

Sphingolactone

DOI: 10.1002/ange.200501983

Sphingolactone: selektive und irreversibel wirkende Inhibitoren der neutralen Sphingomyelinase

Veit Wascholowski und Athanassios Giannis*

Sphingolipide sind wichtige Bausteine der Plasmamembranen eukaryontischer Zellen. In den letzten Jahren haben immer mehr Metabolite der Sphingolipide Interesse geweckt, da sie vielfältige biologische Wirkungen aufweisen und darüber hinaus als sekundäre Botenstoffe fungieren könnten.

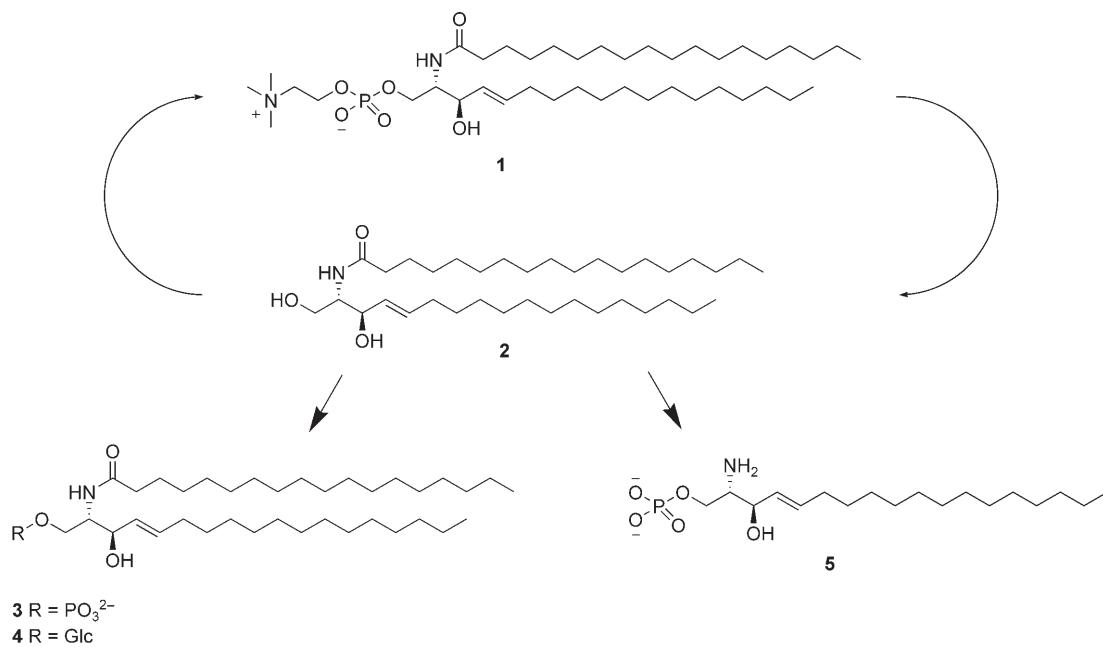
Dem primären Sphingomyelin (**1**)-Kataboliten Ceramid (**2**), der durch die enzymatische Aktivität von Sphingomyelinasen entsteht, wird eine entscheidende Rolle in der Zellregulation, bei der Steuerung von Entzündungsprozessen sowie beim programmierten Zelltod (Apoptose) zugesprochen.^[1-5] Zudem ist Ceramid in der Lage, direkt oder indirekt verschiedene Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren.^[1] Die Kontrolle dieser biologischen Effekte wird über eine Regulation der intrazellulären Ceramid-Konzentration erreicht. Diese erfolgt durch die Enzyme der Ceramid-Biosynthese, aber auch durch die Weiterreaktion von Ceramid zu komplexeren Sphingolipiden, wie Ceramid-1-phosphat (**3**), komplexen Glycosphingolipiden (**4**) und Sphingosin-1-phosphat (**5**).^[1]

Seit einigen Jahren wird vermutet, dass die Hydrolyse von Sphingomyelin entscheidend für die Bildung des biologisch wirksamen Ceramids ist. Im streng regulierten Sphingomyelin-Zyklus^[1-3,6] (Schema 1) wird Sphingomyelin durch eine saure Sphingomyelinase (A-SMase) oder eine membranständige neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) zu Ceramid

