

**Boswelliasäuren: Modulation zellulärer
Signaltransduktionsmechanismen in Leukozyten und
Thrombozyten und Korrelation zu funktionellen Eigenschaften**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Anja Altmann
aus Bad Kissingen

Frankfurt, 2003
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

2. Gutachter: PD. Dr. Oliver Werz

Datum der Disputation: 29. März 2004

„Man muss das Unmögliche versuchen,
um das Mögliche zu erreichen“

Hermann Hesse

Meiner Familie
Meinen Freunden
Zum Dank

1 Einleitung und Problemstellung

Eine Vielzahl von allergischen und entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder Asthma bronchiale weisen eine auffallende Anreicherung von Leukotrienen (LTs) auf. LTs wird bei der Pathogenese dieser Erkrankungen eine entscheidende Rolle zugesprochen. Die LTs zählen zu einer Gruppe proinflammatorischer Lipidmediatoren, die nach entsprechender Zellstimulation von verschiedenen Leukozyten wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet werden. Die 5-Lipoxygenase (5-LO) stellt das Schlüsselenzym der LT-Biosynthese dar, indem es in einer zweistufigen Reaktion Arachidonsäure (AA) zum LTA_4 umsetzt. Das LTA_4 dient als Vorstufe für LTB_4 und die Peptidleukotriene LTC_4 , D_4 und E_4 .

Die Identifizierung von Substanzen, welche die Bildung der LTs verhindern oder ihre Wirkung antagonisieren, ist somit ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer antiinflammatorischer Arzneimittel. Die Hemmung der 5-LO Aktivität stellt hierbei eine Möglichkeit der Anti-LT Therapie dar. Wirkstoffscreening an diversen entzündungsrelevanten Zellen, den entsprechenden Zellhomogenaten sowie gereinigter 5-LO lieferten vor allem redoxaktive Verbindungen oder Eisenligand-inhibitoren, die mit dem Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms interagieren. Da solche Substanzen häufig nur über eine geringe Selektivität verfügen und/oder nur von geringer Wirksamkeit sind, richtet sich das Augenmerk im Besonderen auf die Entwicklung und Charakterisierung von spezifischen nicht-redoxaktiven 5-LO Hemmstoffen. Dabei waren und sind nicht nur chemisch-synthetische Verbindungen von Interesse, sondern vielfach auch Pflanzen und ihre Inhaltsstoffe, die vor allem durch ihre Anwendungen als Naturheilmittel bei Entzündungen und rheumatischen Beschwerden in der traditionellen Medizin verschiedenster Kulturen bekannt sind. Für eine Anwendung dieser Phytopharmaka in der modernen Phytotherapie ist es ohnehin erforderlich geworden, das jahrhundertalte subjektive Wissen um ihre bewährte Heilkraft, durch systematische Wirksamkeitsnachweise objektiv abzusichern, indem nicht nur die Wirksamkeit am Patienten im Vergleich zu anderen Präparaten nachgewiesen wird, sondern auch eine Charakterisierung der für die therapeutischen Wirkungen verantwortlichen Inhaltsstoffe sowie der zu Grunde liegenden Wirkmechanismen erfolgt. So wurde eine interessante Leitstruktur, im

Hinblick auf die spezifische nicht-redoxaktive 5-LO Hemmung, bei der Charakterisierung der für die Wirksamkeit verantwortlichen Inhaltsstoffe des Gummiharzes des indischen Weihrauches (*Boswellia serrata*) gefunden: die pentazyklische Triterpensäure AKBA (*3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid*).

Auf das Weihrauchharz, das in Indien seit mehr als 3000 Jahren erfolgreich in der ayurvedischen Medizin bei Nervenleiden und entzündlichen Erkrankungen eingesetzt wird, wurde die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ammon (Tübingen) schon einige Jahre zuvor aufmerksam, als sie zeigen konnte, dass ein Extrakt aus Weihrauch bei isolierten Leukozyten die Bildung von LTB₄ und anderer 5-LO Produkte unterdrückt. Nach heutigem Kenntnisstand scheint vor allem die β -Fraktion der pentazyklischen Triterpene mit den Substanzen AKBA, KBA (11-Keto- β -BA), A- β -BA (3-O-Acetyl- β -BA) und β -BA therapeutisch wichtig zu sein.

Als zentraler antiinflammatorischer Wirkmechanismus der β -BAs gilt bislang eine direkte, nicht-kompetitive, nicht-redoxaktive, reversible Hemmung der 5-LO. Daneben wirken die Extrakte und ihre isolierten Inhaltsstoffe auch auf Mechanismen der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose, indem sie z.B. Topoisomerasen hemmen und Caspasen aktivieren. Außerdem sind Effekte auf die humane Leukozytenelastase sowie auf das für die Immunabwehr wichtige Komplementsystem beschrieben worden.

Unter den verschiedenen getesteten BAs ist AKBA der potenteste 5-LO Inhibitor, wohingegen KBA etwa 3-fach weniger aktiv ist und BAs ohne 11-Keto-Gruppe kaum wirksam sind. Die bislang publizierten IC₅₀-Werte der einzelnen Verbindungen bezüglich 5-LO weisen zum Teil recht große Unterschiede (Faktor 5 bis 10) zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen auf, was auf eine Abhängigkeit der BA-induzierten 5-LO Hemmung vom verwendeten Zelltyp und den experimentellen Bedingungen hinweist. Allen Untersuchungen zur Wirkung der BAs auf die 5-LO in Leukozyten ist aber gemeinsam, dass AKBA und KBA in intakten Zellen zu einer stärkeren Hemmung der 5-LO führen als im zellfreien System. Dabei ist die Hemmung der 5-LO Aktivität in Zellhomogenaten mit einer direkten Interaktion mit dem Enzym gleichzusetzen, wohingegen die Hemmung der 5-LO in intakten Zellen auch durch andere Faktoren (u.a. Hemmung von MAPK, cPLA₂, FLAP, Ca²⁺-Komplexierung, Zytotoxizität) verursacht werden kann. Die Diskrepanz der Hemmwirkungen in intakten Zellen und Zellhomogenaten lässt daher den Schluss

zu, dass möglicherweise Signaltransduktionswege, die zur Regulation der 5-LO führen, durch BAs beeinflusst werden. Schließlich ist zu bemerken, dass Plasmaspiegel von Probanden nach oraler Einnahme von therapeutisch relevanten Dosen an *B. serrata* Extrakten mit max. 2,1 μM KBA und 0,5 μM AKBA deutlich unter den IC_{50} -Werten liegen, die in *in vitro* Experimenten gefunden wurden.

Die Hemmung der 5-LO bzw. der LT-Biosynthese als antiinflammatorisches Wirkprinzip der BAs wird derzeit sehr kontrovers diskutiert und ist aufgrund der Diskrepanz zwischen den erreichbaren Blutspiegeln und den IC_{50} -Werten für die 5-LO Hemmung eher unwahrscheinlich.

Gegenstand der Arbeit war es daher, den Einfluss von BAs auf die zelluläre Signaltransduktion und ihre Wirkungen auf zelluläre Funktionen näher zu untersuchen. Darüber hinaus sollten mögliche zelltypabhängige Unterschiede im Hinblick auf die Signaltransduktion und den zellulären Funktionen geprüft werden.

I. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	ALLGEMEINER TEIL	4
2.1	Weihrauch	4
2.1.1	Materialkunde und traditionelle Anwendung	4
2.1.2	Fertigarzneimittel	8
2.1.3	Verordnungsfähigkeit von H15 TM bzw. Sallaki TM	8
2.1.4	Pharmakologie	9
2.1.4.1	5-LO Hemmung	9
2.1.4.2	Wirkung auf Leukozytenelastase	11
2.1.4.3	Weitere antiinflammatorische Wirkungen	11
2.1.4.4	Wirkungen auf Tumorzellen	11
2.1.5	Klinische Wirksamkeit	12
2.1.5.1	Colitis Ulcerosa	12
2.1.5.2	Morbus Crohn (Enteritis regionalis)	13
2.1.5.3	Chronische Polyarthrit (rheumatoide Arthritis)	13
2.1.5.4	Bronchialasthma	14
2.1.5.5	Peritumorales Hirnödem / Hirntumore	14
2.1.6	Unerwünschte Wirkungen	15
2.1.7	Plasmadaten	15
2.2	Blutzellen	16
2.3	Entzündungsmechanismen und Leukozytenaktivierung	17
2.3.1	Entzündungsmediatoren	17
2.3.1.1	n-formylierte Peptide	17
2.3.1.2	Lipidmediatoren	18
2.3.1.3	Zytokine	19
2.3.1.4	Komplement-Komponenten	20
2.4	Neutrophile Granulozyten und ihre Funktionen	21
2.4.1	Chemotaxis	21
2.4.2	Phagozytose	21
2.4.3	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	21
2.4.3.1	Aufbau und Regulation der NADPH-Oxidase	23
2.5	Thrombozyten und ihre Funktionen	25

2.6	HL60 Zellen und Mono Mac 6 Zellen	25
2.7	Zelluläre Signaltransduktion in PMNL	26
2.7.1	Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs).....	26
2.7.2	Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	27
2.7.3	Phosphoinositid 3-Kinasen (PI 3-Ks).....	29
2.7.4	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs).....	30
2.8	Lipoxygenasen (LOs).....	33
2.8.1	LO-Stoffwechsel der Arachidonsäure	35
2.8.1.1	H(P)ETEs	37
2.8.1.2	Lipoxine (LX)	38
2.8.1.3	Leukotrien B ₄ (LTB ₄) und Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LTs)	38
2.8.2	5S-Lipoxygenase	39
2.8.2.1	Stimulierende Faktoren der 5-LO.....	39
2.8.2.2	FLAP, Phospholipase A ₂ , LTA ₄ -Hydrolase und LTC ₄ -Synthase.....	40
2.8.2.3	Regulation der zellulären 5-LO Aktivität	42
2.8.2.4	Pharmakologie der Anti-LT Therapie	45
2.8.3	12S-Lipoxygenase	48
2.8.4	15S-Lipoxygenase	48
3	MATERIALIEN UND GERÄTE	49
3.1	Materialien	49
3.2	Geräte	51
4	METHODEN	52
4.1	Zellen und Zellkultur	52
4.1.1	HL60 Zellen und Mono Mac 6 Zellen.....	52
4.1.2	Differenzierung der HL60 und MM6 Zellen.....	52
4.1.3	Isolierung menschlicher Granulozyten und Thrombozyten	52
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	53
4.2	5-Lipoxygenaseassay	53
4.2.1	Intakte Zellen	53
4.2.2	Zellhomogenate	54
4.3	12-Lipoxygenaseassay	54
4.4	HPLC-Analytik der LO Metabolite.....	55

4.5	MAPK Aktivierung	55
4.5.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	55
4.5.2	Western-Blotting	56
4.5.3	In-gel Kinase Assay	56
4.6	Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration	57
4.7	Bestimmung der zellulären Peroxidbildung	57
4.8	Arachidonsäurefreisetzung	58
4.9	Statistik	58
5	ERGEBNISSE	59
5.1	5-LO Aktivitätshemmung durch pentazyklische Triterpene und Strukturanaloga	59
5.1.1	Hemmung der 5-LO Aktivität durch Boswelliasäuren.....	59
5.1.2	Effekte von AA auf die 5-LO Hemmung durch AKBA.....	62
5.1.3	Hemmung der 5-LO Aktivität durch Heteronemin, Echinocystinsäure, Abietinsäure und Abietinsäuremethylester	63
5.2	Diskussion	66
5.3	Einfluss von BAs auf Signaltransduktionmoleküle in PMNL	69
5.3.1	Einfluss von BAs auf Agonist-induzierte MAPK Aktivierung in PMNL.....	69
5.3.2	11-Keto-BAs aktivieren p38 MAPK und p42 ^{MAPK} in humanen PMNL.....	70
5.3.3	Einfluss von Ca ²⁺ , PKC und PI 3-K auf die induzierte MAPK Aktivierung.....	74
5.3.4	Pertussistoxin (PTX) schwächt die BA-induzierte MAPK Aktivierung	77
5.3.5	Keto-BAs induzieren die Ca ²⁺ -Freisetzung in PMNL.....	78
5.4	Diskussion	80
5.5	Funktionelle Effekte der BAs in PMNL	84
5.5.1	11-Keto BAs stimulieren die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	84
5.5.2	PI 3-K und p42/44 ^{MAPK} regulieren die AKBA-induzierte ROS-Bildung	86
5.5.3	11-Keto-BAs führen zur Freisetzung von [³ H]-Arachidonsäure in PMNL	88
5.5.4	11-Keto BAs stimulieren die 5-LO in intakten Zellen.....	89
5.5.5	Einfluss von Ca ²⁺ auf die Wirksamkeit von AKBA	92
5.6	Diskussion	95

5.7	Zelltypabhängige Wirkungen der BAs	99
5.7.1	BAs induzieren intrazelluläre Ca ²⁺ -Mobilisierung in Thrombozyten	99
5.7.2	BAs aktivieren p38 MAPK in Thrombozyten.....	101
5.7.3	BAs induzieren AA Freisetzung und Metabolisierung zu 12-H(P)ETE.....	101
5.7.4	Einfluss von MAPK und Ca ²⁺ auf die induzierte 12-H(P)ETE Bildung	103
5.7.5	Wirkungen der BAs in differenzierten HL60 und Mono Mac 6 Zellen	104
5.8	Diskussion	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
7	ANHANG	113
8	LITERATURVERZEICHNIS	118
9	LEBENS LAUF	137
10	PUBLIKATIONEN	139
11	DANKSAGUNG	140

II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Inhaltsstoffe von Olibanum und indischem Weihrauch</i>	5
<i>Abb. 2: Chemische Struktur der BAs und TAs</i>	7
<i>Abb. 3: Entstehung und mögliche Reaktionen von ROS</i>	22
<i>Abb. 4: Aufbau der NADPH-Oxidase im aktiven Zustand</i>	23
<i>Abb. 5: Regulation der NADPH-Oxidase</i>	24
<i>Abb. 6: Komponenten und Aktivierung des ERK-Wegs</i>	32
<i>Abb. 7: Komponenten und Aktivierung des JNK- und p38-MAPK Wegs</i>	32
<i>Abb. 8: Z,Z-1,4-Pentadien-Teilstruktur</i>	33
<i>Abb. 9: Familie der Säugetier-Lipoxygenasen</i>	34
<i>Abb. 10: LO-Stoffwechsel der Arachidonsäure</i>	36
<i>Abb. 11: Zelluläre 5-LO Aktivierung in PMNL</i>	44
<i>Abb. 12: Hemmung der 5-LO Aktivität in intakten PMNL durch unterschiedliche BAs</i>	60
<i>Abb. 13: Hemmung der 5-LO Aktivität durch AKBA, KBA und BS-Extrakt (B)</i>	61
<i>Abb. 14: Einfluss der AA auf die Hemmung der 5-LO Aktivität durch AKBA</i>	62
<i>Abb. 15: 5-LO Hemmung durch Heteronemin und Echinocystinsäure</i>	64
<i>Abb. 16: 5-LO Hemmung durch Abietinsäure und Abietinsäuremethylester</i>	65
<i>Abb. 17: Einfluss von 11-Keto-BAs auf die Ionophor-induzierte MAPK Aktivierung</i>	70
<i>Abb. 18: MAPK Aktivierung durch B. serrata Extrakte (WB)</i>	71
<i>Abb. 19: MAPK Aktivierung durch pentazyklische Triterpene (WB)</i>	72
<i>Abb. 20: p42^{MAPK} Aktivierung durch AKBA und BS-Extrakt (In-gel Kinase Assay)</i>	72
<i>Abb. 21: Dosisabhängige MAPK Aktivierung durch AKBA und KBA</i>	73
<i>Abb. 22: Zeitverlauf der MAPK Aktivierung durch AKBA und KBA</i>	74
<i>Abb. 23: Ca²⁺-Abhängigkeit der MAPK Aktivierung durch AKBA</i>	75
<i>Abb. 24: Effekte von PKC und PI 3-K Inhibitoren auf die MAPK Aktivierung durch AKBA</i>	76
<i>Abb. 25: Einfluss von PTX auf MAPK Aktivierung</i>	77
<i>Abb. 26: Ca²⁺-Mobilisierung durch BAs (30µM) in PMNL</i>	79
<i>Abb. 27: Signalmoleküle und funktionelle Prozesse in PMNL (vereinfachtes Schema)</i>	84
<i>Abb. 28: Bildung von ROS durch verschiedene Stimuli in PMNL</i>	85

<i>Abb. 29: Einfluss von NADPH-Oxidase und Ca²⁺ auf die ROS-Bildung</i>	86
<i>Abb. 30: Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die ROS-Bildung in PMNL</i>	87
<i>Abb. 31: Arachidonsäurefreisetzung durch BAs in PMNL</i>	88
<i>Abb. 32: 5-LO Aktivierung in intakten PMNL bei Abwesenheit von Ca²⁺</i>	90
<i>Abb. 33: 5-LO Aktivierung in intakten PMNL bei Anwesenheit von Ca²⁺</i>	90
<i>Abb. 34: Abhängigkeit der 5-LO Aktivierung von Vorinkubationszeit und AA-Konzentration</i>	91
<i>Abb. 35: Dosiswirkungskurve der AKBA-induzierten 5-LO Aktivierung</i>	92
<i>Abb. 36: Einfluss von Ca²⁺ auf die Wirksamkeit von AKBA (A)</i>	93
<i>Abb. 37: Einfluss von Ca²⁺ auf die Wirksamkeit von AKBA (B)</i>	94
<i>Abb. 38: Ca²⁺-Mobilisierung durch BAs in Thrombozyten</i>	100
<i>Abb. 39: Aktivierung von MAPK durch BAs in Thrombozyten</i>	101
<i>Abb. 40: Effekte von BAs auf die 12-H(P)ETE-Bildung in Thrombozyten</i>	102
<i>Abb. 41: Einfluss von Ca²⁺ und MAPK auf die 12-H(P)ETE Bildung</i>	103
<i>Abb. 42: MAPK Aktivierung durch BAs in differenzierten HL60</i>	104
<i>Abb. 43: Bildung von ROS durch verschiedene Stimuli in differenzierten HL60</i>	106
<i>Abb. 44: Pharmakologische Charakterisierung der AKBA-induzierten ROS-Bildung</i>	106

III. Abkürzungsverzeichnis

β -BA	β -Boswelliasäure
A- β -BA	3-O-Acetyl- β -Boswelliasäure
AA	Arachidonsäure
AK	Antikörper
AKBA	3-O-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BA _s	Boswelliasäuren
BAPTA/AM	bis-(O-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N',-tetraacetic acid / acetoxymethylester
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat-Toluidinsalz
BS-Extr.	<i>Boswellia serrata</i> Extrakt
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
DAG	Diacylglycerol
DCF-DA	2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyleniodonium(chlorid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEA	European Medicines Evaluation Agency
ERK 1/2	extrazellulär Signal-regulierte Kinase $\hat{=}$ p42/44 ^{MAPK}
ESCOP	European Scientific Cooperative On Phytotherapy
FAF-BSA	Fatty Acid Free-Bovine Serum Albumin
FCS	fötales Kälberserum
FLAP	5-lipoxygenaseaktivierendes Protein

fMLP	<i>n</i> -formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GCP	Good Clinical Practice
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GPx	Glutathionperoxidase
H(P)ETE	Hydro(pero)xyeicosatetraensäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
KBA	11-Keto- β -Boswelliasäure
K _D	Dissoziationskonstante
LLQ	Lower Limit of Quantification
LO(s)	Lipoxygenase(n)
LT	Leukotrien
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin Basic Protein
MEK	MAPK Kinase
MIP	Monocyte Inflammatory Protein
MAPKAPK (\cong MK)	MAPK aktivierte Proteinkinase
NADPH	Nicotinamid-Adenine-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitrobluetetrazonium(chlorid)

OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl-Glycerol
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Prostaglandine
PG Puffer	PBS mit 1g/L Glucose
PGC Puffer	PBS mit 1g/L Glucose und 1mM CaCl ₂
PI 3-K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
PT bzw. TT	pentazyklische bzw. tetrazyklische Triterpensäuren
PTX	Pertussistoxin
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-b	2X SDS-PAGE sample loading buffer
TAs	Tirucallensäuren
TBS	Tris Buffered Saline
TGF-β1	Transforming Growth Factor beta-1
TNF	Tumornekrosefaktor
VD3	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (Calcitriol)
WB	Western Blot

1 Einleitung und Problemstellung

Eine Vielzahl von allergischen und entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder Asthma bronchiale weisen eine auffallende Anreicherung von Leukotrienen (LTs) auf. LTs wird bei der Pathogenese dieser Erkrankungen eine entscheidende Rolle zugesprochen. Die LTs zählen zu einer Gruppe proinflammatorischer Lipidmediatoren, die nach entsprechender Zellstimulation von verschiedenen Leukozyten wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet werden. Die 5-Lipoxygenase (5-LO) stellt das Schlüsselenzym der LT-Biosynthese dar, indem es in einer zweistufigen Reaktion Arachidonsäure (AA) zum LTA_4 umsetzt. Das LTA_4 dient als Vorstufe für LTB_4 und die Peptidleukotriene LTC_4 , D_4 und E_4 .

Die Identifizierung von Substanzen, welche die Bildung der LTs verhindern oder ihre Wirkung antagonisieren, ist somit ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer antiinflammatorischer Arzneimittel. Die Hemmung der 5-LO Aktivität stellt hierbei eine Möglichkeit der Anti-LT Therapie dar. Wirkstoffscreening an diversen entzündungsrelevanten Zellen, den entsprechenden Zellhomogenaten sowie gereinigter 5-LO lieferten vor allem redoxaktive Verbindungen oder Eisenligand-inhibitoren, die mit dem Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms interagieren. Da solche Substanzen häufig nur über eine geringe Selektivität verfügen und/oder nur von geringer Wirksamkeit sind, richtet sich das Augenmerk im Besonderen auf die Entwicklung und Charakterisierung von spezifischen nicht-redoxaktiven 5-LO Hemmstoffen. Dabei waren und sind nicht nur chemisch-synthetische Verbindungen von Interesse, sondern vielfach auch Pflanzen und ihre Inhaltsstoffe, die vor allem durch ihre Anwendungen als Naturheilmittel bei Entzündungen und rheumatischen Beschwerden in der traditionellen Medizin verschiedenster Kulturen bekannt sind. Für eine Anwendung dieser Phytopharmaka in der modernen Phytotherapie ist es ohnehin erforderlich geworden, das jahrhundertalte subjektive Wissen um ihre bewährte Heilkraft, durch systematische Wirksamkeitsnachweise objektiv abzusichern, indem nicht nur die Wirksamkeit am Patienten im Vergleich zu anderen Präparaten nachgewiesen wird, sondern auch eine Charakterisierung der für die therapeutischen Wirkungen verantwortlichen Inhaltsstoffe sowie der zu Grunde

liegenden Wirkmechanismen erfolgt. So wurde eine interessante Leitstruktur, im Hinblick auf die spezifische nicht-redoxaktive 5-LO Hemmung, bei der Charakterisierung der für die Wirksamkeit verantwortlichen Inhaltsstoffe des Gummiharzes des indischen Weihrauches (*Boswellia serrata*) gefunden: die pentazyklische Triterpensäure AKBA (*3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid*).

Auf das Weihrauchharz, das in Indien seit mehr als 3000 Jahren erfolgreich in der ayurvedischen Medizin bei Nervenleiden und entzündlichen Erkrankungen eingesetzt wird, wurde die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ammon (Tübingen) schon einige Jahre zuvor aufmerksam, als sie zeigen konnte, dass ein Extrakt aus Weihrauch bei isolierten Leukozyten die Bildung von LTB₄ und anderer 5-LO Produkte unterdrückt. Nach heutigem Kenntnisstand scheint vor allem die β -Fraktion der pentazyklischen Triterpene mit den Substanzen AKBA, KBA (11-Keto- β -BA), A- β -BA (3-O-Acetyl- β -BA) und β -BA therapeutisch wichtig zu sein.

Als zentraler antiinflammatorischer Wirkmechanismus der β -BAs gilt bislang eine direkte, nicht-kompetitive, nicht-redoxaktive, reversible Hemmung der 5-LO. Daneben wirken die Extrakte und ihre isolierten Inhaltsstoffe auch auf Mechanismen der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose, indem sie z.B. Topoisomerasen hemmen und Caspasen aktivieren. Außerdem sind Effekte auf die humane Leukozytenelastase sowie auf das für die Immunabwehr wichtige Komplementsystem beschrieben worden.

Unter den verschiedenen getesteten BAs ist AKBA der potenteste 5-LO Inhibitor, wohingegen KBA etwa 3-fach weniger aktiv ist und BAs ohne 11-Keto-Gruppe kaum wirksam sind. Die bislang publizierten IC₅₀-Werte der einzelnen Verbindungen bezüglich 5-LO weisen zum Teil recht große Unterschiede (Faktor 5 bis 10) zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen auf, was auf eine Abhängigkeit der BA-induzierten 5-LO Hemmung vom verwendeten Zelltyp und den experimentellen Bedingungen hinweist. Allen Untersuchungen zur Wirkung der BAs auf die 5-LO in Leukozyten ist aber gemeinsam, dass AKBA und KBA in intakten Zellen zu einer stärkeren Hemmung der 5-LO führen als im zellfreien System. Dabei ist die Hemmung der 5-LO Aktivität in Zellhomogenaten mit einer direkten Interaktion mit dem Enzym gleichzusetzen, wohingegen die Hemmung der 5-LO in intakten Zellen auch durch andere Faktoren (u.a. Hemmung von MAPK, cPLA₂, FLAP, Ca²⁺-Komplexierung, Zytotoxizität) verursacht werden kann. Die Diskrepanz der

Hemmwirkungen in intakten Zellen und Zellhomogenaten lässt daher den Schluss zu, dass möglicherweise Signaltransduktionswege, die zur Regulation der 5-LO führen, durch BAs beeinflusst werden. Schließlich ist zu bemerken, dass Plasmaspiegel von Probanden nach oraler Einnahme von therapeutisch relevanten Dosen an *B. serrata* Extrakten mit max. 2,1 μM KBA und 0,5 μM AKBA deutlich unter den IC_{50} -Werten liegen, die in *in vitro* Experimenten gefunden wurden.

Die Hemmung der 5-LO bzw. der LT-Biosynthese als antiinflammatorisches Wirkprinzip der BAs wird derzeit sehr kontrovers diskutiert und ist aufgrund der Diskrepanz zwischen den erreichbaren Blutspiegeln und den IC_{50} -Werten für die 5-LO Hemmung eher unwahrscheinlich.

Gegenstand der Arbeit war es daher, den Einfluss von BAs auf die zelluläre Signaltransduktion und ihre Wirkungen auf zelluläre Funktionen näher zu untersuchen. Darüber hinaus sollten mögliche zelltypabhängige Unterschiede im Hinblick auf die Signaltransduktion und den zellulären Funktionen geprüft werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Weihrauch

2.1.1 Materialkunde und traditionelle Anwendung^{1,2}

Weihrauchbäume gehören innerhalb der Familie der Balsambaumgewächse (Burseraceae) zur Gattung *Boswellia*, die in 25 Arten unterteilt werden kann. Zu den drogenliefernden Arten zählen die Weihrauchbäume *Boswellia sacra* FLUECK (Südarabien), *B. carterii* BIRD. (Nordsomalia), *B. frereana* BIRD (Somalia) sowie der Salei- bzw. Saphalbaum *B. serrata* ROXB (Indien). Zum Teil ist eine exakte Unterscheidung der Arten kaum möglich. So ist *B. carterii* äußerlich kaum von *B. sacra* zu unterscheiden und wird daher häufig mit dieser in einer Art geführt.

Das in der Öffentlichkeit allgemein als Weihrauch bzw. Olibanum bezeichnete Gummiharz stellt meist eine Mischung arabischer Weihraucharten dar und muss vom indischen Weihrauch unterschieden werden. Die Handelsqualitäten, die über den Apothekengroßhandel als *Olibanum in granis* zu beziehen sind, stammen vorwiegend von den Arten *Boswellia carterii*, *Boswellia frereana* und *Boswellia sacra*³. Hauptverfälschungsmittel, vor allem beim Olibanum, sind Kolophonium und Terpentin, die beide über einen hohen Anteil an Abietinsäure verfügen¹.

Schon seit Jahrtausenden wird Weihrauch als Naturheilmittel genutzt und noch heute in der traditionellen ägyptischen, chinesischen und indischen Medizin bei einer Vielzahl von Erkrankungen angewendet^{4,5}. In Indien wird Weihrauch („*Salai Guggal*“) seit etwa 3000 Jahren erfolgreich in der ayurvedischen Medizin bei Nervenleiden und entzündlichen Erkrankungen (u.a. Gicht, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Asthma, rheumatische Erkrankungen) eingesetzt.

Auch die traditionelle Pharmakologie in Deutschland kannte bis Mitte des letzten Jahrhunderts die Anwendungen für Weihrauch u.a. bei Entzündungen des Mund- und Rachenraums, chronischen Darmerkrankungen, Husten und Heiserkeit, Ulcera und Furunkel¹. Verwendet wurden Suppositorien, Rinde und Harz als Abkochungen in Wasser und Öl, das Harz pulverisiert in Pasten, Salben und Pflastern oder der Rauch zur Inhalation.

Die Gummiharze von *B. carterii* und *B. frereana* wurden schon im DAB 1 (*Pharmacopoea Germanica*) von 1872 als Olibanum aufgeführt⁶. Der letzte Eintrag findet sich im 6. Ergänzungsbuch aus dem Jahre 1941 und enthält nur eine Beschreibung von Aussehen und Beschaffenheit der Harzstücke.

Das Weihrauchharz ist ein klassisches pflanzliches Vielstoffgemisch, aus dem bisher über 200 verschiedene chemische Verbindungen isoliert wurden, die in die 3 Hauptfraktionen ätherisches Öl, Harzstoffe und Schleime gegliedert werden können. Die Zusammensetzung des Gummiharzes und die Verteilung der Inhaltsstoffe sind artabhängig (*siehe Abb. 1*). Medizinisch relevant ist die Harzfraktion, die u.a. ein Gemisch aus verschiedenen Boswelliasäuren (BAs) und Tirucallensäuren (TAs) enthält (*siehe Strukturen in Abb. 2*). Die BAs zählen chemisch zur Gruppe der pentazyklischen Triterpene, wohingegen die Tirucallensäuren tetrazyklische Triterpene darstellen. Formal sind Terpene Oligomere der Kohlenwasserstoffverbindung Isopren (2-Methyl-1,2-butadien), die je nach Anzahl der Isopreneinheiten in Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Sesterpene, Triterpene und Tetraterpene eingeteilt werden.

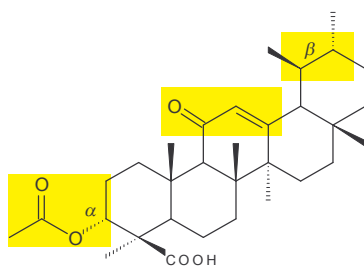
Fraktion	Qualität von Olibanum (nach EB 6)	Qualität von <i>B. serrata</i>
äth. Öl	~ 5-9% (artabhängige Zusammensetzung)	~ 7,5-9% (Thujen, Phellandren, Pinen)
Reinharz	~ 66% (α -BA, β -BA, 11- α -Hydroxy- β -BA, KBA, 3-Acetyl-11-hydroxy- β -BA-methylester)	~ 55-57% (A- β -BA, AKBA, β -BA, KBA / Tirucallensäuren)
Schleim	~ 12% (Galaktose, Arabinose, Methylglucuronsäure) ~ 6-8% Bassorin, Gummi, Bitterstoffe	~ 23% (Galaktose, Arabinose, Mannose, Uronsäuren, etc.)

(Angaben aus Hagers Handbuch, 1998)

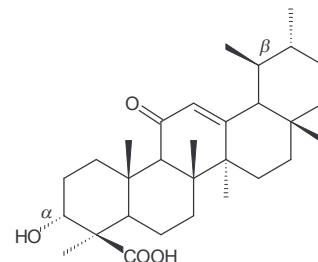
Abb. 1: Inhaltsstoffe von Olibanum und indischem Weihrauch

Nach dem heutigen Kenntnisstand sind für die zahlreichen pharmakologischen Wirkungen des Weihrauchharzes die β -Fraktion der BAs, mit den Verbindungen AKBA (3-O-Acetyl-11-keto- β -BA), KBA (11-keto- β -BA), A- β -BA (3-O-Acetyl- β -BA) und β -BA verantwortlich. Neueren Untersuchungen zur Folge scheinen aber auch die γ -BAs über hochpotente Wirkungen zu verfügen⁷. Sie fallen in größeren Mengen bei der Reinigung und Extraktion der BAs als thermodynamisch stabilere Produkte an. Die α -Fraktion scheint zum jetzigen Stand der Wissenschaft keinen Beitrag zur Wirkung zu leisten. Zum Einfluss der TAs auf die Gesamtwirkung des Weihrauchextraktes gibt es zur Zeit nur wenig verfügbare Literaturdaten. Man vermutet aber einen stimulierenden Effekt auf die LT-Synthese in intakten Zellen⁸.

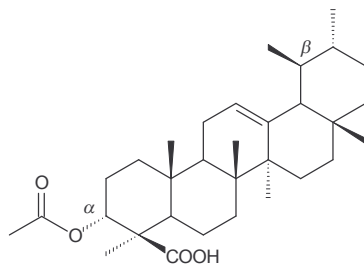
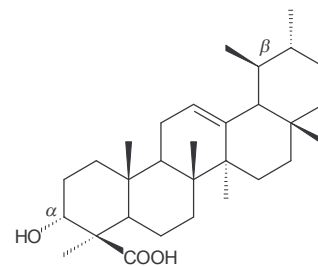
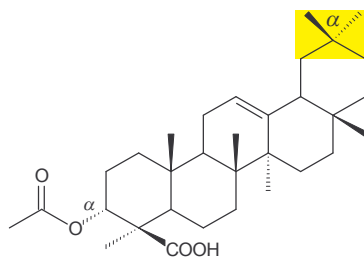
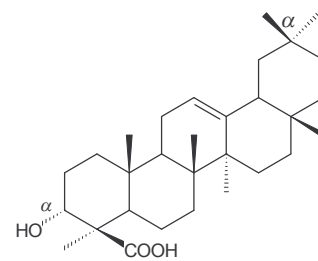
Pentazyklische Triterpene (Boswelliasäuren)

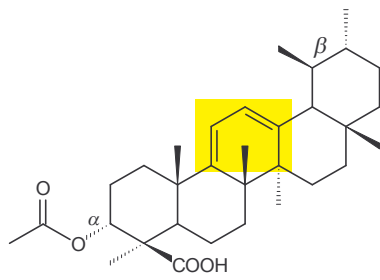
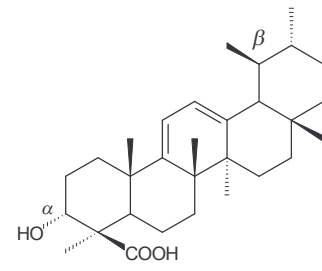
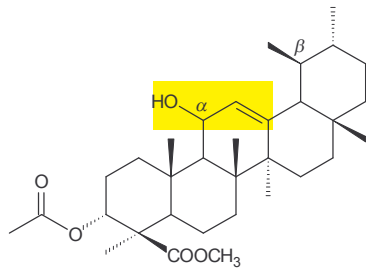
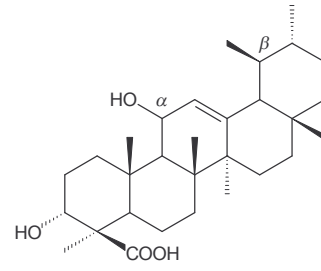


AKBA

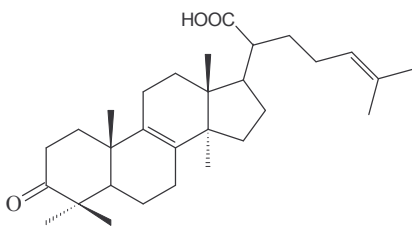


KBA

Acetyl- β -BA β -BAAcetyl- α -BA α -BA

Acetyl- γ -BA γ -BA3-Acetyl-11- α -hydroxy- β -BA-methylester11- α -Hydroxy- β -BA

Tetrazyklische Triterpene (Tirucallensäuren)



3-Keto-tirucall-8,24-dien-21-säure

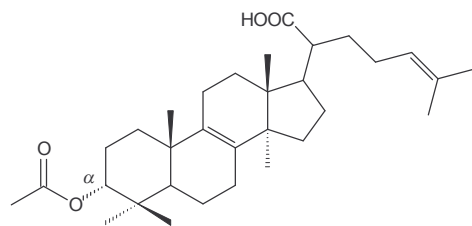
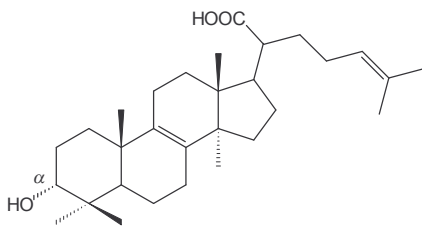
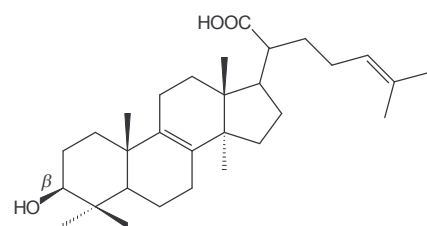
3- α -Acetoxy-tirucall-8,24-dien-21-säure3- α -Hydroxy-tirucall-8,24-dien-21-säure3- β -Hydroxy-tirucall-8,24-dien-21-säure

Abb. 2: Chemische Struktur der BAs und TAs

2.1.2 Fertigarzneimittel

H15TM Ayurmedica bzw. SallakiTM sind Tabletten, die je 400 mg Trockenextrakt (Olibanum extractum siccum / DEV 4,2 - 5,9 : 1, Auszugsmittel: MeOH)² aus *Boswellia serrata* enthalten. Der verwendete Trockenextrakt wird durch Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln (Klasse 2 und 3 gemäß Ph. Eur. Nachtrag 1999, Kap. 5.4) nach einem speziellen, standardisierten Verfahren hergestellt⁹. Die Packungsbeilage deklariert die Tabletten als pflanzliches Antirheumatikum mit den Indikationen aktive rheumatische Arthritis und juvenile chronische Arthritis¹⁰.

In der Roten Liste 2002 werden Weihrauchprodukte als homöopathische Zubereitungen (Olibanum RA-Weihrauch[®] Streukügelchen, Tabletten, Tropfen) von der Zilly GmbH Baden-Baden aufgeführt. Daneben sind national und international eine größere Anzahl weiterer Weihrauchpräparate verfügbar.

2.1.3 Verordnungsfähigkeit von H15TM bzw. SallakiTM

Die Fertigarzneimittel H15TM und SallakiTM werden in Indien (Bombay) von der Gufic Ltd. hergestellt. SallakiTM ist in Indien ein zugelassenes Arzneimittel. Das identische H15TM ist in der Schweiz in dem Halbkanton Appenzell-Außerroden registriert und wird von der ebi-pharm AG (Kirchlindach) importiert, die es auch vertreibt. Bei modernen Phytopharmaka gelten für die Zulassung grundsätzlich dieselben Anforderungen hinsichtlich pharmazeutischer Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit wie bei Arzneimitteln mit chemisch-synthetischen Wirkstoffen. Auch wenn die pharmazeutische Qualität von einer Arbeitsgruppe der Spreewald-Pharma GmbH⁹ für H15TM bestätigt wurde und die Anwendung von Weihrauchpräparaten in den durchgeführten klinischen Studien allgemein gut vertragen wurde, so wurde die Zulassung von H15TM oder eines analogen Präparates in Deutschland bislang mangels hinreichender wissenschaftlicher Unterlagen abgelehnt. Da das Produkt in der Schweiz nur über eine eingeschränkte (regionale) Verkehrsfähigkeit verfügt, ist der Import von H15TM nach einer ärztlichen Verordnung nur aus Indien möglich. Die Packungsaufmachung und der Beipackzettel des Präparates müssen in englischer Sprache verfasst sein.

Für Weihrauch wurde keine Kommission E-Monographie erstellt und auch EMEA- und ESCOP-Monographien existieren zur Zeit noch nicht. Allerdings hat im Dezember 2002 das *Committee for Orphan Medicinal Products* der europäischen Zulassungsbehörde EMEA in London eine Stellungnahme veröffentlicht, in der eine europaweite Zulassung von *B. serrata* Extrakt für die Firma Pharmasan GmbH (Freiburg) als Orphan Drug zur Behandlung von perifokalen Ödemen durch Hirntumore als positiv beurteilt wurde ¹¹. Eine europäische Zulassung für die Indikation „Peritumorales Hirnödem“ steht somit bevor.

2.1.4 Pharmakologie

2.1.4.1 5-LO Hemmung

Rohharze, verschiedene Extrakte oder isolierte BAs zeigen in verschiedenen tierexperimentellen Ödem-, Entzündungs- und Arthritismodellen eine deutliche dosisabhängige antiinflammatorische Wirkung auf ^{12, 13, 14, 15}. Studien bezüglich analgetischer oder antipyretischer Wirkungen sind widersprüchlich ^{16, 17}.

In *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit PMNL konnte eine Hemmung der 5-Lipoxygenase (5-LO) festgestellt werden ^{18, 19, 20, 21}. Die Interaktion mit dem Enzym erfolgt vermutlich über eine selektive allosterische Bindungsstelle für pentazyklische Triterpene, da α -Amyrin und Ursolsäure die Wirkung der BAs aufheben können, nicht aber die Wirkung anderer 5-LO Inhibitoren (z.B. MK-886; L-739,010; ZM-230,487). Eine unspezifische lipophile Interaktion wurde ausgeschlossen, da lipophile Ringverbindungen wie Cholesterol, Kortikoide und Testosteron weder selbst inhibieren, noch die BAs antagonisieren können. Ergebnisse eines Photolabeling-Assays mit Azido-¹²⁵I-KBA als AKBA-Analogen lassen außerdem vermuten, dass es sich bei der AKBA-Bindungsstelle um eine regulatorische zweite AA-Bindungsstelle handelt ²².

Die Hemmwirkung der verschiedenen BAs ist strukturabhängig und differiert deutlich. Strukturelle Voraussetzungen für die Hemmwirkung der 5-LO scheinen das 5-Ring-Grundgerüst, die 11-Keto-Funktion und eine hydrophile Gruppe am C4-Atom zu sein.

Die in *Tabelle 1* aufgeführten IC_{50} -Werte für BAs und ihre Derivate wurden von *Sailer et al.*²¹ und *Schweizer et al.*⁷ an Leukozyten aus dem Rattenperitoneum nach vorrangegangener Glykogeninjektion gewonnen. Intakte Zellen wurden mit 1,9 μ M Ionophor A23187 und 1,8 mM Ca^{2+} stimuliert. Die Homogenate wurden mit 10 μ M AA inkubiert.

Substanzen	IC_{50} -Werte (Intakte Zellen)	IC_{50} -Werte (Homogenate)
AKBA	~ 1,5 μ M	~ 8 μ M
KBA	~ 2,8 μ M	~ 14,6 μ M
β -BA	Partialinhibitor (max. 60%)	Partialinhibitor (max. 60%)
Acetyl- β -BA	Partialinhibitor (max. 60%)	Partialinhibitor (max. 60%)
11-keto-3 α ,24-diol	~ 4,5 μ M	~ 45,3 μ M
Acetyl- γ -BA	~ 0,75 μ M	~ 5 μ M
γ -BA	Partialinhibitor (max. 90%)	~ 5 μ M
Acetyl-11-methoxy- β -BA	Partialinhibitor (max. 80%)	o. A.

Tabelle 1: IC_{50} -Werte der BAs und ihrer Derivate^{7, 21}

Die bislang publizierte IC_{50} -Werte der Verbindungen weisen zum Teil recht große Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen auf, was auf eine Abhängigkeit der BA-induzierten 5-LO Hemmung vom verwendeten Zelltyp und den Assay-Bedingungen hinweist. In Neutrophilen der Ratte wurden für AKBA IC_{50} -Werte von ~1,5 μ M¹⁸, in differenzierten granulozytären HL60 Zellen und differenzierten monozytären Mono Mac 6 Zellen von ~12 μ M und ~15 μ M¹²⁴ bestimmt. In den korrespondierenden Zellhomogenaten lagen die IC_{50} -Werte bei 8 μ M¹⁸ bzw. 50 μ M (HL60, MM6)¹²⁴. Allen Untersuchungen zur Wirkung der BAs auf die 5-LO in leukozytären Zellen ist gemeinsam, dass AKBA und KBA zu einer stärkeren 5-LO Hemmung in intakten Zellen als in zellfreien System führen.

Weiteren Untersuchungen zur Folge kann durch Stimulation mit niedrigen BS-Extrakt Konzentrationen (2,5 - 10 μ g/mL) eine Steigerung der 5-LO Produktbildung in PMNL auftreten, die erst bei 20 μ g/mL gehemmt wird²³. Verantwortlich dafür könnten nach *Boden et al.*⁸ die Tirucallensäuren sein, da die 3-oxo-TA zu einer Steigerung der 5-LO Produktbildung führt.

2.1.4.2 Wirkung auf Leukozytenelastase

Neben der 5-LO hemmt die AKBA auch die enzymatische Aktivität der humanen Leukozytenelastase. Allerdings liegen die dafür benötigten Konzentrationen mit einem IC_{50} -Wert von 15 μM deutlich höher als die Werte, die zur Hemmung der Leukotriensynthese benötigt werden. Für β -BA konnte bei einer Konzentration von 20 μM eine 64%-ige Hemmung der Elastase gezeigt werden ²⁴.

2.1.4.3 Weitere antiinflammatorische Wirkungen

Einige experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass Weihrauch bzw. seine Inhaltsstoffe durch eine Erhöhung der lysosomalen Stabilität ²⁵, Abnahme der Ausscheidung von Hydroxyprolin ²⁶ sowie Hemmung des Abbaus von Glykosaminglykanen ²⁷ ebenfalls entzündungshemmend wirken könnten.

Im Tierexperiment unterdrückt ein alkoholischer Trockenextrakt (nicht genauer definiert) die primäre Antikörperbildung gegen Erythrozyten des Schafes, die zelluläre Immunantwort wurde ebenfalls beeinträchtigt ²⁸. Die Vorbehandlung mit einem Acetyl-BA-Gemisch (95% A- β -BA, 2% A- α -BA, 3% AKBA) zeigte im Tiermodell hepatoprotektive Effekte ²⁹.

2.1.4.4 Wirkungen auf Tumorzellen

In vitro Untersuchungen an verschiedenen Tumorzelllinien zeigen antitumorale Wirkungen von BAs. AKBA, KBA, A- β -BA und β -BA hemmen die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in undifferenzierten HL60-Zellen ³⁰. Für AKBA konnte zudem eine Wachstumshemmung von HL60 Zellen ³⁰, eine Hemmung der Proliferation von HL60 und CCRF-CEM Zellen (IC_{50} ~30 μM) sowie eine Topoisomerase-Inhibition (IC_{50} >10 μM) nachgewiesen werden ³¹. Von *Park et al.* ³² konnte gezeigt werden, dass 2-8 μM AKBA zytotoxisch auf Meningiomazellen wirken und die PDGF-induzierte p42/44^{MAPK} Aktivierung inhibieren. Apoptotische Effekte durch Acetyl- α -BA und Acetyl- β -BA wurden in verschiedenen Leukämiezellen (HL60, U937, ML1) von *Jing et al.* ³³ gefunden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen *Glaser et al.* ³⁴ bei der Untersuchung von AKBA, Acetyl- β -BA und β -BA an Glioblastomzelllinien (T98 G, LN229, LN18 und LN306) mit IC_{50} -Werten von 20 - 40 μM . Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an Kolonkarzinomzellen für AKBA und KBA apoptotische Effekte, die Caspase-8-vermittelt sind ³⁵. Bei der Verwendung von gereinigter

humaner Topoisomerase I und IIa konnten *Syrovets et al.*³⁶ eine direkte Interaktion der Acetyl-BAs feststellen. Scheinbar konkurrieren BAs mit der DNA um die Bindung an der Topoisomerase. In dieser Untersuchung erwiesen sich die Acetyl-BAs potenter als Camptothecin und Etoposid. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten sich *in vivo* Befunde von *Winking et al.*³⁷ unter Verwendung von H15TM bei Ratten, denen C6-Gliomazellen intrakranial implantiert wurden.

2.1.5 Klinische Wirksamkeit

Präklinische Untersuchungen haben gezeigt, dass *BS*-Extrakte sowie einige isolierte Boswelliasäuren über entzündungshemmende Eigenschaften verfügen. Erkrankungen, die durch eine auffallende Anreicherung von Leukotrienen (LTs) ausgewiesen sind, wurden vorrangig untersucht. Dazu zählen Asthma bronchiale, chronische Polyarthritiden sowie die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Auch Hirntumore wie Astrozytom oder Glioblastom und die damit verbundenen perifokalen Ödeme gehen mit einer vermehrten Bildung von LTs einher³⁸.

2.1.5.1 Colitis Ulcerosa

Colitis Ulcerosa ist eine chronisch-rezidivierende entzündliche Erkrankung des Dickdarms mit blutigen Durchfällen und Geschwürbildung. Die Therapie erfolgt im akuten Schub mit dem Prodrug Sulfasalazin oder 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin), ggf. kombiniert mit Glucocorticoiden³⁹.

Erste Hinweise auf die Wirksamkeit von Weihrauchpräparaten bei chronischen Darmerkrankungen lieferte eine 1997 von *Gupta et al.*⁴⁰ in Indien durchgeführte offene, nicht randomisierte, verumkontrollierte Pilotstudie in der 34 Patienten mit Salai Guggal und 8 Patienten mit Sulfasalazin über einen Zeitraum von 6 Wochen behandelt wurden. Sowohl unter der Therapie mit Salai Guggal als auch mit Sulfasalazin wurden vergleichbare Remissionsraten erzielt. Ein zu geringes Patientenkollektiv und ein nicht GCP-konformes Studiendesign lassen eine eindeutige positive Bewertung der Studie jedoch nicht zu.

