

Regulation der 5-Lipoxygenase durch Caspase-6

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe–Universität
in Frankfurt am Main

von
Irina Tretiakova
aus Kishinev

Frankfurt am Main (2006)
(DF1)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhilber
Prof. Dr. G. Schneider

Datum der Disputation: 19.02.2007

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Lipoxygenasen	1
1.2	5-Lipoxygenase	1
1.2.1	Gen- und Proteinexpression	1
1.2.2	Enzym und Regulation der 5-LO-Aktivität.....	2
1.2.3	Bildung und biologische Funktionen der Leukotriene.....	10
1.2.4	Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese.....	12
1.2.5	Hyperforin	14
1.2.6	Myrtucommulon.....	15
1.3	Caspasen und Apoptose.....	16
1.3.1	Caspasen.....	16
1.3.2	Aktivierungswege der Caspasen	19
1.3.3	Apoptose und andere Folgen der Caspasenaktivierung	22
1.3.4	Pflanzeninhaltsstoffe zur Therapie von Krebserkrankungen	24
1.4	Ziel der Arbeit	26
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	27
2.1	Zellen und Zellkultur	27
2.1.1	B-lymphozytäre Zelllinien	27
2.1.2	Weitere Zelllinien.....	27
2.2	Zellwachstum.....	28
2.2.1	Proliferationsassay	28
2.2.2	MTT-Assay	28
2.3	Bestimmung der 5-LO-Aktivität in Zellhomogenaten.....	29
2.4	SDS-PAGE und Western blot	29
2.5	Bestimmung der Caspase-Aktivität.....	31
2.6	Spaltung der 5-LO <i>in vitro</i>.....	31
2.7	Expression und Aufreinigung des 5-LO-Proteins	31

2.8	Site-directed mutagenesis	32
2.9	Subzelluläre Lokalisation der 5-LO	33
2.10	Transiente Transfektion	33
2.11	Apoptose-Bestimmung	34
2.11.1	Photometrische Apoptose-Bestimmung	34
2.11.2	DNA-Gelelektrophorese	35
2.12	Statistische Auswertungen	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Transfer von BL41-E95-A Zellen in frisches Medium	36
3.1.1	Regulation der 5-LO in passagierten B-Lymphozyten	36
3.1.2	Einfluss des Mediums auf die 5-LO-Regulation	37
3.1.3	<i>De novo</i> -Proteinsynthese	39
3.1.4	Caspasen-Aktivität	40
3.1.5	Zellproliferation	42
3.2	Untersuchungen an rekombinanter 5-LO <i>in vitro</i>	43
3.2.1	Spaltung der Wildtyp 5-LO <i>in vitro</i>	43
3.2.2	Spaltung der mutierten 5-LO-Proteine <i>in vitro</i>	44
3.2.3	Posttranslationale Modifikation (PTM) der 5-LO?	46
3.3	Subzelluläre Lokalisation der 5-LO in B-Lymphozyten	51
3.4	5-LO in weiteren Zelllinien	53
3.4.1	Transfektion von HeLa-Zellen	53
3.4.2	5-LO in MM6-, RBL-1-, PMNL-Zellen	58
3.4.3	<i>In vitro</i> -Untersuchungen mit 5-LO aus humanen Zelllinien	58
3.5	Hyperforin	63
3.5.1	Einfluss von Hyperforin auf die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen	63
3.5.2	Einfluss von Hyperforin auf Caspasen-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen	66
3.5.3	LP-131 und LP-119 zeigen Hyperforin-ähnliche Wirkungen	69
3.5.4	Einfluss von Hyperforin auf andere Zelllinien	70

3.6	Myrtucommulon.....	73
3.6.1	Einfluss von Myrtucommulon auf die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen...	73
3.6.2	Einfluss von Myrtucommulon auf Caspasen-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen.	75
3.6.3	Einfluss von Myrtucommulon auf andere Zelllinien	76
4	DISKUSSION	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
	PUBLIKATIONEN	101
	LEBENS LAUF	128
	DANKSAGUNG	130

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AK	Arbeitskreis
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
CHX	Cycloheximid
CLP	Coactosin-like protein
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	Zytosolische Phospholipase A ₂
cysLTs	Cysteinylleukotriene
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Daunorubicin
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GSH	Glutathion
H(p)ETE	Hydro(pero)xyeicosatetraensäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPG	Immobilized pH gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranopyranosid
(k)Da	(Kilo)dalton
LB	Luria-Broth Base Medium

5-LO	5-Lipoxygenase
LT	Leukotrien
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MM6	Mono Mac 6
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
NLS	Nuclear localization signal
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol
OD	Optical Density
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAF	Platelet-activating factor
PARP	Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
<i>pI</i>	Isoelektrischer Punkt
PK	Proteinkinase
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTM	Posttranslationale Modifikation
RBL-1	Rat basophilic leukemia
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STI	Sojabohnen Trypsininhibitor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
WT	Wildtyp
γ	Knockout

Einleitung

Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind Oxidoreduktasen, die den Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren katalysieren. Dabei erfolgt der Sauerstoff-Einbau stereospezifisch an einem bestimmten C-Atom, das in die cis,cis-1,4-Pentadien-Struktur der Fettsäure integriert ist [1]. Die Arachidonsäure (20:4) stellt in Säugetieren das Hauptsubstrat der Lipoxygenasen dar, wohingegen in pflanzlichen Zellen vorwiegend die Linolsäure (18:2) und die Linolensäure (18:3) von Lipoxygenasen umgesetzt werden. Zu den in Säugetieren vorkommenden Lipoxygenasen gehören die 5-LO, die 8-LO, die 12-LO und die 15-LO. Dabei erfolgt die Namensgebung der Lipoxygenasen nach der Position des C-Atoms der Arachidonsäure (AA), an dem der Einbau des Sauerstoffs erfolgt. Einige Lipoxygenasen sind dafür bekannt unterschiedliche Substrate umsetzen zu können bzw. die Oxidation nicht C-Atom-spezifisch durchzuführen. Diese Enzyme werden anhand von ihren Hauptsubstraten benannt [2, 3].

Im Jahr 1947 wurde die 15-LO als erste Lipoxidase in Sojabohnen identifiziert und isoliert [4]. Die 12-LO wurde 1974 in humanen Thrombozyten entdeckt [5], und kurz danach folgte die Entdeckung der 5-LO in polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) des Kaninchens [6]. Lipoxygenasen sind verbreitet in Tieren, Pflanzen und Pilzen, nicht aber in Bakterien oder Hefen. Heute sind 18 verschiedene Säugetier-Lipoxygenasen bekannt, wobei sie nach ihren enzymatischen Eigenschaften in vier Gruppen eingeteilt werden [7]. In humanen Zellen werden fünf Lipoxygenase-Typen unterschieden [7]. Die komplette Familie umfasst Enzyme mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa in Säugern und 94-104 kDa in Pflanzen.

5-Lipoxygenase

Gen- und Proteinexpression

Das humane 5-LO-Gen befindet sich auf dem Chromosom 10q11.2 und hat eine Länge von 82 Kilobasen (kb). Der Promoter weist eine Länge von 6,1 kb auf und die 14 Exons werden von 13 Introns unterbrochen [8]. Der 5-LO-Promoter ist reich an G und C Basen und enthält keine TATA- oder CCAAT-Sequenz. Innerhalb des 5-LO-Promoters wurden einige Konsensus-Bindungsstellen nachgewiesen, unter anderem für die Transkriptionsfaktoren

AP-2, NF- κ B, Sp1, Sp3, c-myb, Egr-1, Egr-2 [9, 10] sowie für die nukleären Rezeptoren ROR α 1 und ROR α 4 (retinoic acid receptor related orphan-receptor alpha) [11].

Die cDNA der humanen 5-Lipoxygenase kodiert für ein Protein aus 673 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 77,839 kDa [12]. Die Expression des 5-LO-Proteins erfolgt vorwiegend in Zellen myeloiden Ursprungs und kann somit in Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden [13]. T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten sind dagegen 5-LO-negativ. Einige andere Zelltypen weisen ebenfalls die Expression des 5-LO-Proteins auf, dazu zählen differenzierte humane Keratinozyten [14] sowie epidermale Langerhans-Zellen [15]. Die Expression der 5-LO findet häufig zusammen mit der Expression von FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) statt [13].

Die Differenzierung der myeloiden Zelllinien HL-60 und MM6 mit Calcitriol und TGF β führt zu einer deutlichen Induktion der mRNA-Menge, Proteinexpression und Enzymaktivität der 5-LO [16-18]. DMSO, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) oder Interleukin-3 führen ebenfalls zu einer Erhöhung der 5-LO-mRNA-Menge in einigen leukozytären Zellen [19]. Die 5-LO-Expression kann durch DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung reguliert werden. So führt die Behandlung von 5-LO-negativen Zelllinien U937 und HL-60TB mit demethylierendem Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu einer Hochregulation der Expression des 5-LO-Primärtranskriptes und der mRNA-Reifung [20]. Für die maximale Induktion der 5-LO-Genexpression durch Calcitriol und TGF β sollte der Promoter demethyliert vorliegen. Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A vermag außerdem die Aktivität des 5-LO-Promoters in MM6-Zellen zu aktivieren [21].

Enzym und Regulation der 5-LO-Aktivität

Die Kristallstruktur der 5-LO existiert im Gegensatz zu anderen Lipoxygenasen (Sojabohnen LO-1/3, Kaninchenretikulozyten 15-LO) bis heute nicht. Einige Modelle der 5-LO sind bislang entwickelt worden. Das Modell von Hemak et al. [22] basiert sowohl auf experimentellen Daten als auch auf der Struktur der Retikulozyten-15-LO des Kaninchens. Ein weiteres Modell der 5-LO entstand kürzlich im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Schneider, Institut für Organische Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main [23] (Abbildung 1).

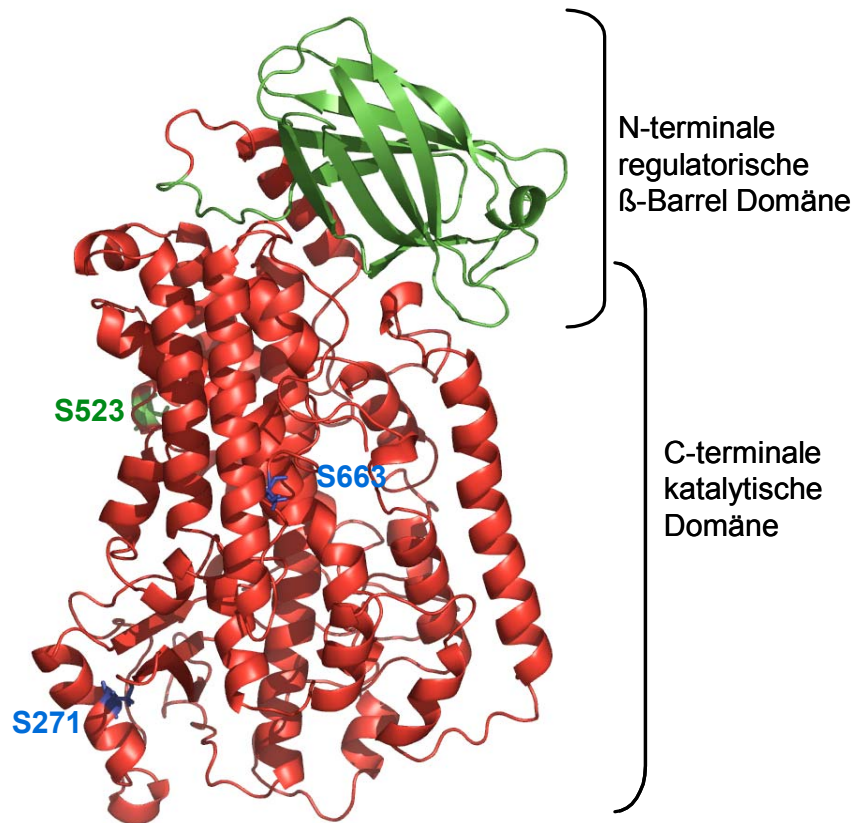


Abbildung 1: Mögliche Struktur der 5-LO, dargestellt als Modell (AK G. Schneider) mit zwei aktivierenden (blau) und einer hemmenden (grün) Phosphorylierungsstellen.

Das 5-LO-Protein enthält neben der N-terminalen β -Barrel-Domäne, bestehend aus den ersten 120 Aminosäuren, die C-terminale katalytische Domäne, welche die Aminosäuren 121-673 umfasst. Innerhalb der katalytischen Domäne enthält die 5-LO in ihrem aktiven Zentrum ein nicht Häm-gebundenes Eisenatom, das durch die Histidine His372, His550 und das terminale Isoleucin Ile673 koordiniert wird [24, 25] (Abbildung 2A). His367, Asn554 und ein Wassermolekül stellen vermutlich flexible Liganden dar [26].

Für die katalytische Umsetzung der AA durch die 5-LO ist das Eisenion von zentraler Bedeutung, da es während der Reaktion verschiedene Redoxstadien durchläuft und dabei die Funktion eines Elektronenakzeptors und -donators ausübt. Für die Aktivität der 5-LO muss das Eisenion als Fe^{3+} vorliegen. Die Lipidhydroperoxide (LOOH) in intakten Zellen wie 5-HpETE, 12-HpETE, 15-HpETE oder 13(S)-HpODE katalysieren die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , wohingegen anorganischen Hydroperoxiden wie H_2O_2 diese Fähigkeit fehlt [27, 28].

Reduktionsmittel wie Glutathion (GSH) oder Dithiothreitol (DTT) können der 5-LO-Aktivierung entgegenwirken, auch die Glutathionperoxidase reduziert den zellulären Peroxidlevel und wirkt somit der 5-LO-Aktivierung entgegen [29].

