch betrachtet fließen bei dem entwickelten Entscheidungssystem auch bisherige Erfahrungen im Umgang mit dem Tiermodell und den Testsubstanzen subjektiv in die Graduierung der Valproinsäure-Analoga mit ein (weiche Daten), trotzdem kann durch die gewählten Randbedingungen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Objektivität der Substanzbewertung erreicht werden.

## 5.2 Synthese enantiomerer VPA-Hydroxamsäurederivate mit chiralem Zentrum an C2 und reproduktionstoxikologische Untersuchung

Zur Vervollständigung des Substanzpools von VPA-Derivaten wurden in dieser Arbeit erstmals zwei enantiomere Hydroxamsäurederivate der VPA mit chiralem Zentrum an C2 synthetisiert. Diese Verbindungen waren aus zwei Gründen für die zu untersuchende Fragestellung von besonderem Interesse, denn erstens konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass die Verbindung ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure die bis dato einzige bekannte VPA-Hydroxamsäure mit teratogener Nebenwirkung war (VOLLAND 2002). Es sollte daher untersucht werden, ob die teratogene Wirkung dieser Verbindung ausschließlich oder überwiegend durch eines der Enantiomere verursacht wird, wie dies bereits für Karbonsäurederivate der VPA mit chiralem Zentrum an C2 gezeigt werden konnte (HAUCK et al. 1991). Zweitens waren Hydroxamsäuren interessante Strukturanaloga zur Untersuchung einer inhibierenden Wirkung an HDACs, da einer der am besten charakterisierten HDAC-Inhibitoren (Trichostatin A) ebenfalls eine Hydroxamsäure darstellt. Trichostatin A zeigt als Hydroxamsäure eine sehr hohe Aktivität an HDACs der Klasse I und II mit einer  $IC_{50}$ (HDAC) von 5-50 nmol/L, während die korrespondierende Säure keine Aktivität aufweist (YOSHIDA et al. 1990). Es stellte sich daher die prinzipielle Frage, ob die Hydroxamsäurefunktion auch bei VPA-Derivaten eine Steigerung der Aktivität an HDACs verursachen könnte.

Die hier erstmalige Synthese der enantiomeren R- und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure erfolgte ausgehend von der jeweiligen Karbonsäure (GRAVEMANN 2002) in sehr guten Ausbeuten von über 80 % mit hoher chemischer (> 99 %) und optischer Reinheit (> 98 %ee) im Grammmaßstab. Die reproduktionstoxikologische Untersuchung im NMRI-Exenzephalie-Modell bestätigte zunächst, dass die teratogene Wirkung ausschließlich von einem der beiden Enantiomere, der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure, induziert wurde. Allerdings war die Gesamtinzidenz der beobachteten Fehlbildungen mit 5 % bei einer Dosisgabe von 1,5 mmol/kg überraschend gering. Im Vergleich zur Exenzephalierate von 14 % der racemischen Mischung (VOLLAND 2002) wurde nicht die erwartete Wirkungssteigerung bei Applikation nur der aktiven Wirkform (des S-Enantiomers) beobachtet, sondern eine deutlich geringere Exenzephalierate gemessen. Erklärungen hierfür könnten im Bereich der Pharmakokinetik und Metabolisierung dieser Hydroxamsäuren liegen. Da die Applikation eines Racemates praktisch der Gabe zweier unabhängiger Substanzen entspricht, können sich diese im Sinne einer Drug-Drug Wechselwirkung auf vielfältige Weise gegenseitig beeinflussen (z.B. Plasmaproteinbindung, Metabolisierung, Wirkrezeptoren, Transportrezeptoren etc.). Eine abschließende Erklärung kann für den beobachteten Effekt nicht gegeben werden, im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden aber Studien zum Metabolismus und zur Pharmakokinetik der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure durchgeführt, die eine deutliche Metabolisierung dieser Substanz anzeigen und einen möglichen Ansatzpunkt für Drug-Drug-Wechselwirkungen darstellen.

### 5.3 Untersuchung der HDAC-Inhibition im F9-Zellsystem

Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der VPA-Derivate im Hinblick auf eine Inhibition von HDAC-Enzymen erfolgte in dieser Arbeit zunächst qualitativ in einem Zellsystem von teratokarzinomen F9-Mauszellen. Das F9-Testsystem eignet sich für diese Untersuchungen aus zwei Gründen. Erstens ist die F9-Zelle als embryonale Stammzelle in der Lage unter Valproinsäure-Behandlung zu differenzieren (EUROPEAN COLLECTION OF CELL CULTURES 2004, WERLING et al. 2001) und konnte bereits in früheren Untersuchungen als sehr sensitive Zelle für die Valproat-Behandlung identifiziert werden (LAMPEN et al. 1999). Zweitens kann durch die Verwendung von Mauszellen der Übergang ausgehend vom Maus-Tiermodell über die Mauszellkultur hin zu Untersuchungen an humanen HDAC-Enzymen demonstriert werden.

Bei einer erwarteten Funktionsinhibierung der HDACs sollten die Kernhistone der Zellen einen höheren Grad an Acetylierung erreichen, welcher auf Proteinebene in Form des hyperacetylierten Kernhistons H4 mittels Western-Blot-Analysen verfolgt wurde. Das Kernhiston H4 war als Markerprotein besonders gut geeignet, da neben einer generellen evolutionären Konservierung der Kernhistone besonders Histon H4 eines der am stärksten konservierten Proteine darstellt (STREYER 1999). Darüber hinaus wurde bisher keine selektive Wirkung einzelner HDAC-Isoformen gegenüber den Kernhistonen gezeigt, sodass die Hyperacetylierung von H4 als Summenparameter für die Inhibition aller Isoformen von Histondeacetylasen gelten kann.

Anhand der untersuchten VPA-Derivate konnte gezeigt werden, dass die Hyperacetylierung des Kernhistons H4 sehr strukturspezifisch ausgelöst wurde und ausschließlich durch VPA-Derivate mit teratogenem Potenzial erreicht wurde. Dies stand qualitativ in guter Übereinstimmung mit der Arbeitshypothese. Durch Voruntersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Hyperacetylierung bei Behandlung mit VPA oder S-2-Pentyl-4-Pentinsäure wurde festgestellt, dass VPA eine Hyperacetylierung nach 15 Minuten auslöste, während das Derivat erst im Verlauf von über vier Stunden einen signifikant unterschiedlichen Effekt zeigte. Dies weist einerseits auf die unterschiedlich schnelle Überwindung der Zellmembran in Abhängigkeit der Molekülstruktur hin, andererseits wird deutlich, dass der von VPA induzierte Effekt sehr schnell ausgelöst wird und HDACs als molekulare Zielstruktur entweder den Startpunkt der Signalkaskade bilden oder zumindest in sehr frühen Stadien der Signalkaskade beteiligt sind.

Neben der beobachteten qualitativen Übereinstimmung der induzierten Hyperacetylierung mit dem teratogenen Potenzial der jeweiligen VPA-Derivate fiel jedoch auf, dass sowohl Amid- und Hydroxamsäure-Derivate als auch an C3 verzweigte VPA-Derivate ( $\beta$ -verzweigte VPA-Derivate) keine bzw. nur eine geringe Hyperacetylierung zeigten. Diesen Substanzen wurde aber zuvor im Graduierungssystem teilweise eine teratogene Potenz zugewiesen, sodass diese VPA-Derivate im Sinne eines Testsystems zur Erkennung einer teratogenen Substanzen auf Grundlage der HDAC Inhibition als falsch negative Testsubstanzen gelten würden. Die eingehende Diskussion dieser

beobachteten Effekte erfolgt in Kapitel 5.5 – 5.7 anhand der Untersuchungen zum Metabolismus dieser VPA-Derivate.

Zwei Arbeitsgruppen konnten an unterschiedlichen Zelllinien zeigen, dass HDAC-Inhibitoren auch in der Lage sind den Proteingehalt an Histondeacetylasen selbst zu verringern. KRÄMER et al. demonstrierten den durch VPA induzierten selektiven proteosomalen Abbau von HDAC 2 im Gegensatz zu HDAC 3, während XU et al. eine Verringerung des HDAC3 Proteinlevels durch Behandlung mit Suberoylanilinhydroxamsäure (SAHA) zeigen konnten (KRÄMER et al. 2003, XU et al. 2005). Da eine Hyperacetylierung des Kernhistons H4 prinzipiell auch durch eine Reduktion des Proteingehaltes an HDACs erreicht werden könnte, wurden repräsentativ ausgewählte VPA-Derivate im F9-Zellsystem auf ihren Einfluss auf den Proteingehalt von HDAC 2 und HDAC 3 untersucht. Entgegen der Beschreibung von KRÄMER et al. konnte jedoch kein Einfluss der VPA-Derivate auf den zellulären Proteingehalt von HDAC 2 oder HDAC 3 in einem Zeitraum von bis zu 24 Stunden festgestellt werden. Warum auch Valproinsäure selbst in diesen Untersuchungen keine Wirkung auf den Proteingehalt an HDAC 2 zeigte, kann nicht abschließend geklärt werden; eindeutig ist jedoch, dass die bereits nach sechs Stunden beobachtete Hyperacetylierung der Kernhistone nach Behandlung der F9-Zellen nicht durch einen Proteinabbau von HDACs verursacht wird.

Da in dieser Arbeit auch kein strukturabhängiger Effekt der VPA-Derivate auf den Proteingehalt an HDAC 2 oder HDAC 3 beobachtet werden konnte und insbesondere das VPA-Derivat S-2-Pentyl-4-Pentylhydroxamsäure mit einer  $IC_{50}(\text{HDAC})$  von 50  $\mu\text{mol/L}$  keine Wirkung auf den HDAC 2 und HDAC 3 Proteinlevel zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass nicht die Induktion eines Abbaus von HDACs, sondern tatsächlich die Funktionsinhibierung der Histondeacetylasen ursächlich mit der teratogenen Potenz der VPA-Derivate korreliert.

## 5.4 Untersuchung der HDAC-Inhibition im Enzym-Assay

In weitergehenden Untersuchungen an einem humanen HDAC-Enzym-Assay wurde die Funktionsbeeinflussung der HDACs quantitativ durch Berechnung der Halbwirkkonzentration  $IC_{50}(\text{HDAC})$  bestimmt. Der hierzu verwendete kommerzielle HDAC-Enzym-Assay verwendet als Quelle seiner HDAC-Aktivität einen nukleären Zellextrakt von HeLa-Zellen (humane Krebszelllinie Helene Lange), der eine Mischung aller natürlich vorkommenden HDAC Klassen und Isoformen darstellt. Die berechnete  $IC_{50}(\text{HDAC})$  ist in diesem Sinne ein Summenparameter und unterscheidet nicht zwischen der Aktivität an einzelnen HDAC-Isoformen.

Die Untersuchung der VPA-Derivate des Test-Sets zeigte eine hohe Strukturselektivität der HDAC-Inhibition an, wobei die  $IC_{50}(\text{HDAC})$  der einzelnen Strukturanaloga Werte von 10 - 5000  $\mu\text{mol/L}$  erreichte. Wie schon zuvor bei der Untersuchung der Hyperacetylierung des Kernhistons H4, zeigten ausschließlich Strukturanaloga mit teratogenem Potenzial eine  $IC_{50}(\text{HDAC})$  von weniger als 2500  $\mu\text{mol/L}$ . Besonders auffällig waren VPA-Derivate mit einer Halbwirkkonzentration von 10-50  $\mu\text{mol/L}$  (z.B. 2-Propyl-Oktansäure und S-2-Pentyl-4-Pentinsäure), was im Vergleich zu VPA eine Steigerung der Aktivität an HDAC-Enzymen um den Faktor 10-50 entspricht. Solche Derivate sind einerseits als Modellsubstanzen im Bereich der molekularen Teratologie, aber auch im Bereich der Krebsforschung als mögliche neue Chemotherapeutika von großem Interesse. In beiden Forschungsbereichen werden insbesondere Substanzen mit einer abgestuften Aktivität an HDACs von Bedeutung sein, da sie eine selektivere Beeinflussung als bisherige Inhibitoren (z.B. Trichostatin A -  $IC_{50}(\text{HDAC}) = 50 \text{ nmol/L}$ ) ermöglichen.

Amid- und Hydroxamsäure-Derivate sowie die VPA-Derivate mit Kettenverzweigung an C3 stellten bei diesen Untersuchungen erneut eine Ausnahme im Sinne der Arbeitshypothese dar. Trotz des bestimmten teratogenen Potenzials zeigten diese Derivate keine bzw. nur eine sehr geringe Aktivität an HDACs ( $IC_{50}(\text{HDAC}) > 2000 \mu\text{mol/L}$ ). Besonders auffällig war das VPA-Derivat 3-Methyl-Hexansäure, das trotz des geringen teratogenen Potenzials von + eine  $IC_{50}(\text{HDAC})$  von 780  $\mu\text{mol/L}$  aufwies und damit in einer Größenordnung mit der Halbwirkkonzentration von Valproinsäure lag.

Eine typische Eigenschaft von enzymatischen Testsystemen, wie dem in dieser Arbeit verwendeten, und der überwiegenden Zahl heute bekannter Zell-Testsysteme ist die mangelnde metabolische Kompetenz. Im Vergleich zu Testverfahren im Tiermodell können daher aktivierende (teilweise auch deaktivierende) Prozesse in der Regel nicht berücksichtigt werden, sodass diese Systeme ausschließlich die intrinsische Aktivität der eingesetzten Testsubstanz bestimmen. Ausnahmen bilden die derzeit in der Forschung und Entwicklung befindlichen neueren in vitro Methoden, die Testsubstanzen vor Zugabe zum Testsystem metabolisieren (z.B.

durch Leberzellextrakte) oder die eine gleichzeitige Metabolisierung und Testung von Substanzen durch Co-Kulturen von z.B. Leberzellen und Zielzellen ermöglichen (BREMER et al. 2002).

Es wurde daher vermutet, dass die zwei bisherigen Ausnahmegruppen der Amide und Hydroxamsäuren sowie der  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivate intrinsisch keine teratogene Wirkung aufwiesen, sondern im Tiermodell erst zu aktiven Substanzen metabolisiert werden müssen, bzw. wie im Falle der 3-Methyl-Hexansäure intrinsisch aktiv sind, jedoch in vivo deaktiviert werden. Diese Substanzeigenschaft konnte explizit bereits für Valpromid, dem Amid-Derivat der Valproinsäure, im Tierversuch gezeigt werden (RADATZ et al. 1998), während andere Untersuchungen zum metabolischen und pharmakokinetischen Verhalten von Valproinhydroxamsäure keinen Hinweis auf eine Metabolisierung zur Karbonsäure geben konnten (LEVI et al. 1997).

Ehe eine Korrelation zwischen der berechneten HDAC-Halbwirkkonzentration und dem anhand des Graduierungssystems festgestellten teratogenen Potenzial in Kapitel 5.7 angestrebt wurde, sollten daher Untersuchungen zum metabolischen und pharmakokinetischen Verhalten dieser beiden Substanzgruppen im Mausmodell anhand von repräsentativen VPA-Analogen durchgeführt werden.

## 5.5 Pharmakokinetische Untersuchungen von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure und ihres Metaboliten

Ausgehend von der Hypothese, dass die VPA-Hydroxamsäuren in vivo zu teratogenen und an HDAC aktiven Derivaten metabolisiert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit NMRI-Mäuse mit S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure als Modells substanz für Hydroxamsäurederivate der VPA behandelt und Plasmaproben per GC-MS auf Metabolite untersucht. Als einziger nachzuweisender Metabolit konnte die korrespondierende Karbonsäure in relativ hohen Konzentrationen im Blutplasma nachgewiesen werden. Hieran anschließend wurden jeweils quantitative und stereoselektive Bestimmungsverfahren zur Analyse sowohl von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure als auch des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure entwickelt und die pharmakokinetischen Parameter dieser beiden Substanzen bestimmt.

In dieser Arbeit konnte erstmals die erfolgreiche Derivatisierung einer chiralen Hydroxamsäure mittels Menthylchloroformat ((-)-MCF), einem klassischen Derivatisierungsmittel für chirale Alkohole, zum diastereomeren Chlorameisensäurementhylester demonstriert werden. Die stereoselektive Untersuchung war notwendig, da ausgeschlossen werden sollte, dass das chirale Zentrum an C2 auf Grund der Nähe zur funktionellen Hydroxamsäurefunktion im Verlauf der Metabolisierung konvertiert würde. Dies galt ebenso für die Strategie zur stereoselektiven Derivatisierung der Karbonsäure, die durch Umsetzung mit einem chiralen Amin zum diastereomeren Amid erfolgte, wie bereits früher zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit chiraler VPA-Derivate erfolgreich demonstriert (HAUCK et al. 1991).

Die Validierung beider entwickelter Bestimmungsmethoden zeigte die für bioanalytische Verfahren geforderten Kenngrößen (FEDERAL DRUG ADMINISTRATION 2001) und führte zur Übernahme der Methoden in das akkreditierte Laborqualitätsmanagementsystem der Abteilung. Beide Quantifizierungsmethoden ermöglichten die Konzentrationsbestimmung in Maus- und Humanplasma sowie verschiedenen Geweben der Maus wie Niere, Milz, Leber und Gehirn mit sehr guten Wiederfindungsraten von 80 – 110 % bei einem Variationskoeffizienten von unter 10 %. Die Linearität der Verfahren war bei einer Bestimmungsgrenze von absolut 0,75 µg über einen Bereich von absolut 0,75 – 50 µg gegeben.

Die Analyse der pharmakokinetischen Parameter von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure im NMRI-Mausmodell zeigte eine im Vergleich zu VPA verkürzte Halbwertszeit von 20 Minuten (Gesamthalbwertszeit im non-compartment-model) bei gleichzeitig schneller Verteilung in alle untersuchten Gewebe. Besonders auffällig war die beobachtete rasche Aufnahme in das Gehirn. Unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Plasmabindungsrate von 45 % in der Maus ergab sich rechnerisch ein Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke von fast 200 %. Dies könnte eine Begründung für die bereits früher festgestellten guten antikonvulsiven Eigenschaften der Hydroxamsäurederivate der VPA sein (LEVI et al. 1997, VOLLAND 2002). Eine

Stereokonversion der Ausgangsverbindung konnte in keiner der untersuchten Plasma- oder Gewebeprouben festgestellt werden, während die sehr kurze Mean-Residence-Time (MRT) von 0,54 h bereits auf eine hohe Ausscheidungsgeschwindigkeit bzw. eine intensive Metabolisierung der Ausgangssubstanz schließen ließ.

Die quantitative Untersuchung des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure zeigte eine schnelle und intensive Verstoffwechslung nach Applikation der Hydroxamsäure. Bereits nach 30 Minuten erreichte der Metabolit vergleichbare Plasmakonzentrationen und konnte noch nach sechs Stunden in Plasma und Geweben bestimmt werden, während die Ausgangsverbindung bereits nach zwei Stunden in keinem Körperkompartiment mehr nachzuweisen war. Da der Metabolit S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ein VPA-Derivat mit extrem hohem teratogenem Potential (+++++) und sehr starker HDAC-Inhibition war ( $IC_{50}(\text{HDAC}) = 50 \mu\text{mol/L}$ ), wurde eine Äquivalentdosis-Betrachtung durchgeführt, die Aufschluss über die Frage geben sollte, ob der gebildete Metabolit eine Erklärung für die beobachteten teratogenen Effekte der S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell sein könnte. Die Abschätzung konnte zeigen, dass die nach Gabe der Hydroxamsäure im Blutplasma erreichten Konzentrationen der korrespondierenden Säure ausreichend sind um die bei S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure beobachteten teratogenen Wirkungen zu induzieren und zu begründen.

Hydroxamsäure-Derivate der VPA sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit intrinsisch nicht teratogen, sondern werden *in vitro* zu den korrespondierenden teratogenen Säuren metabolisiert (Pro-Teratogen). Dass dieser Metabolisierungsprozess von Levi et al. bei Verwendung von Valproinhydroxamsäure als Modellsubstanz nicht beobachtet wurde (LEVI et al. 1997), könnte zwei Ursachen haben: Erstens wurde in dieser Studie am Hundemodell eine vergleichsweise geringe Dosis von nur 0,14 mmol/kg eingesetzt und zweitens würde der postulierte Metabolit der Valproinhydroxamsäure, die Valproinsäure selbst, bekanntermaßen schnell und umfangreich weiter metabolisiert und eliminiert.

Trotz der sehr guten Verteilung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in das Hirngewebe der Maus spricht die ausgedehnte Metabolisierung zur korrespondierenden Karbonsäure gegen einen Einsatz dieses VPA-Derivates als anti-epileptisch wirksame Substanz. Als Pro-Teratogen ist sie jedoch hervorragend geeignet zur Entwicklung und Erforschung von *in vitro* Testsystemen mit metabolischer Kompetenz (z.B. Co-Kulturen). Auf Grund der geringen Zahl bekannter Pro-Teratogene ergibt sich hier ein neues Verwendungsfeld dieser Hydroxamsäure.

## 5.6 Pharmakokinetische Untersuchungen von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure

S-2-Pentyl-4-Pentinsäure mit einer Halbwirkkonzentration von  $IC_{50}(\text{HDAC}) = 50 \mu\text{mol/L}$  stellt ein sehr interessantes VPA-Derivat dar, das in weiteren pharmakokinetischen Studien in drei Mausstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund untersucht wurde. Im Vergleich zu VPA zeigte sich eine stark verlängerte Halbwertszeit von 240 Minuten ( $VPA t_{1/2} = 50 \text{ min}$ ) bei gleichzeitig schneller Verteilung in alle untersuchten Gewebe. Die Plasmabindungsrate in der Maus ist mit 69 % im Vergleich zu einer Plasmabindungsrate von ca. 12 % der VPA, vermutlich auf Grund der größeren Lipophilie, deutlich erhöht. Es erfolgt eine sehr gute Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, die unter der Annahme, dass nur freie Säure die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, praktisch 100 % beträgt und im Vergleich zu VPA fünfmal höhere Gehirnkonzentrationen ermöglicht.

Zwischen den untersuchten Mausstämmen von NMRI und den zwei Mäusestämmen mit einem genetischen Hintergrund, der C57/BL6 entspricht, ergaben sich dahingehend Unterschiede, dass S-2-Pentyl-4-Pentinsäure im NMRI Mausstamm eine längere Halbwertszeit im Plasma aufweist. Bei vergleichbarem Verteilungsvolumen lässt sich damit bei C57/BL6 basierenden Mäusen eine höhere Clearance und geringere Mean-Residence-Time feststellen.

Es ergeben sich also prinzipiell unterschiedliche pharmakokinetische Parameter der Testsubstanz S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der untersuchten Mäuse, was sich auf die Induktion von Neuralrohrdefekten in Abhängigkeit des Mausstammes auswirken könnte. Diese Schlussfolgerung stimmt sehr gut mit Untersuchungen zu Hitzeinduzierten und Phenobarbital-induzierten Neuralrohrdefekten in verschiedenen Mäusestämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund überein, die eine deutlich differenzielle Sensitivität zeigten (FINNELL et al. 1986, FINNELL et al. 1987). Gegenüber Phenobarbital stellte sich insbesondere der C57/BL6 Mausstamm als vergleichsweise resistent heraus.