2.1.5.2 Morbus Crohn (Enteritis regionalis)

Morbus Crohn ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, die alle Abschnitte des Magen-Darm-Traktes betreffen kann und durch Schmerzen im Unterbauch, Fieber und Durchfällen gekennzeichnet ist. Typisch ist der segmentale Befall, bei dem alle Wandschichten betroffen sind. Für die Therapie des Morbus Crohn gilt im Wesentlichen das gleiche wie für Colitis Ulcerosa⁴¹.

In einem doppelblinden, randomisierten, verumkontrollierten, 8-wöchigen Parallelgruppenvergleich wurden 44 Patienten mit 3,6 g H15TM und 39 Patienten mit 4,5 g Mesalazin behandelt⁴². Die Studie entsprach in seinem Studiendesign und der Durchführung den in der EU gültigen Regelungen nach GCP und ICH. Anhand der Änderung des Crohn Disease Activity Index (CDAI) wurde belegt, dass H15TM der Therapie mit Mesalazin nicht unterlegen ist. Die nachgewiesene gute Verträglichkeit lässt H15TM außerdem im Sinne einer Nutzen-Risiko-Bewertung günstiger bewerten als Mesalazin^{43, 44}.

2.1.5.3 Chronische Polyarthritits (rheumatoide Arthritis)

Die chronische Polyarthritits ist eine progredient verlaufende, entzündliche, destruierende Gelenkerkrankung mit unbekannter Krankheitsursache. In der Rheumatherapie werden hauptsächlich eingesetzt: NSAR, Glucocorticoide, sog. Basistherapeutika wie Goldverbindungen, Methotrexat und Sulfasalazin aber auch Biologika (z.B. Etanercept, Anakinra), die gezielt IL-1 und TNF- α ausschalten⁴¹.

Von 1987 bis 1988 wurde eine doppelblinde, multizentrische, placebokontrollierte Pilotstudie (4 Zentren, 78 Patienten) durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch als nicht publikationswürdig erachtet wurden⁴⁵. Nach *Keudell et al.*⁴⁶ zeigten sich in einer 1994 erstellten Metaanalyse der Studie wesentliche und statistisch signifikante Besserungen unter der Therapie mit H15TM (unpublizierte Daten). Die Auswertung der Daten eines Zentrums⁴⁵ erbrachte dagegen keine signifikanten oder klinisch relevanten Änderungen in Verum- und Placebogruppe. Auf Grund der Tatsache, dass eine Veröffentlichung von Studiendesign und Ergebnissen nicht erfolgte, lassen sich keine Aussagen zur Wirksamkeit von Weihrauchpräparaten bei rheumatoider Arthritis machen.

2.1.5.4 Bronchialasthma

Asthma bronchiale zeichnet sich durch anfallsweise auftretende Atemnot infolge einer Atemwegsobstruktion eines hyperreaktiven Bronchialsystems aus. Die Einengung der Atemwege wird infolge von Bronchospasmen, Schleimhautödem und Hypersekretion eines zähen Schleims hervorgerufen. Die symptomatische Therapie kann durch Unterdrückung der Entzündung (z. B. Cromoglicinsäure, Glucocorticoide, Lukaste) sowie der Bronchospasmolyse (β_2 -Sympathomimetika, Theophyllin, Parasympatholytika) erfolgen.

In einer doppelblinden, randomisierten, monozentrischen, placebokontrollierten Studie wurden 40 Patienten mit *B. serrata* Kapseln (S-CompoundTM) und 40 Patienten mit Placebo-Kapseln für 6 Wochen therapiert⁴⁷. In beiden Gruppen konnte eine Abnahme der Rasselgeräusche, eine Verbesserung im Bereich der Dyspnoe, der Atemfrequenz und der Anfallshäufigkeit festgestellt werden. Die spirometrischen Parameter (FEV_i, FVC und PEF_R) der Boswelliagruppe zeigten gegenüber der Placebogruppe eine signifikante Verbesserung der Situation.

2.1.5.5 Peritumorales Hirnödem / Hirntumore

Das Astrozytom geht von entarteten Zellen des Stützgewebes (Glia) des Gehirns aus (Astrozyten). Je nach Differenzierung der Tumorzellen werden nach WHO vier Klassen unterschieden. Tumore der Grade III (anaplastisches Astrozytom) und Grad IV (Glioblastom) wachsen extrem rasch und zählen zu den bösartigsten Hirntumoren überhaupt. Die neurologischen Störungen bei Patienten mit Glioblastom und Astrozytom sind häufig nicht durch den Tumor allein, sondern durch das perifokale Ödem bedingt, dessen Ausprägung mit der Menge an ausgeschiedenen LT-Abbauprodukten im Urin korreliert^{48, 49}.

Neben einigen Beobachtungsserien^{50, 51} wurde eine prospektive, kontrollierte Studie an 29 Patienten mit malignen Gliomen durchgeführt⁵². Die ausgeprägteste Reduktion des Ödems und eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik wurde unter der höchsten Dosierung (3600 mg H15TM pro Tag) beobachtet. Ein Einfluss auf die Tumorgroße wurde nach einwöchiger Therapie bei keinem der 29 Patienten beobachtet. Eine durchgeführte Folgestudie wurde im Jahre 2002 beendet (Ergebnisse und Studiendesign noch unpubliziert) und

bewirkte eine positive Beurteilung des *BS*-Extrakt als Orphan Drug zur Behandlung von perifokalen Ödemen durch Hirntumore durch die EMEA ¹¹.

2.1.6 Unerwünschte Wirkungen

Bei Einnahme von H15TM auf nüchternen Magen kann es zu Übelkeit oder Widerwillen (eigenartiger Geschmack) gegen das Heilmittel kommen ¹⁰. Im Allgemeinen wird die Einnahme der Weihrauchpräparate gut vertragen, allerdings gibt es nur wenig Informationen über unerwünschte Nebenwirkungen. In klinischen Studien wurde vereinzelt über gastrointestinale Schmerzen, Hyperazidität, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen sowie Hautirritationen berichtet. Die Nebenwirkungen waren nach Absetzen der Präparate reversibel. Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln wurden bislang nicht beschrieben, aber vermutlich auch nicht systematisch untersucht.

Die akute Toxizität des Gummiharzes ist tierexperimentell sehr niedrig. 2 g/kg Körpergewicht per oral hatte bei Ratten und Mäusen innerhalb von 72 Stunden keine tödliche Wirkung ¹.

2.1.7 Plasmadaten

Die erste validierte analytische Methode zur Bestimmung von BAs im Plasma wurde von *Tawab et al.*⁵³ entwickelt. Diese Methode stellt eine Kombination aus Festphasenextraktion über eine Bond Elut C-8 Kartusche mit anschließender Flüssigchromatographie über eine LiChrospher[®] RP-18 Säule und UV-Detektion bei 250 nm dar. Durch diese HPLC-Methode lässt sich die Konzentration von KBA im humanen Plasma in einem Bereich von 0,1-2 µg /mL bestimmen. Eine zweite validierte Methode wurde von *Kaunzinger et al.*⁵⁴ entwickelt. Es handelt sich um eine GC/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von AKBA und KBA im humanen Plasma. Interner Standard (18 α -Glycyrrhetinsäure) und BAs wurden durch eine flüssig/flüssig-Extraktion aus dem Plasma entfernt, anschließend methyliert und mittels GC/MS im negativen Modus bestimmt. Durch diese Methode lässt sich die Konzentration von KBA in einem Bereich von 0,01-2 µg/mL Plasma bestimmen.

In einer kleinen Pilotstudie (unveröffentlicht) wurden die Plasmakonzentrationen von 6 Patienten nach der Einnahme einer therapeutisch relevanten Einzeldosis

von 4 Tabletten (= 1600 mg Extrakt) über einen Zeitraum von 8 Stunden bestimmt. Die gefundenen Konzentrationen für KBA lagen zwischen 350 und 1000 ng/mL (respektive 0,7-2,1 μM KBA). Beide Methoden lieferten hier vergleichbare Daten. Die Bestimmung der Plasmakonzentration von AKBA war mit der HPLC-Methode infolge eines höheren LLQ nicht möglich. Mit der GC/MS-Methode konnten AKBA-Konzentrationen von 50 bis 260 ng/mL (resp. 0,1-0,5 μM AKBA) bestimmt werden.

2.2 Blutzellen

Blutzellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, sind pluripotent und bilden zwei Linien von Vorläuferzellen. Aus den lymphoiden Stammzellen entwickeln sich die B- und T-Lymphozyten, aus den myeloischen Stammzellen die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Leukozyten lassen sich in Monozyten/Makrophagen sowie basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten unterteilen.

Die Entwicklung der Granulozyten erfolgt über zahlreiche Zellstadien unter dem Einfluss verschiedener Zytokine (SCF, IL-3, GM-CSF, G-CSF) bis hin zu reifen Zellen. Die Reifezeit beträgt etwa 5-10 Tage, die gesamte Lebenszeit 12-14 Tage. Ihre Verweildauer im Blut liegt nur bei ca. 14 Stunden, über 90% der reifen Granulozyten verbleiben daher im Knochenmark, von wo sie bei Bedarf (z.B. einer Infektion) sofort rekrutiert werden können. Die zahlenmäßig größte Untergruppe der Granulozyten bilden die neutrophilen Granulozyten (55-70%). Sie werden aufgrund ihrer vielgestaltigen Kerne (segmentkernig) auch als polymorphkernige Zellen (*polymorphonuclear leukocytes*, PMNL) bezeichnet.

Thrombozyten sind scheibenförmige Blutkörperchen mit einem Durchmesser von 1-4 μm , die im Knochenmark durch zytoplasmatische Abschnürung aus ihren Vorläuferzellen (Megakaryozyten) gebildet werden. Sie überleben im Blut etwa zehn Tage. Die Thrombozyten sind kernlos und damit nicht zur Proteinbiosynthese oder Zellteilung in der Lage, sie sind jedoch mit den Enzymsystemen der Glykolyse und der Atmungskette ausgestattet.

2.3 Entzündungsmechanismen und Leukozytenaktivierung

Dem Organismus stehen unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen zur Verfügung, an denen sowohl humorale als auch zelluläre Prozesse beteiligt sind.

Mechanische, chemische oder physikalische Einflüsse sowie Mikroorganismen führen meist lokal zu einer Gewebeschädigung. Die Zellen geschädigter Gewebe setzen dabei Entzündungsmediatoren wie biogene Amine (Serotonin, Histamin), Acetylcholin, Bradykinin, Prostaglandine (PGs), Leukotriene (LTs), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei.

Vielfach schließt sich an die ersten Entzündungsreaktionen eine Emigration von Blutzellen (Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) in den extrazellulären Raum sowie eine Proliferation von Histozyten (Gewebsmakrophagen) und Fibroblasten (Bindegewebezellen) an. Die Art der Entzündung wird von der Beschaffenheit der schädigenden Noxe, der Art der Erkennung durch das Immunsystem, den am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen sowie den freigesetzten Mediatoren bestimmt. Man unterscheidet Entzündungen nach der Entzündungsform (exudativ, serös, fibrinös, eitrig, proliferativ) und dem zeitlichen Ablauf (perakut, akut, subakut, chronisch). Chronische Entzündungen entwickeln sich häufig aus einer akuten Entzündung bei der die anfänglichen Abwehrreaktionen nicht in der Lage sind, die Schädigung zu beseitigen, oder bei denen die Schädigung anhält.

2.3.1 Entzündungsmediatoren

2.3.1.1 n-formylierte Peptide

Die Anreicherung inflammatorischer Zellen infolge einer bakteriellen Infektion kann u.a. darauf beruhen, dass bakterielle Abbauprodukte direkt als chemoattraktive Substanzen wirken. So haben n-formylierte Methionylpeptide wie z.B. das synthetische n-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten^{55, 56, 57}. Stimuliert man neutrophile Granulozyten mit fMLP, so erfolgt nach Bindung an GPCRs (*G-protein-coupled receptors*) des G_i-Typs^{58,59} oder G_q-Typs⁶⁰ eine Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade^{61, 62}.

^{63, 64} sowie der MKK3, p38 MAPK und MAPKAPK-2 (MK-2) ^{65, 66}, wohingegen JNKs nicht beeinflusst werden. Diese fMLP-induzierte ERK-Aktivierung erfolgt dabei über Pertussistoxin (PTX)-sensitive $G_{\alpha_{12}}$ -Proteine, die p38 MAPK Aktivierung dagegen vermutlich über die PTX-unempfindlichen $G_{\alpha_{16}}$ -Proteine ^{65, 67}.

(MAPK Kaskade siehe 2.7.4.; GPCR siehe 2.7.2)

Es konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit fMLP in humanen PMNL die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Phosphorylierung der NADPH-Oxidase über p38 MAPK, ERK1/2 und Proteinkinase C (PKC) erfolgt ^{117, 118, 119}. Des weiteren fand man, dass die Stimulation von menschlichen PMNL mit fMLP zur Phosphorylierung der cPLA₂ sowie zur Freisetzung von AA führt ⁶⁸.

2.3.1.2 Lipidmediatoren

Die Stimulation inflammatorischer Zellen durch Mediatoren oder opsonierten Erregern führt zur Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂), die neben Arachidonsäure (AA) auch den Vorläufer des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF), das Lyso-PAF, freisetzt. (cPLA₂ siehe 2.8.2.2)

Wie fMLP wirkt PAF ⁶⁹ als „Chemoattraktant“ für Monozyten, Neutrophile und Eosinophile und trägt durch Stimulation dieser Zellen dazu bei, einen inflammatorischen bzw. allergischen Prozess zu unterhalten. PAF ist an der Thrombozytenaktivierung beteiligt, verfügt über bronchokonstriktorische Wirkungen, erhöht die Gefäßpermeabilität und führt zum Blutdruckabfall ^{70, 71}. Eine exzessive PAF-Freisetzung führt zu Neurodegeneration ⁷², die durch vorbeugende Gabe des PAF-Antagonisten BN-53021, einem Ginkgolid aus *Ginkgo biloba*, verhindert werden kann. Die Wirkung von PAF erfolgt durch Bindung an einen GPCR des G_i- oder G_q- Typs ⁷³ über Phosphorylierung und Aktivierung der p38 MAPK- und ERK1/2-Kaskaden, sowie der Phospholipase C (PLC). Die PAF-induzierte ERK-Aktivierung ist PTX-sensitiv, wohingegen die p38 MAPK Aktivierung durch PTX nicht gehemmt werden kann ^{66, 74}. PAF ist hinsichtlich der 5-LO und der 5-LO aktivierenden MAPKAPKs ein schwacher Stimulus in PMNL, allerdings kann z.B. durch Zugabe von Natriumarsenit (genotoxischer Stress) die PAF-induzierte 5-LO Kinaseaktivität beträchtlich gesteigert und die 5-LO Produktbildung entsprechend erhöht werden ^{193, 284}. Darüber hinaus potenziert PAF zahlreiche, durch andere Mediatoren ausgelöste pathophysiologische

Effekte. So triggert PAF u.a. die fMLP-induzierte ROS-Bildung in Granulozyten⁷⁵, obwohl eine Stimulation mit PAF kaum zur Bildung von ROS führt^{66, 76}.

AA dient zum einen als Ausgangsstoff für eine breite Anzahl hoch potenter, bioaktiver Mediatoren, indem sie entweder durch die Cyclooxygenasen (COX) zu Prostaglandinen (PGD, PGE, PGF), Prostacyclin (PGI) und Thromboxan (TXA) oder durch die Lipoxygenasen (LO) zu den Leukotrienen (LTB₄, CysLTs) und Lipoxinen (LXs) biotransformiert wird. Zum anderen besitzt AA selbst die Funktion eines Mediators. So führt die Stimulation von PMNL mit AA zur Zellaggregation, Adhäsion ans Gefäßendothel, ROS-Bildung und zur Chemotaxis⁷⁷. AA aktiviert innerhalb kurzer Zeit die 5-LO Kinasen ERK1/2 (p44/42^{MAPK}) und MK2^{78, 79, 80}, führt zur Ca²⁺-Mobilisierung⁸¹ und induziert die 5-LO Translokation zur Kernmembran⁸². (*5-LO Aktivierung siehe 2.8.2.3*)

Von der COX sind bislang zwei Isoenzyme im Menschen identifiziert worden^{83, 84}, wobei COX1 konstitutiv in vielen Zellarten (Thrombozyten, Endothelzellen, u.a.) exprimiert wird und COX2 nur im Hirngewebe und Rückenmark konstitutiv vorkommt. Das COX2-Gen kann nach Induktion durch einen äußeren Stimulus in wenigen Minuten in Monozyten, Epithelzellen, Mastzellen oder Endothelzellen *de novo* exprimiert werden. COX-Produkte, die Prostanoiden, binden an spezifische GPCRs. Neben ihrer zentralen Rolle beim Schmerz- und Entzündungsgeschehen beeinflussen sie u.a. die Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur, die Thrombozytenaggregation sowie die Säure- und Schleimsekretion im Magen⁴¹.

Funktion der Leukotriene und Lipoxine siehe Abschnitt 2.8.1.

2.3.1.3 Zytokine

Zytokine sind körpereigene Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die vor allem proinflammatorische, immunregulatorische und die Hämatopoese steuernde Funktionen über spezifische membranständige Zytokin-Rezeptoren vermitteln⁸⁵. Sie werden von aktivierten Zellen nach entsprechender Stimulation freigesetzt. So sind PMNL in der Lage, die Zytokine IL-1/6/8/12, TNF- α , MIP-1 α /1 β zu bilden⁸⁶.

Die Zytokine lassen sich in die Gruppe der Interleukine (IL-1 bis 18), Interferone (IFN- α , β und γ), koloniestimulierende Faktoren (*colony stimulating factors*, CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF- α und β), TGF- β (*transforming-growth-factor- β*) und

Chemokine unterteilen. Ihre physiologische und pathophysiologische Wirkung ist sehr komplex. Zum Beispiel induziert IL-1, neben Fieber als endogenes Pyrogen und der Aktivierung von T- und B-Zellen, die Biosynthese von NO in Knorpelzellen^{87, 88, 89}. IL-3 und IL-5 steigern in eosinophilen Granulozyten die Bildung von Sauerstoffradikalen⁹⁰. GM-CSF, TNF- α und IFN- γ erhöhen sowohl die ROS-Bildung in Neutrophilen als auch die Biosynthese von NO in Makrophagen⁹¹. TGF- β zeigt dagegen antiinflammatorische Eigenschaften und unterstützt sowohl die Fibroblastenproliferation als auch die Wundheilung⁹².

Chemokine⁹³ bestehen aus kleinen proinflammatorischen Polypeptiden, die als chemische Lockstoffe für phagozytierende Zellen dienen („*chemoattractant cytokines*“). Ihre Wirkungen vermitteln sie über spezifische GPCRs⁹⁴. Wichtigstes Chemokin für die Granulozytenfunktion ist das IL-8, das von Neutrophilen selbst, von Makrophagen, T-Zellen oder Fibroblasten gebildet werden kann. Neben seinen chemotaktischen Eigenschaften regt IL-8 Neutrophile zur ROS- und NO-Bildung und zur Entleerung von Speichergranula an⁹⁵.

2.3.1.4 Komplement-Komponenten

Die mehr als 20 aktivierbaren Glykoproteine des Komplementsystems⁴¹ werden vor allem von Makrophagen und Leberzellen synthetisiert und sind Bestandteil der unspezifischen humoralen Abwehr. Die Aktivierung des Komplementsystems durch Antigen-Antikörper-Komplexe („klassischer Weg“) oder durch Kontakt mit Oberflächenstrukturen von Mikroben („alternativer Weg“) führt zur Bildung der „Opsonine“ C3b, C4b und C2a, die vor allem die phagozytotische Aktivität von Makrophagen und Granulozyten steigern. Außerdem werden die Anaphylatoxine C5a, C3a und C4a gebildet⁹⁶. Sie bewirken Spasmen der glatten Muskulatur (Bronchialspasmen), führen zur Steigerung der Permeabilität der Blutkapillaren und induzieren die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Ferner stimulieren sie Mastzellen, Basophile, Neutrophile und Thrombozyten zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren.

2.4 Neutrophile Granulozyten und ihre Funktionen ⁹⁷

2.4.1 Chemotaxis

Dringen beispielsweise Bakterien ins Körpergewebe ein, werden neutrophile Granulozyten durch chemische Reize zum Infektionsherd gelockt (Chemotaxis) ⁹⁸. Als Stimuli fungieren dabei u.a. bakterielle Proteine (fMLP), der Komplementfaktor C5a, IL-8 oder Leukotrien B₄, die an spezifische GPCRs ⁹⁹ der Granulozyten binden und zur Aktivierung verschiedener Signalwege führen. Unter anderem kommt es zur vermehrten Expression von Adhäsionsproteinen (z.B. CD11a/CD18) auf der Zelloberfläche von Granulozyten, zur ROS-Bildung und Degranulierung.

2.4.2 Phagozytose

Am Infektionsort nehmen Granulozyten Erreger endozytotisch auf, wobei das Phagosom (phagozytierter Erreger) mit den enzymhaltigen Lysosomen der PMNL verschmilzt. Die enthaltenen Proteasen oder Lysozyme schädigen zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies vor allem die Zellwand der Keime und führen letztendlich zur Abtötung der Krankheitserreger.

Damit der Granulozyt die zu phagozytierenden Keime erkennen kann, werden diese zuvor opsonisiert, d.h. die Erregeroberfläche wird entweder mit dem Komplementfaktor C3b und/oder mit antigenspezifischen Immunglobulinen (IgM, IgG) „markiert“. Gleichzeitig exprimieren Granulozyten spezielle Rezeptoren, um diese Opsonine binden zu können.

2.4.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), insbesondere Superoxidanionen (O_2^-), spielen bei der zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle. Die Hauptquelle der ROS ist die NADPH-Oxidase ¹⁰⁰, die als aktiviertes Enzym in der Zellmembran von Leukozyten lokalisiert ist. Sie überträgt freie Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wobei O_2^- entsteht. Als Elektronendonator dient NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat). Das entstandene O_2^- wird weiter durch die Superoxiddismutase (SOD) zum membranpermeablen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt, das weiter zum Hydroxylradikal OH^\bullet (Haber-Weiss-Reaktion/Fenton-Reaktion) reduziert wird.

Das Hydroxylradikal zählt zu den stärksten Oxidationsmitteln überhaupt und entfaltet seine biologische Wirkung im unmittelbaren Bereich seiner Entstehung. Sowohl $\cdot\text{O}_2^-$ als auch H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ sind zytotoxisch.

Enzyme wie Katalasen und Glutathionperoxidasen (GPx) entschärfen H_2O_2 (bzw. LOOH), um eine Schädigung der Granulozyten zu verhindern (Oxidationsschutz der Zelle).

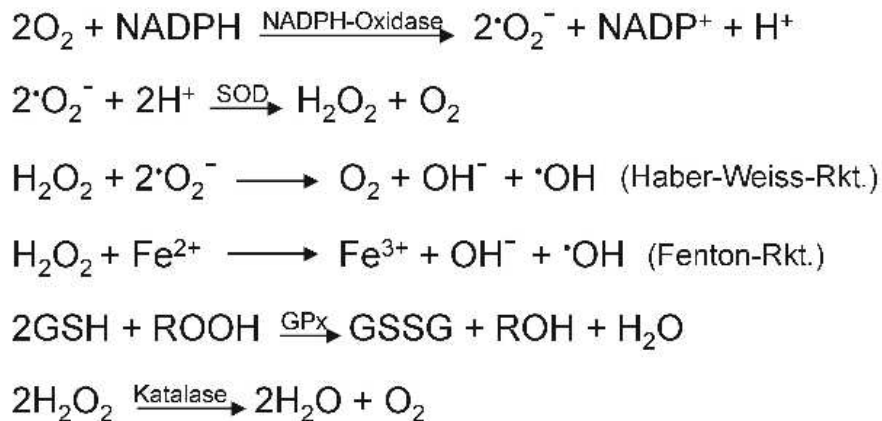


Abb. 3: Entstehung und mögliche Reaktionen von ROS

Bei der Invasion von Erregern werden auch andere körpereigene Zellen in Mitleidenschaft gezogen, da ROS wegen ihrer hohen Reaktivität praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zelle reagieren können. Liegt ein Ungleichgewicht zwischen ROS und zellulären Antioxidantien zugunsten der ROS vor, so bezeichnet man dies als „oxidativen Stress“. Dieser spielt in der Pathophysiologie und Progression von beispielsweise Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen, aber auch in der Hypertonie, bei Diabetes mellitus und bei Vorgängen des Alterns eine wichtige Rolle^{101, 102, 103}. Im Gegensatz dazu führt der genetisch bedingte Ausfall des NADPH-Oxidase-Enzymsystems zum Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (CGD), die durch eine wesentlich höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen gekennzeichnet ist¹⁰⁴.

2.4.3.1 Aufbau und Regulation der NADPH-Oxidase

Freie Radikale und andere reaktive Sauerstoffspezies spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der zellulären Immunantwort. Sie sind auch entscheidend an der zellulären Signaltransduktion als sogenannter „Second messenger“ beteiligt¹⁰⁵. Ihre Wirkungsweise erfolgt hier vermutlich durch Redox-Aktivierung von Proteinkinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren. Dadurch modulieren die ROS u.a. die Differenzierung und Proliferation von Zellen^{106, 107}.

Quellen von ROS sind die mitochondrialen und mikrosomalen Elektronentransportketten, die Xanthinoxidase, die Prostaglandin- und Leukotriensynthese, das Cytochrom-P450-System sowie die leukozytäre NADPH-Oxidase, die besonders an der Agonist-induzierten ROS-Bildung beteiligt ist.

Aktive NADPH-Oxidase stellt einen Multienzymkomplex (Abb. 4) dar, der aus den zytosolischen Komponenten p47^{phox} und p67^{phox} (*phagocyte oxidase*, phox) sowie dem heterodimeren transmembranären Flavocytochrom-b558-Protein, das wiederum aus den Untereinheiten gp91^{phox} und p22^{phox} gebildet wird, besteht^{100, 108, 109}. Kürzlich konnte neben p47^{phox} und p67^{phox} noch eine weitere zytosolische Untereinheit, die p40^{phox} nachgewiesen werden, deren Funktion bislang aber noch weitgehend unklar ist¹⁰⁰. Zum einen scheint sie die Affinität der p47^{phox} Untereinheit zum Flavocytochrom-b558¹¹⁰ zu erhöhen, zum anderen schränkt sie aber bei Bindung an den NADPH-Oxidase-Komplex die Radikalbildung ein¹¹¹.

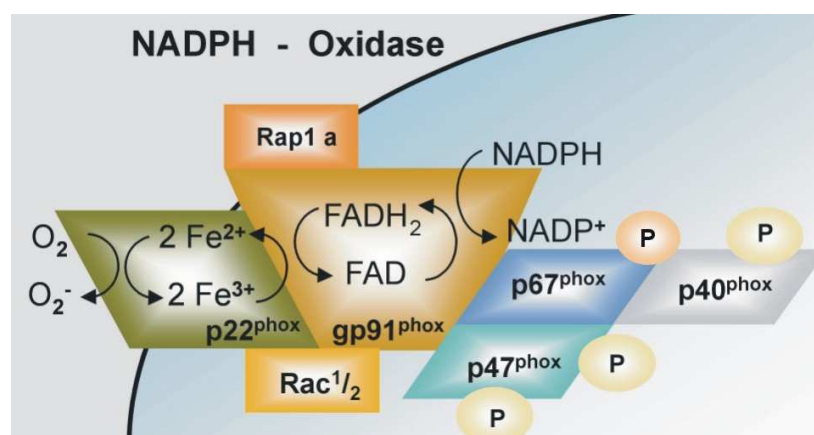


Abb. 4: Aufbau der NADPH-Oxidase im aktiven Zustand

In ruhenden Phagozyten ist die NADPH-Oxidase inaktiv und der Komplex in membrangebundene und zytosolische Untereinheiten gespalten. Erst nach Aktivierung (Abb. 5) erfolgt unter Beteiligung kleiner G-Proteine (Rac1/2, Rap1a) die Translokation der zytosolischen Komponenten zur Plasmamembran ¹¹².

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die p47^{phox}- als auch die p40^{phox}- und p67^{phox}-Untereinheiten während der Aktivierung von Neutrophilen phosphoryliert werden und anschließend zur Plasmamembran translozieren ^{113, 114, 115}. Die Phosphorylierungen verlaufen dabei hauptsächlich über die PKC ^{116, 117, 118}, es konnten aber auch p42/44^{MAPK} und p38 MAPK identifiziert werden ^{119, 120}.

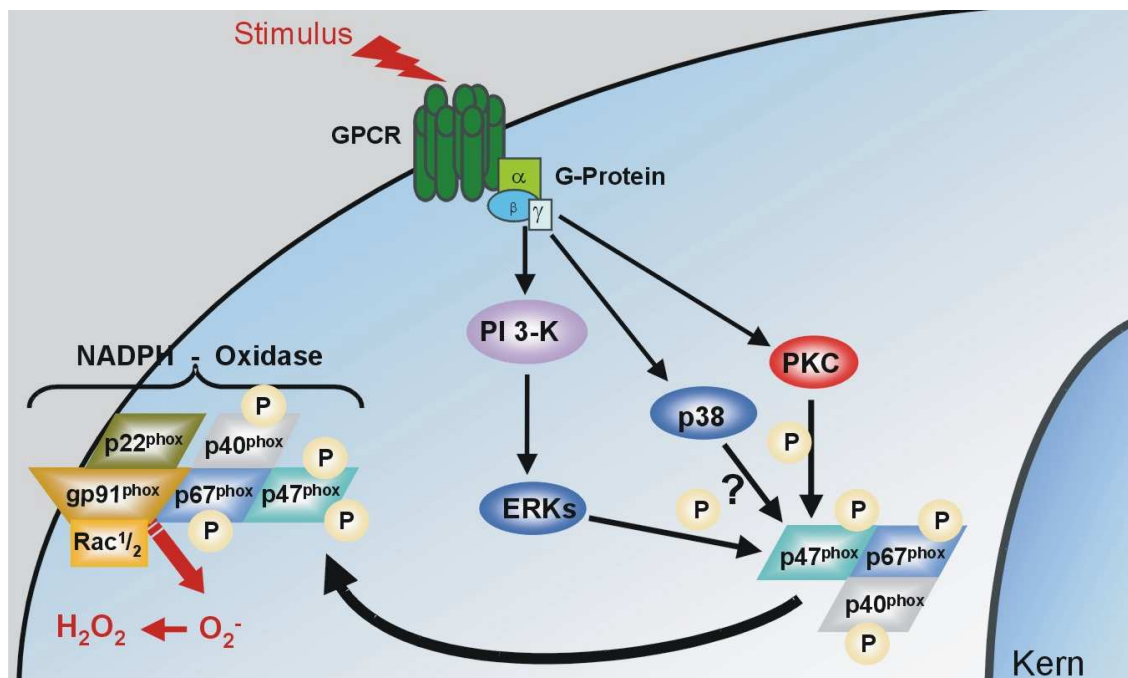


Abb. 5: Regulation der NADPH-Oxidase

2.5 Thrombozyten und ihre Funktionen

Zu den wesentlichen Funktionen der Thrombozyten zählt neben der Blutgerinnung mit der Fähigkeit zur Thrombozytenaggregation, die Phagozytose von kolloidalen Partikeln ¹²¹ und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ¹²². Ferner kann aus den Phospholipiden der Thrombozyten AA freigesetzt werden, die durch COX zu zyklischen Endoperoxiden oder durch die 12-LO zur 12-H(P)ETE umgewandelt werden kann. (*Lipidmediatoren siehe 2.3.1.2 und H(P)ETEs siehe 2.8.1.1.*)

2.6 HL60 Zellen und Mono Mac 6 Zellen

HL60 Zellen ¹²³ sind humane promyeloische Leukämiezellen, die zu reifen Zellen wie Granulozyten oder Makrophagen differenziert werden können. Durch Differenzierung mit DMSO und TGF- β /VD₃ erreicht man in HL60 Zellen eine mit Granulozyten vergleichbare Expression und Aktivität der 5-LO ¹²⁴.

MM6 Zellen ¹²⁵ sind humane Leukämiezellen, die phänotypische und funktionelle Eigenschaften reifer Monozyten besitzen. MM6 Zellen exprimieren zwar FLAP, aber keine 5-LO mRNA. Die Fähigkeit zur LT-Synthese wird erst nach Differenzierung der Zellen mit TGF- β und VD₃ erworben ¹²⁶. So kann nach zwei Tagen 5-LO Protein nachgewiesen werden, das allerdings weder in intakten Zellen noch in Homogenaten aktiv ist. Erst nach weiteren 24 - 48 Std. Zellreifung ist 5-LO Produktbildung in Zellhomogenaten und intakten Zellen detektierbar.

Sowohl in undifferenzierten HL60 Zellen als auch in nicht ausgereiften MM6 Zellen wurden selenabhängige Gluthathionperoxidasen (GPx) als endogene Inhibitoren der 5-Lipoxygenase identifiziert ¹²⁷. Nach vollständiger Differenzierung der Zellen wird die 5-LO Produktbildung deutlich weniger durch GPx gehemmt, obwohl paradoxerweise eine deutlich höhere Aktivität der GPx als in unreifen Zellen vorhanden ist. Vermutlich wird im Verlauf der Zellreifung ein Mechanismus induziert, der die 5-LO gegenüber der GPx-Aktivität zu schützen in der Lage ist. Weiterführende Experimente von *Bürkert et al.* ¹²⁸ zeigten eine Ca²⁺-abhängige Resistenz der 5-LO gegenüber der GPx-1 in MM6 Zellen.

2.7 Zelluläre Signaltransduktion in PMNL

Kommen extrazelluläre physikalische, chemische oder molekulare Signale an einer Zelle an, so werden sie in das Zellinnere übertragen, wo sie schließlich spezifische zelluläre Funktionen induzieren. Lipophile Signalmoleküle wie Steroidhormone können dabei die Zellmembran leicht durch Diffusion überwinden und an spezifische Rezeptoren im Zellinneren binden. Da die Zellmembran für hydrophile Moleküle wie Aminosäuren oder Peptide eine natürliche Barriere darstellt, binden diese an Rezeptoren der Zelloberfläche.

Entsprechend ihrer Funktionsweise unterscheidet man verschiedene Klassen von Zelloberflächen-Rezeptoren:

(I) **Liganden-gesteuerte Ionenkanäle:**

charakteristisch für schnelle synaptische Signalübertragung

(II) **Enzym-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren:**

besitzen eine intrazelluläre Domäne mit enzymatischer Aktivität, z.B. intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren

(III) **Transmembran-Rezeptoren mit assoziierter Tyrosin-Kinase-Aktivität:**

aktivieren nach Bindung eines Liganden eine Tyrosin-Kinase, die nicht auf dem Rezeptorprotein lokalisiert ist

(IV) **G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCRs):**

binden intrazellulär an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine), die nach Stimulation das Signal über Effektorproteine weiterleiten

2.7.1 Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs)

Ligand-aktivierte RTKs sind integrale dimere Membranproteine, die ein Signal durch intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung weiterleiten. Häufig handelt es sich bei den extrazellulären Stimuli um Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF), die einen regulierenden Einfluss auf die Zellproliferation ausüben. Als Folge der Ligandenbindung kommt es zur Autophosphorylierung und/oder zur Phosphorylierung von Substratproteinen, die über spezifische Phosphotyrosin-Bindungsdomänen (SH2-Domänen) an RTKs binden.

Bedeutende Effektormoleküle sind die Phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$)¹²⁹, die Adaptorproteine Shc und Grb2 der Ras-Signalübertragung¹³⁰ sowie die p85-Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI 3-K)¹³¹. So transloziert die $PLC\gamma$ nach Bindung über zwei SH2-Domänen an aktivierte RTKs zur Plasmamembran und damit zu ihrem Substrat, dem Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)¹³². Auch das Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), das in der Zelle mit dem Nukleotidaustauschfaktor Sos als Komplex vorliegt, wird durch direkte Bindung an RTKs (oder indirekt über ein zweites Adaptorprotein (Shc)¹³³) aus dem Zytosol zur Plasmamembran rekrutiert¹³⁴. Hier fördert Sos den Austausch des an Ras gebundenen GDP gegen GTP. In diesem Zustand kann dann Ras wiederum mit der Serin/Threonin-Kinase Raf (Ras-aktivierter Eaktor) interagieren, das daraufhin ebenfalls zur Membran transloziert^{135, 136}. Zur vollen Raf-Aktivierung sind neben Ras noch weitere Proteine (c-Src, PKC) an der Regulation beteiligt^{137, 138, 139}. Die genauen Zusammenhänge sind derzeit noch unklar. Aktiviertes Raf steht an erster Stelle der mehrstufigen MAPK-Kaskade¹⁴⁰. (MAPK siehe 2.7.4)

2.7.2 Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens von 7 Transmembran-Helices werden GPCRs auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Die mit dem Rezeptor gekoppelten G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer $G\alpha$ - sowie einer $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit. Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für GTP bzw. GDP und besitzt GTPase-Aktivität. Der $G\beta\gamma$ -Komplex verhindert die spontane Freisetzung von GDP¹⁴¹ und erhöht die Affinität zum GPCR¹⁴². Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch der $G\beta\gamma$ -Komplex interagieren direkt mit dem Rezeptor und sind über Lipidanker mit der Zellmembran assoziiert.

Über GPCRs werden die unterschiedlichsten Signale wie Licht, Geruchsstoffe, Fettsäurederivate, biogene Amine und Aminosäuren wahrgenommen. Durch Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, was in weiterer Folge zur Aktivierung des gebundenen G-Proteins führt, indem es den Austausch des im Ruhezustand gebundenen GDP zu GTP fördert. Nach erfolgter GTP-Bindung dissoziieren der $G\beta\gamma$ -Komplex und die $G\alpha$ -GTP-Untereinheit vom Rezeptor ab und aktivieren unabhängig voneinander Effektormoleküle.

Der frei vorliegende Rezeptor aktiviert weitere G-Proteine und erzielt somit eine Amplifikation des Signals. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird die Dauer der Signalwirkung bestimmt, d.h. nach der Hydrolyse des GTP zu GDP re-assoziiieren $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ zum inaktiven Heterotrimer.

Die **$G\alpha$ -Untereinheiten** mit einem Molekulargewicht von 39-52 kDa werden nach ihrer Sequenzhomologie und funktionellen Eigenschaften in die vier Subfamilien $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_q$ eingeteilt, dem entsprechend werden die G-Proteine als G_s -, G_i -, G_{12} - und G_q -Proteine bezeichnet ^{143, 144}.

G_s -Proteine stimulieren via $G\alpha_s$ -Untereinheit membranständige Adenylylcyclasen (AC), die die Umsetzung von ATP zu cAMP katalysieren ¹⁴⁵. cAMP bindet und aktiviert cAMP-abhängige Serin/Threonin-Kinasen, die auch als Proteinkinasen A (PKA) bezeichnet werden ¹⁴⁶. Charakteristisch für die Mitglieder der G_s -Familie ist ihre Hemmbarkeit durch das Cholera toxin ¹⁴⁷. Dieses katalysiert die ADP-Ribosylierung an $G\alpha_s$ und inaktiviert dessen GTPase-Aktivität. Dadurch bleibt das G_s -Protein konstitutiv aktiviert und die nachgeschalteten Effektormoleküle werden permanent stimuliert.

G_i -Proteine bilden mit ihren Isoformen (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_z , G_o , G_t , G_g) eine eigene Subfamilie, deren $G\alpha_i$ -Untereinheiten vorrangig AC inhibieren ¹⁴⁸. Darüber hinaus werden die Signale der G_i -Proteine häufig über $G\beta\gamma$ -Komplexe vermittelt. Die G_i -Proteine werden bis auf wenige Ausnahmen (z.B. G_z) durch Pertussistoxin (PTX) an der $G\alpha$ -Untereinheit ADP-ribosyliert ¹⁴⁷. Es kommt zur Entkopplung des G_i -Proteins von seinem transmembranären Rezeptor und verhindert damit die Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor.

G_{12} -Proteine (G_{12} , G_{13}) werden ubiquitär in geringen Mengen exprimiert ¹⁴⁹. Über ihre Funktion und ihren Wirkmechanismus ist bislang wenig bekannt. Für $G\alpha_{13}$ gilt jedoch eine Aktivierung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des monomeren GTP-bindenden Proteins Rho als gesichert ¹⁵⁰.

Die **G_q -Subfamilie** (G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} , G_{16}) stimuliert Phospholipase C β (PLC β)-Isoformen, die PIP₂ in IP₃ und DAG spalten ¹⁵¹. IP₃ bindet an ER an IP₃-Rezeptoren (Liganden-gesteuerte Ca²⁺-Kanäle) und induziert die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER ins Zytosol ¹⁵². Das in der Membran verbleibende DAG stimuliert

zusammen mit Ca^{2+} die Proteinkinase C (PKC), die unter Beteiligung von spezifischen RACK-Proteinen (Rezeptoren für aktivierte Protein Kinase C) zur Zellmembran transloziert ^{153, 154}. Auch Tumorpromotoren wie PMA (Phorbol-Myristat-Aacetat) binden mit hoher Affinität an PKC und aktivieren diese direkt und sehr spezifisch. Substrate der PKC sind die MARCKS-Proteine ¹⁵⁵ (Myristoyliertes, alaninreiches-C-Kinase-Substrat), die an der Änderung des Aktinzytoskelettes ¹⁵⁶ beteiligt sind, sowie andere mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine.

Der heterodimere **G $\beta\gamma$ -Komplex** der G-Proteine, stellt ein funktionelles Monomer dar ¹⁴². Bislang sind fünf Isoformen der G β -Untereinheit (G β_{1-5}) mit M_r von 35-39 kDa bekannt. Die G γ -Untereinheiten (12 Isoformen) sind mit 6-8 kDa dagegen deutlich kleiner. PLC β und AC können durch G $\beta\gamma$ -Komplexe, die meist von G $_i$ -Proteinen abstammen, reguliert werden ^{157, 158}. Darüber hinaus werden von G $\beta\gamma$ auch PLA₂ ¹⁵⁹, PI 3-K β ¹⁶⁰, PI 3-K γ ¹⁶¹, K⁺-Kanäle (in Gehirn und Herz) ¹⁶² sowie Raf1-Kinase ¹⁶³ aktiviert.

2.7.3 Phosphoinositid 3-Kinasen (PI 3-Ks)

Membranlipide wie Phosphatidylinositol (PI) und seine phosphorylierten Derivate (PIP, PIP₂, PIP₃) haben eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. PIP₂ kann durch PLC zu IP₃ und DAG gespalten werden. Andererseits ist aber auch eine Phosphorylierung des PIP₂ an der 3'-Position des Inositolrings durch G-Protein- oder RTK-aktivierte PI 3-Kinasen möglich. Dies führt zur Bildung von PIP₃, das die Translokation und Aktivierung verschiedener Proteine induzieren kann. So binden verschiedene Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Proteine der Rac/Rho-Familie (Mitglied der Ras-Superfamilie) spezifisch an PIP₃ ^{164, 165}. Einige PI 3-Ks können über ihre Proteinkinaseaktivität Signale weiterleiten, so wird vermutet, dass die PI 3-K γ die MAP Kinase ERK direkt durch Phosphorylierung stimuliert ¹⁶⁶. Auch wenn die Regulation und Funktion der PI 3-K noch nicht eindeutig geklärt ist, so gilt eine Beteiligung an zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung oder zytoskelettale Veränderungen als gesichert.

Allgemein lassen sich PI 3-Kinasen anhand ihrer Substratspezifität in drei Klassen einteilen: Mitglieder der Klasse 1 können *in vitro* PI, PIP und PIP₂ phosphorylieren, während Klasse 2 nur PI und PIP und Klasse 3 nur PI als Substrat akzeptiert ¹⁶⁷. Demnach erfolgt die Rezeptor-induzierte PIP₃-Bildung durch PI 3-Ks der Klasse 1.

Diese sind vorwiegend im Zytosol lokalisiert und bestehen aus einer etwa 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110) sowie einer kleineren (50-101 kDa) nicht-katalytischen Untereinheit. Sie sind empfindlich gegenüber Wortmannin, das die für die enzymatische Aktivität notwendige Bindung von ATP verhindert¹⁶⁸.

In Säugern kennt man vier p110-Isoformen (p110 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$), dementsprechend werden die Klasse 1 PI 3-Ks als PI 3-K $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ bezeichnet. PI 3-K $\alpha/\beta/\delta$ werden vor allem durch RTKs¹³¹ aktiviert, wohingegen PI 3-K γ typischerweise durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert wird¹⁶¹. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die in hämatopoetischen Zellen exprimierte PI 3-K γ in die Signaltransduktion inflammatorischer Prozesse durch Chemokine (IL-8) und chemotaktische Peptide (fMLP) involviert ist¹⁶⁹. Darüber hinaus zeigten PMNL von PI 3-K γ ^{-/-} Mäusen *in vitro* und *in vivo* eine verringerte ROS-Bildung und chemotaktische Migration nach Stimulation mit fMLP^{170, 171}.

2.7.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)

Die Familie der sogenannten „Mitogen-aktivierten Proteinkinasen“ (MAPKs) spielt eine besondere Rolle bei der Übertragung von Wachstumssignalen und Stressfaktoren ins Zellinnere¹⁷². Zu ihnen zählen die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2 bzw. p44/42^{MAPK}), die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK; c-Jun N-terminale Kinasen (JNK1/2/3) und p38 MAPK) sowie die „big“ MAPK (ERK5). Mitogene Signale werden vorrangig über den ERK-Weg vermittelt, während Stresssignale (UV-Licht, Hitze, osmotischer Schock) und Zytokine über den SAPK-Weg laufen¹⁷³. Aufgrund der Multivalenz einzelner Komponenten der Signalleitung können Signalwege miteinander koppeln („Crosstalk“), daher ist eine eindeutige Zuordnung des Signals zu einer bestimmten MAPK-Kaskade nur bedingt möglich. Zur Aktivierung müssen MAPKs sowohl an einem Threonin- als auch an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden, die lediglich durch eine Aminosäure getrennt sind. Katalysiert werden diese Phosphorylierungen von dual-spezifischen MAP Kinase Kinasen (MAPKK, MKK, MEK (MAPK/ERK Kinase)), die ihrerseits durch MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK, MKKK oder MEKK) stimuliert werden¹⁷⁴. Die Stärke und Dauer der MAPK Aktivität hängt einerseits von der Aktivierung der stromaufwärts gelegenen Proteinkinasen und andererseits von inaktivierenden spezifischen Phosphatasen ab¹⁷⁵.

Die „klassische“ MAPK-Kaskade führt über die Stimulation von RTKs zur Bindung von Grb2/Sos und in weiterer Folge zur Aktivierung der GTPase Ras. Alternativ ist eine Aktivierung von Ras auch durch $G\beta\gamma$ von G_i PCR möglich, indem diese u.a. über PI 3-K γ Shc aktivieren^{176, 329}, das mit Grb2/Sos einen aktiven Komplex eingeht¹⁷⁷. Ras wiederum interagiert mit Raf, welches hier die Funktion einer MAPKKK hat, indem es über MEK1/2 (MAPKK) die MAPK ERK1/2 aktiviert¹⁷⁸. Daneben kann Raf auch Ras-unabhängig aktiviert werden, indem es über $G\alpha_q$ zur Aktivierung von PKC kommt, die wiederum Raf stimuliert¹⁷⁹. ERK1/2 sind hauptsächlich an der Regulation der Differenzierung und Proliferation von Zellen beteiligt, indem sie entweder verschiedenartige zytoplasmatische Substrate (u.a. zytoskelettale Proteine, cPLA₂, MK1/3, 5-LO) phosphorylieren oder im Zellkern Transkriptionsfaktoren phosphorylieren¹⁸⁰.

Im Unterschied zur Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade ist über Signaltransduktionskomponenten der Stress-aktivierten MAPKs wenig bekannt. Man geht derzeit von folgenden vereinfachten Signalkaskaden aus: Bei der Stimulation des JNK-Wegs leiten die Rho-GTPasen¹⁸¹ Rac und Cdc42 das Signal weiter, indem sie zunächst GCKs (*germinal center kinase*) oder PAKs (*p21-activated kinase*)^{174, 182, 183} phosphorylieren, die wiederum über verschiedene MKKKs und MKK4/7 (MAPKK)^{184, 185} zur JNK1/2/3 Aktivierung führen. Im Zellkern aktivieren sie u.a. die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2¹⁸⁶. Die Aktivierung des p38-Wegs erfolgt nach Rezeptorstimulation ebenfalls über die Rho-GTPasen Rac und Cdc42, die durch Phosphorylierung von PAK über MKKKs und MKK3/6 zur Aktivierung von p38 MAPK führen^{187, 188}. Durch p38 MAPK werden im Kern die Transkriptionsfaktoren ELK1 und ATF2 angeschaltet, im Zytosol führen p38 MAPK u.a. zur Aktivierung von MAPKAPK2/3 (MK2/3)¹⁸⁹, die wiederum *Heat Shock Protein 27* (HSP27)¹⁹⁰, *Lymphocyte-Specific Protein* (LSP)¹⁹¹, *Serum Response Faktor* (SRF)¹⁹² sowie 5-LO¹⁹³ als Substrate haben.

