

4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Darstellung und die Reaktionen von aktiven Stickstoffspezies mit DNA/RNA-Teilstrukturen hinsichtlich der beobachteten mutagenen Schädigungen der Erbsubstanz durch endo- oder exogen gebildetem Stickstoffmonoxid und seiner reaktiven Folgeprodukte zu untersuchen.

Diese pathologischen Veränderungen sind das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, das im Wesentlichen durch aktivierte Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen verursacht wird. Pathologisch bedeutsam ist die Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) aus Stickstoffmonoxid-Radikal¹ (NO) und dem *in vivo* ubiquitär durch die NADPH-Oxidase gebildeten Superoxid-anion-Radikal ($\text{O}_2^{\cdot -}$). Sowohl $\text{O}_2^{\cdot -}$ als auch NO gehören zu den reaktiven, instabilen Radikalen. Somit ist es nicht verwunderlich, daß sie äußerst schnell zu Peroxynitrit als Hauptreaktionsprodukt reagieren. Diese Reaktion läuft etwa dreimal schneller ab als die Dismutierung von $\text{O}_2^{\cdot -}$ durch Superoxiddismutase. Dies bedeutet, daß durch vermehrte $\text{O}_2^{\cdot -}$ -Bildung die physiologischen Funktionen von NO sehr ausgeprägt gehemmt werden können. Außerdem stellt Peroxynitrit ein starkes Oxidans dar, welches Zellmembranen durchdringen kann. Beim Zerfall des Peroxynitrit werden Nitrierungs- und Oxidationsreaktionen beobachtet. So stellt die Nitrierung von Tyrosin zum 3-Nitrotyrosin eine Markerreaktion für *in vivo* entstandenes Peroxynitrit dar.

Als allgemeine Überlegungen sind deshalb voranzustellen:

- Welche reaktiven Spezies werden für die durchzuführenden Reaktionen ausgewählt?
- Mit welchen DNA/RNA Teilstrukturen werden die Reaktionen durchgeführt?
- Entstehen eventuell mehrere Substanzen mit den reaktiven Spezies?
- Können Leitverbindungen für die durchgeführten Reaktionen gefunden werden?

¹ Stickstoffmonoxid ist im Grundzustand ein radikalisches Molekül (siehe Abbildung 1.2).

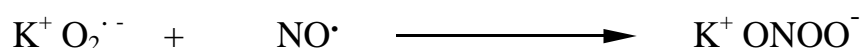
Bei der Auswahl der reaktiven Spezies muß vor allem das Stickstoffmonoxid als das biologisch aktive Molekül eingesetzt werden.

Eine weitere reaktive Spezies ist das Peroxynitrit, welches durch die hohe Geschwindigkeitskonstante bei der Bildung *in vivo* und seiner Reaktivität von großer Bedeutung bei Reaktionen mit DNA/RNA Teilstrukturen sein muß. Da für das Peroxynitrit auch Nitrierungsreaktionen beobachtet worden sind (siehe oben), ist der Vergleich der Reaktionsprodukte, wie sie aus der Reaktion von DNA/RNA Teilstrukturen mit Stickstoffdioxid oder Peroxynitrit entstehen, wichtig. Bilden sich sogar gleiche Reaktionsprodukte, sind zusätzlich Aussagen zu eventuell ablaufenden Zerfallsreaktionen des Peroxynitrit möglich. Außerdem wird bei der Reaktion von Peroxynitrit ein Zerfall unter Bildung von OH⁻- und NO₂⁻-Radikalen diskutiert, die dann die eigentlichen Reaktionspartner für die biologischen Zielstrukturen darstellen. Aus diesen Gründen wird neben Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit auch Stickstoffdioxid als reaktive Spezies verwendet.