Es sind ebenfalls Effekte des St8SiaIV-Gen-knock-outs festzustellen, da sich die beiden C57/BL6 basierenden Mausstämme im Verteilungsvolumen und der maximal erreichten Plasmakonzentration unterscheiden. Während der Wildtyp-Stamm ein größeres Verteilungsvolumen aufweist (und dementsprechend eine geringere maximale Plasmakonzentration sowie eine verlängerte Halbwertszeit), zeigen beide Mausstämme eine identische AUC. Anhand der Pharmakokinetik könnte daher vermutet werden, dass der knock-out Stamm bei Valproat-induzierten Neuralrohrdefekten eine zum NMRI-Mausstamm vergleichbare Exenzephalierate und eine zum Wildtyp-Stamm erhöhte Exenzephalierate aufweisen sollte. Tatsächlich konnte aber gezeigt werden, dass der Gen knock-out die Inzidenz von Neuralrohrdefekten nach Applikation von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure drastisch reduziert, was ein

deutlicher Nachweis für die Beteiligung dieses Gen an der Entstehung von Neuralrohrdefekten darstellt (HOFFMANN 2004).

Die Analyse von Plasmaproben behandelter NMRI-Mäuse lieferte keine Hinweise auf eine Stereokonversion des Analyten. Zum Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ( $t=60$  min,  $c=600$   $\mu\text{g/mL}$ ) konnte die R-2-Pentyl-Pentinsäure in sehr geringen Konzentrationen von  $20$   $\mu\text{g/mL}$  bestimmt werden. Diese Konzentration liegt einerseits im Bereich der Bestimmungsgrenze des analytischen Verfahrens und beträgt andererseits nur ca.  $3$  % der Konzentration des S-Enantiomers. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Konzentration durch die Applikation des S-Enantiomers selbst erreicht wird, da dieses chirale VPA-Derivat eine optische Reinheit von  $96$  %ee besaß (GRAVEMANN 2002). Desweiteren konnten per gaschromatographischer Trennung und massenselektiver Detektion ausgewählter NMRI Mausplasmaproben keine Metabolite im Plasma behandelter Tiere nachgewiesen werden, sodass die teratogene Potenz von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure auf die Substanz selbst und nicht auf einen möglichen Metaboliten zurückzuführen ist.

S-2-Pentyl-4-Pentinsäure stellt somit eine Verbindung dar, die im Vergleich zu VPA nicht nur eine intrinsisch höhere Aktivität an HDACs, sondern auch aufgrund der verlängerten Halbwertszeit eine vorteilhaftere Pharmakokinetik aufweist. Da HDAC-Inhibitoren derzeit als aussichtsreiche Substanzen zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika gelten, ist S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nicht nur zur Untersuchung der molekularen Teratogenität von Valproaten, sondern auch zum Einsatz in der Differenzierungstherapie im Rahmen der Krebsbehandlung von Interesse.

## 5.7 Metabolische Untersuchung von 3-Propyl-Heptansäure

In Kapitel 5.5 konnte gezeigt werden, dass Amid- und Hydroxamsäure-Derivate der VPA intrinsisch nicht teratogen sind, sondern durch Metabolisierung in vivo aktiviert werden (Pro-Teratogene). Es wurden daher weitere metabolische Untersuchungen zur Aufklärung der intrinsischen Teratogenität der Gruppe der  $\beta$ -verzweigten Karbonsäuren am Beispiel von 3-Propyl-Heptansäure durchgeführt und die Fragestellung verfolgt, ob diese Strukturanaloga entsprechend der Phytansäure und anderer 3-Methyl-Fettsäuren (CASTEELS et al. 2003) möglicherweise in einem  $\alpha$ -Oxidationsprozess zu den korrespondierenden  $\alpha$ -verzweigten VPA-Derivaten in vivo aktiviert werden.

Diese Hypothese konnte anhand der GC-MS Analyse von Gewebe und Plasmaproben behandelter NMRI-Mäuse widerlegt werden, da in keiner Probe die zunächst postulierte 2-Propyl-Hexansäure nachgewiesen werden konnte, sodass davon auszugehen ist, dass die  $\alpha$ -Oxidation auf eine eng umrissene Gruppe von Substraten beschränkt bleibt. Vermutlich sind Substrate mit längerer Seitenkette als der Methylgruppe nicht geeignet durch  $\alpha$ -Oxidation abgebaut zu werden. Versuche zur Metabolisierung von 3-Methyl-Hexansäure könnten diese Vermutung erhärten und einen Hinweis darauf liefern, ob dieses VPA-Derivat möglicherweise durch eine  $\alpha$ -Oxidation in vivo deaktiviert wird und deshalb im Tierversuch geringere Exenzephalieraten zeigt, als durch die Halbwirkkonzentration an HDAC zu vermuten wäre.

Im Tierversuch an NMRI Mäusen konnten nach Applikation von 3-Propyl-Heptansäure insgesamt drei mögliche Metabolite in Plasmaproben detektiert werden, von denen jedoch nur einer in Konzentrationen auftrat, die für die teratogene Wirkung in vitro verantwortlich sein könnte. Die massenspektrometrische Analyse dieser Verbindung, Datenbankvergleich des erhaltenen Massenspektrums sowie Vergleich mit Massenspektren hydroxylierter Valproinsäurestandards zeigten, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein ( $\omega$ -1)-Oxidationsprodukt handelte. Es konnte bisher nicht eindeutig unterschieden werden, ob es sich bei dem Metaboliten um 3-Propyl-6-Hydroxy-Heptansäure oder 3-(2-Hydroxy)-Heptansäure handelte. Sollte dieser Metabolit die Ursache für die in vivo beobachteten teratogenen Effekte der 3-Propyl-Heptansäure sein, so müsste dieses ( $\omega$ -1)-Oxidationsprodukt, wegen der geringen Plasmakonzentration, eine ungewöhnlich hohe Aktivität an HDAC-Enzymen besitzen.

Insgesamt stellt die Gruppe der  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivate weiterhin eine Ausnahme von der Arbeitshypothese dar. Weitere Untersuchungen zur Frage der intrinsischen teratogenen Aktivität dieser VPA-Derivate werden notwendig sein, insbesondere die Synthese und Untersuchung der HDAC-Aktivität von ( $\omega$ -1)-Oxidationsprodukten wie z.B. 3-Propyl-6-Hydroxy-Heptansäure.

## 5.8 Korrelation der HDAC-Halbwirkkonzentration mit der teratogenen Potenz von VPA-Derivaten

Die Gruppe der Amid- und Hydroxamsäure-Derivate der VPA wurde, aufgrund der zuvor gezeigten fehlenden intrinsischen teratogenen Potenz, in der Korrelationsanalyse ebenso wenig berücksichtigt wie die Gruppe der an C3 verzweigten VPA-Derivate, bei denen die intrinsische teratogene Potenz nicht abschließend beurteilt werden konnte. Die Korrelationsanalyse basierte daher auf einem reduzierten Datensatz von 21 VPA-Derivaten.

Bei diesen handelte es sich um Strukturanaloga der VPA mit verlängerter Seitenkette, zusätzlicher Seitenkettenverzweigung, einer Doppel- oder Dreifachbindung in Position C4-C5, derivatisierter Karbonsäurefunktion, substituiertem  $\alpha$ -Wasserstoffatom sowie um Derivate mit chiralem Zentrum an C2, sodass trotz Datenreduktion eine hohe strukturelle Diversifizierung erreicht werden konnte. Die Korrelationsanalyse der logarithmierten Halbwirkkonzentration  $IC_{50}(\text{HDAC})$  mit der in sechs Klassen graduierten teratogenen Potenz lieferte einen linearen Zusammenhang dieser zwei Substanzeigenschaften mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,89$ . Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die intrinsische Aktivität in einem humanen Enzym-Assay direkt mit der beobachteten systemischen Wirkung im Tiermodell verglichen wurde, handelt es sich um eine hervorragende Korrelation, die die Ausgangshypothese dieser Arbeit bestätigt.

Entgegen ersten Vermutungen und im Kontrast zum gut charakterisierten HDAC-Inhibitor Trichostatin A, welcher nur als Hydroxamsäure nicht jedoch als Karbonsäure HDAC-aktiv ist, wurde die Aktivität der VPA-Karbonsäuren durch Derivatisierung zur Hydroxamsäure deutlich verringert. Die bisher bekannten Kristallstrukturen von TSA und Suberoylanilin-hydroxamsäure (SAHA) sowohl an einer bakteriellen Histondeacetylase (FINNIN et al 1999), als auch an humanem HDAC 8 (SOMOZA et al. 2004, VANNINI et al. 2004) zeigen, dass HDAs entlang einer hydrophoben Bindungstasche in das Protein hineinreichen und dort das katalytisch wirksame Zinkatom komplexieren und somit inaktivieren. Bisher sind keine Kristallstrukturanalysen von VPA an HDACs bekannt, jedoch zeigen erste Untersuchungen zum Bindungsmechanismus von VPA an HDACs (molecular docking), dass auch VPA entlang dieser Bindungstasche eine günstige energetische Konformation einnehmen kann, sodass wahrscheinlich ist, dass VPA HDACs mit einem zu TSA vergleichbaren Mechanismus inhibiert (PD Dr. Laila Abouzaid, Universität Kairo – mündliche Mitteilung 2004).

Die dargestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der VPA-Analoga stellen unter dieser Annahme gänzlich neue strukturelle Voraussetzungen für eine Substanzbindung an HDAC-Proteine dar. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Inhibition der Enzymklasse der Histondeacetylasen ein molekularer Ausgangspunkt oder früher Bestandteil der Signalkaskade von VPA induzierten Neuralrohrdefekten ist.

## 5.9 Untersuchung bekannter Teratogene auf HDAC-Inhibition

Nach Bestätigung der Ausgangshypothese, dass VPA-induzierte Neuralrohrdefekte durch Inhibition der Enzymklasse der HDACs vermittelt werden, wurde diese um die Fragestellung erweitert, ob auch andere bekannte teratogene Substanzen die Enzymklasse der HDACs in ihrer Funktion beeinflussen können. Hierzu wurden beispielhaft die zwei bekannten teratogenen Stoffe Thalidomid (Wirkstoff von Contergan®) und Vitamin A (all-trans-Retinsäure) als Modellsubstanzen ausgewählt. Untersuchung dieser Kernstrukturen sowie teratogener und nicht-teratogener Derivate dieser zwei Verbindungen konnten zeigen, dass sie die HDACs bis zur Grenze ihrer jeweiligen Löslichkeit weder in Zellkultur noch in einem humanen Enzymassay in ihrer Funktion beeinflussen.

Die erweiterte Hypothese kann damit zunächst widerlegt werden, HDACs können nicht als generelle Zielstruktur von teratogenen Substanzen angesehen werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen zu reproduktionstoxischen Effekten des sehr gut charakterisierten HDAC-Inhibitors TSA. Während von SVENSSON et al. bei explantierten Mausembryonen unter TSA Einfluss ähnliche Fehlbildungen wie unter VPA Behandlung beobachtet werden konnten (SVENSSON et al. 1998), konnten NERVI et al. keine embryonale oder maternale Toxizität von TSA in vivo feststellen (NERVI et al. 2001). Ein Grund für diese zunächst widersprüchlichen Beobachtungen könnten deaktivierende Einflüsse in vivo durch Metabolisierung von TSA sein, während dem explantierten Mausembryonenmodell diese metabolische Aktivität fehlt. Es ist bekannt, dass TSA zu einer Reihe von Metaboliten verstoffwechselt werden kann (ELAUT et al. 2002), bei denen es sich neben Trichostatinsäure überwiegend um mono- und di-demethylierte Produkte handelt, deren Aktivität an HDAC noch nicht abschließend geklärt ist.

Es bleibt damit zunächst offen, ob im Umkehrschluss zur Arbeitshypothese HDAC-Inhibitoren auch teratogene Effekte verursachen. Weitere Untersuchungen im NMRI-Exenzephalie-Modell zu Neuralrohrdefekten ausgewählter HDACs werden derzeit im Arbeitskreis durchgeführt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind teratogene Effekte aber weiterhin als substanzspezifisch anzusehen und in ihrer molekularen Kausalität sehr komplex.

## 5.10 Untersuchung von Lebensmittelinhaltsstoffen auf HDAC-Inhibition

Bei VPA handelt es sich um eine kurz- und verzweigt-kettige Fettsäure mit vergleichsweise einfacher chemischer Struktur. Aufgrund der strukturell-chemischen Analogie wurden in dieser Arbeit auch Lebensmittelinhaltsstoffe, insbesondere Fettsäuren, auf ihre Fähigkeit zur HDAC-Inhibition untersucht. Diese Fragestellung war in Bezug auf mögliche protektive Eigenschaften von Fettsäuren im Bereich der Krebsprävention von großem Interesse.

Neben einer Vielzahl getesteter Lebensmittelinhaltsstoffe ohne Funktionsbeeinflussung der HDACs (z.B. Vitamin C, Folsäure als Modell für Folate,  $\beta$ -Sitosterol etc.) zeigten einige der untersuchten Fettsäuren eine inhibitorische Wirkung. Während zwei konjugierte Linolsäuren (10E, 12Z CLA 18:2 und 9E, 11Z CLA 18:2) und ein typisches oxidatives Abbauprodukt der CLAs die Furanfettsäure 8-(5-hexyl-2-furyl)-Oktansäure im HDAC-Enzym-Assay eine Halbwirkkonzentration von 300  $\mu\text{mol/L}$  zeigten, konnten diese im F9-Zellsystem bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{mol/L}$  keine Hyperacetylierung von Kernhiston H4 induzieren. Auf Grund der beobachteten relativ steilen Dosis-Wirkungs-Kurve im HDAC-Enzym-Assay und einer Halbwirkkonzentration, die sich nahe der Löslichkeitsgrenze dieser Fettsäuren (ca. 850  $\mu\text{mol/L}$ ) in wässrigen Systemen befindet, stellte sich die Frage nach der physiologischen Relevanz dieses beobachteten Effektes. Es ist insbesondere fraglich, ob nicht mögliche andere molekulare Zielstrukturen von CLAs bereits bei wesentlich geringeren Konzentrationen angesprochen werden. Derzeitige Studien im Arbeitskreis zeigen, dass CLAs Effekte auf zellulärer Ebene bereits bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{mol/L}$  auszulösen vermögen. Eine abschließende Beurteilung zur physiologischen Relevanz der beobachteten HDAC-Inhibition bei CLAs und der FFA ist noch nicht möglich. Weitere derzeit im Arbeitskreis durchgeführte Untersuchungen werden zeigen, ob CLAs und FFAs ein fruchtschädigendes Potenzial und/oder anti-karzinogene Eigenschaften aufweisen, die durch HDAC-Inhibition vermittelt werden.

Ebenfalls positiv getestet wurden Liponsäuren, die mit 2 mmol/L eine relativ hohe Halbwirkkonzentration besaßen. Auf Grund der normal verlaufenden Dosis-Wirkungs-Kurve des Enzym-Assays konnte auch im F9-Zellsystem bei einer Konzentration von 1 mmol/L eine signifikante Hyperacetylierung des Kernhistons H4 beobachtet werden. Die HDAC inhibierenden Eigenschaften von alpha-Liponsäure wurde aktuell bereits von der Arbeitsgruppe um Douglas Faller beschrieben (VAN DE MARK et al. 2003, KRISHNA et al. 2002), die eine HDAC-Inhibition verschiedener Zelllinien in einem Bereich von 2-5 mM zeigen konnten, ohne jedoch eine  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  zu bestimmen.

Interessant ist die Tatsache, dass Liponsäure ein chirales Zentrum an C6 besitzt, in dieser Arbeit jedoch zunächst nur als racemische Mischung untersucht werden konnte. Eine differenzierte Studie in Abhängigkeit der Stereochemie könnte Aufschluss darüber geben, ob auch hier, wie im Falle der VPA-Derivate, eine stereoselektive Wirkung an HDAC-Enzymen vorliegt. Dies könnte

theoretisch zu einer Steigerung der Aktivität an HDACs um den Faktor 2 auf ca. 1 mmol/L führen. Dieser Konzentrationsbereich wäre physiologisch sehr interessant, da alpha-Liponsäure zur Zeit als Nahrungsergänzungsmittel kommerziell erhältlich ist und für verschiedene medizinische Anwendungen verwendet wird (z.Bsp. Diabetis induzierte Neuropathien). Bei Patienten unter Liponsäurebehandlung werden dabei Blutplasmaspiegel im Konzentrationsbereich von 1 mmol/L ohne toxische Nebenwirkungen erreicht (MORELIFE 2003).

Im Sinne einer Korrelation von HDAC-Inhibition und einer Induktion von Fehlbildungen kann festgestellt werden, dass bisher keine Studien zu reproduktionstoxikologischen Effekten von alpha-Liponsäure vorliegen. Die allgemeine Toxizität ist jedoch sehr gering, so liegt die LD<sub>50</sub> bei Hunden bei 600 mg/kg (HIGDON 2003) und auch bei Menschen sind bei mM-Plasmalevel in einem Behandlungszeitraum von drei Jahren keine gravierenden Nebenwirkungen bekannt geworden. Studien zur reproduktionstoxikologischen Bewertung von alpha-Liponsäure werden derzeit im Arbeitskreis vorbereitet. Interessant wäre auch die Frage, ob eine Derivatisierung der alpha-Liponsäure zur Hydroxamsäure eine Steigerung der Aktivität an HDAC bewirken kann und sich diese strukturell ähnlich der HDAI-Gruppe der Hydroxamsäuren oder mehr wie die Gruppe der Fettsäuren verhält.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es Lebensmittelinhaltsstoffe / Nahrungsergänzungsmittel gibt, insbesondere mittel- und langkettige Fettsäuren, die ein HDAC-Inhibitions-Potential besitzen. Ein weitergehendes Substanzscreening könnte Aufschluss darüber geben, ob solche Stoffe HDACs in physiologischen Konzentrationen inhibieren und dadurch sowohl an der Prävention von Krebserkrankungen beteiligt sein können als auch zu einem Risiko von teratogenen Effekten beitragen.

## 5.11 Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit die Ausgangshypothese bestätigt werden konnte, dass VPA induzierte Neuralrohrdefekte mit der Inhibition der Enzymklasse der HDACs korrelieren, werden weitere Studien zeigen, ob einzelne HDAC-Isoformen ursächlich mit den teratogenen Nebenwirkungen der VPA verbunden werden können. Es konnte bereits eine differenzierende Inhibition einzelner HDAC-Isoformen durch VPA gezeigt werden (GURVICH et al. 2004), sodass es möglich erscheint, Klassen oder gar einzelne Isoformen von HDACs als molekulares Ziel für die VPA-induzierten Neuralrohrdefekte zu definieren.

Während Trichostatin A als klassischer HDAC-Inhibitor bereits in ersten Studien zur Differenzierungstherapie bei Krebserkrankungen eingesetzt wird und HDAC-Isoformen der Klasse I und II mit einer  $IC_{50}$ (HDAC) von 5-50 nmol/L sehr potent inhibiert, könnte der Einsatz eines HDAC-Inhibitors mit abgestufter Aktivität, wie zum Beispiel VPA und ihre Derivate mit einer  $IC_{50}$  von 10 – 500  $\mu$ mol/L, differenziertere und selektivere zelluläre Prozesse induzieren. Hier scheint insbesondere S-2-Pentyl-4-Pentinsäure auf Grund günstiger pharmakokinetischer Eigenschaften und einer im Vergleich zu VPA um den Faktor 10 höheren Aktivität an HDACs eine geeignete Modellsubstanz zu sein.

Im Sinne der Entwicklung von in vitro Testsystemen mit metabolischer Kompetenz, insbesondere von metabolisch aktiven Systemen in Co-Kulturen, scheint das hier erstmals dargestellte VPA-Derivat S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure besonders geeignet. Es ist eines der wenigen bekannten Pro-Teratogene, die zu einem pharmakokinetisch stabilen und hoch potenten Metaboliten verstoffwechselt wird.

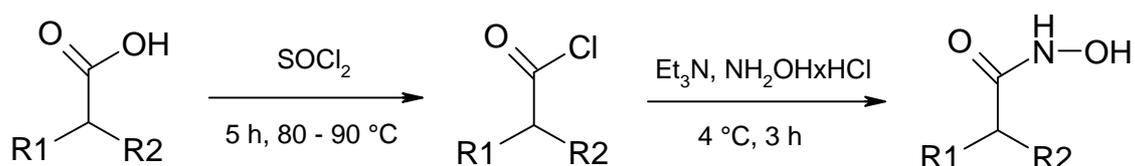
Die Untersuchung weiterer bekannter Teratogene könnte aufzeigen, ob die HDAC-Inhibition ein geeigneter biologischer Endpunkt zur Verwendung als in vitro Testsystem im Sinne einer Ergänzung und Ersatz von Tierversuchen darstellt. Ein solcher Verwendungszweck erscheint insbesondere im Hinblick auf die beobachteten reproduktionstoxischen Eigenschaften von Trichostatin A realistisch, gleichwohl dieser klassische HDAC-Inhibitor bisher widersprüchlich als Substanz mit fruchtschädigender Eigenschaft beschrieben wurde (SVENSSON et al. 1998, NERVI et al. 2001 und PHIEL et al. 2001). Zu diesem Themenkomplex könnte umgekehrt die Untersuchung bekannter HDAC-Inhibitoren auf reproduktionstoxische Eigenschaften im Tiermodell weitergehende Erkenntnisse liefern.

Das Substanzscreening weiterer Lebensmittelinhaltsstoffe, insbesondere mittel- und langkettiger Fettsäuren, könnte interessante neue Erkenntnisse einerseits über das Risikopotential solcher Verbindungen bezüglich reproduktionstoxischer Effekte, andererseits über mögliche Mechanismen einer protektiven Wirkung im Zusammenhang der Prävention von Krebserkrankungen liefern.

## 6 Arbeitsmethodiken und verwendete Materialien

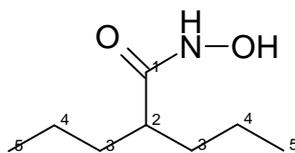
### 6.1 Organisch-präparative Synthese enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure

Neben einer direkten Kupplung von Karbonsäuren mit Hydroxylamin unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagenz (HOARE et al. 1968) können Hydroxamsäuren im Allgemeinen durch Umsetzung der entsprechenden Säurechloride mit Hydroxylamin in guten Ausbeuten dargestellt werden (Abbildung 6-1). Die im Folgenden beschriebenen Synthesen erfolgten nach einer Vorschrift von LEVI et al. und wurden für Valproinhydroxamsäure und ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure bereits zuvor erfolgreich eingesetzt (LEVI et al. 1997, GRAVEMANN 2002).