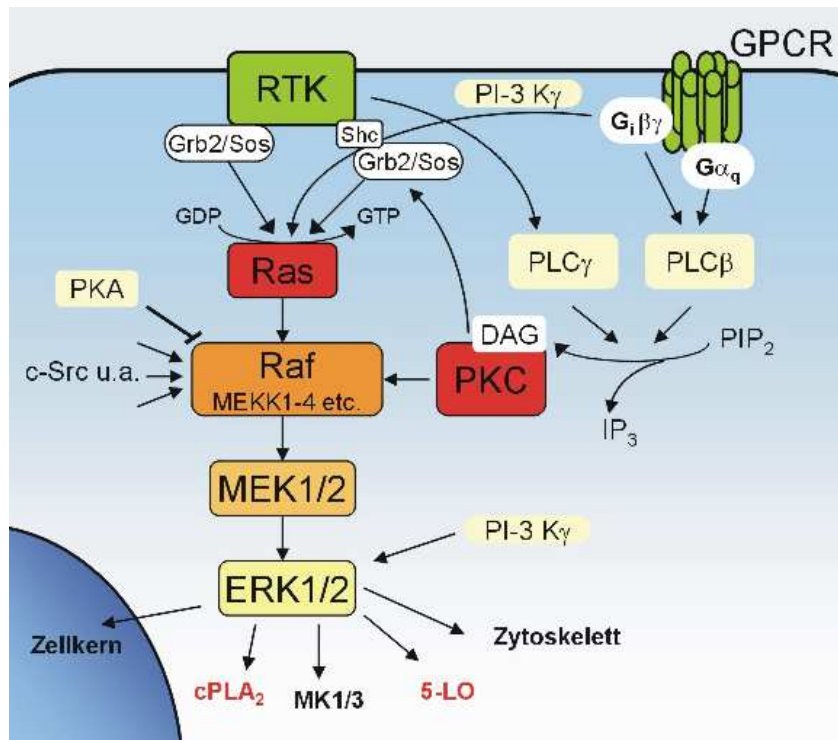


Abb. 6: Komponenten und Aktivierung des ERK-Wegs

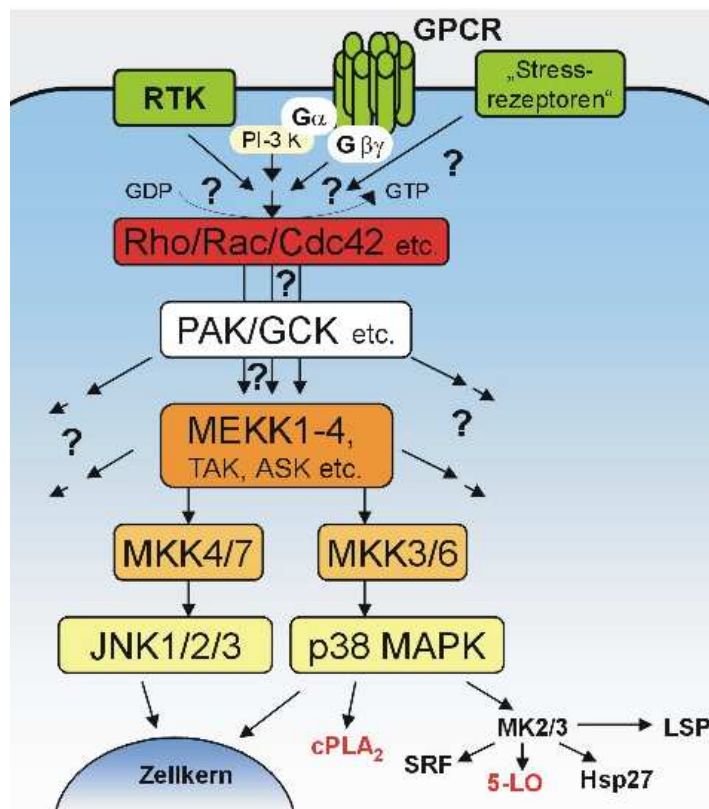


Abb. 7: Komponenten und Aktivierung des JNK- und p38-MAPK Wegs

2.8 Lipoxygenasen (LOs)

LOs findet man sowohl bei Mensch und Tier, als auch bei Pflanzen und Pilzen, nicht jedoch in Hefen und Bakterien¹⁹⁴. Die erste LO, die identifiziert werden konnte, war eine 15-LO. Sie wurde 1947 aus Sojabohnen isoliert und als Lipoxydase bezeichnet¹⁹⁵. Die erste 12-LO in Säugetieren wurde erst 1974 von M. Hamberg und B. Samuelsson gefunden, als sie humane Thrombozyten mit exogener AA inkubierten¹⁹⁶. 1976 wurde die 5-LO in Leukozyten des Kaninchens entdeckt¹⁹⁷. Die LOs sind definiert als eine Familie lipidperoxidierender Dioxygenasen, die den stereospezifischen Einbau von molekularem Sauerstoff in freie oder veresterte, mehrfachungesättigte C-18 oder C-20 Fettsäuren katalysieren. Strukturelle Voraussetzung ist eine Z,Z-1,4-Pentadien-Struktur¹⁹⁸.

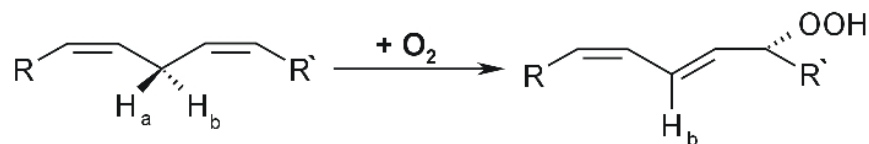


Abb. 8: Z,Z-1,4-Pentadien-Teilstruktur

Nahezu alle LOs enthalten ein nicht-hämgebundenes Eisen im aktiven Zentrum, das im inaktiven Zustand als Fe^{2+} und nach Aktivierung durch Hydroperoxide als Fe^{3+} vorliegt. Bevorzugtes Substrat von Säuger-LOs ist die Arachidonsäure (20:4), von Pflanzen-LOs dagegen die Linolsäure (18:2), sowie die Linolensäure (18:3). Im Säuger wird AA einerseits über die Nahrung aufgenommen, andererseits kann sie aus Linolsäure (essentiell) gebildet werden. Durch anschließende Veresterung mit Phospholipiden der Plasmamembran wird AA gespeichert, sodass die freie Konzentration im Plasma und Zytosol im Normalfall sehr gering ist.

LOs werden in der Regel nach der Position des Sauerstoffeinbaus in das Fettsäuremolekül benannt. Manche LOs sind jedoch nicht grundsätzlich Substrat- und positionsspezifisch. Sie werden daher nach ihrem Hauptprodukt bezeichnet. So ergeben sich als häufigste Varianten die 5-, 12- und 15-LO.

Je nach Herkunft werden die einzelnen Isoenzyme nochmals unterteilt. So wird die humane 12-LO in einen Thrombozyten- und einen (Leukozyten- oder) Epidermis-Typ differenziert. In ähnlicher Weise unterteilt man die 15-LO in einen Retikulozyten- und einen (Leukozyten- oder) Epidermis-Typ.

Wie im phylogenetischen Stammbaum der Säugetier-LOs (Abb. 9) zu erkennen ist, konnte man in Säugern bislang 5-, 8-, 12- und 15-LOs identifizieren, die vorrangig Produkte mit S-Konfiguration liefern. R-Konfigurierte Produkte bilden nur die beiden 12(R)-LOs vom epidermalen Typ, die in Mensch und Maus gefunden wurden. Eine 8(S)-LO konnte bislang nur in Mäusen nachgewiesen werden.

LOs sind monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa (in Säugern) bzw. 94-104 kDa (in Pflanzen). In der Protein Daten Bank findet man die Strukturen zweier LO-1^{199, 200} und einer LO-3²⁰¹ der Sojabohne, sowie der 15(S)-LO²⁰² aus Kaninchen-Retikulozyten, da bislang nur von diesen LOs Einzelkristalle für die Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden konnten.

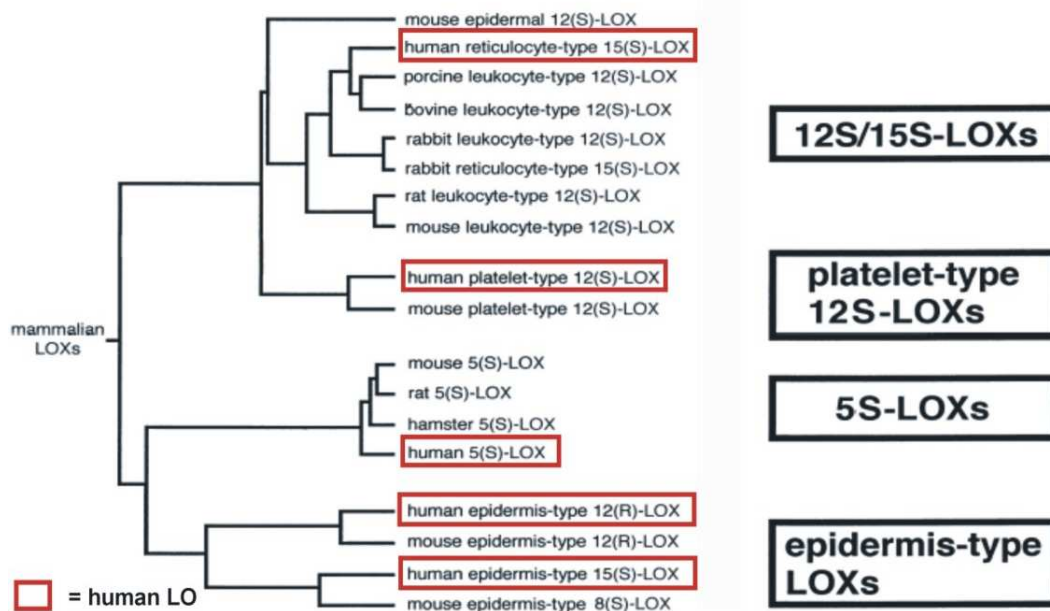


Abb. 9: Familie der Säugetier-Lipoxygenasen

Die humanen 5-, 12- und 15-LOs bestehen aus einer N-terminalen β -Faltblatt-Domäne (5-LO, aa 1-114) und einer C-terminalen Domäne (5-LO, aa 115-673), mit katalytischem Zentrum. Das zentrale Eisen ist weder über ein Häm noch über Eisen-Schwefel-Brücken gebunden, sondern wird vorwiegend über Histidinreste und dem Isoleucin des Carboxy-Terminus der Proteinkette koordiniert (His372, His550, Ile673)^{203, 204}. Als sogenannte flexible Liganden wurden das His367, Asn554 und ein Wasser-Molekül identifiziert²⁰⁵.

Die Strukturmodelle der LOs lassen eine „schuhförmige“ Substrat-Bindungsstelle erkennen, die je nach LO unterschiedlich groß ist. Die stereospezifische Einführung des Sauerstoffes in das Substrat richtet sich nach Art und Weise der Anordnung des Substrats in der Bindungsstelle^{202, 206}. Man geht davon aus, dass der Sauerstoffzutritt diffusionskontrolliert ohne spezifische O₂-Bindung an das Enzym erfolgt²⁰⁷. Eine zweite, möglicherweise regulatorische (allosterische), Bindungsstelle für Substrate und Produkte wie Fettsäure(hydroperoxide)^{208, 209, 210} gilt als gesichert. Auch für AKBA konnte eine Ca²⁺-regulierte allosterische Bindungsstelle identifiziert werden²².

Die N-terminale β -Barrel-Domäne der 5-LO bindet Ca²⁺ (2 Mol Ca²⁺/Mol 5-LO), das in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen die 5-LO *in vitro* und *in vivo* aktiviert^{211, 212}. Untersuchungen zeigten, dass die Ca²⁺-bindende β -Barrel-Domäne für eine Ca²⁺-vermittelte Membranassoziation²¹³ sowie einen Ca²⁺-abhängigen Schutz der 5-LO gegen die Inaktivierung durch GPx-1 verantwortlich ist¹²⁸. Neben Ca²⁺ bindet ATP im Verhältnis 1:1 an die 5-LO (eine Tatsache, die zur 5-LO Reinigung mittels ATP-Affinitätschromatographie²¹⁴ genutzt wird) und stimuliert deren katalytische Aktivität ohne dabei hydrolysiert zu werden²¹⁵. Interessanterweise weist die 5-LO Primärsequenz keine typischen Nukleotid-Bindungsstellen auf. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ATP-Analoga an zwei Tryptophanreste (W75 und W201) gebunden werden²¹⁶.

2.8.1 LO-Stoffwechsel der Arachidonsäure

Allen humanen LOs ist gemeinsam, dass sie zunächst durch ihre Oxygenaseaktivität die stereospezifische Bildung ihrer jeweiligen Hydroperoxyeicosatetraensäuren (5-, 12- und 15-HPETE) aus AA katalysieren, die in einer anschließenden Reaktion durch zelluläre GPx zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) reduziert werden können²¹⁷. Die 5-LO besitzt eine weitere enzymatische Aktivität, mit der sie unter Wasserabspaltung aus der 5-HPETE die Bildung des instabilen Epoxids Leukotrien A₄ (LTA₄) katalysiert (Synthaseaktivität).

In Neutrophilen und Monozyten katalysiert die LTA_4 -Hydrolase aus LTA_4 durch Einbau von Wasser die Bildung des LTB_4 . In eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie in Mastzellen wird LTA_4 durch Konjugation mit Glutathion zum $Cys-LTC_4$ und in weiterer Folge, durch Abspaltung von Glutamat und Glycin, zu LTD_4 und LTE_4 metabolisiert²¹⁷.

Neben diesen enzymatischen Reaktionen können aus LTA_4 auf nicht-enzymatischem Wege, ebenfalls durch Wassereinbau, die beiden 6-trans Isomere des LTB_4 (Epimere bezüglich des C-12 Atoms) entstehen²¹⁸.

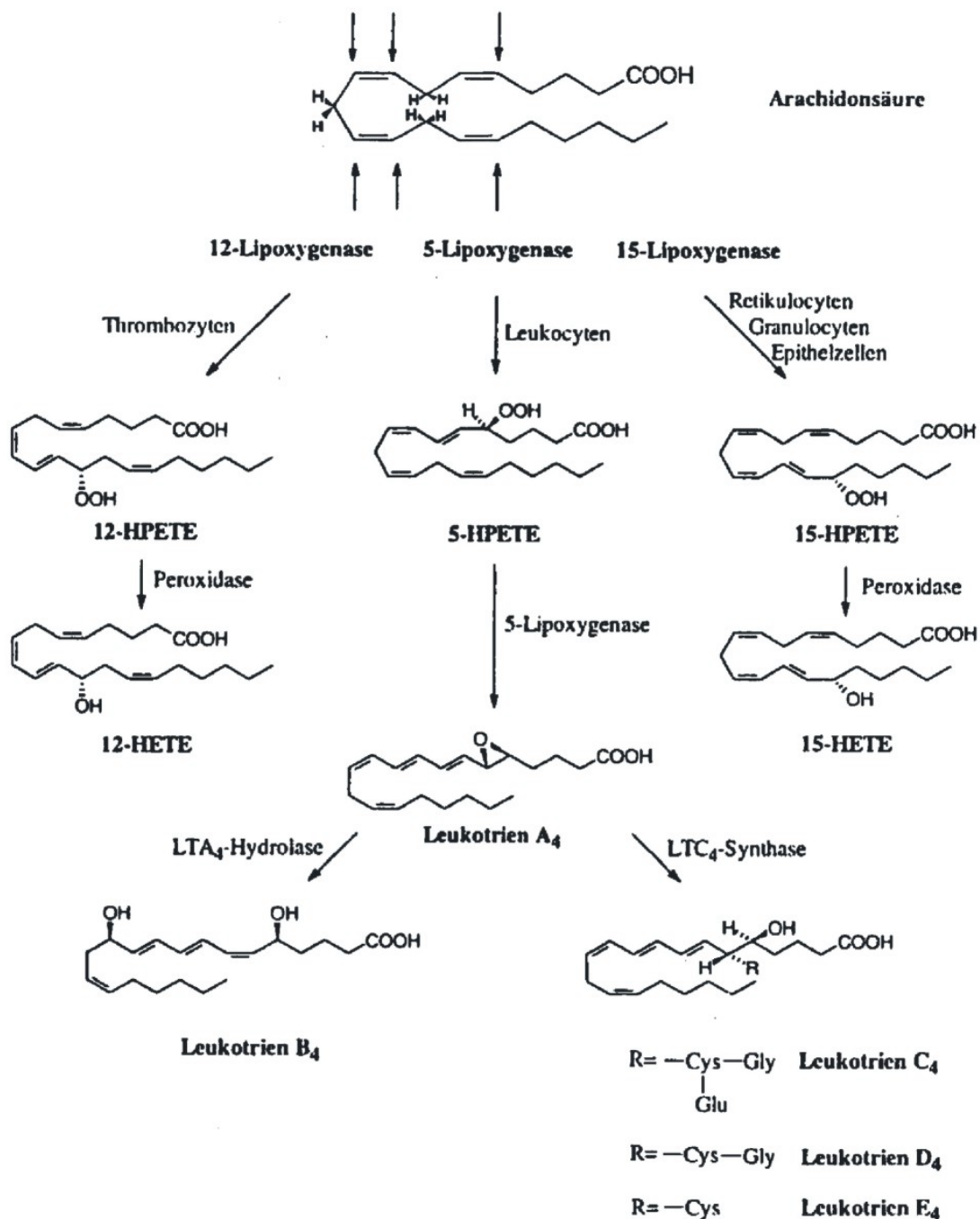


Abb. 10: LO-Stoffwechsel der Arachidonsäure

2.8.1.1 H(P)ETEs

Die physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen der einzelnen H(P)ETEs sind noch nicht vollständig geklärt, dennoch weisen viele Untersuchungen darauf hin, dass sie eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Artherosklerose und der Proliferation von Zellen spielen ²¹⁹.

Es konnte gezeigt werden, dass 12(S)-HETE und 12(S)-HPETE chemotaktisch auf humane Leukozyten, Fibroblasten und Keratinozyten wirken ^{220, 221}. Für die 12(S)-HPETE konnte eine Hemmung der AA- oder Thrombin-induzierten Plättchenaggregation ²²², für die 12(S)-HETE eine Stimulation der Thrombin-induzierten Aggregation gezeigt werden ²²³. Pathophysiologisch erhöhte 12(R)-HETE-Spiegel finden sich in der Haut von Psoriasispatienten ²²⁴, erhöhte 12(S)-HETE-Spiegel in Patienten mit essentieller Hypertonie ²²⁵. Ferner wurde über modulatorische Effekte der 12(S)-HETE in der Karzinogenese und der Metastatisierung von Pankreas-Krebszellen berichtet ²²⁶. Die 12-H(P)ETE induziert die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle ²²⁷, modifiziert das Zytoskelett ²²⁸ und spielt eine Rolle bei der Hemmung der Apoptose ²²⁹.

Für die 5(S)-HETE konnte eine Beteiligung an der Proliferation von Prostata-Krebszellen ²³⁰ sowie die Induktion anti-apoptotischer Signale in malignen Mesothelialzellen ²³¹ gezeigt werden. Die oxidierte Form der 5(S)-HETE, die 5-Oxo-EETE, wirkt stimulierend auf Chemotaxis, Aktinpolymerisation und Ca^{2+} -Mobilisierung in Eosinophilen und Neutrophilen und stimuliert die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b/CD18 auf der Zelloberfläche von PMNL ^{232, 233}.

Für die 15-HETE konnte gezeigt werden, dass sie direkt die Aktivität der 5-LO zu hemmen vermag ²³⁴. Darüber hinaus wird eine Beteiligung an der arteriellen Vasokonstriktion und Vasorelaxation ²³⁵, der Psoriasis ²³⁶ sowie der Entstehung einer Lungenentzündung ²³⁷ diskutiert.

12(S)-H(P)ETE, 15(S)-H(P)ETE und LTB_4 werden als Agonisten eines endogenen Vanilloid (Capsaicin)-Rezeptors in Schmerzneuronen diskutiert ²³⁸.

2.8.1.2 Lipoxine (LX)

Lipoxine (*lipoxigenase interacting products*) entstehen durch den gemeinsamen Angriff der 5- bzw. 15-LO aus AA. So wird das Lipoxin A₄ (LXA₄) entweder aus dem LTA₄ durch Metabolisierung mittels 15-LO oder aus der 15S-H(P)ETE mittels 5-LO gebildet^{239, 240}. Im Gegensatz zu allen anderen Eicosanoiden verfügen die LXs über antiinflammatorische Eigenschaften, die sie über GPCRs vermitteln²⁴¹. Darüber hinaus sind sie in der Lage, die LTD₄-Effekte an Cys-LT-Rezeptoren zu antagonisieren²⁴². Interessanterweise kann ein Stereoisomer des LXA₄ durch einen gemeinsamen Angriff einer Aspirin-acetylierten COX-2 und der 5-LO entstehen. Die Aspirin-Acetylierung bewirkt eine Änderung der katalytischen Aktivität der COX und es kommt zur Bildung von 15*R*-HETE, das der 5-LO als Substrat dient. Das entstandene 15-epi-LXA₄ ist in seiner antiinflammatorischen Wirkung potenter als LXA₄. Diese Tatsache lässt auf eine weitere entzündungshemmende Wirkung von Aspirin schließen²⁴³.

2.8.1.3 Leukotrien B₄ (LTB₄) und Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LTs)

Leukotrien B₄^{217, 244} stellt ein potentes Chemotaktikum und Chemokinetikum für Phagozyten dar, das bevorzugt in Makrophagen und Neutrophilen gebildet wird. Darüber hinaus ist LTB₄ ein bedeutender Aktivator der Leukozytenfunktion. Es stimuliert die Akkumulation und Aggregation von PMNL und erhöht deren Adhäsion an das Gefäßendothel. Des Weiteren induziert es die lysosomale Enzymfreisetzung sowie die ROS-Produktion in PMNL. LTB₄ gilt daher als pathophysiologischer Mediator für chronisch-entzündliche Erkrankungen.

Die „*Slow Reacting Substance of Anaphylaxis*“ (SRS-A) wurde als komplexes Gemisch aus Cys-LT C₄, D₄ und E₄ identifiziert²⁴⁵. Neben ihrer konstriktorischen Wirkung auf die Bronchialmuskulatur, die glatte Muskulatur des Darms, der Arteriolen und Koronargefäße, erhöhen sie die Gefäßpermeabilität und verstärken die bronchiale Schleimproduktion. Somit sind Cys-LTs vor allem an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt²⁴⁶. Die biologischen Wirkungen von LTB₄ und Cys-LTs werden über spezifische Rezeptoren, die zur Gruppe der GPCRs gehören, weitergeleitet. Für das LTB₄ sind bislang zwei Rezeptoren bekannt; BLT₁ wird hauptsächlich in Leukozyten exprimiert, BLT₂ ist ubiquitär vorhanden.

Je nach Zelltyp koppeln die Rezeptoren an G_{α_i} - oder G_{α_q} - Proteine ²⁴⁷. LTB_4 wurde als Ligand des $PPAR_{\alpha}$ (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor α) identifiziert, einem Transkriptionsfaktor, der als antiinflammatorischer Regulator an Entzündungsreaktionen beteiligt ist ^{248, 249}.

Als Cys-LT-Rezeptoren konnten bislang zwei verschiedenartige Rezeptortypen identifiziert und kloniert werden. $CysLT_1$ wird verstärkt in Leukozyten, in der Bronchialmuskulatur und den vaskulären Endothelzellen exprimiert, wohingegen $CysLT_2$ vorrangig in der Lunge, der Nebenniere und der Milz vorkommt ²⁴⁷.

2.8.2 5S-Lipoxygenase

5-LO wird im wesentlichen in Zellen myeloider Herkunft exprimiert. Man findet sie in Granulozyten, Mastzellen, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten, während T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten kein 5-LO Enzym aufweisen. Verschiedene Zytokine ($TGF\beta$, GM-CSF) führen zur Hochregulierung der zellulären 5-LO Expression und der 5-LO Aktivität in MM6 und HL60 Zellen (siehe 2.6). In unstimulierten Zellen befindet sich die 5-LO je nach Zelltyp im Zytosol (PMNL, Monozyten, differenzierte HL60/MM6 Zellen) oder in löslichen Kernkompartimenten (Alveolarmakrophagen, basophile Leukämiezellen der Ratte, Langerhanszellen der Haut) ²¹⁵. Nach Zellstimulation transloziert die 5-LO zur Kernmembran und kolokalisiert mit $cPLA_2$ und FLAP (5-LO activating protein).

2.8.2.1 Stimulierende Faktoren der 5-LO

Ca^{2+} bindet im Verhältnis 2:1 an die N-terminale β -Barrel-Domäne und erhöht die Lipophilie der 5-LO ²¹². Dies begünstigt die Bindung an Phospholipide (z.B. Phosphatidylcholin-Vesikel) ²⁵⁰ und stimuliert die Translokation und Assoziation mit der Kernmembran ^{251, 252}. Die maximale Aktivität des gereinigten Enzyms liegt bei 4-10 μM Calcium ²¹², während in intakten Zellen schon 200-400 nM Ca^{2+} zur vollen Aktivierung ausreichen ²⁵³. Ähnliche stimulierende Effekte wurden mit hohen Konzentrationen an Mg^{2+} (~4 mM) beobachtet ²⁵⁴.

ATP erhöht in Abhängigkeit von Ca^{2+} die katalytische Aktivität des Enzyms um etwa 2- bis 6-fach mit K_a -Werten von 30-100 μM . Andere Nukleotide wie ADP, AMP, cAMP, CTP und UTP binden ebenfalls an die 5-LO, zeigen aber wesentlich schwächere Effekte^{216, 255, 256}. ATP wird während der Stimulation der 5-LO nicht hydrolysiert, somit kann eine Autophosphorylierung oder ein Mechanismus unter Energieverbrauch ausgeschlossen werden²⁵⁷.

Gereinigte 5-LO wird durch **Membranfraktionen** stabilisiert und die Aktivität erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass ein membranassoziierter, hitzestabiler Faktor durch Phosphatidylcholin-Liposomen ersetzt werden konnte, wohingegen Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol oder DAG als stimulatorische Faktoren ausgeschlossen werden konnten^{252, 258}.

Eine weitere Voraussetzung für die Aktivierung der 5-LO ist der zelluläre Redoxstatus, da eine Oxidation des Fe^{2+} zum Fe^{3+} im aktiven Zentrum erfolgen muss. Stimulierend auf die zelluläre LT-Synthese wirken daher **ROS und LOOH**. In Zellhomogenaten konnte für 5-HPETE, 12-HPETE und 13-HPODE eine Enzymaktivierung festgestellt werden, wohingegen anorganische Hydroperoxide wie H_2O_2 kaum zur Aktivierung der 5-LO führten²⁵⁹. Selenabhängige GPx, die für niedrige zelluläre Peroxidlevel sorgen, üben einen hemmenden Effekt auf die 5-LO Aktivität aus^{260, 261}. Obwohl LOOH zur Bildung des aktiven Enzyms benötigt werden, können diese vor allem bei anhaltender Exposition und hohen Konzentrationen zu einer schnellen Inaktivierung der 5-LO führen^{262, 263}.

2.8.2.2 FLAP, Phospholipase A₂, LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase

Das **5-LO aktivierende Protein (FLAP)** ist ein fettsäurebindendes 18 kDa Membranprotein. Durch Studien mit FLAP-Inhibitoren (MK886, Bay-X1005) und FLAP^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass FLAP für die zelluläre LT-Synthese essentiell ist, wohingegen in zellfreien Systemen FLAP für die katalytische Aktivität der 5-LO nicht benötigt wird²⁶⁴. Man geht davon aus, dass FLAP den Substrattransfer zur 5-LO optimiert, ohne direkt mit der 5-LO zu assoziieren²⁶⁵. FLAP wird in vielen myeloiden Zellen (Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten, PMNL) zusammen mit 5-LO exprimiert. Daneben findet man es auch in 5-LO negativen Zellen (u.a. undifferenzierte HL60 Zellen, T-Zellen)²⁶⁶.

Die Familie der **Phospholipase A₂** umfasst die Gruppen der sekretorischen PLA₂ (sPLA₂), der zytosolischen PLA₂ (cPLA₂), der Ca²⁺-unabhängigen PLA₂ (iPLA₂) und der PAF-Acetylhydrolasen (PAF-AH), die Phospholipide in der sn-2 Position zu freien Fettsäuren (z.B. AA) und Lysophospholipiden spalten²⁶⁷. Bislang sind 19 Mitglieder dieser Familie in Säugetieren identifiziert worden. Die Gruppe der sPLA₂ umfasst 10 Isoenzyme mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa. Ihre Aktivierung ist Ca²⁺-abhängig und im Gegensatz zur cPLA₂ unterscheiden sPLA₂ nicht zwischen den unterschiedlichen sn-2 Fettsäuren. Sie sind u.a. bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen und Infektionen, nach operativen Eingriffen und schweren Traumen, sowie bei Atherosklerose involviert. Die Gruppe der cPLA₂ umfasst drei Isoenzyme mit Molekulargewichten zwischen 60 und 114 kDa. cPLA₂ ist im Säugerorganismus weit verbreitet und wird in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert. Unter den verschiedenen Isoformen der PLA₂ spielt die 85 kDa cPLA₂ eine zentrale Rolle bei der Freisetzung der AA zur Synthese von Eicosanoiden. Die intrazelluläre Aktivierung der cPLA₂ wird durch Ca²⁺ und/oder Phosphorylierung u.a. an Ser505 durch ERK und p38 MAPK sowie an Ser727 durch MNK-1 reguliert^{268, 269}. Die im N-Terminus der cPLA₂ befindliche Bindungsdomäne für Ca²⁺ und Phospholipide spielt eine zentrale Rolle bei der Ca²⁺-abhängigen Translokation und Interaktion der cPLA₂ mit Membranen und Phospholipidvesikeln^{270, 271}. Die Phosphorylierung der cPLA₂ scheint für die Aktivität essentiell zu sein, wenn der Stimulus nur zu einem moderaten und vorübergehenden Ca²⁺-Einstrom führt. Auch Agonisten wie Okadainsäure oder PMA, die zu keinem Anstieg der Ca²⁺-Konzentration, aber zu einer starken MAPK Aktivierung führen, sind in der Lage, die AA-Freisetzung zu stimulieren²⁶⁸. Bei Stimuli wie Ca²⁺-Ionophor, die zu einem starken und anhaltenden Ca²⁺-Einstrom führen, ist eine Phosphorylierung nicht zwingend erforderlich²⁷². Obwohl Ca²⁺ und MAPKs die cPLA₂-Aktivität regulieren, ist der Zusammenhang zwischen Translokation, Phosphorylierung und AA-Freisetzung nicht vollständig geklärt. So wurde einerseits festgestellt, dass SB203580 (p38 MAPK Inhibitor) die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der cPLA₂ in Thrombozyten verhindert, die AA-Freisetzung jedoch nicht beeinflusst²⁷³. Andererseits ist U0126 (MEK-Inhibitor) in der Lage, die AA-Freisetzung in MDCK Zellen signifikant zu reduzieren, ohne dabei Einfluss auf Phosphorylierung oder Translokation der cPLA₂ zu haben²⁷⁴.

Neben Ca^{2+} und Phosphorylierung scheinen daher alternative Mechanismen in die cPLA₂-Aktivierung involviert zu sein.

LTA₄-Hydrolase ist ein zinkhaltiges 69 kDa Protein, das die stereospezifische Hydrolyse des Epoxids LTA₄ zum LTB₄ katalysiert. Darüber hinaus besitzt sie Aminopeptidase-Aktivität, die durch Chlorid-Ionen oder Albumin stimuliert werden kann^{275, 276}. Die LTA₄-Hydrolase ist in Säugern weitverbreitet und wurde in nahezu allen Geweben und Blutzellen gefunden.

LTA₄ kann weiterhin durch Konjugation mit Glutathion zum Cys-LTC₄ metabolisiert werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch die **LTC₄-Synthase** (Glutathion-S-Transferase), einem 18 kDa großen homodimeren Membranprotein, welches hauptsächlich in Thrombozyten, Eosinophilen und Mastzellen exprimiert wird²⁷⁷.

2.8.2.3 Regulation der zellulären 5-LO Aktivität

Aktivierung durch Calcium

Stimuliert man Leukozyten mit Stimuli wie Ca^{2+} -Ionophor oder Thapsigargin, so kommt es aufgrund eines raschen und hohen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Synthese beträchtlicher Mengen an 5-LO Produkten. Die 5-LO wird dabei innerhalb von 1-2 Min. „Suicide-inaktiviert“^{218, 262, 263}. Die Stimulation mit natürlichen Liganden wie fMLP, PAF, IL-8, C5a oder Zymosan, die zu einer moderaten Ca^{2+} -Erhöhung führen, resultiert in einer geringeren LT-Synthese²⁷⁸.

Durch Vorbehandlung der Leukozyten mit sogenannten „Priming-Agentien“ (Phorbolestern, Zytokinen, Wachstumsfaktoren), die alleine nicht in der Lage sind die 5-LO Aktivität oder Translokation zu induzieren, kann die LT-Synthese durch Stimulation mit natürlichen Liganden stark erhöht werden²⁶⁶. Unter diesen Bedingungen wird die cPLA₂-Aktivität und damit die AA-Freisetzung stark erhöht, was nahe legt, dass das erhöhte Substratangebot für die gesteigerte 5-LO Produktbildung verantwortlich ist. „Priming“-Versuche mit PMA und LPS in PMNL und MM6 Zellen lieferten aber auch Hinweise darauf, dass die Assoziation und Translokation der 5-LO zur Kernmembran hochreguliert wird^{82, 279}.

Aktivierung durch Phosphorylierung

Obwohl eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einen gesicherten Mechanismus für die Translokation und Aktivierung der 5-LO darstellt, wurden schon länger alternative zelluläre Aktivierungsmechanismen vermutet. Da neben Ca^{2+} auch die Phosphorylierung einen wichtigen biochemischen Mechanismus zur Regulation einer Vielzahl intrazellulärer Enzyme und Transkriptionsfaktoren darstellt und die Primärsequenz der 5-Lipoxygenase über eine Anzahl von Phosphorylierungsmotiven für Proteinkinasen (p42/44^{MAPK}, PKA, PKC, CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase), MAPKAPK-2/3 etc.)²⁸⁰ verfügt, vermutete man auch für die 5-LO eine Enzymphosphorylierung. In der Tat konnten kürzlich sowohl Phosphorylierungen am Ser271 durch die p38 MAPK-abhängige MAPK-aktivierte Proteinkinase2 (MK2), als auch am Ser663 durch die p42/44^{MAPK} als Mechanismen der 5-LO Aktivierung identifiziert werden. Das Ausmaß der Phosphorylierung wird durch Zugabe von AA oder anderen ungesättigten Fettsäuren (UFS) stark gesteigert^{79, 208}.

Die Phosphorylierungsvorgänge erweisen sich für eine 5-LO Aktivierung als weniger wichtig, wenn die Ca^{2+} -Spiegel auf Werte > 200 nM ansteigen^{79, 281, 282}. Kinetikanalysen zeigten deutliche Unterschiede zwischen Phosphorylierungs-induzierter (AA, Zellstress) und Ca^{2+} -induzierter (Ionophor) 5-LO Aktivierung auf. So scheint die 5-LO Aktivierung durch Phosphorylierung bei mäßiger Ca^{2+} -Mobilisierung eher einem physiologischen Mechanismus zu entsprechen, der zu einer verzögerten, langanhaltenden und moderaten LT-Synthese führt^{283, 284}.

Folgende Kaskade der 5-LO Aktivierung in PMNL wird angenommen:

Werden Zellen durch extrazelluläre Faktoren (Ionophor, AA, chemotaktische Faktoren, Zellstress etc.) stimuliert, so führt dies zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und/oder zur Aktivierung der 5-LO Kinasen p42/44^{MAPK} und MK2. Dadurch wird zunächst die cPLA₂ aktiviert und AA freigesetzt. In Anwesenheit freier AA phosphorylieren p42/44^{MAPK} und MK2 die 5-LO effizient, wodurch das Enzym aktiviert wird. Alternativ bzw. synergistisch kann die 5-LO durch Bindung von Ca^{2+} direkt aktiviert werden. Unabhängig von der Art der Stimulation transloziert nun die 5-LO zur Kernmembran, wo AA als Substrat durch FLAP bereitgestellt wird und die LTA₄-Synthese beginnen kann.

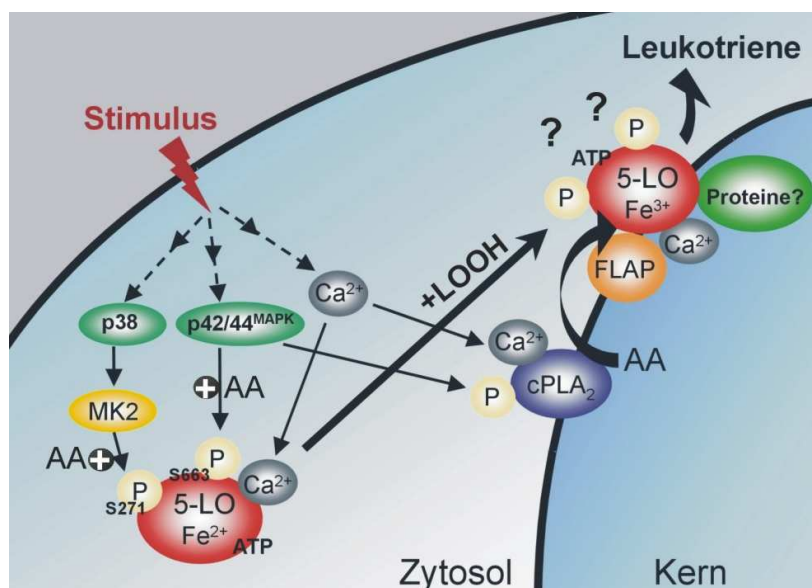


Abb. 11: Zelluläre 5-LO Aktivierung in PMNL

Der Aktivierungsmechanismus der 5-LO in PMNL ist jedoch nicht ohne weiteres auf alle Zelltypen übertragbar. So erwies sich die 5-LO Phosphorylierung in differenzierten Mono Mac 6 Zellen durch p42/44^{MAPK} und MK2 ohne gleichzeitige Mobilisierung von Ca²⁺ und Translokation zur Kernmembran als nicht ausreichend für die 5-LO Produktbildung^{79, 283}.

Neben Ca²⁺-Mobilisierung und 5-LO Phosphorylierung sind zusätzliche, bislang noch unbekannte Mechanismen zur 5-LO Aktivierung nicht auszuschließen. Werden intakte PMNL mit OAG (membrangängiges DAG-Derivat) stimuliert, so resultiert zwar eine beträchtliche 5-LO Produktbildung, die jedoch unabhängig von Ca²⁺, MAPK und PKC ist. Darüber hinaus ist OAG weder in der Lage die endogene AA-Freisetzung, noch die Translokation der 5-LO zu induzieren. Somit scheinen der OAG-induzierten 5-LO Aktivierung völlig neuartige Mechanismen zu Grunde zu liegen²⁸⁵.

2.8.2.4 Pharmakologie der Anti-LT Therapie

Die Anti-LT Therapie basiert auf zwei grundlegenden Strategien:

- (I) Hemmung der LT-Synthese
- (II) Suppression der LT-Wirkung durch LT-Rezeptorantagonisten

Die Blockierung der LT-Synthese kann prinzipiell durch folgende Ansätze erfolgen:

- (I) Hemmung der cPLA₂
- (II) Hemmung von FLAP
- (III) direkte Inhibition der 5-LO

Cys-LT-Rezeptorantagonisten binden mit hoher Affinität an Cys-LTR und verhindern damit die Effekte von LTC₄, D₄ und E₄. Montelukast (Singulair®) ist der erste Vertreter dieser Wirkstoffklasse, der 1998 in Deutschland auf den Markt gekommen ist. Damit wurde ein neues Wirkprinzip zur Anfallsprophylaxe bei Asthma bronchiale eingeführt. Zwei weitere Substanzen dieser Klasse sind in anderen Ländern bereits auf dem Markt (Zafirlukast [USA: Accolate®] und Pranlukast [Japan: Ultair®]) oder befinden sich noch in der Entwicklung (z. B. Pobilukast, Verlukast, Tomelukast, Iralukast)²⁸⁶.

Die cPLA₂ stellt theoretisch ein attraktives Target für die Entwicklung anti-inflammatorischer Substanzen dar, da man sich eine Hemmung der gesamten AA-Kaskade und somit eine erhöhte therapeutische Wirkung verspricht. Doch bislang hat es außer den Glucocorticoiden keine Substanz mit diesem Wirkprinzip zur Zulassung geschafft.

FLAP-Inhibitoren (MK886, MK0591, Bay-X1005) hemmen die LT-Synthese, indem sie AA und andere UFS aus ihrer Bindungsstelle an FLAP verdrängen und somit den Substrat-Transfer zur 5-LO blockieren. Im Gegensatz zu Untersuchungen an isolierten Zellen, erwiesen sich FLAP-Inhibitoren im Vollblut-Assay als 50-200fach weniger wirksam und konnten in klinischen Studien bislang nicht überzeugen.

Die Hemmstoffe der 5-LO lassen sich folgende Gruppen unterteilen:

- (I) Redoxaktive 5-LO Inhibitoren
- (II) Eisenligandinhibitoren
- (III) Nicht-redoxaktive (kompetitive) 5-LO Inhibitoren
- (IV) Duale 5-LO/COX-Inhibitoren

Zur Gruppe der Redoxinhibitoren zählen die meisten der beschriebenen 5-LO Hemmstoffe, darunter eine Reihe von Naturstoffen wie Nordihydroguaiarsäure, Kaffeesäure und verschiedene Flavonoide. Sie hemmen die 5-LO durch Reduktion des Eisens u./o. der Lipidperoxide. Die Substanzen verfügen *in vitro* über eine effektive Hemmwirkung, allerdings sind sie kaum selektiv. So kommt es durch Reduktion anderer eisenhaltiger Proteine, wie z.B. Hämoglobin oder COX, zu teils schwerwiegenden Nebenwirkungen. Eisenligandinhibitoren sind Substanzen mit Hydroxyharnstoff- oder Hydroxamsäurestrukturen (z.B. BWA4C). Prominentester Vertreter ist Zileuton (Zyflo[®]), der als erster und einziger 5-LO Inhibitor dieser Stoffklasse bis zur Marktreife kam und seit Ende der 90er Jahre in den USA zur Therapie des Asthma bronchiale zugelassen ist. Zileuton muss aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit mehrmals täglich und in hohen Dosen verabreicht werden²⁸⁷. Strukturell verwandte Verbindungen mit höherer Wirksamkeit und Wirkdauer (ABT-761, LDP-977) befinden sich derzeit in klinischer Prüfung.

Die Suche nach wirksameren und spezifischeren 5-LO Inhibitoren führte zur Entwicklung der nicht-redoxaktiven, kompetitiven Inhibitoren, die AA aus der Bindungsstelle im aktiven Zentrum verdrängen. Nach Testung in verschiedenen *in vitro* und *ex vivo* Modellen stellten sich vor allem ZD2138 und ZM230487 als vielversprechende LT-Synthesehemmstoffe heraus²⁸⁸. Diese Substanzen sind zwar nahezu frei von Nebenwirkungen, zeigten aber geringe Wirksamkeit in klinischen Studien²⁷⁸. Weiterführenden Untersuchungen zur Folge können nicht-redoxaktive Verbindungen vom Typ des ZM230487 nur bei niedrigen LOOH-Level die 5-LO bezüglich der AA kompetitiv hemmen, während sie bei hohen LOOH-Level eine nicht-kompetitive Kinetik aufweisen²⁸⁹. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass die Hemmung der 5-LO Produktbildung in PMNL durch nicht-redoxaktive Inhibitoren von der Art der Aktivierung der 5-LO abhängig sein kann.

Erfolgt z.B. eine Zellstress-induzierte 5-LO Produktbildung (Aktivierung der 5-LO durch Phosphorylierung), so wird eine 10- bis 100-fach höhere Konzentration an ZM230487 für eine vergleichbare Hemmung einer durch Ca^{2+} -Ionophor-induzierten 5-LO Produktbildung benötigt²⁹⁰. Diese Befunde könnten erklären, warum ZM230487 bei gesunden Probanden eine potente LT-Synthesehemmung zeigt, bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen (entzündungsbedingte ROS-Bildung, Zellstress-induzierte Aktivierung) jedoch unwirksam ist.

Ein weiterer Ansatzpunkt der antiinflammatorischen Therapie beruht auf der Entwicklung dualer COX/5-LO Inhibitoren, mit dem Ziel magenverträglichere NSAR (nichtsteroidale Antirhematika) zu erhalten. Durch Hemmung der COX wird AA vermehrt über den 5-LO Weg metabolisiert. Erhöhte LT-Level können für die magenschädigenden Nebenwirkungen der NSAR verantwortlich sein.

Ein aussichtsreicher Kandidat der dualen Inhibitoren ist Licofelone[®] (ML-3000), dessen Phase III-Studien abgeschlossen sind und dessen Zulassung zur Behandlung von Arthrose beantragt ist. Studienergebnisse zeigen, dass die Wirksamkeit von Licofelone[®] (Firma: Merckle) der des Naproxens bei gleichzeitig guter allgemeiner und gastrointestinaler Verträglichkeit entspricht²⁹¹.

Auch diverse Pflanzenextrakte und ihre Inhaltsstoffe wurden auf Beeinflussung des AA-Metabolismus hin untersucht. Erst kürzlich konnte Hyperforin, ein Inhaltsstoff des pflanzlichen Antidepressivums Johanniskraut, als dualer Inhibitor von COX1 und 5-LO identifiziert werden³⁰⁸. Ferner konnte gezeigt werden, dass Schöllkraut-Extrakte und daraus isoliertes Sanguinarin sowohl die 5-LO als auch die 12-LO inhibieren²⁹². Cannabidiol (CBD), als wichtigster nicht psychotroper Inhaltsstoff der Hanfpflanze, zeigt antiinflammatorische und analgetische Effekte bei Mäusen, *in vitro* wirkt CBD als COX/LO-Inhibitor²⁹³. Zu den Phytopharmaka, die zur Behandlung von entzündlichen und rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden, zählen in Deutschland allerdings hauptsächlich die Extrakte aus Teufelskrallenwurzel, Weidenrinde, Goldrutenkraut und Weihrauchharze.

2.8.3 12S-Lipoxygenase^{294, 295}

Die 12S-LO kommt, entsprechend ihrer Gewebeverteilung, in drei Isoformen vor:

- (I) Leukozyten-12S-LO (*l*-12S-LO)
- (II) Thrombozyten-12S-LO (*t*-12S-LO)
- (III) Epithel-12S-LO (*e*-12S-LO)

Wie im phylogenetischen Stammbaum der Säugetier-LOs (*Abb. 9*) zu erkennen, besitzt die *l*-12S-LO eine größere Übereinstimmung mit der Retikulozyten-15-LO von Mensch und Kaninchen als mit anderen 12-LO-Isoformen. Man bezeichnet diese LOs daher häufig als 12/15-LOs. Die *t*-12S-LO findet man in erster Linie im Zytosol von Thrombozyten und Epidermiszellen, die nach Stimulation mit Thrombin durch Translokation vom Zytosol zur Membran aktiviert wird. Eine Abhängigkeit von Ca^{2+} , ATP, FLAP und Phosphorylierung der 12-LO Aktivierung ist nicht bekannt. Im Gegensatz zur *l*-12S-LO, die sowohl freie als auch veresterte Fettsäuren (FS) oxidieren kann, verfügt die *t*-12S-LO über eine hohe Spezifität bezüglich freier AA. Die *e*-12S-LO bevorzugt die Methylester der C18- und C20-FS. Dient AA als Substrat, so bildet die *t*-12S-LO hauptsächlich 12S-HPETE, wohingegen die *l*-12S-LO daneben auch eine erhebliche Menge an 15S-HPETE hervorbringt. Neben den im Abschnitt 2.8.1.1 beschriebenen Effekte der 12-LO Metabolite wurde eine Beteiligung der 12-LO an der oxidativen Modifikation von LDL²⁹⁶, der Regulation der Insulinsekretion im Pankreas²⁹⁷, dem Wachstum von Prostata-Tumoren²⁹⁸, Psoriasis²⁹⁹ und dem malignem Melanom³⁰⁰ festgestellt .

2.8.4 15S-Lipoxygenase³⁰¹

Die 15-LO des Menschen unterteilt man in einen Retikulozyten- und einen epidermalen Typ. Wie die 5- und 12-LO ist die 15-LO im Zytosol lokalisiert und benötigt zur maximalen Aktivität eine Ca^{2+} -abhängige Translokation zur Kernmembran, sowie geringe Mengen Hydroperoxide³⁰². Als Substrat dienen ihr mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die sowohl frei als auch in biologischen Strukturen (Biomembranen, Lipoproteinen etc.) gebunden vorliegen können. Neben den im Abschnitt 2.8.1.1 beschriebenen Effekten der 15-LO Metabolite, gilt eine Beteiligung der 15-LO an Atherosklerose³⁰³ und immunologischen Reaktionen³⁰⁴ als gesichert. Durch eine Interaktion mit dem 5-LO Stoffwechsel sind antiinflammatorische Eigenschaften der 15-LO nicht auszuschließen²³⁴.

3 Materialien und Geräte

3.1 Materialien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (110 TBq/mmol)	Amersham, Buckinghamshire, UK
$[\text{}^3\text{H}]\text{AA}$	Biotrend, Köln
A- β -BA, β -BA, AKBA, KBA	ChromaDex, Laguna Hills, CA
aktivierte p42 ^{MAPK} Isoform (Ratten, rekombinat)	Biomol, Hamburg
AP-konjugierte Immunglobuline (IgG)	Sigma, Deisenhofen
Arachidonsäure	Sigma, Deisenhofen
BAPTA/AM	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Ca ²⁺ Ionophore A23187	Sigma, Deisenhofen
Calcitriol	Dr. H. Wiesinger (Schering AG)
DCF-DA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DPI	Sigma, Deisenhofen
ethanolischer <i>Boswellia serrata</i> Extrakt (enthält nach Firmenangaben ~ 40 % BAs)	Engelhard Arzneimittel, Niederdorfelden
FCS	Boehringer Mannheim, Mannheim
fMLP	Sigma, Deisenhofen
Fura-2/AM	Calbiochem, Bad Soden
GF109203x	Biotrend, Köln
NBT	Biomol, Hamburg
Nycoprep	PAA Laboratories
PBS	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin Lösung	Sigma, Deisenhofen

phosphorspezifische AK gegen p38 MAPK (Thr180/Tyr182), bzw. ERK ½ (Thr202/Tyr204)	New England Biolabs, Frankfurt
PMA	Sigma, Deisenhofen
Prostaglandin B ₁	Sigma, Deisenhofen
PTX	Calbiochem, Bad Soden
RO-31-8425	Alexis, Grünberg
RPMI 1640 Medium	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	Gibco-BRL, Grand Island, NY
SB203580	Calbiochem, Bad Soden
See Blue® Standard	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TGF-β1	Isoliert aus Thrombozyten ³⁰⁵
Triton X	Sigma, Deisenhofen
Trizima Base	Sigma, Deisenhofen
U0126	Calbiochem, Bad Soden
Ursolsäure	Extrasynthèse, Genay, Frankreich
Wortmannin	Biotrend, Köln

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in entsprechender Reinheit von Sigma-Deisenhofen, Merck-Darmstadt, Alexis-Grünberg oder Serva-Heidelberg bezogen.