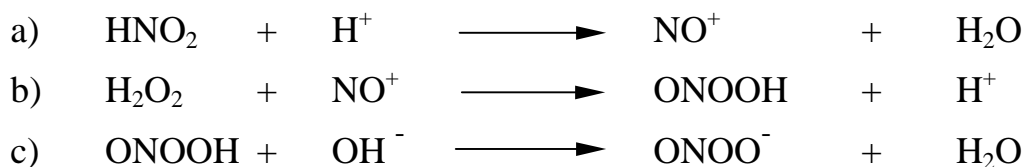
Als DNA/RNA Teilstrukturen bieten sich die entsprechenden Purin- und Pyrimidinbasen Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin an. So können im Einzelfall die Reaktionen der reaktiven Spezies mit den entsprechenden DNA/RNA-Bausteinen untersucht und anschließend miteinander verglichen werden.

Alle reaktiven Spezies (NO, NO₂ und ONOO⁻) wurden in höchst möglicher Reinheit zur Reaktion gebracht. Da Peroxynitrit im Gegensatz zu NO und NO₂ nicht käuflich erworben werden konnte, mußte es hergestellt werden. Aus der Vielzahl der in dieser Arbeit beschriebenen Möglichkeiten wurden die folgenden beiden Möglichkeiten im Labor etabliert. Aus der Reaktion 1 von Kaliumsuperoxid (KO₂) mit NO-Gas entsteht das chemisch reinere Peroxynitrit. Nachteil ist der hohe apparative und zeitliche Aufwand. Über Reaktion 2 lassen sich mit Hilfe eines „Quenched Flow“-Reaktors größere Mengen Peroxynitrit relativ schnell herstellen, wobei hohe Salzverunreinigungen durch die verwendeten Edukte in Kauf genommen werden müssen.