[*] Dipl.-Chem. V. Wascholowski, Prof. Dr. A. Giannis
Institut für Organische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-973-6599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



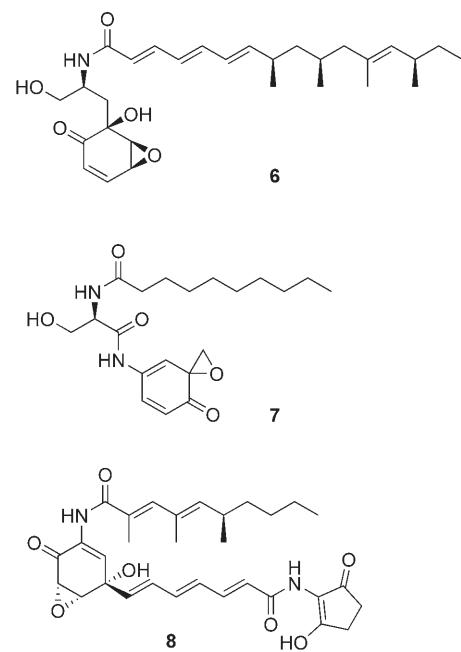
Schema 1. Der Sphingomyelin-Zyklus. Sphingomyelin (**1**) wird durch Sphingomyelinasen zu Ceramid (**2**) umgesetzt. Dieses steht im metabolischen Gleichgewicht mit Ceramid-1-phosphat (**3**), komplexen Glycosphingolipiden (**4**; z.B. Glc = Glucose) und Sphingosin-1-phosphat (**5**).

umgesetzt. Verschiedene Cytokine, wie Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β , Interferon- γ , sowie Strahlung, Hitze, oxidative Agentien, Vitamin D₃ und NO können die Sphingomyelinasen aktivieren.^[3,4]

Zahlreiche Aspekte, vor allem im Hinblick auf Mechanismus und Regulation der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion sowie insbesondere die Rolle von Ceramid bei der Apoptose, sind noch umstritten.^[3-7] Auch die Identität der Sphingomyelinase, die für die Stimulus-induzierte Ceramid-Freisetzung zuständig ist, wird kontrovers diskutiert.^[3,8-11] Der membranständigen N-SMase, die einer physiologischen Regulation durch Glutathion und Arachidonsäure unterliegt, wird eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion beigemessen.^[1,3]

Zur Klärung der biologischen Funktion von Ceramid und den Sphingomyelinasen sind vor allem potente und selektive Inhibitoren notwendig. Zwar ist eine Reihe von N-SMase-Inhibitoren bekannt,^[12,13] für solche Zwecke wurden bisher allerdings weitgehend Scyphostatin (**6**),^[12b,c,g] das Spiroepoxid **7**^[13a,b] und Manumycin A (**8**)^[12a] sowie seine einfacheren Analoga verwendet (Schema 2).^[14] Alle diese Verbindungen enthalten jedoch reaktive Epoxidgruppen, die mit einer Vielzahl weiterer Proteine kovalent wechselwirken und damit die Interpretation zellbiologischer Experimente erschweren können. Wir berichten hier über die Entwicklung einer neuartigen Klasse von potenteren, selektiven und Epoxid-freien Inhibitoren der neutralen Sphingomyelinase, die wir Sphingolactone nennen möchten.