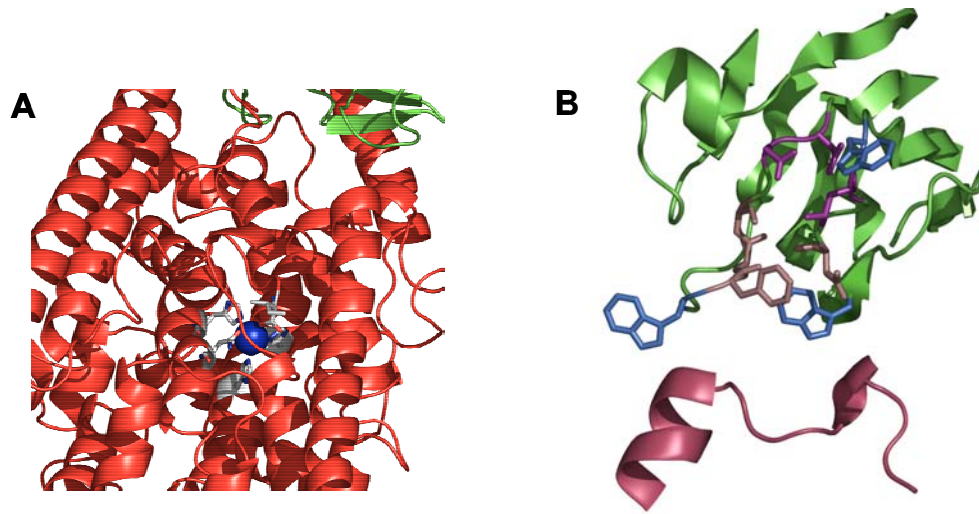


Abbildung 2: (A) Koordination des Eisenions im aktiven Zentrum der 5-LO. (B) Vermutliche Koordination der zwei Ca²⁺-Ionen nach Bindu et. al [30] sowie vermutete Membranassoziation über die Tryptophane Trp13, Trp75 und Trp102 [31] in der regulatorischen Domäne.

Die N-terminale β -Barrel-Domäne bindet Ca²⁺ [32] und vermittelt die Translokation und die Assoziation des Enzyms mit der Kernmembran [33]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bindung von Ca²⁺ an die β -Barrel-Domäne in einem stöchiometrischen Verhältnis von zwei mol Ca²⁺ zu einem mol Enzym erfolgt. Dabei sind die Aminosäuren Asn34, Asp44 und Glu46 für die Ca²⁺-Bindung verantwortlich [32, 34]. In einem theoretischen Verfahren sind außerdem kürzlich zwei Ca²⁺-Bindungsstellen identifiziert worden, wobei die eine Stelle von den Aminosäuren Phe14, Ala15, Gly16 und Asp79 und die zweite von Asp18, Asp19 und Leu76 geformt wird [30] (Abbildung 2B).

Obwohl für die Aktivität anderer Lipoxygenasen kein Ca²⁺ notwendig ist, und Ca²⁺ auch für die Aktivität der 5-LO nicht absolut essentiell ist, wird durch Ca²⁺ eine verstärkte Leukotrien-Bildung angeregt [35]. Studien belegen die Steigerung der 5-LO-Aktivität durch Ca²⁺ sowohl in intakten Zellen [36, 37] als auch in zellfreien Systemen [38, 39] und bei Untersuchungen mit gereinigtem Enzym [40]. Auch Mg²⁺ kann als ein bivalentes Kation an die 5-LO binden und diese aktivieren, allerdings weniger effizient als Ca²⁺ [30, 41]. Ca²⁺ erhöht die Hydrophobizität der 5-LO und fördert die Bindung des Enzyms an Phosphatidylcholin (PC) [42].

Außerdem fördert die Bindung von Ca^{2+} an die N-terminale β -Barrel-Domäne die Translokation der zytosolischen 5-LO zum Zellkern sowie ihre Membranbindung [31, 43, 44]. Für die 5-LO-Bindung an Membranen scheinen die Tryptophane Trp13, Trp75 und Trp102 verantwortlich zu sein, die alle in der β -Barrel-Domäne vorkommen [31] (Abbildung 2B). Studien an isolierter 5-LO haben gezeigt, dass Membranfraktionen das Enzym stabilisieren und seine Aktivität erhöhen [45-47]. Sie können in ihrer Funktion durch PC, nicht aber durch Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol ersetzt werden [35].

Die N-terminale Region des Enzyms trägt also die Funktionen einer echten C2-Domäne. C2-Domänen sind konservierte Motive innerhalb der Proteinstrukturen, die einen achtsträngigen antiparallelen β -Sandwich ausbilden und zu einer Ca^{2+} -abhängigen Membranbindung des Proteins führen [48]. Auch andere Ca^{2+} -bindende Proteine, die auch als C2-Domänen-Proteine bezeichnet werden, besitzen ähnliche Eigenschaften wie die 5-LO. Dazu gehören unter anderem die Proteinkinase C (PKC) und die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) [49, 50].

Neben den Ca^{2+} -vermittelten Effekten stellt die Phosphorylierung der 5-LO einen weiteren Weg der Enzymaktivierung dar [51]. Besondere Bedeutung kommt dabei den Kinasen aus der Familie der mitogen-activated protein kinases (MAPK) zu. Die Familie der MAPK, die eine Vielzahl verschiedener physiologischer Prozesse kontrolliert, lässt sich in vier Untergruppen einteilen: ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), JNKs (c-Jun amino-terminal kinases), p38 MAPKs und ERK5 [52]. Bezüglich der 5-LO-Phosphorylierung sind vor allem ERKs und p38 MAPK von Interesse.

Die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs) kann unter anderem durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren moduliert werden [53, 54], wobei ERKs für die Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten in unterschiedlichsten Zellkompartimenten verantwortlich sind und eine zentrale Rolle für das Überleben und die Proliferation von Zellen spielen [55]. P38 MAPK werden in Immunzellen aber auch als Antwort auf verschiedene zelluläre Stress-Stimuli, wie chemotaktische Faktoren, Hormone, Hitzeschock, zellulärer oder oxidativer Stress, aktiviert, was häufig in der Bildung proinflammatorischer Zytokine, Chemotaxis, Adhäsion und Degranulation resultieren kann [55, 56]. Somit kommt der Phosphorylierung intrazellulärer Enzyme oder Transkriptionsfaktoren durch Kinasen eine wichtige Rolle in den zellulären Aktivierungsmechanismen zu.

Die Primärsequenz der 5-LO enthält ebenfalls einige Phosphorylierungsmotive, wobei die 5-LO als Substrat für PKA, PKC, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII), S6-Kinase,

MAPKAPK-2/3 (MK2/3) und MAPK1/2 fungieren kann [57]. Die Leukotrienbiosynthese kann tatsächlich durch die Aktivierung der p38 MAPK-regulierten MAPKAPK-2 und -3 in PMNL und MM6 stimuliert werden [58], zusätzlich phosphorylieren diese Kinasen die 5-LO *in vitro* [59]. Auch in B-Lymphozyten (BL41-E95-A-Zellen) führt Zellstress in Abhängigkeit vom p38 MAPK-Signaltransduktionsweg zu einer signifikanten Erhöhung der LT-Biosynthese [60]. Mittlerweile konnte nicht nur die Aktivierung der 5-LO durch Phosphorylierung am Ser271 durch MAPKAPK-2 gezeigt werden [61], sondern auch die Phosphorylierung der 5-LO am Ser663 durch ERKs *in vitro* [62] (Abbildung 1). Darüber hinaus scheint die Phosphorylierung der 5-LO durch die PKA am Ser523 einen hemmenden Einfluss auf das Enzym auszuüben, was in der Inhibition der LT-Synthese resultiert [63] (Abbildung 1).

ATP ist ein weiterer bekannter Faktor, der die 5-LO-Aktivität zu erhöhen vermag. Dieser Effekt ist in Gegenwart von Ca^{2+} [39] oder Mg^{2+} [41], aber auch in Abwesenheit von bivalenten Kationen [64], gezeigt worden. Die 5-LO scheint über die Tryptophane Trp75 und Trp201 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 an ATP zu binden [65], eine Eigenschaft, die für die Aufreinigung des Enzyms über ATP-Affinitätschromatographie genutzt wird. Außerdem scheint die 5-LO noch eine weitere potentielle ATP-Bindungsstelle zu enthalten, die in anderen Lipoxygenasen nicht vorhanden ist [22].

Für die enzymatische Funktion der 5-LO kommt FLAP (5-Lipoxygenase aktivierendes Protein) eine zentrale Bedeutung zu. Es ist ein membranassoziiertes Protein von 18 kDa Größe, das zu der MAPEG-Familie (membrane associated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism) gehört [66]. FLAP und 5-LO werden in einigen Zellen myeloiden Ursprungs wie in PMNL, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten koexprimiert. Bei einigen anderen 5-LO-negativen Zelllinien wie T-Lymphozyten, undifferenzierten MM6- oder U937-Zellen konnte auch die FLAP-Expression festgestellt werden, was auf Unterschiede in der Genaktivierung schließen lässt [11]. Die Entdeckung von FLAP verdankt man der Beobachtung, dass die Verbindung MK886 die Leukotrienbildung zwar in intakten Zellen verhindert, nicht aber in entsprechenden Zellhomogenaten [67]. Auch wenn die genaue Funktion von FLAP noch nicht geklärt ist, so scheint es die Umwandlung der AA durch die 5-LO zu unterstützen und die Bildung von 5-HpETE und LTA_4 zu fördern [66, 68].

Die subzelluläre Lokalisation der 5-LO scheint stark zelltypabhängig zu sein. So befindet sich die 5-LO in ruhenden peripheren Neutrophilen und Monozyten, peritonealen Makrophagen (PM), differenzierten HL-60 und MM6-Zellen vorwiegend im Zytosol. In ruhenden Alveolar-Makrophagen (AM), Mäuse-Mastzellen, RBL-1-Zellen und humanen

Langerhanszellen der Haut dagegen ist die 5-LO hauptsächlich in der löslichen intranukleären Fraktion zu finden [57]. Nach der Stimulation der Zellen erfolgt die Translokation des Enzyms an die Kernmembran [69, 70], wobei die zytoplasmatische 5-LO mit dem ER und der äußeren Kernmembran assoziiert und die intranukleäre 5-LO zur inneren Kernmembran transloziert [71]. Der nukleäre Import zytosolischer 5-LO nach *in vitro*-Adhärenz von PMNL [72] sowie die nukleäre Lokalisation der 5-LO nach Transfektion einiger Zelltypen wie RAW-Makrophagen, HEK 293-, COS-, CHO- und NIH-3T3-Zellen [57] wurden ebenfalls beobachtet.

Da der nukleäre Import größerer Proteine das Vorhandensein nukleärer Lokalisationssequenzen (NLS) erfordert, ist die 5-LO diesbezüglich untersucht worden. Innerhalb der 5-LO-Struktur sind tatsächlich einige potentielle NLS postuliert worden, die unterschiedlich diskutiert werden [73-76]. Das Zusammenspiel mehrerer NLS scheint für die Feinregulation und die präzisere Kontrolle des nukleären Importes der 5-LO zuständig zu sein [77], wobei unterschiedliche Level des 5-LO-Importes in unterschiedlichen Mengen der gebildeten Leukotriene resultieren [71].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass verschiedene Stimuli zu unterschiedlichen Mengen an 5-LO-Metaboliten führen können. Die Stimulation der Zellen mit Ca^{2+} -mobilisierenden Agentien (Ca^{2+} -Ionophor, Thapsigargin, Ionomycin, LTB_4 , fMLP, Zytokinen), AA oder Zellstress (osmotischer Schock, chemischer Stress durch Natriumarsenit, UV-Licht, Hitzeschock) resultiert in einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [78], welches direkt an die 5-LO binden kann, und/oder Phosphorylierung der 5-LO durch MAPK (Abbildung 3). Auf diese Weise kommt es zur Aktivierung der 5-LO und zur anschließenden Translokation an die Kernmembran [44, 69]. Gleichzeitig erfolgt die Rekrutierung der zytosolischen PLA_2 , die für die Bereitstellung von AA bei der Leukotrienbiosynthese von zentraler Bedeutung ist [79, 80]. Dabei kann die cPLA_2 ebenfalls durch Ca^{2+} und/oder Phosphorylierung an Ser550 durch MAPK aktiviert werden [81], worauf das Enzym mit der Translokation zur Kernmembran beginnt, um dort die AA-Freisetzung aufzunehmen [82]. Die freigesetzte AA kann anschließend mittels FLAP der 5-LO für die Umwandlung in Leukotriene zur Verfügung gestellt werden.

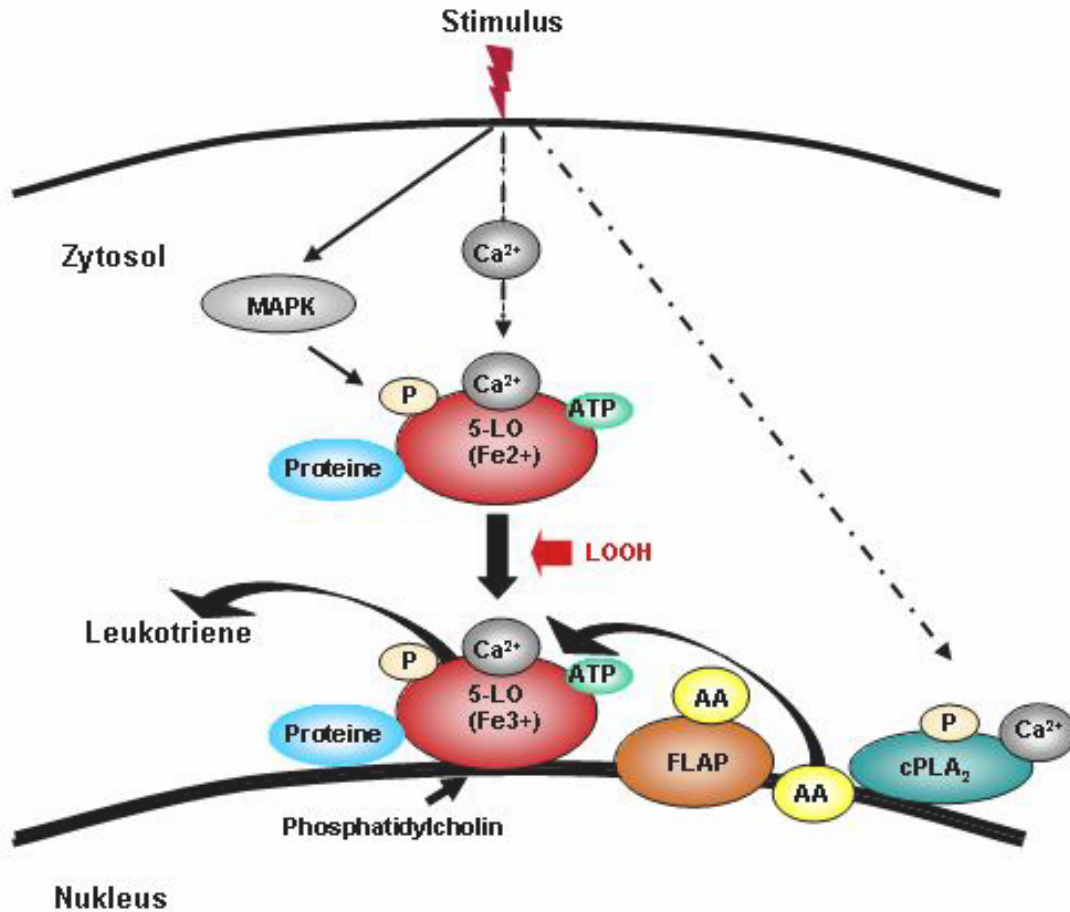


Abbildung 3: Regulation der zellulären 5-LO-Aktivität in der Leukotrienbiosynthese.