3.2 Geräte

beta-Counter	Micro Beta Trilux, Perkin Elmer, CA
Brutschrank	WTC-Binder, Reiskirchen
HPLC-Anlage	Pumpe: Waters 510, Millipore in Kombination mit Waters Automated Gradient Controller Injektor: Waters 717plus Autosampler Detektoren: Waters 486 Tunable Absorbance, Millipore Steuerung/Auswertung: Millenium ³² Version 3.05.01, Waters Corporation 1998
Mini Protean system	Bio-Rad, Hercules, CA
Phosphor-Imgager	Fuji Phosphorimager FLA-3000, Raytest, Straubenhardt
Sonifier	Sonoplus HD200, Bandelin electronic, Berlin
Spektrofluorimeter	Aminco-Bowman series 2, Thermo Spectronic, NY
Zentrifuge	Varifuge 3.0 RS (Heraeus Sepatech), Hanau Rotortyp: 8080; Radius: 21,1 cm

4 Methoden

4.1 Zellen und Zellkultur

HL60 und Mono Mac 6 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 6% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert und im Abstand von 3-4 Tagen mit einer Zelldichte von 1 bis 2 x 10⁵/mL in neues Kulturmedium umgesetzt. Für die Differenzierung wurde eine Zelldichte von (3 x 10⁵/mL) angesetzt. Da die verwendeten Zelllinien als sogenannte Suspensionskulturen wachsen, konnten die Zellen durch einfache Zentrifugation (340g; 10 Min.; RT) vom Medium abgetrennt werden. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Zellen in PG Puffer aufgenommen und die Zellzahl und Zellvitalität wie beschrieben bestimmt.

4.1.1 HL60 Zellen und Mono Mac 6 Zellen

HL60 Zellen wurden von ATCC bezogen. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Medium (Gibco) verwendet, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 µg/mL Streptomycin und 100 U/mL Penicillin supplementiert wurde³⁰⁶. Das verwendete FCS wurde zur Inaktivierung für 45 Min. bei 58°C erhitzt.

MM 6 Zellen wurden von Dr. Ziegler-Heitbrock, München, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 µg/mL Streptomycin und 100 U/mL Penicillin, 1 mM Pyruvat, 1 mM Oxalacetat, 1x nichtessentielle Aminosäuren und 10 µg/mL Insulin ergänzt wurde.

4.1.2 Differenzierung der HL60 und MM6 Zellen

HL60 Zellen wurden für 4 Tage in Gegenwart von 1 ng/mL TGF-β, 500 pM VD₃ (Calcitriol) und 1,5 Vol.% DMSO differenziert. Die Differenzierung der MM6 Zellen erfolgte über 4 Tage in Gegenwart von 1 ng/mL TGF-β und 50 nM VD₃¹²⁴.

4.1.3 Isolierung menschlicher Granulozyten³⁰⁷ und Thrombozyten³⁰⁸

Menschliche Granulozyten und Thrombozyten wurden aus Leukozytenkonzentrat (Buffy-coats) gesunder weiblicher und männlicher Patienten isoliert (St. Markus Hospitals, Frankfurt). Etwa 5 - 6 frische Buffy-coats (je ~50 mL) wurden vereinigt und mit PBS auf ca. 500 mL verdünnt. Zur Entfernung der Erythrozyten erfolgte

eine 30-minütige Sedimentation mit einer 5%-igen Dextran-Lösung in PBS bei RT. Nach Sedimentation der Erythrozyten wurde die überstehende Zellsuspension (~40 mL) auf 10 mL Nycoprep geschichtet und zentrifugiert (1250 g; ohne Bremse; 10 Min.; RT). Ein Teil des Überstandes wurde für die Isolierung der Thrombozyten verwendet, der Rest wurde vollständig abgesaugt. Die Pellets (Granulozyten, Erythrozyten) wurden mit wenig eiskaltem PBS resuspendiert, vereinigt, auf 50 mL mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (680 g; 10 Min.; RT). Zur Beseitigung verbleibender Erythrozyten wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 10 mL eiskaltem destilliertem Wasser versetzt. Nach 45 Sek. wurde der Lysevorgang durch Zugabe von 40 mL eiskalten PBS abgestoppt und die Granulozyten durch eine weitere Zentrifugation (680 g; 10 Min.; RT) abgetrennt. Abschließend wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und das Pellet (Granulozyten) in 5-10 mL PG Puffer aufgenommen. Für die Isolierung der Thrombozyten wurde der Überstand (Serum, Thrombozyten) der Dichtezentrifugation abpipettiert und mit PBS, pH 5,9 (3:2; Vol.-%) verdünnt. Anschließend wurde zentrifugiert (2120 g; 15 Min.; RT), der Überstand abgesaugt und das Pellet in einer Mischung aus 0,9% NaCl-Lösung und PBS pH 5,9 (1:1; Vol.-%) resuspendiert, auf 50 mL aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1850g; 10 Min.; RT). Das Pellet aus gereinigten Thrombozyten wurde in 5 mL PBS pH 7,4 aufgenommen.

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop durch visuelles Auszählen bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit einer 0,2%-igen Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:40 bis 1:1600 gemischt und auf die Zählkammer aufgetragen. Intakte Zellen schließen Trypanblau aus, tote Zellen werden dagegen blau angefärbt.

4.2 5-Lipoxygenaseassay³⁰⁹

4.2.1 Intakte Zellen

$7,5 - 10 \times 10^6$ PMNL wurden entweder in 1 mL PGC Puffer oder 1 mL PG Puffer plus 1 mM EDTA/30 μ M BAPTA/AM (Vorinkubation: 15 Min.; RT) aufgenommen und mit einer entsprechenden Menge an Untersuchungssubstanz für den angegebenen Zeitraum vorinkubiert oder simultan mit dem Stimulus zugesetzt.

Durch Zugabe von AA und/oder Ca^{2+} -Ionophor wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Methanol abgestoppt, auf Eis gestellt und den Proben jeweils 200 ng PGB_1 (interner Standard), 30 μL 1 N HCl und 500 μL PBS zugesetzt.

Anschließend wurde zentrifugiert (950 g; 10 Min.; RT) und die 5-LO Metabolite mittels Festphasenextraktion über RP-18 Extraktionskartuschen aus dem Überstand abgetrennt.

Extraktionsbedingungen:

Konditionierung: 1 mL Methanol, 100%; 1 mL Wasser

Probenaufgabe: 2,5 mL

Reinigung: 1 mL Wasser; 1 mL Methanol, 25%

Elution: 300 μL Methanol, 100%

Dem Eluat wurden 120 μL Wasser zugegeben und ein Aliquot (100 μL) dieser Lösung mittels HPLC analysiert. Die 5-LO Aktivität wurde über die Summe der gebildeten 5-LO Metabolite berechnet.

4.2.2 Zellhomogenate

$7,5\text{-}10 \times 10^6$ PMNL wurden in 1 mL PG Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 mM EDTA wurden die Zellen mittels Ultraschall homogenisiert (3 x 5 Sek.) und mit den entsprechenden Inhibitoren für 10 Min. bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurde 1 mM ATP zugegeben und die Proben für 30 Sekunden bei 37°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM Ca^{2+} und AA gestartet. Inkubations- und Extraktionsbedingungen siehe 4.2.1.

4.3 12-Lipoxygenaseassay

10^8 Thrombozyten wurden in 1 mL PG Puffer aufgenommen und entweder mit entsprechenden Inhibitoren für 15 Min. vorinkubiert oder direkt mit den Untersuchungssubstanzen stimuliert. Wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} inkubiert, so erfolgt zusätzlich eine 15-minütige Vorinkubation mit 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA/AM bei 37°C . Wurde in Anwesenheit von Calcium inkubiert, so erfolgte die Zugabe von 1 mM Ca^{2+} unmittelbar vor der Zugabe der Stimuli. Inkubations- und Extraktionsbedingungen siehe 4.2.1.

4.4 HPLC-Analytik der LO Metabolite

Zur Bestimmung der 5-LO Aktivität wurden die gebildeten Metabolite qualitativ und quantitativ mittels HPLC bestimmt, über die Summe der 5-LO Metabolite (LTB₄, 6-trans LTB₄, 5-HPETE bzw. 5-HETE) in ng pro 10⁶ Zellen berechnet und als Mittelwerte ± Standardfehler (S.E.) angegeben. Die 12-LO Aktivität wurde als ng 12-H(P)ETE pro 10⁶ Zellen berechnet und als Mittelwerte ± S.E. angegeben. Die Quantifizierung erfolgte mittels internem Standard (PGB₂).

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase: Novapak C-18 Radial-Pak Säule
(100 mm x 5 mm I.D., 5 µM Partikelgröße, Waters)
Mobile Phase: Methanol / Wasser / Trifluoressigsäure (72/28/0,007 Vol.-%)
Fluss: 1,2 mL/ Min.
Detektion: UV bei 280 nm, nach 8 min umschalten auf 235 nm

4.5 MAPK Aktivierung

Isolierte humane PMNL (5 x 10⁶/mL), Thrombozyten (1 x 10⁸/mL), differenzierte HL60 (5 x 10⁶/mL) oder MM6 Zellen (5 x 10⁶/mL) wurden in 100 µL PGC Puffer oder 100 µL PG Puffer mit 1 mM EDTA und/oder 30 µM BAPTA/AM resuspendiert und durch Zugabe der entsprechenden Stimuli bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL eiskaltem SDS-b (20 mM Tris/HCl; pH 8; 2 mM EDTA; 5% SDS (Gew.-%); 10% β-Mercaptoethanol) abgestoppt und für 6 Min. bei 95°C erhitzt. Das Zelllysate wurde 3-5 Sek. mittels Ultraschall homogenisiert und durch SDS-PAGE und Western-Blotting oder In-gel Kinase Assay analysiert.

4.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

20 µL des Zelllysates wurden mit 4 µL Glycerol/0,1% Bromphenolblau-Mischung (1:1; Vol.-%) gemischt. Als Marker wurde eine Mischung aus 4 µL SeeBlue® Pre-Stained Standard mit 4 µL Glycerol/0,1% Bromphenolblau-Mischung (1:1; Vol.-%) und 16 µL SDS-b verwendet. Die Auftrennung der Proteinkinasen erfolgte über ein 10%-iges Polyacrylamidgel unter Verwendung eines Mini Protean Systems nach einer Vorschrift von Laemmli³¹⁰. Als Elektrophoresepuffer wurde eine wässrige Lösung aus 25 mM Tris, 200 mM Glycin und 1% SDS (Gew.-%) verwendet.

4.5.2 Western-Blotting

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia, UK) durch Tankblotting transferiert. Als Transferpuffer wurde eine 25%-ige methanolische Lösung mit 30 mM Tris und 250 mM Glycin verwendet. Nach dem Blotting wurde die Membran für 1 Stunde bei RT durch eine 5%-ige Milchpulver-TBS-Suspension geblockt (TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl) und anschließend mit TBS gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper (phosphorspezifische AK gegen p38 MAPK (Thr180/Tyr182), bzw. ERK ½ (Thr202/Tyr204); Verdünnung 1:2000) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal mit TBS (2. Waschschrift plus 0,1% NP-40) gewaschen und für 3 Stunden in einer 1:1000 Verdünnung eines AP-konjugierten IgGs inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS (2. Waschschrift plus 0,1% NP-40), wurden die Proteine auf der Membran visualisiert, indem die Membran erst 10 Min. im Detektionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) und anschließend im Substratpuffer (16,5 mg NBT plus 8,5 mg BCIP in 50 mL Detektionspuffer) inkubiert wurde. Die Farbreaktion der AP wurde mit Stop-Puffer (TBS plus 2% EDTA) beendet.

4.5.3 In-gel Kinase Assay

20 µL des PMNL-Zelllysates (0,5 x 10⁶/mL PMNL) wurden in einem In-gel Kinase Assay auf p44/42^{MAPK} (ERK1/2) Aktivität untersucht. *Myelin-basic-Protein* (MBP; 0,5 mg/mL) wurde als Substrat zur Polymerisation eines 10%-igen Polyacrylamidgels zugegeben^{80, 282}. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel 5 x 10 Min. bei RT mit 60 mL Puffer A (20 Vol.% Isopropanol in 50 mM Tris/HCl, pH 8) gewaschen, um das überschüssige SDS zu entfernen. Nach weiteren 5 x 10 Min. bei RT in 60 mL Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM DTT) wurde das Gel zur Denaturierung der Proteine für 1 Stunde bei RT in Puffer C (50 mM Tris/HCl, pH 8; 20 mM DTT; 2 mM EDTA; 6 M Guanidin-HCl) gegeben. Zur vollständigen Renaturierung der Proteine wurde das Gel 1 x 10 Min. bei RT in 60 mL Puffer D (50 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM DTT; 2 mM EDTA; 0,04% Tween 20;) gewaschen und anschließend in 300 mL desselben Puffers über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Vorinkubation für 1 Stunde bei RT in 30 mL Kinase-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,6; 20 mM MgCl₂; 20 mM β-Glycerolphosphat; 20 mM 4-Nitro-phenylphosphate; 2 mM

DTT; 0,2 mM Na_3VO_4) wurde das Gel 1 Stunde bei 30°C in 10 mL Kinase-Puffer plus 50 μM ATP plus 10 $\mu\text{Ci/mL}$ [$\gamma^{32}\text{-P}$]ATP inkubiert. Um das überschüssige [$\gamma^{32}\text{-P}$] ATP zu entfernen, wurde das Gel mehrmals mit 50 mL Waschpuffer (1% (m/v) Na-Pyrophosphat; 5% (m/v) Trichloressigsäure) gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die phosphorylierten Proteine wurden mit einem Fuji Phosphorimager FLA-300 visualisiert.

4.6 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Isolierte PMNL ($1 \times 10^7/\text{mL}$), Thrombozyten ($1 \times 10^8/\text{mL}$), differenzierten HL60 ($1 \times 10^7/\text{mL}$) oder MM6 Zellen ($3 \times 10^6/\text{mL}$) wurden in PG Puffer aufgenommen und mit 2 μM Fura-2/AM für 30 Min. bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (340 g; 5 Min; RT), der Überstand abgesaugt, das Pellet einmal mit PG Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in PG Puffer resuspendiert, anschließend 1 mM Ca^{2+} zugesetzt und in eine temperierte (37°C) Fluorimeterküvette überführt. Die Zugabe der Stimuli erfolgte nach Aufzeichnung der Basislinie (30 - 40 Sek.). Als Positivkontrolle wurde 1 μM Ionomycin verwendet. Zur Bestimmung der maximalen Ca^{2+} -Konzentration wurden die Zellen nach 180 Sek. durch 50 μL Triton-X 100 (Endkonz. 0,5%) lysiert. Durch Zugabe von 50 μL EDTA 0,2 M (Endkonz. 10 mM) nach weiteren 25 Sek. wurde der minimale Ca^{2+} -Wert bestimmt. Die Fluoreszenzemission wurde bei 510 nm nach Anregung bei 340 nm (Ca^{2+} -gebundener Farbstoff) und 380 nm (freier Farbstoff) unter Rühren in einem Lumineszenzspektrometer (Aminco-Bowman Series 2, Thermo Spectronic) gemessen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde nach der Methode von *Grynkiewicz et al.*³¹¹ berechnet (K_D des Farbstoffkomplexes = 135).

4.7 Bestimmung der zellulären Peroxidbildung

Isolierte humane PMNL ($1 \times 10^7/\text{mL}$), differenzierte HL60 ($1 \times 10^7/\text{mL}$) oder MM6 Zellen ($5 \times 10^6/\text{mL}$) wurden in 1 mL PGC Puffer aufgenommen und mit dem Peroxid-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA (1 $\mu\text{g/mL}$ für PMNL und MM6, 10 $\mu\text{g/mL}$ für HL60 Zellen) für 2 Min. in einer temperierten (37°C) Fluorimeterküvette unter kontinuierlichem Rühren vorinkubiert. Nach Aufzeichnung der Basislinie (30 Sek.) erfolgte die Zugabe der Testsubstanz.

Die Fluoreszenzemission wurde bei 530 nm nach Anregung bei 485 nm über 5 Min. bei 37°C unter Rühren in einem Lumineszenzspektrometer (Aminco-Bowman Series 2, Thermo Spectronic) gemessen. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) von mindestens drei unabhängigen Versuchen angegeben (\pm S.E.).

4.8 Arachidonsäurefreisetzung

Isolierte humane PMNL wurden in einer Konzentration von 2×10^6 /mL in RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze) mit 4,8 nM [3 H]AA (entspricht 0,25 μ Ci/mL, spezifische Aktivität 200 Ci/mmol) resuspendiert und für 120 Min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (340 g; 10 Min.; RT). Um die überschüssige [3 H]AA zu entfernen, wurden die Zellen nun einmal mit PBS und zweimal mit PG Puffer plus 2 mg/mL FAF-BSA gewaschen.

Die [3 H]AA-beladenen PMNL (5×10^6) wurden in 1 mL PGC Puffer plus 2 mg/mL FAF-BSA aufgenommen und je nach Versuchsplan entweder mit einem Inhibitor 20 Min. vorinkubiert oder direkt mit der Untersuchungssubstanz für 5 Min. bei 37°C stimuliert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen für 2 Min. auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (1300 rpm; 5 Min.; RT). Ein Aliquot (100 μ L) des Überstandes wurden mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Freisetzung von [3 H]AA mittels beta-Counter bestimmt. Die AA-Freisetzung von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurde in Prozent gegenüber den unstimulierten Zellen angegeben (\pm S.E.).

4.9 Statistik

Die statistische Auswertung der durchgeführten Versuche erfolgte unter Anwendung der Statistikprogramme „GraphPad PRISM Version 3.02“ und „SigmaPlot 2001 Version 7.101“. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde ein t-Test nach vorangegangenem F-Test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$) bzw. 1% ($p = 0,01$) wurde vorausgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 5-LO Aktivitätshemmung durch pentazyklische Triterpene und Strukturanaloga

Zur Identifizierung und Evaluierung von Hemmstoffen der LT-Biosynthese wurde ein etabliertes *in vitro* Testsystem (Arbeitskreis Prof. D. Steinhilber) verwendet. Die Untersuchungen erfolgten dabei sowohl an intakten PMNL als auch an korrespondierenden Zellhomogenaten. Um ausreichende Mengen an Substrat sicherzustellen, wurde die LT-Synthesehemmung in Anwesenheit exogener AA bestimmt. Nach Vorinkubation mit den Testsubstanzen und entsprechender Stimulation der Zellen wurden die gebildeten 5-LO Metabolite durch Festphasenextraktion aus der Zellsuspension isoliert und anschließend mittels HPLC qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Hemmung der 5-LO Aktivität in Zellhomogenaten ist mit einer direkten Interaktion der Testsubstanz mit dem Enzym gleichzusetzen, wohingegen eine Hemmung der 5-LO Aktivität in intakten Zellen auch durch andere Mechanismen (Hemmung von MAPK, cPLA₂ oder FLAP, Ca²⁺-Komplexierung, Zytotoxizität, usw.) verursacht werden kann.

5.1.1 Hemmung der 5-LO Aktivität durch Boswelliasäuren

Im Folgenden wurden zur Induktion der 5-LO Aktivität in intakten Zellen 2,5 µM Ionophor und 10 µM AA verwendet. Diese Bedingungen gaben ausreichende 5-LO Aktivität. In einem Vergleich der Hemmwirkungen der BAs auf die 5-LO Aktivität in intakten Zellen zeigte sich folgendes Bild (*Abb. 12*):

Sowohl Acetyl- α -BA als auch α -BA erwiesen sich im Konzentrationsbereich von 1 µM bis 100 µM hinsichtlich einer 5-LO Hemmung als unwirksam. Ihre Strukturisomere Acetyl- β -BA und β -BA zeigten schwache Hemmeigenschaften. So ergab sich bei einer Konzentration von 100 µM eine 60%-ige Hemmung der 5-LO Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde die 5-LO durch die beiden Keto-BAs, AKBA und KBA, bei 100 µM fast vollständig gehemmt.

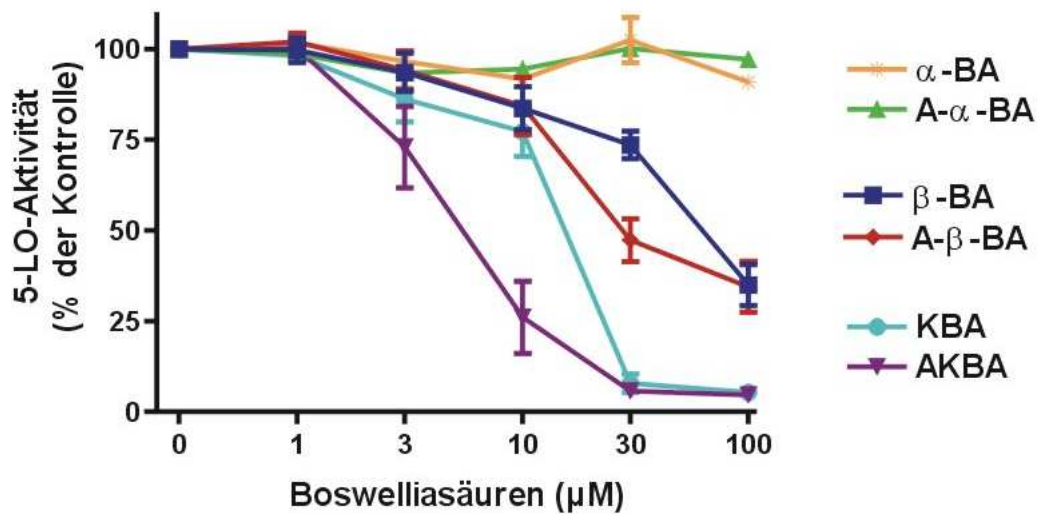


Abb. 12: Hemmung der 5-LO Aktivität in intakten PMNL durch unterschiedliche BAs.

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den entsprechenden BAs 10 Min. bei RT vorinkubiert und durch Zugabe einer Mischung aus 2,5 µM Ca^{2+} -Ionophor und 10 µM AA bei 37°C für weitere 10 Min. stimuliert. Die Bestimmung der 5-LO Aktivität erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. (Mittelwerte \pm S.E.; n = 3)

In weiterführenden Untersuchungen wurden die IC_{50} -Werte für AKBA, KBA und ein *Boswellia serrata* Extrakt (Firma Engelhard Arzneimittel, Niederdorfelden) sowohl in intakten PMNL als auch in korrespondierenden Zellhomogenaten bestimmt. Nach Firmenangaben verfügt der BS-Extrakt über einen Gesamt-BA-Gehalt von etwa 40%.

Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, wurden für AKBA und KBA in intakten Zellen IC_{50} -Werte von ~ 5 µM und ~ 14 µM bestimmt. In korrespondierenden Zellhomogenaten lagen die Werte dagegen deutlich höher (IC_{50} -Werte: ~ 47 µM bzw. ~ 46 µM).

Geht man von einem BA-Gehalt von 40% im Extrakt aus, so entsprechen die IC_{50} -Werte von ~ 19 µg/mL (intakte Zellen) und ~ 27 µg/mL (Homogenate) in etwa einer Konzentration von ~ 15 µM bzw. ~ 21 µM BA (bezogen auf M_r von AKBA).

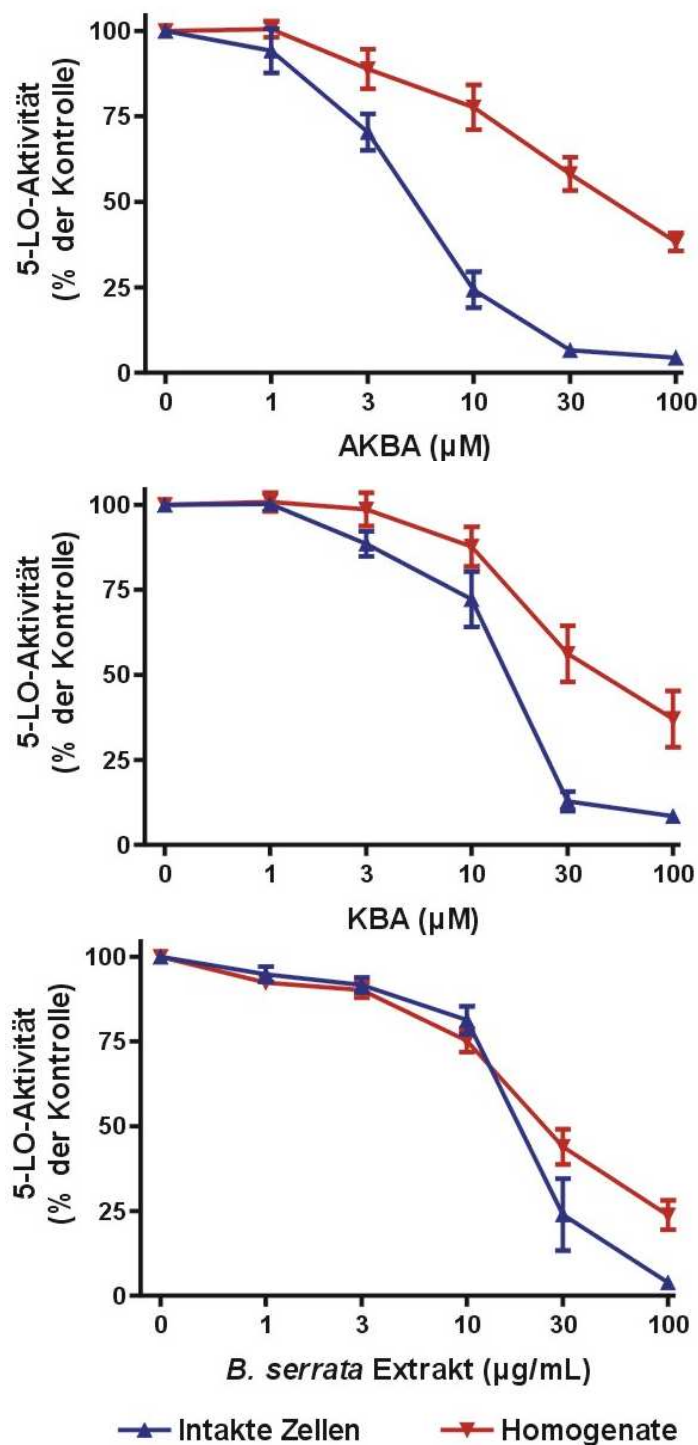


Abb. 13: Hemmung der 5-LO Aktivität durch AKBA, KBA und BS-Extrakt (B)

PMNL wurden entweder in PGC Puffer aufgenommen oder in PG Puffer plus 1 mM EDTA homogenisiert und mit den Untersuchungssubstanzen für 10 Min. vorinkubiert. Durch Zugabe von 2,5 μM Ca^{2+} -Ionophor und 10 μM AA wurden intakten Zellen für weitere 10 Min. bei 37°C stimuliert. Die Zellhomogenate wurden nach Zugabe von 1 mM ATP bei 37°C für 30 Sek. erwärmt und mit 2 mM Ca^{2+} und 10 μM AA versetzt. Die Bestimmung der 5-LO Aktivität erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. (Mittelwerte \pm S.E.; $n \geq 5$)

5.1.2 Effekte von AA auf die 5-LO Hemmung durch AKBA

Die Diskrepanz der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu denen von *Safayhi und Ammon et al.*¹⁸ könnte auf unterschiedliche Assay-Bedingungen zurückzuführen sein. Deshalb wurden die experimentellen Bedingungen für die 5-LO Hemmung durch Boswelliasäuren (BAs) modifiziert.

Wie aus *Abb. 14* ersichtlich, lag der IC_{50} -Wert von AKBA in Abwesenheit von AA bei $\sim 4,5 \mu\text{M}$. Durch Zugabe von $40 \mu\text{M}$ exogener AA wurde der IC_{50} -Wert um etwa das 3-fache auf $\sim 14,5 \mu\text{M}$ erhöht, wohingegen durch $10 \mu\text{M}$ AA nur eine geringe Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte ($IC_{50} = \sim 6 \mu\text{M}$). Auch für KBA konnte eine Abnahme der 5-LO Hemmung in intakten Zellen bei Anwesenheit von $40 \mu\text{M}$ AA festgestellt werden (ohne Abb.).

Analoge Untersuchungen in entsprechenden Zellhomogenaten zeigten weder für AKBA noch für KBA Unterschiede in der 5-LO Hemmung bei Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ bzw. $40 \mu\text{M}$ AA.

Eine Änderung der Ionophor- ($2,5 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$) oder Ca^{2+} -Konzentration ($0,5 \text{ mM}$; 1 mM ; 2 mM) blieb ohne Auswirkung auf die Testergebnisse (ohne Abb.).

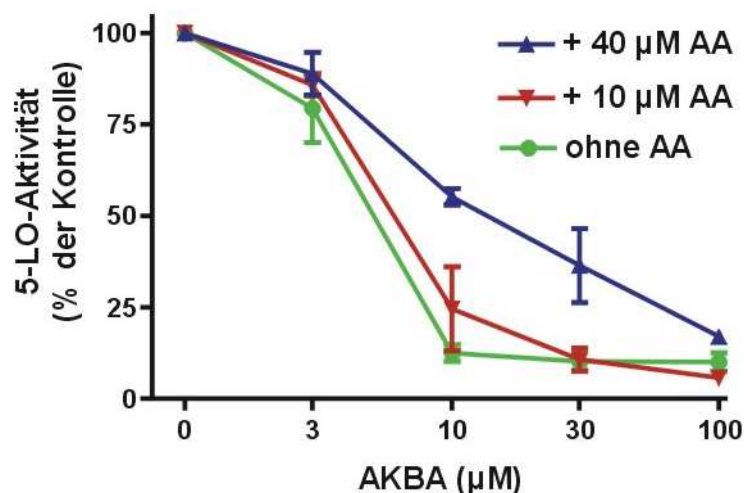


Abb. 14: Einfluss der AA auf die Hemmung der 5-LO Aktivität durch AKBA.

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit AKBA für 10 Min. bei RT vorinkubiert und mit $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Ionophor in An- oder Abwesenheit von AA bei 37°C für weitere 10 Min. inkubiert. Die Bestimmung der 5-LO Aktivität erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E. von vier unabhängigen Experimenten angegeben.

5.1.3 Hemmung der 5-LO Aktivität durch Heteronemin, Echinocystssäure, Abietinsäure und Abietinsäuremethylester

Aufgrund der Tatsache, dass AKBA der potenteste 5-LO Inhibitor unter den pentazyklischen Triterpenen ist, diente diese Verbindung als „Leitstruktur“ für die Auswahl kommerziell erwerblicher Verbindungen als mögliche 5-LO Inhibitoren. Neben einer großen Anzahl von pentazyklischen Triterpenen des Ursan- und Oleanantypes, wurden auch zyklische Mono-, Di- und Sesterterpene auf eine 5-LO Hemmung hin untersucht (Liste der untersuchten Substanzen siehe Anhang).

Unter diesen Verbindungen zeigten das Sesterterpen Heteronemin (Scalaran), die beiden Diterpene Abietinsäure und Abietinsäuremethylester und das Triterpen Echinocystssäure einen hemmenden Effekt auf die 5-LO sowohl in intakten Zellen als auch in Zellhomogenaten (*siehe Tabelle 2*).

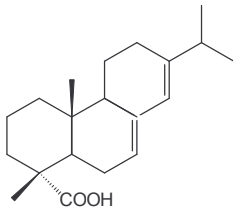
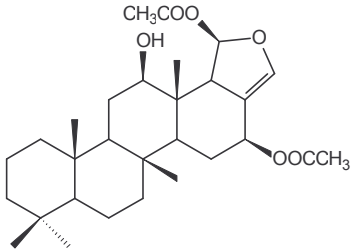
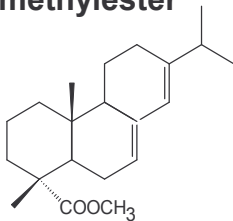
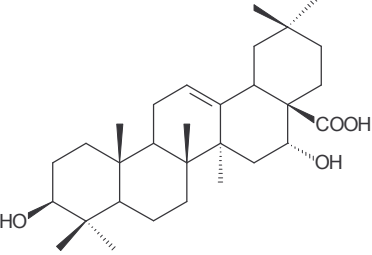
Substanz	IC ₅₀ -Werte (µM)		Substanz	IC ₅₀ -Werte (µM)	
	Intakt	Homogenat		Intakt	Homogenat
Abietinsäure 	~ 13	~46	Heteronemin 	~1,5	~4,5
Abietinsäure-methylester 	~22	~43	Echinocystssäure 	~14	~56

Tabelle 2: Strukturen und IC₅₀-Werte

Heteronemin³¹², ein Naturstoff mit tuberkulostatischen Eigenschaften, wird aus dem Schwamm *Hyrtios erectus* gewonnen. In intakten Zellen wurden IC₅₀-Werte von ~1,5 µM, in Homogenaten von ~4,5 µM bestimmt (Abb. 15; oben).

Echinocystsäure ist als Sapogenin in Pflanzen weitverbreitet (u.a. Primelwurzel, Panax Ginseng, Baccharis-Büsche, Ackerhasenohr). Sie zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der 5-LO Aktivität. Die IC₅₀-Werte lagen bei ~14 µM bzw. ~56 µM (Abb. 15, unten).

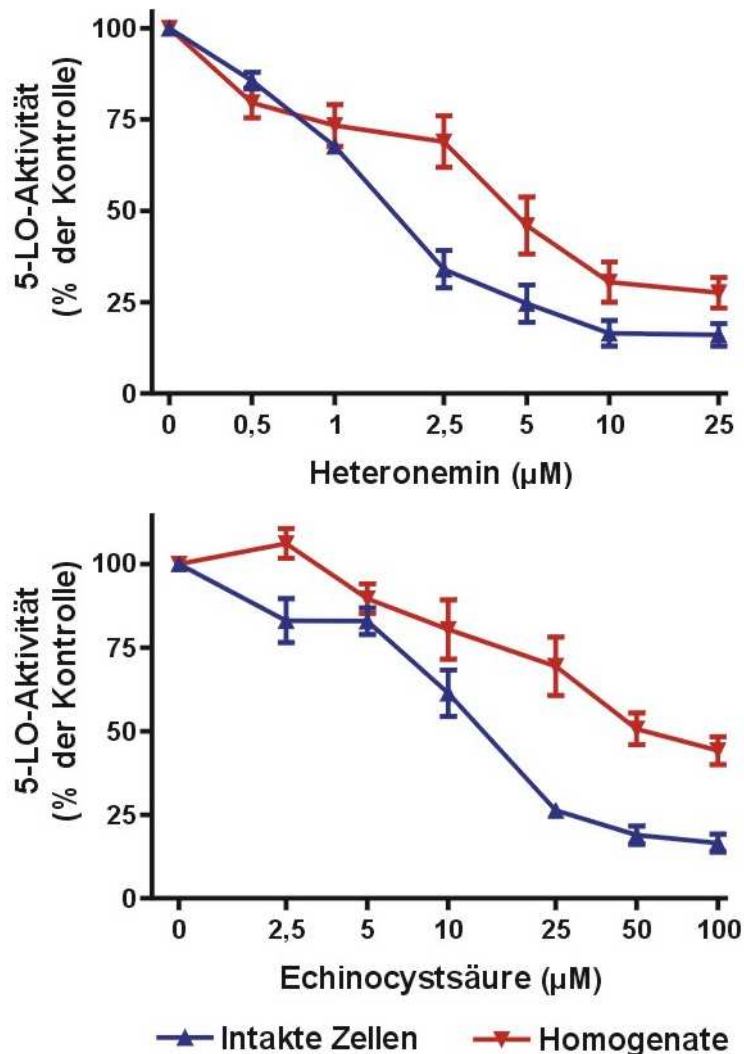


Abb. 15: 5-LO Hemmung durch Heteronemin und Echinocystsäure.

PMNL wurden entweder in PGC Puffer aufgenommen oder in PG Puffer plus 1 mM EDTA homogenisiert und mit den Testsubstanzen in entsprechenden Konzentrationen 10 Min. vorinkubiert. Durch Zugabe von 10 µM Ca²⁺-Ionophor und 40 µM AA wurden intakte Zellen für 10 Min. bei 37°C stimuliert. Zellhomogenate wurden nach Zugabe von 1 mM ATP für 30 Sek. erwärmt (37°C) und mit 2 mM Ca²⁺ und 40 µM AA stimuliert. Bestimmung der 5-LO Aktivität wie unter „Methoden“ beschrieben. (Mittelwerte ± S.E.; n = 4)

Abietinsäure und seine Derivate sind Bestandteil des Naturstoffes Kolophonium und finden v.a. in der Lack-, Klebstoff- und Kunststoffindustrie Anwendung. Abietinsäure und Abietinsäuremethylester zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der 5-LO Aktivität, sowohl in intakten Zellen als auch in Homogenaten. Die entsprechenden IC_{50} -Werte lagen bei $\sim 13 \mu\text{M}$ und $\sim 46 \mu\text{M}$ (Abietinsäure) bzw. $\sim 22 \mu\text{M}$ und $\sim 43 \mu\text{M}$ (Abietinsäuremethylester). Eine vollständige Hemmung der 5-LO Aktivität erfolgte auch bei hohen Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$) nicht (Abb. 16).

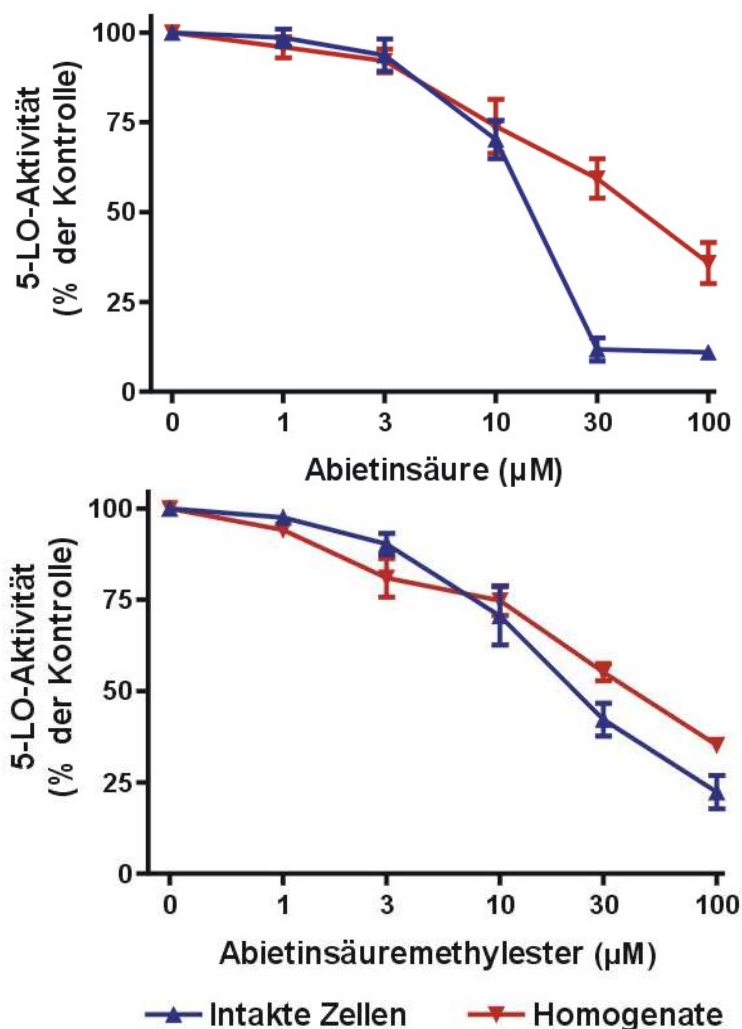


Abb. 16: 5-LO Hemmung durch Abietinsäure und Abietinsäuremethylester

PMNL wurden entweder in PGC Puffer aufgenommen oder in PG Puffer plus 1 mM EDTA homogenisiert und mit den Testsubstanzen in entsprechenden Konzentrationen für 10 Min. vorinkubiert. Durch Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Ionophor und $40 \mu\text{M}$ AA wurden intakte Zellen für 10 Min. bei 37°C stimuliert. Zellhomogenate wurden nach Zugabe von 1 mM ATP für 30 Sek. (37°C) erwärmt und mit 2 mM Ca^{2+} und $40 \mu\text{M}$ AA versetzt. Bestimmung der 5-LO Aktivität wie unter „Methoden“ beschrieben. (Mittelwerte \pm S.E.; $n = 4$)

5.2 Diskussion

Im Hinblick auf die spezifische, nicht-redoxaktive 5-LO Hemmung wurde AKBA 1992 bei der Charakterisierung des indischen Weihrauches als Leitstruktur gefunden. Neben AKBA (3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid) konnten auch für KBA (11-keto- β -BA), A- β -BA (3-O-Acetyl- β -BA) und β -BA inhibitorische Effekte auf die 5-LO Aktivität gezeigt werden. Als zentraler antiinflammatorischer Wirkmechanismus der BAs gilt eine nicht-kompetitive, nicht-redoxaktive, reversible Hemmung der 5-LO.

In Übereinstimmung mit Arbeiten von *Safayhi et al.*¹⁸ zeigte AKBA (gefolgt von KBA) die stärksten Effekte hinsichtlich 5-LO Hemmung in intakten Zellen und Zellhomogenaten, wohingegen BAs ohne 11-keto-Funktion (A- β -BA, β -BA) nur zu einer partiellen Hemmung führten und α -BAs keine Wirkung zeigten. Insgesamt betrachtet lagen die in unserem Testsystem bestimmte IC₅₀-Werte für AKBA und KBA deutlich höher als die von *Safayhi et al.* veröffentlichten Werte. Allen Untersuchungen zur Wirkung der BAs auf die 5-LO in Leukozyten ist aber gemeinsam, dass AKBA und KBA zu einer stärkeren Hemmung der 5-LO in intakten Zellen als im zellfreien System führen.

Vergleicht man sämtliche bislang publizierte IC₅₀-Werte der BAs, so sind zum Teil recht große Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen erkennbar. Schon in früheren Untersuchungen von *Wertz et al.*¹²⁴ konnten hinsichtlich einer 5-LO Hemmung in verschiedenen Zelllinien wie HL60 und Mono Mac 6 für AKBA unterschiedliche Wirksamkeiten gezeigt werden. So lagen in differenzierten intakten HL60 und MM6 Zellen die IC₅₀-Werte bei 15 μ M und 12 μ M, wohingegen die 5-LO in intakten humanen PMNL mit einem IC₅₀ von 5 μ M gehemmt wurde. *Safayhi et al.*¹⁸ konnte dagegen an Leukozyten des Rattenperitoniums, die in Abwesenheit exogener AA mit Ionophor stimuliert wurden, für AKBA IC₅₀-Werte von 1,5 μ M bestimmen. Diese Diskrepanzen in der Wirksamkeit weisen auf eine deutliche Abhängigkeit der BA-induzierten 5-LO Hemmung vom Zelltyp und den experimentellen Bedingungen hin. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass eine hohe AA-Konzentration (40 μ M) bei intakten PMNL zu einem deutlich höheren IC₅₀-Wert für die AKBA-induzierte 5-LO Hemmung führt als mit 10 μ M oder in Abwesenheit exogener AA. Die Annahme von *Sailer et al.*²², dass die

Zugabe von exogener AA zu einer Verdrängung der AKBA aus ihrer Bindungsstelle an der 5-LO führt und somit die Effektivität der AKBA erniedrigt, scheint demnach plausibel. Im Widerspruch dazu stehen allerdings unsere Befunde, dass durch Anwesenheit von 10 μM und 40 μM AA in Zellhomogenaten keine signifikanten Unterschiede der IC_{50} -Werte resultieren.

Der getestete BS-Extrakt (Gesamt-BA-Gehalt $\sim 40\%$) lieferte im Vergleich zu H15^{TM} -Extrakten ($\sim 2,2\%$ AKBA, $\sim 2,8\%$ KBA, $\sim 8\%$ A- β -BA)^{23, 313} relativ hohe IC_{50} -Werte in intakten PMNL und Zellhomogenaten. Eine Potenzierung der Agonist-induzierten 5-LO Aktivität durch niedrige Extraktkonzentrationen wurde im Gegensatz zu H15^{TM} nicht festgestellt²³. Eine weitere Beurteilung des BS-Extraktes der Firma Engelhard ist aufgrund fehlender Angaben über Extraktionsbedingungen und Zusammensetzung nicht möglich.

Im Rahmen der Untersuchung diverser Terpene wurden 4 Verbindungen als potente 5-LO Inhibitoren identifiziert. Das Sesterterpen Heteronemin zeigte den größten Effekt hinsichtlich 5-LO Hemmung und erwies sich potenter als AKBA. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen im Bereich der Konzentration, die für die Hemmung des *Mycobacterium tuberculosis* benötigt wurden³¹⁴.

Abietinsäure und Abietinsäuremethylester sind Bestandteile des Kolophoniums, das als häufiges Haut-Kontakt-Allergen^{315, 316} gilt. Abietinsäure wird durch Autoxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff zum hochreaktiven, allergenen Peroxid³¹⁷ umgesetzt. Es wurde gezeigt, dass Abietinsäure die Proteinexpression von $\text{TNF}\alpha$ und COX2 unterdrückt und $\text{PPAR}\gamma$ in LPS-stimulierten Makrophagen aktiviert³¹⁸. Die antiinflammatorische Aktivität der Abietinsäure wurde außerdem im Carrageenan-induzierten Rattenpfotenödem und TPA-induzierten Ohrödem bestätigt³¹⁹. In unseren Untersuchungen konnten wir sowohl für Abietinsäure als auch Abietinsäuremethylester eine Hemmung der 5-LO Aktivität in humanen PMNL und korrespondierenden Zellhomogenaten feststellen, die im Bereich der von *Ulusu et al.*³²⁰ für Abietinsäure gezeigten Hemmung der 5-LO der Sojabohne ($\text{IC}_{50} \sim 29,5 \mu\text{M}$) lagen. Da die Hauptverfälschungsmittel des echten Weihrauchharzes Kolophonium und Terpentin sind¹, ist möglicherweise Abietinsäure ein gewisser Anteil der antiinflammatorischen Wirkung des Harzes zuzusprechen.

Echinocystinsäure ist als Sapogenin in Pflanzen weitverbreitet. Einigen Saponinen wurden antiinflammatorische, analgetische und tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen^{321, 322, 323}. Unsere Untersuchungen zeigten, dass durch Echinocystinsäure eine mit Abietinsäure und Abietinsäuremethylester vergleichbare 5-LO Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten erzielt werden konnte.

Ein Vergleich der Strukturen der vier 5-LO Inhibitoren und eine Gegenüberstellung sämtlicher nicht-wirksamer Verbindungen, ließen keine Rückschlüsse auf eine strukturelle Voraussetzung für eine effektive 5-LO Hemmung zu.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben BAs auch andere Terpene die 5-LO hemmen, die (wie im Falle von Heteronemin) die Potenz der AKBA deutlich übersteigen können. Die hohe zytotoxische Aktivität von Heteronemin schränkt jedoch die weitere Testung der Substanz bezüglich antiinflammatorischer Wirksamkeit erheblich ein. Eventuell könnten aber mikrobiologische und/oder chemische Modifikationen der Substanz weniger toxische, aber pharmakologisch potente Verbindungen liefern.

5.3 Einfluss von BAs auf Signaltransduktionmoleküle in PMNL

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Wirkung der Boswelliasäuren auf die 5-LO Aktivität ist erkennbar, dass AKBA und KBA zu einer stärkeren Hemmung der 5-LO in intakten Zellen führen als im Zellhomogenat. Wie bereits erwähnt, ist die Hemmung der 5-LO Aktivität im zellfreien System mit einer direkten Interaktion der BAs mit dem Enzym gleichzusetzen, wohingegen die Hemmung der 5-LO in intakten Zellen auch durch andere Faktoren verursacht werden kann. Die Diskrepanz der Hemmwirkungen in intakten Zellen und Zellhomogenaten lässt daher den Schluss zu, dass möglicherweise die Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der 5-LO führen, durch BAs beeinflusst werden.

Bei der Regulation der zellulären 5-LO Aktivierung sind mehrere Faktoren involviert. Neben ATP, Phospholipiden und Lipidperoxiden ist Ca^{2+} ein potenter Aktivator der 5-LO. Daneben ist aber auch eine Stimulation der 5-LO durch direkte Phosphorylierung über p38 MAPK-regulierte MAPKAPK-2 (MK2) an Ser-271 sowie über p44/42^{MAPK} (ERK1/2) an Ser-663 möglich^{193, 324, 325}.

Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit war es, den Einfluss von BAs auf die zelluläre Signaltransduktion, im Speziellen auf MAPK und Ca^{2+} zu untersuchen.

5.3.1 Einfluss von BAs auf Agonist-induzierte MAPK Aktivierung in PMNL

Es erschien möglich, dass neben der direkten 5-LO Hemmung Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der 5-LO führen, durch BAs blockiert werden und dadurch der potente Hemmeffekt in intakten Zellen zu erklären ist. Es wurde daher die Hemmung der Ionophor- bzw. AA-induzierten Kinaseaktivierung von p38 MAPK und p42/44^{MAPK} durch BAs untersucht.

Der Ca^{2+} -Ionophor A23187 ist der potenteste Stimulus für die 5-LO Produktbildung in PMNL, indem er vorrangig durch eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ($\gg 200$ nM) die 5-LO aktiviert^{326, 327}. Darüber hinaus aktiviert A23187 auch p38 MAPK und p42/44^{MAPK}, die durch Phosphorylierung die 5-LO aktivieren²⁶⁶. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation von PMNL mit exogener AA zu einer Ca^{2+} -unabhängigen 5-LO Produktbildung mit gleichzeitiger Aktivierung von p42/44^{MAPK} und p38 MAPK²⁸³.

Entgegen der Annahme, dass die BAs die Ionophor-induzierte p42/44^{MAPK} bzw. p38 MAPK Aktivierung hemmen, konnte eine konzentrationsabhängige Stimulation der Kinasen festgestellt werden (siehe Abb. 17). Auch Versuche, eine AA-induzierte MAPK Aktivierung zu hemmen, lieferten vergleichbare Ergebnisse. Anstatt einer Abschwächung des Signals, wurde ab einer Konzentration von 30 µM AKBA bzw. KBA die durch 40 µM AA-induzierte MAPK Aktivierung verstärkt (ohne Abb.).