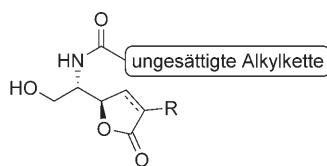
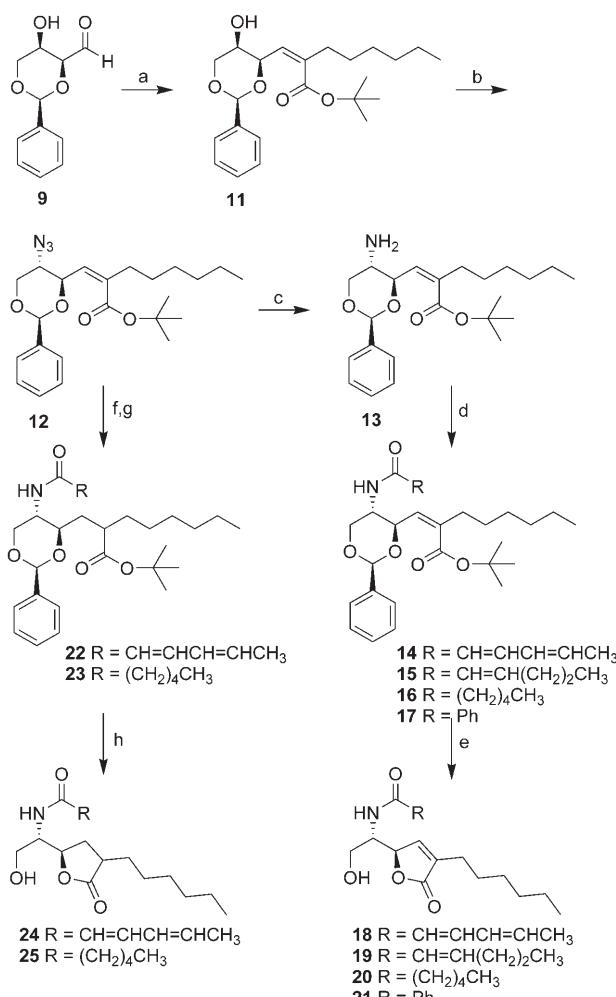
Beim Entwurf der Inhibitoren ließen wir uns von den folgenden Fakten leiten: Sowohl **6** als auch **8** enthalten jeweils eine mehrfach ungesättigte Fettsäure als Strukturelement. Weiterhin zeigen synthetische Manumycin-Analoga mit ungesättigten Carbonsäuren im Amidteil eine höhere Affinität zur N-SMase als solche mit gesättigten Fettsäureketten.^[12a]



Schema 2. Scyphostatin (**6**), Spiroepoxid **7** und Manumycin A (**8**).

Darüber hinaus wussten wir aus unseren eigenen Untersuchungen, dass bei **7** die primäre Hydroxygruppe für die inhibitorische Aktivität essenziell ist.^[13c] Als Ersatz für die reaktiven Epoxid-haltigen Systeme wählten wir mit dem γ -Butyrolacton-Grundgerüst eine privilegierte Struktur, die in biologisch aktiven Molekülen ein immer wiederkehrendes Strukturmotiv^[15] darstellt. Abbildung 1 zeigt den gesuchten Inhibitor.

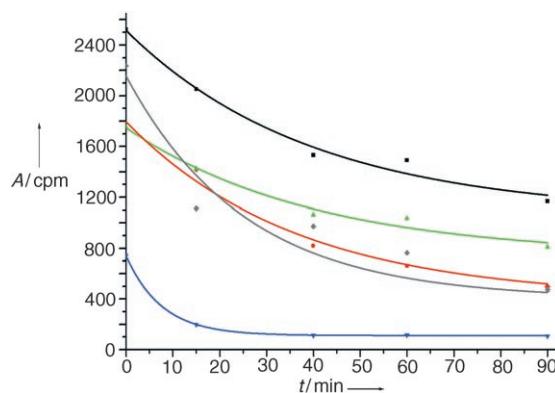
Die Synthese (Schema 3) beginnt mit der Umsetzung von 2,4-O-Benzyliden-D-threose (**9**), die einfach durch Periodat-

**Abbildung 1.** Der gesuchte Inhibitor.

spaltung aus 4,6-O-Benzyliden-D-galactose zugänglich ist,^[16,17] mit dem entsprechend modifizierten Arylphosphonat **10**^[18] in der Ando-Variante^[19] der Horner-Wadsworth-Emmons(HWE)-Reaktion^[20] bei -78°C . Hierbei entstand das gewünschte Z-Isomer **11** im Verhältnis von 20:1 zum E-Isomer. Nach Azidaustausch und Reduktion wurde das so erhaltene Amin **13** mit verschiedenen Carbonsäurechloriden

zu den Amiden **14–17** umgesetzt. Bei der nachfolgenden Abspaltung der Schutzgruppen mit katalytischen Mengen para-Toluolsulfinsäure entstanden direkt die gewünschten Lactone **18–21**. Die Synthese von **24** und **25** erfolgte durch katalytische Hydrogenolyse von **12** mit Pd/C. Diese Reaktion ergab ein nicht trennbares Diastereomerengemisch im Verhältnis von 4:1. Die weitere Umsetzung zu den gewünschten Verbindungen **24** und **25** erfolgte analog der oben beschriebenen Synthese.