Nach neueren Erkenntnissen scheint allerdings die subzelluläre 5-LO-Verteilung ein dynamischer Prozess und eine vorübergehende nukleäre Lokalisation charakteristisch für die 5-LO zu sein [83]. Die Kernmembran wurde dabei als Ort der Leukotrienbiosynthese beschrieben [84] und eine Korrelation zwischen erhöhter 5-LO-Menge innerhalb des Zellkerns und der Steigerung der LT-Produktion beobachtet [85, 86]. Die oben beschriebenen Signalwege haben möglicherweise nicht nur einen Effekt auf die enzymatische Aktivität der 5-LO, sondern sie regulieren auch die Möglichkeit des nukleären Importes/Exportes des Enzyms [85], wie beispielsweise die Phosphorylierung der 5-LO durch die PKA, die den nukleären Import verhindert [87].

Obwohl eine ganze Reihe verschiedener Proteine mit der 5-LO zu interagieren scheint, ist bis heute nur die Bindung einiger weniger Proteine an das Enzym tatsächlich gezeigt worden. Drei dieser Proteine sind im Yeast Two-Hybrid System unter Verwendung humaner cDNA aus Lungengewebe detektiert worden. Dazu gehört zum Einen das Coactosin like protein (CLP), ein Coactosin-ähnliches, F-Aktin-bindendes Protein von 17 kDa Größe aus *Dictyostelium discooidium* [88]. Das CLP bindet an die 5-LO in einem stöchiometrischen

Verhältnis von 1:1, wobei diese Bindung Ca^{2+} -unabhängig aber pH-Wert-abhängig ist, und Lys131 des CLP an der 5-LO-Bindung beteiligt ist [89]. Die Bindung des CLP scheint in der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO zu erfolgen, wobei wiederum die Beteiligung der Tryptophane Trp13, Trp75 und Trp102 an dieser Bindung angenommen wird [303]. Obwohl bisher kein F-Aktin/CLP/5-LO-Komplex detektiert wurde, konnte eine Konkurrenz zwischen F-Aktin und 5-LO um die Bindung am CLP nachgewiesen werden [89].

Ein weiteres Protein, welchem durch den Befund im Yeast Two-Hybrid Verfahren die 5-LO-Bindung zugesprochen wird, ist Dicer, auch als Ribonuklease (Rnase) III bezeichnet [88]. Dicer prozessiert lange doppelsträngige RNA in kürzere siRNA-Fragmente (small interference RNAs), die nachträglich die Spaltung homologer mRNA durch RISC (RNA-induced silencing complex) regulieren [90]. Bis jetzt ist keine funktionelle Verbindung zwischen Dicer und 5-LO gezeigt worden.

Die 5-LO-Bindung an den C-Terminus von TRAP-1 (TGF β receptor-I-associated protein-1) ist ebenfalls durch das Yeast Two-Hybrid System gezeigt worden [88]. Diese Bindung erscheint nachvollziehbar, da durch TGF β und Calcitriol die 5-LO-Expression und -Aktivität in beispielsweise HL-60-Zellen stimuliert werden können [17].

Isolierte aufgereinigte 5-LO besitzt außerdem die Fähigkeit über die kurze Prolin-reiche Region (Aminosäuren 566-577), die als Bindungsmotiv für SH3-Domänen (Src homology 3) fungieren kann, an das GST-Grb2-Fusionsprotein zu binden [91]. Da Grb2 (growth factor bound receptor protein 2) an dem Tyrosinkinase-vermittelten Signal-transduktionsweg beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch die 5-LO in diesen zellulären Signalweg involviert ist.

Interessanterweise ist es bis heute nicht gelungen, eine direkte Bindung zwischen der 5-LO und FLAP zu detektieren, obwohl FLAP in seiner Funktion häufig als 5-LO-Anker zu fungieren scheint.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die 5-LO-Aktivität in PMNL durch Zugabe von 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) erhöht werden kann, was in einer bis zu 40-fach höheren Leukotrienproduktion durch die 5-LO resultiert [92]. Dieser Effekt basiert weder auf der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration noch auf der Phosphorylierung der 5-LO durch MAPK, vielmehr scheint die 5-LO-Aktivierung durch direkte Bindung von OAG an die N-terminale β -Barrel-Domäne des Enzyms zu erfolgen [93].

Bildung und biologische Funktionen der Leukotriene

Die 5-LO katalysiert die ersten beiden Schritte bei der Entstehung der Leukotriene aus Arachidonsäure (Abbildung 4). Dabei erfolgt während der Oxygenase-Reaktion die stereospezifische Abstraktion des pro-S Wasserstoffatoms am C₇ der AA, gefolgt von der Insertion des molekularen Sauerstoffs am C₅ und der Entstehung der (5(S)-Hydroperoxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraensäure (5(S)-HpETE) [94]. Die 5-HpETE kann einerseits zum korrespondierenden Alkohol 5-HETE reduziert werden, andererseits sorgt die LTA₄-Synthase-Aktivität der 5-LO für die Umwandlung der 5-HpETE zu dem instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) durch die Abstraktion des pro-R Wasserstoffatoms am C₁₀ und den Allylshift des Radikals zum C₆ [95, 96]. Das LTA₄ kann nun je nach Enzymausstattung der Zelle zum Leukotrien B₄ (5(S),12(R)-Dihydroxy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eicosatetraensäure, LTB₄) hydrolysiert werden oder durch Konjugation mit Glutathion zum Cysteinylleukotrien C₄ (5S-Hydroxy-6R-glutathionyl-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraensäure, LTC₄) umgesetzt werden [97]. Das LTC₄ kann weiterhin zu den beiden Cysteinylleukotrienen D₄ (5S-Hydroxy-6R-cysteinylglycyl-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraen-säure, LTD₄) und E₄ (LTE₄) metabolisiert werden (Abbildung 4).

Leukotriene sind potente biologische Mediatoren, die eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen und Reaktionen des Immunsystems spielen [98]. LTB₄ besitzt ausgeprägte chemotaktische und chemokinetische Eigenschaften, was zur Einwanderung und Aktivierung der Granulozyten mit Anhaftung dieser an Gefäßwände [99], Degranulation und Freisetzung von Superoxid und lysosomalen Enzymen führt [100]. LTB₄ verstärkt die Phagozytose von Neutrophilen und Makrophagen [101, 102], stimuliert in Lymphozyten die Sekretion von IgE, IgG und IgM [103, 104] und scheint an der erhöhten Interleukinproduktion beteiligt zu sein [105].

Eine Vielzahl pathophysiologischer Funktionen ist auch für Cysteinylleukotriene (CysLTs) beschrieben worden. Bis 1979 die einzelnen CysLTs als LTC₄, D₄ und E₄ identifiziert wurden [106], sind sie zunächst unter der Bezeichnung der slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) bekannt gewesen. CysLTs bewirken die Kontraktion der glatten Muskulatur [107] und die Schleimsekretion in der Lunge [108], die Vasokonstriktion und die mikrovaskuläre Plasmaexsudation [99] und sind für die Rekrutierung von Eosinophilen verantwortlich [109]. Die CysLTs spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale [110].

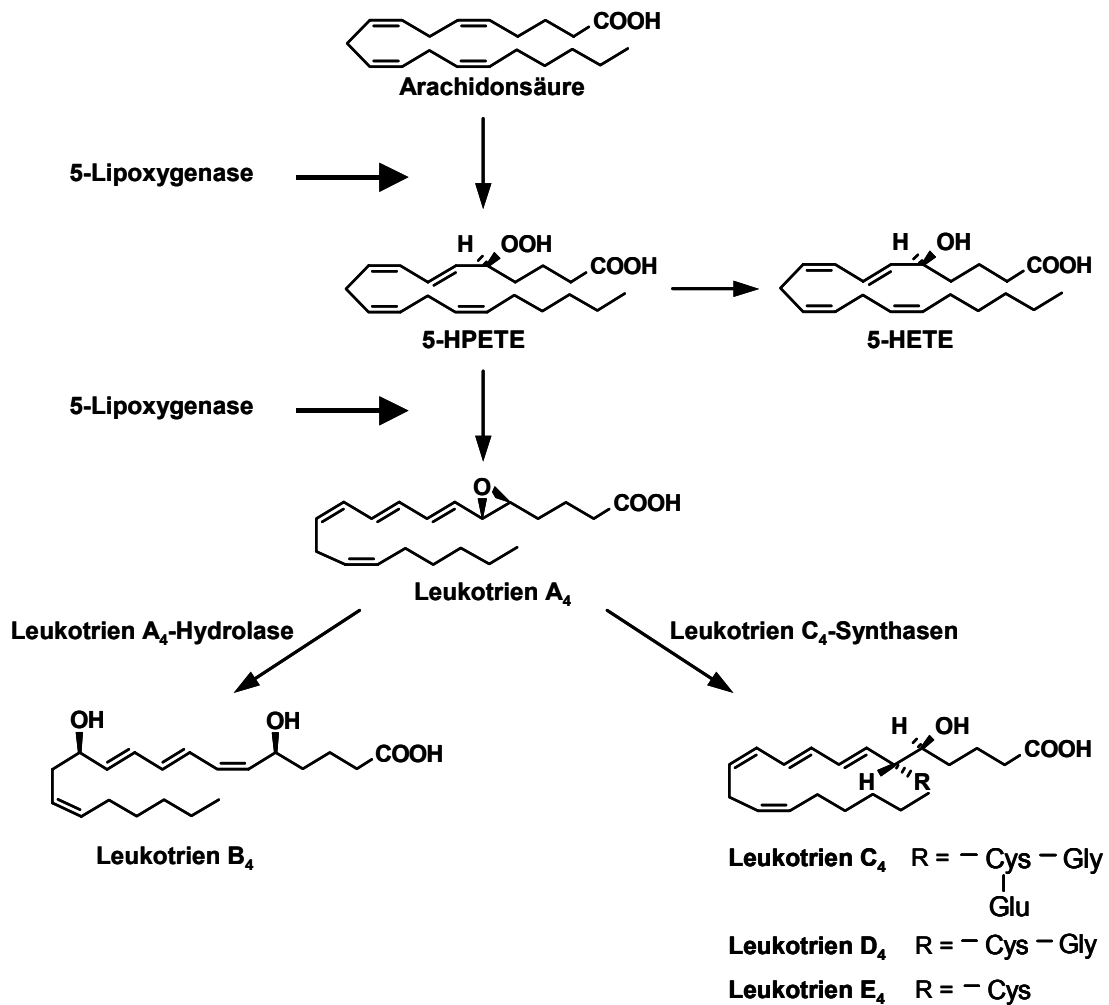


Abbildung 4: 5-LO-Stoffwechsel.

Wichtige Erkenntnisse über die physiologische und pathophysiologische Rolle der 5-LO und LTs lieferten Experimente mit 5-LO-knockout-Mäusen (5-LO^{-/-}) [111, 112]. Die 5-LO^{-/-}-Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Entwicklung, praktisch keine phänotypischen Veränderungen und eine normale Lebenserwartung verglichen mit WT-Mäusen [113]. Die 5-LO^{-/-}-Mäuse zeigten außerdem geringere Anzeichen einer Entzündung bei AA-induzierten Ohrenödemen oder der Zymosan-induzierten Peritonitis [113], eine signifikante Resistenz bezüglich PAF-induzierten Schock-Zuständen [113] sowie eine deutlich geringere Hyperreaktivität und Reduktion der Eosinophilen-Anzahl bei allergischen Entzündungen der Atemwege [114]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Mäuse, die keine 5-LO exprimieren und somit keine Leukotriene synthetisieren können, einen höheren Schutz gegenüber bakteriellen Infektionen und Lungenfibrose besitzen als WT-Mäuse [115].

Die 5-LO-Metabolite sind nicht nur in viele allergische [116, 117] und entzündliche Erkrankungen [118, 119] involviert, sie sind auch an der Entstehung atherosklerotischer Plaques [120], Osteoporose und einiger Krebsarten [121, 122] beteiligt (Abbildung 5). Die 5-LO stellt daher eine Zielstruktur für die Entwicklung von Medikamenten gegen diese Krankheiten dar.

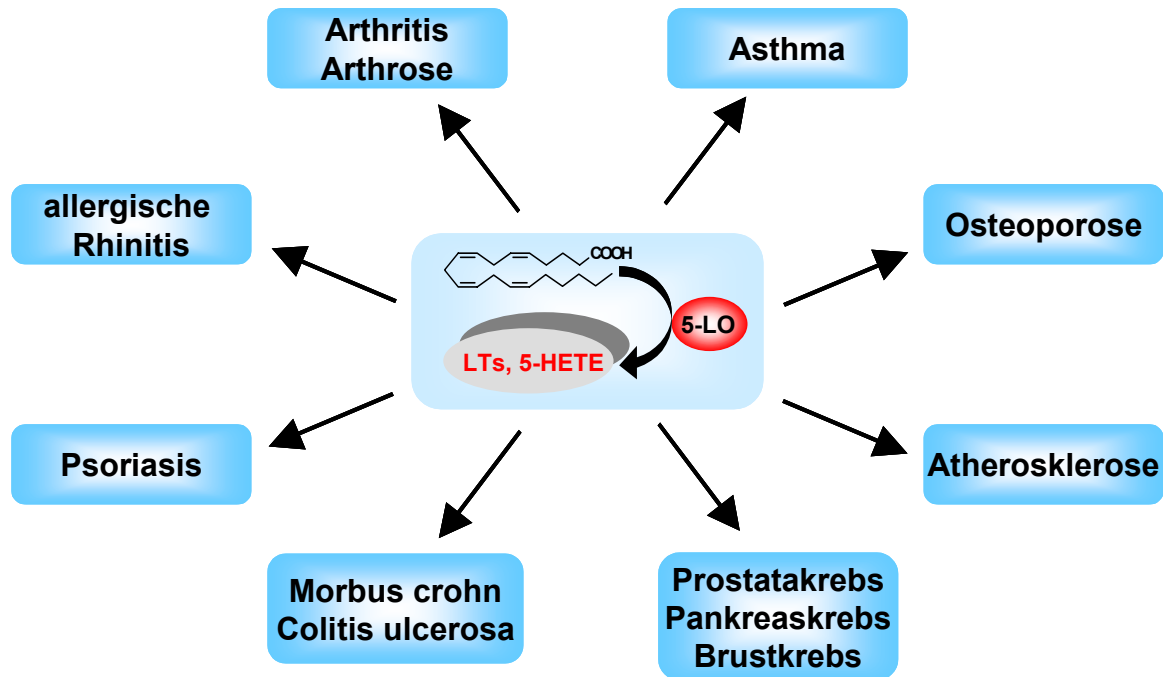


Abbildung 5: Indikationen für Anti-Leukotrien-Therapie.

Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese

Hinsichtlich der pathophysiologischen Eigenschaften der Leukotriene, ist die Anti-LT-Therapie ein sinnvoller und wichtiger Ansatz zur Behandlung einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen, aber auch für die Behandlung von Atherosklerose, Osteoarthritis und Krebs (Abbildung 5). Es existieren zwei verschiedene Möglichkeiten der Anti-LT-Therapie: die Hemmung der Leukotrien-Bildung und die Hemmung der Leukotrien-Wirkung an spezifischen Rezeptoren. In den letzten Jahren haben sich LT-Rezeptor-Antagonisten wie Montelukast (Singulair®) und seine Derivate in der Therapie des Asthma bronchiale bewährt [123].

Die Leukotrienbiosynthese lässt sich durch die Hemmung der AA-Bereitstellung oder durch den Einsatz direkter 5-LO- oder FLAP-Inhibitoren supprimieren.

Die Hemmung der cPLA₂ führt zu fehlender AA-Freisetzung für die LT-Produktion. Durch Glucocorticoide lässt sich zwar die PLA₂-Expression hemmen, doch haben sich hohe Dosen der Glucocorticoide als ineffektiv bei der Hemmung der LT-Biosynthese erwiesen [110].

Direkte 5-LO-Inhibitoren lassen sich in redoxaktive, Eisenligand- und nicht redoxaktive Inhibitoren einteilen.

Redoxaktive Verbindungen wie Phenole, Flavonoide oder Cumarine intervenieren in den katalytischen Zyklus der 5-LO durch die Reduktion des Eisenions im aktiven Zentrum des Enzyms. Die fehlende Selektivität dieser Substanzen führt allerdings zu vielen unerwünschten Wirkungen, wie beispielsweise Methämoglobinbildung [124]. Die Entwicklung potenter, oral aktiver Inhibitoren wie BW755C oder AA-861 führte ebenfalls aufgrund des Nebenwirkungspotentials nicht zu einem marktreifen Produkt [3].

Zu den Eisenligand-Inhibitoren der 5-LO gehören Derivate der Hydroxamsäure und des N-Hydroxyharnstoffs. Die Weiterentwicklung auf der Basis des potenten 5-LO-Inhibitors BWA4C wurde aufgrund auftretender toxischer NO-Radikale nicht weiter verfolgt [125]. Zileuton (Zyflo[®], Abbott) war der einzige auf dem Markt befindliche direkte 5-LO-Inhibitor, der in den USA bis Juni 2003 zur Therapie von Asthma bronchiale zugelassen war [126, 127]. Eine signifikante Verbesserung in der Therapie allergischer Rhinitis, rheumatoider Arthritis [128] und Colitis ulcerosa [129] konnte auch bei Zileuton-Gabe nicht festgestellt werden.

Die niedrige Selektivität und schlechte Bioverfügbarkeit der redoxaktiven und Eisenligand-Inhibitoren führten zur Entwicklung der nicht redoxaktiven 5-LO-Inhibitoren. Die meisten Verbindungen dieser Gruppe enthalten eine Methoxyalkylthiazol- oder Methoxytetrahydropyran-Teilstruktur. Der angenommene Wirkmechanismus dieser Verbindungen basiert auf der kompetitiven Verdrängung der AA durch stereospezifische Bindung an die 5-LO [130]. ZD2138 und ZM230487 scheinen allerdings bei akuten, nicht aber bei chronischen entzündlichen Erkrankungen effektiv zu sein [131]. Diese Verbindungen zeigen nichtkompetitive Eigenschaften bei geringem zellulärem Hydroperoxidlevel und erniedrigte inhibitorische Potenz bei erhöhtem Peroxidtonus [132]. Die hohen Peroxidspiegel am Entzündungsort bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen sind möglicherweise für die niedrige Effizienz dieser Substanzen *in vivo* verantwortlich.

Über die inhibitorische Potenz hinsichtlich der Leukotrienbildung von einigen pflanzlichen Verbindungen ist ebenfalls berichtet worden. So vermögen die 11-Keto-β-boswelliasäure (KBA) und ihr Acetylderivat 3-O-acetyl-11-keto-β-boswelliasäure (AKBA) als Bestandteile des Gummiharzes von *Boswellia serrata* (Weihrauch) die 5-LO zu hemmen [133, 134]. Außerdem sind Hyperforin, der Hauptinhaltsstoff in Extrakten aus *Hypericum perforatum*

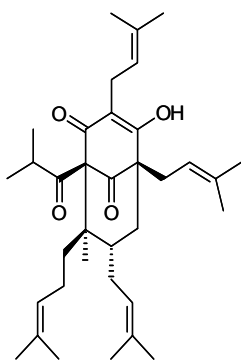
(Johanniskraut), und Myrtucommulon, ein Acylphloroglycinol in den Blättern von *Myrtus communis* (Myrthe), als duale Inhibitoren der 5-LO und COX-1 identifiziert worden [135, 136]. Da beide Enzyme eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher und allergischer Erkrankungen spielen, lässt sich die Wirksamkeit dieser Pflanzenextrakte in der traditionellen Anwendung bei solchen Erkrankungen erklären.

Kürzlich sind Cholesterolsulfat (CS), ein in hoher Menge im menschlichen Blut vorkommendes sulfatiertes Sterol, und das synthetische anionische Lipid Cholesterolphosphat (CP), als LT-Synthese-Inhibitoren in PMNL und MM6-Zellen identifiziert worden [137].

Die Entwicklung von FLAP-Inhibitoren lieferte eine weitere Möglichkeit der LT-Synthese-Hemmung. MK886, MK0591 und Bay X1005 sind wichtige Vertreter dieser Inhibitoren-Gruppe. Obwohl diese Inhibitoren die Hemmung der LT-Biosynthese in isolierten Neutrophilen zeigen, ist ihre inhibitorische Potenz im Vollblut stark eingeschränkt. Diese Befunde lassen sich möglicherweise durch die hohe Affinität von FLAP-Inhibitoren zu Plasmaproteinen und/oder Konkurrenz von FLAP und AA erklären [11].

Hyperforin

Hyperforin, ein Acylphloroglycinol-Analogon, stellt den lipophilen Hauptinhaltsstoff des Johanniskrautextraktes dar. Hypericin und Pseudohypericin, die Flavonoide Hyperosid und



Hyperforin-Strukturformel

Quercetin sowie Biflavonoide und Gerbstoffe zählen ebenfalls zu den Inhaltsstoffen des Johanniskrautextraktes. Johanniskrautpräparate finden traditionell Anwendung bei der Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen [138], wobei die antidepressive Wirksamkeit der Johanniskrautextrakte mittlerweile in zahlreichen placebokontrollierten klinischen Studien belegt wurde [139, 140]. In der Volksmedizin wird Johanniskraut zur

Behandlung von Asthma, rheumatoider Arthritis, entzündlichen Hauterkrankungen und Verbrennungen angewendet. Hyperforin-haltige Salben oder Cremes finden Einsatz zur Behandlung und Nachbehandlung von scharfen und stumpfen Verletzungen, Myalgien und Verbrennungen 1. Grades sowie bei atopischer Dermatitis [141, 142]. Es wurde aber auch über Anwendungen des Johanniskrauts bei Gallenerkrankungen, Gastritis und Bronchitis [143] sowie über die antibakterielle Wirkung des Hyperforins gegen gram-positive Bakterien [144] berichtet.

Neuere Studien haben Hyperforin als dualen Inhibitor der 5-LO und der COX-1 charakterisiert [135, 145]. Die Hemmung der 5-LO konnte dabei sowohl im zellulären System (PMNL) als auch an isoliertem Enzym gezeigt werden, und konnte auf direkte Bindung des

Hyperforins an die 5-LO zurückgeführt werden [146]. Bei der selektiven COX-1-Hemmung in stimulierten Thrombozyten erwies sich Hyperforin potenter als Acetylsalicylsäure [135]. Hyperforin wird auch als ein potentielleres Krebstherapeutikum diskutiert [147], da es die Fähigkeit besitzt in einigen Krebszelllinien Apoptose durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade auszulösen [148, 149]. Die proapoptotische Wirkung des Hyperforins an isolierten Leukämiezellen konnte auch *ex vivo* gezeigt werden [150].

Myrtucommulon

Myrtucommulon (MC) und Semimyrtucommulon (S-MC) aus *Myrtus communis* sind als zwei weitere duale Inhibitoren der 5-LO und der COX-1 beschrieben worden, wobei die Suppression der LT-Biosynthese auf direkte Inhibition der 5-LO und der COX-1 *in vitro* und *in vivo* zurückgeführt werden kann [151]. Diese oligomeren, nicht prenylierten Acylphloroglycinol-Derivate mit dem Isobutyrophenon-Kern (IBP-C) als Grundgerüst [152] (Abbildung 6) sind bislang nur in Myrte (*Myrtus communis* L.) nachgewiesen worden (0,12% Myrtucommulon in getrockneten Myrteblättern). Sie scheinen für die antioxidativen [153-155] und antibakteriellen [156, 157] Eigenschaften der Myrthezubereitungen verantwortlich zu sein.

Myrthe findet Einsatz nicht nur als Küchengewürz und zur Herstellung von Likören, sondern wird volksmedizinisch unter anderem zur Behandlung von Diabetes mellitus oder als Antiseptikum verwendet. Für Myrtheextrakte sind außerdem antihyperglykämische [158-160] und analgetische [161] Eigenschaften beschrieben worden.

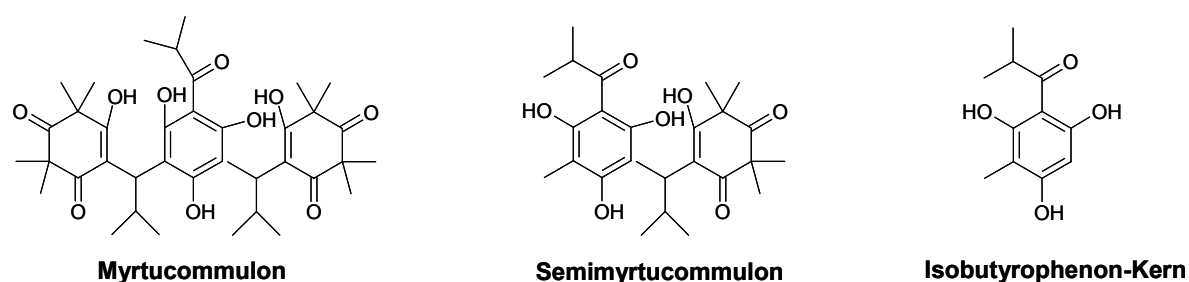


Abbildung 6: Strukturformeln von Myrtucommulon (MC) und Semimyrtucommulon (S-MC) mit dem Isobutyrophenon-Kern (IBP-C) als Grundgerüst in beiden Verbindungen.

Caspasen und Apoptose

Apoptose, oder programmierter Zelltod, ist ein zellautonomer, physiologisch essentieller Prozess, der eine wichtige Rolle in der Gewebeentwicklung und -Homöostase spielt und eine ausgeklügelte Maschinerie für die Zellzerstörung als Antwort auf physiologische, pathogene oder zytotoxische Stimuli besitzt [162]. Als 1972 dieses Phänomen identifiziert wurde, prägten Kerr et al. den Begriff Apoptose [163], der diesen Prozess von einer anderen, weitverbreiteten Art des Zelltodes, der Nekrose, unterscheiden sollte. Eine zentrale Bedeutung bei der Induktion, Transduktion und Amplifikation intrazellulärer apoptotischer Signale kommt dabei einem proteolytischen System zu, in das eine Proteasen-Familie, die Caspasen, involviert ist [164, 165].

Caspasen

Caspasen (**C**ystein-**A**spartasen) sind aspartatspezifische Cysteinylnproteasen [166], die biologische Prozesse mittels spezifischer Proteolyse kontrollieren. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Ablauf apoptotischer Vorgänge, sind aber auch an der Regulation von anderen zellulären Prozessen, wie beispielsweise Zelldifferenzierung und -Proliferation, Rezeptorinternalisation, entzündlichen Prozessen, beteiligt [167].

Caspasen sind Proteasen der Interleukin-1 β -converting enzyme Familie. Ihre Beteiligung an apoptotischen Vorgängen ist seit der Entdeckung bekannt, dass CED-3, ein für den Zelltod im Nematoden *Caenorhabditis elegans* verantwortliches Protein, mit dem Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE oder Caspase-1) der Säugetiere verwandt ist [168, 169].

Innerhalb der Caspasen werden große Ähnlichkeiten im Bezug auf Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität beobachtet [164]. Caspasen werden als latente Zymogene synthetisiert (30 bis 50 kDa), die aus drei Domänen bestehen: der N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) [170, 171] (Abbildung 7, Darstellung links). Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch (a) die Abspaltung der Prodomäne, (b) die proteolytische Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten und (c) die anschließende Assoziation der kleinen und der großen Untereinheit zu einem Heterodimer [172]. Anschließend formen zwei solche Heterodimere ein Tetramer mit zwei katalytischen Zentren an gegenüberliegenden Seiten des Enzyms [173, 174] (Abbildung 7, Darstellung links).