**Abbildung 6-1:** Syntheschema zur Darstellung von Hydroxamsäuren aus den korrespondierenden Karbonsäuren mittels Säurechloriden (LEVI et al. 1997)

#### 6.1.1 Darstellung von 2-Propyl-Pentanhydroxamsäure



**Abbildung 6-2:** Strukturformel von Valproinhydroxamsäure,  $M_w=159,23$  g/mol

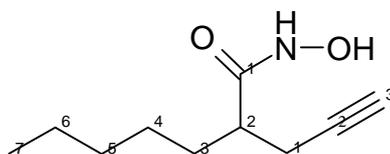
Ein Gemisch aus VPA (10,1 g, 70 mmol, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) und Thionylchlorid (7,7 mL, 105 mmol, 1,5 eq, Merck-Schuchhardt GmbH, 99 %) wurde bis zum Ende der Gasreaktion unter Rückfluss bei ca. 80 °C für fünf Stunden erhitzt. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid im Wasserpumpenvakuum entfernt und das rohe Säurechlorid ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Zu einer auf ca. 4 °C vorgekühlten Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (69,5 g, 1 mol, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %), Triethylamin (135 mL, 1 mol, Riedel-de-Haen GmbH, pure) und Wasser (290 mL) wurde langsam das in ca. 80 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF, Carl Roth GmbH, Rotisolv HPLC grade) aufgenommene Säurechlorid zugetropft und für weitere 1,5 Stunden gerührt. Nach Extraktion des Produktes mit Dichlormethan (3 x 150 mL, Sigma-Aldrich GmbH, 99,9 %) wurde die organische Phase über Natriumsulfat (Sigma-Aldrich GmbH, 98 %) getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das verbliebene zähflüssige Öl wurde über Kieselgel Si 60 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 0,04 – 0,063) flash-chromatographisch (Essigester/Petrolether 1/1) gereinigt und die Fraktionen mittels Dünnschicht-Chromatographie überprüft. Die gesammelten Produktfraktionen wurden erneut am Rotationsverdampfer eingengt und der verbliebene kristallisierte Rückstand zweimal aus Petrolether (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) mit ca. 1 % Essigester (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) umkristallisiert.

Die 2-Propyl-Pentanhydroxamsäure (Valproinhydroxamsäure, 6,7 g, 42 mmol, Ausbeute: 60 %) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

DC-Chromatographie:	Essigester/Petrolether 1:1 $R_f$ (Valproinhydroxamsäure) = 0,5 $R_f$ (Valproinsäure) = 1,0
Schmelzpunkt:	123 °C Lit.: 124 – 125 °C (LIBERT et al. 1986) 126 °C (GRAVEMANN 2002)
IR (ATR, $\nu$ [cm <sup>-1</sup> ]):	3175 (br); 3027 (br); 2957 (s, CH); 2929 (s, CH); 2874 (s, CH); 1626 (vs, C=O); 1538 (s, Amid); 1464 (s); 1382 (m); 1274 (m); 1114 (m); 1063 (m); 1041 (s); 990 (w); 949 (s); 892 (m); 787 (w); 756 (m); 698 (w)
MS (70 eV; m/z (RI)):	159 (42) M <sup>+</sup> ; 130 (16) M <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; 127 (100) M <sup>+</sup> -NH <sub>2</sub> ; 125 (15); 117 (31) M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ; 116 (17) M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ; 101 (36); 100 (21); 99 (72) M <sup>+</sup> -CONH <sub>2</sub> ; 98 (34); 97 (12); 96 (19); 88 (58); 85 (10); 83 (46); 72 (57); 71 (21); 70 (26); 69 (26); 67 (10)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, $\delta$ ):	0,89 (t, 6H, J = 7,2 Hz); 1,20 – 2,02 (m, 9H); 8,20 (bs, 1H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, $\delta$ ):	14,0 (C5 und C5'); 20,7 (C4 und C4'); 34,7 (C3 und C3'); 44,0 (C2); 174,2 (C1)
CHN-Analyse:	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> (M <sub>w</sub> =159,23 g/mol) Berechnet: C: 60,35 % H: 10,76 % N: 8,80 % Analyse: C: 60,35 % H: 10,62 % N: 8,76 %
Chemische Reinheit:	≥ 99 %

### 6.1.2 Darstellung von (±)-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure



**Abbildung 6-3:** Strukturformel von (±)-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure,  $M_w=183,25$  g/mol

Ein Gemisch aus (±)-2-Pentyl-4-Pentinsäure (8,4 g, 50 mmol, (GRAVEMANN 2001) und Thionylchlorid (15 mL, 150 mmol, 3 eq, Merck-Schuchhardt GmbH, 99%) wurde unter Rückfluss bei ca. 90 °C für fünf Stunden erhitzt. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid im Wasserpumpenvakuum entfernt und das rohe Säurechlorid bei ca. 10 mbar und 110 °C abdestilliert.

Zu einer auf ca. 4 °C vorgekühlten Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (69,5 g, 1 mol, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %), Triethylamin (140 mL, 1 mol, Riedel-de-Haen GmbH, pure) und Wasser (300 mL) wurde langsam das in ca. 80 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF, Carl-Roth GmbH, Rotisol HPLC) aufgenommene Säurechlorid zugetropft und für weitere 1,5 Stunden gerührt.

Nach Extraktion des Produktes mit Dichlormethan (3 x 150 mL, Sigma-Aldrich GmbH, 99,9 %) wurde die organische Phase über Natriumsulfat (Sigma-Aldrich GmbH, 98 %) getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das verbliebene gelb-rötliche und zähflüssige Öl wurde über Kieselgel Si 60 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) flash-chromatographiert (Essigester/Petrolether 1/5) und die Fraktionen mittels DC Chromatographie überprüft. Die gesammelten Produktfraktionen wurden erneut am Rotationsverdampfer eingengt und der verbliebene kristallisierte Rückstand zweimal aus Petrolether (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) mit 1 % Essigester (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) umkristallisiert.

Die (±)-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (7,0 g, 38 mmol, Ausbeute: 75 %) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

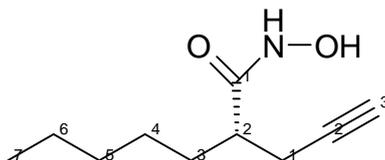
DC-Chromatographie: Essigester/Petrolether (1:5)  
 $R_f((\pm)\text{-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure}) = 0,3$   
 $R_f((\pm)\text{-2-Pentyl-4-Pentinsäure}) = 0,7$

Schmelzpunkt: 66 °C Lit.: 66 °C (GRAVEMANN 2002)

IR (ATR,  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]): 3279 (m, Alkin); 3189 (br); 3035 (br); 2919 (s, CH); 2858 (s, CH); 1626 (vs, C=O); 1538 (m, Amid); 1459 (w); 1384 (m); 1275 (w);

	1205 (w); 1111 (m); 1067 (m); 1012 (m); 1000 (m); 953 (m); 857 (w); 778 (m); 693 (m)
MS (70 eV; m/z (RI)):	183 (23) M <sup>+</sup> ; 167 (14); 151 (100) M <sup>+</sup> -NHOH ; 144 (12) M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ; 136 (14); 128 (15); 126 (28); 123 (16) M <sup>+</sup> -CONHOH ; 121 (10); 120 (10); 113 (32) M <sup>+</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> ; 112 (26) M <sup>+</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ; 110 (29); 109 (12); 98 (14); 97 (39); 96 (37); 95 (28); 94 (17); 93 (29); 91 (17); 83 (30); 82 (30); 81 (99); 80 (22); 79 (35); 77 (28); 69 (34); 68 (24); 67 (58)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, δ):	0,87 (t, 3H, J = 6.9 Hz); 1,29 (m, 6H); 1,51 – 1,75 (m, 2H); 2,06 (t, 1H, J = 2,6 Hz); 2,23 – 2,48 (m, 3H); 8,70 (s, 1H); 9,05 (bs, 1H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, δ):	14,0 (C7); 21,6(C6); 22,4(C1') ; 2,.9 (C5); 31,5 (C4 od. C3); 31,6 (C4 od. C3); 43,5 (C2); 70,7 (C2'); 81,4 (C3'); 172,6 (C1)
CHN-Analyse:	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> (M <sub>w</sub> =183.25 g/mol) Berechnet: C: 65,54 % H: 9,35 % N: 7,64 % Analyse: C: 65,48 % H: 9,22 % N: 7,60 %
Chemische Reinheit:	≥ 99 %

### 6.1.3 Darstellung von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure



**Abbildung 6-4:** Strukturformel von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure, M<sub>w</sub>=183,25 g/mol

Ein Gemisch aus S-2-Pentyl-4-Pentinsäure (8,6 g, 51 mmol, (GRAVEMANN 2001)) und Thionylchlorid (15 mL, 150 mmol, 3 eq, Merck-Schuchhardt GmbH, 99 %) wurde unter Rückfluss bei ca. 90 °C für fünf Stunden erhitzt. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid im Wasserpumpenvakuum entfernt und das rohe Säurechlorid bei ca. 10 mbar und 110 °C abdestilliert.

Zu einer auf ca. 4 °C vorgekühlten Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (69,5 g, 1 mol, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %), Triethylamin (140 mL, 1 mol, Riedel-de-Haen GmbH, pure) und Wasser (300 mL) wurde langsam das in ca. 80 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF, Carl Roth GmbH, RotisolV HPLC) aufgenommene Säurechlorid zugetropft und für weitere 1,5 Stunden gerührt.

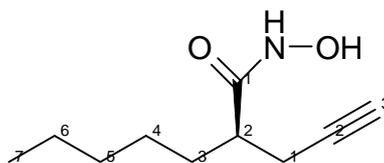
Nach Extraktion des Produktes mit Dichlormethan (3 x 150 mL, Sigma-Aldrich GmbH, 99,9 %) wurde die organische Phase mit ca. 80 mL Salzsäurelösung ( $c = 1 \text{ mol/L}$ ) gewaschen, anschließend über Nacht mit Natriumsulfat (Sigma-Aldrich GmbH, 98 %) getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt.

Die Substanz kristallisierte aus, sodass keine säulenchromatographische Aufreinigung notwendig war. Der Rückstand wurde zweimal aus Petrolether (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) mit 1 % Essigester (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) umkristallisiert.

Die S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (9,0 g, 49 mmol, Ausbeute: 96 %) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

DC-Chromatographie:	Essigester/Petrolether (1:5) $R_f(\text{S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure}) = 0,3$ $R_f(\text{S-2-Pentyl-4-Pentinsäure}) = 0,7$
Schmelzpunkt:	66 °C
IR (ATR, $\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]):	3329 (br); 3297 (m); 3273 (m); 3196 (br); 3078 (br); 2922 (br, CH); 2857 (m, CH); 1628 (vs, C=O); 1531 (m, Amid); 1469 (w); 1400 (w); 1332 (m); 1116 (m); 1058 (m); 1018 (m); 944 (w); 912 (w)
MS (70 eV; m/z (RI)):	183 (4) $\text{M}^+$ ; 151 (98) $\text{M}^+\text{-NHOH}$ ; 113 (20) $\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_{10}$ ; 110 (15); 97 (23); 96 (33); 95 (13); 93 (16); 91 (14); 83 (21); 81 (100); 80 (10); 79 (27); 77 (10); 69 (29); 67 (42); 65 (10)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\delta$ ):	0,88 (t, 3H, $J = 6,9 \text{ Hz}$ ); 1,28 (m, 6H); 1,51 – 1,71 (m, 2H); 2,06 (t, 1H, $J = 2,6 \text{ Hz}$ ); 2,21 – 2,51 (m, 3H); 8,42 (s, 1H)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\delta$ ):	14,0 (C7); 21,6 (C6); 22,4 (C1') ; 26,9 (C5); 31,5 (C4 od. C3); 31,6 (C4 od. C3); 43,5 (C2); 70,7 (C2'); 81,4 (C3'); 172,4 (C1)
CHN-Analyse:	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ ( $M_w = 183,25 \text{ g/mol}$ ) Berechnet: C: 65,54 % H: 9,35 % N: 7,64 % Analyse: C: 65,50 % H: 9,20 % N: 7,60 %
Spez. Drehwert ( $\alpha$ ):	- 8,6 (589 nm); - 8,8 (578 nm); - 9,8 (546 nm); - 15,6 (436 nm); - 21,3 (365 nm) Alle Werte bei $t = 20 \text{ °C}$ , $c = 10,03 \text{ mg/mL}$ in $\text{CHCl}_3$
Chemische Reinheit:	$\geq 99 \%$
Optische Reinheit:	$\geq 99 \%$ ( $\geq 98 \%$ ee)

### 6.1.4 Darstellung von R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure



**Abbildung 6-5:** Strukturformel von R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure,  $M_w=183,25$  g/mol

Ein Gemisch aus R-2-Pentyl-4-Pentinsäure (8,6 g, 51 mmol, (GRAVEMANN 2001)) und Thionylchlorid (15 mL, 150 mmol, 3 eq, Merck-Schuchardt GmbH, 99 %) wurde unter Rückfluss bei ca. 90 °C für fünf Stunden erhitzt. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid im Wasserpumpenvakuum entfernt und das rohe Säurechlorid bei ca. 10 mbar und 110 °C abdestilliert.

Zu einer auf ca. 4 °C vorgekühlten Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (69,5 g, 1 mol, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %), Triethylamin (140 mL, 1 mol, Riedel-de-Haen GmbH, pure) und Wasser (300 mL) wurde langsam das in ca. 80 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF, Carl-Roth GmbH, Rotisol HPLC) aufgenommene Säurechlorid zugetropft und für weitere 1,5 Stunden gerührt. Nach Extraktion des Produktes mit Dichlormethan (3 x 150 mL, Sigma-Aldrich GmbH, 99,9 %) wurde die organische Phase mit ca. 100 mL Salzsäurelösung ( $c = 0.1$  mol/L) gewaschen, anschließend über Nacht mit Natriumsulfat (Sigma-Aldrich GmbH, 98 %) getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt.

Das verbliebene gelb-rötliche und zähflüssige Öl wurde über Kieselgel Si 60 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) flash-chromatographiert (Essigester/Petrolether 1/5) und die Fraktionen mittels DC Chromatographie überprüft. Die gesammelten Produktfraktionen wurden erneut am Rotationsverdampfer eingengt und der verbliebene kristallisierte Rückstand zweimal aus Petrolether (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) mit 1 % Essigester (Chemikalienlager Tierärztliche Hochschule Hannover) umkristallisiert.

Die R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure (7,5 g, 41 mmol, Ausbeute: 82 %) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

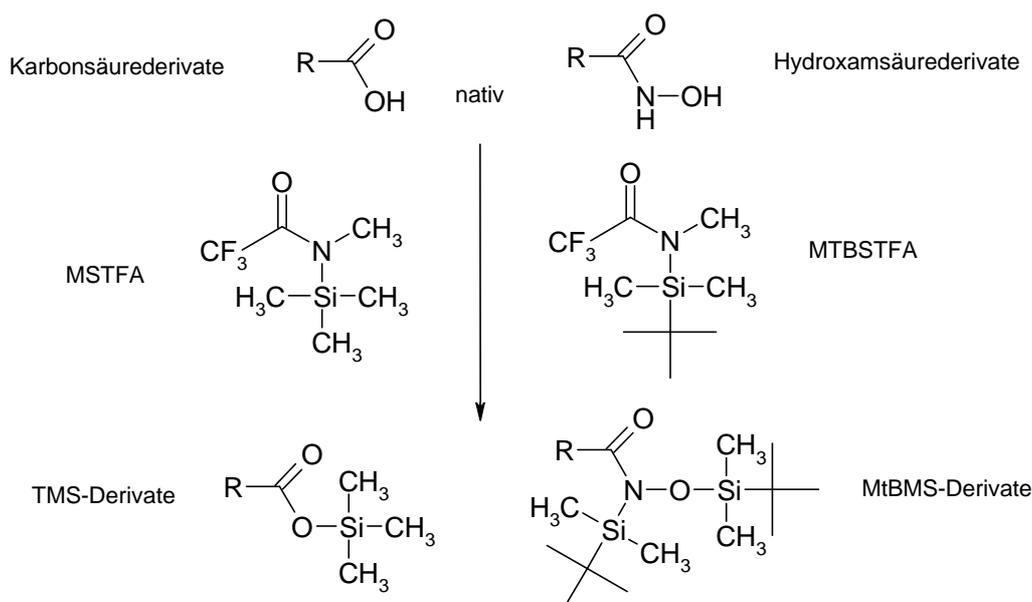
DC-Chromatographie: Essigester/Petrolether (1:5)  
 $R_f(\text{R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure}) = 0,3$   
 $R_f(\text{R-2-Pentyl-4-Pentinsäure}) = 0,7$

Schmelzpunkt: 66 °C

IR (ATR, $\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]):	3329 (br); 3297 (m); 3273 (m); 3199 (br); 3078 (br); 2956 (m, CH); 2921 (br, CH); 2856 (m, CH); 1628 (vs, C=O); 1530 (m, Amid); 1468 (w); 1400 (m); 1380 (w); 1331 (m); 1273 (w); 1116 (m); 1058 (m); 1018 (m); 944 (m); 679 (s)
MS (70 eV; m/z (RI)):	183 (3) $\text{M}^+$ ; 151 (94) $\text{M}^+$ -NHOH; 97 (18); 95 (11); 91 (10); 81 (100); 67 (40)
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, $\delta$ ):	0,88 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz); 1,27 (m, 6H); 1,52 – 1,75 (m, 2H); 2,06 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz); 2,21 – 2,50 (m, 3H); 8,75 (s, 1H); 9,14 (bs, 1H)
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, $\delta$ ):	14,0 (C7); 21,6 (C6); 22,4 (C1'); 26,8 (C5); 31,5 (C4 od. C3); 31,6 (C4 od. C3); 43,5 (C2); 70,7 (C2'); 81,4 (C3'); 172,7 (C1)
CHN-Analyse:	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ ( $M_w = 183,25$ g/mol) Berechnet: C: 65,54 % H: 9,35 % N: 7,64 % Analyse: C: 65,38 % H: 9,37 % N: 7,60 %
Spez. Drehwert ( $\alpha$ ):	+ 8,8 (589 nm); + 9,2 (578 nm); + 10,2 (546 nm); + 15,7 (436 nm); + 21,0 (365 nm) Alle Werte bei $t = 20$ °C, $c = 10,16$ mg/mL in $\text{CHCl}_3$
Chemische Reinheit:	$\geq 99$ %
Optische Reinheit:	$\geq 99$ % ( $\geq 98$ %ee)

### 6.1.5 Bestimmung der chemischen Reinheit von Valproinsäurederivaten

Zur Bestimmung der chemischen Reinheit sowohl der dargestellten Hydroxamsäuren als auch der eingesetzten Karbonsäuren wurde die GC-MS als Analysetechnik verwendet, bei der die zu untersuchende Substanz entweder nativ oder nach geeigneter Derivatisierung gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch detektiert wurde. Die zu testende Substanz wurde dabei zunächst in drei Konzentrationen in 100  $\mu\text{L}$  Acetonitril (Riedel-de-Haen, LC-MS Chromasolv) gelöst (Einwaage zwischen 5  $\mu\text{g}$  und 5000  $\mu\text{g}$ ). Je nach Substanz erfolgte dann vor GC-MS Analyse die Derivatisierung nach drei unterschiedlichen Methoden (Abbildung 6-6). Als underivatisierte oder native Substanz wurde die Probe mit weiteren 300  $\mu\text{L}$  Acetonitril versetzt und direkt analysiert. Als MtBMS-Derivat wurde die Substanz mit 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril und 100  $\mu\text{L}$  N-Methyl-N-Dimethyltertbutylsilyl-Trifluoracetamid (Sigma-Aldrich GmbH, 97+ %) versetzt, eine Stunde bei 60 °C leicht geschüttelt und bei 60 °C im Stickstoffstrom eingedampft. Nach Wiederaufnahme in 400  $\mu\text{L}$  Acetonitril wurde die Probe analysiert, während als TMS-Derivat die Probe mit 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril und 100  $\mu\text{L}$  N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid (Fluka-Sigma-Aldrich, 99 %) versetzt, eine Stunde bei 60 °C leicht geschüttelt und anschließend analysiert wurde.



**Abbildung 6-6:** Derivatisierungsschema zur Bestimmung der chemischen Reinheit von Valproinsäureanaloga

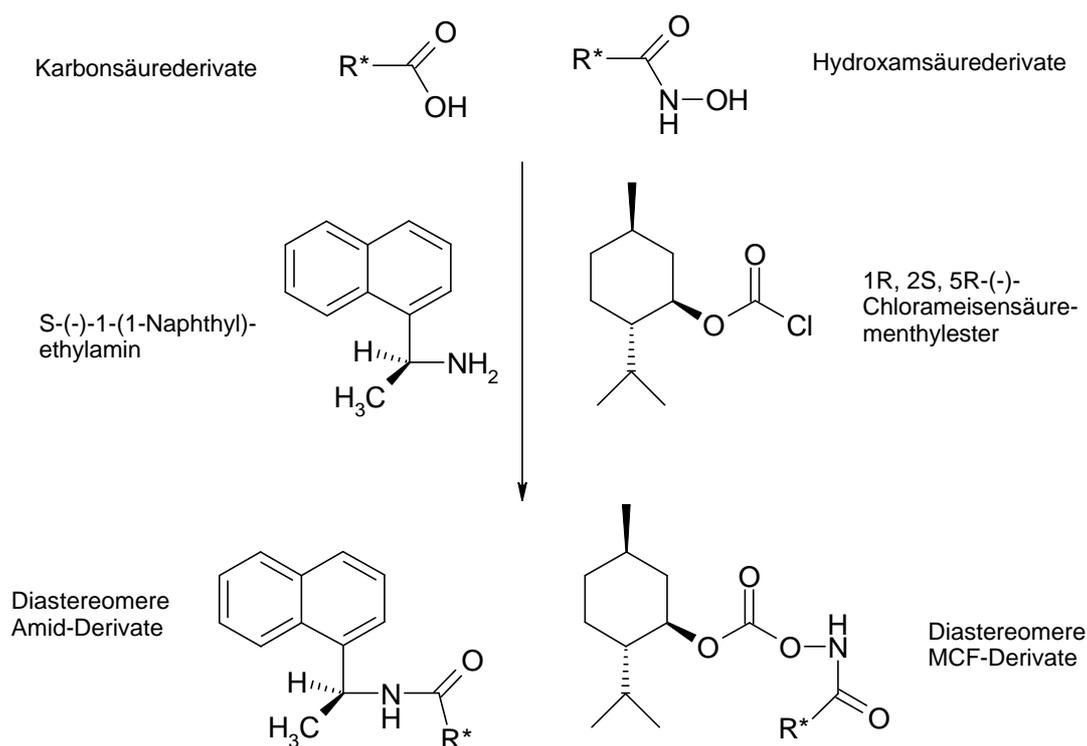
Die GC-MS Analyse (GC-MS System HP 6890 mit MSD 5973 der Firma Agilent GmbH) wurde für alle drei Derivatisierungsmethoden mit folgenden Parametern durchgeführt:

Einlasssystem:	split-splitless Liner, split 40:1, 150 °C, 1,0 µL Injektion
Säule:	Agilent 19091S-433, HP-5MS, 0,25 mm * 30 m * 0.25 µm
Temp.-Programm:	Start 70 °C für 2 min mit 8 °C / min auf 220 °C für 5 min halten mit 50 °C / min auf 320 °C für 5 min halten
Trärgas:	Helium 5.0, 1.0 mL/min
Transferline:	280 °C
MSD:	Solvent delay 3 min, TIC-Mode, m/z 50,0 – 500,0, MS-Quad 150 °C, MS-Source 230 °C

Die Auswertung der chemischen Reinheit erfolgte durch einen Vergleich der Signale in Retentionszeiten mit einer Leerprobe. Identifizierte Analysenpeaks wurden über die Signalfäche integriert, addiert und der prozentuale Anteil des reinen Analytsignals in der Probe berechnet. Dies wurde bei drei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz durchgeführt. Angegeben wurde die chemische Reinheit als Mittelwert dieser drei Bestimmungen in Prozent.