Reaktion 1: KO₂ mit NO-Gas unter Sauerstoffausschluß

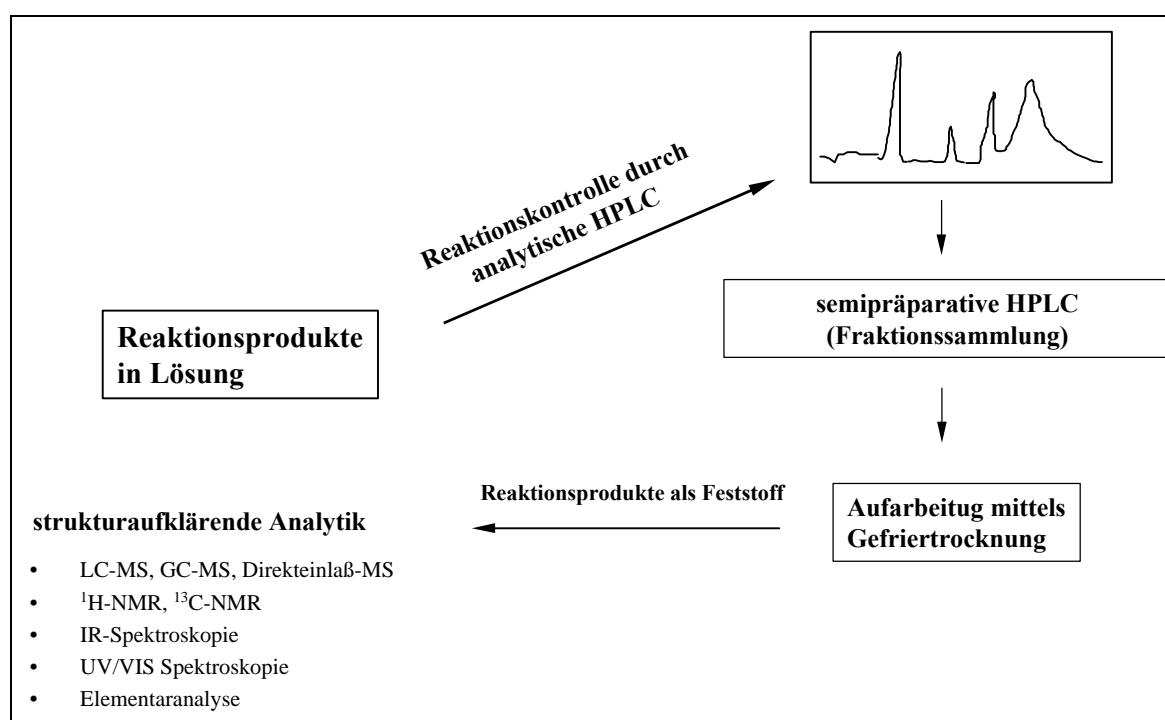


Reaktion 2: Wasserstoffperoxid mit salpetriger Säure im „Quenched Flow“-Reaktor



Nach Umsetzung der Purin- bzw. Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies konnte ein funktionsfähiges Modell zur Analytik der Reaktionsprodukte entwickelt werden. In der folgenden Abbildung ist der prinzipielle Ablauf schematisch dargestellt.

Abbildung 4.1



Die entstandenen Reaktionsprodukte sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt und könnten Endprodukte molekularer Mechanismen bei der Gentoxizität sein (Punktmutation). So ist erstmals das 8-Nitroguanin als Substanz und Marker zur DNA Schädigung durch Peroxynitrit überhaupt aufgeführt¹. Dies läßt sich nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit unter anderem auch auf Nitroverbindungen des Adenins erweitern.

¹ Cayman-Chemical Katalog 2000, ist jedoch noch nicht käuflich zu erwerben.

Abbildung 4.2 Reaktion der Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies

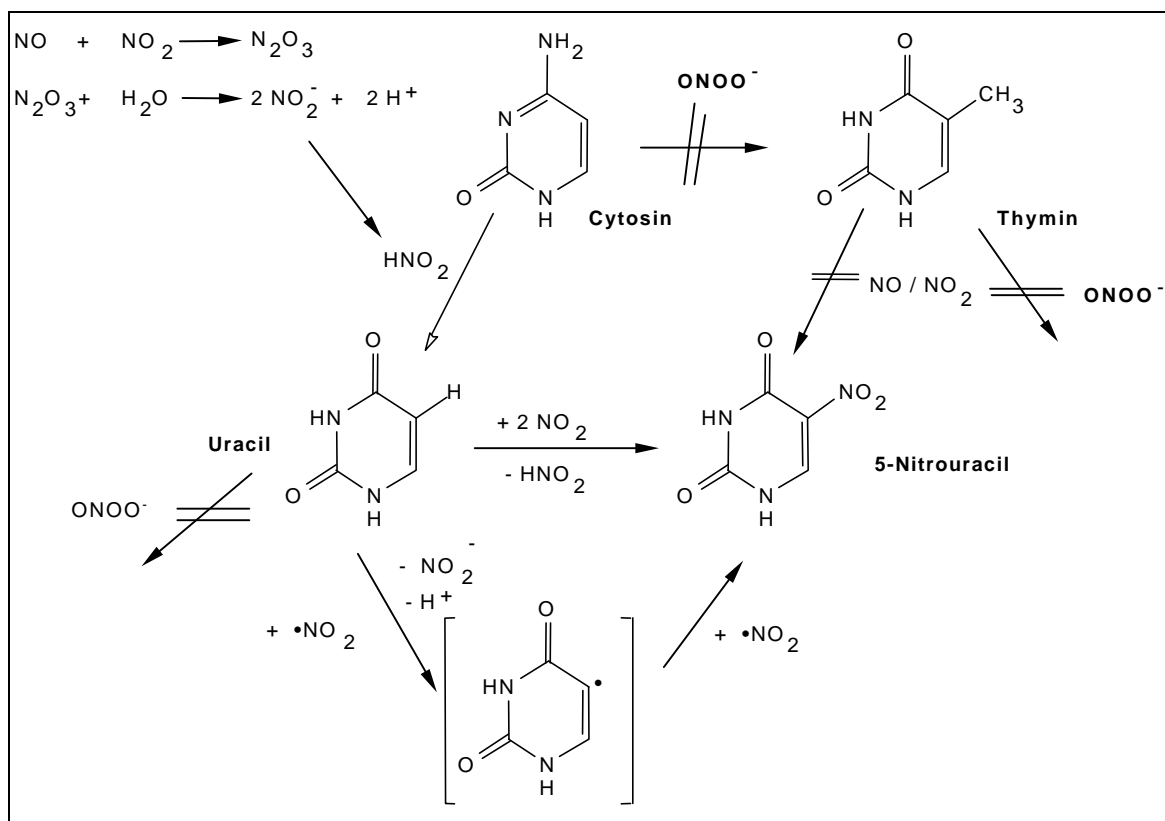
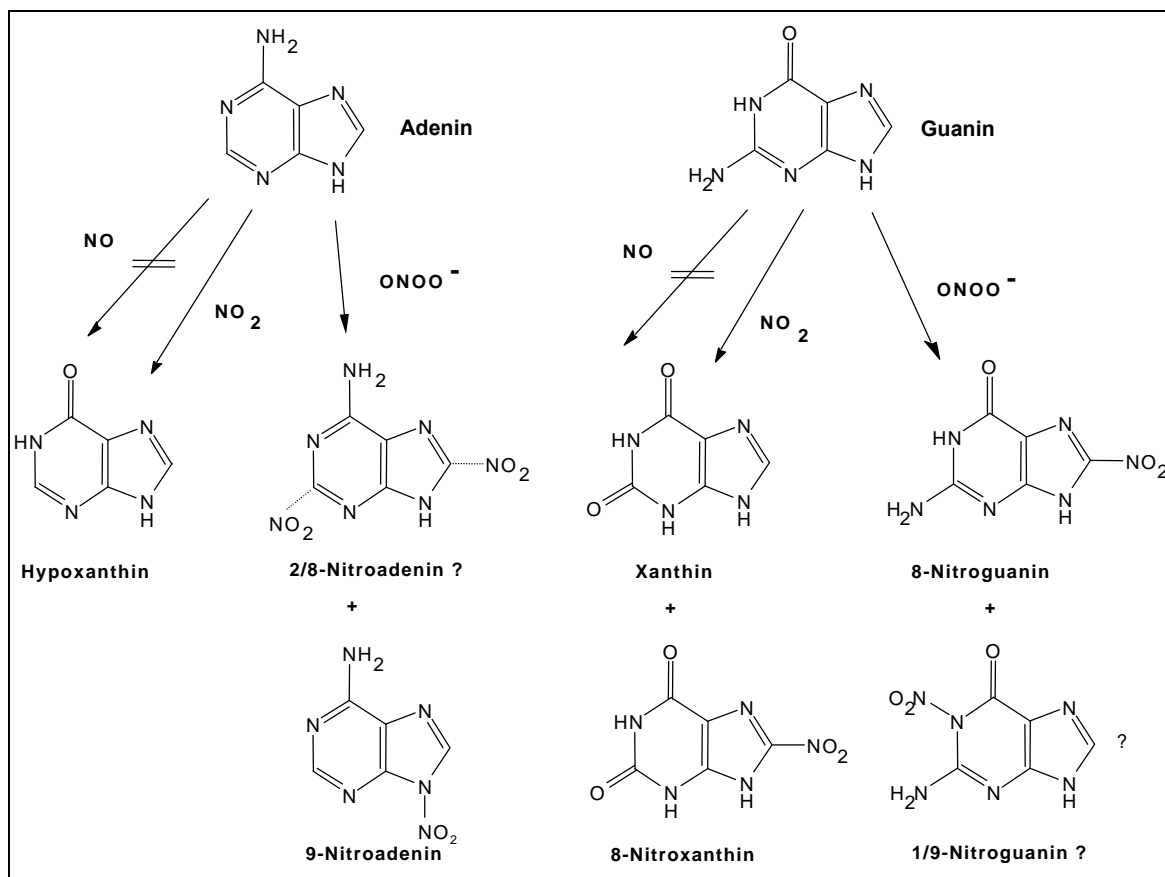