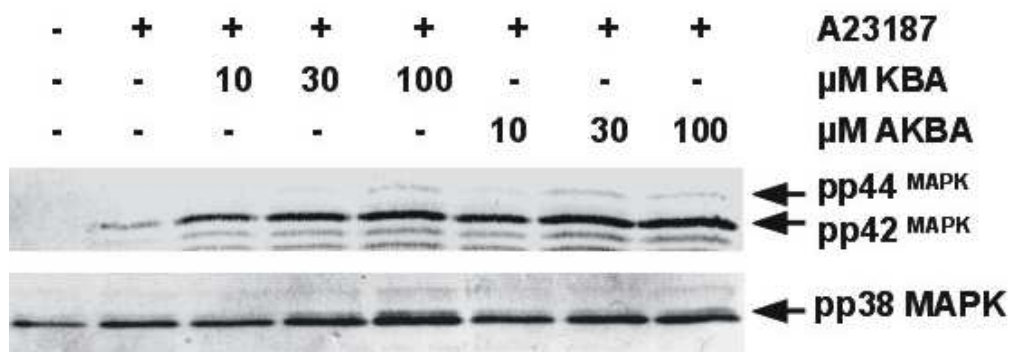


Abb. 17: Einfluss von 11-Keto-BAs auf die Ionophor-induzierte MAPK Aktivierung

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit AKBA bzw. KBA in den entsprechenden Konzentrationen für 10 Min. bei 37°C vorinkubiert, mit 2,5 µM Ionophor A23187 stimuliert und die Reaktion nach 2,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5.3.2 11-Keto-BAs aktivieren p38 MAPK und p42^{MAPK} in humanen PMNL

Da AKBA und KBA eine Ionophor- bzw. AA-induzierte MAPK Aktivierung nicht hemmen konnten, schien es möglich, dass BAs bzw. entsprechende *B. serrata*-Extrakte MAPK auch ohne weiteren Stimulus aktivieren können.

Wie Abb. 18 zeigt, führte eine 3-minütige Exposition der PMNL mit BS-Extrakten (3,8 bis 130,0 µg/mL) zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der p38 MAPK und p42^{MAPK}, wohingegen p44^{MAPK} scheinbar nicht beeinflusst wird.

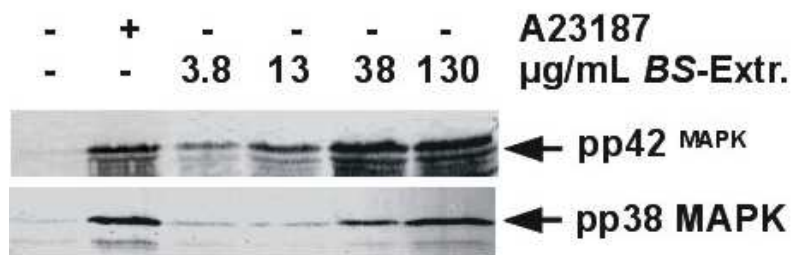


Abb. 18: MAPK Aktivierung durch *B. serrata* Extrakte (WB)

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit entsprechenden Konzentrationen eines BS-Extr. bei 37°C stimuliert und die Reaktion nach 2,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Als Positivkontrolle wurde Ca^{2+} -Ionophor A23187 (2,5 μM) verwendet. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, zeigten auch KBA und AKBA bei einer Konzentration von 30 μM (entsprechen $\sim 38,0 \mu\text{g/mL BS-Extr.}$) eine Aktivierung der p38 MAPK und p42^{MAPK}, wohingegen β -BA und A- β -BA (je 30 μM) p42^{MAPK} nicht und p38 MAPK nur schwach aktivierten. Um die Spezifität der BAs für die MAPK Aktivierung zu bestimmen, wurden die beiden pentazyklischen Triterpene Ursolsäure (US) und α -Amyrin untersucht. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, führten diese Verbindungen bei einer Konzentration von 100 μM nicht zur Aktivierung der MAPK. Bei Untersuchungen der JNKs konnte keine Aktivierung durch BAs festgestellt werden (ohne Abb.).

Die Aktivierung der p42^{MAPK} durch AKBA wurde zusätzlich durch ein In-gel Kinase Assay bestätigt (Abb. 20). In Übereinstimmung mit den in Abb. 19 gezeigten Ergebnissen, führte auch hier die Zellstimulation mit BS-Extrakt (38 $\mu\text{g/mL}$) und AKBA (30 und 100 μM) zu einer auffallenden p42^{MAPK} Aktivierung. Eine Aktivierung der p44^{MAPK} war nicht zu erkennen. Untersuchungen mit 100 μM KBA, A- β -BA und β -BA zeigten dagegen nur eine geringe oder gar keine Kinaseaktivierung im In-gel Kinase Assay (ohne Abb.)

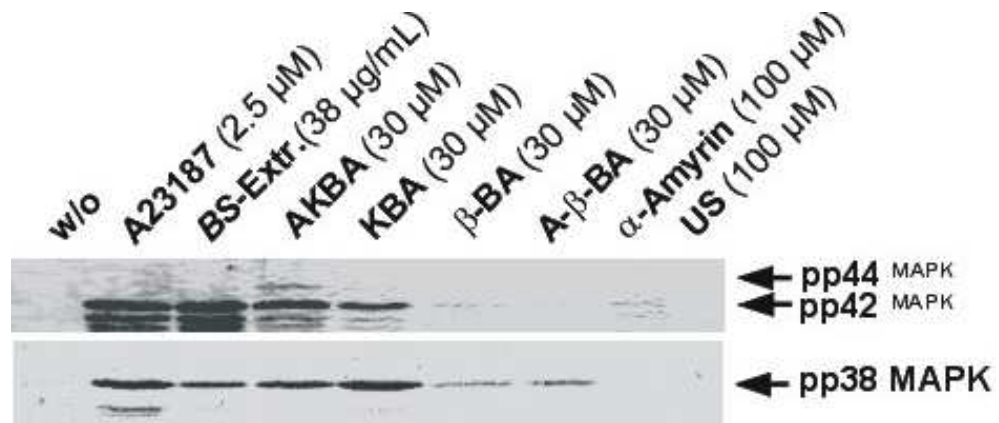


Abb. 19: MAPK Aktivierung durch pentazyklische Triterpene (WB)

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den Testsubstanzen bei 37°C stimuliert und die Reaktion nach 1,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Als Positivkontrolle wurde Ca²⁺-Ionophor A23187 verwendet. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

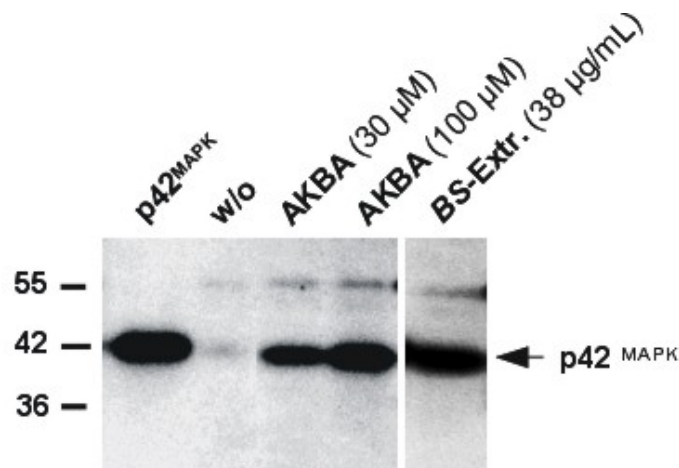


Abb. 20: p42^{MAPK} Aktivierung durch AKBA und BS-Extrakt (In-gel Kinase Assay)

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den Testsubstanzen stimuliert und die Reaktion nach 1,5 Min. mit eiskaltem SDS-b abgestoppt. Die Aktivität der p42^{MAPK} wurde unter Verwendung von Myelin Basic Protein (MBP; 0,5 mg/mL) als Substrat bestimmt, indem die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE über ein mit MBP polymerisiertes Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Nach Renaturierung der Proteine wurde das Gel in Gegenwart von γ -³²P-ATP inkubiert, das überschüssige γ -³²P-ATP entfernt und die phosphorylierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert. Als Positivkontrolle wurde gereinigte rekombinante aktive p42^{MAPK} (10 mU) verwendet. In-gel Gel ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich der Aktivierung von MAPK durch AKBA und KBA, wurden BA-Konzentrationen im Bereich von 3 bis 100 μM gewählt. Wie in *Abb. 21* zu erkennen ist, wurden p38 MAPK und p42^{MAPK} schon bei einer Konzentration von 30 μM durch AKBA klar aktiviert, wohingegen meist 100 μM KBA für eine eindeutige Aktivierung von p42^{MAPK} benötigt wurden. Dagegen reichten bereits 10 bis 30 μM KBA aus, um eine signifikante Aktivierung der p38 MAPK zu erzielen.

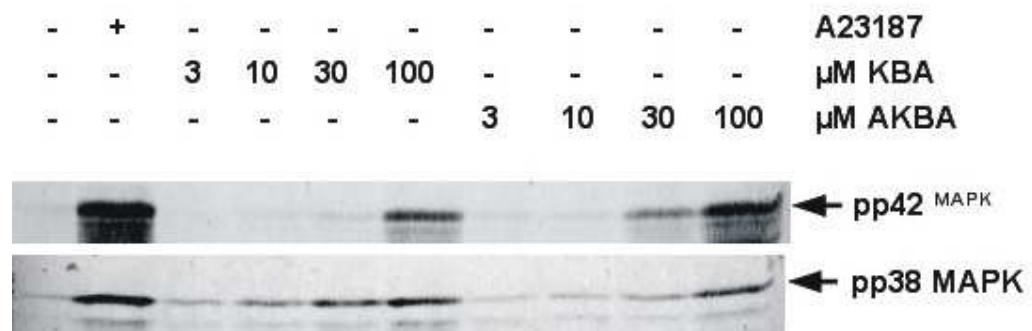


Abb. 21: Dosisabhängige MAPK Aktivierung durch AKBA und KBA

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit AKBA oder KBA in den entsprechenden Konzentrationen stimuliert und die Reaktion nach 1,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Als Positivkontrolle wurde Ca^{2+} -Ionophor A23187 (2,5 μM) verwendet. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Untersuchungen der BAs ohne Keto-Funktion (β -BA, A- β -BA) ergaben für beide Substanzen erst bei 100 μM eine schwache MAPK Aktivierung, die auch bei 150 μM nicht verstärkt wurde (ohne Abb.). Damit ist denkbar, dass die 11-Keto-Funktion eine strukturelle Voraussetzung für die Aktivierung der MAPK durch BAs darstellt.

Da die Intensität und Dauer der MAPK Aktivierung einerseits von der Aktivierung vorgeschalteter Proteinkinasen abhängig ist, andererseits von der Inaktivierung durch Phosphatasen, wurde im Folgenden der Zeitverlauf der Kinaseaktivierung durch AKBA und KBA untersucht (*Abb. 22*). Es zeigte sich, dass die Aktivierung von p42^{MAPK} und p38 MAPK durch 30 μM AKBA und 100 μM KBA sehr schnell (nach max. 30 Sek.) erfolgte und nach 1 bis 2,5 Min. maximal war. Eine eindeutige Inaktivierung der Kinasen war nach etwa 10 Min. zu erkennen.

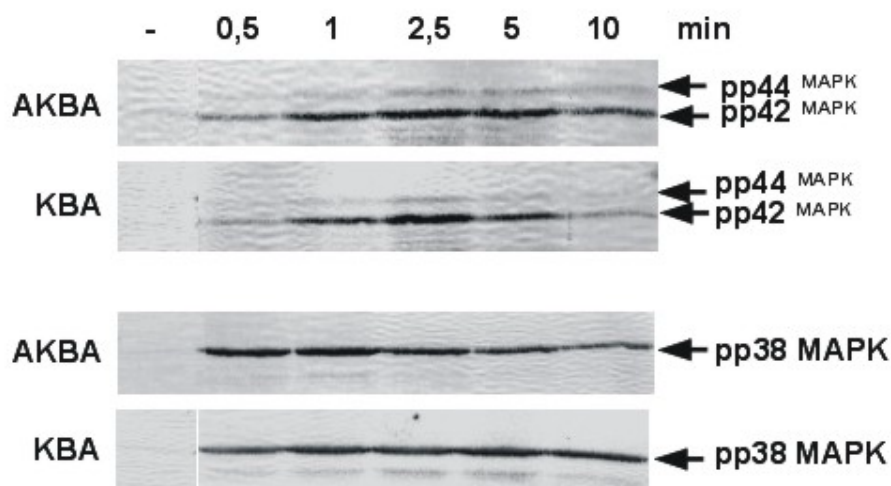


Abb. 22: Zeitverlauf der MAPK Aktivierung durch AKBA und KBA

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit 30 μM AKBA oder 100 μM KBA bei 37°C stimuliert und die Reaktionen nach oben angegebenen Zeiten mit SDS-b abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5.3.3 Einfluss von Ca^{2+} , PKC und PI 3-K auf die induzierte MAPK Aktivierung

Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der MAPK Aktivierung durch 11-Keto-BAs wurden in weiteren Experimenten die Funktion von Ca^{2+} und vorgeschalteten Proteinkinase-Kaskaden untersucht.

Zur Überprüfung des Einflusses von Ca^{2+} auf die Kinaseaktivierung wurden PMNL in Anwesenheit oder Abwesenheit von Ca^{2+} untersucht. Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration betrug 1 mM.

Wie in Abb. 23 zu erkennen ist, führte die Komplexierung von extrazellulärem Ca^{2+} durch EDTA und/oder intrazellulärem Ca^{2+} durch zellpermeables BAPTA/AM nur zu einer geringfügigen Abschwächung der AKBA-induzierten MAPK Aktivierung. Weder intrazelluläres noch extrazelluläres Ca^{2+} scheinen daher für die AKBA-induzierte MAPK Aktivierung eine wichtige Rolle zu spielen.

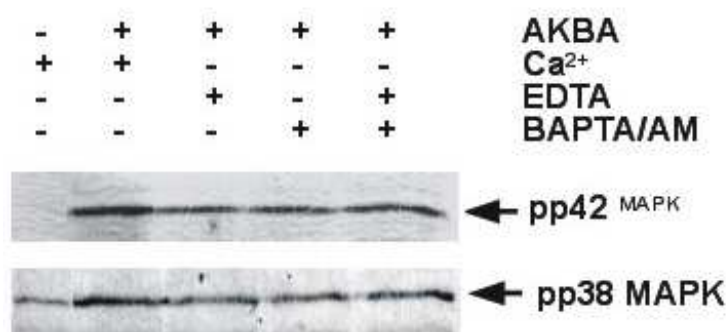


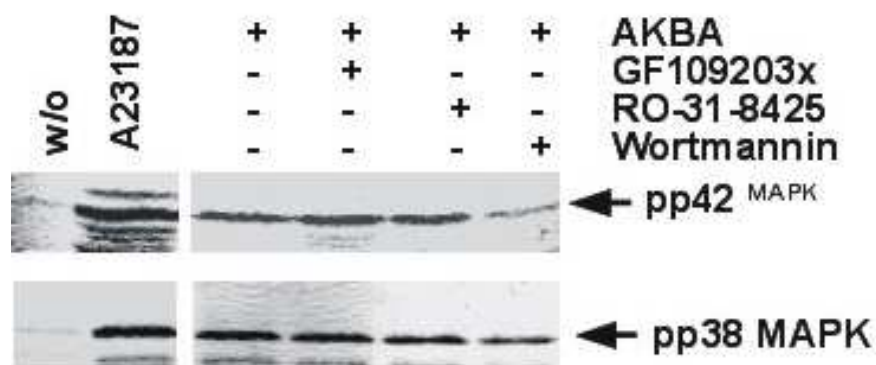
Abb. 23: Ca²⁺-Abhängigkeit der MAPK Aktivierung durch AKBA

PMNL wurden in PG Puffer aufgenommen und entweder mit 1mM Ca²⁺, 1 mM EDTA oder 30 µM BAPTA/AM für 15 Min. vorinkubiert und anschließend mit 30 µM AKBA stimuliert. Die Reaktionen wurde nach 1,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Untersuchungen zum Einfluss der PKC und PI 3-K auf die MAPK Aktivierung lieferten folgende Ergebnisse: Wie dem WB und dem In-gel Kinase Assay in Abb. 24 zu entnehmen ist, führte die Hemmung von PKC durch RO-31-8425 (1 µM) zu keiner nennenswerten Abschwächung der AKBA-induzierten p38 MAPK und p42^{MAPK} Aktivierung. Der PKC-Inhibitor GF109203x (1 µM) zeigte dagegen eher eine Verstärkung des p42^{MAPK}-Signals. Offensichtlich sind also Isoformen der PKC in die Aktivierung der beiden MAPK kaum involviert.

Der PI 3-K-Inhibitor Wortmannin (0,2 µM) erzielte vor allem bei der p42^{MAPK} eine signifikante Abnahme der Aktivierung durch AKBA, aber auch die p38 MAPK Aktivierung wurde reduziert. Daraus kann geschlossen werden, dass die PI 3-K in die vorgeschaltete Kaskade zur AKBA-induzierten MAPK Aktivierung involviert ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden unter Verwendung von KBA (100 µM) als Stimulus erzielt (ohne Abb.).

A:



B:

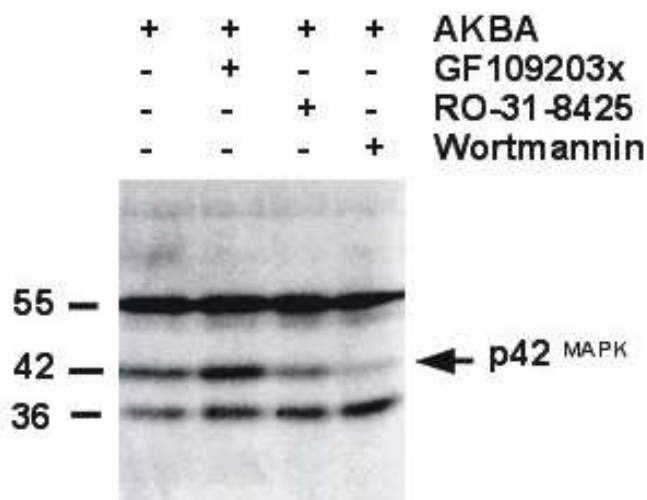


Abb. 24: Effekte von PKC und PI 3-K Inhibitoren auf die MAPK Aktivierung durch AKBA

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den entsprechenden Inhibitoren für 15 Min. vorinkubiert und anschließend mit 30 μ M AKBA stimuliert. Die Reaktionen wurden nach 1,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte über SDS-PAGE und Western Blotting (A) bzw. In-gel Kinase Assay (B). Die abgebildeten Experimente sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5.3.4 Pertussistoxin (PTX) schwächt die BA-induzierte MAPK Aktivierung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung innerhalb einer Zelle. Nach Bindung durch einen Liganden bewirken sie eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte, u.a. die Aktivierung von intrazellulären Proteinkinasen, wozu auch die p38 MAPK, p42/44^{MAPK} und JNKs gehören^{328, 329}. Um eine mögliche Rolle eines G_i- oder G_o-Proteins in der AKBA-induzierten MAPK Aktivierung nachzuweisen, wurden die Zellen mit Pertussistoxin (PTX; 2 µg/mL), einem irreversiblen Inhibitor der G_{αi}-Untereinheit, vorinkubiert und mit den entsprechenden BAs stimuliert.

Um zytotoxische Effekte des PTX und Effekte des Lösungsmittels (Glycerol) auszuschließen, wurden in Kontrollexperimenten die 5-LO Aktivitäten in intakten Zellen nach Stimulation mit 10 µM Ionophor und 40 µM AA (umgeht G-Protein-Signalling) bestimmt. Es zeigte sich hier kein Aktivitätsverlust der 5-LO, was auf zelluläre Integrität hinweist.

Wie in *Abb. 25* gezeigt ist, wurde die p42^{MAPK} Aktivierung durch AKBA und KBA in PMNL durch PTX eindeutig gehemmt. Der Effekt auf die Aktivierung der p38 MAPK ist dagegen schwächer ausgeprägt. Das Kontrollexperiment mit fMLP zeigt wie erwartet ebenfalls eine Reduktion der MAPK Aktivierung.

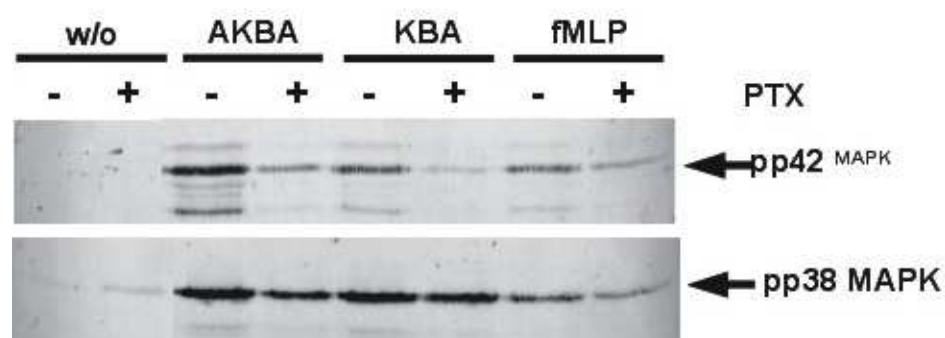


Abb. 25: Einfluss von PTX auf MAPK Aktivierung

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit oder ohne PTX (2 µg/mL) für 1 Std. vorinkubiert und entweder mit AKBA (30 µM), KBA (30 µM) oder fMLP (1 µM) stimuliert. Die Reaktionen wurden nach 1,5 Min. mit SDS-b abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5.3.5 Keto-BAs induzieren die Ca^{2+} -Freisetzung in PMNL

In Analogie zur MAPK Aktivierung durch AKBA und KBA zogen wir eine Ca^{2+} -Mobilisierung durch BAs in Erwägung.

Zur Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels wurden PMNL mit zell-permeablem Fura-2/AM vorinkubiert, das nach Bildung eines Ca^{2+} -Chelatkomplexes fluoresziert. Diese Fluoreszenz lässt sich zur quantitativen Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration heranziehen, die nach der Methode von Grynkiewicz *et al.*³¹¹ berechnet wird.

Wie aus *Abb. 26* ersichtlich, induzieren AKBA und KBA (je 30 μM) einen schnellen und signifikanten Ca^{2+} -Einstrom, der mit dem Effekt des fMLP vergleichbar ist. Als charakteristisches Merkmal im Kurvenverlauf zeigte sich nach Erreichen eines Maximums eine erneute Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} -Levels. Unter Verwendung von 100 μM AKBA war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt, d.h. die Ca^{2+} -Konzentration blieb im Messzeitraum nach der Stimulation mit AKBA relativ konstant (ohne *Abb.*).

Der intrazelluläre Ca^{2+} -Level lag in unstimulierten Zellen bei 40 bis 50 nM und stieg durch 1 μM fMLP auf ca. 240 nM an. 10 und 30 μM AKBA lieferten Ca^{2+} -Konzentrationen von ~120 und ~230 nM und 10 und 30 μM KBA lieferten Werte von durchschnittlich 105 und 180 nM. BAs ohne Keto-Funktion (β -BA und A- β -BA) zeigten sich, wie schon bei der Aktivierung der MAPK, auch hinsichtlich der Ca^{2+} -Freisetzung in PMNL als unwirksam.

Weiterführende Untersuchungen durch Daniel Pöckel (AK Werz/Steinhilber) zeigten, dass auch die AKBA-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung in humanen PMNL durch PTX (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) um etwa die Hälfte reduziert werden konnte. Kontrollversuche mit fMLP zeigten vergleichbare Effekte (ohne *Abb.*).

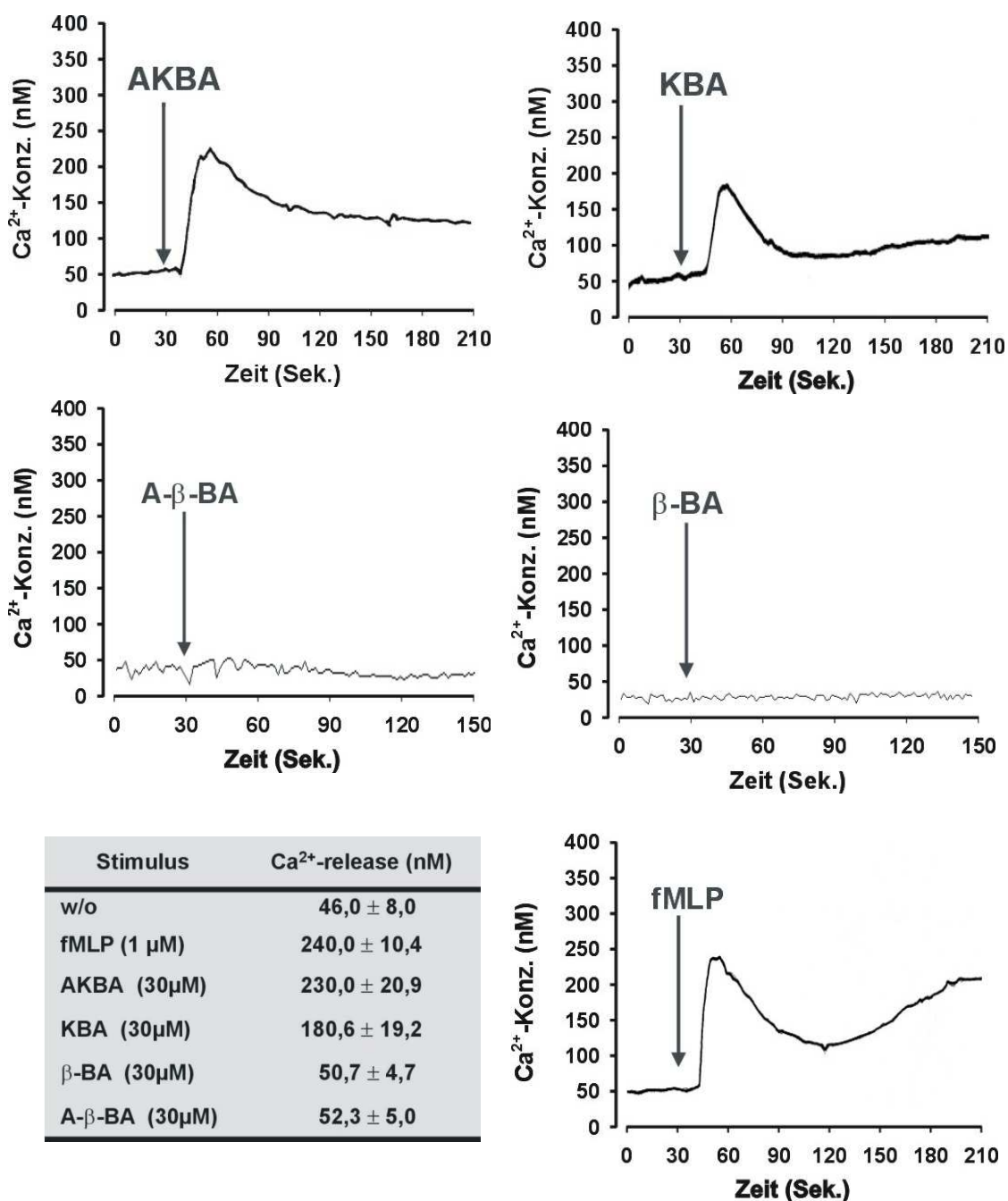


Abb. 26: Ca²⁺-Mobilisierung durch BAs (30µM) in PMNL

PMNL wurden in PG Puffer aufgenommen, mit Fura-2/AM für 30 Min. vorinkubiert, 1mM Ca²⁺ zugesetzt und anschließend mit den entsprechenden Testsubstanzen stimuliert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Lumineszenzspektrometer. Die Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die abgebildeten Kurven sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (Mittelwerte in nM ± S.E.; n = 5)

5.4 Diskussion

Aufgrund der Diskrepanz der Hemmwirkung von AKBA und KBA auf die 5-LO in intakten Zellen und Zellhomogenaten vermuteten wir neben der direkten 5-LO Hemmung eine Blockade der Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der 5-LO führen. Zu den Signaltransduktionskaskaden der 5-LO gehören u.a. die p42/44^{MAPK} und p38 MAPK²⁸¹, sowie die Mobilisierung von Ca²⁺²¹⁵.

Interessanterweise konnte jedoch anstatt einer Hemmung der Ionophor- oder AA-induzierten MAPK Aktivierung eine verstärkte Stimulation der Kinasen durch 11-Keto-BAs festgestellt werden. Wurden PMNL direkt mit AKBA und KBA stimuliert resultierte eine beachtliche Aktivierung von p42^{MAPK} und p38 MAPK. Daneben induzierten beide 11-Keto-BAs die Mobilisierung von zellulärem Ca²⁺. Die zur Ca²⁺-Mobilisierung bzw. MAPK Aktivierung benötigten Konzentrationen von AKBA oder KBA lagen im Bereich der Konzentrationen, die von anderen Arbeitsgruppen für biologische Effekte der BAs festgestellt wurden^{24, 31}. In Analogie zu 11-Keto-BAs konnte auch für 3-Oxo-Tirucallensäure, isoliert aus *B. serrata*, eine erhöhte MEK1/2 Phosphorylierung und eine moderate Ca²⁺-Freisetzung in PMNL gezeigt werden⁸. Die 11-Keto-Funktion scheint für die Effekte der BAs in PMNL wichtig zu sein, da β -BA und A- β -BA kaum einen Einfluss auf die MAPK Aktivierung ausübten und nur AKBA und KBA die Ca²⁺-Freisetzung induzierten. Auch in anderen experimentellen Modellen zeigte sich die Wichtigkeit der 11-Keto-Gruppe. So ist für eine effektive Inhibition der Agonist-induzierten Leukotrienbildung in Neutrophilen²¹ sowie für einen deutlichen inhibierenden Effekt auf die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in HL60 Zellen³⁰ die 11-Keto-Gruppe Voraussetzung.

Vergleichbar mit Keto-BAs induzieren die chemotaktischen Agonisten fMLP und PAF die Aktivierung von p42^{MAPK} und p38 MAPK^{66, 330} und führen zu einer schnellen Ca²⁺-Freisetzung in PMNL^{331, 332}. Vor allem die Charakteristik der fMLP-induzierten MAPK Aktivierung ähnelt im Zeitverlauf dem Einfluss von Ca²⁺, PKC und PI 3-K, der für AKBA und KBA charakterisierten MAPK Aktivierung^{61, 65, 66}. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die BAs möglicherweise die gleichen Signaltransduktionswege wie z.B. fMLP oder PAF zur MAPK Aktivierung nutzen.

Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger biochemischer Mechanismus, der zur Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere und zur Regulation einer Vielzahl intrazellulärer Enzyme und Transkriptionsfaktoren dient. Auch die Stimulation der 5-LO kann durch Phosphorylierung über die p38 MAPK-regulierte MK2 an Ser-271 und über p42/44^{MAPK} an Ser-663 erfolgen. Die Aktivierung von p42/44^{MAPK} und p38 MAPK wurde durch WB und phosphospezifische Antikörper bestimmt, die nur die dualphosphorylierte, aktive Form der Kinasen detektieren. Durch AKBA und KBA erfolgte eine rasche Aktivierung der p38 MAPK und p42^{MAPK}, die einen zeit- und konzentrationsabhängigen Verlauf zeigte. Zusätzlich wurde die p42^{MAPK} Aktivierung durch AKBA mittels In-gel Kinase Assay bestätigt.

PKC Isoformen sind häufig als Schaltstellen in die Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung von p42/44^{MAPK} und p38 MAPK in PMNL involviert. Die Mitglieder der Familie der PKC sind zentrale Signalproteine und als solche an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Zu den Substraten der PKC zählen u.a. die Raf-Kinase¹⁷⁹, die Signale über den MAPK-Weg weitergibt, sowie die MARCKS-Proteine¹⁵⁵, denen die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts¹⁵⁶ zugeschrieben wird. Der PKC-Inhibitor RO-31-8524 führte in unseren Untersuchungen zu keiner nennenswerten Inhibierung der AKBA-induzierten p42^{MAPK} und p38 MAPK Aktivierung, wohingegen GF109203x die Effekte von AKBA leicht steigerte. Die Gründe hierfür sind noch unklar, doch offensichtlich wird durch Hemmung GF109203x-sensitiver PKC Isoformen ein Signalweg soweit unterdrückt, dass andere Signalwege (z.B. über PI 3-K) stärker stimuliert werden und somit eine erhöhte MAPK Aktivierung resultiert. In Analogie zur AKBA-induzierten p42/44^{MAPK} und p38 MAPK Aktivierung zeigt sich auch für die fMLP-induzierte MAPK Aktivierung eine untergeordnete Rolle der PKC in PMNL⁶⁵.

Die PI 3-Kinase findet man mit vielen GPCRs, RTKs und zytoplasmatischen Proteinkinasen assoziiert. Eine besondere Funktion wird ihr bei der Wachstumsregulation³³³ und der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts durch die GTPase Rac^{334, 335} zugesprochen. Wie die PKC ist auch die PI 3-K ein Effektorprotein der Ras-Raf-Signal-Übertragung³³⁶. Verschiedene Agonisten wie fMLP oder AA führen in PMNL zu einer schnellen Aktivierung der PI 3-K und in weiterer Folge zur Regulation von chemotaktischen Eigenschaften^{337, 338}. Dabei ist die PI 3-K teilweise in die fMLP- bzw. AA-induzierte p42/44^{MAPK} Aktivierung involviert^{339, 340},

spielt aber in der p38 MAPK Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle^{341, 342}. Wortmannin, ein selektiver Inhibitor der PI 3-K, führte in unseren Experimenten zu einer wesentlichen Hemmung der AKBA-induzierten p42^{MAPK} Aktivierung, aber nur zu einer teilweisen Reduktion der Stimulation von p38 MAPK. Somit dürfte die PI 3-K ein wichtiges Element in der Signaltransduktion der durch AKBA induzierten p42^{MAPK} Aktivierung sein.

Zu den Komponenten der intrazellulären Signalleitung zählen neben Proteinen (Kinasen, Phosphatasen, regulatorische GTPasen und Adaptorproteine) auch niedermolekulare Botenstoffe (Inosit-Phosphate, DAG, Ca²⁺ etc.). Vor allem Ca²⁺ ist ein zentraler „Second messenger“ der Zelle, das nach Stimulation durch Rezeptoragonisten ins Zytosol einströmt und eine Anzahl von funktionellen Prozessen in PMNL reguliert³⁴³. So spielt Ca²⁺ u.a. eine wichtige Rolle in der Regulation von Proteinphosphorylierungen³⁴⁴ und Ca²⁺-selektive Ionophore wie Ionomycin und A23187 führen zu einer starken Aktivierung von p42/44^{MAPK} und p38 MAPK in humanen PMNL^{345, 324}.

Wir konnten zeigen, dass auch AKBA und KBA einen schnellen und signifikanten Ca²⁺-Einstrom in PMNL induzieren, der im Ausmaß und Zeitverlauf mit dem Effekt des chemotaktisch wirksamen fMLP vergleichbar ist. Die Ca²⁺-Freisetzung könnte, wie auch bei der Stimulation mit Ca²⁺-Ionophor, ein Grund für die durch Keto-BAs induzierte MAPK Aktivierung sein. Es zeigte sich allerdings, dass eine Ca²⁺-Mobilisierung keine zwingende Voraussetzung für die MAPK Aktivierung durch Keto-BAs darstellt, da die Entfernung von intra- und/oder extrazellulärem Ca²⁺ nur zu einer teilweisen Reduktion der AKBA-induzierten MAPK Aktivierung führte. Diese Beobachtungen stimmen interessanterweise mit den von *Ferby et al.*³³⁰ für PAF gefundenen Ergebnisse überein und bestätigen, dass neben der Ca²⁺-Freisetzung auch alternative Mechanismen, wie z.B. die PI 3-K-regulierte Signalübertragung, zur MAPK Aktivierung führen können.

Chemotaktische Agonisten wie PAF, fMLP oder LTB₄, binden an spezifische GPCRs und führen dadurch zur Aktivierung von MAPK und zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺. Über diese Signalmoleküle werden wiederum eine Anzahl von funktionellen Prozessen wie Chemotaxis, Degranulierung, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, AA-Freisetzung und Leukotrienbiosynthese reguliert^{346, 347, 348}. Für die Ermittlung der Beteiligung von G-Proteinen an zellulären Prozessen sind

zwei bakterielle Toxine von großer Bedeutung. Durch ADP-Ribosylierung inaktiviert das Cholera-toxin die GTPase-Aktivität eines G_s -Proteins, wohingegen das Pertussis-toxin (PTX) die Aktivierung eines G_i -Proteins durch seinen Rezeptor verhindert.

In Analogie zu chemotaktischen Agonisten ist es möglich, dass 11-Keto-BAs an spezifische Membranrezeptoren binden und damit Signale an zelluläre Effektoren weitergeben. Die 11-Keto-Funktion könnte eine strukturelle Voraussetzung für die Interaktion mit dem Rezeptor in PMNL sein. Experimente mit PTX lieferten erste Hinweise auf die Beteiligung eines $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteins an der AKBA-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung und MAPK Aktivierung. Damit ist es denkbar, dass BAs Liganden von GPCRs sind oder alternativ G-Proteine direkt bzw. indirekt über Regulatoren des G-Protein Signalings (RGS) stimulieren. Wie für Lipoamine beschrieben³⁴⁹, wäre eine direkte Modulation von G-Proteinen durch BAs möglich. Interessanterweise erfolgte sowohl die Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms als auch die Hemmung der MAPK Aktivierung durch PTX nur unvollständig. Dabei wurde die BA-induzierte p38 MAPK Aktivierung schwächer als die p42/44^{MAPK} Aktivierung durch PTX beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht-PTX-sensitive G_q -Untereinheiten, wie im Fall des PAF-Rezeptors⁷⁴ oder des fMLP-Rezeptors⁶⁷, involviert sind.

Zusammenfassend stimulieren 11-Keto-BAs in isolierten humanen PMNL unter Beteiligung von G-Proteinen wichtige zelluläre Signaltransduktionswege wie die Ca^{2+} -Mobilisierung und MAPK-Aktivierung. Die Charakteristik (GPCR, PI 3-K) und das Wirkprofil zeigen dabei eine auffallende Ähnlichkeit mit chemotaktischen Verbindungen wie fMLP, LTB_4 und PAF.

5.5 Funktionelle Effekte der BAs in PMNL

Signalmoleküle wie Ca^{2+} und Proteinkinasen sind in PMNL an einer Anzahl von funktionellen Prozessen, z.B. der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), der Freisetzung von Lipidmediatoren (AA) sowie der Leukotrienbiosynthese, beteiligt.

In weiteren Untersuchungen galt es daher festzustellen, ob BAs in der Lage sind, funktionelle Prozesse in PMNL zu induzieren.

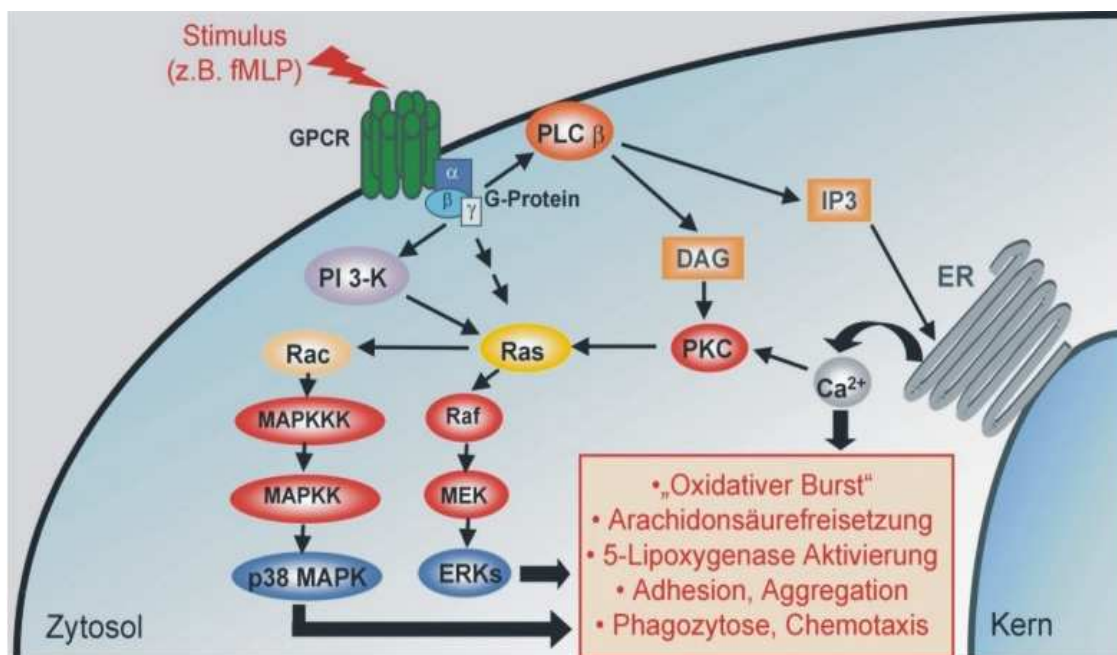


Abb. 27: Signalmoleküle und funktionelle Prozesse in PMNL (vereinfachtes Schema)

5.5.1 11-Keto BAs stimulieren die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sind in der Lage, in den Körper eindringende Mikroorganismen mittels Phagozytose abzutöten. Hierbei spielt die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) durch die NADPH-Oxidase eine wesentliche Rolle. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase benötigt Ca^{2+} und eine mehrfache Phosphorylierung der p47^{phox} Untereinheit durch bestimmte PKC-Isoformen und andere Kinasen (z.B. MAPKs) ^{118, 119, 120}.

In Übereinstimmung mit der Literatur^{350, 351} führten fMLP, Ionophor und PMA in PMNL zu einer signifikanten Freisetzung von ROS. Wie aus *Abb. 28* ersichtlich ist, konnte auch für AKBA und KBA eine mit Ionophor bzw. PMA vergleichbare Hochregulation der ROS-Bildung festgestellt werden, wohingegen A- β -BA und β -BA verhältnismäßig schwache Effekte zeigten. Die ROS-Freisetzung durch AKBA oder KBA zeigte sich eindeutig effektiver als die fMLP-induzierte.

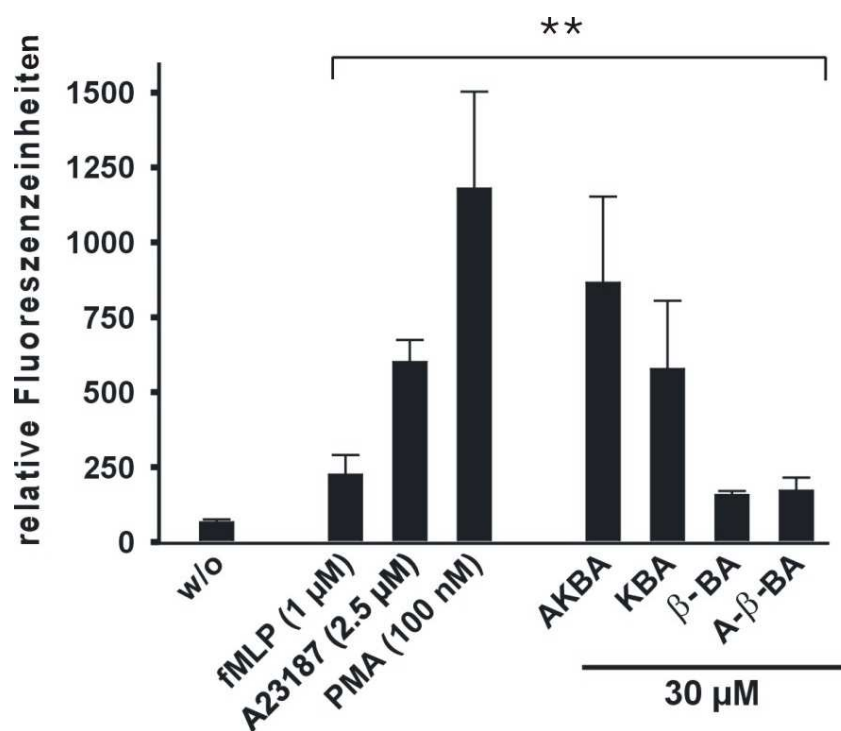


Abb. 28: Bildung von ROS durch verschiedene Stimuli in PMNL

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit dem Peroxid-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA (1 µg/mL) für 2 Min. bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. Die Messung der gebildeten Peroxide erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der gemessenen 5 Min. wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Mittelwerte \pm S.E.; n = 4; Student t Test: ** P < 0,01).

5.5.2 PI 3-K und p42/44^{MAPK} regulieren die AKBA-induzierte ROS-Bildung

Um die zugrundeliegenden Signalwege der AKBA-induzierten ROS-Bildung zu charakterisieren, wurden PMNL mit spezifischen Inhibitoren möglicher Signalmoleküle vorinkubiert. Als Kontrollsubstanz wurde PMA verwendet, von dem bekannt ist, dass es PKC-Isoenzyme aktiviert, die wiederum die NADPH-Oxidase durch mehrfache Phosphorylierung der p47^{phox}-Untereinheit stimulieren^{117, 118}.

Untersuchungen mit DPI, einem direkten Inhibitor der NADPH-Oxidase³⁵², zeigten, dass sowohl die PMA- als auch die AKBA-induzierte ROS-Freisetzung nahezu vollständig supprimiert wurde. Auch die Komplexbildung von Ca²⁺ durch BAPTA/AM und EDTA führte zu einer deutlichen Reduktion der AKBA- oder PMA-induzierten ROS-Bildung (Abb. 29).

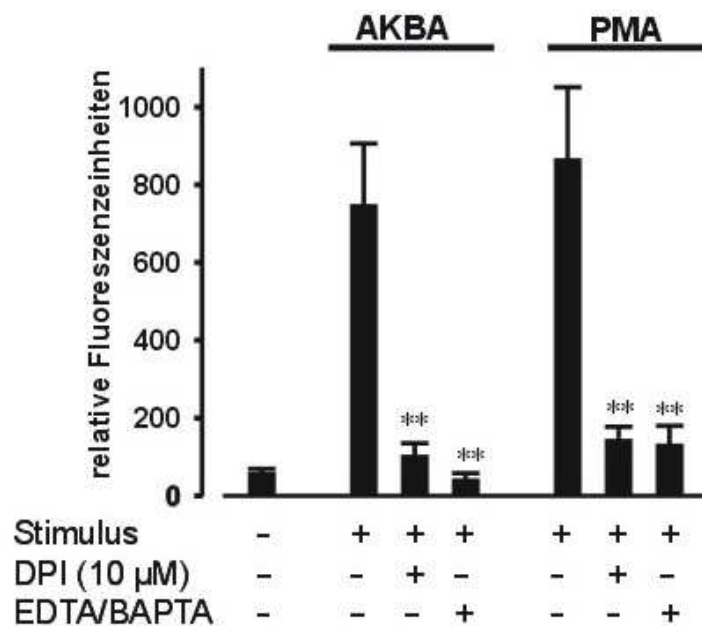


Abb. 29: Einfluss von NADPH-Oxidase und Ca²⁺ auf die ROS-Bildung

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit 10 µM DPI oder 1 mM EDTA/30 µM BAPTA/AM für 20 Min. bei RT vorinkubiert und anschließend bei 37°C mit DCF-DA (1 µg/mL) versetzt. Nach weiteren 2 Min. erfolgte die Zugabe von AKBA (30 µM) oder PMA (100 nM). Die Messung der gebildeten Peroxide erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Mittelwerte ± S.E.; n = 4; Student t Test: ** P<0,01).

Im Folgenden wurde der Einfluss pharmakologischer Proteinkinase-Inhibitoren auf die AKBA- und PMA-induzierte ROS-Bildung untersucht. Wie aus *Abb. 30* zu entnehmen ist, wurde die PMA-induzierte ROS-Freisetzung nur unwesentlich durch Wortmannin (PI 3-K) und SB203580 (p38 MAPK) beeinträchtigt. Dagegen reduzierte U0126, ein Inhibitor der den p42/44^{MAPK} vorgeschalteten MEK1/2, die ROS-Freisetzung teilweise. Die Effekte von PMA wurden durch den PKC-Inhibitor RO-318425 vollständig aufgehoben. Für die AKBA-induzierte ROS-Bildung wurde keine Hemmung durch RO-318425 und SB203580 gemessen, dagegen konnte sie durch Wortmannin und U0126 signifikant gehemmt werden. Anhand dieser Ergebnisse sind die p42/44^{MAPK} und PI 3-K an der Bildung von ROS durch AKBA beteiligt.

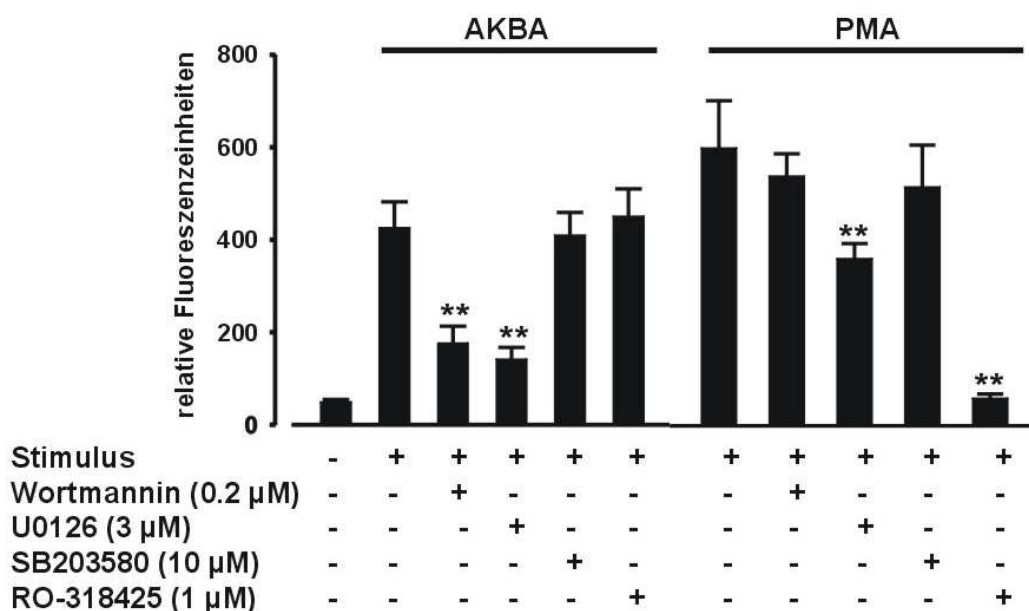


Abb. 30: Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die ROS-Bildung in PMNL

PMNL wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den angegebenen Inhibitoren für 20 Min. bei RT vorinkubiert und anschließend bei 37°C mit DCF-DA (1 µg/mL) versetzt. Nach weiteren 2 Min. erfolgte die Zugabe von AKBA (30 µM) oder PMA (100 nM). Die Messung der gebildeten Peroxide erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der gemessenen 5 Min. wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Mittelwerte ± S.E.; n = 4; Student t Test: ** P < 0,01).