### 6.1.6 Bestimmung der optischen Reinheit chiraler Karbonsäure- und Hydroxamsäureanaloga der Valproinsäure

Zur Bestimmung der optischen Reinheit von Karbonsäure- und Hydroxamsäureanaloga der VPA wurde die gaschromatographische Trennung mit thermionischer Detektion (GC-NPD) als Analysetechnik angewandt. Vor der GC-NPD Analyse (GC-System HP 6890, Agilent GmbH) erfolgte zunächst die Derivatisierung der Substanz mit Hilfe chiraler Reagenzien zu diastereomeren Verbindungen. Bei Karbonsäuren wurde hierzu die Derivatisierung mithilfe eines chiralen Amins ((-)-S-1-(1-Naphthyl)-ethylamin, Fluka-Sigma-Aldrich GmbH, chiraselect) zum diastereomeren Amid (HAUCK et al. 1992), bei den Hydroxamsäuren die Derivatisierung mit einem chiralen Chlorameisensäurementhylester ((-)-1R,2S,5R-Menthylchloroformate, (-)-MCF, Fluka-Sigma-Aldrich GmbH, pure 97 %) zu einem diastereomeren Menthylcarbonat verwendet (Abbildung 6-7).



**Abbildung 6-7:** Derivatisierungsschema zur Bestimmung der optischen Reinheit von Karbonsäure- und Hydroxamsäureanaloga der Valproinsäure.

Die zu untersuchende Substanz wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen in 100  $\mu\text{L}$  Acetonitril (Riedel-de-Haen, LC-MS Chromasolv) gelöst (Einwaage zwischen 25  $\mu\text{g}$  und 500  $\mu\text{g}$ )

und derivatisiert. Die Derivatisierung, Aufarbeitung und gaschromatographische Trennung der Proben wurde im Verlauf dieser Arbeit als quantitative Bestimmungsmethoden auch zur Analyse pharmakokinetischer Parameter dieser Substanzen entwickelt und daher in Kapitel 6.5.2 und 6.5.3 im Detail beschrieben.

Die Auswertung der optischen Reinheit erfolgte durch Identifikation der Retentionszeiten der zwei jeweiligen Diastereomersignale und Integration, Addition und prozentuale Bestimmung ihrer Peakflächen. Dies wurde bei drei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz durchgeführt. Angegeben wurde die optische Reinheit als Mittelwert dieser drei Bestimmungen in Prozent und in Prozent Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, %ee, Abbildung 6-8).

$$ee[\%] = \frac{[\text{Peakfläche}_{\text{Diastereomer1}}] - [\text{Peakfläche}_{\text{Diastereomer2}}]}{[\text{Peakfläche}_{\text{Diastereomer1}}] + [\text{Peakfläche}_{\text{Diastereomer2}}]} * 100$$

**Abbildung 6-8:** Formel zur Berechnung des Enantiomerenüberschusses (enantiomeric excess, %ee)

### 6.1.7 Weitere chemisch-physikalische Charakterisierungstechniken

Zur chemisch-physikalischen Charakterisierung der in 6.1.1 bis 6.1.4 dargestellten Hydroxamsäurederivate der VPA wurde der Schmelzpunkt bestimmt (Melting Point B-450, Büchi Labortechnik GmbH) und durch die Universität Hannover im Analysenservice eine <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Kernmagnetische Resonanzanalyse in deuteriertem Chloroform durchgeführt (NMR-Gerät AM 300, Bruker Biospin GmbH). Des Weiteren wurde eine Infrarotspektrometrische Analyse (Vector 22 – Golden Gate ATR, Bruker Optik GmbH), eine Elementaranalyse (CHN-Rapid, Haereus-Kendro GmbH) und eine massenspektrometrische Analyse (MAT 312, Thermo-Finnigan GmbH Bremen) im Analysenservice der Universität Hannover angefertigt.

Zur Bestimmung des spezifischen Drehwertes  $\alpha$  (Polarimeter 341, Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH) wurde der Drehwinkel der jeweiligen Testsubstanz in Chloroform (Mallinckrodt-Baker Holland, Baker HPLC analyzed) bei 20 °C und unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Ausgehend vom Drehwinkel wurde der spezifische Drehwert  $\alpha$  nach Abbildung 6-9 berechnet.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden an DC Platten Alugram Sil (G/UV<sub>254</sub> 0,20 mm Si 60, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) in einem Laufmittel von Essigester und Petrolether durchgeführt (UV-Lampe DC Nu4KL, Konrad Bender Laborgeräte GmbH).

$$[\alpha]_{20}^l = \frac{q}{l * c}$$

**Abbildung 6-9:** Formel zur Berechnung des spezifischen Drehwertes  $\alpha$  ausgehend von dem experimentell bestimmten Drehwinkel bei 20 °C

$\alpha$	spezifischer Drehwert (°/(dm*g/mL))
$\lambda$	Messwellenlänge (nm)
$\theta$	experimentell gemessener Drehwinkel (°)
d	Schichtdicke der Küvette (dm)
c	Konzentration der Lösung (g/mL)

### 6.1.8 Bestimmung reproduktionstoxischer Effekte im Tiermodell

Als Testmodell zur Untersuchung der reproduktionstoxikologischen Effekte der zwei erstmals dargestellten enantiomeren Hydroxamsäuren mit chiralem Zentrum an C2 wurde das NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell nach NAU et al. verwendet (NAU et al. 1981). Nach einer dreistündigen Verpaarung wurden diejenigen Muttertiere des NMRI-Auszuchtstammes (Hsd:Win-NMRI, Harlan-Winkelmann Borcheln) mit Vaginalpropf als trächtig separiert (Tag 0: 8.00 Uhr) und am Tag 8,25 (Tag 8: 14.00 Uhr) intraperitoneal mit einer neutralisierten Lösung (pH = 7,4) des jeweiligen Enantiomers bzw. einer Kontrolllösung in Cremophor EL (25 % v/v, Sigma-Aldrich GmbH) behandelt. Die Lösungen wurden hierbei entsprechend den Tierversuchsempfehlungen der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science) und FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) in einem Volumen von 10 mL/kg Körpergewicht injiziert und die Tiere am Tag 18 der Trächtigkeit durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Föten wurden diese gewogen, sowie die Anzahl der Exenzephalien und Resorptionen bestimmt. Die Auswertung erfolgte ausgehend von mindestens fünf Muttertieren über die prozentuale Verteilung von lebenden Föten mit Exenzephalien im Vergleich zu nicht fehlgebildeten Föten dieser Würfe.

Die Tierversuche zur Bestimmung des reproduktionstoxischen Potentials wurden von Frau K. Zoll im Rahmen ihrer Dissertation und gemäß den gesetzlichen Rahmenbedingungen §§ 7 und 8 Tierschutzgesetz, Tierversuchsantrag Aktenzeichen 02/612 durchgeführt.



## 6.2 Beurteilung und Graduierung reproduktionstoxischer Effekte

Die Auswertung bereits veröffentlichter reproduktionstoxischer Daten der VPA-Derivate im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell zeigte, dass nur für vergleichsweise wenige Derivate eine Berechnung der Halbwirkkonzentration  $TeraD_{50}$  nach Wilkinson Gauss möglich war, da für diese Auswertungsmethode mindestens drei Dosis-Wirkungs-Messwerte vorliegen müssen. Für die überwiegende Zahl der untersuchten VPA-Derivate lag jedoch nur ein Dosis-Wirkungs-Messwert in diesem Tiermodell vor, sodass ein Entscheidungssystem entwickelt wurde, das die Klassifizierung der teratogenen Potenz einzelner Derivate in sechs Kategorien semi-quantitativ ermöglichte (Tabelle 6-1). Wurden die Bewertungskriterien in den Untersuchungen der ausgewerteten Literatur nicht exakt getroffen, wurde unter Berücksichtigung der vorausgesetzten Randbedingungen eine realistische Exenzephalierate bei jeweils leicht erhöhter oder erniedrigter Dosis abgeschätzt.

**Tabelle 6-1:** Entscheidungskriterien zur Graduierung des teratogenen Potentials von Valproinsäurederivaten anhand von Untersuchungen im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell nach Nau et al. (NAU 1981)

Dosis (mmol/kg)	Exenzephalie (%)	Beurteilung	Graduierung
= 3,00	0	kein teratogenes Potenzial	<b>0</b>
2,00 – 3,00	1 – 5	teratogenes Potenzial sehr schwach	+
2,00 – 3,00	5 – 25	teratogenes Potenzial schwächer als VPA	++
2,00 – 3,00	25 – 60	teratogenes Potenzial äquivalent zu VPA	+++
1,00 – 2,00	40 – 60	teratogenes Potenzial stärker als VPA	++++
0,25 – 1,00	40 – 60	sehr starkes teratogenes Potenzial	+++++

Randbedingungen:

- Die Testdosis ist limitiert durch maternal toxische Effekte.
- Subkutane und intraperitoneale Applikationen zeigen vergleichbare Exenzephalie-raten während orale Applikationen nicht berücksichtigt werden können (NAU 1986).
- Dosis-Teratogenitäts-Kurven verlaufen generell sehr steil (NAU 1985).
- Die Exenzephalie-Spontanrate beträgt im NMRI-Exenzephalie-Maus-Modell  $\leq 0,8 \%$  (BOJIC et al. 1996).
- Exenzephalieraten sind bei Verwendung von Cremophor EL 25 % als Lösemittel deutlich reduziert (um ca. - 10 %) (VOLLAND 2002).
- pH-Wert-Verschiebungen von Injektionslösungen haben einen drastischen Einfluss auf die experimentelle Exenzephalierate. Es können nur Daten von neutralisierten Substanzlösungen mit pH  $7,4 \pm 0,4$  verwendet werden (Dr. Katrin Hoffmann – mündl. Mitteilung).

Zur beispielhaften Darstellung des Entscheidungsweges zur Klassifizierung eines VPA-Derivates durch Anwendung der Graduierungskriterien auf Basis nur weniger Dosis-Wirkungsbeziehungen werden die in Tabelle 6-2 genannten Substanzen mit ihren bekannten Dosis-Exenzephalie-Beziehungen aus dem NMRI-Mausmodell beschrieben.

- Valproinsäure mit einer Exenzephalierate von 53 % bei einer Dosis von 3,00 mmol/kg wird mit einem teratogenen Potenzial von Grad +++ bewertet.
- (±)-2-Hexyl-4-Pentinsäure mit 79 % Exenzephalierate bei einer Dosis von 1,00 mmol/kg wird mit einem Potenzial von der Grad +++++ klassifiziert.
- 2-Propyl-2-trans-Pentensäure mit 0 % Exenzephalierate bei einer Dosis größer 3,00 mmol/kg ist eine Substanz ohne teratogenes Potential (Grad 0).
- S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure wird mit einer Exenzephalierate von 5 % bei einer Dosis von 1,50 mmol/kg unter Berücksichtigung des Lösemittels CremophorEL 25 % (v/v) mit einem teratogenen Potential von Grad ++ bewertet.

**Tabelle 6-2:** Dosis-Exenzephalie-Werte der Beispielsubstanzen zur Graduierung des teratogenen Potentials (a: RADATZ et al. 1998, b: BOJIC et al. 1998, c: NAU AND LÖSCHER 1986; d: in CremEL 25% (v/v))

Substanzname	Dosis (mmol/kg)	lebende Feten (N)	Embryoethalität (%)	Exenzephalie (%)
Valproinsäure	3,00 <sup>a</sup>	45	52	53
(±)-2-Hexyl-4-Pentinsäure	1,50 <sup>b</sup>	12	84	100
	1,00 <sup>b</sup>	37	67	79
	0,50 <sup>b</sup>	165	18	7
2-Propyl-2-trans-Pentensäure	3,70 <sup>c</sup>	150	8	0
S-2-Pentyl-4-Pentin-hydroxamsäure	1,50 <sup>d</sup>	108	13	5 <sup>d</sup>
	1,00 <sup>d</sup>	75	9	0 <sup>d</sup>

## 6.3 In vitro Untersuchungen am F9 Mauszellsystem

Zum Nachweis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der VPA, VPA-Derivate und weiterer Testsubstanzen auf zellbiologischer und proteinchemischer Ebene wurde in vitro ein F9-Mauszellsystem verwendet. Die F9-Zelle entstammt teratokarzinomen Zellen der Maus (EUROPEAN COLLECTION ON CELL CULTURES 2004), die unter Standard-Kultivierung nur vereinzelt differenzieren. Unter Behandlungen mit z.B. Retinsäure, VPA oder speziellen Wachstumsfaktoren erfolgt eine Änderung sowohl in der Morphologie als auch in der Expression von Markergenen, die einer überwiegenden Differenzierung zu neuro-ectodermalen Zellen entspricht (WERLING et al. 2001, LAMPEN et al. 1999). Die Untersuchung behandelter F9-Zellen erfolgte im Hinblick auf den Proteingehalt ausgewählter Marker- und Targetproteine mittels Western-Blot-Analysen. Durch Verwendung dieses in vitro Mauszellsystems wurde methodisch der Übergang vom NMRI-Tiermodell hin zu einem enzymatischen Testsystem, bestehend aus humanen Enzymen, erreicht.

### 6.3.1 Kultivierung und Behandlung des F9-Zellsystems

Die F9 teratokarzinome Mauszelllinie (American Type Culture Collection Rockville US) wurde in F9-Zellmedium bei 37 °C in einer angefeuchteten Luft-CO<sub>2</sub> Atmosphäre von 5 % kultiviert und das Medium täglich gewechselt. Passagiert wurden die Zellen alle drei Tage in einem Splitverhältnis von 1 : 5 durch Absaugen des F9-Zellmediums und Zugabe von 2 mL Trypsinlösung (0,05 % w/v, Gibco/Invitrogen GmbH). Nach kurzer Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Schütteln abgelöst und nach Zugabe von 8 mL F9-Zellmedium homogenisiert. Die Passagierung erfolgte durch Zugabe von je 2 mL dieser Zellsuspension zu 20 mL F9-Zellmedium in einer neuen Kulturflasche. Die Zellen wurden bis zur internen Passage 25 für Versuche verwendet, wobei die Passagenzahl der Ausgangszellen nicht bekannt war.

Zur Langzeitlagerung wurden frisch trypsinisierte Zellen für fünf Minuten bei 500 g zentrifugiert und mit F9-Zellmedium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Homogenisierung des Zellpellets in 10 mL F9-Cryo-Medium und die sofortige Überführung von je 1,5 mL der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen (Cryo.S, GreinerBioOne GmbH). Die Kryoröhrchen wurden in einer auf ca. 4 °C vorgekühlten Einfrierbox (CryoFreezing Container, Nalgene GmbH) zur Lagerung bei ca. -80 °C gebracht.

Das Auftauen so gelagerter Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Probe im 37 °C Wasserbad und Überführung in ein Zentrifugationsröhrchen. Nach tropfenweiser Zugabe von 10 mL F9-Zellmedium wurden die Zellen zunächst ohne Homogenisierung bei 5 °C und 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Aufnahme und Homogenisierung der Zellen in 10 mL F9-Zellmedium wurden diese in eine Kulturflasche überführt und wie oben kultiviert.

F9-Zellmedium: 500 mL Gibco D-MEM:F-12 (1:1) – L-Glutamin (Gibco/Invitrogen GmbH)  
+ 5 mL L-Glutaminlösung (200 mM/L, Gibco/Invitrogen GmbH)  
+ 50 mL inaktives fötales Kälberserum (Gibco/Invitrogen GmbH)  
+ 1,45 mL 2-Mercaptoethanol (50 mM Gibco/Invitrogen GmbH)  
+ 5 mL Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 U/mL, Gibco/Invitrogen GmbH)

F9-Cryo-Medium: 70 mL Gibco D-MEM:F-12 (1:1) – L-Glutamin (Invitrogen GmbH)  
+ 20 mL inaktives fötales Kälberserum (Gibco/Invitrogen GmbH)  
+ 10 mL Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich GmbH, 99,9 %)

Für Inkubationsversuche mit Testsubstanzen wurden trypsinisierte und in F9-Zellmedium aufgenommene Zellen aus vier Kulturflaschen vereint, bei 500 g und 5 °C zentrifugiert und der Medienüberstand verworfen. Nach Aufnahme in ca. 15 mL F9-Zellmedium wurden die Zellen homogenisiert und die Zellzahl der Suspension mit Hilfe einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Vier-Feld-Zählung: Faktor 20000) ermittelt. Um den Verdünnungsfehler bei der späteren Zugabe von Zellsuspension gering zu halten, wurde zur weiteren Verwendung der Suspension auf eine Zelldichte von mehr als  $10 \times 10^6$  Zellen pro mL geachtet.

Die Inkubationsversuche wurden in 6-Well-Platten (TC-Plate, Greiner BioOne GmbH) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 2 mL der mit Testlösung dotierten F9-Zellmedien vorgelegt und mit dem benötigten Volumen der Zellsuspensionslösung versetzt, sodass pro Well  $1 \times 10^6$  Zellen exponiert wurden (der durch die Volumenerhöhung bedingte Dosisfehler betrug dabei weniger als 5 %). Für die Dauer der Behandlung wurden die Zellen in den 6-Well-Platten bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> Luftanteil für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden adhärente Zellen mechanisch abgelöst und zusammen mit dem Medium in einem 2-mL Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur und 500 g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen, die Zellen einmal mit PBS-Lösung (Phosphate buffered saline, gepufferte physiologische Kochsalzlösung, Gibco/Invitrogen GmbH) gewaschen und anschließend das Zellpellet mit SDS-Puffer-I für Versuche zur Western-Blot-Analyse von acetyliertem Kernhiston H4 bzw. SDS-Puffer-II für Versuche zur Western-Blot-Analyse von Histondeacetylase 3 und Histondeacetylase 2 versetzt. Nach Entnahme eines Aliquots von 5 µL zur Proteingehaltsbestimmung wurden 5 µL Coomassie-Lösung (10 mg/mL Brilliant-Blue R 250, Sigma-Aldrich GmbH) zugegeben und die Proteine im Thermomixer für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten auf Eis gekühlt und bis zur Western-Blot-Analyse bei ca. -25 °C gelagert.

SDS-Puffer-I	6,25 mL Tris-Puffer (1M Tris, pH 6,8, Carl-Roth GmbH, 99,9 %) + 20 mL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %) + 1,1 mL Glycerin (Merck-Schuchardt GmbH, wasserfrei) + 250 µL DTT ((±)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol, 1 mM, Sigma-Aldrich GmbH, 99+ %) + Wasser ad 100 mL
SDS-Puffer-II	100 mL SDS-Puffer-I + 250 µL PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 M, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) + 50 µL Bestatin (0,1 mg/mL, Gibco/Invitrogen GmbH) + 20 µL Aprotinin (10 mg/mL, Gibco/Invitrogen GmbH) + 50 µL Leupeptin (0,1 mg/mL, Gibco/Invitrogen GmbH)

### 6.3.2 Western-Blot-Analysen von nukleärem acetylierten Histon 4 ( $^3\text{H}_4$ )

Die eingefrorenen Zelllysate wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, homogenisiert und jeweils 10 µL der zu untersuchenden Proben, 5 µL Rainbow-Marker (full-range, Amersham Biosciences Sweden) und 10 µL einer positiv Kontrolle mittels Hamilton-Präzisionspritze (Hamilton Bernaduz 50 µL gastight) auf ein 15 %iges Acrylamid-Minigel aufgetragen. Der Einlauf der Proben im Mini-Gel-System (Biometra GmbH) erfolgte mit 60 Volt für ca. 30 Minuten und die anschließende Trennung bei 100 Volt für ca. zwei Stunden. Nach Ende der Elektrophorese wurde sowohl das Gel als auch die benötigte Membran (Nitrocellulose Membran Hybond ECL, Amersham Biosciences Sweden) und die Whatmanpapiere (Chromatographiepapier MN 218B, Macherey-Nagel GmbH) für ca. 10 min in Transferpuffer getaucht und der Blotsandwich bestehend aus 6 Lagen Whatmanpapier/Membran/Gel/6 Lagen Whatmanpapier aufgebaut und in semi-dry Technik bei 40 mA für 25 min (bzw. 70 mA bei zwei Gelen) geblottet (Blotting Chamber Trans-Blot SD, Bio-Rad GmbH).

Sammelgel	350 µL Roth-Acrylamid (30 %ige Lsg., Carl Roth GmbH) + 315 µL Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH=6,8, Carl-Roth GmbH, 99,9 %) + 25 µL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %) + 2,37 mL Wasser + 2,5 µL TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) + 50 µL APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v), Merck-Schuchardt GmbH, p.A.)
-----------	--

Trenngel 15 %	5 mL Roth-Acrylamid (30 %ige Lsg., Carl Roth GmbH) + 100 µL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %) + 2,3 mL Wasser + 2,5 mL Trenngelpuffer (1.5 M Tris, pH=8.8, Carl-Roth GmbH, 99,9 %) + 5 µL TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylendiamin, Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) + 50 µL APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v), Merck-Schuchardt GmbH, p.A.)
Laufpuffer	3,03 g Tris (Pufferan, Carl Roth GmbH, 99,9 %) + 14,4 g Glycin (Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) + 10 mL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %) + Wasser ad 1000 mL pH 8,3
Transferpuffer	5,80 g Tris (Pufferan, Carl Roth GmbH, 99,9 %) + 2,93 g Glycin (Sigma-Aldrich GmbH, 99 %) + 200 mL Methanol (JT Baker NL, HPLC grade) + Wasser ad 1000 mL

Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurde das Gel nach dem Blotten über Nacht in Coomassie-Färbelösung getaucht und die überschüssige Farbe anschließend in Essigsäurelösung (10 % (v/v), Carl-Roth GmbH, konz.) entfernt. Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele mit 500 µL Essigsäurelösung (7 % (v/v)) eingeschweißt und eingescannt.

Coomassie-Lösung	250 mg Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich GmbH) + 125 mL 2-Propanol (JT Baker NL, HPLC grade) + 52 mL Essigsäure (konz., Carl-Roth GmbH, Rotipuran) + Wasser ad 500 mL
------------------	--

Die geblottete Membran wurde nach dem Proteintransfer zwei Mal mit ca. 10 mL für fünf Minuten in TBS-Lösung gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 10 mL TBS-Milk (3 % (w/v) Milchpulver, Sigma-Aldrich GmbH) geblockt. Die Antikörperreaktion mit dem anti-Histon H<sub>4</sub> Antikörper (anti-acetyliertes Histon H<sub>4</sub>, Upstate-Biomol GmbH 06-866, Chip grade) erfolgte in 10 mL TBS-Milk 3 % (w/v) bei einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei ca. 5 °C auf einer Rocking-Plattform (Biometra GmbH). Am folgenden Tag wurde die Membran drei Mal mit ca. 10 mL TBS-Lösung für fünf Minuten gewaschen und für 1,5 Stunden mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase gekoppelter anti-rabbit Antikörper) in 10 mL TBS-Milk 3 % (w/v) bei einer Verdünnung von 1:5000 und Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der zweiten Antikörperreaktion wurde die Membran drei Mal mit ca. 10 mL TBS-Lösung für jeweils fünf

Minuten, einmal mit ca. 10 mL TBS-T-Lösung (10 mL TBS-Lösung und 5 µL Tween20, Sigma-Aldrich GmbH) für fünf Minuten und erneut drei Mal mit ca. 10 mL TBS-Lösung für jeweils fünf Minuten gewaschen.