Abbildung 4.3 Reaktion der Purinbasen mit den reaktiven Spezies



5 Summary

The objective of this thesis was to investigate the preparation and reactions of active nitrogen species with partial DNA/RNA structures regarding observable mutagenic damages to genetic material by endogenically or exogenically generated nitrogen monoxide and its reactive intermediates and products. These pathologic changes are the result of a series of events caused mainly by active nitrogen and oxygen containing compounds. Pathologically important is the generation of peroxynitrite (ONOO^-) from nitrogen monoxide radicals¹ (NO) reacting with superoxide radical anions ($\text{O}_2^{\cdot -}$), with the latter being ubiquitous generated *in vivo* by NADPH-oxidase. $\text{O}_2^{\cdot -}$ as well as NO are known to be reactive and instable radicals. Therefore, a very fast reaction yielding peroxynitrite as the main product is not surprising. This reaction is about 3 times faster than the $\text{O}_2^{\cdot -}$ dismutation by superoxide dismutase. Accordingly, an increased $\text{O}_2^{\cdot -}$ formation is able to effectively prevent NO 's physiological functions. In addition, peroxynitrite is a strong oxidans with the ability to permeate cell membranes. During the decay of peroxynitrite, nitro-addition reactions and oxidations are observed. For instance, the nitro-addition to tyrosine yielding 3-nitrotyrosine is a marker reaction for *in vivo* generated peroxynitrite.

Therefore, the following questions can be raised:

- Which reactive species are chosen for the reactions under investigation?
- What partial DNA/RNA structures are likely targets for these reactions?
- Are there additional by-products and intermediates other than the reactive species?
- Is it possible to identify lead compounds for the reactions under investigation?

¹ Nitrogen monoxide in the ground state is a radical.

During selection of reactive species, nitrogen monoxide has to preferably be considered as the biologically active molecule.

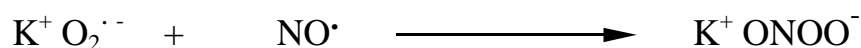
Peroxynitrite is a further reactive species of great importance, since it exhibits a high rate constant during its generation *in vivo* and because of its reactivity towards partial DNA/RNA structures. Since peroxynitrite also undergoes nitro-addition reactions (see above), a comparison of reaction products is important regarding reactions of nitrogen dioxide and peroxynitrite with partial DNA/RNA structures. In case of similar reaction products in both of these reactions, additional conclusions about possible decay reaction pathways can be drawn in order to clarify the still unknown fate of peroxynitrite during its decay. Furthermore, there exists the hypothesis of a peroxynitrite decay into OH⁻ and NO₂⁻ radicals, which will then in turn react with the biological targets.

Therefore, nitrogen dioxide is also chosen as a reactive species besides nitrogen monoxide and peroxynitrite.

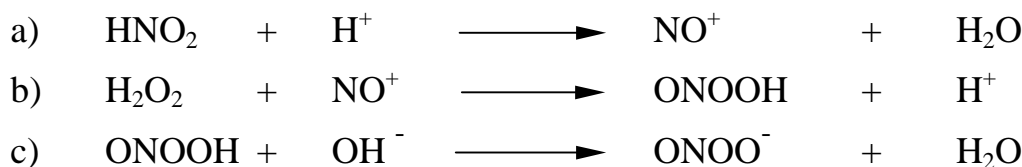
The purine and pyrimidine bases adenine, guanine, cytosine, uracil, and thymine are well suited as partial DNA/RNA structures. This way, the reactions of all reactive species with each DNA/RNA building block can be singled out, investigated and its results compared.