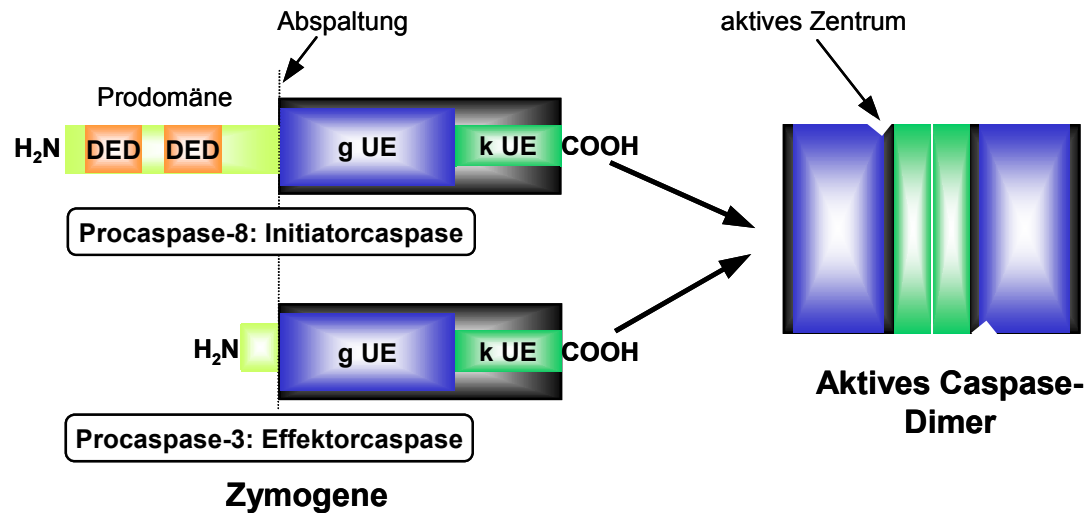


Abbildung 7: Darstellung der Zymogene der Caspase-8 (Initiatorcaspase) und -3 (Effektorcaspase) bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne (gelb), einer großen Untereinheit (g UE, blau) und einer kleinen Untereinheit (k UE, grün). Die Prodomäne der Caspase-8 enthält zwei Todeseffektordomänen (DED, Death Effector Domain). Das heterotetramere Enzym (rechts) entsteht durch proteolytische Spaltung (Abbildung nach Earnshaw et al., 1999 [171]).

Im aktiven Zentrum aller Caspasen befindet sich das konservierte Motiv QACXG, wobei X für die Aminosäure R, Q oder D steht [175]. Sämtliche Spaltungen erfolgen an und durch Caspasen auf der Carboxylseite des Aspartatrestes. Eine solche Spezifität ist nur bei Proteasen der Caspasen-Familie und bei Granzym B, einer von den zytotoxischen T-Zellen exprimierten Serinprotease, bekannt [171].

Die Prodomänen der Caspasen können stark in ihrer Länge variieren (23-219 Aminosäuren). Caspasen mit einer langen Prodomäne sind oft in die Initiation apoptotischer Vorgänge involviert und werden folglich als Initiatorcaspasen bezeichnet [176]. Caspasen mit einer kurzen Prodomäne werden unmittelbar durch die Initiatorcaspasen aktiviert und sind innerhalb der Caspasen-Kaskade hierarchisch untergeordnet („downstream“ Caspasen) [177]. Sie werden auch unter dem Namen Effektorcaspasen gesammelt betrachtet [171].

Innerhalb der langen Prodomänen sind zwei verwandte Motive identifiziert worden. Die death effector domain (DED) der Caspase-8 (Abbildung 7) und der Caspase-10 scheint für die Interaktion mit Signaladapterproteinen wie MORT1/FADD [178, 179] und TRADD [180] verantwortlich zu sein. Die caspase recruitment domain (CARD) der Caspase-1, -2, -4 und -9 vermittelt Interaktionen sowohl zwischen den Caspasen untereinander als auch mit einer Reihe regulatorischer und Adapter-Proteine. Die kurzen Domänen effektorischer Caspasen scheinen nicht an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein. Basierend auf der

Homologie der Aminosäuren-Sequenzen lassen sich die 14 bisher identifizierten Caspasen in drei Unterfamilien einteilen (Tabelle 1) [175, 181].

Caspase	Andere Namen	Physiologische Rolle	Unterfamilie
Caspase-2	ICH-I _L , NEDD-2	Apoptose-Initiator	I
Caspase-8	MCH-5, MACH, FLICE		
Caspase-9	MCH-6, ICE-LAP6		
Caspase-10	MCH-4, FLICE-2		
Caspase-3	CPP32, Apopain, Yama	Apoptose-Effektor	II
Caspase-6	MCH-2		
Caspase-7	MCH-3, ICE-LAP3, CMH-1		
Caspase-1	ICE	Entzündungsmediator	III
Caspase-4	ICH-3, TX, ICE _{rel} II		
Caspase-5	ICH-3, TY, ICE _{rel} III		
Caspase-11			
Caspase-12			
Caspase-13	ERICE		
Caspase-14	MICE		

Tabelle 1: Einteilung der Caspasen in drei Unterfamilien nach der Homologie der Aminosäuren-Sequenz.

Alternativ können Caspasen anhand der Erkennungssequenzen innerhalb der Caspasen-Substrate eingeteilt werden. Alle Caspasen-Substrate enthalten ein Tetrapeptid (mit Aminosäuren in Positionen P₁-P₄) als Erkennungssequenz, wobei die Substratspaltung nach dem Aspartat (in Position P₁) erfolgt [164]. Demnach sind alle Bereiche innerhalb der Caspasen-Primärsequenzen, die an der Katalyse und der Erkennung des P₁ Asp beteiligt sind, hoch konserviert. Dagegen sind die Bereiche, die für die Bindung der Aminosäure in Position P₄ des Caspasen-Substrates verantwortlich sind, stark variabel. Daher stellen diese Bereiche Schlüsseldeterminanten für die Substratpräferenz dar [164, 182].

Unter Zuhilfenahme der PS-SCL (positional scanning synthetic combinatorial library) sind für neun Caspasen die optimalen Erkennungssequenzen ermittelt worden [183, 184]. Dabei ist bestätigt worden, dass die drei Aminosäuren der Erkennungssequenz in Positionen P₂-P₄ für die Substratspezifität der jeweiligen Caspase von Bedeutung sind. Die Aminosäure in P₄ stellt die wichtigste Position dar, in P₂ dagegen werden in der Regel viele verschiedene Aminosäurereste toleriert [183]. Die in Tabelle 2 vorgenommene Einteilung der Caspasen

erfolgt nach der Substratpräferenz in Position P₄ [164, 183]. Enzyme der Gruppe I erkennen in P₄ massive hydrophobe Reste, Enzyme der Gruppe II tolerieren ausschließlich ein Aspartat in P₄, während Gruppe III-Enzyme verzweigtkettige aliphatische Aminosäuren an dieser Stelle präferieren [164, 183].

Caspase	P ₄ -P ₁ -Spezifität	Konsensus-Motiv	Gruppe
Caspase-1	WEHD	WEHD	I
Caspase-4	(W/L)EHD		
Caspase-5	(W/L)EHD		
<i>C. elegans</i> CED-3	DETD	DExD	II
Caspase-3	DEVD		
Caspase-7	DEVD		
Caspase-2	DEHD		
Caspase-6	VEHD	(IVL)ExD	III
Caspase-8	LETD		
Caspase-9	LEHD		
Granzym B	IEPD		

Tabelle 2: Einteilung der Caspasen nach ihrer Substratspezifität, basierend auf der Aminosäurepräferenz in P₄. X steht für eine beliebige Aminosäure [164, 183].

Aktivierungswege der Caspasen

Man unterscheidet zwei klassische Aktivierungswege für Proteasen der Caspasen-Familie: den „extrinsischen“, über die Todesrezeptoren (death receptors) vermittelten Signaltransduktionsweg, und den „intrinsischen“, rezeptorunabhängigen, mitochondrialen Signalweg [175, 176]. Dabei kann keine strenge Trennung der beiden Aktivierungswege vorgenommen werden, da sie über eine Vielzahl von Quervernetzungen in ständiger „Kommunikation“ miteinander stehen [185, 186].

Der extrinsische, Todesrezeptor-vermittelte Signalweg wird über die Bindung extrazellulärer Todesliganden (death ligands), wie Fas-Ligand (FasL), an membranständige Todesrezeptoren (death receptors) ausgelöst [187]. Diese Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR), von denen TNFR und Fas am besten charakterisiert sind [186], und besitzen in ihren zytoplasmatischen Regionen die sogenannten Todesdomänen (death domain, DD) [188]. Die Bindung der Rezeptoren an korrespondierende DD-enhaltende Liganden führt zur Bildung von Oligomeren und/oder

Konformationsänderung der Rezeptoren. Anschließend werden Adapterproteinen FADD (Fas-associated death domain) oder TNFADD (TNF receptor-associated death domain) sowie die Initiatorprocaspase-8 und/oder -10 rekrutiert, wodurch es zur Entstehung von DISC (death inducing signalling complex) kommt [189, 190]. DISC führt letztendlich zur Prozessierung und Aktivierung der Procaspase-8, die ihrerseits für die Aktivierung der Caspase-3 und -7 sorgt [191] (Abbildung 8).

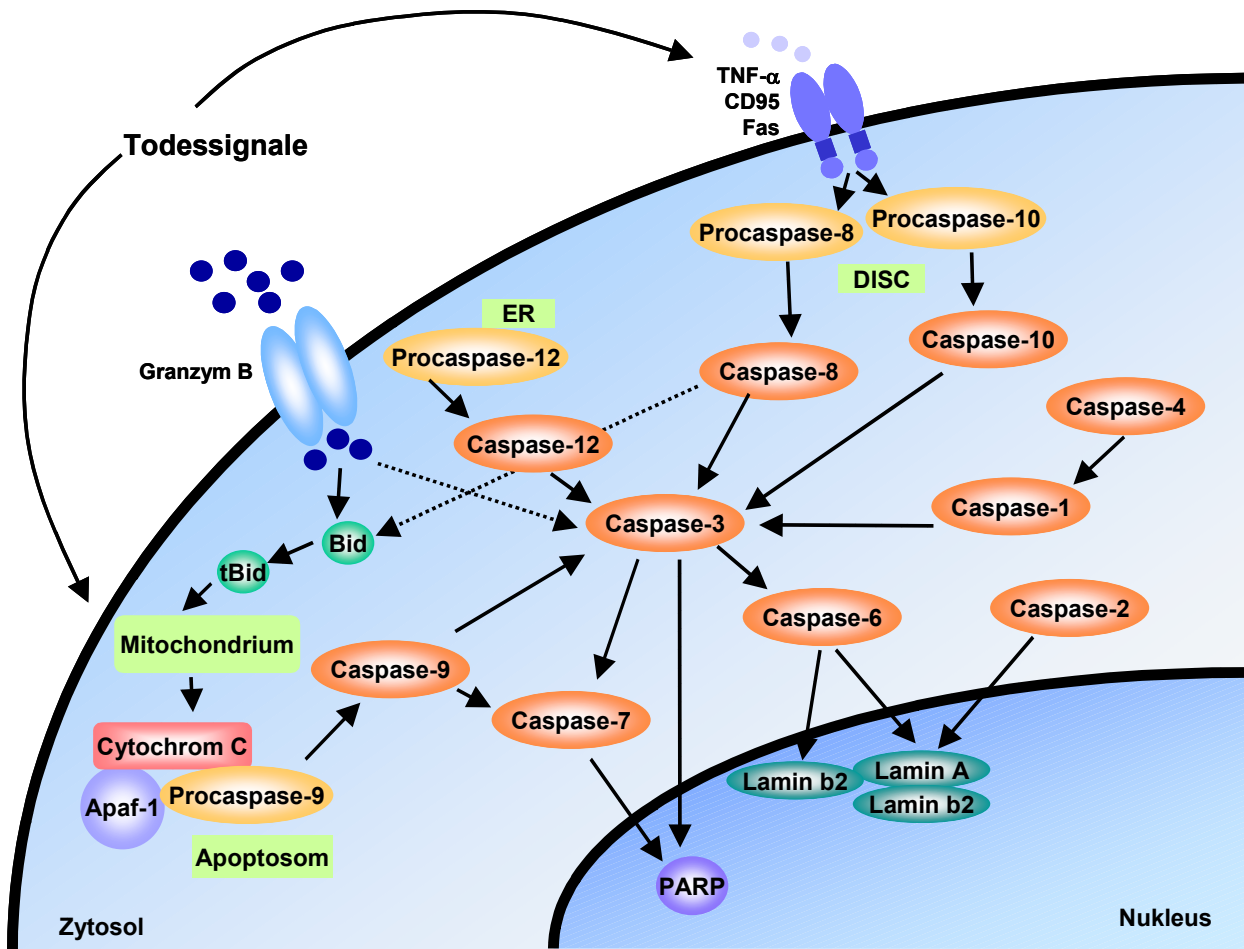


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Caspasen-Aktivierungswege.

Der intrinsische Signalweg wird als Antwort auf die Wirkung verschiedener Todesstimuli aus dem Zellinneren, wie beispielsweise DNA-Zerstörung oder Aktivierung der Onkogene, ausgelöst. Dabei stehen Veränderungen an Mitochondrien im Vordergrund [185, 192]. Zunächst wird die Außenmembran der Mitochondrien permeabel für Proteine, die sich normalerweise in dem membranären Zwischenraum befinden [186]. Dazu gehören unter anderem das Cytochrom *c*, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases, AIF (apoptosis-inducing factor) und andere Proteine [185]. Das freigesetzte proapoptotische Protein Cytochrom *c* bindet nun im Zytosol an APAF1, welches dadurch eine

Konformationsänderung erfährt und unter Bindung an ATP/dATP das Apoptosom ausbildet. Dieser massive heptamere Komplex stellt eine Plattform für die Aktivierung der Caspase-9 dar, die ihrerseits die Effektorcaspase-3, -6 und -7 aktiviert [191] (Abbildung 8).

Obwohl die Aktivierung der Caspase-9 bei dem Mitochondrien-abhängigen Signalweg eine zentrale Rolle spielt, kann auf diesem Weg auch die Caspase-8 (über die zuvor aktivierte Caspase-6) aktiviert werden, ohne die Interaktion mit FADD bzw. DISC-Bildung [193]. Über die Möglichkeit der Beteiligung der Caspase-2 bei den initialen Schritten des intrinsischen Signalweges ist ebenfalls berichtet worden [194, 195].

Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg führen zur Aktivierung der Caspase-3 und -7. Die Verbindung zwischen den beiden Signaltransduktionswegen lässt sich aber auch über das proapoptische Protein Bid, ein BH3-only Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie [196, 197], nachvollziehen. Bid ist ein physiologisch wichtiges Substrat der aktiven Caspase-8, dessen C-terminales Fragment (truncated Bid, tBid) zu der äußeren Mitochondrienmembran transloziert und dort die Freisetzung proapoptischer Stimuli induziert [198, 199] (Abbildung 8). Auf diese Weise führt auch Bid zur Interkommunikation zwischen den beiden Signalwegen [187].

Zwei weitere Signalwege, die über das Endoplasmatische Reticulum (ER) oder das Granzym B vermittelt werden, können ebenfalls an der Aktivierung der Caspasen beteiligt sein [186].

Caspase-12, die spezifisch an der zytoplasmatischen Membran des ER lokalisiert ist, scheint bei dem ER-vermittelten Signalweg eine zentrale Rolle zu spielen [200]. Nach der Aktivierung der Caspase-12 erfolgt die Phosphorylierung von Bim (BH3-only Bcl-2-Protein) durch JNK, was letztendlich zur Cytochrom *c*-Freisetzung aus Mitochondrien führt [201].

In Natürlichen Killerzellen (NK) und zytotoxischen T-Lymphozyten (zTL) kann die Caspasen-Aktivierung über die Einwirkung von Granzym B, einer mit der Caspasen-Familie verwandten Serinprotease, in Kooperation mit Perforin, einem Poren-bildenden Protein, erfolgen [202]. Nach der Freisetzung aus zTL bindet Granzym B an seinen Rezeptor, wird über Endozytose aufgenommen, verbleibt aber zunächst in endozytotischen Vesikeln, bis seine Freisetzung durch Perforin eingeleitet wird. Im Zytosol kann Granzym B dann zur Aktivierung der Caspase-3 [203], zur Spaltung von Bid [204] oder zur Rekrutierung weiterer Mediatoren wie Cytochrom *c* aus den Mitochondrien [205] führen (Abbildung 8).

Es existieren einige Klassen reversibler und irreversibler Inhibitoren der Cysteinproteasen [206]. Neben den natürlichen (viralen) Caspasen-Inhibitoren wie CrmA (cytokine response modifier A) [207], p35 [208] oder Mitgliedern der IAP-Familie (inhibitor of

apoptosis) [209], sind synthetische Inhibitoren mit einem Erkennungspeptid, das eine Ähnlichkeit zur korrespondierenden Sequenz im natürlichen Caspase-Substrat aufweist, von besonderer Potenz [164]. Zu den IAPs in Säugetieren zählen acht verschiedene Proteine [185], die die katalytische Aktivität der Effektorcaspase-3 und -7 sowie die der Caspase-9 inhibieren können [187]. Die baciloviralen Proteine p35 und p49 können dagegen die meisten Caspasen *in vivo* und *in vitro* hemmen [185]. Diese Inhibitoren zeigen allerdings, häufig in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration [210], keine absolute Enzymspezifität [206].

Da alle Caspasen in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein enthalten, können sie in Anwesenheit von thiolalkylierenden Agentien, wie beispielsweise Iodacetamid (IAA) oder N-Ethylmaleimid (NEM), oder durch Thiol-Disulfid-Interaktionen mit Disulfiram (DSF) gehemmt werden [211]. In reduzierendem Milieu (in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) oder Glutathion (GSH)) ist die Aktivität der Caspasen optimal [211].

Einige Mitglieder der Bcl-2-Familie können ebenfalls in die Folgen der Caspasen-Aktivierung eingreifen [212]. Man unterscheidet dabei die anti-apoptotischen Proteine, die vier kurze Bcl-2-Homologiedomänen enthalten (BH1-BH4) und zu denen unter anderem Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF-1 und viele andere Proteine gezählt werden [213]. Der anti-apoptotische Mechanismus dieser Proteine basiert auf der Bindung an proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bad, Bak, Bax, Bid, Bik, Bim, Blk und andere, inklusive ihrer nachfolgenden Inaktivierung [175, 212]. Auf diese Weise können Proteine der Bcl-2-Familie indirekt die Caspasenaktivität regulieren und die verwandten Signaltransduktionswege beeinflussen.

Apoptose und andere Folgen der Caspasenaktivierung

Die Aktivierung der Proteasen aus der Caspasen-Familie führt zur Spaltung einer Vielzahl verschiedener Proteine, die unter anderem an Vorgängen des Zellzyklus, Signaltransduktion und Transkription regulatorischer Proteine beteiligt sind, Bestandteile des Zytoskeletts oder des nukleären Baugerüsts darstellen, für DNA-Reparatur und -Replikation sorgen. Mittlerweile sind mehr als 280 Proteine als Caspasen-Substrate identifiziert und beschrieben worden [214]. In den meisten Fällen führen die einst aktivierten Caspasen zum apoptotischen Tod der Zelle. Einige der gespaltenen Proteine sind direkt am Ablauf apoptotischer Vorgänge beteiligt, andere wiederum werden gespalten ohne eine eindeutige Funktion bei der Apoptose zu haben [171, 214].

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen apoptotischer Zellen konnten morphologische und molekulare Veränderungen während der Apoptose beobachtet und identifiziert

werden [181]. Das Schrumpfen des Zytoplasmas und des Nukleus, Bildung von Ausstülpungen der Plasmamembran und Vesikeln, Chromatinkondensation und Zerfall der DNA in hochmolekulare und oligonukleosomale Fragmente sind nur einige der typischen Veränderungen an einer apoptotischen Zelle [171]. Anschließend erfolgt der Zerfall der Zelle in membranumschlossene Fragmente (apoptotic bodies), die von Phagozyten beseitigt werden [215, 216]. Durch den Kontaktverlust zu ihren Nachbarzellen während der Apoptose und die schnelle Beseitigung der Zellreste bleibt die inflammatorische Antwort in umliegendem Gewebe aus, was bei nekrotischem Zelltod der Fall wäre [217].

Apoptose ist für die Entfernung überschüssiger, geschädigter oder virusinfizierter Zellen verantwortlich und somit für den Organismus ein lebensnotwendiger Prozess [218, 219]. Dieser hochkomplexe Prozess spielt bei normaler Entwicklung und Homöostase eines Organismus eine Rolle, stellt aber auch einen Abwehrmechanismus bei Entstehung zellulärer Abnormalitäten dar [220, 221].

Darüber hinaus ist Apoptose in viele pathologische Zustände involviert [221, 222], einschließlich neurodegenerativer [223], kardiovaskulärer [224] und immunologischer [225] Erkrankungen, akuter neurologischer Schädigungen, AIDS und Krebs [226, 227]. Demnach kann die Aufklärung apoptotischer Mechanismen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beitragen. Eine ganze Reihe natürlicher und synthetischer Caspasen-Inhibitoren können dabei als Targets für neue Arzneistoffe dienen [228].

Lange Zeit wurde angenommen, dass Caspasen-Aktivierung unweigerlich zum apoptotischen Tod der Zelle führt. Mittlerweile existieren mehr und mehr Beweise für nichtapoptotische Funktionen der Caspasen [172] (Abbildung 9). So sind Caspase-8, -3 und -9 an Prozessen wie Zelldifferenzierung und -proliferation beteiligt, Caspase-12 ist in Funktionen des Immunsystems und Caspase-2 in DNA-Reparaturprozesse involviert [229, 230]. Über einige weitere nichtapoptotische Rollen der Caspase-8 und der FADD-bindenden Todesrezeptoren ist ebenfalls berichtet worden [231]. Beispielsweise führt die erhöhte Aktivierung der Caspase-8 und -6 in stimulierten B-Lymphozyten zur verstärkten Expression von Genen, die für den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus notwendig sind [232]. Auch für die Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung der Immunzellen scheinen Caspasen mitverantwortlich zu sein [172, 233]. Neben den gut untersuchten proinflammatorischen Fähigkeiten einiger Caspasen, wurde über die Reduktion entzündlicher Symptome durch Injektion apoptotischer Zellen in entzündetes Gewebe berichtet [234].

Die Regulation der Zellproliferation, -Differenzierung, -Aktivierung und Zytoprotektion durch Caspasen impliziert eine selektive Spaltung spezifischer Targetproteine. Diese kann

durch unterschiedliche Mechanismen gewährleistet werden: (a) posttranslationale Modifikation der Caspasen, der Adapterproteine und/oder der Targetproteine, (b) spezifische subzelluläre Verteilung der Proteasen oder Schutz potentieller Targetproteine durch Gerüstproteine oder (c) Aktivierung antiapoptotischer Faktoren [172] (siehe Abbildung 9).

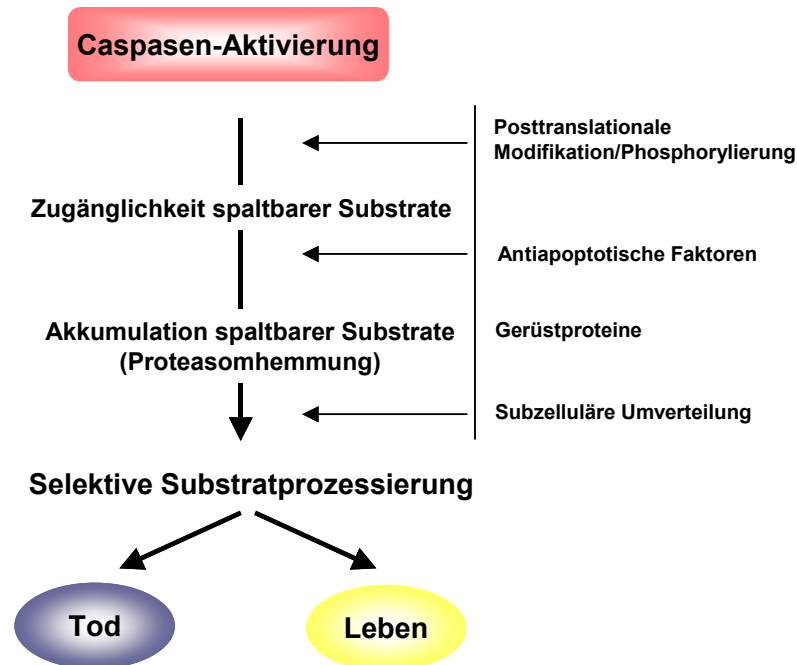


Abbildung 9: Regulation zellulärer Vorgänge durch Caspasen nach Launay et al. [172].

Eine Vielzahl potentieller nichtapoptotischer Eigenschaften der Caspasen wird weiterhin untersucht und die Frage der exakten Regulation der Entscheidung nach „Leben oder Tod“ bleibt vorerst ungeklärt. Bei der Anwendung therapeutischer Strategien zur Behandlung von Krankheiten, in die Caspasen involviert sind, sollten demnach die nichtapoptotischen Funktionen der Caspasen unbedingt beachtet werden.

Pflanzeninhaltsstoffe zur Therapie von Krebserkrankungen

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten schweren Erkrankungen in den Industrienationen, und stellen eine der Hauptursachen für krankheitsbedingte Todesfälle dar. Neben einer erhöhten Zellproliferation liegt die Unfähigkeit der Zellen in die Apoptose zu gehen (erniedrigte Sterberate) [235] den meisten Krebsarten zugrunde. Defekte des apoptotischen Mechanismus tragen zur Kanzerogenese bei, da die entstehende günstige Umgebung für genetische Instabilität und Akkumulation von Genmutationen zu

Resistenzbildung gegenüber zytotoxischen Antitumor-Therapeutika oder Strahlung beiträgt [236].

Die pharmakologische Therapie ist meist komplex zusammengesetzt und mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Zu den heutigen Behandlungsmöglichkeiten von soliden Tumoren gehören neben der operativen Entfernung und Bestrahlung auch eine pharmakologische Therapie (Chemotherapie). Das Problem dabei liegt in der geringen Spezifität bzw. Selektivität der Wirkstoffe, da sämtliche Chemotherapeutika bevorzugt auf alle proliferierenden Zellen wirken. Die derzeit angewendeten Pharmaka zur Tumorbehandlung haben unterschiedliche Angriffspunkte während der Zellteilung. Man unterscheidet dabei zwischen Antimetaboliten, Alkylantien, interkalierenden Wirkstoffen, Topoisomerase-Inhibitoren, Mitosehemmstoffen, Kinaseinhibitoren sowie (Anti-) Sexualhormonen. Rekombinante Wirkstoffe (z. B. Zytokine oder Antikörper) finden genau so Anwendung wie pflanzliche Inhaltsstoffe.

Die generelle Toxizität der meisten Wirkstoffe führt ständig zur Suche nach neuen Arzneistoffen, die selektiv Tumorzellen, nicht aber gesundes Gewebe schädigen. Einige pflanzliche Inhaltsstoffe können dem Tumorwachstum entgegen wirken und besitzen antiangiogenetische, antiinvasive und antimetastatische Eigenschaften [237, 238]. Eine ganze Reihe etablierter Wirkstoffe zur Krebstherapie, wie Vinblastin, Vincristin, Etoposid, Teniposid, Paclitaxel, Doxetaxel, Podophyllotoxin und Camptothecin, sind natürliche Verbindungen oder basieren auf natürlich vorkommenden Substanzen [239].

Es wurde ebenfalls über die antitumorgenetische Wirkung von Knoblauch [240], Bestandteilen des Grünen Tees [241] oder von Curcumin [242] berichtet. Das pharmakologische Potential der Phytoestrogene in der Krebstherapie ist ebenfalls diskutiert worden [243, 244]. Zubereitungen aus Mistel werden seit einigen Jahren vor allem in deutschsprachigen Ländern als anthroposophische Alternativtherapie bei Krebserkrankungen eingesetzt, wobei die Wirksamkeit der Mistelextrakte noch immer stark umstritten ist [245, 246].

Hyperforin hat sich als ein potenter pflanzlicher Inhaltsstoff zur möglichen Therapie von Krebserkrankungen herausgestellt [147]. Neben der Möglichkeit der Apoptoseauslösung in humanen malignen Zelllinien [148, 149] und an isolierten Leukämiezellen [150] sowie Wachstumsinhibition invasiver und metastasierender Tumorzellen [247, 248], hat Hyperforin auch Hinweise auf inhibitorische Effekte bezüglich Neoangiogenese [249] geliefert.