5.5.3 11-Keto-BAs führen zur Freisetzung von [³H]-Arachidonsäure in PMNL

Die Freisetzung von AA in Leukozyten ist ein wichtiger Schritt in der Entstehung entzündlicher Reaktionen. Da in PMNL die cPLA₂ über Ca²⁺ und Phosphorylierung durch MAPK reguliert wird²⁷², lag es nahe, dass BAs in der Lage sind, über diese Mechanismen AA freizusetzen.

Wie dem Balkendiagramm in *Abb. 31* zu entnehmen ist, erhöhten AKBA und KBA (je 100 µM) sowie ein BS-Extrakt (130 µg/mL) die Freisetzung von [³H]AA um den Faktor 2,0 bis 2,5 gegenüber unstimulierten Zellen, wohingegen β-BA und A-β-BA nur vergleichbar schwache Effekte erzielten. Auch in diesem experimentellen Ansatz zeigten sich AKBA und KBA ähnlich effektiv wie fMLP.

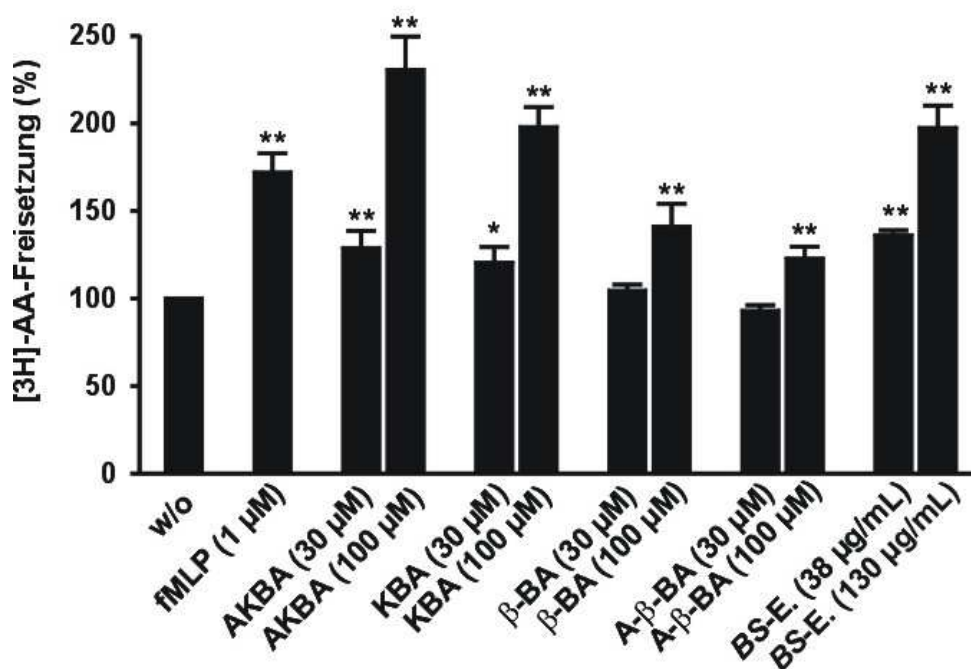


Abb. 31: Arachidonsäurefreisetzung durch BAs in PMNL

PMNL wurden mit 0,25 µCi/mL [³H]AA beladen, anschließend gewaschen und in PGC Puffer plus FAF-BSA aufgenommen und mit der zu untersuchenden Substanz für 5 Min. bei 37°C stimuliert. Die Freisetzung von [³H]AA ins Zellmedium wurde mittels eines beta-Counters bestimmt und in Prozent gegenüber den unstimulierten Zellen angegeben. (Mittelwerte ± S.E.; n = 4; Student t Test: ** P < 0,01 bzw. * P < 0,05).

Sowohl die fMLP(1 μ M)- als auch die AKBA(100 μ M)-induzierte AA-Freisetzung war nach Entfernen von Ca²⁺ durch BAPTA/AM und EDTA fast vollständig supprimiert (ohne Abb.). Um den Einfluss der p38 MAPK und p42/44^{MAPK} auf die AA-Freisetzung zu untersuchen, wurden Experimente mit U0126 (3 μ M) und SB203580 (10 μ M) durchgeführt. Die Effekte von AKBA (100 μ M) wurden durch U0126 teilweise (53 \pm 4,6%) verringert, durch SB203580 jedoch nicht beeinflusst (ohne Abb.). Daher scheint die p42/44^{MAPK}, jedoch nicht die p38 MAPK, an der AKBA-induzierten AA-Freisetzung beteiligt zu sein.

5.5.4 11-Keto BAs stimulieren die 5-LO in intakten Zellen

In intakten Zellen kann die 5-LO durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Levels und/oder durch Phosphorylierung durch p42/44^{MAPK} bzw. p38 MAPK-regulierte MK2 aktiviert werden^{193, 325}. Da BAs in PMNL Ca²⁺ mobilisieren und MAPK aktivieren, lag es nahe, dass AKBA und KBA als Stimuli der 5-LO in intakten Zellen fungieren können.

Wie aus *Abb. 32* zu entnehmen ist, zeigte sich bei simultaner Zugabe von AKBA bzw. KBA (je 30 μ M) mit 20 μ M AA eine etwa 3,8- bzw. 2,4-fache Steigerung der 5-LO Produktbildung gegenüber der Kontrolle mit AA stimulierten Zellen. Für BAs ohne Keto-Funktion konnten keine stimulierenden Effekte festgestellt werden.

Überraschenderweise war die Hochregulation durch AKBA und KBA nur in Abwesenheit von intra- und extrazellulärem Ca²⁺ in diesem Ausmaß zu finden. Wie in *Abb. 33* zu erkennen ist, erzielte KBA in Anwesenheit von Ca²⁺ (1 mM) keinen Effekt und AKBA lieferte nur einen 1,9-fachen Anstieg der 5-LO Produktbildung. Wurde die Ca²⁺-Konzentration auf 2 mM erhöht, so konnte auch für AKBA kein stimulierender Effekt mehr gezeigt werden (ohne Abb.).

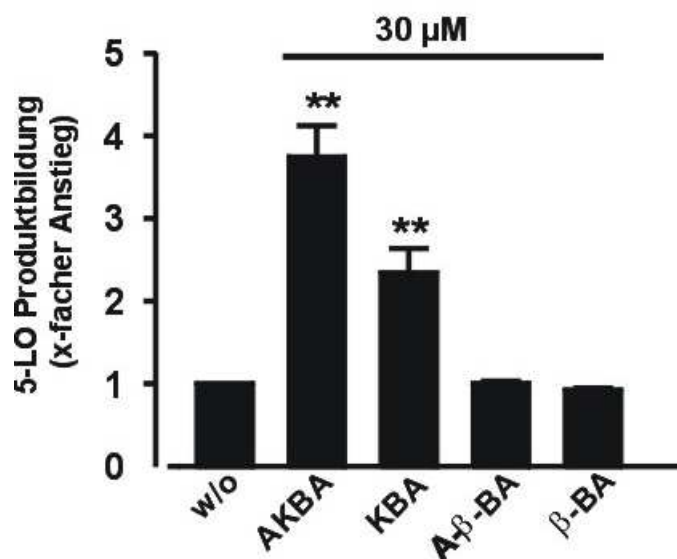


Abb. 32: 5-LO Aktivierung in intakten PMNL bei Abwesenheit von Ca^{2+}

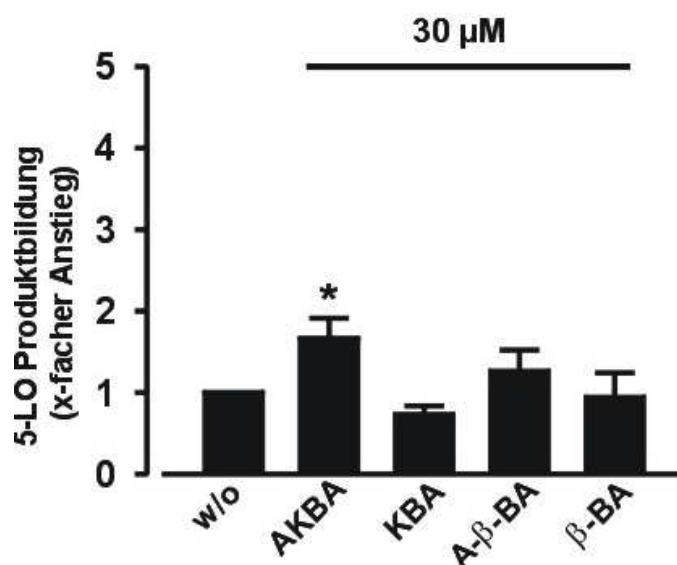


Abb. 33: 5-LO Aktivierung in intakten PMNL bei Anwesenheit von Ca^{2+}

PMNL wurden in PG Puffer aufgenommen und entweder mit 1 mM EDTA plus 30 μ M BAPTA/AM für 15 Min. vorinkubiert (Abb. 32) oder mit 1mM Ca^{2+} versetzt (Abb. 33). Anschließend wurde mit AA (20 μ M) oder AA simultan mit den entsprechenden BAs (je 30 μ M) stimuliert und für weitere 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die 5-LO Metabolite wurden wie unter „Methoden“ beschrieben bestimmt. (Mittelwerte \pm S.E.; n = 3-6; Student t Test: ** P < 0,01 bzw. * P < 0,05).

Erfolgte die Zugabe der BAs vor Stimulation mit AA, so zeigte sich bei einer Erhöhung der Vorinkubationszeit von AKBA (30 μ M) eine Abnahme der 5-LO Aktivität. Wie aus *Abb. 34* zu entnehmen ist, erhöhte sich die 5-LO Produktbildung bei einer Vorinkubationszeit von 1 Min. nur noch um etwa Faktor 3, nach 3 Min. nur um Faktor 2,5.

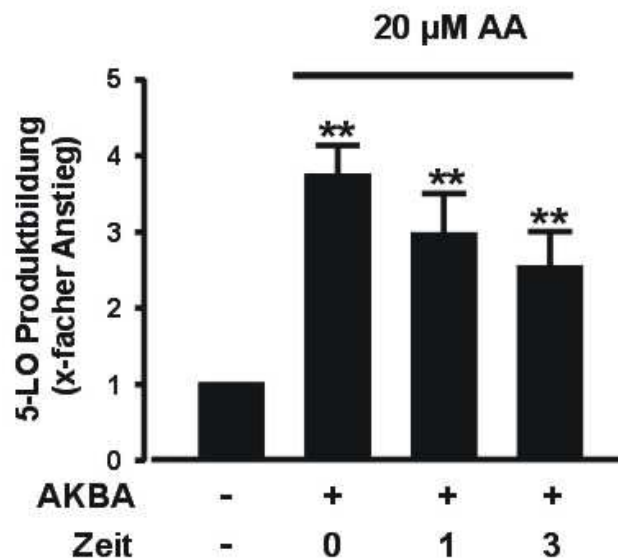


Abb. 34: Abhängigkeit der 5-LO Aktivierung von Vorinkubationszeit und AA-Konzentration

PMNL wurden in PG Puffer aufgenommen, mit 1 mM EDTA plus 30 μ M BAPTA/AM für 15 Min. vorbehandelt, anschließend mit AKBA (30 μ M) für 0, 1 oder 3 Min. inkubiert und durch Zugabe von 20 μ M AA stimuliert. Nach 10 Min. bei 37°C wurden die 5-LO Metabolite wie unter „Methoden“ beschrieben bestimmt. (Mittelwerte \pm S.E.; $n = 4-6$; Student t Test: ** $P < 0,01$).

Die Dosiswirkungskurve in *Abb. 35* lässt erkennen, dass die Stimulation der 5-LO in Abwesenheit von Ca^{2+} durch AKBA konzentrationsabhängig ist und über ein Maximum bei etwa 30 μ M verfügt. Bei Konzentrationen von ≥ 100 μ M verfügt AKBA über keinen stimulierenden Effekt auf die 5-LO. Hier scheint die direkte Interaktion der AKBA mit dem Enzym zum Tragen zu kommen, die eine Aktivierung des Enzyms in der Summe verhindert.

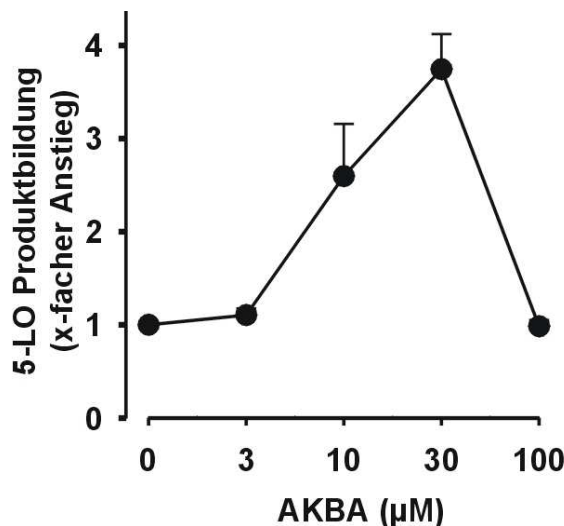


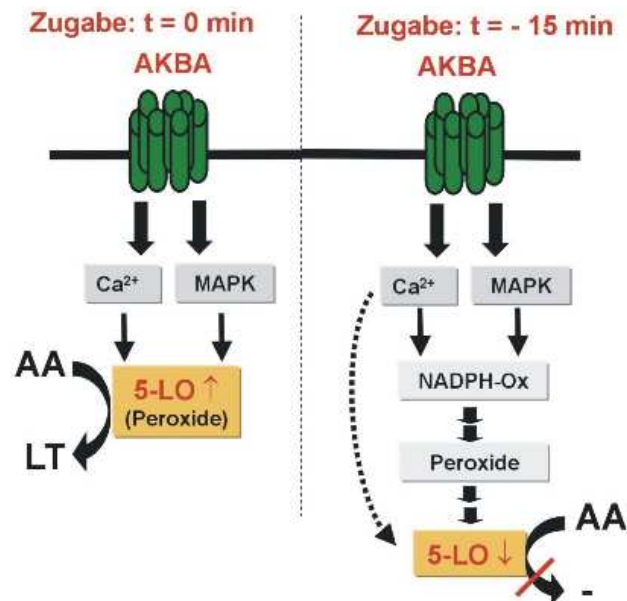
Abb. 35: Dosiswirkungskurve der AKBA-induzierten 5-LO Aktivierung

PMNL wurden in PG Puffer aufgenommen, mit 1 mM EDTA plus 30 µM BAPTA/AM für 15 Min. vorinkubiert, anschließend mit AA (20 µM) oder AA simultan mit steigenden AKBA-Konzentrationen stimuliert und für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die 5-LO Metabolite wurden wie unter „Methoden“ beschrieben bestimmt. (Mittelwerte ± S.E.; n = 4-5).

Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Kinasen bei der AKBA-induzierten 5-LO Aktivierung unter Verwendung spezifischer Inhibitoren (u.a. SB203580, U0126, Wortmannin, RO-31-8425) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse ließen jedoch wegen statistisch nicht signifikanter Daten keine eindeutige Aussage über eine Beteiligung relevanter 5-LO Kinasen zu (ohne Abb.).

5.5.5 Einfluss von Ca²⁺ auf die Wirksamkeit von AKBA

Normalerweise werden Zellen mit 5-LO Inhibitoren vorinkubiert (5 bis 30 Minuten) und anschließend mit einem Gemisch aus AA und Ionophor A23187 stimuliert. Betrachtet man diesen Versuchsansatz unter Berücksichtigung der gefundenen Wirkungen der BAs in PMNL, so kommt es schon während der Vorinkubationszeit zu einem Anstieg des Ca²⁺-Levels, zur Aktivierung der MAPK, zur Bildung von ROS und zur Freisetzung von AA. Es ist bekannt, dass eine langanhaltende Einwirkung von Oxidantien (z.B. ROS) und Ca²⁺ zu einer schnellen Inaktivierung von 5-LO führen kann^{262, 263}. Folglich könnte die 5-LO nach Vorinkubation mit AKBA und nachfolgender Zugabe von AA und Stimulus schon inaktiviert sein.



Führt man den oben beschriebenen Versuch in einem Ca^{2+} -freien Milieu durch, so müsste nicht nur der Ca^{2+} -Einstrom, sondern auch die Ca^{2+} -abhängige ROS-Bildung und AA-Freisetzung unterbunden werden und somit die 5-LO Aktivität durch AKBA weniger stark hemmbar sein.

Wurden die Zellen in Anwesenheit von Ca^{2+} mit AKBA (30 μM) vorinkubiert, so war die 5-LO Aktivität etwa 3% der Kontrolle, in Ca^{2+} -freien Zellen lag die Aktivität dagegen bei ~15% (Abb. 36). Die Hemmung der 5-LO durch AKBA ist somit im Ca^{2+} -freien Milieu deutlich schwächer ausgeprägt.

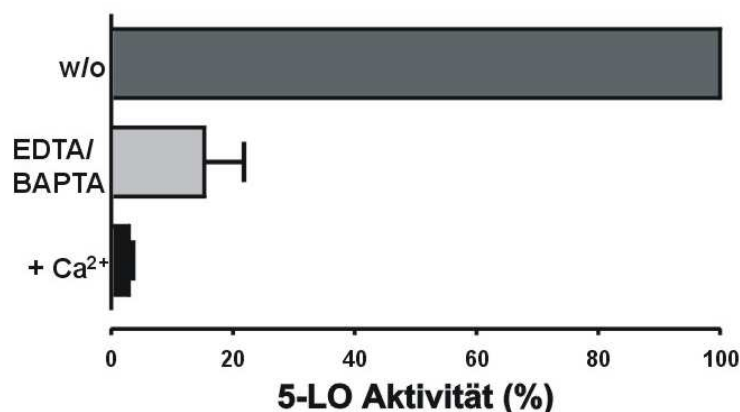


Abb. 36: Einfluss von Ca^{2+} auf die Wirksamkeit von AKBA (A)

PMNL wurden entweder in PGC Puffer oder in PG Puffer plus 1mM EDTA/30 μM BAPTA/AM aufgenommen. Nach 15 Min. wurde 30 μM AKBA zugesetzt und für 15 Min. bei 37°C vorinkubiert. Alle Inkubationsansätze wurden auf 1 mM Ca^{2+} eingestellt und mit 2,5 μM Ionophor und 10 μM AA stimuliert und für weitere 10 Min. inkubiert. Die 5-LO Metabolite wurden wie unter „Methoden“ beschrieben bestimmt. (Mittelwerte \pm S.E.; n = 3)

Wie von *Safayhi et al.*¹⁹ gezeigt wurde, handelt es sich bei der direkten Hemmung der 5-LO um einen nicht-kompetitiven, nicht-redoxaktiven Mechanismus, an einer allosterischen Bindungsstelle für pentazyklische Triterpene. Diese Hemmung erwies sich bei Untersuchungen des isolierten 5-LO Enzyms als reversibel.

Um die Reversibilität der 5-LO Hemmung durch AKBA in intakten Zellen zu überprüfen, wurde folgender Versuchsansatz gewählt: AKBA (30 μM) wurde nach einer Vorinkubationszeit von 30 Min. in einer Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Zellsuspension durch Waschen mit frischem PBS entfernt. Nach Zentrifugation und Resuspension in frischem PG Puffer wurde EDTA zugesetzt und die 5-LO Aktivität im Homogenat bestimmt.

Wie in *Abb. 37* zu erkennen ist, war die 5-LO Aktivität in Zellen, die in Anwesenheit von Ca^{2+} vorinkubiert wurden, sehr niedrig, die Restaktivität lag bei $6,03 \pm 0,4\%$ der Kontrolle (ohne AKBA Vorinkubation). Im Gegensatz dazu lag die Aktivität der 5-LO nach Inkubation mit AKBA in Abwesenheit von Ca^{2+} bei $60,7 \pm 9,6\%$ der Kontrolle.

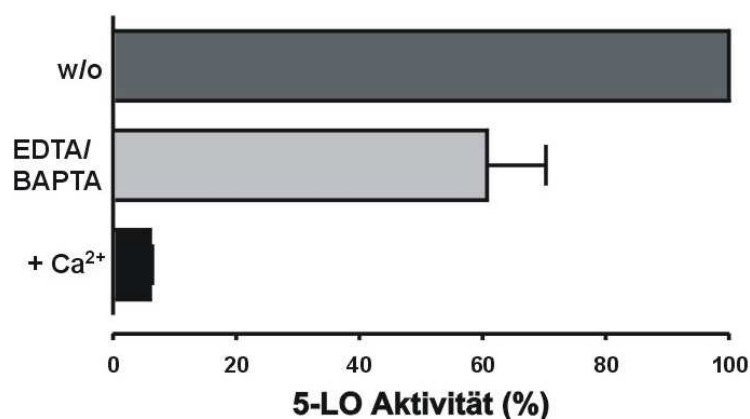


Abb. 37: Einfluss von Ca^{2+} auf die Wirksamkeit von AKBA (B)

PMNL wurden entweder in PGC Puffer oder in PG Puffer plus 1 mM EDTA/30 μM BAPTA/AM aufgenommen, für 15 Min. vorinkubiert und für weitere 30 Min. bei 37°C mit 30 μM AKBA inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden zentrifugiert (950g; 10 Min.), der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem PG Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von EDTA wurden die Zellen mittels Ultraschall homogenisiert und die 5-LO Aktivität im Homogenat wie unter „Methoden“ beschrieben bestimmt. (Mittelwerte \pm S.E.; $n = 3$)

5.6 Diskussion

Aufgrund der Tatsache, dass Signalmoleküle wie Ca^{2+} und Proteinkinasen eine Anzahl von Leukozytenfunktionen steuern (u.a. Zytokinfreisetzung, Chemotaxis, Adhäsion an das Gefäßendothel, Phagozytose von Partikeln, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Degranulierung, Freisetzung und Metabolisierung von Lipidmediatoren), wurden Effekte von BAs bezüglich ROS-Bildung, AA-Freisetzung und LT-Synthese in PMNL untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass 11-Keto-BAs in der Lage sind, die Bildung von ROS, die Freisetzung von AA und ihre anschließende Metabolisierung durch 5-LO auszulösen. Untersuchungen der beteiligten Signalmoleküle und vergleichbare Kinetiken, induziert durch chemotaktische Stimuli von Leukozyten (fMLP, PAF, LTB_4), bestätigen, dass 11-Keto-BAs ähnliche Signaltransduktionswege wie chemotaktische Liganden nutzen.

Reaktive Sauerstoffspezies spielen im Rahmen der zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle. Während der Phagozytose führen sie zusammen mit verschiedenen Verdauungsenzymen zur Abtötung von Mikroorganismen. Die NADPH-Oxidase von Leukozyten ist die Hauptquelle des $\cdot\text{O}_2^-$, das in weiterer Folge zu H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ umgesetzt wird¹⁰⁶. Für die $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung ist neben der Anwesenheit von Ca^{2+} die Phosphorylierung der $\text{p}47^{\text{phox}}$ -Untereinheit der NADPH-Oxidase eine wichtige Voraussetzung^{116, 117, 119}. Gemäß ihrer Fähigkeit, die Ca^{2+} -Freisetzung und MAPK in PMNL zu stimulieren, führten die 11-Keto-BAs zu einer schnellen Oxidation des Peroxid-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes DCF-DA, wohingegen die BAs ohne Keto-Funktion keine Effekte zeigten. Da der NADPH-Oxidase Inhibitor DPI diese Oxidation verhindern konnte, kann das NADPH-Oxidase System als Quelle der ROS-Bildung angenommen werden. Die pharmakologische Charakterisierung der zugrundeliegenden Signalwege der AKBA-induzierten ROS-Bildung lieferte Hinweise auf die Beteiligung der PI 3-K und der $\text{p}42/44^{\text{MAPK}}$, wohingegen die $\text{p}38$ MAPK sowie PKC Isoformen anscheinend nicht involviert sind. Gemäß der Tatsache, dass in Abwesenheit von Ca^{2+} die AKBA-induzierte ROS-Freisetzung nahezu vollständig unterdrückt wurde, kann für 11-Keto-BAs eine Stimulation der ROS-Bildung durch Ca^{2+} -Mobilisierung und Aktivierung der $\text{p}42/44^{\text{MAPK}}$ via PI 3-K angenommen werden.

Kontrollexperimente mit PMA, einem direkten Aktivator der PKC, stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{117, 118, 120}. So zeigte sich, dass PKC und in einem geringeren Ausmaß auch p42^{MAPK} für die NADPH-Oxidase abhängige ROS-Bildung durch PMA involviert sind, wohingegen eine Beteiligung der PI 3-K oder p38 MAPK nicht erkennbar ist.

Die pharmakologische Charakterisierung der AKBA-induzierten ROS-Bildung zeigt gewisse Parallelen zum Einfluss von fMLP auf das NADPH-Oxidase System auf. So konnte in Untersuchungen von *Dewas et al.*¹²⁰ und *Ding et al.*³⁵³ die fMLP-induzierte Phosphorylierung der p47^{phox}-Untereinheit in Neutrophilen durch Hemmung der p42^{MAPK} und PI 3-K unterdrückt werden, wobei die Inhibierung der p38 MAPK ohne Auswirkung blieb. Versuche, die fMLP-induzierte ROS-Bildung mit entsprechenden Inhibitoren zu hemmen, zeigten allerdings für p42/44^{MAPK}, PI 3-K und p38 MAPK eine Reduktion der ROS-Bildung in PMNL^{66, 354, 355}. Möglicherweise könnte hierfür eine Phosphorylierung der p67^{phox}-Untereinheit durch p38 MAPK verantwortlich sein¹¹⁹.

In PMNL wird die Freisetzung von AA aus Membranphospholipiden über die cPLA₂ reguliert. Die AA kann anschließend zu Entzündungsmediatoren verstoffwechselt werden. Die Regulation der cPLA₂ erfolgt durch Phosphorylierung über bestimmte MAPK und/oder durch Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Levels²⁶⁸. Es konnte gezeigt werden, dass 11-Keto-BAs, nicht jedoch β-BA und A-β-BA, in PMNL zu einer mit fMLP vergleichbaren AA-Freisetzung führen. Für die AKBA-induzierte AA-Freisetzung zeigte sich eine Abhängigkeit von p42/44^{MAPK} und Ca²⁺, die auch für andere Liganden (Zyosan, Ca²⁺-Ionophor) von GPCRs gefunden wurde²⁶⁸. Die benötigten Konzentrationen an AKBA und KBA lagen für die AA-Freisetzung höher als für die ROS-Bildung. Dies könnte daran liegen, dass die cPLA₂ für ihre Aktivierung einen möglichst langanhaltenden Ca²⁺-Einstrom benötigt²⁷². Betrachtet man die intrazellulären Ca²⁺-Level nach Stimulation mit 30 μM AKBA oder KBA (*Abb. 26*), so lässt sich erkennen, dass es nach Erreichen des Maximums zu einer Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt. Dieser Effekt war bei 100 μM AKBA oder KBA weniger stark ausgeprägt. Möglicherweise ist erst bei höheren Konzentrationen von 11-Keto-BAs ein ausreichend hoher und gleichbleibender Ca²⁺-Level für die cPLA₂-Aktivierung vorhanden.

Obwohl die BAs als direkte, nicht-kompetitive Inhibitoren der 5-LO beschrieben wurden^{18, 19}, konnten wir paradoxerweise eine Stimulation der 5-LO in intakten Zellen durch AKBA feststellen. Voraussetzung ist dabei, dass die Zugabe der BAs simultan mit einer ausreichenden Menge an exogener AA erfolgt. Die Aktivierung der 5-LO war bei etwa 30 μM maximal, bei höheren Konzentrationen scheint allerdings die direkte Interaktion der AKBA mit der 5-LO eine Aktivierung des Enzyms zu verhindern. Auch für *BS*-Extrakte und einige Inhaltsstoffe wurde eine Hochregulierung der 5-LO Aktivität in PMNL gefunden. So konnte nicht nur für niedrige Konzentrationen des Extraktes ein Anstieg der Ionophor-induzierten 5-LO Produktbildung beobachtet werden²³, es zeigte sich auch für die 3-oxo-Tirucallensäure, die in zellfreien Systemen als Inhibitor der 5-LO wirkt, eine Stimulation der 5-LO Aktivität in humanen Neutrophilen⁸.

In intakten Zellen kann die 5-LO sowohl durch Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels als auch durch Phosphorylierung durch p38 MAPK-regulierte MK2 und p42/44^{MAPK} aktiviert werden^{193, 325}. Interessanterweise war allerdings die AKBA-induzierte 5-LO Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} stärker ausgeprägt und wurde durch MAPK-Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst. Daher scheinen zusätzliche noch unbekannte 5-LO aktivierende Faktoren oder Signalwege durch AKBA induziert zu werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch die Stimulation von PMNL mit OAG zu einer beträchtlichen 5-LO Produktbildung führt, die jedoch unabhängig von Ca^{2+} , MAPK und PKC ist. Auch eine Induktion der 5-LO Translokation sowie die Freisetzung endogener AA konnte nicht gezeigt werden. Somit scheinen hier völlig neuartige Mechanismen der 5-LO Aktivierung zu Grunde zu liegen²⁸⁵.

Die Diskrepanz der Hemmwirkung von AKBA bezüglich 5-LO in intakten Zellen ($\text{IC}_{50} \sim 2\text{-}5 \mu\text{M}$) und Zellhomogenaten ($\text{IC}_{50} \sim 15\text{-}50 \mu\text{M}$), die von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde^{7, 124, 289}, lässt den Schluss zu, dass in intakten Zellen weitere Faktoren für die AKBA-vermittelte 5-LO Hemmung verantwortlich sind. Da eine anhaltende Einwirkung von Oxidantien und Ca^{2+} zu einer schnellen Inaktivierung der 5-LO führt^{262, 263}, ist es möglich, dass die potente 5-LO Hemmung durch AKBA in intakten Zellen auf die induzierte ROS-Bildung und Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen ist. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die Wirksamkeit von AKBA in intakten Zellen durch Ca^{2+} -

Komplexierung verringert wurde. Die Restaktivität der 5-LO in Ca^{2+} -freien Zellen lag etwa 5-fach höher als in Zellen mit Ca^{2+} . Auch Untersuchungen hinsichtlich Reversibilität der AKBA-induzierten 5-LO Hemmung bestätigen diese Hypothese. Trotz Auswaschen von AKBA nach Vorinkubation in Ca^{2+} -haltigem Milieu, wurde in korrespondierenden Homogenaten eine starke 5-LO Hemmung (~94%) festgestellt. Bei Vorinkubation der AKBA in Ca^{2+} -freiem Milieu, zeigte sich dagegen eine deutlich geringere 5-LO Hemmung (~39%). Eine Erklärung für die hohe 5-LO Hemmung nach Vorinkubation von AKBA in Anwesenheit von Ca^{2+} ist auch hier der AKBA-induzierte Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -abhängige ROS-Bildung. Beides kann schon vorzeitig zu einer irreversiblen Inaktivierung der 5-LO führen. Damit bestätigt sich die These, dass die hohe Wirksamkeit von AKBA in intakten Zellen nicht ausschließlich aus der direkten Interaktion von AKBA mit der 5-LO resultiert, sondern auch andere zelluläre Mechanismen (Ca^{2+} /ROS) eine Rolle spielen.

Zusammenfassend sind 11-Keto-BAs in hohen, pharmakologisch nichtrelevanten Konzentrationen als multifunktionelle Agonisten inflammatorischer Prozesse aufzufassen. Dies widerspricht zunächst der Tatsache, dass verschiedene Untersuchungen an Tieren sowie klinische Pilotstudien antiinflammatorische Effekte der BS-Extrakte und der BAs zeigen^{42, 356, 357}. Es ist denkbar, dass BAs in niedrigen Konzentrationen eine antagonistische Aktivität auf Signalwege ausüben, die durch einen Agonisten (LTB_4 , PAF etc.) induziert werden. In der Tat konnte von *Park et al.*³² gezeigt werden, dass durch 2-8 μM AKBA die PDGF-induzierte $\text{p42/44}^{\text{MAPK}}$ Aktivierung in Meningioma Zellen inhibiert wird. Erste Untersuchungen an Thrombozyten, die von O. Werz (Frankfurt) durchgeführt wurden, zeigten außerdem eine signifikante Hemmung der PAF-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung durch niedrige Konzentrationen an BAs (0,3 bis 1 μM). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Bay-U9773 in niedrigen Konzentrationen antagonistische Aktivität, in hohen Konzentrationen agonistische Aktivität am Cys-LTR-2 aufweist und zur Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt wird³⁵⁸. Weitere Studien hinsichtlich einer antagonistischen Aktivität der BAs in pharmakologisch relevanten Konzentrationen (< 1 μM) sind notwendig, um diese These zu bestätigen und in weiterer Folge den Rezeptor bzw. den genauen molekularen Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung der BAs zu identifizieren.

5.7 Zelltypabhängige Wirkungen der BAs

Die Untersuchung der Wirkungen von BAs sollte auf weitere Zelltypen ausgedehnt werden. So fokussierte sich unser Interesse neben leukozytären und monozytären Zelllinien (HL60 und MM6) auch auf Thrombozyten. Diese nehmen im Entzündungsgeschehen ebenfalls eine wichtige Rolle ein und verfügen u.a. über eine 12-Lipoxygenase.

5.7.1 BAs induzieren intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in Thrombozyten

Frisch isolierte menschliche Thrombozyten wurden auf Ca^{2+} -Freisetzung hin untersucht. Die Bestimmung erfolgte dabei analog zu PMNL. Als Positivkontrolle wurde Thrombin (5u) verwendet.

Wie in *Abb. 38* dargestellt ist, führte vor allem die Stimulation mit β -BA zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Levels. So erhöhte sich die intrazelluläre Konzentration von durchschnittlich 30 nM Ca^{2+} durch 30 μM β -BA auf 634 ± 198 nM und lieferte Werte, die mit Thrombin erreicht wurden (~ 550 nM). Auch A- β -BA und AKBA führten zu einer effizienten Ca^{2+} -Mobilisierung und erreichten Konzentrationen von 326 ± 196 nM und 274 ± 89 nM, wohingegen KBA keinen Einfluss zeigte.

In weiterführenden Untersuchungen durch Daniel Pöckel (AK Werz/Steinhilber) konnte gezeigt werden, dass der β -BA-induzierte Ca^{2+} -Einstrom zu ca. 70% auf dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über die Zellmembran beruht, etwa 30% sind demnach auf die Freisetzung aus internen Speichern zurückzuführen.

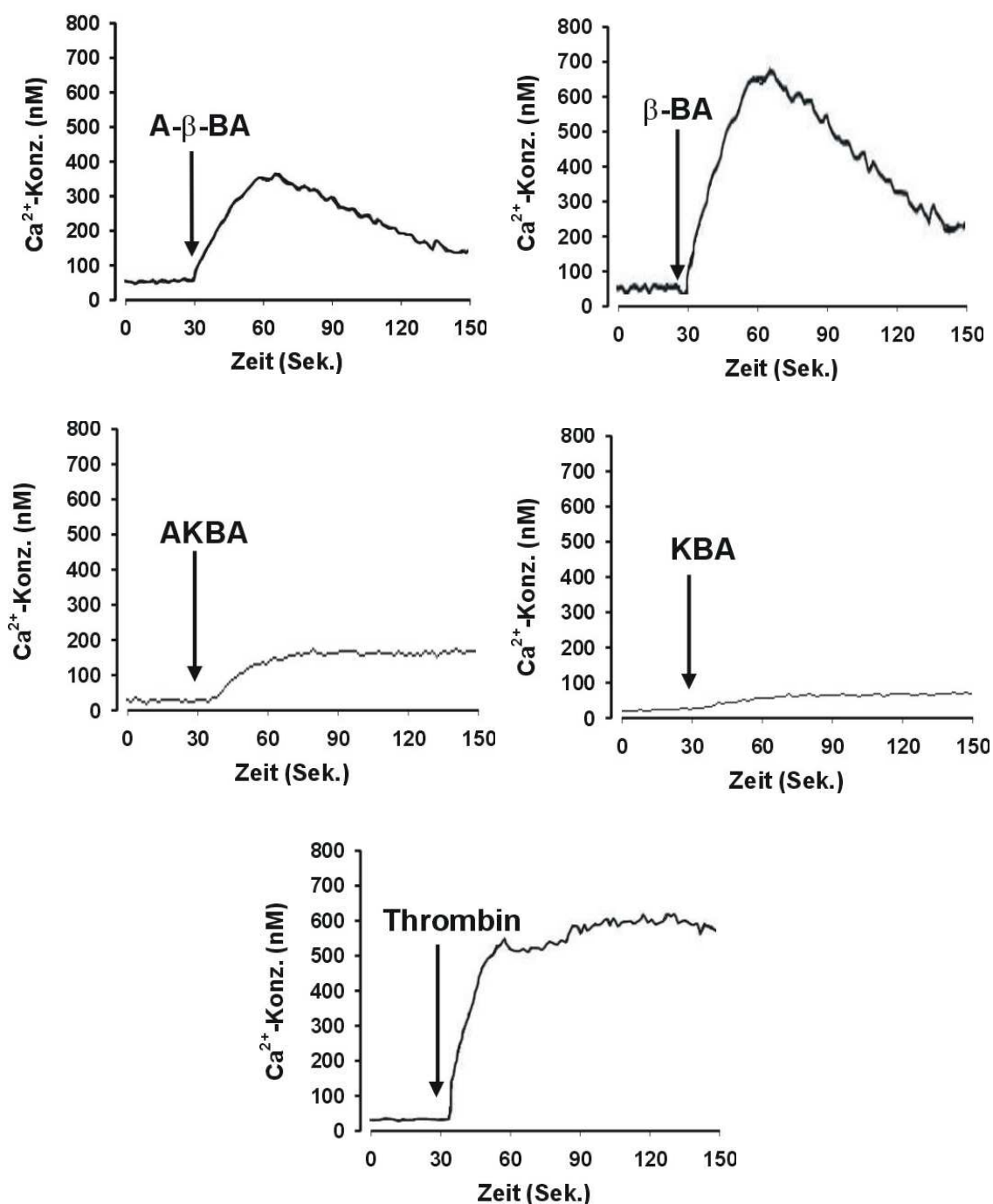


Abb. 38: Ca^{2+} -Mobilisierung durch BAs in Thrombozyten

Thrombozyten wurden in PG Puffer aufgenommen, mit Fura-2/AM vorinkubiert, 1mM Ca^{2+} zugesetzt und anschließend mit den entsprechenden Testsubstanzen stimuliert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Lumineszenzspektrometer. Die Bestimmung der Ca^{2+} -Konz. erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die abgebildeten Kurven sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (Mittelwerte in nM \pm S.E.; n=5)

5.7.2 BAs aktivieren p38 MAPK in Thrombozyten

Zur Bestimmung der Aktivierung von MAPK durch BAs, wurden Thrombozyten mit den entsprechenden BAs stimuliert und die Aktivierung der p38 MAPK und p42/44^{MAPK} mittels WB und phosphospezifischen Antikörpern bestimmt.

Wie aus *Abb. 39* ersichtlich ist, führten alle BAs zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der p38 MAPK. Interessanterweise zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen BAs. Im Gegensatz dazu wurde die p42/44^{MAPK} nur wenig durch die Stimulation mit BAs aktiviert.

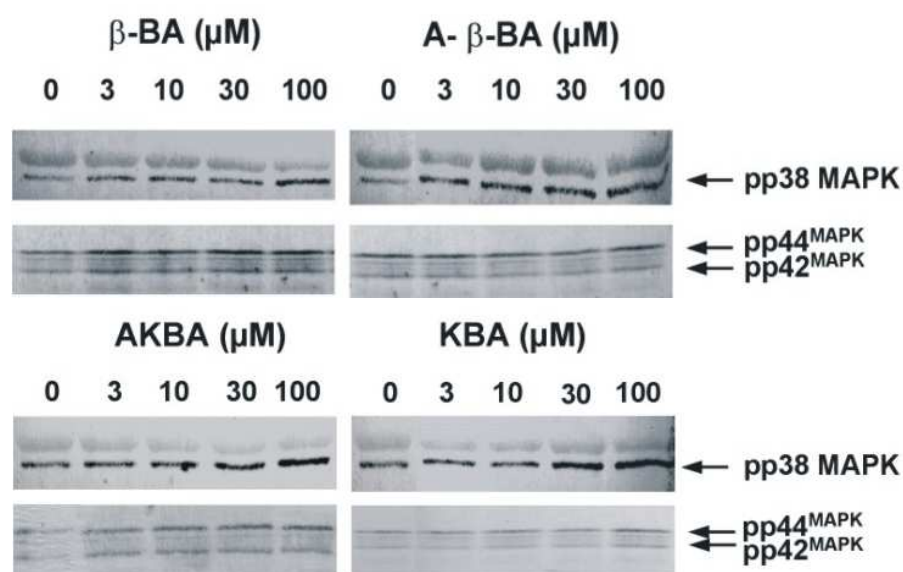


Abb. 39: Aktivierung von MAPK durch BAs in Thrombozyten

Thrombozyten wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den entsprechenden BAs stimuliert und die Reaktion nach 1,5 Min. abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildete WBs sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5.7.3 BAs induzieren AA Freisetzung und Metabolisierung zu 12-H(P)ETE

Auch in Thrombozyten ist die cPLA₂ durch Ca²⁺ und MAPK reguliert und stellt die PLA₂ dar, die überwiegend zur Agonist-induzierten AA-Freisetzung beiträgt^{359, 360}. Freie AA wird rasch durch „platelet-type“ 12-LO zu 12(S)-HPETE umgesetzt und durch Peroxidasen zu 12(S)-HETE reduziert.

Zur Bestimmung der 12-H(P)ETE Bildung wurden Thrombozyten in PGC Puffer mit den entsprechenden BAs oder Thrombin stimuliert und die gebildeten 12-LO Metabolite qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Balkendiagramme in *Abb. 40* zeigen die Wirksamkeit der verschiedenen BAs. Während AKBA und KBA nur eine moderate Bildung von 12-H(P)ETE bewirkten, stimulierten β -BA und A- β -BA die 12-H(P)ETE-Synthese effizient. So erhöhten bereits 3 μ M β -BA die Konzentration von 12-H(P)ETE um Faktor 2,6. Die maximale Syntheserate (29-fache Steigerung) wurde durch 100 μ M β -BA erzielt. Sie lag damit signifikant höher als die Thrombin-induzierte 12-H(P)ETE-Bildung (20-fache Steigerung).

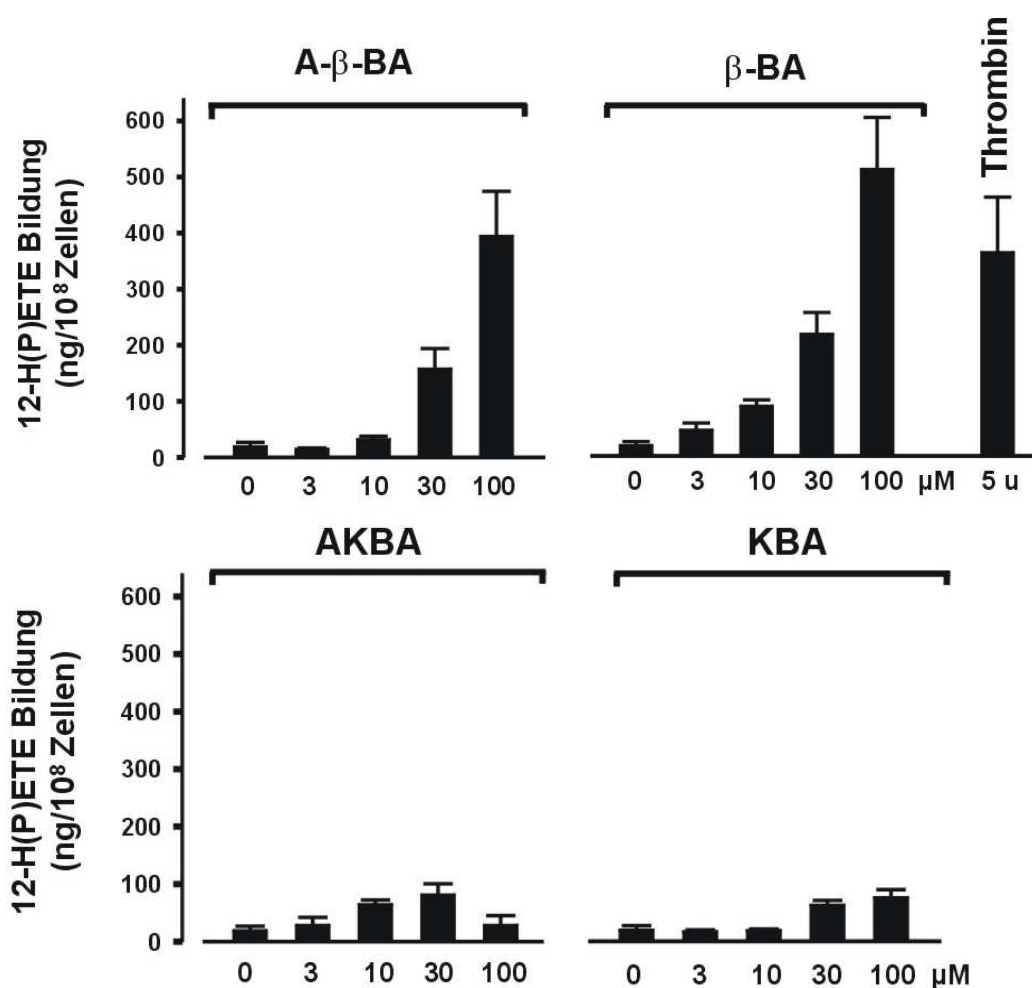


Abb. 40: Effekte von BAs auf die 12-H(P)ETE-Bildung in Thrombozyten

Thrombozyten wurden in PGC Puffer aufgenommen und für 10 Min. bei 37°C mit den entsprechenden BAs stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Thrombin (5u) verwendet. Die gebildeten 12-HETE und 12-H(P)ETE wurden anschließend qualitativ und quantitativ mittels HPLC bestimmt und in ng/10⁸ Zellen angegeben (Mittelwerte \pm S.E.; n = 4-6).

5.7.4 Einfluss von MAPK und Ca^{2+} auf die induzierte 12-H(P)ETE Bildung

Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Signalwege bei der durch BAs induzierten 12-H(P)ETE-Synthese wurde eine mögliche Ca^{2+} - und/oder MAPK-Abhängigkeit untersucht. Dazu wurden die Thrombozyten in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} bzw. nach Vorinkubation mit spezifischen MAPK-Inhibitoren mit β -BA, A- β -BA oder Thrombin inkubiert. Wie aus *Abb. 41* ersichtlich, wurde die Thrombin-induzierte 12-H(P)ETE-Bildung durch Entfernen von Ca^{2+} beinahe vollständig aufgehoben, aber auch die β -BA oder A- β -BA-induzierte 12-H(P)ETE-Synthese wurde um ca. 80% reduziert. Unter Verwendung von MAPK-Inhibitoren zeigte sich eine Reduktion der β -BA-induzierten 12-H(P)ETE-Bildung durch U0126 (3 μM) um etwa 39%, durch SB203580 (10 μM) um etwa 26%, und die Kombination beider Inhibitoren resultierte in einer ca. 50%igen Hemmung. Somit scheinen Ca^{2+} und MAPK wichtige Faktoren der β -BA-induzierten AA-Freisetzung und der nachfolgenden Metabolisierung zu 12-H(P)ETE zu sein.

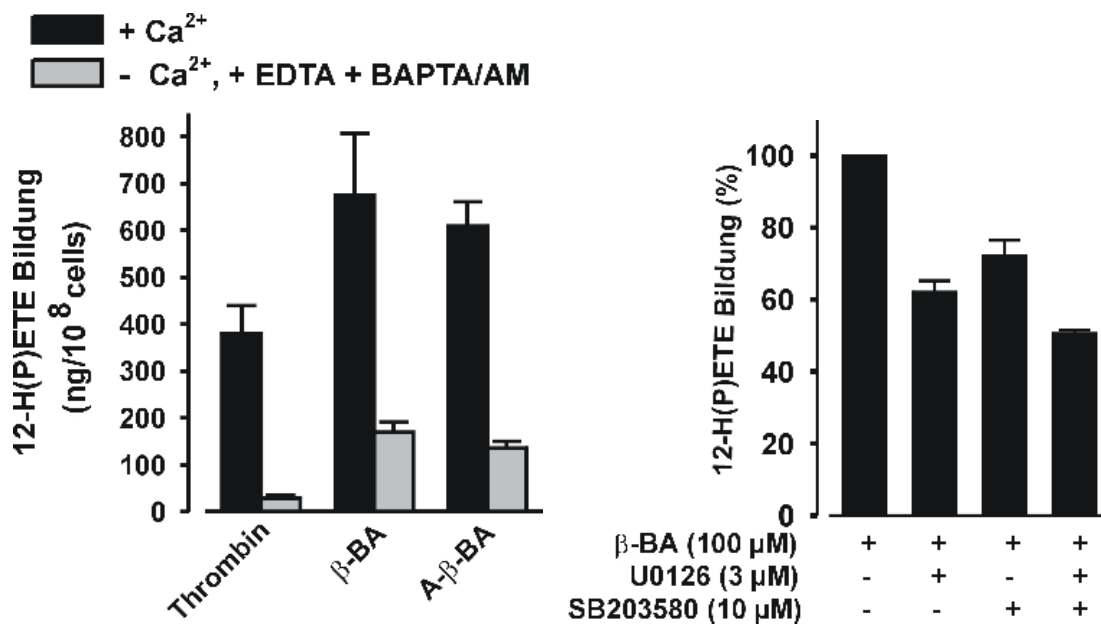


Abb. 41: Einfluss von Ca^{2+} und MAPK auf die 12-H(P)ETE Bildung

Thrombozyten wurden entweder in PGC Puffer mit oder ohne entsprechende Inhibitoren oder in PG Puffer plus 1 mM EDTA/30 μM BAPTA/AM aufgenommen und für 15 Min. vorinkubiert. Anschließend wurde mit 100 μM β -BA, A- β -BA oder 5u Thrombin für weitere 10 Min. bei 37°C stimuliert. Bestimmung der Metabolite wie unter „Methoden“ beschrieben. (Mittelwerte \pm S.E.; n = 4-6).