TBS-Lösung            2,4 g Tris  
                          + 8 g Natriumchlorid  
                          + Wasser ad 1000 mL  
                          pH 7,6

Anschließend erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz in einer Dunkelkammer. Hierzu wurde die Membran zunächst in einem Volumen von insgesamt 3 mL Detektierlösung (ECL Western Blotting Analysen System, Amersham Biosciences Sweden) für ca. drei Minuten geschwenkt und anschließend in einer Röntgenkassette (IEC 60406, MS-Laborgeräte GmbH) der Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Biosciences Sweden) für zehn Minuten exponiert. Die Entwicklung (LX 24 1:5 verdünnt, Kodak GmbH) des Röntgenfilms erfolgte in einer Minute, die Fixierung (AL 4 1:5 verdünnt, Kodak GmbH) innerhalb von fünf Minuten. Zu Dokumentationszwecken wurde der belichtete Film getrocknet und eingescannt.

### **6.3.3 Western-Blot-Analysen von zellulärer Histondeacetylase 3 (HDAC 3)**

Die Westernblot-Analyse von zellulärem HDAC 3 erfolgte analog der in 6.3.2 beschriebenen Methode mit folgenden Änderungen:

Es wurden je 20 µL der zu untersuchenden Proben, 5 µL Rainbow-Marker (full-range, Amersham Biosciences Sweden) und 20 µL einer positiv Kontrolle mittels Hamilton-Präzisionsspritze (Hamilton Bernaduz 50 µL gastight) auf ein 8 %iges Acrylamid-Minigel aufgetragen. Der Einlauf der Proben im Mini-Gel-System (Biometra GmbH) erfolgte mit 60 Volt für ca. 30 Minuten und die anschließende Trennung bei 150 Volt für ca. 1,5 Stunden. Protein-Blotting wurde ebenfalls in semi-dry Technik allerdings bei 40 mA für 50 Minuten (bzw. 70 mA bei zwei Gelen) durchgeführt.

Die Antikörperreaktion mit dem anti-Histondeacetylase 3 Antikörper (anti-HDAC3, Upstate-Biomol GmbH 06-890) erfolgte in 10 mL TBS-Milk 3 % (w/v) bei einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei ca. 5 °C auf einer Rocking-Plattform. Die Detektion erfolgte wie zuvor über die Chemolumineszenz, allerdings wurde der Röntgenfilm für 30 Minuten exponiert.

Trenngel 8 %            2,7 mL Roth-Acrylamid (30 %ige Lsg., Carl Roth GmbH)  
+ 100 µL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %)  
+ 4,6 mL Wasser  
+ 2,5 mL Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH=8.8, Carl-Roth  
GmbH, 99 %)  
+ 6 µL TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Sigma-  
Aldrich GmbH, 99 %)  
+ 50 µL APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v),  
Merck-Schuchhardt GmbH, 99 %)

#### **6.3.4 Western-Blot-Analyse von zellulärer Histondeacetylase 2 (HDAC 2)**

Die Western-Blot-Analyse von zellulärem HDAC 2 erfolgte analog der in 6.3.2 beschriebenen Methode mit folgenden Änderungen:

Es wurden je 20 µL der zu untersuchenden Proben, 5 µL Rainbow-Marker und 20 µL einer positiv Kontrolle auf ein 8 %iges Acrylamid-Minigel aufgetragen. Der Einlauf der Proben im Mini-Gel-System erfolgte mit 60 Volt für ca. 30 Minuten und die anschließende Trennung bei 150 Volt für ca. 1,5 Stunden. Protein-Blotting wurde ebenfalls in semi-dry Technik allerdings bei 40 mA für 50 Minuten (bzw. 70 mA bei zwei Gelen) durchgeführt.

Die Antikörperreaktion mit dem anti-Histondeacetylase 2 Antikörper (anti-HADAC2, Upstate-Biomol GmbH 07-222) erfolgte in 10 mL TBS-Milk 3 % (w/v) bei einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei ca. 5 °C auf einer Rocking-Plattform. Die Detektion erfolgte wie bereits zuvor über die Chemolumineszenz, allerdings wurde der Röntgenfilm für 30 Minuten exponiert.

Trenngel 8 %            2,7 mL Roth-Acrylamid (30 %ige Lsg., Carl Roth GmbH)  
+ 100 µL SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %)  
+ 4,6 mL Wasser  
+ 2,5 mL Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH=8.8, Carl Roth GmbH,  
99,9 %)  
+ 6 µL TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Sigma-  
Aldrich GmbH, 99 %)  
+ 50 µL APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v),  
Merck-Schuchhardt GmbH, 99 %)

### 6.3.5 Western-Blot-Analyse von zellulärem b-Actin

Die Western-Blot-Analyse von zellulärem  $\beta$ -Actin erfolgte zur Kontrolle der äquivalenten Proteinkonzentration von Zelllysaten mit Behandlungszeiten der Ausgangszellen von über sechs Stunden. Die Analyse erfolgte analog der in 6.3.2 beschriebenen Methode mit folgenden Änderungen:

Zunächst wurde der Proteingehalt der Probe nach 6.3.6 berechnet und das hieraus folgende notwendige Probenvolumen sowie 5  $\mu$ L Rainbow-Marker auf ein 8 %iges Acrylamid-Minigel aufgetragen. Der Einlauf der Proben im Mini-Gel-System erfolgte mit 60 Volt für ca. 30 Minuten und die anschließende Trennung bei 150 Volt für ca. 1,5 Stunden. Protein-Blotting wurde erneut in semi-dry Technik bei 40 mA für 50 Minuten (bzw. 70 mA bei zwei Gelen) durchgeführt.

Die Antikörperreaktion mit dem anti-Actin Antikörper (Actin, pan AB-5 Clone ACTN05, Dunn Labortechnik GmbH, Nr. 1295-P0) erfolgte in 10 mL TBS-Milk 3 % (w/v) bei einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei ca. 5 °C auf einer Rocking-Plattform. Die Detektion erfolgte wie bereits zuvor über die Chemolumineszenz, hier wurde der Röntgenfilm für nur 15 Minuten exponiert und entwickelt.

Trenngel 8 %            2,7 mL Roth-Acrylamid (30 %ige Lsg., Carl Roth GmbH)  
                              + 100  $\mu$ L SDS-Lösung (10 % (w/v), Carl-Roth GmbH, 99 %)  
                              + 4,6 mL Wasser  
                              + 2,5 mL Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH=8.8, Carl Roth GmbH,  
                              99,9 %)  
                              + 6  $\mu$ L TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Sigma-  
                              Aldrich GmbH, 99 %)  
                              + 50  $\mu$ L APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v),  
                              Merck-Schuchhardt GmbH, 99 %)

### 6.3.6 Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten nach SMITH et al. 1985

Die zu untersuchenden Zelllysate wurden zunächst mit entionisiertem Wasser in zwei Stufen mit einem Faktor von 1 : 10 und 1 : 100 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ L der verdünnten Zelllysate in einer 96-Well-Platte mit 100  $\mu$ L Reaktionslösung versetzt, kurz geschüttelt und anschließend für 45 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die sich entwickelnde Färbung der Lösungen aufgrund der Umsetzung des reduzierten Kupfer II mit Bicinchoninsäure wurde photometrisch bei 550 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde anhand der Extinktionswerte

einer Kalibrierfunktion ermittelt. Diese wurde in einem Konzentrationsbereich von 100 µg/mL bis 5 µg/mL durch Verdünnen eines Protein-Standards (Sigma-Aldrich GmbH P 5619) mit entionisiertem Wasser und Umsetzung der Proben mit der Reaktionslösung wie oben beschrieben ermittelt.

Reaktionslösung      0,1 mL 4 %ige (m/v) Kupfersulfat(II)-Lösung  
                             + 4,9 mL Bicinchonsäure-Lösung (Sigma Aldrich GmbH B9643)

In Abhängigkeit der ermittelten Proteinkonzentrationen wurden zur Western-Blot-Analyse Probenvolumina von maximal 20 µL pro Geltasche (Probe mit der geringsten Proteinkonzentration) aufgetragen und entsprechend geringere Volumina der höher konzentrierten Proben verwendet. Die so konstant aufgetragene Proteinmenge betrug in Abhängigkeit des Probendurchganges 7 bis 10 µg pro Geltasche.

## 6.4 In vitro Untersuchungen am enzymatischen HDAC Testsystem

Zur Untersuchung der Testsubstanzen auf ihr Potenzial zur Inhibierung der Enzymaktivität der Klasse der Histondeacetylasen und quantitativen Bestimmung der Halbwirkkonzentration (inhibition concentration 50 %,  $IC_{50}$ ) wurde ein enzymatisches Testsystem mit fluorimetrischer Endpunktsindikation verwendet (AK 500, Biomol GmbH). Dieses Inhibitions-Testsystem nutzt die HDAC-Enzymaktivität eines humanen Zellkernextraktes aus HeLa-Zellen, dessen Zusammensetzung in Hinblick auf die einzelnen HDAC-Isoformen nicht genau bekannt war. Bisher konnte nur die Präsenz von HDACs der Klasse I, insbesondere HDACs 1-3 sicher abgeleitet werden, obwohl laut Firmeninformationen (BIOMOL GMBH 2004) auch weitere HDACs, inklusive der Sirtuine, in diesem HDAC-Cocktail vorhanden sein sollten.

### 6.4.1 Durchführung des enzymatischen Testverfahrens

Der Enzymassay (AK500 HDAC-Enzymtestsystem, Biomol GmbH) wurde prinzipiell in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde die Testsubstanz in Wasser gelöst und neutralisiert. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde dann eine Verdünnungsreihe in HDAC-Assay-Puffer (KI 143, Biomol GmbH) angesetzt und jeweils 10  $\mu$ L der Lösung vorgelegt (fünffach-konzentriert im Vergleich zur gewünschten Test-End-Konzentration) und mit 15  $\mu$ L HDAC-Enzym-Lösung (1450  $\mu$ L HDAC-Assay-Puffer mit 100  $\mu$ L HeLa-Nuklearextrakt) sowie 25  $\mu$ L Substratlösung (2500  $\mu$ L HDAC-Assay-Puffer mit 50  $\mu$ L Fluo-de-Lys-Substrat (KI 104, Biomol GmbH) versetzt.

Die Herstellung der HDAC-Enzymlösung erfolgte durch rasches Auftauen des HeLa-Nuklearextraktes (KI 140, Biomol GmbH) und Verdünnung mit bei ca. 5 °C vorgekühltem HDAC-Assay-Puffer. Bis zur Verwendung wurde die Zellextraktlösung auf Eis gelagert. Nach Auftauen des HeLa-Nuklearextraktes mussten alle folgenden Arbeitsschritte zügig durchgeführt werden, da ansonsten die Enzymaktivität des Extraktes deutlich abgenommen hätte.

Die enzymatische Reaktion wurde in einer klaren  $\frac{1}{2}$ -Volumen-96-Well-Platte (KI 101, Biomol GmbH) durchgeführt, die nach Zugabe der Substanzen mit Folie (MACtac Industries US) verschlossen, fünf Minuten geschüttelt und anschließend bei 37 °C für vier Stunden inkubiert wurde.

Im zweiten Schritt des enzymatischen Testsystems wurde die Folie zunächst entfernt, 50  $\mu$ L Entwicklerlösung zugefügt, die  $\frac{1}{2}$ -Volumen-96-Well-Platte erneut mit der Folie verschlossen und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Entwicklerlösung bewirkte durch den Anteil an Trichostatin A einerseits einen Abbruch jeder weiteren HDAC enzymatischen Reaktion, andererseits wurde das durch die HDAC-Enzyme bereits deacetylierte Substrat mittels Entwicklerreagenz zum fluoreszierenden Endmolekül derivatisiert.

Nach Abschluss der Entwicklung wurde die ½-Volumen-96-Well-Platte im Fluoreszenzreader (355 nm Anregungswellenlänge, 535 nm Detektionswellenlänge, Wallac Victor 1420, Perkin-Elmer GmbH) ausgelesen.

Entwicklerlösung: 5700 µL HDAC-Assay Puffer  
 + 300 µL Fluo-de-Lys-Entwickler (KI 105, Biomol GmbH)  
 + 60 µL Trichostatin A Lsg. (GR 309-9090, Biomol GmbH)

#### 6.4.2 Bestimmung der Halbwirkkonzentration IC<sub>50</sub>(HDAC)

Das gemessene Fluoreszenzsignal in AFU (arbitrary fluorescence units) war ein Maß für die absolute Menge an deacetyliertem Substrat und somit ein direktes Maß für die gesamte HDAC-Enzymaktivität. Die inhibierende Wirkung einer Testsubstanz bewirkte daher eine Abnahme des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu einer HDAC-Pufferlösung ohne Wirkstoff. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Fluoreszenzwerte daher zunächst durch Subtraktion mit den Werten für eine Trichostatin A Lösung (c = 200 nmol/L, negativ Kontrolle) und Vergleich mit Bestimmungen einer Testlösung ohne Wirkstoff (positiv Kontrolle) normalisiert und in einen prozentualen Wert der Enzymaktivität umgerechnet. Zur Verdeutlichung der Vorgehensweise wurden die gemessenen Werte von Valproinsäure in Tabelle 6-3 dargestellt.

**Tabelle 6-3:** Konzentrations-Fluoreszenzwerte der VPA als Testsubstanz im HDAC-Enzymassay und die Umrechnung in Prozent Enzymaktivität anhand der Enzymaktivität von Trichostatin A (c = 200 nmol/L) in Relation zur Kontrolle (n=3).

Dosis (nmol/L)	Messung			Enzymaktivität		
	1 (AFU)	2 (AFU)	3 (AFU)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
20 000	3264	2720	2974	6,4	4,8	5,5
10 000	3554	3780	4236	7,3	7,9	9,3
5 000	4092	4704	4680	8,9	10,7	10,7
1 000	11584	13082	9260	31,5	36,0	24,5
500	13950	19339	15669	38,6	54,9	43,8
100	27275	26737	26739	78,8	77,2	77,2
10	35994	31687	29836	105,1	92,1	86,5
0	35879	33315	31554	104,7	97,0	91,7
TSA	1130	1146	1182	0,0	0,0	0,0

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve und der Berechnung des IC<sub>50</sub>(HDAC)-wertes wurden von jeder Testsubstanz mindestens fünf Dosis-Enzymaktivitäts-Messungen in je dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die graphische Darstellung und iterative Anpassung an eine sigmoide, mathematische Inhibierungsfunktion (Abbildung 6-10) erfolgte anschließend

mittels des Softwarepaketes WinNonLin Version 4.0.1 (Pharsight Industries - Pharmakodynamic Module).

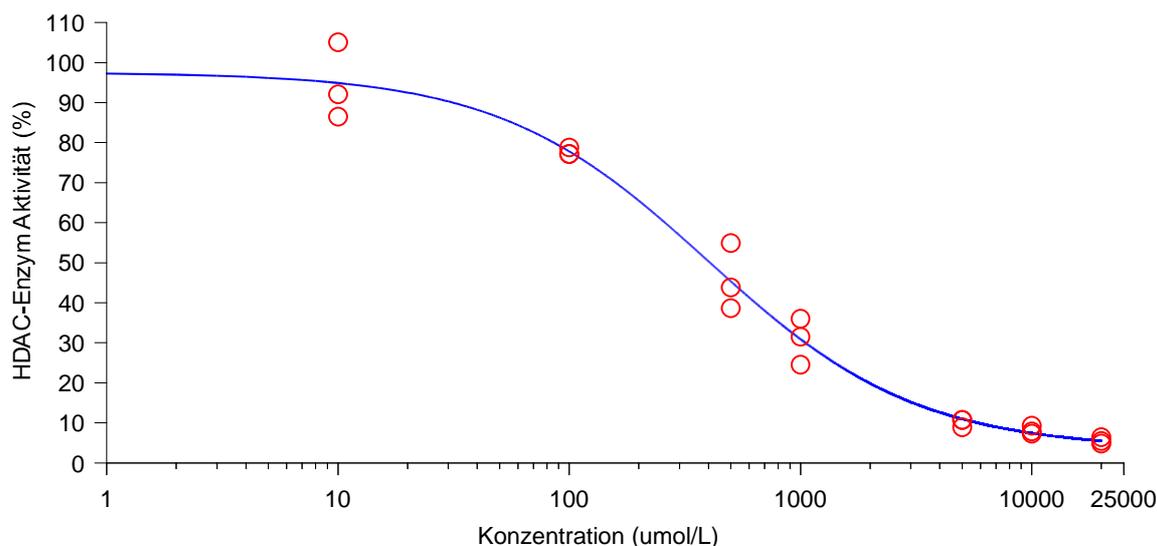
$$E = E_{\max} - \left( \frac{c^{\delta} * (E_{\max} - E_0)}{c^{\delta} + IC_{50}^{\delta}} \right)$$

**Abbildung 6-10:** Mathematische Funktion zur Anpassung der Enzymdaten an die sigmoide Inhibierungskurve.

E	Enzymaktivität (%)
$E_{\max}$	iterativ berechnete Enzymaktivität ohne Testsubstanz (%)
$E_0$	iterativ berechnete Enzymaktivität bei maximaler Dosis (%)
c	Dosis ( $\mu\text{mol/L}$ )
$\delta$	Krümmungsfaktor der sigmoiden Inhibitionskurve
$IC_{50}$	Dosis bei der die Enzymaktivität $\frac{1}{2} E_{\max} - E_0$ entspricht ( $\mu\text{mol/L}$ )

Anhand der iterativen Funktionsbestimmung berechnete das Computerprogramm den  $IC_{50}$ (HDAC)-Wert einer Testsubstanz sowie den Vertrauensbereich des Messergebnisses in Abhängigkeit der Qualität der Funktionsanpassung an die experimentellen Daten. Die Angabe des Vertrauensbereiches erfolgte als Standard Fehler (Standard Error, SE), bei dem es sich nicht um den Standardfehler eines Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) handelte.

Beispielhaft wurde hier die iterative Funktionsanpassung und die Bestimmung des  $IC_{50}$ (HDAC)-Wertes für Valproinsäure durchgeführt (Abbildung 6-11).



**Abbildung 6-11:** Graphische Darstellung der computerberechneten Inhibitionsfunktion durch Valproinsäure;  $IC_{50}$ (HDAC): 398  $\mu\text{mol/L}$  (SE: 50  $\mu\text{mol/L}$ ).

Der hier beispielhaft berechnete  $IC_{50}$ (HDAC)-Wert von 398  $\mu\text{mol/L}$  (SE: 50  $\mu\text{mol/L}$ ) bestätigte den in der Literatur bekannten  $IC_{50}$ (HDAC-1) von 400  $\mu\text{mol/L}$  sowie den ebenfalls an einem HeLa-Nuklearextrakt bestimmten  $IC_{50}$ (HDAC) von 2000  $\mu\text{mol/L}$  (PHIEL et al. 2001).

### **6.4.3 Ausschluss interferierender HDAC-Inhibitoren**

Der enzymatische HDAC-Assay stellt schlussendlich eine Farbreaktion dar, bei dem das Ausbleiben der zu messenden Färbung als Aktivität am Enzym gedeutet wird. Da aber auch eine chemische Interferenz das Ausbleiben der Farbreaktion bewirken kann, müssen positiv getestete Substanzen in einem Enzymassay immer auch auf falsch positive Ergebnissen untersucht werden.

Zunächst positiv getestete Substanzen wurden daher in einem Konzentrationsbereich oberhalb der zuvor bestimmten Halbwirkkonzentration auf Interferenz mit den Entwicklungsreagenzien untersucht. Hierzu wurden je 10  $\mu\text{L}$  der Testlösung ( $c > IC_{50}$ ) für 15 Minuten bei 37 °C zusammen mit 40  $\mu\text{L}$  bereits deacetyliertem Substrat ( $c=125 \mu\text{mol/L}$  FluodeLys-deacetylated-standard, Ki 142 Biomol GmbH) inkubiert und anschließend 50  $\mu\text{L}$  Entwicklerlösung (Kapitel 6.4.1) zugegeben. Im Abstand von drei Minuten wurde dann die Fluoreszenzintensität der Proben ( $n=4$ ) gemessen und über weitere 15 Minuten ein Kurvenverlauf der zeitlichen Entwicklung erstellt und mit einer positiv Kontrolle (nur Puffer-Lösung) verglichen.

Entsprach der Kurvenverlauf an Intensität und Geschwindigkeit der zeitlichen Fluoreszenz der positiv Kontrolle, konnte keine Interferenz mit dem Entwicklungsschritt des Enzym-Assays unterstellt werden; wurden jedoch deutliche Abweichungen in der zeitlichen Entwicklung oder in der maximal erreichten Fluoreszenzintensität festgestellt, handelte es sich um eine zunächst fälschlicherweise als HDAC-Inhibitor eingestufte Substanz (z.B. Vitamin C, Kapitel 4.4.3).

## 6.5 Pharmakokinetische Untersuchungen im Mausmodell

Zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter wurden zwei ausgewählte VPA-analoga (S-2-Pentyl-4-Pentinsäure und S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure) in unterschiedlichen Mausmodellen untersucht. S-2-Pentyl-4-Pentinsäure war insbesondere wegen der beobachteten starken HDAC-Inhibition und des hohen teratogenen Potenzials von großem Interesse, während S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure auf Grund des teratogenen Potenzials bei fehlender Aktivität an HDAC-Enzymen als mögliches Pro-Teratogen untersucht werden sollte. Des Weiteren sollten für ausgewählte VPA-Derivate die in vivo gebildeten Metabolite untersucht und strukturell aufgeklärt werden. Die Bestimmungsmethoden zur enantioselektiven Quantifizierung der beiden oben genannten VPA-Derivate beruhte schematisch auf den bereits in Kapitel 6.1.6 beschriebenen chiralen Derivatisierungen zum diastereomeren Amid bzw. zum diastereomeren Menthylcarbonat und der anschließenden gaschromatographischen Trennung mit thermionischer Detektion an einem Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD). Diese bereits zur Bestimmung der optischen Reinheit verwendete Methodik konnte hier zu einer validierten Bestimmungsmethode ausgearbeitet und in das am Institut bestehende akkreditierte Laborqualitätsmanagementsystem integriert werden.

### 6.5.1 Haltung und Behandlung der Versuchstiere

Die kontrolliert klimatischen Bedingungen des Tierraumes betragen 21-23 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55-70 %. Die Dunkelphase dauerte von 22<sup>00</sup> Uhr bis 10<sup>00</sup> Uhr. Die Tiere erhielten pelletiertes Fertigfutter der Marke Altromin (Standarddiät „Haltung“ für Mäuse und Ratten), Einstreu der Marke Lignocell (staubfreie Natur- und Weichholzfaser, BK8/15) sowie Leitungswasser ad libitum. Substanzlösungen zur Injektion wurden zunächst eingewogen, unter pH-Wert-Kontrolle (eingestellter pH-Wert ca.  $7,4 \pm 0,2$ ) mit Natriumhydroxidlösung neutralisiert und den Empfehlungen der GV-SOLAS folgend mit Wasser auf 10 mL Lösung aufgefüllt. Bis zur Verwendung wurden die Lösungen bei ca. 4 °C gelagert und vor Injektion von 10 mL/kg Körpergewicht auf ca. 37 °C erwärmt und homogenisiert.