Die Suche nach weiteren potentiellen Wirkstoffen zur Therapie von Krebserkrankungen mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil ist in der Pflanzenwelt noch lange nicht abgeschlossen.

Ziel der Arbeit

Basierend auf zwei vorangegangenen Diplomarbeiten von Annegret Ulke-Lemee und Angela Michel sollte die Verbindung zwischen Caspasen-Aktivität und Regulation des 5-LO-Proteins in BL41-E95-A-Zellen untersucht werden. Nach Transfer der BL41-E95-A-Zellen ins frische Wachstumsmedium und Reduktion der Zellkonzentration ist ein deutlicher Verlust der 5-LO-Aktivität beobachtet worden. In Zellhomogenaten, die 24 Stunden nach Umsetzen der Zellen getestet wurden, konnte keine 5-LO-Aktivität festgestellt werden, wohingegen Zellhomogenate vier Tage nach dem Umsetzen eine maximale 5-LO-Aktivität aufwiesen [250]. Der 5-LO-Aktivitätsverlust ging mit der erhöhten Aktivität der Initiatorcaspase-8 und dem Auftreten eines Degradationsproduktes des 5-LO-Proteins einher. Untersuchungen der 5-LO auf mRNA-Ebene ergaben eine Reduktion des mRNA-Niveaus bei umgesetzten Zellen innerhalb der ersten 14 Stunden auf ca. 30% im Vergleich zu unpassagierten Zellen (vier Tage alte Zellen). Innerhalb von weiteren 30 Stunden blieb das mRNA-Niveau vergleichsweise niedrig (ca. 40%) [23].

Es sollte also festgestellt werden, inwiefern die Caspase-8-Aktivierung sowie möglicherweise die Aktivierung weiterer Caspasen mit dem Abbau des 5-LO-Proteins in Verbindung gebracht werden können. Die potentielle Schnittstelle innerhalb des 5-LO-Proteins sollte unter anderem mittels *in vitro*-Studien durch gezieltes Austauschen von Aminosäuren identifiziert und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte das Zusammenspiel zwischen Caspasen-Aktivierung und 5-LO-Regulation in einigen weiteren Zelllinien (HeLa, MM6) untersucht werden.

Die Aktivierung der Caspase-8 und der 5-LO-Abbau konnten durch den Einsatz des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid unterbunden werden. In dieser Arbeit sollte nach weiteren möglichen direkten oder indirekten Inhibitoren der 5-LO-Degradation sowie nach den möglichen Wirkmechanismen dieser Inhibitoren geforscht werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sind Effekte der Pflanzeninhaltsstoffe Hyperforin und Myrtucommulon auf die apoptoseresistente Zelllinie BL41-E95-A und den 5-LO-Abbau in diesen Zellen untersucht werden. Außerdem galt es, den Effekt von Myrtucommulon auf verschiedene Krebszelllinien (HL-60, MM6, Jurkat) bezüglich Caspasen-Aktivierung und Apoptoseauslösung zu erforschen.

Materialien und Methoden

Zellen und Zellkultur

B-lymphozytäre Zelllinien

B-lymphozytäre Zelllinien BL41 (Burkitt's Lymphoma Zellen, erworben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig) und BL41-E95-A (Burkitt's Lymphoma Zellen transient transfiziert mit der B95-8-Variante des Epstein-Barr Virus (EBV) [251], zur Verfügung gestellt von Dr. H.-E. Claesson, Karolinska Institut, Stockholm) wurden im RPMI 1640 Medium mit Glutamin (von GIBCO) bei einer Temperatur von 37°C und in einer Atmosphäre mit gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt in einem Inkubator (WTB-Binder, Tübingen) kultiviert. Das Medium wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich) und einer Antibiotika-Mischung in der Endkonzentration von 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories) supplementiert.

Beide Zelllinien zeichnen sich durch konstitutive Expression der 5-LO aus. Die BL41-E95-A-Zellen zeigen im Gegensatz zu untransfizierten BL41-Zellen eine circa 4-fach höhere Kapazität in der Bildung der 5-LO-Metabolite 5-HETE und LTB₄ [252, 253]. Insgesamt wurde für BL41-E95-A-Zellen ein deutlich höherer 5-LO-Proteinlevel verglichen mit weiteren B-Zelllinien festgestellt [254].

Durch die *in vitro* Infektion der BL41-Zellen mit dem Epstein-Barr Virus erhielten die Zellen neben dem malignen Phänotyp auch die Apoptose-Resistenz [255]. Diese basiert auf EBV-kodierten kleinen RNAs [256], inaktivem Caspase-3-Signalweg, erhöhter Bcl-2-Expression [257] und reduzierter Expression des proapoptotischen Bim [258].

Weitere Zelllinien

HL-60-Zellen (akute promyeloische Leukämie-Zellen) stammen von der American Type Culture Collection (ATCC).

Jurkat-Zellen (akute T-Zell Leukämie) und Jurkat DD3-Zellen (akute T-Zell Leukämie Zelllinie mit einer Mutation von Fas in der Todesdomäne) wurden ebenfalls von der American Type Culture Collection (ATCC) erhalten.

RBL-1-Zellen (basophile Leukämiezellen der Ratte) wurden von Prof. Dr. Andreas Habenicht, Jena bezogen

Die oben genannten Zelllinien wurden wie die bereits erwähnten B-lymphozytären Zellen im RPMI 1640 Medium mit Glutamin unter Zusatz von 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert.

Mono Mac 6-Zellen (MM6) wurden von Dr. H. W. Ziegler-Heitbrock, München zur Verfügung gestellt. Diese monozytäre Zelllinie wurde im RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 × nichtessentielle Aminosäuren, 10 µg/ml Insulin und 1 mM Oxalacetat kultiviert.

HeLa-Zellen (epithelartige Zellen aus einem Zervixkarzinom) wurden im Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA Laboratories, Österreich), supplementiert mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert.

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C, in einer Atmosphäre mit gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt.

Zellwachstum

Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Zellzahl und -Vitalität wurden Zellen in einer vorgegebenen Konzentration ausgesät, in An- bzw. Abwesenheit von Testsubstanzen kultiviert und nach der indizierten Zeit durch Zentrifugieren bei 1200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur geerntet. Anschließend wurden die Zellen in einer 0,2%-igen Trypanblaulösung (1:1 V/V) resuspendiert und unter dem Lichtmikroskop in einer Bürker-Zählkammer gezählt. Da Trypanblau die Zellmembranen intakter Zellen nicht penetrieren kann, erscheinen lebende Zellen unter dem Mikroskop hell, während tote Zellen durch den Farbstoff blau angefärbt werden.

MTT-Assay

Mit dem sogenannten MTT-Assay [259] wurde im Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J. W. Goethe-Universität von Martin Michaelis et al. die Lebensfähigkeit bzw. Vitalität der Zellen bestimmt [260]. Die Zellen wurden 5 Tage lang bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt kultiviert und anschließend mit dem MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) für 4 Stunden inkubiert. Für weitere 4 Stunden wurden die Zellen mit 100 µl einer SDS-Lösung (20% SDS in 1:1 DMF/H₂O-Mischung) behandelt. Die Platten wurden auf einem multiwell scanning Spectrophotometer bei 620 nm untersucht. Als Referenzwellenlänge wurde die Einstellung

von 690 nm verwendet. Reduktion der Zellvitalität wurde als relative Reduktion der optischen Dichte (OD) im Vergleich zu Kontrollzellen berechnet.

Bestimmung der 5-LO-Aktivität in Zellhomogenaten

BL41- und BL41-E95-A-Zellen (1×10^7) wurden in 1 ml PBS (pH 7,4) mit 1 mM EDTA resuspendiert, 5 min auf Eis gekühlt und mittels Ultraschall-Sonotrode (3×10 Sekunden) homogenisiert. Nach Zugabe von 1 mM ATP wurden die Proben 30 Sekunden bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 mM CaCl_2 und 40 μM Arachidonsäure gestartet. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37°C und wurde durch Methanol-Zugabe gestoppt. Anschließend wurden die gebildeten 5-LO-Metabolite durch eine Festphasenextraktion an einer RP18-Säule (Clean-Up[®] Extraction Columns, United Chemical Technologies), vorkonditioniert mit Methanol und Wasser, aus dem Gemisch isoliert und das Eluat via HPLC untersucht. Die Detektion erfolgte in den ersten 8 Minuten bei 280 nm und bei 235 nm für die weiteren 22 Minuten. Als stationären Phase wurde die Novapak C-18 Radial Pack-Säule (100 mm 5 mm I.D., 4 μm Partikelgröße, Waters) verwendet, das Fließmittel war ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure (72/28/0,007 V/V) und der Fluss betrug 1,2 ml/min. Die Darstellung der 5-LO-Produktbildung erfolgt in ng 5-LO-Metabolite pro 10^6 Zellen und umfasst die Summe aus LTB_4 , den 6-trans-Isomeren des LTB_4 sowie 5-HPETE und 5-HETE.

SDS-PAGE und Western blot

BL41- und BL41-E95-A-Zellen (4×10^6) wurden in 50 μl eiskaltem Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5/50 mM NaCl/30 mM Natriumpyrophosphat/10 mM 4-Nitrophenylphosphat/50 mM NaF/20 mM β -Glycerophosphat/2 mM Na_3VO_4 /0,5 mM PMSF/10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin/60 $\mu\text{g/ml}$ STI) resuspendiert und für 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die BL41-E95-A-Proben bei 10.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und die Überstände 1:1 mit 2 \times Ladepuffer für SDS-PAGE (20 mM Tris-HCl, pH 8/2 mM EDTA/5% (m/V) SDS/10% β -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Andere verwendete Zelllinien (HeLa, Jurkat, MM6, PMNL, RBL-1 und andere) wurden (je 4×10^6 Zellen) in 50 μl PBS, pH 7,4 resuspendiert und mittels Ultraschall-Sonotrode 3×10 Sekunden homogenisiert. Diese Proben wurden direkt 1:1 mit Ladepuffer für SDS-PAGE versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Aliquots der Proben (20 μl , entsprechend $0,8 \times 10^6$ Zellen) wurden mit 4 μl der Mischung Glycerol/0,1% Bromphenolblau (1:1, V/V) versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach dem Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Bioscience) und Blocken

mit 5%-iger Magermilchpulver-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur, wurden die Membranen mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit primärem Antikörper inkubiert. Alle verwendeten primären Antikörper wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die Membranen wurden erneut mit TBS gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären, an alkalische Phosphatase gekoppelten, Antikörper (Sigma) für 3 Stunden bei RT inkubiert. Zur Visualisierung der Proteine sind der Lösung Nitroblau-Tetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (Sigma) als Substrate der alkalischen Phosphatase zugegeben worden.

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
anti-5-LO	polyklonales 5-LO-Antiserum AK7, 1551, zur Detektion intakter (78 kDa) und prozessierter (62 bzw. 58 kDa), denaturierter 5-LO	Karolinska Institut, Schweden
anti-5-LO-Serum	polyklonales Anti-5-LO-Mausserum, zur Detektion intakter 5-LO (78 kDa)	Ilse Zündorf, AK Prof. Dingermann, Uni Frankfurt
anti-Caspase-8	zur Detektion unprozessierter (57/55 kDa) Caspase-8, des intermediären Spaltproduktes (43/41 kDa) und der aktiven Form (18 kDa)	New England Biolabs, Inc. Beverly, MA
anti-Caspase-6	zur Detektion unprozessierter (35 kDa) und aktiver (15 kDa) Form der Caspase-6	New England Biolabs, Inc. Beverly, MA
anti-Caspase-3	zur Detektion unprozessierter (35 kDa) Caspase-3 und des Spaltproduktes (17 kDa)	New England Biolabs, Inc. Beverly, MA DEXD
anti-Caspase-9	zur Detektion unprozessierter (47 kDa) Caspase-9 und des Spaltproduktes (37/35 kDa)	New England Biolabs, Inc. Beverly, MA
anti-PARP	zur Detektion der C-terminale Domäne des gespaltenen PARP-Proteins (89 kDa)	MoBiTec, Göttingen
anti-cPLA ₂	zur Detektion der humanen cPLA ₂ -Proteins (100 kDa)	Cell Signaling Technology
anti-Ubiquitin	zur Detektion von Ubiquitin, Poly-Ubiquitin und ubiquitinierten Proteinen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
anti-Actin	zur Detektion der C-terminale Domäne des humanen Aktin-Proteins (47 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

Tabelle 3: Für die Immunodetektion verwendeten primären Antikörper.

Bestimmung der Caspase-Aktivität

BL41- und BL41-E95-A-Zellen (5×10^6) wurden in 100 μ l eiskaltem Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,4/0,1% CHAPS/0,1% Triton X-100/0,1 mM EDTA/1 mM DTT/1 mM PMSF/1 μ g/ml Leupeptin) resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Die Proben wurden 10 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und die Überstände sind für die Bestimmung der Caspase-Aktivität verwendet worden. Zunächst wurden 30 μ l der Probe 10 min bei RT mit 195 μ l Assaypuffer (50 mM HEPES, pH 7,4/100 mM NaCl/0,1% CHAPS/1 mM EDTA/10 mM DTT/10% Glycerol) inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ M (Endkonzentration) des kolorimetrischen Substrates für die jeweilige Caspase gestartet. Folgende Substratpeptide, gekoppelt an *para*-Nitroanilin (*p*NA), sind verwendet worden: Ac-VEID-*p*NA für Caspase-6, Ac-IETD-*p*NA für Caspase-8 (Calbiochem, Bad Soden). Die Absorption wurde bei 405 nm alle 2 Minuten über den Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Durch Anreicherung des Nitroanilins in der Lösung kommt es zur Erhöhung der Absorptionswerte mit zunehmender Zeit. Die Caspase-Aktivität wird als x-fache Steigerung oder in Prozent der Kontrolle (100%) angegeben unter Berücksichtigung der Absorption bei 405 nm am End- und am Startpunkt der Messung.