Die synthetisierten Verbindungen wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die N-SMase untersucht, wofür eine Mikrosomenpräparation der Mg^{2+} -abhängigen N-SMase aus Rattenhirn verwendet wurde. In der Tat inhibierten die Lactone **18**, **24** und **25** die N-SMase zeitabhängig (irreversibel; Abbildung 2). Ebenfalls wirksam waren die Derivate **19–21** (irreversible Inhibition; Daten nicht gezeigt).

**Abbildung 2.** Zeitabhängigkeit der Inhibition der neutralen Sphingomyelinase durch **18** (◊), **24** (▼) und **25** (●) (Endkonzentration: jeweils 350 μM). Hypothetischer Kurvenverlauf unter der Annahme einer reversiblen kompetitiven Inhibition durch **25**: ▲ Kontrolle; ■. A = Aktivität; cpm = Zählungen pro Minute; t = Vorinkubationszeit.^[22]

Im Anschluss daran untersuchten wir, welche funktionelle Gruppe der Inhibitoren für die irreversible Hemmung verantwortlich ist. Hierbei erwies sich das reduzierte Derivat **24** mit der elektrophileren Lactongruppe als noch potenterer Inhibitor als **18**. Dies deutet darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung direkt mit dem Lactonring zusammenhängt und nicht durch eine 1,4-Addition an das Michael-System von **18** zustande kommt. Die Tatsache, dass das gesättigte Lacton **25**, wie auch das Derivat **21**, die N-SMase immer noch irreversibel hemmt, stützt diese Hypothese. Des Weiteren zeigte sich, dass steigende Konzentrationen an Sphingomyelin die inhibitorische Wirkung von **24** abschwächen (Abbildung 3). Dies weist darauf hin, dass der Inhibitor **24** an das aktive Zentrum der N-SMase bindet. Unter den Bedingungen des Assays wurde die saure Sphingomyelinase vom Inhibitor **24** nur leicht kompetitiv und konzentrationsabhängig gehemmt (Abbildung 4).

Auch die N-Acylkette hat einen entscheidenden Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der Lactone. Insbesondere scheint das konjugierte System der (2E,4E)-Hexa-2,4-dienäsäure den Inhibitor **24** im aktiven Zentrum der N-SMase so zu positionieren, dass der Lactonring von einem bisher nicht

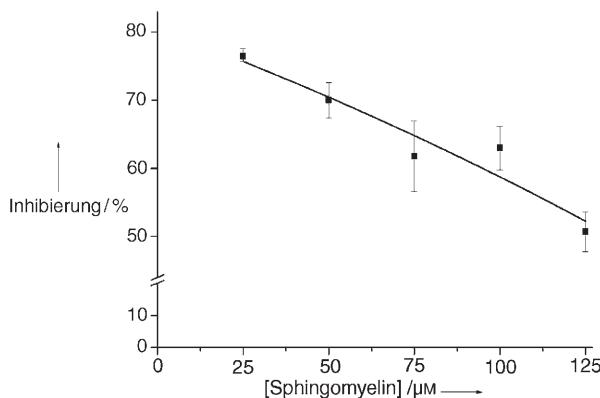


Abbildung 3. Inhibition der N-SMase bei unterschiedlichen Sphingomyelin-Konzentrationen (gemittelte Doppelbestimmung, bei einer Endkonzentration der Verbindung **24** von $350 \mu\text{M}$, ohne Vorinkubationszeit).^[22]

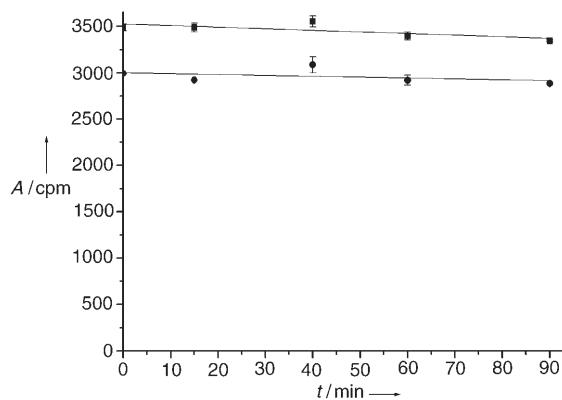


Abbildung 4. Effekt von **24** (●) auf die A-SMase (Endkonzentration: $350 \mu\text{M}$). Kontrolle: ■.^[22]

identifizierten Nucleophil des Enzyms angegriffen werden kann.