Die Auswahl der Versuchstiere von je drei weiblichen Mäusen (Hsd:Win NMRI und C57BL/6J; Harlan Winkelmann Borcheln GmbH sowie ST8SiaIV<sup>(+/+)</sup> und ST8SiaIV<sup>(-/-)</sup> aus dem Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover – Institut für zelluläre Chemie) pro Zeitpunkt nach Verabreichung der Testsubstanz erfolgte zufällig aus dem gesamten Bestand der zur Verfügung stehenden Tiere. Alle Tiere wurden gewogen und nach subkutaner oder intraperitonealer Injektion separiert. Nach Narkotisierung des Versuchstiers wurde vom medialen Augenwinkel eine Blutprobe von 0,5 bis 1,0 ml Vollblut in ein Lithium-Heparin Probengefäß (15 I.E. Heparin/ml) entnommen und das Tier anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Als weitere Probenorgane wurden dem Tier Gehirn, Leber, Niere und Milz entnommen. Die Blut-

probe wurde anschließend bei 5000 g für 5 Minuten zentrifugiert, das überstehende Plasma entnommen und die Plasmaprobe sowie Organe bis zur weiteren Analyse bei ca. -25 °C gelagert.

Die Tierversuche zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter wurden von Frau Dr. K. Hoffmann im Rahmen ihrer Dissertation und gemäß den gesetzlichen Rahmenbedingungen (§ 8 Abs.2 Gentechnikgesetz, §§ 7 und 8 Tierschutzgesetz, Tierversuchsanträge Aktenzeichen 00/269 und Aktenzeichen 02/612) durchgeführt.

### 6.5.2 Metabolische Untersuchung von Testsubstanzen

Zur metabolischen Untersuchung von VPA-Derivaten wurden die im Tiermodell erhaltenen Plasmaproben (50 µL) zunächst mit Pufferlösung I (0,5 M Natriumdihydrogenphosphat pH 5,0) versetzt und anschließend zweimal mit je 1 mL Essigsäureethylester extrahiert. Gewebeproben (50 µg) wurden zunächst mit Hilfe eines Ultraturrax T8 (Ika GmbH) für eine Minute homogenisiert und ebenfalls nach Zugabe von Pufferlösung I je zweimal mit 1 mL Essigsäureethylester extrahiert. Nach Zugabe von weiteren 100 µL Acetonitril zu der vereinigten organischen Phase wurden die Proben im Stickstoffstrom auf ca. 50 µL eingengt, mit weiteren 50 µL Acetonitril und 100 µL N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid (MSTFA) versetzt und für eine Stunde bei 60 °C unter Schütteln zu dem TMS-Derivaten umgesetzt wie bereits in Kapitel 6.1.5 schematisch dargestellt. Die so erhaltenen TMS-Derivate der Analyten und zu untersuchenden Metabolite wurden dann gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe der massenselektiven Detektion untersucht (GC-MSD). Die hierzu verwendeten GC-MS Parameter entsprachen den Werten für die in Kapitel 6.1.5 beschriebene Technik zur Bestimmung der chemischen Reinheit von VPA-Derivaten und waren wie folgt:

Injektorparameter:	split-splittless Liner, splittless, 150 °C, 1,0 – 5,0 µL Injektion
Säule:	Agilent 19091S-433, HP-5ms, 0,25 mm * 30 m * 0,25 µm
Flussrate:	1,0 mL/min Helium 5.0
Temperaturprogramm:	Beginn 70 °C für 2 min mit 8 °C / min auf 220 °C für 5 min halten mit 50 °C / min auf 320 °C für 5 min halten
Transferline:	280 °C
MSD:	Solvent delay 3 min; TIC-Mode; m/z 50,0 – 550,0, MS-Quad 150 °C, MS-Source 230 °C

Die erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren der Proben wurden mit entsprechenden Proben unbehandelter Tiere verglichen und die Massenspektren der Differenzsignale ausgewertet. Hierzu standen sowohl verschiedene kommerzielle Datenbanken als auch Referenzspektren ausgewählter VPA-Derivate und Metabolite zur Verfügung. Als Hilfsmittel zur Interpretation der Massenspektren wurde ein Lehrwerk verwendet (HESSE et al. 1995).

### 6.5.3 Bestimmungsmethode für S-2-Pentyl-4-Pentinsäure

Plasmaproben wurden nach dem Auftauen auf dem Vortexer homogenisiert und ein Volumen von 50  $\mu\text{L}$  in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß-2-mL pipettiert. Hierzu wurden 30  $\mu\text{L}$  der Internen-Standardlösung (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  3-Ethyl-Pentansäure (GRAVEMANN 2002) in Pufferlösung I (0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat pH 7,4)), 200  $\mu\text{L}$  Pufferlösung II (0,5 M Natriumdihydrogenphosphat pH 5,0) und 1 mL Essigsäureethylester (Sigma-Aldrich GmbH, 99,8 %) zugefügt und die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt. Gewebeproben wurden in noch gefrorenem Zustand in Aliquante von ca. 50 mg geteilt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß-2-mL überführt und gewogen. Es wurden 30  $\mu\text{L}$  der Internen-Standardlösung und 400  $\mu\text{L}$  Pufferlösung zupipettiert und die Gewebeprobe für eine Minute im Ultraturrax T8 (Ika GmbH) homogenisiert. Anschließend wurde 1 mL Essigsäureethylester zugefügt und die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt.

Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 20000 g wurden ca. 850  $\mu\text{L}$  der organischen Phase in ein Glasgefäß überführt und die Plasma- oder Gewebeprobe erneut mit 1 mL Essigsäureethylester versetzt. Für die Derivatisierung durften dabei keine Plastikgefäße verwendet werden. Nach Wiederholung des Schüttelns für 15 Minuten und der Zentrifugation bei 20000 g für fünf Minuten wurden 1000  $\mu\text{L}$  der organischen Phase entnommen und ebenfalls in das Glasgefäß gefüllt. Vor dem Einengen bei ca. 30 °C im Stickstoffstrom (Sample-Concentrator, Techne GmbH) auf ca. 50 – 100  $\mu\text{L}$  wurden noch 100  $\mu\text{L}$  Acetonitril zupipettiert. Die Probe durfte hierbei nicht bis zur Trockene eingedampft werden.

Der eingeeengte Extrakt wurde schließlich nach Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  Dichlormethan (Sigma-Aldrich GmbH, HPLC gradient grade), 200  $\mu\text{L}$  1-Hydroxybenzotriazol-Lösung (20 mg/mL in Dichlormethan/Pyridin 99/1), 200  $\mu\text{L}$  N<sup>+</sup>-(3-Dimethylaminopropyl)-N-Ethyl-Carbodiimid Hydrochlorid-Lösung (20 mg/mL in Dichlormethan) und 200  $\mu\text{L}$  S(-)-1-(1-Naphthyl)-ethylamin-Lösung (20 mg/mL in Dichlormethan) für 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln derivatisiert. Nach Reaktionsende wurde die Lösung bei ca. 30 °C im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt und zur gaschromatographischen Analyse in 100  $\mu\text{L}$  GC-Lösemittelgemisch (n-Hexan/Essigsäureethylester 4/1) aufgenommen.

Zum qualitativen Nachweis des Analyten wurde die Retentionszeit von 2-Pentyl-4-Pentinsäure im Vergleich zur Retentionszeit der Reinsubstanz/Vergleichsprobe nach gaschromatographischer Trennung gekoppelt mit thermionischer Detektion (GC-System HP 6890, Agilent GmbH) unter Verwendung der folgenden Parameter herangezogen:

Injektorparameter: Quarzglas splitless Liner deaktivierte Glaswolle, Injektion 1  $\mu\text{L}$  splitless bei 250 °C  
Säule: Agilent HP 5 MS (30 m x 320  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ )

Flussrate:	2 mL/min Helium 5,0
Temperaturprogramm:	Beginn 120 °C für 2 min mit 20 °C/min auf 220 °C für 1 min halten mit 10 °C/min auf 230 °C für 12 min halten mit 60 °C/min auf 325 °C für 6 min halten
Detektorparameter:	50 pA (Äquilibrierzeit 20 min) bei 250 °C

Zur quantitativen Bestimmung von 2-Propyl-4-Pentinsäure wurden die Chromatogramme im Hinblick auf das Peakflächenverhältnis von Analytsignal und internem Standard und Vergleich mit einer Kalibrierfunktion unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix ausgewertet (Abbildung 6-12).

$$C_{Probe} = \frac{\left(\frac{F_A}{F_{IS}} - a\right)}{b} * 1000 * \frac{50}{V_P} * W_{Matrix}$$

**Abbildung 6-12:** Bestimmung der Analytkonzentration nach GC-NPD Analyse.

$C_{Probe}$	= Konzentration des Analyten in Plasmaproben ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bzw. Gewebeproben ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
$F_A$	= Peakflächeneinheiten Analyt ( $\text{nA}\cdot\text{s}$ )
$F_{IS}$	= Peakflächeneinheiten interner Standard ( $\text{nA}\cdot\text{s}$ )
$a$	= y-Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion ( $(\text{nA}\cdot\text{s})/(\text{nA}\cdot\text{s})$ )
$b$	= Steigung der Kalibrierfunktion ( $1/\mu\text{g}$ )
$V_P$	= Analytierte Probenmenge bei Plasmaproben ( $\mu\text{L}$ ) bzw. bei Gewebeproben ( $\text{mg}$ )
$W_{Matrix}$	= Wiederfindungsrate in der analysierten Matrix (%)

#### 6.5.4 Bestimmungsmethode für S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure

Plasmaproben wurden nach dem Auftauen auf dem Vortexer homogenisiert und ein Volumen von 50  $\mu\text{L}$  in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Hierzu wurden 20  $\mu\text{L}$  der Internen-Standardlösung (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Valproinhydroxamsäure in Pufferlösung I (0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat pH 7,4), 200  $\mu\text{L}$  Pufferlösung II (0,5 M Natriumdihydrogenphosphat pH 5,0) und 1 mL Essigsäureethylester (Sigma-Aldrich GmbH, 99,8 %) zugefügt und die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt. Gewebeproben wurden in noch gefrorenem Zustand in Aliquante von ca. 50 mg geteilt, in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Es wurden 20  $\mu\text{L}$  der Internen-Standardlösung und 400  $\mu\text{L}$  Pufferlösung II zupipettiert und die Gewebeprobe für eine Minute mit dem Ultraturax T8 (Ika-Labortechnik

GmbH) homogenisiert. Anschließend wurde 1 mL Essigsäureethylester zugefügt und die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt.

Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 20000 g wurden ca. 850 µL der organischen Phase in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasma- oder Gewebeprobe erneut mit 1 mL Essigsäureethylester versetzt. Nach Wiederholung des Schüttelns für 15 Minuten und der Zentrifugation bei 20000 g für fünf Minuten wurden 1000 µL der organischen Phase entnommen, ebenfalls in das 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und im Stickstoffstrom (Sample-Concentrator, Techne GmbH) bei ca. 40 °C bis zur Trockene eingedampft.

Die Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von 300 µL Toluol (Sigma-Aldrich GmbH, rein), 10 µL Pyridin (Sigma-Aldrich GmbH, p.A.) und 5 µL (-)-1R,2S,5R-Chlorameisensäurementhylester (1R,2S,5R-(-)-Menthylchloroformate, Fluka-Sigma-Aldrich GmbH, purum 97 %) und leichtem Schütteln für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 100 µL Wasser versetzt und für fünf Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 20.000 g für fünf Minuten wurde der Überstand von ca. 250 µL in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß-1,5 mL überführt, eine Spatelspitze Natriumsulfat (Sigma-Aldrich GmbH, 98 %) zugefügt und die Lösung unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 g für 5 Minuten wurden 200 µL Lösung in ein GC-Vial pipettiert und gaschromatographisch analysiert.

Zum qualitativen Nachweis des Analyten wurde die Retentionszeit von 2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure im Vergleich zur Retentionszeit der Reinsubstanz/Vergleichsprobe nach gaschromatographischer Trennung gekoppelt mit thermionischer Detektion an einem Stickstoff-Phosphor-Detektor (GC-System HP 6890, Agilent GmbH) unter Verwendung der folgenden gaschromatographischen Parameter herangezogen:

Injektorparameter:	Quarzglas splitless Liner ohne Glaswolle, Injektion 1 µL splitless bei 200 °C
Säule:	Agilent HP 1 (30 m x 320 µm x 0,25 µm)
Flussrate:	2,2 mL/min Helium 5,0
Temperaturprogramm:	Beginn 80 °C für 3 min mit 30 °C/min auf 220 °C für 0 min halten mit 2 °C/min auf 270 °C für 0 min halten mit 30 °C/min auf 320 °C für 5 min halten
Detektorparameter:	50 pA (Äquilibrierzeit 20 min) bei 325 °C

Zur quantitativen Bestimmung von 2-Propyl-4-Pentinsäure wurden die Chromatogramme im Hinblick auf das Peakflächenverhältnis von Analytsignal und internem Standard und Vergleich

mit einer Kalibrierfunktion unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix ausgewertet (Abbildung 6-12).

### **6.5.5 Bestimmung von Plasmabindungsrate der Testsubstanzen**

Zur Bestimmung der Plasmabindungsrate einer Testsubstanz wurde Natrium-EDTA-Humanplasma von gesunden und freiwilligen Probanden verwendet, in dem frisch entnommenes Vollblut in einem Na-EDTA-Entnahmesystem für fünf Minuten bei 5000 g zentrifugiert, das überstehende Plasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei ca. -25 °C aufbewahrt wurde. Lithium-Heparin Mausplasma wurde als gepooltes Plasma von weiblichen und männlichen Tieren unterschiedlicher Stämme kommerziell bezogen (Firma Harlan-Winkelmann GmbH) und Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen in diesen Plasmen angesetzt. Nach erwärmen und schütteln der Proben für 1 Stunde bei 37 °C zur Gleichgewichtseinstellung der Proteinbindung erfolgte die Abnahme, Probenaufarbeitung und Analyse von Aliquoten dieser Proben zur Bestimmung der Ausgangskonzentration im Plasma und die mindestens dreifache Durchführung einer Proteintrennung.

Hierzu wurden mindestens je 400 µL Plasmalösung in Zentrifugenröhrchen (Vivaspin 500, Mw-cut-off 5 kDa, Firma Sarstedt GmbH o.ä) für drei Minuten bei 10000 g und ca. 37 °C zentrifugiert. Die Plasmaproteine mit gebundener Testsubstanz wurden dabei durch die Membran der Zentrifugenröhrchen zurückgehalten und nur freier Analyt im Plasmawasser als Zentrifugat aufgefangen. Um das Bindungsgleichgewicht nicht zu verändern, wurde darauf geachtet, dass nur ca. 80 µL Plasmawasser abzentrifugiert wurde. Das Zentrifugat wurde entnommen und der Analytgehalt bestimmt. Die Plasmabindungsrate wurde anschließend nach Vergleich der Konzentration von Ausgangslösung und Zentrifugat in Prozent angegeben.

### **6.5.6 Bestimmung pharmakokinetischer Parameter**

Zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter wurden die Plasma-Konzentrations-Zeit-Werte nach Dosisgabe der Testsubstanz untersucht. Die Berechnung der Parameter erfolgte mittels des Softwarepaketes WinNonLin 4.0.1 (Pharsight Industries-Pharmacokinetic Module). Es wurde eine Non-Compartment-Analyse mit dem linearen Trapezmodell zur Berechnung der terminalen Halbwertszeit durchgeführt. Allen Datenpunkten wurde dieselbe Gewichtung zugeteilt. Als pharmakokinetische Parameter wurden bestimmt:

$t_{\max}$	Zeit nach Dosisgabe, zu der die Maximalkonzentration erreicht wird (min)
$C_{\max}$	Konzentration, die im Zeitverlauf maximal erreicht wird (µg/mL)

---

$\lambda_z$	Exponentialfaktor, der die Steigung der linearen Regressionsgeraden der Zeit-Log(Konzentration)-Kurve zur Bestimmung der terminalen Halbwertszeit angibt (1/h)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit der Testsubstanz im Plasma (h)
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	Fläche unter der Zeit-Konzentrationskurve extrapoliert vom Zeitpunkt null bis zum Zeitpunkt unendlich unter Berücksichtigung der terminalen Halbwertszeit ( $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$ )
$V_z$	Verteilungsvolumen der Testsubstanz unter der Annahme vollständiger Bioverfügbarkeit nach subkutaner bzw. intraperitonealer Applikation ( $F=1$ bei $V_z \cdot F$ ), (L/kg)
Cl	Clearance - Rate (mL/h/kg)
MRT	Mean-Residence-Time, mittlere Verweilzeit eines Moleküls (theoretische Einheit) im untersuchten Organismus (h)



## 7 Literaturverzeichnis

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.  
Molecular Biology of the Cell  
Verlag Garland Science New York, 4. Auflage **2002**

Bacon C.L., Gallagher H., Haughey J.C., Regan C.M.  
Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of Cyclin D3 during the C6 glioma phase.  
Journal of Neurochemistry **2002** (83) 12-19

Baillie T.A.  
Metabolic-activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity - role of the terminal olefin, 2-Normal-propyl-4-pentenoic acid.  
Chemical Research in Toxicology **1988** (4) 195-199

Bialer M.  
New antiepileptic drugs currently in clinical trials: is there a strategy in their development ?  
Therapeutical Drug Monitoring **2002** (1) 85-90

Biomol GmbH Deutschland **2004**  
Product Information Guide HDAC-Enzyme-Assay AK 500

Bjerkedal T., Czeizel A., Goujard J., Kallen B., Mastroiacova P., Nevin N., Oakley G., Robert E.  
Valproic acid and spina-bifida.  
The Lancet **1982** (8307) 1096

Blaheta R.A., Cinatl J. Jr.  
Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug.  
Medicinal Research Reviews **2002** (5) 492-511

Bojic U., Elmazar M.M.A., Hauck R.S., Nau H.  
Further branching of valproate-related carboxylic acids reduces the teratogenic activity, but not the anticonvulsant effect.  
Chemical Research in Toxicology **1996** (5) 866-870

Bojic U., Ehlers K., Ellerbeck U., Bacon C.L., O'Driscoll E., O'Connell C., Berezin V., Kawa A., Lepekhn E., Bock E., Regan C.M., Nau H.  
Studies on the teratogen pharmacophore of valproic acid analogues: evidence of interactions at a hydrophobic centre.  
European Journal of Pharmacology **1998** (2-3) 289-299

Bowden C.L., Brugger A.M., Swann A.C., Calabrese J.R., Janicak P.G., Petty F., Dilsaver S.C., Davis J.M., Rush A.J., Small J.G., Garzatreveno E.S., Risch S.C., Goodnick P.J., Morris D.D.  
Efficacy of divalproex vs lithium and placebo in the treatment of mania.  
*Journal of the American Medical Association* **1994** (12) 918-924

Bremer S., Pellizzer C., Coecke S., Paparelle M., Catalani P.  
Detection of the embryotoxic potential of cyclophosphamide by using a combined system of metabolic competent cells and embryonic stem cells.  
*Alternatives to Laboratory Animals* **2002** (30) 77-85

Burton B.S.  
On the propyl derivatives and decomposition of ethylacetoacetat.  
*Journal of the American Chemical Association* **1882** (3) 385-395

Casteels M., Foulon V., Mannaerts G.P., vanVeldhoven P.P.  
Alpha-oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids and its thiamine dependence.  
*European Journal of Biochemistry* **2003** (270) 1619-1627

Chapman A.G., Meldrum B.S., Mendes E.  
Acute anticonvulsant activity of structural analogues of valproic acid and changes in brain GABA and aspartate content.  
*Life Science* **1983** (32) 2023-2031

Cinatl J. Jr, Cinatl J., Scholz M., Driever P.H., Henrich D., Kabickova H., Vogel J.U., Doerr H.W., Kornhuber B.  
Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells.  
*Anti-Cancer Drugs* **1996** (7) 766-773

Cinatl J. Jr, Cinatl J., Driever P.H., Kotchetkov R., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D.  
Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells.  
*Anti-Cancer Drugs* **1997** (10) 958-963

Clarkson A., Choonara I.  
Surveillance for fatal suspected adverse drug reactions in the UK.  
*Archives of Disease in Childhood* **2002** (6) 462-466

Courage-Maguire C., Bacon C.L., Nau H., Regan C.M.  
Correlation of anti-proliferative potential with in-vivo teratogenicity in a series of valproate analogues.  
*International Journal of Developmental Neuroscience* **1997** (15) 37-43

- Curtin M., Glaser K.  
Histone Deacetylase Inhibitors: The Abbott Experience.  
Current Medicinal Chemistry **2003** (10) 2373-2392
- Dang C.  
c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism.  
Molecular and Cellular Biology **1999** (19) 1-11
- Dangond F., Hendriksson M., Zardo G., Caiafa P., Ekström T.J., Gray S.G.  
Differential expression of class I HDACs: roles of cell density and cell cycle.  
International Journal of Oncology **2001** (19) 773-777
- Davis R., Peters D.H., McTavish D.  
Valproic Acid - A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy.  
Drugs **1994** (2) 332-372
- Dencker L., Nau H., dArgy R.  
Marked accumulation of valproic acid in embryonic neuroepithelium of the mouse during early organogenesis.  
Teratology **1990** (6) 699-706
- deRuijter A.J.M., vanGennip A.H., Caron H.N., Kemp S., vanKuilenburg A.B.P.  
Histone Deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.  
Biochemical Journal **2003** (370) 737-749
- deSilva M., MacArdle B., McGowan M., Hughes E., Stewart J., Neville B.G.R., Johnson A.L., Reynolds E.H.  
Randomised comparative monotherapy trial of phenobarbitone, phenytoin, carbamazepine, or sodium valproate for newly diagnosed childhood epilepsy.  
Lancet **1996** (9003) 709-713
- Deubzer H., Schulze S., Eikel D., Busche B., Rönndahl G., Schweigerer L., Nau H., Witt O.  
Novel valproic acid derivatives with potent differentiation-inducing activity in myeloid leukemia cells.  
Manuscript in preparation **2005**
- Deutsche Kinder Krebs Stiftung **2004**  
Beschreibung zur HIT-GMB Studien  
<http://www.kinderkrebsstiftung.de/pdf/hit-netzwerk/behandlungsnetzwerk09.pdf>
- Dreifuss F.E., Santilli N., Langer D.H., Sweeney K.P., Moline K.A., Menander K.B.  
Valproic acid hepatic fatalities - A retrospective review.  
Neurology **1987** (3) 379-385

Easter D., oBryan-Tear C.G., Verity C.

Weight gain with valproate or carbamazepine - A reappraisal.

Seizure **1997** (2) 121-125

Elaut G., Török G., Vinken M., Laus G., Papeleu P., Tourwe D., Rogiers V.

Major phase I biotransformation pathways of trichostatin A in rat hepatocytes and in rat and human liver microsomes.

Drug Metabolism and Disposition **2002** (30) 1320-1328

Ehlers K., Stürje H.J., Nau H.