5.7.5 Wirkungen der BAs in differenzierten HL60 und Mono Mac 6 Zellen

Die Einflüsse der BAs auf die Freisetzung von Ca^{2+} , die Aktivierung von MAPK und die Bildung von ROS wurden ferner in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien untersucht.

In undifferenzierten und differenzierten monozytären Mono Mac 6 Zellen konnte für keine der vier BAs eine Ca^{2+} -Mobilisierung oder MAPK Aktivierung festgestellt werden. Auch im Hinblick auf die ROS-Bildung wurde keine signifikante Induktion durch BAs beobachtet. Kontrolleexperimente mit PAF, LTB_4 oder fMLP wiesen dagegen eine deutliche Ca^{2+} -Mobilisierung in differenzierten MM6 Zellen auf und zeigten damit, dass G-Protein-gekoppelte Ca^{2+} -Signaltransduktion in diesen Zellen möglich ist.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Untersuchungen der BAs an differenzierten granulozytären HL60 Zellen gewisse Ähnlichkeiten mit den in PMNL gefundenen Effekten. Wie anhand des WB in *Abb. 42* zu erkennen ist, führten sämtliche BAs bei einer Konzentration von 30 und 100 μM zu einer Aktivierung der p38 MAPK und p42/44^{MAPK}. Die stärkste Stimulation der Kinasen wurde jeweils durch β -BA oder AKBA erzielt, wohingegen KBA vor allem die p38 MAPK nur vergleichsweise schwach aktivierte. Wurden diese Versuche an undifferenzierten Zellen durchgeführt, so zeigte sich kein Einfluss der BAs auf die MAPK-Aktivität (ohne Abb.).

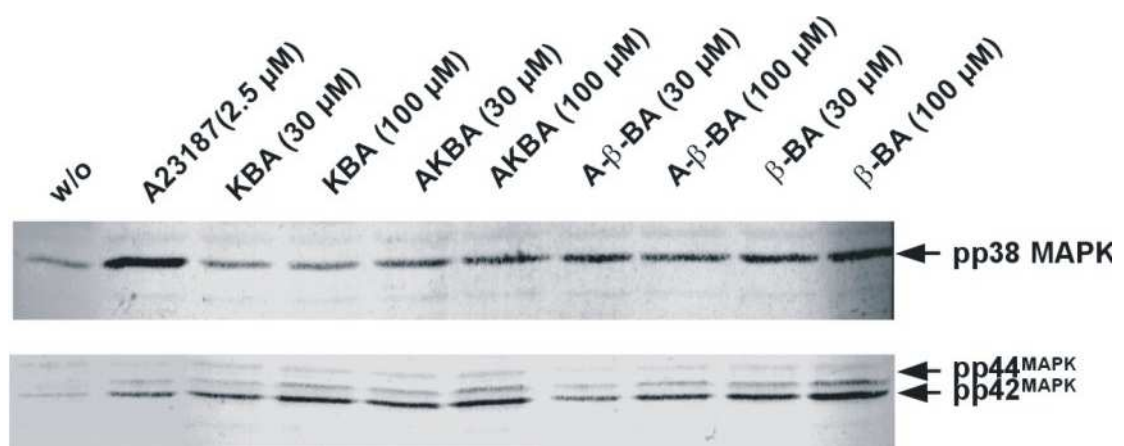


Abb. 42: MAPK Aktivierung durch BAs in differenzierten HL60

Differenzierte granulozytäre HL60 Zellen wurden in PGC Puffer aufgenommen, mit den entsprechenden BAs stimuliert und die Reaktion nach 1,5 Min. abgestoppt. Trennung und Detektion der MAPK erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Abgebildeter WB ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Hinsichtlich der Ca^{2+} -Mobilisierung zeigte sich nach Stimulation der differenzierten HL60 Zellen mit jeweils 30 μM BAs kein signifikantes Ca^{2+} -Signal. Erst bei einer Konzentration von 100 μM AKBA erhöhte sich der intrazelluläre Ca^{2+} -Level von 45 ± 7 nM auf 175 ± 25 nM. KBA, β -BA und A- β -BA blieben bei 100 μM ohne Einfluss (ohne Abb.). Interessanterweise ließ der Kurvenverlauf der AKBA-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung in differenzierten HL60 Zellen eine andere Kinetik als in PMNL erkennen. Der Ca^{2+} -Einstrom erfolgte hier sehr langsam, erreichte zwischen 30 und 45 Sekunden ein Maximum und sank bis zum Ende der Messzeit nur leicht ab. Kontrollexperimente mit Ionomycin (2,5 μM) lieferten Ca^{2+} -Konzentrationen von 405 ± 45 nM. Vergleichbare Untersuchungen an undifferenzierten Zellen zeigten keine Wirksamkeit der BAs, wohingegen mit Ionomycin (2,5 μM) Ca^{2+} -Level von etwa 129 nM erreicht wurden.

Zur Bestimmung der ROS-Bildung in HL60 Zellen wurden undifferenzierte und differenzierte Zellen mit den entsprechenden BAs (50 μM), fMLP (1 μM) oder PMA (1 μM) stimuliert. Wie aus *Abb. 43* zu entnehmen ist, konnte mit β -BA eine mit fMLP vergleichbare Hochregulierung der ROS-Bildung in differenzierten HL60 Zellen erzielt werden, AKBA erwies sich sogar als potenter, wohingegen A- β -BA und KBA nur vergleichsweise schwache Effekte zeigten. In undifferenzierten Zellen konnte keine Wirksamkeit der BAs festgestellt werden (ohne Abb.).

Die Charakterisierung der zugrundeliegenden Signalwege der durch AKBA induzierten ROS-Bildung erfolgte mit spezifischen Inhibitoren möglicher Signalmoleküle (*Abb. 44*). Sowohl die Hemmung der p38 MAPK (SB203580) als auch der PI 3-K (Wortmannin) erwiesen sich als unwirksam, dagegen konnte die AKBA-induzierte ROS-Freisetzung durch U0126 vollständig gehemmt werden. Diese Ergebnisse lassen daher auf eine Beteiligung der p42/44^{MAPK} schließen.

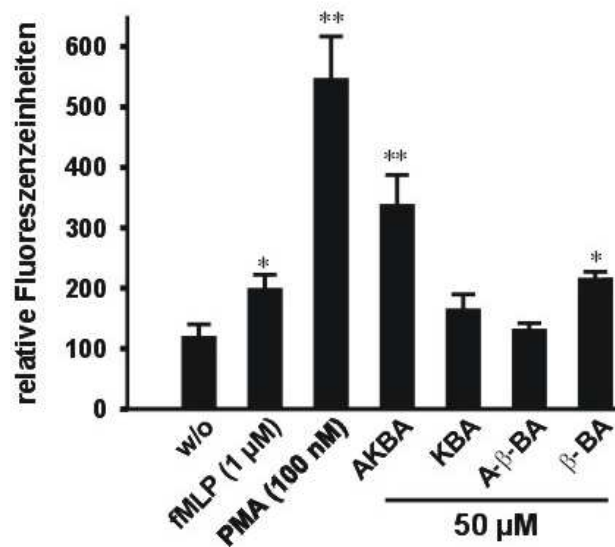


Abb. 43: Bildung von ROS durch verschiedene Stimuli in differenzierten HL60

Differenzierte granulozytäre HL60 Zellen wurden mit DCF-DA (10 µg/mL) für 2 Min. vorinkubiert und anschließend mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. Die Messung der gebildeten Peroxide erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der gemessenen 5 Min. wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Mittelwerte ± S.E.; n = 4; Student t Test: ** P < 0,01 bzw. * P < 0,05).

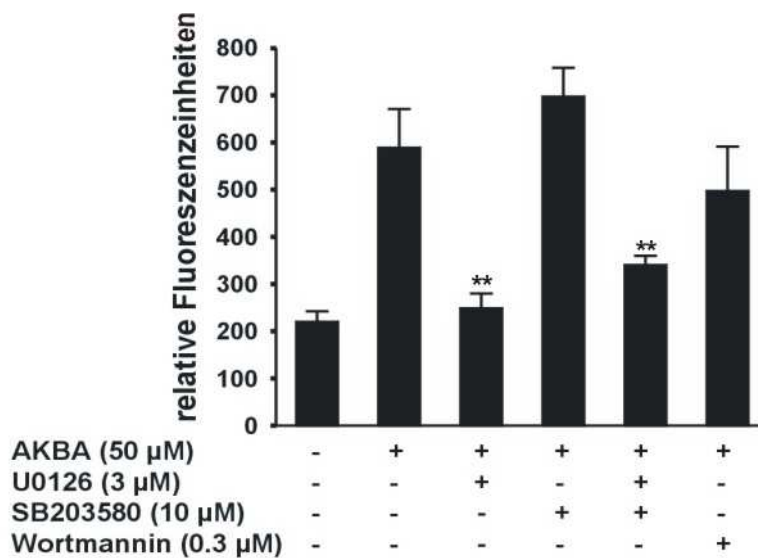


Abb. 44: Pharmakologische Charakterisierung der AKBA-induzierten ROS-Bildung

Differenzierte granulozytäre HL60 Zellen wurden zunächst mit den angegebenen Inhibitoren für 20 Min. bei RT vorinkubiert und anschließend mit DCF-DA (10 µg/mL) versetzt. Nach weiteren 2 Min. erfolgte die Zugabe von AKBA. Die Messung der gebildeten Peroxide erfolgte wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der gemessenen 5 Min. wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Mittelwerte ± S.E.; n = 4; Student t Test: ** P < 0,01).

5.8 Diskussion

Schon in früheren Untersuchungen von *Werz et al.*¹²⁴ konnten hinsichtlich der Hemmung der 5-LO in verschiedenen Zelllinien wie HL60 und MM6 für AKBA unterschiedliche Wirksamkeiten gezeigt werden. So lagen die IC₅₀-Werte in differenzierten intakten HL60 bzw. MM6 Zellen bei 15 µM und 12 µM, wohingegen die 5-LO in intakten humanen PMNL mit einem IC₅₀ von 5 µM gehemmt wurde.

Auch im Hinblick auf die Signaltransduktion und die induzierten funktionellen Effekte durch BAs konnten wir zelltypabhängige Unterschiede in der Wirksamkeit der BAs feststellen. In PMNL erwies sich die 11-Keto-Funktion der BAs als eine wichtige strukturelle Voraussetzung für eine potente Stimulation. Hier induzierten nur AKBA und KBA, nicht jedoch A-β-BA und β-BA, zelluläre Signaltransduktionsmechanismen und funktionelle Effekte. In Thrombozyten dagegen erwiesen sich vor allem die BAs ohne Keto-Funktion hinsichtlich Ca²⁺-Mobilisierung sowie der Freisetzung und Metabolisierung von AA durch die 12-LO als die effektiveren BAs. Generell war aber auch eine Stimulation durch Keto-BAs möglich.

In Konzentrationen von 30 µM und 100 µM A-β-BA oder β-BA konnten in Thrombozyten mit Thrombin vergleichbare Ca²⁺-Level erzielt werden. Der induzierte Ca²⁺-Einstrom korrelierte dabei mit der induzierten 12-H(P)ETE-Bildung aus endogener AA. Im Gegensatz dazu lagen sowohl die 12-H(P)ETE-Bildung als auch die Ca²⁺-Mobilisierung nach Stimulation mit AKBA wesentlich niedriger. Die Abnahme der 12-H(P)ETE-Produktion bei einer Konzentration von 100 µM AKBA lässt zudem einen inhibitorischen Effekt in Thrombozyten vermuten.

Obwohl Ca²⁺ für die 12-LO Aktivität nicht zwingend erforderlich ist³⁶¹, so ist dennoch ein ausreichender Ca²⁺-Level für die Bildung von 12-LO Produkten notwendig. Grund hierfür ist, dass auch in Thrombozyten die AA-Freisetzung über eine Ca²⁺-abhängige cPLA₂ vermittelt wird^{362, 363}. Diese Ca²⁺-Abhängigkeit konnten wir auch für die BA-induzierte 12-H(P)ETE-Bildung bestätigen, da die Stimulation durch β-BA und A-β-BA nach Entfernen von intra- und extrazellulärem Ca²⁺ stark vermindert wurde.

Neben Ca^{2+} sind auch MAPK an der AA-Freisetzung und somit an der Bildung von 12-LO Produkten in Thrombozyten (z.B. nach Stimulation mit Thrombin) beteiligt, indem sie die cPLA₂ durch Phosphorylierung aktivieren²⁷³. Auch für die BA-induzierte 12-H(P)ETE-Bildung konnte, durch Verwendung spezifischer MAPK-Inhibitoren, eine Beteiligung von p38 MAPK und p42/44^{MAPK} bestätigt werden.

Die unterschiedlichen Wirksamkeiten der BAs in PMNL und Thrombozyten könnten ein Hinweis auf die Existenz verschiedener putativer Rezeptoren (oder Effektoren) für BAs in diesen Zellen sein. Darüber hinaus scheinen BA-Rezeptoren während der Differenzierung der HL60 Zellen zu granulozytären Zellen induziert zu werden, da undifferenzierte HL60 Zellen auf keine der BAs ansprachen, wohingegen reife HL60 Zellen durch BAs stimuliert werden konnten. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch für den GPCR des fMLP gezeigt werden konnte, dass dieser erst während der Differenzierung in HL60 Zellen exprimiert wird³⁶⁴. Überraschenderweise konnten differenzierte HL60 Zellen, im Unterschied zu PMNL, auch durch β -BA und A- β -BA stimuliert werden. Daraus lässt sich schließen, dass in differenzierten HL60 Zellen putative Rezeptorsubtypen existieren, die auch BAs ohne Keto-Funktion akzeptieren.

Im Gegensatz zu HL60 Zellen konnten in differenzierten MM6 Zellen keine BA-induzierten Signalwege aufgezeigt werden, obwohl MM6 Zellen auf diverse Liganden für GPCRs (fMLP, LTB₄ oder PAF) ansprachen. Dies lässt vermuten, dass die Expression des Targets bzw. Rezeptors für AKBA auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist.

6 Zusammenfassung

Boswelliasäuren (BAs) sind pentazyklische Triterpene, die als biologisch aktive Komponenten des Weihrauchharzes aus *Boswellia serrata* identifiziert wurden. Weihrauchpräparate werden seit langer Zeit in der ayurvedischen Medizin zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen angewandt. Klinische Untersuchungen an Patienten mit rheumatoider Arthritis, chronischer und ulcerativer Colitis, Morbus Crohn, bronchialem Asthma und peritumoralen Hirnödemen zeigen ebenfalls vielversprechende Effekte. Die den klinischen Effekten zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen und die molekularen Zielstrukturen der BAs sind jedoch noch nicht geklärt. Bislang wurden die 5-Lipoxygenase (5-LO) und die Elastase als molekulare Targets der BAs identifiziert und in direkten Zusammenhang mit der antiinflammatorischen Wirkung gebracht. Weiterhin wurde gezeigt, dass BAs Inhibitoren von Topoisomerasen sind und signifikante Effekte bezüglich des Wachstums und der Differenzierung von Tumorzellen bewirken. Die antiinflammatorische Wirksamkeit von BAs wird vor allem mit der Hemmung der Leukotrienbiosynthese erklärt. Leukotriene (LTs) sind hochwirksame Mediatoren entzündlicher und allergischer Reaktionen, die von weißen Blutzellen freigesetzt werden und ihre Effekte über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) vermitteln. Schlüsselenzym der LT-Biosynthese ist die 5-LO, die Arachidonsäure (AA) zum LTA₄ umsetzt. Das instabile LTA₄ wird weiter zu chemotaktischem LTB₄ umgewandelt oder zu den LT C₄, D₄ und E₄ metabolisiert, die gefäßerweiternd und bronchokonstriktorisch wirken. Die 5-LO ist ein interessantes Arzneistoff-Target bei der Entwicklung antiinflammatorischer und antiasthmatischer Wirkstoffe, wobei jedoch derzeit ein großes Defizit an potenten 5-LO Hemmstoffen für die klinische Anwendung besteht. Gegenwärtig ist in Deutschland kein 5-LO Inhibitor als Arzneimittel zugelassen.

Unter den verschiedenen getesteten BAs ist 3-O-Acetyl-11-Keto-BA (AKBA) der potenteste 5-LO Inhibitor, wohingegen 11-Keto-BA (KBA) etwa 3-fach weniger aktiv ist und BAs ohne 11-Keto-Gruppe kaum wirksam sind. Eine direkte Interaktion von AKBA mit einer regulatorischen AA-Bindungsstelle der 5-LO in Abhängigkeit von Ca²⁺ wurde gezeigt. Die gefundenen IC₅₀-Werte von AKBA bezüglich 5-LO sind deutlich von den experimentellen Bedingungen und vom

Zelltyp abhängig. Darüber hinaus liegen die IC_{50} -Werte in zellfreien Systemen deutlich höher, was darauf hinweist, dass in intakten Zellen zelluläre Komponenten die Wirksamkeit von AKBA erhöhen. Die Plasmaspiegel von Probanden, nach oraler Einnahme von therapeutisch relevanten Dosen an *Boswellia serrata* Extrakten, liegen deutlich unter den IC_{50} -Werten, die in *in vitro* Experimenten gefunden wurden. Die Hemmung der 5-LO bzw. der LT-Biosynthese als antiinflammatorisches Wirkprinzip der BAs wird derzeit sehr kontrovers diskutiert und ist aufgrund der Diskrepanz zwischen den erreichbaren Blutspiegeln und den IC_{50} -Werten für die 5-LO Hemmung eher unwahrscheinlich.

Vor dem Hintergrund, die molekularen Grundlagen der pharmakologischen Eigenschaften von BAs aufzuklären und potenzielle Targets zu charakterisieren, lag der Schwerpunkt der Arbeit bei der Identifizierung und Charakterisierung zentraler Signaltransduktionsmechanismen in menschlichen Blutzellen. Es wurden funktionelle Zellantworten untersucht und in einen kausalen Zusammenhang mit der Signaltransduktion gebracht. Die Untersuchungen wurden an polymorphkernigen Leukozyten (PMNL), Thrombozyten, Mono Mac 6 und HL60 Zellen vorgenommen.

Die 5-LO wird durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration oder/und durch Phosphorylierung (durch MAPK) aktiviert, wobei Interaktion mit dem 5-LO aktivierenden Protein (FLAP), Hydroperoxide und die Translokation zur Kernmembran die 5-LO Aktivierung fördern. Die Diskrepanz der IC_{50} -Werte von AKBA für die Hemmung der 5-LO in intakten Zellen (ca. 5 μ M) und in zellfreien Systemen (ca. 50 μ M) lässt den Schluss zu, dass die potente Hemmung der zellulären 5-LO Aktivität durch Blockade relevanter Aktivierungsmechanismen begründet sein könnte. Denkbar ist, dass AKBA in niedrigen Konzentrationen mit zellulären Prozessen interferiert und dadurch zu einer potenten 5-LO Hemmung führt, während das Enzym bei diesen Konzentrationen nicht direkt gehemmt wird. Es wurde daher zunächst der Einfluss von BAs auf zelluläre 5-LO Aktivierungsmechanismen (Ca^{2+} , MAPK) untersucht. Überraschenderweise konnte dabei festgestellt werden, dass BAs (10 – 30 μ M) mit einer 11-Keto-Gruppe (KBA und AKBA) potente Aktivatoren von PMNL aus Humanblut sind, während BAs ohne 11-Keto-Gruppe (β -BA und A- β -BA) kaum aktiv sind. Im Gegensatz dazu erwiesen sich vor allem AKBA und β -BA als Stimulatoren von differenzierten

granulozytären HL-60 Zellen, wohingegen undifferenzierte HL60 Zellen auf keine der BAs ansprechen. Differenzierte HL60 Zellen sind demnach BA-responsiv, nicht jedoch undifferenzierte HL60 Zellen. Im Unterschied zu HL60 Zellen konnten sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierte monozytäre MM6 Zellen keine BA-induzierten Signalwege aufgezeigt werden. Vermutlich ist die Expression des BA-Rezeptors vom Zelltyp und/oder Differenzierungsstatus abhängig.

Vergleichbar mit chemotaktischen Stimuli (fMLP, PAF) erhöhen AKBA und KBA die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und aktivieren p38 MAPK und p42/44^{MAPK}. Untersuchungen der proximalen Signaltransduktionswege ergaben, dass die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K), nicht jedoch die Proteinkinase (PK) C, in die AKBA-induzierte MAPK Aktivierung involviert ist. Experimente mit Pertussistoxin weisen auf die Beteiligung eines $\text{G}\alpha_i$ - oder $\text{G}\alpha_0$ -Proteins an der AKBA-induzierten MAPK Aktivierung sowie an der Mobilisierung von Ca^{2+} hin. Damit ist es denkbar, dass BAs Liganden von GPCRs sind oder direkt mit G-Proteinen bzw. indirekt über „Regulatoren des G-Protein Signalings“ (RGS) interagieren. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft mit Lipidmediatoren wie PAF, LTB_4 , LTs, 5- oder 12-HETE, könnten BAs an GPCRs dieser Mediatoren binden und so ihre Effekte vermitteln. In Analogie zu chemotaktischen Liganden von GPCR (z.B. fMLP, PAF, 5-HETE, LTB_4) kommt es auch durch Zellstimulation mit BAs zu funktionellen Zellantworten in Leukozyten. Es konnte gezeigt werden, dass 11-Keto-BAs in der Lage sind, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Freisetzung von AA und ihre anschließende Metabolisierung durch 5-LO in PMNL zu induzieren. Dies ist einleuchtend, da diese Prozesse u.a. durch Ca^{2+} Mobilisierung und MAPK Aktivierung vermittelt werden können. Die pharmakologische Charakterisierung der zugrundeliegenden Signalwege der AKBA-induzierten ROS-Bildung liefert Hinweise auf die Beteiligung der PI 3-K und der p42/44^{MAPK}, wohingegen die p38 MAPK sowie PKC Isoformen scheinbar nicht involviert sind. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist die AKBA-induzierte ROS-Freisetzung fast vollständig unterdrückt. Daher kann für 11-Keto-BAs in PMNL eine Stimulation der ROS-Bildung durch Ca^{2+} -Mobilisierung und Aktivierung der p42/44^{MAPK} über PI 3-K angenommen werden. Auch für die AKBA-induzierte AA-Freisetzung zeigt sich eine Abhängigkeit von p42/44^{MAPK} und Ca^{2+} . Zudem konnten wir nachweisen, dass die kombinierte Gabe von 30 μM AKBA und AA paradoxerweise zu einer 4-

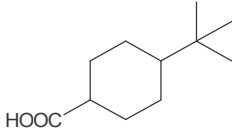
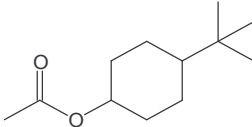
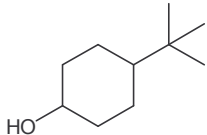
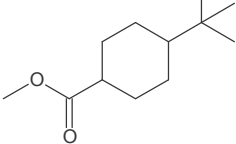
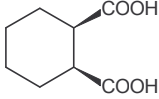
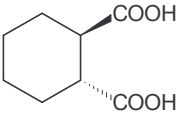
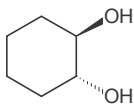
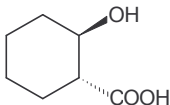
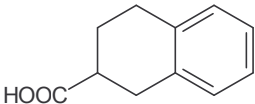
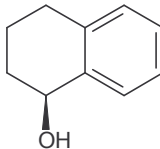
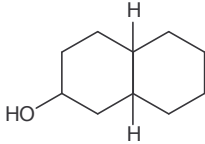
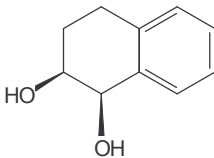
fachen Steigerung der 5-LO Produktbildung in PMNL führt, die in Abwesenheit von Ca^{2+} stärker ausgeprägt ist und durch MAPK-Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst wird. Daher scheinen zusätzliche noch unbekannte 5-LO aktivierende Faktoren oder Signalwege durch AKBA induziert zu werden.

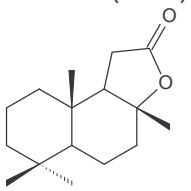
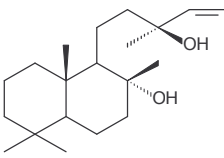
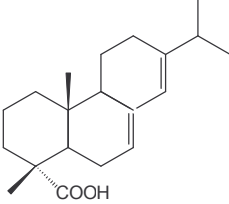
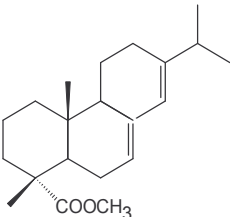
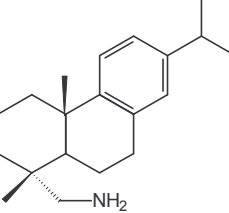
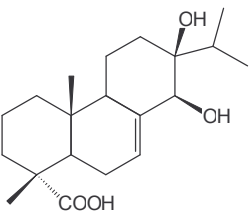
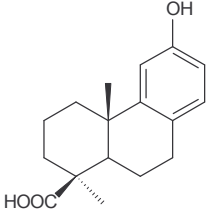
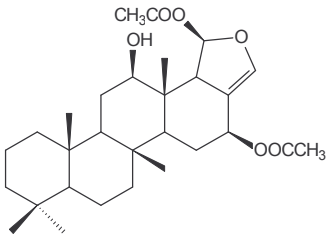
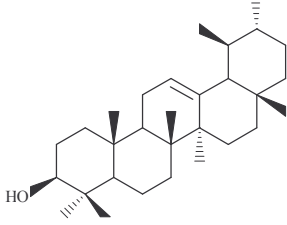
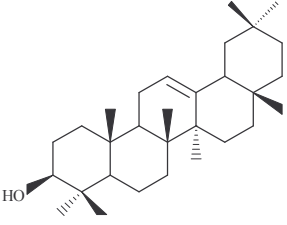
Anhand der funktionellen Zellantworten nach Stimulation mit 11-Keto BAs ist es anzunehmen, dass AKBA bei der Testung als 5-LO Inhibitor während der Vorinkubation, die üblicherweise ca. 10-30 min dauert, zu massiver Ca^{2+} Mobilisierung und Bildung von ROS führt. Dies dürfte zu einer irreversiblen Inaktivierung der (Ca^{2+} - bzw. oxidationsempfindlichen) 5-LO führen, was die potente Hemmung der 5-LO in intakten Zellen begründen würde.

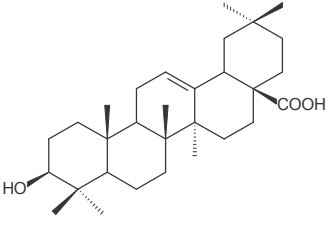
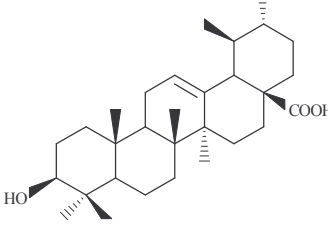
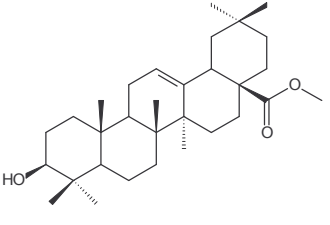
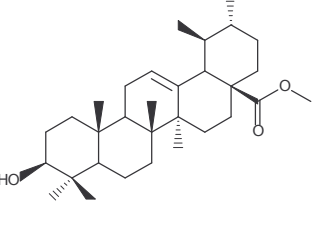
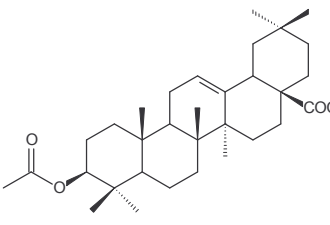
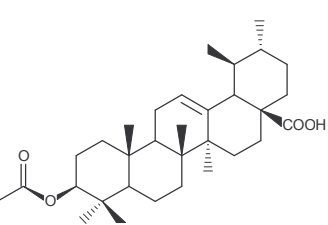
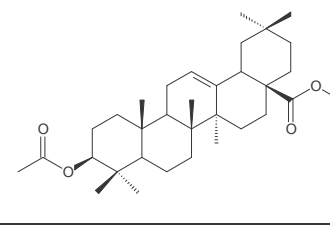
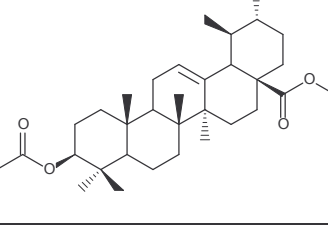
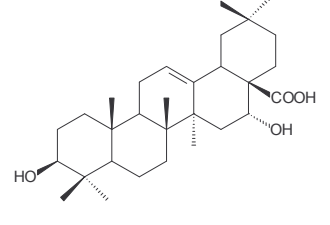
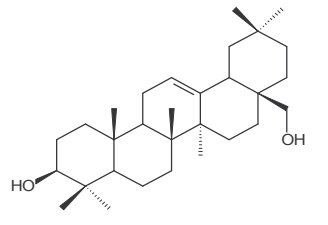
Im Gegensatz zu AKBA und KBA sind BAs ohne 11-Keto-Gruppe (β -BA und A- β -BA) potente Agonisten ($\text{EC}_{50} = 3 - 10 \mu\text{M}$) für Thrombozyten und stimulieren, in ähnlichem Ausmaß wie Thrombin, die Ca^{2+} Mobilisierung und die Aktivierung von MAPK. Auch funktionelle Zellantworten wie die Bereitstellung von AA sowie deren Umwandlung zu 12(S)-Hydro(pero)xyeikosatetraensäure (12-H(P)ETE) werden durch BAs ohne Keto-Gruppe induziert und sind zumindest teilweise von der p38 MAPK und $\text{p42/44}^{\text{MAPK}}$ abhängig. 12(S)-H(P)ETE wirkt chemotaktisch für Leukozyten, aktiviert inflammatorische Zellen, stimuliert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und fördert die Angiogenese und das Wachstum verschiedener Tumore.

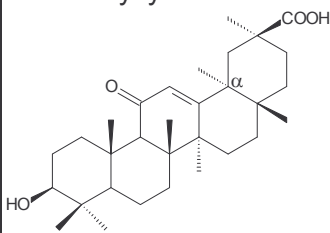
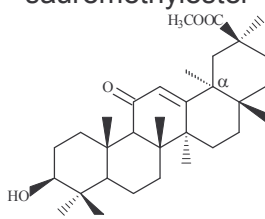
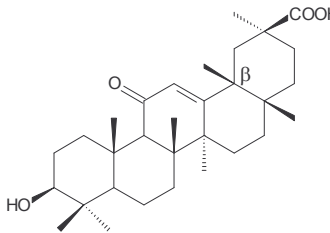
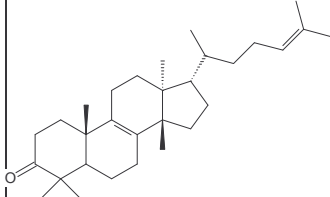
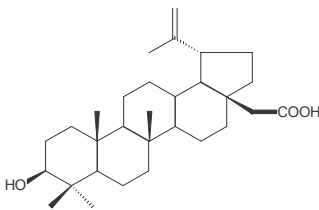
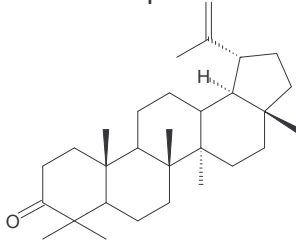
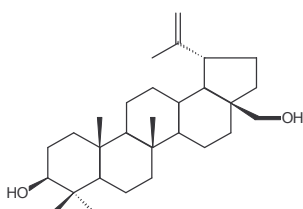
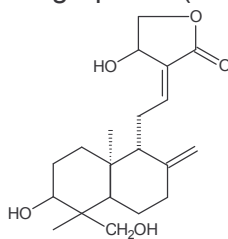
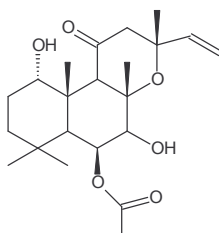
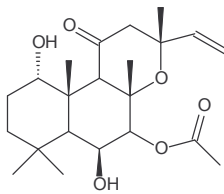
Zusammenfassend sind also BAs in hohen, pharmakologisch nicht-relevanten Konzentrationen als multifunktionelle Agonisten inflammatorischer Prozesse aufzufassen. Es ist jedoch denkbar, dass sie in niedrigen Konzentrationen eine antagonistische Wirkung an einem bestimmten oder auch an unterschiedlichen Rezeptoren ausüben. Hier ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Klärung der antiinflammatorischen Wirksamkeit der BAs zu sehen, da eine antagonistische Wirkung, in pharmakologisch relevanten Konzentrationen ($<1 \mu\text{M}$), gegenüber chemotaktischen Faktoren (wie z.B. PAF, LTB_4) eine plausible Erklärung für die entzündungshemmenden BA-Wirkungen sein könnte. Dementsprechend ist die Identifizierung und Charakterisierung von BA-Rezeptoren bzw. der involvierten G-Proteine oder RGS sowie die antagonistische Wirkungen der BAs gegenüber proinflammatorischen Stimuli in weiterführenden Studien von außerordentlicher Bedeutung.

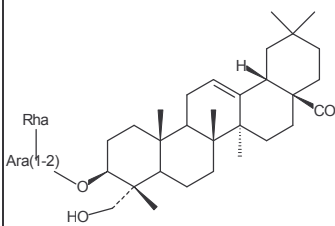
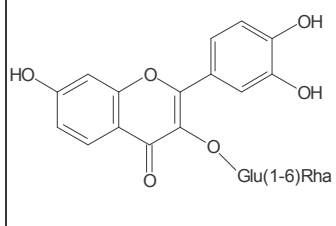
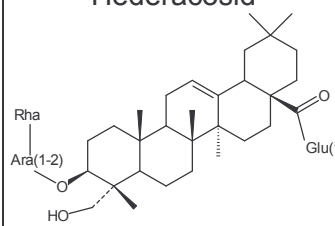
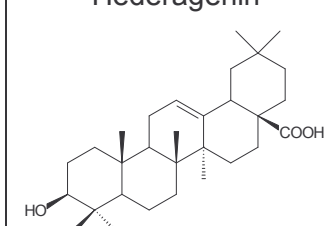
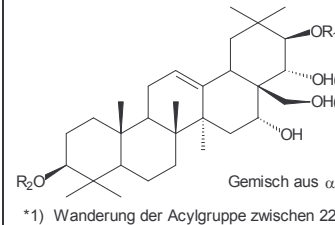
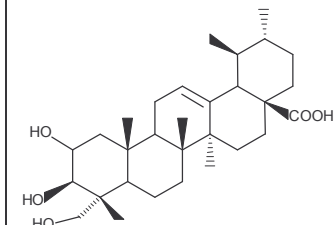
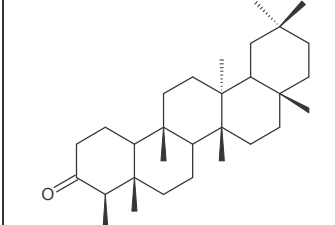
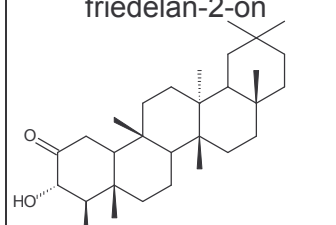
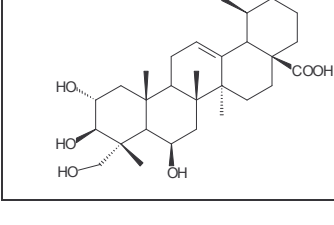
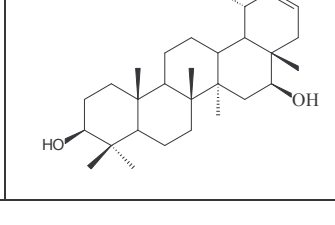
7 Anhang

Substanz	Effekte	Substanz	Effekte
4-tert.-Butylcyclohexancarbonsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	(4-tert.-Butylcyclohexyl)acetat 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
4-tert.-Butylcyclohexanol 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	4-tert.-Butylcyclohexancarbonsäuremethylester 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	trans-1,2-Cyclohexandicarbonsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
trans-1,2-Cyclohexandiol 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	trans-2-Hydroxycyclohexancarbonsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthoesäure (98%) 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	(S)-1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthol (99%) 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Decahydro-2-naphthol 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	(1R,2S)-cis-1,2,3,4-Tetrahydro-1,2-naphthalindiol 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten

Substanz	Effekte	Substanz	Effekte
Sclareolid (97%) 	IC_{50} (intakt) = $\sim 30\mu M$ keine Hemmung in Homogenaten	Sclareol 	$\sim 50\%$ 5-LO Aktivität in intakten Zellen mit $50\mu M$, keine Hemmung in Homogenaten
Abietinsäure 	IC_{50} (intakt) = $\sim 13\mu M$ IC_{50} (homo) = $\sim 46\mu M$	Abietinsäuremethylester 	IC_{50} (intakt) = $\sim 22\mu M$ IC_{50} (homo) = $\sim 43\mu M$
Dehydroabietylamin 	Hemmt intakte Zellen und Homogenate, (aber keine Reinsubstanz)	7,8-Dihydroxy- abietinsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Resin 731 D (~90% tricyclische Diterpene)	hemmt intakte Zellen und Homogenate, (aber Mischung)	Harzöl (Gemisch aus Mono- und Diterpenen sowie cyclischen Kohlen- wasserstoffen)	hemmt intakte Zellen und Homogenate, (aber Mischung)
Podocarpinsäure (98%) 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	Heteronemin 	IC_{50} (intakt) = $\sim 1,5\mu M$ IC_{50} (homo) = $\sim 4,5\mu M$
α -Amyrin 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	β -Amyrin 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten

Substanz	Effekte	Substanz	Effekte
Oleanolsäure (97%) 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	Ursolsäure (>90%) 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Oleanolsäure- methylester 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	Ursolsäure- methylester 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Acetyloleanolsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	Acetylursolsäure 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Acetyloleanolsäure- methylester 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	Acetylursolsäure- methylester 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
Echinocystsäure 	IC_{50} (intakt) = ~14 μ M IC_{50} (homo) = ~56 μ M	Erythrodiol 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten

Substanz	Effekte	Substanz	Effekte
<p>18α-Glycyrrhetinsäure</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	<p>18α-Glycyrrhetin- säuremethylester</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
<p>18β-Glycyrrhetinsäure</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	<p>Pinacolsäure A (β-Elemonicsäure)</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
<p>Betulinsäure</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	<p>Lupeol</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
<p>Betulin</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	<p>Andrographolid (98%)</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten
<p>Forskholin</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten	<p>Coleonol B</p> 	keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten

Substanz	Effekte	Substanz	Effekte
<p>α-Hederin</p> 	<p>IC₅₀ (intakt) = ~ 8,5µM</p> <p>keine Hemmung in Homogenaten</p>	<p>Rutin</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>
<p>Hederacosid</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>	<p>Hederagenin</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>
<p>Aescinsäure</p>  <p>Gemisch aus α/β-Aescin</p> <p>*1) Wanderung der Acylgruppe zwischen 22α-OH und 28-OH R1 Tiglinsäure-, Angelicasäure-, Isobuttersäure-, α-Methylbuttersäure-Reste R2 Glucuronsäure + 2mal Glucose</p>	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>	<p>Asiatsäure</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>
<p>Friedelin</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>	<p>3-α-Hydroxy- friedelan-2-on</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>
<p>Madecassicsäure</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>	<p>Faradiol</p> 	<p>keine Hemmung in intakten Zellen und Homogenaten</p>

8 Literaturverzeichnis

- ¹ Hagers Handbuch (1998), Folgeband 2 (A-K), 5. Auflage, 245-52
- ² Kreck C. (1998), Indischer Weihrauch und seine Zubereitungen einschließlich H15 als traditionelle und moderne Therapeutika, Tägliche Praxis, Marseille-Verlag, 39, 857-77
- ³ ABDATA-Computerdatei des Apothekengroßhandels
- ⁴ Martinetz D., Lohs K., Jansen J. (1989), Weihrauch und Myrrhe, Kulturgeschichte und wirtschaftliche Bedeutung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- ⁵ Sellar W., Watt M. (1997), Weihrauch und Myrrhe. Anwendung in Geschichte und Gegenwart, Droemersch Verlag, München
- ⁶ Pharmacopoea Germanica, Berlin 1872, Olibanum: S. 262
- ⁷ Schweizer S., Safayhi H. et al. (2000), Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues, J. Nat. Prod., 63, 1058-61
- ⁸ Boden S. et al. (2001), Stimulation of leukotriene synthesis in intact polymorphonuclear cells by the 5-lipoxygenase inhibitor 3-oxo-tirucallic acid, Mol. Pharmacol., 60, 267-73
- ⁹ Ennet D. et al. (2000), Pharmazeutische Bewertung der Harzdroge und ihrer Zubereitungen, DAZ Nr. 16, 20.04.2000
- ¹⁰ H15 Ayurmedica, Produktinformation, ebi-pharm AG, Kirchhildach, 1998
- ¹¹ EMEA, Committee for Orphan Medicinal Products, Public summary of positive opinion for orphan designation of *Boswellia serrata* resin extract for the treatment of peritumoral oedema derived from brain tumors. EMEA/COMP/2247/02, London, 11. Dezember 2002
- ¹² Kriegelstein C., Safayhi H. et al. (2001), AKBA, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis, Int. J. Colorectal. Dis., 16, 88-95
- ¹³ Singh G.B., Atal C.K. et al. (1986), Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata* – a new non-steroidal anti-inflammatory agent, Agents and Actions, 18, 3-4
- ¹⁴ Sharma M.L., Singh G.B. et al. (1989), Anti-arthritis activity of boswellic acids in bovine serum albumin- induced arthritis, Int. J. Immunopharmacol., 11, 647-52
- ¹⁵ Singh G.B. et al. (1996), Anti-inflammatory actions of boswellic acids, Phytomedicine, 3, 81-5
- ¹⁶ Kar A., Menon M.K. (1969), Analgesic effect of the gum resin of *Boswellia serrata* ROXB., Life Sci. 8, 1023-8
- ¹⁷ Menon M.K., Kar A. (1971), Analgesic and psychopharmacological effects of the gum resin of *Boswellia serrata*, Planta Med., 19, 333-41
- ¹⁸ Safayhi H., Ammon H.P.T. et al. (1992), Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase, J. Pharmac. Exp. Ther., 261, 1143-6
- ¹⁹ Safayhi H., Ammon H.P.T. et al. (1995), Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid
- ²⁰ Sailer E.R., Safayhi H. (1996), AKBA: structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity, Br. J. Pharmacol., 117, 615-8
- ²¹ Sailer E.R., Safayhi H. (1996), Preparation of novel analogues of the nonredox-type noncompetitive leukotriene biosynthesis inhibitor AKBA, Arch. Pharm., 329, 54-56

- ²² Sailer E.R., Safayhi H. et al. (1998), Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling, *Eur. J. Biochem.*, 256, 364-68
- ²³ Safayhi H., Ammon H.P.T. et al. (2000), Concentration – dependent potentiating and inhibitory effects of boswellia extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL, *Planta Medica*, 66, 110-13
- ²⁴ Safayhi H., Ammon H.P.T. et al. (1997), Inhibition by boswellic acid of human leukocyte elastase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281, 460-63
- ²⁵ Reddy G.K. et al. (1997), Effect of a new non-steroidal anti-inflammatory agent on lysosomal stability in adjuvant induced arthritis, *Ital. J. Biochem.*, 36, 205-17
- ²⁶ Reddy G.K. et al. (1997), Urinary excretion of connective tissue metabolites under the influence of a new non-steroidal anti-inflammatory agent in adjuvant induced arthritis, *Agents-Actions*, 22, 99-105
- ²⁷ Reddy G.K. et al. (1989), Studies on the metabolism of glycosaminoglycans under influence of new herbal anti-inflammatory agents, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3527-34
- ²⁸ Sharma M.L., Atal C.K. (1988), Effect of galai guggal ex-Boswellia serrata on cellular and humoral immune responses and leucocyte migration, *Agents and Actions*, 24, 1-2
- ²⁹ Safayhi H., Ammon H.P.T. et al. (1991), Protection by boswellic acids against galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice, *Biochem. Pharmacol.*, 41, 1536-37
- ³⁰ Shao Y., Huang M.T. et al. (1998), Inhibitory activity of boswellic acid from *Boswellia serrata* against human leukemia HL-60 cells in culture, *Planta Medica*, 64, 328-331
- ³¹ Hoernlein R., Ammon H.P.T. et al. (1999), AKBA induces apoptosis in HL60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288, 613-19
- ³² Park Y.S., Safayhi H., Golubic M. et al. (2002), Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) is cytotoxic for meningioma cells and inhibits phosphorylation of the extracellular-signal regulated kinase 1 and 2, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 507, 387-93
- ³³ Jing Y. et al. (1992), Growth inhibition and differentiation of promyelocytic cells (HL60) induces by BC-4, an active principle from *Boswellia carterii* Birdw., *Clin. Med. Sci. J.*, 7, 12-15
- ³⁴ Glaser T., Safayhi H., Weller M. et al. (1999), Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Bri. J. Cancer*, 80, 756-65
- ³⁵ Liu J.J., Duan R.D. et al. (2002), Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells, *Carcinogenesis*, 23, 2087-93
- ³⁶ Syrovets T., Simmeth Th. et al. (2000), Acetyl-boswellic acid are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIa, *Mol. Pharmacol.*, 58, 71-81
- ³⁷ Winking M., Böker D.K. et al. (2000), Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option?, *J. Neuro-Oncol.*, 46, 97-103
- ³⁸ Heldt R.M., Winking M., Simmet Th. (1996), Cysteinyl-leukotrienes as potential mediators of the peritumoral brain oedema in astrocytoma patients, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 353/4S, R142, Abstr. 538
- ³⁹ Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage (1994)
- ⁴⁰ Gupta I. et al. (1997), Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis, *Eur. J. Med. Res.*, 2, 37-43
- ⁴¹ Mutschler *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage

- ⁴² Gerhardt H. et al. (2001), Therapie des aktiven Morbus Crohn mit dem Boswellia-serrata-Extrakt H15, Z. Gastroenterol., 39, 11-17
- ⁴³ Seifert F., Gerhardt H. (2001), Lebensqualität unter antientzündlicher Therapie mit dem Boswellia-serrata-Extrakt H15, Med. Welt, 52, Dezember
- ⁴⁴ Gerhardt H. (2001), Therapeutischer Nutzen des Boswellia-serrata-Extraktes H15, Med. Welt, 52, 37-9, Februar
- ⁴⁵ Sander et al. (1998), Ist H15 eine sinnvolle Ergänzung zur etablierten medikamentösen Therapie der chronischen Polyarthritits? - Ergebnisse einer doppelblinden Pilotstudie, Z. Rheumatio., 57, 11-16
- ⁴⁶ Keudell et al. (1994), Klinische Wirksamkeit des Weihrauchpräparates H15 bei rheumatoider Arthritis, Zeitschrift für Rheumatologie, 53, V144 (Abstract)
- ⁴⁷ Gupte I, Ammon H.P.T. et al. (1998), Effects of Boswellia serrata gum resin in patients with bronchial asthma, Eur. J. Med. Res. 3, 511-14
- ⁴⁸ Winking M. et al. (1994), Significant influence of cysteinyl-leukotrienes in formation of perifocal edema in brain tumor patients, J. Neurooncol., 21, 67
- ⁴⁹ Winking M. et al. (1995), Cysteinyl-Leukotriensynthese bei Astrocytomen – Korrelation mit dem perifokalem Ödem und Malignitätsgrad, In: Moderne Verfahren zur Optimierung der Hirntumorbehandlung, Aachen, Shaker Verlag
- ⁵⁰ Janßen G., Göbel U. et al. (2000), Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumors, Klin. Pädiatr., 212, 189-195
- ⁵¹ Streffer J. et al. (2001), Response to radiochemotherapy associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent- H15, Neurology., 56, 1219-21
- ⁵² Böker C., Winking M. (1997), Die Rolle von Boswelliasäuren in der Therapie maligner Gliome, Dt. Ärztebl. 94:A, 1197-99
- ⁵³ Tawab M. et al. (2001), Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 11-keto-beta-boswellic acid in human plasma, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 761, 2, 221-7
- ⁵⁴ Kaunzinger A. et al. (2002), Determination of 11-keto-boswellic acid in human plasma, J. Pharm. Biomed. Anal., 28, 3-4, 729-39
- ⁵⁵ Schiffman E., Corcoran B.A., Wahl S.M. (1975), N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes, Proc. Natl. Acad. Sci, 72, 1059-62
- ⁵⁶ Marasco W.A., Krutzsch H. et al. (1984), Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli, J. Biol. Chem., 259, 5430-39
- ⁵⁷ Panaro M.A., Mitolo V. (1999), Cellular responses to fMLP challenging: a mini-review, Immunopharmacol. Immunotoxicol., 21, 397-419
- ⁵⁸ Williams L.T., Pike M.C. et al. (1977), Specific receptor sites for chemotactic peptides on polymorphonuclear leukocytes, Proc. Natl. Acad. Sci, 74, 1204-08
- ⁵⁹ Boulay B., Vignais P. et al. (1990), The human N-formylpeptide receptor. Characterisation of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors, Biochemistry, 29, 11123-33
- ⁶⁰ Yang M., Ye R.D. et al. (2001), $G\alpha_{16}$ couples chemoattractant receptors to NF- κ B activation, J. Immunol., 166, 6885-92