All reactive species (NO, NO₂, and ONOO⁻) were of highest possible purity. Peroxynitrite had to be prepared since it is not commercially available like NO and NO₂. From the multitude of possibilities to prepare peroxynitrite as described in this thesis, the following two synthetic routes were applied: The reaction of potassium superoxide (KO₂) with gaseous NO yields peroxynitrite of higher purity (less impurities, see reaction 1). Reaction 2 enables the relatively fast preparation of higher quantities by employing a quenched-flow reactor with the trade-off of high salt impurities caused by the educts.

Reaction 1: KO₂ reaction with gaseous NO under exclusion of oxygen

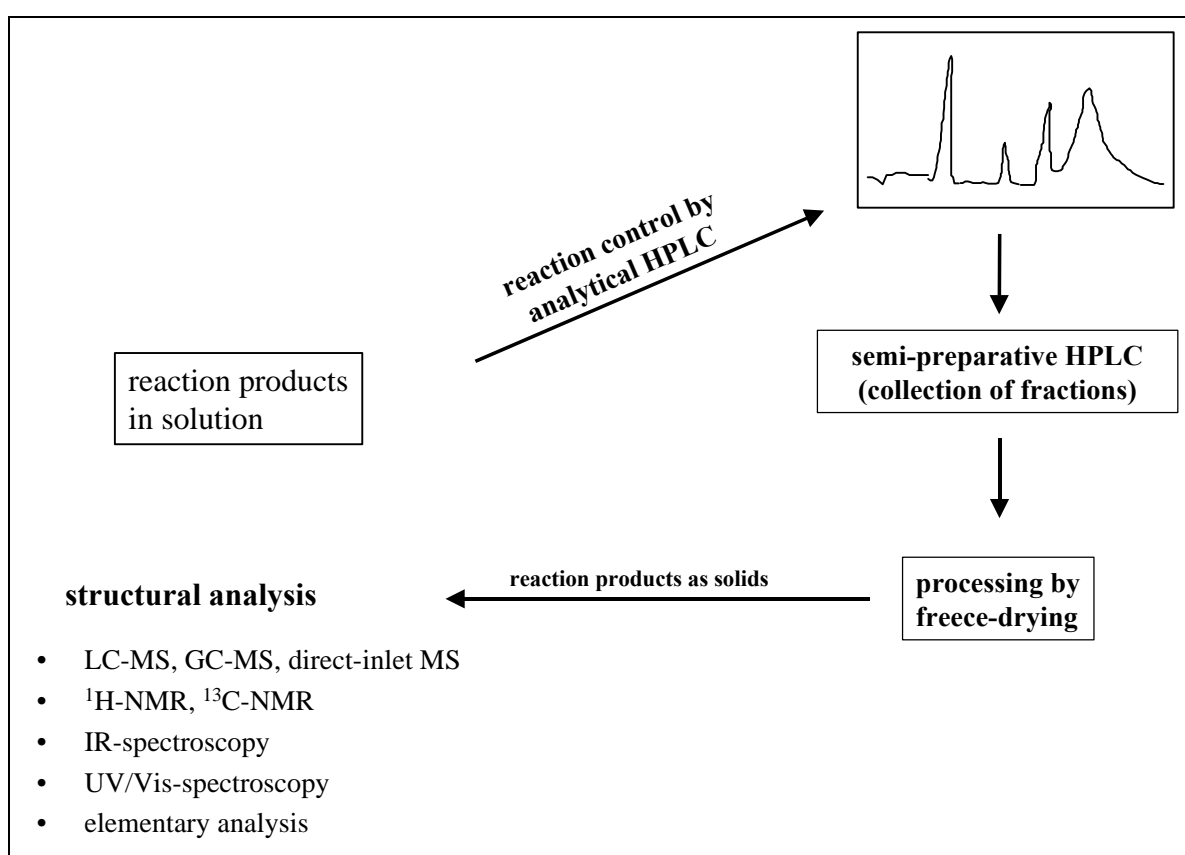


Reaction 2: Hydrogen peroxide reaction with nitrous acid in a quenched-flow reactor



A successful model was developed to analyse the reaction products of purine and pyrimidine bases with all reactive species. Figure 1 shows the schematics of this system.