Valproic acid induced spina bifida: a mouse model.

Teratology **1992** (45) 145-154

Eickholt B.J., Towers G.J., Ryves W.J., Eikel D., Adley K., Ylinen L.M.J., Chadborn N.H., Harwood A.J., Nau H., Williams R.S.B.

Distinguishing inositol (1,4,5) triphosphate depletion, teratogenic, GSK-3-inhibition and viral replication effects of valproic acid derivatives – A screening approach for new bipolar disorder drugs based on the valproic acid core structure.

Manuscript in preparation **2005**

Ellerbeck U., Radatz M., Nau H.

Structure-teratogenicity-relationship of valproic acid analogues and development of new antiepileptic drugs.

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology **1998** (30) R772

European Collection of Cell Cultures (ECACC) **2004**

<http://www.ecacc.org.uk/>

Federal Drug Administration **2001** – Bio-analytical method validation: Guidance for Industry

<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>

Finnell R.H., Moon S.P., Abbott L.C., Golden J.A., Chernoff G.F.

Strain differences in heat-induced neural tube defects in mice

Teratology **1986** (33) 247-252

Finnell R.H., Shields H.E., Taylor S.M., Chernoff G.F.

Strain differences in Phenobarbital-induced teratogenesis in mice

Teratology **1987** (35) 177-185

Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A., Breslow R., Pavietich N.P.

Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.

Nature **1999** (401) 188-193

- Fischle W., Emiliani S., Hendzel M.J., Nagase T., Nomura N., Voelter W., Verdin E.  
A new family of human histone deacetylase related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p.  
*Journal of Biological Chemistry* **1999** (274) 11713-11720
- Frey H.H., Löscher W.  
Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid.  
*Neuropharmacology* **1987** (17) 637-42
- Fromenty B., Pessayre D.  
Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis - Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines.  
*Journal of Hepatology* **1997** (1) 43-53
- Frye R.A.  
Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000** (273) 793-798
- Gao L., Cueto M.A., Asselbergs F., Atadja P.  
Cloning and functional characterization of HDAC 11, a novel member of the human histone deacetylase family.  
*Journal of Biological Chemistry* **2002** (277) 25748-25755
- Gomez M.R.  
Possible teratogenicity of valproic acid.  
*Journal of Pediatrics* **1981** (3) 508-509
- Göttlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O.H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J.P., Lo C.F., Nervi C., Pelicci P.G., Heinzl T.  
Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.  
*EMBO Journal* **2001** (24) 6969-6978
- Gravemann U.  
Synthese achiraler, racemischer und enantiomerenreiner Valproinsäure-Analoga mit antikonvulsiver, neurotoxischer und teratogener Aktivität.  
Universität Hannover Dissertation **2002**
- Gray S.G., Ekstrom T.J.  
The human histone deacetylase family.  
*Experimental Cell Research* **2001** (262) 75-83

Grozinger C.M., Hassig C.A., Schreiber S.L.

Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda 1p.  
Proceedings of the National Academy of Science **1999** (96) 4869-4873

Grozinger C.M., Schreiber S.L.

Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small molecule inhibitors.  
Chemistry and Biology **2002** (9) 3-19

Gurvich N., Tsygankova O.M., Meinkoth J.L., Klein P.S.

Histone deacetylase is a target of valproic acid mediated cellular differentiation.  
Cancer Research **2004** (64) 1079-1086

Hauck R.S., Nau H.

Structure-teratogenicity relationships of valproic acid and related branched carboxylic acids.  
Teratology **1990** (41) 563-567

Hauck R.S., Nau H., Elmazar M.M.A.

On the development of alternative antiepileptic drugs - Lack of enantioselectivity of the anticonvulsant activity, in contrast to teratogenicity, of 2-N-Propyl-4-pentenoic acid and 2-N-Propyl-4-pentynoic acid, analogues of the anticonvulsant drug valproic acid.  
Naturwissenschaften **1991** (6) 272-274

Hauck R.S., Elmazar M.M.A., Plum C., Nau H.

The enantioselective teratogenicity of 2-Normal-propyl-4-pentynoic Acid (4-Yn-Vpa) is due to stereoselective intrinsic activity and not differences in pharmacokinetics.  
Toxicology Letters **1992** (2) 145-153

Hauck R.S.

Das Antiepileptikum Valproinsäure und strukturverwandte Carbonsäuren: Stereoselektivität der teratogenen Wirkung im Gegensatz zur antikonvulsiven und sedierenden Wirkung – Asymetrische Synthesen und Untersuchungen in der Maus.  
Freie Universität Berlin Dissertation **1992**

Heller A.J., Chesterman P., Elwes R.D.C., Crawford P., Chadwick D., Johnson A.L., Reynolds E.H.

Phenobarbitone, phenytoin, carbamazepine or sodium valproate for newly-diagnosed adult epilepsy - A randomized comparative monotherapy trial.  
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry **1995** (1) 44-50

Hesse M., Meier H., Zeeh B.

Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie  
Verlag Thieme Stuttgart, 5. Auflage **1995**

Higdon J. **2003** – Linus Pauling Institute, Oregon State University

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/la/>

Hoare D.G., Olson A., Koshland D.E. Jr.

The reaction of hydroxamic acids with a water-soluble carbodiimide: A lossen rearrangement.

Journal of the American Chemical Society **1968** (90) 1638

Hoffmann K.

Bedeutung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls und der Polysialinsäure in der Entstehung von Valproinsäure-induzierten Neuralrohrdefekten.

Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover **2004**

Holmes L.B., Harvey E.A., Coull B.A., Huntington K.B., Khoshbin S., Hayes A.M., Ryan L.M.

The teratogenicity of anticonvulsant drugs.

New England Journal of Medicine **2001** (15) 1132-1138

Huai-Yun H., Secret D.T., Mark K.S., Carney D., Brandquist C., Elmquist W.F., Miller D.W.

Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells.

Biochemical and Biophysical Research Communication **1998** (3) 816-820

Hufnagel A.

Internetinformationen für Epileptiker **2004**

<http://www.epilepsie-netz.de/185/Epilepsie-Ratgeber/Antiepileptika/Valproinsaeure.htm>

Huynh K., Barswell V.

The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT.

Oncogene **1998** (17) 2573-2484

Isojarvi J.I.T., Laatikainen T.J., Knip M., Pakarinen A.J., Juntunen K.T.S., Myllyla V.V.

Obesity and endocrine disorders in women taking valproate for epilepsy.

Annals of Neurology **1996** (5) 579-584

Ito A., Kawaguchi Y., Lai C.-H., Kovacs J.J., Higashimoto Y., Appella E., Yao T.-P.

MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation.

EMBO Journal **2002** (22) 6236-6245

Jung M., Brosch G., Kölle D., Scherf H., Gerhäuser C., Loidl P.

Amide analogues of Trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation.

Journal of Medicinal Chemistry **1999** (22) 4669-4679

Kim M.S., Kwon H., Lee Y.M., Baek J., Jang J., Lee S.W., Moon E., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W.

Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes.  
*Nature Medicine* **2001** (7) 437-443

Kinze S., Clauss M., Reuter U., Wolf T., Dreier J.P., Einhäupl K.M., Arnold G.

Valproic acid is effective in migraine prophylaxis at low serum levels: a prospective open-label study.

*Headache* **2001** (41) 774-778

Klapper J.

Divalproex sodium in migraine prophylaxis: a dose-controlled study.

*Cephalalgia Journal* **1997** (7) 103-108

Krämer O.H., Zhu P., Ostendorff H.P., Golebiewski M., Tiefenbach J., Peters M.A., Brill B., Groner B., Bach I., Heinzl T., Göttlicher M.

The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2.

*EMBO Journal* **2003** (13) 3411-3420

Krishna S., Brown N., Faller D.V., Spanjaard R.A.

Differential effects of short-chain fatty acids on head and neck squamous carcinoma cells.

*The Laryngoscope* **2002** (112) 645-650

Kultima K., Nyström A.-M., Scholz B., Gustafson A.-L., Dencker L., Stigson M.

Valproic Acid Teratogenicity: A toxicogenomics approach

*Environmental Health Perspectives* **2004** (112) 1225-1235

Lagace D.C., Nachtigal M.W.

Inhibition of Histone Deacetylase by valproic acid blocks adipogenesis.

*Journal of Biological Chemistry* **2004** (18) 851-860

Lampen A., Siehler S., Ellerbeck U., Göttlicher M., Nau H.

New molecular bioassays for the estimation of the teratogenic potency of valproic acid derivatives in vitro: Activation of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR delta).

*Toxicology and Applied Pharmacology* **1999** (3) 238-249

Lampen A., Carlberg C., Nau H.

Peroxisome proliferator-activated receptor delta is a specific sensor for teratogenic valproic acid derivatives.

*European Journal of Pharmacology* **2001** (431) 25-33

- Landry J., Slama J.T., Sternglanz R.  
Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the Sir2 like proteins.  
Biochemical and Biophysical Research Communication **2000** (278) 685-690
- Levi M., Yagen B. and Bialer M.  
Pharmacokinetics and antiepileptic activity of valproyl hydroxamic acid derivatives.  
Pharmaceutical Research **1997** (14) 213-217
- Li J., Wang J., Nawaz Z., Liu J.M., Qin J., Wong J.  
Both corepressor proteins SMRT and NcoR exists in large protein complexes containing HDAC3.  
EMBO Journal **2000** (19) 4342-4350
- Libert R., vanHoof F., Schanck A. and Hoffmann E.  
The hydroxamate of valproic acid, a compound produced by oximation of urine from patients under valproic acid therapy.  
Journal of Biomedical and Environmental Mass Spectrometry **1986** (13) 599-603
- Lindhout D., Meinardi H.  
Spina-Bifida and in utero exposure to valproate.  
The Lancet **1984** (8399) 396
- Lindhout D., Meinardi H., Meijer J.W.H., Nau H.  
Antiepileptic drugs and teratogenesis in 2 consecutive cohorts - Changes in prescription policy paralleled by changes in pattern of malformations.  
Neurology **1992** (4) 94-110
- Litchfield J.T., Wilcoxon F.  
A simplified method of dose-response experiments.  
Journal of Pharmacology and Experimental Therapy **1949** (96) 99-113
- Löscher W., Nau H.  
Pharmacological evaluation of various metabolites and analogues of valproic acid.  
Neuropharmacology **1985** (24) 427-435
- Löscher W.  
Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action.  
Progress in Neurobiology 1999 (58) 31-59
- Löscher W.  
Basic pharmacology of valproate – A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy.  
CNS Drugs **2002** (10) 669-694

Marks P., Rifkind R., Richon V., Breslow R., Miller T., Kelly W.  
Histon deacetylases and cancer: causes and therapies.  
Nature Reviews - Cancer **2001** (1) 194-202 /a

Marks P.A., Richon V.M., Breslow R., Rifkind R.A.  
Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs.  
Current Opinion in Oncology **2001** (13) 477-483 /b

Martin M.L., Regan C.M.  
The anticonvulsant valproate teratogen restricts the glial cell cycle at defined point in the mid-G1 phase.  
Brain Research **1991** (554) 223-228

Meunier H., Carraz G., Meunier Y., Eymard P., Aimard M.  
Proprietes pharmacodynamique de l'acide n-dipropylacetique. 1<sup>er</sup> memoir : proprietes antiepileptique.  
Therapie **1963** (18) 435-438

Michaelis M., Kohler N., Reinisch A., Eikel D., Gravemann U., Doerr H.W., Nau H., Cinatl J. Jr.  
Increased human cytomegalovirus replication in fibroblasts after treatment with therapeutical plasma concentrations of valproic acid.  
Biochemical Pharmacology **2004** (3) 531-538 /a

Michaelis M., Michaelis U.R., Fleming I., Suhan T., Cinatl J., Blaheta R.A., Hoffmann K., Kotchetkov R., Busse R., Nau H., Cinatl J. Jr.  
Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo.  
Molecular Pharmacology **2004** (3) 520-527 /b

MoreLife **2003** – Alpha-lipoic acid  
<http://morelife.org/supplements/RLA.html>

Murata T., Kurokawa R., Kronen A., Tatsumi K., Ishii M., Taki T., Masuno M., Ohashi H., Yanagisawa M., Rosenfeld M., Glass C.K., Hayashi Y.  
Defects of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome.  
Human Molecular Genetics **2001** (10) 1071-1076

Murray C.J.L., Lopez A.D.  
Global burden of disease.  
Verlag Harvard University Press Boston, **1996**

---

Nau H., Zierer R., Spielmann H., Neubert D., Gansau C.

A new model for embryotoxicity testing - Teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations.

Life Sciences **1981** (26) 2803-2813

Nau H., Rating D., Koch S., Hauser I., Helge H.

Valproic acid and its metabolites: placental transfer, neonatal pharmacokinetics, transfer via mother's milk and clinical status in neonates of epileptic mothers.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapy **1981** (219) 768-777

Nau H., Löscher W.

Valproic acids and metabolites: pharmacological and toxicological studies.

Epilepsia **1984** (1) 14-22

Nau H.

Teratogenic valproic acid concentrations - Infusion by implanted minipumps vs conventional injection regimen in the mouse.

Toxicology and Applied Pharmacology **1985** (2) 243-250

Nau H.

Valproic acid teratogenicity in mice after various administration and phenobarbital-pretreatment regimen: the parent drug and not one of the metabolites assayed is implicated as teratogen.

Fundamentals in Applied Toxicology **1986** (6) 662-668

Nau H., Löscher W.

Pharmacologic evaluation of various metabolites and analogues of valproic acid: teratogenic potencies in mice.

Fundamental Research in Applied Toxicology **1986** (4) 669-676

Nau H., Scott W.J. Jr

Weak acids may act as teratogens by accumulating in the basic milieu of the early mammalian embryo.

Nature **1986** (323) 276-278

Nau H., Hauck R.S., Ehlers K.

Valproic acid induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms.

Pharmacology and Toxicology **1991** (69) 310-321

Nau H, Regan C.M.

Antiproliferative and neurotrophic molecules (American Biogenetics Inc.), New derivatives of valproic acid.

Patentanmeldung **1995** DE 69520832, US 29810894, Anmeldedatum 25.08.1995

Nervi C., Borello U., Fazi F., Buffa V., Pelicci P.G., Cossu G.

Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity.

Cancer Research **2001** (61) 1247-1249

Omtzigt J.G.C., Nau H., Los F.J., Pijper L., Lindhout D.

The disposition of valproate and its metabolites in the late first trimester and early second trimester of pregnancy in maternal serum, urine and amniotic fluid: effect of dose, co-medication and the presence of spina bifida.

European Journal of Clinical Pharmacology **1992** (43) 381-388

Perucca E.

Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience.

CNS Drugs **2002** (10) 695-714

Pfeiffer C.C.

Optical Isomerism and pharmacological action, a generalization.

Science **1956** (124) 29-30

Phiel C.J., Zhang F., Huang E.Y., Guenther M.G., Lazar M.A., Klein P.S.

Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen.

Journal of Biological Chemistry **2001** (39) 36734-36741

Radatz M., Ehlers K., Yagen B., Bialer M., Nau H.

Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid.

Epilepsy Research **1998** (30) 41-48

Radatz M., Ellerbeck U., Elmazar M.M.A., Nau H.

Posterpräsentation **1999**

Remiszewski S.

Recent advances in the discovery of small molecule histone deacetylase inhibitors.

Current Opinion in Drug Discovery and Development **2002** (4) 487-499

Rösch C., Götz D., Kawa S., Fuhlrott C., Vogt C., Steinbicker V.  
Jahresbericht des Bundeslandes Sachsen-Anhalt zur Häufigkeit von congenitalen Fehlbildungen und Anomalien sowie genetisch bedingten Erkrankungen. **2001**  
<http://www.kinderumweltgesundheit.de/index2/pdf/bericht2001.pdf>

Robert E., Guibaud P.  
Maternal valproic acid and congenital neural tube defects.  
The Lancet **1982** (2) 937

Rowley J., Reshmi S., Sobulo O., Musvee T., Anastasi J., Raimondi S., Schneider N., Barredo J., Cantu E., Schlegelberger B., Housman D., Doggett N.A., Rowley J.D., Zeleznik-Le N.J.  
All patients with the t(11;16)(q23;p13.3) that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders.  
Blood **1997** (90) 4886-4893

Schmidt D.  
Adverse effects of valproate.  
Epilepsia **1984** (1) S44-49

Schmidt D.  
Adverse effects and interactions with other drugs. In: Valproate  
Verlag Birkhäuser Basel, **1999**

Serdaroglu G., Erhan E., Tekgul H., Oksel F., Erermis S., Uyar M., Tutuncuoglu S.  
Sodium valproate prophylaxis in childhood migraine.  
Headache **2002** (8) 819-822

Siemes H., Nau H., Schultze K., Wittfoht W., Drews E., Penzien J., Seidel U.  
Valproate (Vpa) metabolites in various clinical conditions of probable Vpa-associated hepatotoxicity.  
Epilepsia **1993** (2) 332-346

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.  
Measurement of protein using bicinchoninic acid.  
Analytical Biochemistry **1985** (150) 76-85  
Erratum in: Analytical Biochemistry **1987** (163) 279

Somoza J.R., Skene R.J., Katz B.A., Mol C., Ho J.D., Jennings A.J., Luong C., Arvai A., Buggy J.J., Chi E., Tang J., Sang B.-C., Verner E., Wynands R., Leahy E.M., Dougen D.R., Snell G., Navre M., Knuth M.W., Swanson R.V., McRee D.E., Tari L.W.  
Structural Snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases.  
Structure **2004** (12) 1325-1334

Sorensen K.V.

Valproate - A new drug in migraine prophylaxis

Acta Neurologica Scandinavica **1988** (4) 346-348

Streyer L.

Biochemie

Spektrum Verlag Heidelberg, 4. Auflage **1999**

Svensson K., Mattson R., James T.C., Wentzel P., Pilartz M., MacLaughlin J., Miller S.J., Olsson T., Eriksson U.J., Ohlsson R.

The paternal allele of the H19 gene is progressively silenced during early mouse development: the acetylation status of histones may be involved in the generation of variegated expression patterns. Development **1998** (125) 61-69

van de Mark K., Chen J.S., Steliou K., Perrine S.P., Faller D.V.

Alpha-lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines.

Journal of Cellular Physiology **2003** (194) 325-340

Vannini A., Volpari C., Filocamo G., Casavola E.C., Brunetti M., Renzoni D., Chakravarty P., Paolini C., deFrancesco R., Gallinari P., Steinkühler C., diMarco S.

Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor.

Proceedings of the National Academy of Science of the USA **2004** (42) 15064-15069

Vigushin D., Coombes R.

Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment.

Anti-Cancer Drugs **2002** (13) 1-13

Volland J.

Embryotoxizität, Antikonvulsive Wirkung, Sedierung und Adipogenese: Struktur-Aktivitäts-Studien von Valproinsäure-Derivaten bei der Maus und in C3H/10T1/2-Zellen.

Dissertation Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover **2002**

vonKreybig T., Preussmann R., Schmidt W.

Chemical constitution and teratogenic effects in rats. I) Carbonic acid amides, acid hydrazides and hydroxamic acids.

Arzneimittelforschung **1968** (18) 645-657

Wade P.A.

Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin.

Human Molecular Genetics **2001** (10) 693-698

- Wang J., Hoshino T., Redner R., Kajigaya S., Liu J.  
ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukaemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex.  
*Proceedings of the National Academy of Science* **1998** (95) 10860-10865
- Werling U., Siehler S., Litfin M., Nau H., Göttlicher M.  
Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives.  
*Molecular Pharmacology* **2001** (5) 1269-1276
- Williams R.S.B., Cheng L., Mudge A.W., Harwood A.J.  
A common mechanism action for three mood-stabilizing drugs.  
*Nature* **2002** (417) 292-295
- Xu Y., Voelter-Mahlknecht S., Mahlkecht U.  
The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid down-regulates expression levels of Bcr-abl, c-Myc and HDAC3 in chronic myeloid leukemia cell lines.  
*International Journal of Molecular Medicine* **2005** (15) 169-172
- Yoshida M., Yutaka H., Koseki K.  
Structural specificity for biological activity of Trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in friend leukemia cells.  
*The Journal of Antibiotics* **1990** (9) 1101-1106
- Yoshida M., Furumai R., Nishiyama M., Komatsu Y., Nishino N., Horinouchi S.  
Histone deacetylase as new target for cancer chemotherapy.  
*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2001** (48-Supplement 1) S20-S26
- Zahn C.A., Morrell M.J., Collins S.D., Labiner D.M., Yerby M.S.  
Management issues for women with epilepsy: a review of the literature.  
*Neurology* **1998** (15) 949-956
- Zhou X., Richon V.M., Wang A.H., Yang X.-J., Rifkind R.A., Marks P.A.  
Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras.  
*Proceedings of the National Academy of Science* **2000** (97) 14329-14333



## 8 Anhänge

### 8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

<sup>Ac</sup> H4	Acetyliertes Kernhiston H4
AFU	Arbitrary fluorescence units
AUC	Area-under-curve
CAM-Assay	Chick-chorioallantoic-membrane-assay
CHN	Elementaranalyse von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff
CHO-Zellen	Chinese-Hamster-Ovarie Zelllinie
CLA	Konjugierte Linolsäure
C-NMR	Kohlenstoff-Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA, DNS	Desoxyribonukleinsäure
DHA	Docosahexaenoic acid, Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintertraessigsäure
EE	Essigester
EHXA	(±)-2-Ethyl-Hexansäure
F9-Zellen	Teratokarzinome Mauszelllinie F9
FDA	Federal Drug Administration
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FFA	Furanoic fatty acid, Furanfettsäure
GC	Gaschromatographie
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GV-SOLAS	Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde
H4	Kernhiston H4
HAT (HATs)	Histon-Acetylase (Histon-Acetylasen)
HDAC (HDACs)	Histondeacetylase (Histondeacetylasen)
HDAC 2 (HDAC 3)	Histondeacetylase Isoform 2 (Isoform 3)
HDAI (HDAIs)	Histindeacetylase-Inhibitor (Inhibitoren)
H-NMR	Wasserstoff-Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
IC <sub>50</sub>	Halbwirkkonzentration
i.p.	Intraperitoneal (Applikation in den Bauchraum)
IR	Infrarotspektroskopie
LLE	Liquid-liquid-extraction (Flüssig-flüssig Extraktion)
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
logP	Logarithmierter Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser

---

LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
MCF	Menthylchloroformate, Chlorameisensäure-menthylester
MRT	Mean Residence Time, Mittlere-Molekül-Verweilzeit
MS	Massen-Spektrometrie
MSD	Massen-selektiver-Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid
MtBMS	Dimethyl-tertbutyl-silyl
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NMRI-Maus	Naval-Medical-Research-Institute-Maus
NPD	thermionischer Stickstoff-Phosphor-Detektor
NTD	Neural tube defect, Neuralrohrdefekt
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphorsäure gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PE	Petrolether
pKs	Logarithmierte Säurekonstante
PPAR (PPARs)	Peroxisomaler proliferations-aktivierter Rezeptor
s.c.	Subkutan (Applikation unter die Haut)
SD	Standard deviation (Standardabweichung des Mittelwerts)
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SE	Standard error (Standard Fehler als Maß für den Vertrauensbereich einer iterativ angepassten mathematischen Funktion)
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
TBS	Tris buffered saline, Tris gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TeraD <sub>50</sub>	Halbwirkkonzentration bei der ein teratogener Effekt in 50 % der Untersuchungen erreicht wird
THF	Tertrahydrofuran
TIC	Total Ion Count, Totalionenstrom
TMS	Trimethylsilyl
TSA	Trichostatin A
VPA	Valproinsäure, 2-Propyl-Pentansäure
VPD	Valpromid
VPA-HS	Valproinhydroxamsäure

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1:** Strukturformel von Valproinsäure (2-Propyl-Pentansäure,  $M_w = 144,21$  g/mol).
- Abbildung 2-2:** Schematische Darstellung von Metaboliten und Metabolisierungswegen nach Dosisgabe von Valproinsäure (nach OMTZIGT 1992).
- Abbildung 2-3:** Pharmakokinetisches Profil von R- und S-2-Propyl-4-Pentinsäure (R-4yn-VPA und S-4yn-VPA) im NMRI-Mausmodell (HAUCK 1992).
- Abbildung 2-4:** Metabolische Aktivierung von Valpromid (VPD) zu Valproinsäure (VPA) im NMRI-Mausmodell (RADATZ 1998).
- Abbildung 2-5:** Übersicht der bisher bekannten Struktur-Teratogenitäts-Beziehungen von Valproinsäure-Derivaten.
- Abbildung 2-6:** Schematische Darstellung von Proteosomen und eines Ausschnitts des Chromatins in Abhängigkeit des Acetylierungsgrades als eine Möglichkeit der post-translationalen Modifikation von Histonen (modifiziert nach YOSHIDA 2001).
- Abbildung 2-7:** Kristallstrukturanalyse und Energiehyperflächen eines bakteriellen HDAC Homologen mit dem exogenen Inhibitor Trichostatin A in der Bindungstasche (FINNIN 1999).
- Abbildung 2-8:** Schematisierte Gleichgewichtsreaktion der Acetylierung- und Deacetylierung von Lysingruppen der Kernhistone durch HATs und HDACs.
- Abbildung 2-9:** Beispielhafte Gruppen von bisher bekannten HDAs der Klasse I und II (CURTIN AND GLASER 2003, REMISZEWSKI 2002).
- Abbildung 2-10:** Gemeinsame Strukturmerkmale bisheriger HDAs (modifiziert nach MARKS 2001).
- Abbildung 4-1:** Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Hydroxamsäurederivate mit den zwei erstmals dargestellten Stereoisomeren R- und S-2-Pentyl-4-Pentylhydroxamsäure.
- Abbildung 4-2:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach konzentrationsabhängiger VPA-Behandlung.
- Abbildung 4-3:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.
- Abbildung 4-4:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit Valproinsäure.
- Abbildung 4-5:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.
- Abbildung 4-6:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach zeitabhängiger Behandlung mit Trichostatin A (TSA).
- Abbildung 4-7:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 1.
- Abbildung 4-8:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 2.
- Abbildung 4-9:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 3.
- Abbildung 4-10:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 4.