Die hier entwickelten selektiven N-SMase-Inhibitoren, die wir Sphingolactone nennen, zeichnen sich durch ihre hohe Potenz aus. Als der stärkste Inhibitor hat sich dabei Lacton **24** herausgestellt. Anders als die bisher bekannten N-SMase-Inhibitoren **6–8** sind die Sphingolactone stabil und tragen keine Epoxidfunktionen. Sie sind daher wertvolle chemische Hilfsmittel für die Untersuchung der biologischen Bedeutung des Ceramids und der N-SMase z.B. bei der Apoptose, Entzündungsreaktionen, malignen Prozessen und neurodegenerativen Krankheiten, wie der Alzheimer-Erkrankung oder der multiplen Sklerose.^[1,21]

Eingegangen am 8. Juni 2005

Online veröffentlicht am 19. Dezember 2005

Stichwörter: Ceramid · Inhibitoren · Lactone · Signaltransduktion · Sphingomyelinase

[1] a) V. Wascholowski, A. Giannis, *Drug News Perspect.* **2001**, *14*, 581–590; b) B. Ogretmen, Y. A. Hannun, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616; c) A. Huwiler, T. Kolter, J. Pfeilschifter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1485*, 63–99; d) T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568.

- [2] D. K. Perry, Y. A. Hannun, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1463*, 233–243.
- [3] N. Marchesini, Y. A. Hannun, *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 27–44.
- [4] M. E. Venable, L. M. Obeid, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1439*, 291–298.
- [5] G. Liu, L. Oleine, R. L. Hébert, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1999**, *36*, 511–573.
- [6] Y. Hannun, R. Bell, *Science* **1989**, *243*, 500–507.
- [7] R. N. Kolesnick, M. Kronke, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 643–665.
- [8] K. Hoffmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 374–377.
- [9] R. Kolesnick, Y. A. Hannun, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 224–225.
- [10] D. K. Perry, Y. A. Hannun, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 226–227.
- [11] K. Hoffmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 227.
- [12] a) C. Arenz, M. Thutewohl, O. Block, H. Waldmann, H.-J. Altenbach, A. Giannis, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 141–143; b) F. Nara, M. Tanaka, S. Madsuda-Inoue, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 531–535; c) M. Inoue, W. Yokota, G. Murugesh, T. Izuhara, T. Katho, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4303–4305; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4207–4209; d) R. Uchida, H. Tomoda, Y. Dong, S. Omura, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 572–574; e) M. Tanaka, F. Nara, Y. Yamasato, S. Masuda-Inoue, H. Doi-Yoshioka, S. Kumakura, R. Enokita, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 670–673; f) M. Tanaka, F. Nara, Y. Yamasato, Y. Ono, T. J. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 827–830; g) F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 525–530; h) R. Uchida, H. Tomoda, M. Arai, S. Omura, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 882–889; i) S. F. Martin, C. Gómez-Díaz, P. Navas, J. M. Villalba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 581–586; j) Q. Zhou, M. R. Band, A. Hernandez, Z. L. Liu, F. A. Kummerow, *Life Sci.* **2004**, *75*, 1567–1577.
- [13] a) C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1498–1500; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1440–1442; b) C. Arenz, A. Giannis, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 137–140; c) C. Arenz, M. Gartner, V. Wascholowski, A. Giannis, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2901–2904; d) E. N. Pitsinos, V. Wascholowski, S. Karalioti, C. Rigou, E. A. Couladouros, A. Giannis, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1223–1225; e) C. Luberto, D. F. Hassler, P. Signorelli, Y. Okamoto, H. Sawai, E. Boros, D. J. Hazen-Martin, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, G. K. Smith, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41128–41139; f) R. A. Claus, A. Wüstholtz, S. Müller, C. L. Bockmeyer, N. H. Riedel, R. Kinscherf, H.-P. Deigner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 726–737; g) T. Hakogi, Y. Monden, S. Iwama, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2627–2630; h) T. Yokomatsu, H. Takechi, T. Akiyama, S. Shibuya, T. Kominato, S. Soeda, H. Shimeno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1277–1280; i) T. Hakogi, Y. Monden, M. Taichi, S. Iwama, S. Fujii, K. Ikeda, S. Katsumura, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4839–4846; j) C. C. Lindsey, C. Gomez-Diaz, J. M. Villalba, T. R. Pettus, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4559–4565; k) T. Yokomatsu, T. Murano, T. Akiyama, J. Koizumi, S. Shibuya, Y. Tsuji, S. Soeda, H. Shimeno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 229–236; l) M. Taguchi, K. Sugimoto, K.-I. Goda, T. Akama, K. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Tomishima, M. Nishiguchi, K. Arai, K. Takahashi, T. Kobori, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1963–1966; m) M. Taguchi, K.-I. Goda, K. Sugimoto, T. Akama, K. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Tomishima, M. Nishiguchi, K. Arai, K. Takahashi, T. Kobori, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3681–3684.
- [14] a) T. Numakawa, H. Nakayama, S. Suzuki, T. Kubo, F. Nara, Y. Numakawa, D. Yokomaku, T. Araki, T. Ishimoto, A. Ogura, T.