- ⁶¹ Avdi N. Worthen G.S. et al. (1996), Activation of MEKK by FMLP in human neutrophils: mapping pathways for MAP kinase activation, *J. Biol. Chem.*, 271, 33598-606
- ⁶² Thompson H.L., Shiroo H., Saklatvala J. (1993), The chemotactic factor N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine activates microtubule-associated protein 2 (MAP) kinase and a MAP kinase kinase in polymorphonuclear leukocytes, *J. Biochem.*, 290, 483-88
- ⁶³ Worthen. G.S., Johnson G.L. et al. (1994), FMLP activates ras and raf in human neutrophils: potential role in activation of MAP kinase, *J. Clin. Invest.*, 94, 815-23
- ⁶⁴ Thompson H.L., Marshall C.J., Saklatvala J. (1994), Characterization of two different forms of mitogen-activated protein kinase kinase induced in polymorphonuclear leukocytes following stimulation by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J. Biol. Chem*, 269, 9486-92
- ⁶⁵ Krump, E., Grinstein, S. et al. (1997), Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils, *J. Biol. Chem*, 272, 937-44
- ⁶⁶ Nick, J.A., Worthen, G.S. et al. (1997), Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP, *J. Clin. Invest.*, 99, 975-86
- ⁶⁷ Wu E.H., Lo R.K., Wong Y.H. (2003), Regulation of STAT3 activity by G16-coupled receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 920-5
- ⁶⁸ Syrbu S.I., Sha'afi R.I. et al. (1999), Phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ and the release of arachidonic acid in human neutrophils, *J. Immunol.*, 162, 2334-40
- ⁶⁹ Venable M.E., Rrescott A. M. et a. (1993), Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with divers actions, *J. Lipid Res.* 34, 691-702
- ⁷⁰ Snyder F. (1990), Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators, *Am. J. Physiol.*, 259(5 Pt 1):C697-708
- ⁷¹ Schellenberg R.R. (1987), Airway responses to platelet-activating factor, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136(4 Pt 2):S28-32
- ⁷² Bazan N.G. (1998), The neuromessenger platelet-activating factor in plasticity and neurodegeneration, *Prog. Brain. Res.*, 118, 281-91
- ⁷³ Honda Z., Ishii S., Shimizu T. (2002), Platelet-activating factor receptor, *J. Biochem.*, 131, 773-9.
- ⁷⁴ Shimizu T., Kume K. et al. (1996), Platelet-activation factor and somatostatin activate mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) and arachidonate release, *J. Lipid. Mediat. Cll. Signal* , 14, 103-8
- ⁷⁵ Kim F.J., Banerjee A. et al. (1996), Reperfused gut elaborates PAF that chemoattracts and primes neutrophils, *J. Surg. Res.*, 58, 636-40
- ⁷⁶ Steel H.C., Anderson R. (2002), Dissociation of the PAF-receptor from NADPH oxidase and adenylate cyclase in human neutrophils results in accelerated influx and delayed clearance of cytosolic calcium, *Br. J. Pharmacol.*, 136, 81-9
- ⁷⁷ Khan W.A., Blobe G. C., Hannun Y.A. (1995), Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C, *Cell Signal.*, 7, 171-84
- ⁷⁸ Hii C.S., Ferrante A. et al. (1998), Stimulation of p38 phosphorylation and activity by arachidonic acid in HeLa cells, HL60 promyelocytic leukemic cells, and human neutrophils. Evidence for cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 273, 19277-82

- ⁷⁹ Werz O., Bürkert E., Fischer L, Steinhilber D. (2002) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes, *FASEB J.*, 16, 1441-3.
- ⁸⁰ Capodici C., Weissmann G. et al. (1998), Integrin-dependent homotypic adhesion of neutrophils. Arachidonic acid activates Raf-1/Mek/Erk via a 5-lipoxygenase- dependent pathway, *L. Clin. Invest.*, 102(1), 165-75
- ⁸¹ Naccache P.H., Borgeat P. et al. (1989), Arachidonic acid-induced mobilization of calcium in human neutrophils: evidence for a multicomponent mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.*, 97, 461-8
- ⁸² Werz O., Radmark O. et al. (2000), Phorbol ester upregulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 and human PMNL, *Blood*, 97, 2487-95
- ⁸³ Dannhardt G., Kiefer W. (2001), Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects, *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 109-26
- ⁸⁴ Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. (1998), Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 97-120
- ⁸⁵ Oppenheim J.J. (2001), Cytokines: past, present, and future, *Int. J. Hematol.*, 74, 3-8
- ⁸⁶ Scapini P., Cassatella M.A. et al. (2000), The neutrophil as a cellular source of chemokines, *Immunol. Rev.*, 177, 195-203
- ⁸⁷ Lachman L.B. (1983), Human interleukin 1: purification and properties, *Fed. Proc.*, 42, 2639-45
- ⁸⁸ Luheshi G., Rothwell N. (1996), Cytokines and fever, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 109, 301-7
- ⁸⁹ Mendes A.F., Lopes M.C. et al. (2002), Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes, *Inflamm. Res.*, 51, 369-75
- ⁹⁰ Horie S., Gleich G.J., Kita H. (1996), Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 98, 371-81
- ⁹¹ Downey G.P., Fialkow L. et al. (1995), Intracellular signaling in neutrophil priming and activation, *Cell. Bil.* 6, 345-56
- ⁹² Poulakkainen P.A., Ranchalis E. et al. (1995), The enhancement in wound healing by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) depends on the topical delivery system, *J. Surg. Res.*, 58, 321-29
- ⁹³ Ono S.J., Toda M. et al. (2003), Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 111, 1185-99
- ⁹⁴ Kelvin D.J., Wang J.M. et al. (1993), Chemokines and serpentine: the molecular biology of chemokine receptors, *J. Leukoc. Biol.*, 54, 604-12
- ⁹⁵ Atta-ur-Rahman, Harvey K., Siddiqui R.A. (1999), Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator, *Curr. Pharm. Des.*, 5, 241-53
- ⁹⁶ Hugli T.E., Müller-Eberhard H.J. (1978), Anaphylatoxins: C3a and C5a, *Adv. Immunol.*, 26, 1-48
- ⁹⁷ Ali H., Snyderman R. et al. (1997), Mechanisms of inflammation and leukocyte activation, *Adv. Rheumatol.*, 81, 1-28
- ⁹⁸ Luster A.D. (2001), Chemotaxis: role in immune response, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-11
- ⁹⁹ Gerard C., Gerard N.P. (1994), The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte, *Curr. Opin. Immunol.*, 6, 140-45

- ¹⁰⁰ Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. (2002), The neutrophil NADPH oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 397, 342-4
- ¹⁰¹ Beal M.F. (1995), Aging, energie, and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Ann. Neurol.*, 38, 357-66
- ¹⁰² Dreher D., Junod A.F. (1996), Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. Cancer*, 32A, 30-38
- ¹⁰³ Ferro C.J., Webb D.J. (1997), Endothelial dysfunction and hypertension, *Drugs* 53 Suppl.1, 30-41
- ¹⁰⁴ Smith R.M., Curnutte J.T. (1991), Molecular basis of chronic granulomatous disease, *Blood*, 77, 673-86
- ¹⁰⁵ Hancock J.T. (1997), Superoxide, hydrogenperoxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease, *Br. J. Biomed. Sci.*, 54, 38-46
- ¹⁰⁶ Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. (2001), Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation, *Cell Physiol. Biochem.*, 11, 173-86
- ¹⁰⁷ Forman H.J., Torres M. (2002), Reactive oxygen species and cell signaling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166, S4-S8
- ¹⁰⁸ Yu L., Quinn M.T., Cross A.R., Dinauer M.C. (1998), Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 7993-8
- ¹⁰⁹ Volpp B.D., Nauseef W.M., Clark R.A. (1988), Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease, *Science*, 242, 1295-7
- ¹¹⁰ Cross A.R. (2000), p40^{phox} participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47^{phox} for flavocytochrome b₅₅₈, *J. Biochem.*, 349, 113-7
- ¹¹¹ Sathyamoorthy M., Leto T.L. et al. (1997), p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain, *J. Biol. Chem.*, 272, 9141-6
- ¹¹² Gabig T.G., Rosli R. et al. (1995), Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap 1 a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation, *Blood*, 85, 804-11
- ¹¹³ Dusi S., Donini M., Rossi F. (1996), Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40^{phox}, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47^{phox} or p96^{phox}, *J. Biochem.* 314, 409-12
- ¹¹⁴ Fuchs A., Vignais P.V. et al. (1997), The 40 kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40^{phox}) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells, *Eur. J. Biochem.*, 249, 531-9
- ¹¹⁵ Bouin A.P., Fuchs A. et al. (1998), P40^{phox} is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase C-type kinase in the phosphorylation process, *J. Biol. Chem.*, 273, 30097-103
- ¹¹⁶ Chanock S.J., Babior B.M. et al. (1994), The respiratory burst oxidase, *J. Biol. Chem*, 269, 24519-22
- ¹¹⁷ Heyworth P.G., Badwey J.A. (1990), Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium, *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 1-26
- ¹¹⁸ Cox J.A., Tauber A.I. et al. (1985), Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C, *J. Clin. Invest.*, 76, 1932-8

- ¹¹⁹ Dang P.M., Benna J.E. et al. (2003), Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region, *Biochemistry*, 42, 4520-6
- ¹²⁰ Dewas E., El-Benna J. (2000), The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in fMLP-induced p47^{phox} phosphorylation in human neutrophils, *J. Immunol.*, 165, 5238-44
- ¹²¹ Meseguer J., Esteban M.A., Rodriguez A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes?, *Microsc. Res. Tech.*, 57, 491-7
- ¹²² Leo R., Violi F. et al. (1997), Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated, *Circulation*, 95, 885-9
- ¹²³ Gallagher R.E. et al. (1979), Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 54, 713-733
- ¹²⁴ Werz O., Ammon H.P., Steinhilber D. et al. (1997), A test system for leukotriene synthesis inhibitors based on the in vitro differentiation of the human leukemic cell lines HL-60 and Mono Mac 6, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 356, 441-5
- ¹²⁵ Ziegler-Heitbrock H. W. L., Riethmüller G. et al. (1988), Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes, *Int. J. Cancer*, 41, 691-7
- ¹²⁶ Brungs M., Steinhilber D. et al. (1995), Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 107-11
- ¹²⁷ Werz O., Steinhilber D. (1996), Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells – The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells, *Eur. J. Biochem.*, 242, 90-7
- ¹²⁸ Bürkert E., Werz O. et al. (2003), The C2-like β -barrel domain mediates the Ca²⁺-dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1, *JBC in revision*.
- ¹²⁹ Rhee S.G. (2001), Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 281-312
- ¹³⁰ Lowenstein E.J., Schlessinger J. et al. (1992), The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling, Lowenstein E.J., Schlessinger J. et al. (1992), *Cell.*, 70, 431-42
- ¹³¹ Kaplan D.R., Roberts T.M. et al. (1987), Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity, *Cell.*, 50, 1021-9
- ¹³² Matsuda M., Katan M. et al. (2001), Real time fluorescence imaging of PLC gamma translocation and its interaction with the epidermal growth factor receptor, *J. Cell. Biol.*, 153, 599-612
- ¹³³ Chardin P., Ducruix A. et al. (1995), The Grb2 adaptor, *FEBS Lett.*, 369, 47-51
- ¹³⁴ Egan S.E., Weinberg R.A. et al. (1993), Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation, *Nature*, 363(6424), 45-51
- ¹³⁵ Wittinghofer A., Nassar N. (1996), How Ras-related proteins talk to their effectors, *Trends Biochem. Sci.*, 21, 488-91
- ¹³⁶ Stokoe D., Hancock J.F., et al. (1994), Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane, *Science*, 264(5164), 1463-7

- ¹³⁷ Dent P., Sturgill T.W. et al. (1995), Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5203
- ¹³⁸ Marais R, Marshall C.J. et al. (1995), Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *EMBO J.*, 14, 3136-45
- ¹³⁹ Dhillon A.S., Kolch W. (2002), Untying the regulation of the Raf-1 kinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 404, 3-9
- ¹⁴⁰ Robinson M.J., Cobb M.H. (1997), Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 180-6
- ¹⁴¹ Sprang S.R. (1997), G protein mechanisms: insights from structural analysis, Sprang S.R. (1997), *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 639-78
- ¹⁴² Hamm H.E. (1998), The many faces of G protein signaling, *J. Biol. Chem.*, 273, 669-72
- ¹⁴³ Simon M.I., Strathmann M.P., Gautam N. (1991), Diversity of G proteins in signal transduction, *Science*, 252(5007), 802-8
- ¹⁴⁴ Wilkie T.M., Simon M.I. et al. (1992), Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family, *Nat. Genet.*, 1, 85-91
- ¹⁴⁵ Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G. (1996), Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 461-80
- ¹⁴⁶ Meinkoth J.L., Feramisco J.R. et al. (1993), Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase, *Mol. Cell. Biochem.*, 127-128, 179-86
- ¹⁴⁷ Moss J., Vaughan M. (1988), ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 61, 303-79
- ¹⁴⁸ Kaziro Y., Satoh T. et al. (1991), Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 349-400
- ¹⁴⁹ Spicher K., Schultz G. et al. (1994), G12 and G13 alpha-subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198, 906-14
- ¹⁵⁰ Hart M.J., Bollag G. et al. (1998), Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13, *Science*, 280(5372), 2112-4
- ¹⁵¹ Smrcka A.V., Sternweis P.C. et al. (1991), Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq, *Science*, 251(4995), 804-7
- ¹⁵² Berridge M.J. (1993), Inositol trisphosphate and calcium signalling, *Nature*, 361(6410), 315-25
- ¹⁵³ Newton A.C. (1997), Regulation of protein kinase C, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 161-7
- ¹⁵⁴ Schechtman D., Mochly-Rosen D. (2001), Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction, *Oncogene*, 20, 6339-47
- ¹⁵⁵ Aderem A. (1992), The MARCKS-brothers: a family of protein kinase C substrates; *Cell*, 71, 713-716
- ¹⁵⁶ Aderem A. (1992), Signal transduction and the actin cytoskeleton: the role of MARCKS and profilin; *Trends Biochem. Sci.*, 17, 438-443
- ¹⁵⁷ Sternweis P.C., Smrcka A.V. (1993), G proteins in signal transduction: the regulation of phospholipase C, *Ciba Found Symp.*, 176, 96-106; discussion 106-11
- ¹⁵⁸ Clapham D.E., Neer E.J. (1997), G protein beta gamma subunits, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 167-203.

- ¹⁵⁹ Jelsema C.L., Axelrod J. (1987), Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84, 3623-7
- ¹⁶⁰ Kurosu H., Katada T. et al. (1997), Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide, *J. Biol. Chem.*, 272, 24252-6
- ¹⁶¹ Stephens L., Hawkins P.T. et al. (1994), A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits, *Cell*, 77, 83-93
- ¹⁶² Logothetis D.E., Clapham D.E. et al. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart, *Nature*, 325(6102), 321-6
- ¹⁶³ Pumiglia K.M., Decker S.J. et al. (1995), A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase, *J. Biol. Chem.*, 270, 14251-4
- ¹⁶⁴ Klarlund J.K., Czech M.P. et al. (1998), Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J. Biol. Chem.*, 273, 1859-62
- ¹⁶⁵ Han J., Broek D. et al. (1998), Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav, *Science*, 279(5350), 558-60
- ¹⁶⁶ Bondeva T., Wymann M.P. et al. (1998), Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK, *Science*, 282(5387), 293-6
- ¹⁶⁷ Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. et al. (2001), Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 535-602
- ¹⁶⁸ Wymann M.P., Panayotou G. et al. (1996), Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction, *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1722-33
- ¹⁶⁹ Naccache P.H., McColl S.R. et al. (2000), Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma, *J. Biol. Chem.*, 275, 23636-41
- ¹⁷⁰ Hannigan M., Huang C.K. et al. (2002), Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99, 3603-8
- ¹⁷¹ Hirsch E., Wymann M.P. et al. (2000), Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation, *Science*, 287(5455), 1049-53
- ¹⁷² Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. (1998), Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139
- ¹⁷³ Johnson G.L., Lapadat R. (2002), Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science*, 298(5600), 1911-2
- ¹⁷⁴ Widmann C.S., Johnson G.L. et al. (1999), Mitogen-activated protein kinase : conservation of a three-kinase module from the yeast to human, *Physiol. Rev.*, 79, 143-80
- ¹⁷⁵ Keyse S.M. (2000), Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 186-92
- ¹⁷⁶ Touhara K., Hawes B.E., van Biesen T., Lefkowitz R.J. (1995), G protein beta gamma subunits stimulate phosphorylation of Shc adapter protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92, 9284-7
- ¹⁷⁷ van Biesen T., Lefkowitz R.J. (1995), Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway, *Nature*, 376(6543), 781-4

- ¹⁷⁸ Marais R., Marshall C.J. (1996), Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf, *Cancer Surv.*, 27, 101-25
- ¹⁷⁹ Hawes B.E., van Biesen T., Lefkowitz R.J. et al. (1995), Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation, *J. Biol. Chem.*, 270, 17148-53
- ¹⁸⁰ Pearson G., Cobb M.H. et al. (2001), Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.*, 22, 153-83
- ¹⁸¹ Minden A., Karin M. et al. (1995), Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs, *Cell.*, 81, 1147-57
- ¹⁸² Bagrodia S., Cerione R.A. et al. (1995), Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation, *J. Biol. Chem.*, 270, 27995-8
- ¹⁸³ Fanger G.R., Johnson G.L. et al. (1997), MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 67-74
- ¹⁸⁴ Gerwins P., Blank J.L., Johnson G.L. (1997), Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway, *J. Biol. Chem.*, 272, 8288-95
- ¹⁸⁵ Holland P.M., Cooper J.A. et al. (1997), MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous, *J. Biol. Chem.*, 272, 24994-8
- ¹⁸⁶ Gupta S., Davis R.J. et al. (1996), Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors, *EMBO J.*, 15, 2760-70
- ¹⁸⁷ Zhang S., Bokoch G.M. et al. (1995), Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1, *J. Biol. Chem.*, 270, 23934-6
- ¹⁸⁸ Enslen H., Raingeaud J., Davis R.J. (1998), Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6, *J. Biol. Chem.*, 273, 1741-8
- ¹⁸⁹ Clifton A.D., Young P.R., Cohen P. (1996), A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress, *FEBS Lett.*, 392, 209-14
- ¹⁹⁰ Stokoe D., Gaestel M. et al. (1992), Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins, *FEBS Letters*, 313, 307-13
- ¹⁹¹ Huang C.K., Jongstra J. et al. (1997), LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils, *J. Biol. Chem.*, 272, 17-19
- ¹⁹² Heidenreich O., Nordheim A. et al. (1999), MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 274, 14434-43
- ¹⁹³ Werz O., Rådmark, O. et al. (2000), 5-Lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase dependent MAPKAP kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5261-66
- ¹⁹⁴ Brash, R.H. (1999), Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.*, 274, 23679-82
- ¹⁹⁵ Theorell, H., Holman, R.T. and Åkesson, Å. (1947), Crystalline lipoxidase, *Acta Chem. Scand.*, 1, 571-576
- ¹⁹⁶ Hamberg M., Samuelsson B. (1974), Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 3400-4

- ¹⁹⁷ Borgeat P., Hamberg M., Samuelsson B. (1976), Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases, *J. Biol. Chem.*, 251, 7816-20
- ¹⁹⁸ Samuelson B. (1983), Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science*, 220, 568-75
- ¹⁹⁹ Minor W., Axelrod B. et al. (1996), Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution, *Biochemistry*, 35, 10687-701
- ²⁰⁰ Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M. (1993), The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase, *Science*, 260, 1482-6
- ²⁰¹ Skrzypczak-Jankun E., Funk M.O. Jr. et al. (1997), Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme, *Proteins*, 29, 15-31
- ²⁰² Gillmor S.A., Browner M.F. et al. (1997), The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, *Nat. Struct. Biol.*, 4, 1003-9
- ²⁰³ Zhang Y.Y., Lind B., Radmark O., Samuelsson B. (1993), Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues, *J. Biol. Chem.*, 268, 2535-41
- ²⁰⁴ Hammarberg T., Zhang Y.Y., Lind B., Radmark O., Samuelsson B. (1995), Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase, *Eur. J. Biochem.*, 230, 401-7
- ²⁰⁵ Hammarberg T., Kuprin S., Radmark O., Holmgren A. (2001), EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide, *Biochemistry*, 40, 6371-8
- ²⁰⁶ Walther M., Kuhn H. et al. (2001), Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis, *Chem. Biol.*, 8, 779-90
- ²⁰⁷ Glickman M.H., Klinman J.P. (1996), Lipoxygenase reaction mechanism: demonstration that hydrogen abstraction from substrate precedes dioxygen binding during catalytic turnover, *Biochemistry*, 35, 12882-92
- ²⁰⁸ Werz O., Radmark O. et al. (2002), Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPKAP kinase-2, *J. Biol. Chem.*, 277, 14793-800
- ²⁰⁹ Wu H. (1996), Affecting the activity of soybean lipoxygenase-1, *J. Mol. Graph.*, 14, 331-7
- ²¹⁰ Berry H., Debat H., Larreta-Garde V. (1997), Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent, *FEBS Lett.*, 408, 324-6
- ²¹¹ Hammarberg T., Provost P., Persson B., Radmark O. (2002), The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity, *J. Biol. Chem.*, 275, 38787-93.
- ²¹² Hammarberg T., Radmark O. (1999), 5-Lipoxygenase binds calcium, *Biochemistry*, 38, 4441-47
- ²¹³ Chen X.S., Funk C.D. (2001), The N-terminal "β-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation, *J. Biol. Chem.*, 276, 811-8
- ²¹⁴ Denis D., Abramovitz M. et al. (1991), Characterization of the activity of purified recombinant human 5-lipoxygenase in the absence and presence of leukocyte factors, *J. Biol. Chem.*, 266, 5072-9
- ²¹⁵ Radmark O.P. (2000), The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, S11-15
- ²¹⁶ Zhang Y.Y., Samuelsson B., Loscalzo J. et al. (2000), Analysis of a nucleotide-binding site of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences, *Biochem. J.* 351, Tr3, 697-707

- ²¹⁷ Samuelsson B., Serhan C.N. et al. (1987), Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis, and biological effects, *Science* 237, 1171-76
- ²¹⁸ Borgeat P., Samuelsson B. (1979), Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds, *J. Biol. Chem.*, 254, 7865-69
- ²¹⁹ Setty B.N., Graeber J.E., Stuart M.J. (1987), The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition, *J. Biol. Chem.*, 262, 17613-22
- ²²⁰ Turner S.R., Tainer J.A., Lynn W.S. (1975), Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate lipoxygenase system of platelets, *Nature*, 257, 680-1
- ²²¹ Goetzl E.J., Hill H.R., Gorman R.R. (1980), Unique aspects of the modulation of human neutrophil function by 12-L-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, *Prostaglandins*, 19, 71-85
- ²²² Aharony D., Smith J.B., Silver M.J. (1982), Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, *Biochim. Biophys. Acta.*, 718, 193-200
- ²²³ Sekiya F., Saito Y. et al. (1991), 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid plays a central role in the regulation of platelet activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 345-51
- ²²⁴ Boeglin W.E., Kim R.B., Brash A.R. (1998), A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 6744-9
- ²²⁵ Gonzalez-Nunez D., Roch E. et al. (2001), Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension, *Hypertension*, 37, 334-8
- ²²⁶ Ding X.Z., Adrian T.E. et al. (1999), Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 218-23
- ²²⁷ Chopra H., Taylor J.D., Honn K.V. et al. (1991), The lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE induces a cytoskeleton-dependent increase in surface expression of integrin alpha IIb beta 3 on melanoma cells, *Int. J. Cancer*, 49, 774-86
- ²²⁸ Silletti S., Timar J., Honn K.V., Raz A. (1994), Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high- and low-metastatic K1735 melanoma cell variants, *Cancer Res.*, 5752-6
- ²²⁹ Tang D.G., Chen Y.Q., Honn K.V. (1996), Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93, 5241-6
- ²³⁰ Avis I., Mulshine J.L. et al. (2001), Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions, *FASEB J.*, 15, 2007-9
- ²³¹ Romano M., Procopio A. et al. (2001), 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor, *FASEB J.*, 15, 2326-36
- ²³² Powell W.S., Hashefi M. et al. (1993), Stimulation of human neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by a mechanism independent of the leukotriene B4 receptor, *J. Biol. Chem.*, 268, 9280-9286
- ²³³ Powell W.S., Gravel S., Halwani F. (1999), 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of L-selectin shedding, surface expression of CD11b, actin polymerization, and calcium mobilization in human eosinophils, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 20, 163-70
- ²³⁴ Vanderhoek J.Y., Bryant R.W., Bailey J.I.M. (1980), Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J. Bio. Chem.*, 255, 10064-66
- ²³⁵ Takahashi M., Saeki Y. et al. (1985), Vascular effects of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid on canine arteries, *Jpn. J. Pharmacol.*, 37, 325-34

- ²³⁶ Fogh K., Kragballe K. et al. (1987), Heterogeneous distribution of lipoxygenase products in psoriatic skin lesions, *Arch. Dermatol. Res.*, 279, 504-11
- ²³⁷ Johnson H.G., McNee M.L., Sun F.F. (1985), Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potent inflammatory mediator and agonist of canine tracheal mucus secretion, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 131, 917-22
- ²³⁸ Hwang S.W., Kim D., Oh U. et al. (2000), Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97, 6155-60
- ²³⁹ Serhan C.N., Hamberg M., Samuelsson B. (1984), Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 5335-
- ²⁴⁰ Serhan C. N. (1997), Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity, *Prostaglandins*, 53, 107-37
- ²⁴¹ Fierro I.M., Serhan C.N. (2001), Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34, 555-66
- ²⁴² McMahon B., Godson C. et al. (2000), Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors, *J. Biol. Chem.*, 275, 27566-75
- ²⁴³ Serhan C.N., Chiang N. (2002), Lipid-Derived Mediators in Endogenous Anti-Inflammation and Resolution: Lipoxins and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxins, *Scientific World Journal*, 2, 169-204
- ²⁴⁴ Ford-Hutchinson A.W. (1990), Leukotriene B₄ in inflammation, *Crit. Rev. Immunol.*, 10, 1-12
- ²⁴⁵ Samuelson B., Murphy R.C. et al. (1980), Leukotrienes: a new group of biologically active compounds, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 6, 1-8
- ²⁴⁶ Denzlinger C. (1996), Biology and pathophysiology of leukotrienes, *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 23, 167-223
- ²⁴⁷ Izumi T., Shimizu T. et al. (2002), Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction, *J. Biochem.*, 132, 1-6
- ²⁴⁸ Devchand P.R., Wahli W. et al. (1996), The PPARalpha-leukotriene B₄ pathway to inflammation control, *Nature*, 384, 39-43
- ²⁴⁹ Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B. (2000), Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation, *Inflamm. Res.*, 49, 497-505
- ²⁵⁰ Noguchi M., Noma M. et al. (1994), Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA₄ synthetase activity, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1215, 300-6
- ²⁵¹ Peters-Golden M., McNish R.W. (1993), Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear fraction upon macrophage activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 147-53
- ²⁵² Rouzer C.A., Kargman S. (1988), Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187, *J. Biol. Chem.*, 263, 10980-8
- ²⁵³ Schatz-Munding M., Hatzelmann A., Ullrich V. (1991), The involvement of extracellular calcium in the formation of 5-lipoxygenase metabolites by human polymorphonuclear leukocytes, *Eur. J. Biochem.*, 197, 487-93
- ²⁵⁴ Reddy K.V., Hammarberg T., Radmark O. (2000), Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid, *Biochemistry.*, 39, 1840-8

- ²⁵⁵ Ochi K., Yoshimoto T., Miyamoto T. et al. (1983), Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate, *J. Biol. Chem.*, 258, 5754-8
- ²⁵⁶ Rouzer C.A., Samuelsson B. (1985), On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 82, 6040-4
- ²⁵⁷ Noguchi M., Miyano M., Matsumoto T. (1996), Physicochemical characterization of ATP binding to human 5-lipoxygenase, *Lipids*, 31, 367-71
- ²⁵⁸ Puustinen T., Scheffer M.M., Samuelsson B. (1988), Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles, *Biochim. Biophys. Acta.*, 960, 261-7
- ²⁵⁹ Rouzer C.A., Samuelsson B. (1986), The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase, *FEBS Lett.*, 204, 293-6
- ²⁶⁰ Weitzel F., Wendel A. (1993), Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone, *J. Biol. Chem.*, 268, 6288-92
- ²⁶¹ Hatzelmann A., Schatz M., Ullrich V. (1989), Involvement of glutathione peroxidase activity in the simulation of 5-lipoxygenase activity by glutathione-depleting agents in human polymorphonuclear leukocytes, *Eur. J. Biochem.*, 180, 527-33
- ²⁶² Aharony D., Stein R.L. et al. (1987), Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, *Prostaglandins*, 33, 85-100
- ²⁶³ Percival M.D., Gresser M.J. et al. (1992), Investigation of the mechanism of non-turnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase, *Eur. J. Biochem.*, 210, 109-17
- ²⁶⁴ Vickers P.J. (1995), 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), *J. Lipid. Mediat. Cell*, 12, 185-94
- ²⁶⁵ Abramovitz M., Vickers P.J. et al. (1993), 5-Lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase, *Eur. J. Biochem.*, 215, 105-11
- ²⁶⁶ Werz O. (2002), 5-Lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology, *Curr. Drug Targets – Inflammation and Allergy*, 1, 23-44
- ²⁶⁷ Murakami M., Kudo I. (2002), Phospholipase A₂, *J. Biochem.*, 131, 285-92
- ²⁶⁸ Qiu Z.H., Gijon M.A., Leslie C.C. et al. (1998), The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages, *J. Biol. Chem.*, 273, 8203-11
- ²⁶⁹ Hefner Y., Gelb M.H. et al. (2000), Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 275, 37542-51
- ²⁷⁰ Nelefski E.A., Clark J.D. et al. (1994), Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and a Ca²⁺-independent catalytic domain, *J. Biol. Chem.*, 269, 18239-49
- ²⁷¹ Schievella A.R., Lin L.L. et al. (1995), Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 270, 30749-54
- ²⁷² Gijon M.A., Leslie C.C. (1999), Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation, *J. Leuk. Biol.*, 65, 330-6
- ²⁷³ Kramer R.M., Jakubowski J.A. et al. (1996), p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets, *J. Biol. Chem.*, 271, 27723-29

- ²⁷⁴ Evans J.H., Fergus D.J., Leslie C.C. (2002), Inhibition of the MEK1/ERK pathway reduces arachidonic acid release independently of cPLA₂ phosphorylation and translocation, *BMC Biochem.*, 3(1):30
- ²⁷⁵ Haeggstrom J.Z., Thunnissen M.M. et al. (2002), Leukotriene A4 hydrolase, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69:495-510
- ²⁷⁶ Wetterholm A., Haeggstrom J.Z., (1992), Leukotriene A4 hydrolase: an anion activated peptidase, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1123, 275-81
- ²⁷⁷ Lam B.K., Austen K.F. (2002), Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69:511-20
- ²⁷⁸ Steinhilber D. (1999), 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited, *Curr. Med. Chem.*, 6, 69-83
- ²⁷⁹ Surette M.E., Borgeat P. et al. (1998), Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B4 in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *FASEB j.*, 12, 1521-31
- ²⁸⁰ Lepley R.A., Muskardin D.T., Fitzpatrick F.A. (1996), Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase, *J. Biol. Chem.*, 271, 6179-84
- ²⁸¹ Werz O., Bürkert E., Fischer L., Radmark O., Steinhilber D. et al. (2003), 5-Lipoxygenase activation by MAPKAPK-2 and ERKs, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 525, 129-32
- ²⁸² Werz O., Klemm J., Samuelsson B., Radmark O. (2000), 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5261-6
- ²⁸³ Bürkert E., Werz O. et al. (2003), Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid, *J. Leukoc. Biol.*, 73, 191-200
- ²⁸⁴ Werz O., Bürkert E., Steinhilber D. et al. (2002), Activation of 5-lipoxygenase by cell stress in calcium-independent in human polymorphonuclear leukocytes, *Blood*, 99, 1044-52
- ²⁸⁵ Albert D., Bürkert E., Steinhilber D., Werz O. (2003), Induction of 5-lipoxygenase activation in polymorphonuclear leukocytes by 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1631, 85-93
- ²⁸⁶ Claesson H.E., Dahlen S.E. et al. (1999), Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs, *J. Intern. Med.*, 245, 205-27
- ²⁸⁷ Carter G.W., Brooks D.W. et al. (1991), 5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256, 929-37
- ²⁸⁸ McMillan R.M., Walker E.R.H. (1992), Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 323-30
- ²⁸⁹ Werz O., Steinhilber D. et al. (1998), Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity, *Mol. Pharmacol.*, 54, 445-51
- ²⁹⁰ Fischer L., Werz O. et al. (2003), Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors, *FASEB J.*, 17(8), 949-51.
- ²⁹¹ *Dtsche. Apoth. Ztg.*, 2002, 142 (32), 35-6
- ²⁹² Vavreckova C., Gawlik I., Muller K. (1996), Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism, *Planta Med.*, 62, 397-401
- ²⁹³ Evans, F. J. (1991), Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis, *Planta Med.*, 57 Suppl., 60 - 67

- ²⁹⁴ Yoshimoto T., Takahashi Y. (2002), Arachidonate 12-lipoxygenase, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69:245-62
- ²⁹⁵ Conrad D.J. (1999), The arachidonate 12/15-lipoxygenase. A review of tissue expression and biologic function, *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, 17(1-2):71-89
- ²⁹⁶ Sakashita T., Yoshimoto T. et al. (1999), Essential involvement of 12-lipoxygenase in regiospecific and stereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages., *Eur. J. Biochem*, 265, 825-31
- ²⁹⁷ Bleich D., Nadler J.L. et al. (1998), The role of 12-lipoxygenase in pancreatic beta-cells (Review), *Int. J. Mol. Med.*, 1, 265-72
- ²⁹⁸ Timar J. Nie D. et al. (2000), Expression subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential., *Int. J. Cancer*, 87, 37-43
- ²⁹⁹ Hussain H., Holtzman M.J. et al. (1994), Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis, *Am. J. Physiol.*, 266(1 Pt 1):C243-53
- ³⁰⁰ Winer I., Brenner D.E. et al. (2002), Expression of 12-lipoxygenase as a biomarker for melanoma carcinogenesis, *Melanoma Res.*, 12, 429-34
- ³⁰¹ Kuhn H., Walther M., Kuban R.J. (2002), Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 263-90.
- ³⁰² Kühn H., Trebus F. et al. (1999), Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels, *Lipids*, 34 Suppl:S273-9
- ³⁰³ Kuhn H., Chan L. (1997), The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: pro- and antiatherogenic actions, *Curr. Opin. Lipidol.*, 8, 111-7
- ³⁰⁴ Vanderhoek J.Y. (1988), Role of the 15-lipoxygenase in the immune system, *Ann. N Y Acad. Sci.*, 524, 240-51
- ³⁰⁵ Werz O., Brungs M., Steinhilber D. (1996), Purification of transforming growth factor beta1 from human platelets, *Pharmazie*, 51, 893-896
- ³⁰⁶ Collins S.J. et al. (1977), Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature*, 270, 347-349
- ³⁰⁷ Böyum A. (1968), Isolation of leukocytes from human blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 97 (Suppl. 21), 77-89
- ³⁰⁸ Albert D., Werz O. et al. (2002), Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase, *Biochem. Pharmacol.*, 64, 1767-1775
- ³⁰⁹ Werz O. (1996), *Dissertationsarbeit, Universität Tübingen*
- ³¹⁰ Laemmli U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685
- ³¹¹ Grynkiewicz G. et al. (1985), A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450
- ³¹² Tsuchiya N., Sato A, Hata T, Sato N, Sasagawa K, Kobayashi T. et al. (1998), Cytotoxic scalarane sesterterpenes from a sponge, *Hyrtios erecta*, *J. Nat. Prod.*, 61, 468-73
- ³¹³ Ammon H.P., Mack T., Singh G.B., Safayhi H. (1991), Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*, *Planta Med.*, 57, 203-7

- ³¹⁴ El Sayed K.A., Hamann M.T. et al. (2000), Marine natural products as antituberculosis agents, *Tetrahedron*, 56, 949-53
- ³¹⁵ Keira T., Takata T. et al. (1997), Adverse effects of colophony, *Ind. Health.*, 35, 1-7
- ³¹⁶ Estlander T., Kanerva L. et al. (2001), Occupational allergic contact dermatitis caused by wood dusts, *Contact Dermatitis*, 44, 213-7
- ³¹⁷ Karlberg, A.T., Nilsson, J.L.G. et al. (1988), Identification of 15-hydroperoxyabiatic acid as a contact allergen in Portuguese colophony, *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 42-47.
- ³¹⁸ Takahashi N., Fushiki T. et al. (2003), Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism, *FEBS Lett.*, 550(1-3):190-4
- ³¹⁹ Fernandez M.A., Saenz M.T. et al. (2001), Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 867-72
- ³²⁰ Ulusu N.N., Tezcan E.F. et al. (2002), Abietic acid inhibits lipoxygenase activity, *Phytother. Res.* 16, 88-90
- ³²¹ Gene R.M., Canigueral S. et al. (1996), Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccaris trimera*: identification of its active constituents, *Planta Med.*, 62, 232-5
- ³²² Navarro P., Rios J.L. et al. (2001), In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*, *Life Sci.*, 68, 1199-206
- ³²³ Baglin I., Lacaille-Dubois M.A. et al. (2003), A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents, *Mini Rev. Med. Chem.*, 3, 525-39
- ³²⁴ Werz O., Steinhilber D. et al. (2002), Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes, *Blood*, 99, 1044-52
- ³²⁵ Werz O., Steinhilber D. et al. (2002), Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes, *FASEB J.*, 1666, 1441-43
- ³²⁶ Radmark O. (2002), Arachidonate 5-lipoxygenase, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 211-34
- ³²⁷ Flamand N., Borgeat P. et al. (2000), Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161(2 Pt 2):S88-94
- ³²⁸ Post G.R., Brown J.H. (1996), G protein –coupled receptors and signaling pathways regulation growth responses, *FASEB J.*, 10, 741-49
- ³²⁹ Lopez-Illasaca M. (1998), Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades, *Biochem. Pharmacol.*, 56, 269-77
- ³³⁰ Ferby I., Shimizu T. et al. (1994), Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation induced by platelet-activating factor in guinea pig neutrophils, *J. Biol. Chem.*, 269, 30485-88
- ³³¹ Naccache P.H.; Sha'afi, R.I., et al. (1979), Chemotactic factor-induced release of membrane calcium in rabbit neutrophils, *Science*, 203, 461-63
- ³³² Ng D.S., Wong K. (1989), Platelet-activating factor (PAF) stimulates phosphatidylinositol hydrolysis in human peripheral blood mononuclear leukocytes, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 66, 219-31
- ³³³ Koyasu S. (2003), The role of PI 3-K in immune cells, *Nat. Immunol.*, 4, 313-9

- ³³⁴ Eberle M., Norgauer J. et al. (1990), Is there a relationship between phosphatidylinositol trisphosphate and F-actin polymerisation in human neutrophils?, *J. Biol. Chem.*, 265, 16725-8
- ³³⁵ Innocenti M., Scita G. et al. (2003), Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1, *J. Cell. Biol.*, 160, 14-23
- ³³⁶ Krauss G. (1997), *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion, Lehrbuch*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 235-37
- ³³⁷ Wymann M.P., Hirsch E. et al. (2000), Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function, *Immunol. Today*, 21, 260-64
- ³³⁸ Traynor-Kaplan A.E., Sklar L.A. et al. (1989), Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils, *J. Biol. Chem.*, 264, 15668-73
- ³³⁹ Chang L.C., Wang J.P. (2001), Signal transduction pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase by arachidonic acid in rat neutrophils, *J. Leukoc. Biol.*, 69, 659-65
- ³⁴⁰ Capodici C., Pillinger M.H. et al. (1998), Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway, *J. Immunol.*, 160, 1901-9
- ³⁴¹ Chang L.C., Wang J.P. (2000), Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils, *Eur. J. Pharmacol.*, 390, 61-6
- ³⁴² Chang L.C., Wang J.P. (2000), The upstream regulation of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation by arachidonic acid in rat neutrophils, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 539-46
- ³⁴³ O'Flaherty J.T., Redman J.F. (1991), Roles of Ca²⁺ in human neutrophil responses to receptor agonists, *Biochem. J.*, 277, 705-11
- ³⁴⁴ Rollet E., Naccache P.H. et al. (1994), Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils. Comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signaling pathways involved, *J. Immunol.*, 153, 353-63
- ³⁴⁵ Elzi D.J., Silliman C.C. et al. (2001), Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281, C350-C360
- ³⁴⁶ Belcheva, M. M., Coscia C. J. (2002), Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase, *Neurosignals*, 11 (1), 34-44
- ³⁴⁷ Herlaar, E., Brown Z. (1999), p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease, *Mol. Med. Today*, 5 (10), 439-47
- ³⁴⁸ Johnson, E. N., Druey K. M. (2002), Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 109 (4), 592-602
- ³⁴⁹ Breitweg-Lehmann E., Nürnberg B. et al. (2002), Activation and inhibition of G proteins by lipoamines, *Mol. Pharmacol.*, 61, 628-36
- ³⁵⁰ Simchowit L., Spilberg I. (1979), Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factor. Evidence for the role of calcium, *L. Lab. Clin. Med.* 93, 583-93
- ³⁵¹ Roos, D., Weissmann G. (1976), Dissociation of phagocytosis, metabolic stimulation and lysosomal enzyme release in human leukocytes, *Agents. Actions*, 6, 256-9
- ³⁵² Hancock J.T. Jones O.T. (1987), The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages, *Biochem. J.*, 242, 103-7

- ³⁵³ Ding J., Badwey J.A. et al. (1995), Antagonists of phosphatidylinositol 3-kinase block activation of several novel protein kinases in neutrophils, *J. Biol. Chem.* 270, 11684-91
- ³⁵⁴ Yasui K., Komiyama A. (2001), Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D in temporal activation of superoxide production in FMLP-stimulated human neutrophils, *Cell Biochem. Funct.*, 19, 43-50
- ³⁵⁵ Waki K., Kuwabara M. et al. (2003), Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in the activation of NADPH oxidase induced by FMLP receptor but not by complement receptor 3 in rat neutrophils, *Free Radic. Res.*, 37, 665-71
- ³⁵⁶ Gupta U., Ammon H.P.T. et al. (2001), Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis, *Planta Med.*, 67, 391-5
- ³⁵⁷ Gupta O.P., Sharma N., Chand D. (1992), A sensitive and relevant model for evaluation anti-inflammatory activity-papaya latex-induced rat paw inflammation, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 28, 15-9
- ³⁵⁸ Wikstrom J.E., Rosenqvist U., Dahlen S.E. (1998), Agonist and antagonist activities of the leukotriene analogue BAY u9773 in guinea pig lung parenchyma, *Eur. J. Pharmacol.*, 357, 203-11
- ³⁵⁹ Clark J.D., Lin L.L. et al. (1995), Cytosolic phospholipase A2, *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.*, 12, 83-117
- ³⁶⁰ Leslie C.C. (1997), Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.*, 272, 16709-12
- ³⁶¹ Jakschik B.A., Sun F.F., Lee L., Steinhoff M.M. (1980), Calcium stimulation of a novel lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 103-10
- ³⁶² Riendeau D, Nicoll-Griffith D et al. (1994), Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets, *J. Biol. Chem.*, 269, 15619-24
- ³⁶³ Bartoli F., Apitz-Castro R. et al. (1994), Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets, *Biol. Chem.*, 269, 15625-30
- ³⁶⁴ Perez H.D., Kelly E., Holmes R. (1992), Regulation of formyl peptide receptor expression and its mRNA levels during differentiation of HL-60 cells, *J. Biol. Chem.*, 267, 358-63

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Irene Altmann
Geboren am: 15. März 1971 in Bad Kissingen

Hochschulausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

seit Juni 1999	Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt unter Leitung von Prof. Mag. Dr. M. Schubert-Zsilavec und Prof. Dr. D. Steinhilber über das Thema „Boswelliasäuren: Modulation zellulärer Signaltransduktionsmechanismen in Leukozyten und Thrombozyten und Korrelation zu funktionellen Eigenschaften“ Betreuung der Pharmaziestudenten des 1. Semesters im Praktikum „Qualitative Anorganische Analyse“ und Durchführung von Seminaren zum Thema „Allgemeine und Anorganische Chemie“ und „Radiopharmazie“ sowie Mitgestaltung der „Sommer- und Winterschule“ der Frankfurter Pharmazie zur Vorbereitung der Studierenden auf das 1. Staatsexamen
August 1999	Erteilung der Approbation als Apotheker
Juli 1999	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dez. 1998 – Juni 1999	2. Hälfte des Praktischen Jahres als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt
Juni 1998 – Nov. 1998	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Rosen-Apotheke, Offenbach
Mai 1998	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 1996	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
März 1995	2. Hälfte der Famulatur in der Hirsch-Apotheke, Offenbach
Okt. 1993 – Mai 1998	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt
Sep./Okt. 1993	1. Hälfte der Famulatur in der Hirsch-Apotheke, Offenbach

Berufsausbildung und beruflicher Werdegang

Jan. 1993 – Aug. 1993	Berufstätigkeit als Chemielaborantin / F&E Technikum / Hoechst AG Offenbach
Sep. 1990 – Jan. 1993	Ausbildung zur Chemielaborantin / Hoechst AG Offenbach

Schulbildung

Juni 1990	Allgemeine Hochschulreife erworben am Albert-Schweitzer-Gymnasium, Offenbach
1983-1990	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Offenbach
1981-1983	Anne-Frank-Schule (Förderstufe), Offenbach
1977-1981	Grundschule in Obertshausen und Offenbach

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber und Herrn PD Dr. Oliver Werz waren die Professoren:

Dr. Dr. E. Mutschler	Pharmakologie
Dr. W. E. Müller	Pharmakologie
Dr. G. Lambrecht	Pharmakologie
Dr. C.R. Noe	Pharmazeutische Chemie
Dr. H. Linde	Pharmazeutische Chemie
Dr. H. Hoffmann	Pharmazeutische Chemie
Dr. Th. Dingermann	Pharmazeutische Biologie
Dr. J. Kreuter	Pharmazeutische Technologie
Dr. J. B. Dressman	Pharmazeutische Technologie

10 Publikationen

A. Altmann, L. Fischer, M. Schubert-Zsilavecz, D. Steinhilber, O. Werz, (2002) „Boswellic acids activate p42^{MAPK} and p38 MAPK and stimulate Ca²⁺ mobilisation“, Biochem. Biophys. Res. Commun., 290, 185-190

A. Altmann, D. Pöckel, L. Fischer, M. Schubert-Zsilavecz, D. Steinhilber, O. Werz, (2004) „Coupling of boswellic acid-induced Ca²⁺ mobilisation and MAPK activation to lipid metabolism and peroxide formation in human leukocytes“, Br. J. Pharmacol., 141(2), 223-32

D. Pöckel, **A. Altmann**, D. Steinhilber, O. Werz et al., „Activation of human platelets by boswellic acids: signaltransduction and functional responses“ (*in progress*)

Vorträge und Konferenzteilnahmen

A. Altmann, O. Werz, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz, „Natural compounds as nonredox-inhibitors of 5-lipoxygenase“, Posterbeitrag beim „6^h European Congress of Pharmaceutical Sciences“, Budapest, September 2000

A. Altmann, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz, „Terpenes as specific nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase“, Posterbeitrag bei der „DPhG-Jahrestagung“, Münster, Oktober 2000

A. Altmann, L. Fischer, M. Schubert-Zsilavecz, D. Steinhilber, O. Werz. „Boswellic acids activate p42^{MAPK} and p38 MAPK and stimulate Ca²⁺ mobilisation in polymorphonuclear leukocytes“, Vortrag und Posterbeitrag beim „European Graduate Student Meeting“, Frankfurt, Februar 2001

A. Altmann, L. Fischer, M. Schubert-Zsilavecz, D. Steinhilber, O. Werz, „Effects of Boswellic acids on biochemical and cellular signalling pathway in leukocytes“, Vortrag bei der „DPhG-Jahrestagung“, Berlin, Oktober 2002

A. Altmann, L. Fischer, M. Schubert-Zsilavecz, D. Steinhilber, O. Werz, „Boswellic acids activate MAPK pathways, stimulate Ca²⁺ mobilisation and induce functional responses of leukocytes“, Posterbeitrag beim „European Congress of EUFEPS“, Stockholm, Oktober 2002

11 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz und Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas, für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, für ihre freundliche Aufnahme in ihre Arbeitskreise und die intensive Förderung dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die zahlreichen Möglichkeiten zur Teilnahme an Kongressen und Veranstaltungen, für die einmaligen Arbeitskreisseminare in Österreich sowie für die Möglichkeit die Sommer- und Winterschule mitzugestalten.
- PD Dr. Oliver Werz für die vorbildliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit, für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen Anregungen und die vielen Aufmunterungen zur rechten Zeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Pharmazeutische Chemie für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung bei großen und kleinen Sorgen während der Promotion, vor allem

- Kerstin Glöckl und Stefanie Schulte-Löbber für ihre Freundschaft und die vielen persönlichen Aufmunterungen
- Mario Wurglics für die unermüdliche Hilfe mit den Computern, die nicht so wollten wie ich, und für die tolle Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. Semesters
- Eva Bürkert und Dagmar Szellas für eine Vielzahl konstruktiver Gespräche, ihre Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft in allen Laborangelegenheiten an „guten und schlechten Tagen“ und Eva für das Korrekturlesen
- Daniel Pöckel für seine unschätzbare Unterstützung während der Endphase dieser Arbeit und für das schnelle und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit
- Lutz Fischer für die Unterstützung und Durchführung von Experimenten zur Arachidonsäure-Freisetzung und für viele wertvolle Diskussionen

Ein dickes Dankeschön auch an

- Jan Keller, Christian Klein, Mona Tawab, Sabine Seuter, Niko Klan, Andrea Wilke, Astrid Kaunzinger, Kirsten Menke und Hebbes, die nicht nur mein „Uni-Leben“ um einiges bereichert haben.
- meine „Studies“, die mich gerne Assistent sein ließen: Jörn, Mattes, Moritz, Jochen, Sebastian, Dieter, Alex, Leonie, Martina, Anne, Tobias, Arne, Arndt uvm.
- alle Mitglieder des Zentrallabors des Markus-Krankenhauses Frankfurt/Main für die Bereitstellung der Buffy-coats.
- PD Dr. Johann Jauch von der Technischen Universität München (Organische Chemie, Naturstoffchemie) für die Bereitstellung von Boswelliasäuren und einer Vielzahl konstruktiver Gespräche.
- meine Freunde, meine Schwester, Sascha und insbesondere an meine Eltern, die mich das ganze Studium und darüber hinaus immer unterstützt haben und jederzeit für mich da waren.