- Abbildung 4-11:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 5.
- Abbildung 4-12:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit VPA-Derivaten der Gruppe 6.
- Abbildung 4-13:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an HDAC 3 und HDAC 2 nach Behandlung mit ausgewählten VPA-Derivaten für 6 Stunden.
- Abbildung 4-14:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an HDAC 3 und HDAC 2 nach Behandlung mit ausgewählten VPA-Derivaten für 24 Stunden.
- Abbildung 4-15:** HDAC-Enzym-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes einer Pufferlösung ( $c = 25 \text{ mmol/L}$  Tris-Cl) mit zur Untersuchung der Stabilität des Testsystems ( $n=4 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-16:** HDAC-Enzym-Aktivität in Abhängigkeit des Volumenanteils Lösevermittler in der Probe anhand einer Pufferlösung pH 8,0 ( $c = 25 \text{ mmol/L}$  Tris-Cl) ( $n=4 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-17:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 1 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-18:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 2 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-19:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 3 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-20:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 4 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-21:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 5 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-22:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der VPA-Derivate aus Gruppe 6 und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-23:** Einfluss auf die Entwicklungsreaktion des HDAC-Enzym-Assays durch ausgewählte VPA-Derivate ( $n=4 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-24:** Einfluss auf die Entwicklungsreaktion des HDAC-Enzym-Assays durch 2-Hydroxy-2-Propyl-Pentansäure ( $n=4 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 4-25:** Kalibrierfunktion von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure mit  $f(x) = 0,0021 * x - 0,0015$ ;  $r^2 = 0,998$ .
- Abbildung 4-26:** Chromatogramm einer Blindwertprobe von Humanplasma. Kein Störpeak zum Elutionszeitpunkt des Analyten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure von  $t = 16,2$  Minuten.
- Abbildung 4-27:** Chromatogramm einer Blindwertprobe von Maus-Leber. Ein quantifizierbarer Störpeak zum Elutionszeitpunkt des Analyten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure ( $t = 16,2$  Minuten) von  $16 \mu\text{g/mL}$ .
- Abbildung 4-28:** Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven dreier Mausstämmen nach s.c. Gabe einer Dosis von  $1,5 \text{ mmol/kg}$  S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.
- Abbildung 4-29:** Konzentrations-Zeit-Kurve von Plasma und Gehirnen des NMRI-Mausstammes nach s.c. Gabe von  $1,5 \text{ mmol/kg}$  S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.
- Abbildung 4-30:** Konzentrations-Zeit Verlauf in unterschiedlichen Organen der NMRI-Maus nach s.c. Dosis von  $1,5 \text{ mmol/kg}$  S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.
- Abbildung 4-31:** Chromatogramm einer NMRI-Plasmaprobe 2 Stunden nach i.p. Dosis von  $1,5 \text{ mmol/kg}$  S-2-Pentyl-4-Pentinsäure.

- Abbildung 4-32:** Chromatogramm einer Mausplasmaprobe mit ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinsäure (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Abbildung 4-33:** Kalibrierfunktion von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure mit  $f(x) = 0,0035 \cdot x + 0,0033$ ;  $r^2 = 0,997$ .
- Abbildung 4-34:** Chromatogramme einer Blindwertproben aus Humanplasma, kein Störpeak zum Zeitpunkt der Elution von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure von 20,00 Minuten.
- Abbildung 4-35:** Chromatogramme einer Blindwertproben aus Maus-Leber, kein Störpeak zum Zeitpunkt der Elution von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure von 20,00 Minuten.
- Abbildung 4-36:** Konzentrations-Zeit-Kurve von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach intraperitonealer Dosisgabe von 0,8 mmol/kg in NMRI Mäusen in Plasma und Gehirn.
- Abbildung 4-37:** Chromatogramm einer NMRI-Mausplasmaprobe 30 min nach i.p. Applikation von 0,80 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure.
- Abbildung 4-38:** Chromatogramm einer Mausplasmaprobe von ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure ( $c = 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Abbildung 4-39:** Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure und ihres Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinkarbonsäure nach intraperitonealer Dosis von 0,8 mmol/kg
- Abbildung 4-40:**  $\alpha$ -Oxidationsprozess der Phytansäure und Hypothese einer möglichen Metabolisierung von  $\beta$ -verzweigten VPA-Derivaten in Analogie hierzu (ergänzt nach CASTEELS 2003).
- Abbildung 4-41:** Chromatogramm einer Plasmaprobe von NMRI-Mäusen nach intraperitonealer Behandlung mit 1,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure.
- Abbildung 4-42:** Ausschnittsvergrößerung des Chromatogramms zeigt das Metabolitensignal mit der größten Plasmakonzentration bei 16,05 min nach Applikation von 0,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure im Vergleich zu zwei Plasmaproben unbehandelter Tiere.
- Abbildung 4-43:** Untergrundkorrigiertes Massenspektrum des Metaboliten mit der größten Plasmakonzentration nach Dosisgabe von 1,25 mmol/kg 3-Propyl-Heptansäure in NMRI Mäusen (TMS Derivat).
- Abbildung 4-44:** Strukturvorschlag für den beobachteten Metaboliten von 3-Propyl-Heptansäure.
- Abbildung 4-45:** Lineare Korrelation der teratogenen Potenz ausgewählter Valproinsäure-Analoga mit ihren intrinsischen logarithmierten Halbwirkkonzentrationen an HDAC Enzymen -  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$ .  $r^2=0,89$ , Konfidenzintervall 95 %
- Abbildung 4-46:** Auswahl geeigneter Strukturderivate der beiden bekannten teratogenen Substanzen Thalidomid und all-trans-Retinsäure.
- Abbildung 4-47:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit teratogenen und nicht-teratogenen Derivaten von Vitamin A und Thalidomid.
- Abbildung 4-48:** Strukturen der untersuchten Fettsäuren und konjugierten Linolsäuren mit Potenzial zur HDAC-Inhibition.
- Abbildung 4-49:** Proteinstatus der F9 Zellkultur an hyperacetyliertem Kernhiston H4 ( $^{\text{Ac}}\text{H}_4$ ) nach Behandlung mit Fettsäuren, konjugierten Linolsäuren und oxidativen Abbauprodukten der CLAs.
- Abbildung 4-50:** Dosis-HDAC-Inhibierungs-Kurven der positiv getesteten Liponsäuren, konjugierten Linolsäuren und der Furanfettsäure und Angabe der  $\text{IC}_{50}(\text{HDAC})$  nach iterativer Datenanpassung ( $n=3 \pm \text{SD}$ ).
- Abbildung 6-1:** Syntheschema zur Darstellung von Hydroxamsäuren aus den korrespondierenden Karbonsäuren mittels Säurechloriden (Levi et al. 1997).
- Abbildung 6-2:** Strukturformel von Valproinhydroxamsäure,  $M_{\text{W}}=159,23 \text{ g/mol}$ .
- Abbildung 6-3:** Strukturformel von ( $\pm$ )-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure,  $M_{\text{W}}=183,25 \text{ g/mol}$ .

- Abbildung 6-4:** Strukturformel von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure,  $M_W=183,25$  g/mol.
- Abbildung 6-5:** Strukturformel von R-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure,  $M_W=183,25$  g/mol.
- Abbildung 6-6:** Derivatisierungsschema zur Bestimmung der chemischen Reinheit von Valproinsäureanaloga.
- Abbildung 6-7:** Derivatisierungsschema zur Bestimmung der optischen Reinheit von Karbonsäure- und Hydroxamsäureanaloga der Valproinsäure.
- Abbildung 6-8:** Formel zur Berechnung des Enantiomerenüberschusses (enantiomeric excess, %ee).
- Abbildung 6-9:** Formel zur Berechnung des spezifischen Drehwertes  $\alpha$  ausgehend von dem experimentell bestimmten Drehwinkel bei 20 °C.
- Abbildung 6-10:** Mathematische Funktion zur Anpassung der Enzymdaten an die sigmoide Inhibierungskurve.
- Abbildung 6-11:** Graphische Darstellung der computerberechneten Inhibitionsfunktion durch Valproinsäure;  $IC_{50}(HDAC)$ : 398  $\mu\text{mol/L}$  (SE: 50  $\mu\text{mol/L}$ ).
- Abbildung 6-12:** Formel zur Bestimmung der Analytkonzentration anhand einer GC-NPD Analyse.

### 8.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2-1:** Pharmakokinetische Parameter von Valproinsäure in Mensch und Maus (LÖSCHER AND NAU 1985; LEVY AND SHEN 1995)
- Tabelle 2-2:** Fehlfunktionen im Bereich des Acetylierungsgleichgewichtes der Kernhistone und hiermit assoziierte Krankheitsbilder.
- Tabelle 4-1:** Reproduktionstoxische Untersuchung zweier enantiomerer Hydroxamsäurederivate der Valproinsäure (R- und S-2-Pentyl-4-Pentihydroxamsäure).
- Tabelle 4-2:** Entscheidungskriterien zur Graduierung des teratogenen Potentials von Valproinsäurederivaten anhand von Untersuchungen im NMRI-Exencephalie-Maus-Modell nach Nau et al. (NAU et al. 1981).
- Tabelle 4-3:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 1 (a: GRAVEMANN 2002, b: BOJIC et al. 1996).
- Tabelle 4-4:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 2 (a: BOJIC et al. 1998, b: BOJIC et al. 1996, c: HAUCK AND NAU. 1990).
- Tabelle 4-5:** Teratogenes Potential der VPA Derivate aus Gruppe 3 (a: NAU AND LÖSCHER 1986, b: BOJIC et al. 1996, c: ELLERBECK et al. 1998, d: RADATZ et al. 1999).
- Tabelle 4-6:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 4 (a: VOLLAND 2002, b: HAUCK et al. 1992).
- Tabelle 4-7:** Teratogenes Potenzial der VPA-Derivate aus Gruppe 5 (a: RADATZ et al. 1998, b: VOLLAND 2002).
- Tabelle 4-8:** Teratogenes Potenzial von VPA-Derivaten der Gruppe 6 (a: VOLLAND 2002, b: Dr. K. Hoffmann – mündliche Mitteilung, c: GRAVEMANN 2002).
- Tabelle 4-9:** Probenblindwerte und Wiederfindungsraten von derivatisierter S-2-Propyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen Matrices von Mensch und Maus.
- Tabelle 4-10:** Zusammenfassung der Wiederfindung von S-2-Propyl-4-Pentinsäure in Abhängigkeit der Matrix.
- Tabelle 4-11:** Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit bei Analyse von derivatisierter S-2-Propyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen tierischen und humanen Matrices.
- Tabelle 4-12:** Mittlere Tag-zu-Tag Wiederfindung (day-to-day repeatability) und mittlerer Variationskoeffizient von derivatisierter S-2-Propyl-4-Pentinsäure in verschiedenen Matrices.
- Tabelle 4-13:** Proteinbindungsraten von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in Mensch und Maus.
- Tabelle 4-14:** Zeitabhängige Plasmakonzentrationen nach s.c. Gabe einer Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in drei Mausstämmen (n=3 ± SD).
- Tabelle 4-15:** Pharmakokinetische Parameter nach s.c. Gabe von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure in drei Mausstämmen (Non-compartment-Analyse).
- Tabelle 4-16:** Plasma- und Gehirnkonzentrationen von S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nach Gabe von 1,5 mmol/kg in drei verschiedenen Mausstämmen.
- Tabelle 4-17:** Vergleich der maximal Konzentrationen in den Geweben der untersuchten Mausstämmen nach Dosis von 1,5 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinsäure zum angegebenen Zeitpunkt.
- Tabelle 4-18:** Probenblindwerte und Wiederfindungsraten von S-2-Propyl-4-Pentihydroxamsäure aus unterschiedlichen Matrices.

- Tabelle 4-19:** Durchschnittliche Wiederfindung und Variationskoeffizient von S-2-Propyl-4-Pentinhydroxamsäure in Abhängigkeit der Probenmatrix.
- Tabelle 4-20:** Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit und Verfahrensvariationskoeffizienten bei Analyse von S-2-Propyl-4-Pentinsäure aus unterschiedlichen humanen und tierischen Matrices.
- Tabelle 4-21:** Durchschnittliche Tag-zu-Tag Wiederfindung und Variationskoeffizienten von S-2-Propyl-4-Pentinhydroxamsäure in Abhängigkeit der Matrix.
- Tabelle 4-22:** Bestimmung der Adsorptionsrate von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure an unterschiedlichen Extraktionsmembranen (n=4).
- Tabelle 4-23:** Plasmaproteinbindungsrate von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure bei Mensch und Maus (n=4).
- Tabelle 4-24:** Konzentrations-Zeit-Werte von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach intraperitonealer Dosis von 0,8 mmol/kg in Plasma und verschiedenen Geweben der NMRI-Maus (n=3).
- Tabelle 4-25:** Pharmakokinetische Parameter von S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure nach i.p. Behandlung von NMRI-Mäusen mit 0,8 mmol/kg.
- Tabelle 4-26:** Konzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten S-2-Pentyl-4-Pentinsäure nach intraperitonealer Dosisgabe von 0,8 mmol/kg S-2-Pentyl-4-Pentinhydroxamsäure in NMRI Mäusen (n=3 Tiere).
- Tabelle 6-1:** Entscheidungskriterien zur Graduierung des teratogenen Potentials von Valproinsäurederivaten anhand von Untersuchungen im NMRI-Exencephalie-Maus-Modell nach Nau et al. (NAU et al. 1981).
- Tabelle 6-2:** Dosis-Exencephalie-Werte der Beispielsubstanzen zur Graduierung des teratogenen Potentials (a: RADATZ et al. 1998, b: BOJIC et al. 1998, c: NAU AND LÖSCHER 1986; d: VOLLAND 2002, e: Lösemittel Cremophor EL 25 % (v/v)).
- Tabelle 6-3:** Konzentrations-Fluoreszenzwerte der Valproinsäure als Testsubstanz im HDAC-Enzymassay und die Umrechnung in Prozent Enzymaktivität anhand der Enzymaktivität von Trichostatin A (c = 200 nmol/L) in Relation zur Kontrolle (n=3).

## 8.4 Lebenslauf

- seit 03/2002 **Wissenschaftlicher Angestellter** (Doktorand) am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Prof. Dr. Dr. h.c. H. Nau)
- 08/2000 – 02/2002 **Wissenschaftlicher Angestellter** am Institut für Analytische Chemie der Universität Gießen (Prof. Dr. B. Spengler)
- 04/2000 – 05/2000 **Industriepraktikum** THC-Pharm GmbH, FFM  
Arzneistoffanalytik und Qualitätskontrolle von Cannabinoiden
- 10/1994 – 03/2000 **Studium der Chemie** (Diplom) an der Philipps Universität Marburg  
03/2000 **Abschluss: Diplom-Chemiker**
- 04/1999 – 03/2000 **Diplomand** am Institut für Kernchemie der Universität Marburg (Prof. Dr. H. Jungclas)
- 06/1999 – 12/1999 **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Zentrum für Kinderheilkunde der Uniklinik Marburg
- 04/1999 - 06/1999 **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Fachbereich Chemie der Universität Marburg
- 08/1997 – 09/1997 **Industriepraktikum** Degussa AG, FFM
- 04/1997 - 06/1997 **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Fachbereich Chemie der Universität Marburg
- 10/1996 **Abschluss: Chemie-Vordiplom**
- 07/1993 – 10/1994 Zivildienst im Kinder- und Jugendheim Marienfrieden Arnberg
- 08/1984 – 06/1993 Städt. Franz-Stock-Gymnasium Arnberg  
06/1993 **Abschluss: Abitur**

## 8.5 Publikationsliste

Eickholt B.J., Towers G.J., Ryves W.J., Eikel D., Adley K., Ylinen L.M.J., Chadborn N.H., Harwood A.J., Nau H., Williams R.S.B.

Distinguishing inositol (1,4,5) triphosphate depletion, teratogenic, GSK-3-inhibition and viral replication effects of valproic acid derivatives – A screening approach for new bipolar disorder drugs based on the valproic acid core structure.

Molecular Pharmacology **2005** 67(5) 1426-1433

Michaelis M., Kohler N., Reinisch A., Eikel D., Gravemann U., Doerr H.W., Nau H., Cinatl J. Jr. Increased human cytomegalovirus replication in fibroblasts after treatment with therapeutical plasma concentrations of valproic acid.

Journal of Biochemical Pharmacology **2004** 68(3) 531-538

Eikel D., Lampen A., Nau H.

Histondeacetylases are new molecular targets whose inhibition can cause birth defects: Evidence from structure-activity relationship of valproic acid derivatives.

Reproductive Toxicology **2004** (18) 723-724

Eikel D., Hoffmann K., Lampen A., Nau H.

Hydroxamic acid derivatives of valproic acid: Histondeacetylase inhibition and pharmacokinetic profiles in mice.

Reproductive Toxicology **2004** (18) 724-725

Lampen A., Voss, J., Leifheit, M., Eikel, D., Nau, H. Molecular and cellular effects of conjugated linoleic acids (CLAs) in enterocytes: Effects on proliferation, differentiation, and gene expression. 55. Mosbacher Kolloquium **2004**; How nutrients influence gene activity. 1-4 April, 2004.

Eucker J., Eikel D., Heider U., Jakob C., Zavrski I., Gatz F., Mergenthaler H.G., Jungclas H., Possinger K., Sezer O.

Liposomal daunorubicin (DaunoXome) in multiple myeloma: a modified VAD regimen using short-term infusion.

Anticancer Drugs **2003** 14(10) 793-799

## 8.6 Erklärung zur wissenschaftlichen Arbeit

Ich erkläre hiermit, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### **Struktur-Teratogenitäts-Studien von Valproinsäure-Analoga**

<sup>3</sup>/<sub>4</sub>

Inhibierung von Histondeacetylasen und  
Pharmakokinetik ausgewählter Derivate im Mausmodell

selbstständig verfasst habe und keine anderen als die genannten und zitierten Hilfsmittel und Quellen herangezogen habe. Die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen und Personen sind vollständig und namentlich angegeben.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist. Sie ist in diesem Sinne auch noch nicht anderweitig veröffentlicht worden. Bisherige Teilveröffentlichungen sind gemäß den Bestimmungen der Ordnung für die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften an der Universität Hannover erfolgt und unter 8.5 vollständig aufgeführt.

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 8.7 Danksagungen

Im Verlaufe dieser Arbeit durfte ich von vielen Menschen persönlich und fachlich lernen, die alle zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Den folgenden Personen möchte ich namentlich danken, gleichwohl auch allen anderen mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau danke ich dafür, dass er mir das vorliegende Thema anvertraut hat und mir bei der Bearbeitung dieses spannenden Projektes jede Freiheit gewährt hat. Durch seine wohlwollende und konstruktive wissenschaftliche Förderung und durch seinen angenehmen Führungsstil hatte ich die Gelegenheit mich fachlich und persönlich weiterzuentwickeln.

Prof. Dr. Carla Vogt und Priv.-Doz. Dr. Nina Ullrich danke ich für die Bereitschaft zur Durchführung des Promotionsverfahrens an der Universität Hannover, für die Begutachtung dieser Arbeit und das gezeigte Interesse am Thema.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. R.S.B. Williams (University College London), Prof. Dr. J. Cinatl Jr. (Universität Frankfurt), Dr. M. Michaelis (Universität Frankfurt) und Priv.-Doz. Dr. O. Witt (Universitätskinderklinik Göttingen) für die erfolgreichen wissenschaftlichen Kooperationen. Insbesondere danke ich Dr. Gaby Rönndahl (Universitätskinderklinik Göttingen) für den Crashkurs im Western-Blotting.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Lebensmitteltoxikologie. Insbesondere danke ich Priv.-Doz. Dr. Gerd Hamscher für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft in analytischen Fragen, Priv.-Doz. Dr. Dr. Alfonso Lampen für Hilfestellungen in Fragen der Zellkultur sowie besonders Dr. Katrin Hoffmann und Karolin Zoll für die Bereitschaft zur Durchführung der Tierversuche. Dank auch an Frau Ulrike Oberjatzas für ihren Beistand bei der Überwindung so mancher bürokratischer Hürden und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für das angenehme Arbeitsklima.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung in der Zeit meines Studiums und meinem Bruder Joachim sowie Dr. Steffen Happel für die Durchsicht des Manuskripts. Ein herzliches Dankeschön an Mona Pohen, die auch in anstrengenden Zeiten immer an meiner Seite gestanden hat.