Figure 1



All analytically characterized reaction products are shown in the two figures below (figure 2 and figure 3) and could constitute possible end products of molecular mechanisms during gene toxicity (point mutation). 8-Nitroguanine could be identified as a product and marker of peroxyxynitrite DNA damage for the first time¹. This conclusion can also be generalized for nitro compounds of adenine on the basis of the results of this work.

¹ Cayman-Chemical catalog 2000, not yet commercially available

Figure 2 Reactions of pyrimidine bases with reactive species

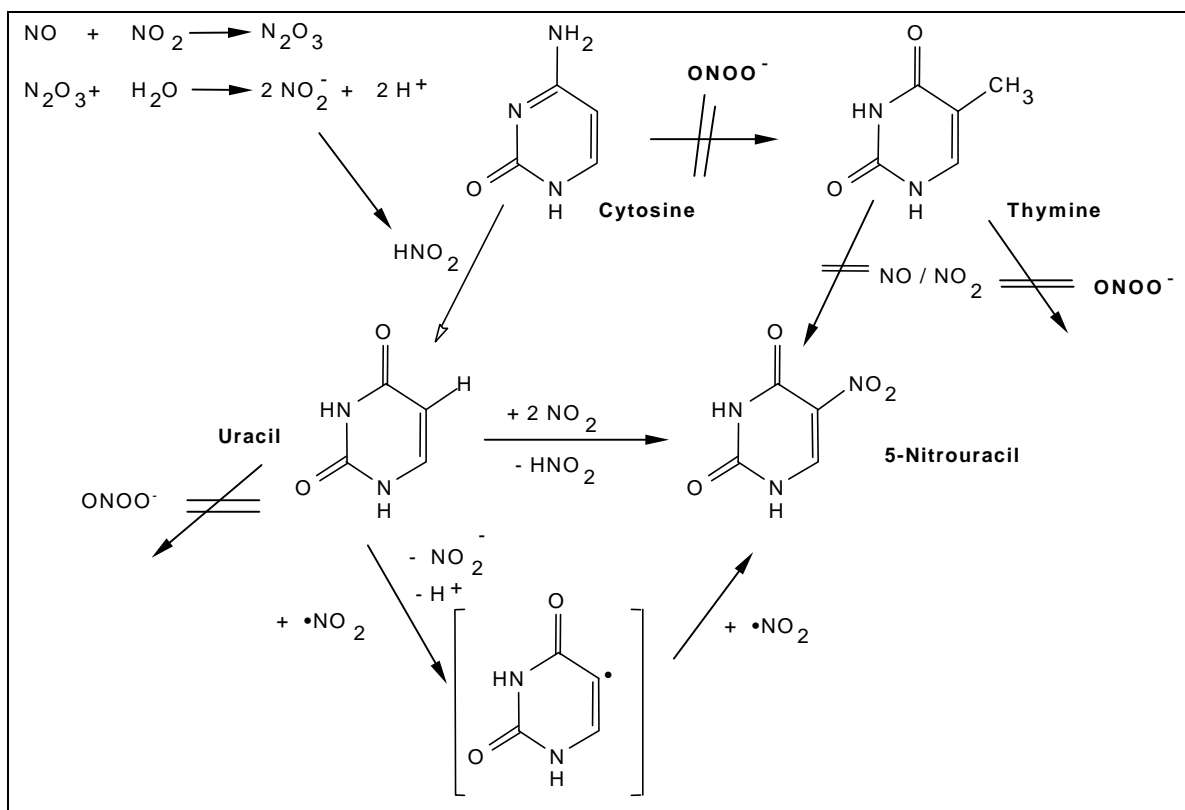


Figure 3 Reactions of purine bases with reactive species