- Taguchi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41259–41269; b) K. Hanada, N. M. Palacpac, P. A. Magistrado, K. Kurokawa, G. Rai, D. Sakata, T. Hara, T. Horii, M. Nishijima, T. Mitamura, *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 23–34; c) M. Czarny, J. Liu, P. Oh, J. E. Schnitzer, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4424–4430; d) M. Czarny, J. E. Schnitzer, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2004**, *287*, H1344–H1352; e) R. Ramer, U. Weinzierl, B. Schwind, K. Brune, B. Hinz, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1189–1198; f) S. Falcone, C. Perrotta, C. De Palma, A. Pisconti, C. Sciorati, A. Capobianco, P. Rovere-Querini, A. A. Manfredi, E. Clementi, *J. Immunol.* **2004**, *173*, 4452–4463; g) R. Barsacchi, C. Perrotta, S. Bulotta, S. Moncada, N. Borgese, E. Clementi, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 886–895; h) L. M. Frago, S. Cañón, E. J. de la Rosa, Y. León, I. Varela-Nieto, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 475–486; i) S. F. Martín, C. Gómez-Díaz, P. Navas, J. M. Villalba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 581–586.
[15] a) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 96–112; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 94–110; b) A. G. González, M. H. Silva, J. I. Padrón, F. Léon, E. Reyes, M. Álvarez-Mon, J. P. Pivel, J. Quintana, F. Estévez, J. Bermejo, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2358–2361; c) F. P. Kuhajda, E. S. Pizer, J. N. Li, N. S. Mani, G. L. Frehywot, C. A. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3450–3454; d) H. M. Ogmundsdóttir, G. M. Zoëga, S. R. Gissurarson, K. Ingólfssdóttir, *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 107–115; e) A. Randazzo, C. Debitus, L. Minale, P. P. Garcia, M. J. Alcaraz, M. Paya, L. Gomez-Paloma, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 571–575; f) A. E. Mitchell, J. Zheng, B. D. Hammcock, M. Lo Bello, A. D. Jones, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6752–6759; g) A. Huwe, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2170–2187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2122–2138; h) M. Hirao, J. Posakony, M. Nelson, H. Hruby, M. Jung, J. A. Simon, A. Bedalow, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52773–52782; i) J. Posakony, M. Hirao, S. Stevens, J. A. Simon, A. Bedalow, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2635–2644; j) M. Biel, A. Kretsovali, E. Karatzali, J. Papamatheakis, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4065–4067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3974–3976; k) A. Kar, S. Gogoi, N. P. Argade, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5297–5302.
[16] E. G. Gros, V. Deulofeu, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3647–3656.
[17] P. Zimmermann, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 663–667.
[18] K. Ando, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4745–4749.
[19] K. Ando, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6815–6821.
[20] B. E. Maryanoff, A. B. Reitz, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863–927.
[21] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
[22] Die Angleichungskurven in den Abbildungen 2–4 wurden mit *Origin 6.0*, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, unter Zuhilfenahme der Funktionen „Fit-Sigmoid“ und „Fit-Linear“ erhalten.