Spaltung der 5-LO *in vitro*

Aufgereinigte rekombinante 5-LO bzw. zelluläre S-100-Überstände mit 5-LO (siehe Kapitel 0) wurden mit der zu untersuchenden Menge an rekombinanter Caspase-6 (Sigma, Deisenhofen) oder Caspase-8 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) im Assaypuffer (50 mM HEPES, pH 7,4/100 mM NaCl/0,1% CHAPS/1 mM EDTA/10 mM DTT/10% Glycerol) inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Endvolumen von 100 μ l, wobei 20 μ l-Aliquots nach 3 bzw. 16 Stunden entnommen und mittels Western blot untersucht wurden.

Expression und Aufreinigung des 5-LO-Proteins

Die Expression rekombinanter 5-LO erfolgte in *E. coli*-Stämmen MV1190 bzw. BL21, welche zuvor mit dem Plasmid pT3-5LO [261] transformiert wurden [34]. Es wurden 5 ml Startkultur im LB Medium (2,5%-iges Luria Broth Base Medium) unter Zusatz von 0,2 mg/ml Ampicillin auf 1 l Wachstumskultur überimpft. Der *E. coli*-Stamm MV1190 wurde im Wachstumsmedium (10%-ige M9-Lösung, pH 7,4, bestehend aus 48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,5 mM NaCl, 19 mM NH₄Cl, 6,3 mM NaOH, 2% Glycerol, 2 g/l Casein) unter Zusatz von 0,1 mg/ml Ampicillin, 2 mM MgSO₄ und 5 μ M FeSO₄ bei 27°C und

210 U/min geschüttelt. Der *E. coli*-Stamm BL21 wurde im LB-Medium unter Zusatz von 0,4 mg/ml Ampicillin, 2 mM MgSO₄ und 5 µM FeSO₄ bei RT und 210 U/min geschüttelt. Die Zugabe von IPTG (0,2 mM für MV1190-, 1 mM für BL21-*E. coli*) zur Induktion der 5-LO-Proteinexpression erfolgte bei einer Optische Dichte (OD₂₆₀) von 0,2-0,3. Nach weiteren 4 Stunden (BL21) bzw. 14-16 Stunden (MV1190) Wachstum wurden die Zellen der Zentrifugation bei 10.000 g, 10 min, 4°C unterworfen und die Zellpellets mit je 100 µl Lysepuffer (50 mM Triethanolamin/HCl, pH 8,0/5 mM EDTA/60 µg/ml STI/2 M DTT/1 mM PMSF/500 µg/ml Lysozym) 25 min auf Eis lysiert und anschließend mittels Ultraschall-Sonotrode homogenisiert. Die Homogenate wurden erneut zentrifugiert (10.000 g, 15 min, 4°C) und aus den zellulären Überständen wurde durch die Ultrazentrifugation (100.000 g, 70 min, 4°C) der sogenannte 100.000 g-Überstand (S-100-Überstand) gewonnen. Die in dem Überstand befindliche 5-LO konnte an dieser Stelle in *in vitro* Studien, wie oben beschrieben (Kapitel 0), untersucht werden. Alternativ wurde eine weitere Aufreinigung mittels ATP-Agarose durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der 100.000 g-Überstand (entsprechend 2×10^8 Zellen/ml) auf eine mit PBS/1 mM EDTA äquilibrierte ATP-Agarose-Säule (1,5-2 ml Säulenbett) aufgetragen und nach drei Waschschrritten [a) PBS/1 mM EDTA; b) 0,5 M NaCl suprapur in PB (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)/1 mM EDTA; c) PB/1 mM EDTA] mit einer 20 mM ATP-Lösung in PB/1 mM EDTA eluiert. Zur Aufkonzentrierung des 5-LO-Proteins wurden die Eluate bei Bedarf mittels Vivaspin Zentrifugationssäulen (2 ml, Sartorius) eingengt und die 5-LO ist in *in vitro* Studien (siehe Kapitel 0) untersucht worden.

Site-directed mutagenesis

Die Codons für ausgewählte Aspartat-Reste im Plasmid pT3-5LO wurden mit Hilfe des QuickChange™ Kits von Stratagene in einem *site-directed mutagenesis*-Verfahren mutiert. Die Verifizierung der in die DNA eingefügten Mutation erfolgte mittels Applied Biosystem PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) mit anschließender Analyse durch Applied Biosystem PRISM 377 Sequenzierer. Die *E. coli* MV1190 bzw. BL21 wurden mit mutierter und mit Wildtyp-DNA transformiert, die rekombinanten Proteine wurden anschließend wie unter 0 beschrieben exprimiert und aufgereinigt.

Subzelluläre Lokalisation der 5-LO

BL41-E95-A- oder HeLa-Zellen (20×10^6) wurden in 300 µl eiskaltem NP-40 Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4/10 mM NaCl/3 mM MgCl₂/1 mM EDTA/0,1% NP-40/1 mM

PMSF/60 µg/ml STI/10 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und bei 800 g, 4°C für 10 min zentrifugiert [58]. Der Überstand (zytosolische Fraktion) wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet (nukleäre Fraktion) in 300 µl eiskaltem TKM-Puffer (50 mM Tris, pH 7,4/250 mM Sucrose/25 mM KCl/5 mM MgCl₂/1 mM EDTA/1 mM PMSF/60 µg/ml STI/10 µg/ml Leupeptin) resuspendiert. Beide Fraktionen wurden erneut zentrifugiert (800 g, 10 min, 4°C). Der Überstand der zytosolischen Fraktion wurde für weitere Verwendung abgenommen, während das Pellet der nukleären Fraktion erneut in 300 µl eiskaltem TKM-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall-Sonotrode homogenisiert wurde. Durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 70 min, 4°C) erfuhren die Proteine beider Fraktionen eine weitere Trennung in lösliche (Überstand) und partikuläre (Pellet) Bestandteile. Die Proben wurden direkt mit dem gleichen Volumen an Ladepuffer für SDS-PAGE (20 mM Tris, pH 8,0/2 mM EDTA/5% SDS/10% β-Mercaptoethanol) versetzt, 6 min bei 95°C erhitzt und das 5-LO-Protein durch SDS-PAGE und Western blot nachgewiesen.

Transiente Transfektion

Transiente Transfektion adhärenter Zellen wurde durch Calcium-Phosphat-Präzipitation durchgeführt. Hierbei wurden bei der Transfektion mit einem Plasmid stets 10 µg des Plasmids eingesetzt, bei der Transfektion mit mehreren Plasmiden gleichzeitig (Kotransfektion) wurde das Verhältnis 10:1 gewählt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen pro T-75 Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät. 10 µg Plasmid wurden mit sterilem MilliQ-Wasser zu 450 µl verdünnt und mit 50 µl einer CaCl₂-Lösung (2,5 M) versetzt. Diese Mischung wurde langsam unter gleichmäßigem Einstrom von steriler Luft zu 500 µl HeBS-Lösung (50 mM HEPES/28 mM NaCl/1,5 mM Na₂HPO₄, mit 5 N NaOH auf pH 7,05 eingestellt) zugegeben. Nach einer Präzipitationszeit von 5-15 min wurde die Suspension zu den Zellen ins Wachstumsmedium gegeben, die Zellen wurden für 16 Stunden mit dem Präzipitat inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt und gegebenenfalls mit Testsubstanzen versetzt. Nach weiteren 8, 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mittels SDS-PAGE/Western blot untersucht bzw. für den Einsatz im 5-LO- oder Caspase-Aktivitätsassay entsprechend präpariert.

Für die Transfektion verwendete Plasmide:

- pcDNA3.1-5LO [89];
- pcDNA3.1-5LO-D170A, kloniert aus pcDNA-5LO im *site-directed mutagenesis*-Verfahren, wie unter 0 beschrieben;

- pcDNA3.1-3W, kloniert von Lutz Fischer aus pcDNA-5LO mittels QuickChange™ Kits von Stratagene (siehe Kapitel 0);
- pSG5-Caspase-6, amplifiziert aus cDNA der BL41-E95-A-Zellen mit folgenden Primern in der Konzentration von je 5 ng/μl mittels PCR mit 35 Zyklen
Casp6_s 5'CTAAGAATTCATGAGCTCGGCCTCGGGGCTCC3'
Casp6_as 5'CACGAAGCTTTTAATTAGATTTTGGAAAGAAATGC3'
und kloniert in den pSG5-Vektor über EcoRI und HindIII Restriktionsschnittstellen;
- pSG5-Caspase-8, amplifiziert aus cDNA der BL41-E95-A-Zellen mit folgenden Primern in der Konzentration von je 5 ng/μl mittels PCR mit 35 Zyklen
Casp8_s 5'CCTCGGATCCTCAATGGACTTCAGCAGAAATCTTTATG3'
Casp8_as 5'CGCCAAGCTTTCAATCAGAAGGGAAGACAAG3'
und kloniert in den pSG5-Vektor über BamHI und HindIII Restriktionsschnittstellen.

Apoptose-Bestimmung

Photometrische Apoptose-Bestimmung

Die photometrische Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mittels Cell Death Detection ELISA® (Roche Molecular Biochemicals). Die Zellen (BL41-E95-A- bzw. HL-60-Zellen) wurden mit bzw. ohne Zusatz von Testsubstanzen kultiviert, geerntet und $0,2-0,5 \times 10^6$ Zellen wurden für die Bestimmung verwendet. Das Prinzip der Bestimmung basiert auf der Detektion von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zell-Lysaten unter Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern gegen Histon und DNA, wobei der anti-DNA-Antikörper an eine Peroxidase gekoppelt ist.

Die Menge an Nukleosomen wurde durch photometrische Bestimmung bei 405 nm ermittelt, durch den Einsatz von ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) als Substrat für die in den Immunokomplexen verbliebene Peroxidase. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Daten repräsentieren die spezielle Anreicherung der in das Zytoplasma freigesetzten Mono- und Oligonukleosomen in Form des apoptotischer Anreicherungsfaktors (AAF). Der AAF ist mittels folgender Formel ermittelt worden: Extinktion [10^{-3}] der Probe (tote/sterbende Zellen) / Extinktion [10^{-3}] der entsprechenden Kontrolle (lebende Zellen).

DNA-Gelelektrophorese

Die Isolierung apoptotischer DNA-Fragmente aus BL41-E95-A- und HL-60-Zellen (1×10^7) erfolgte durch Behandlung der Zellen mit 1 ml DNAzol-Lösung (Molecular Research Center).

Anschließend wurde die DNA mit einer 100%-igen Ethanol-Lösung präzipitiert, zweimal mit einer 95%-igen Ethanol-Lösung gewaschen und in 200 µl Wasser resuspendiert. Die DNA-Probe wurde mit einem Ladebuffer (30% Glycerol/0,25% Xylencyanol FF/0,25% Bromphenolblau) versetzt und auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte im Kammersystem der Firma BioRad (München) mit Hilfe von Spannungsgebern der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg).

Das Anfärben der DNA erfolgte durch Zusatz von 0,01% Ethidiumbromid zur Agarose-Gellösung. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente im Agarosegel ist der 100 bp-Marker verwendet worden.

Statistische Auswertungen

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten wurden mittels Student's *t*-Test für unverbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Dabei ist $P < 0,05$ für signifikant befunden worden. Die Ergebnisse setzen sich aus unabhängigen Mehrfachbestimmungen zusammen ($n =$ mindestens 3). In den Graphen stellen die Fehlerbalken die Standardfehler dar.

Ergebnisse

Transfer von BL41-E95-A Zellen in frisches Medium

Regulation der 5-LO in passagierten B-Lymphozyten

BL41-E95-A-Zellen, die innerhalb von vier Tagen bis zu einer Konzentration von $1,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml angewachsen waren, sind auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt worden. Nach vorgegebener Zeit wurden Aliquots der Zellhomogenate auf die Aktivität der 5-LO überprüft. Die 5-LO-Aktivität wurde bereits 12 Stunden nach Umsetzen der Zellen signifikant beeinträchtigt, erreichte ein Minimum 24-48 Stunden nach umsetzen, begann anschließend aber wieder zu steigen und wurde am Tag 4-5 komplett wiederhergestellt. Im weiteren Verlauf wurde ein Anstieg in der 5-LO-Aktivität bis zum Tag 7 beobachtet, diesem folgte dann erneut eine Aktivitätsabnahme (Abbildung 10A).

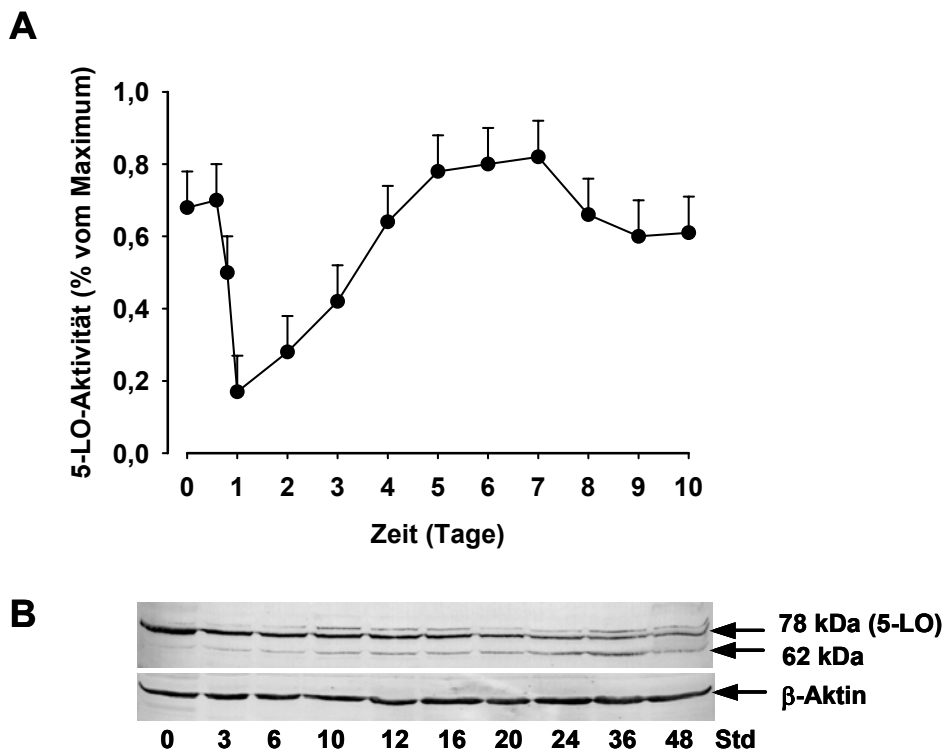


Abbildung 10: Umsetzen von BL41-E95-A-Zellen führt zu einer Herabregulation der 5-LO. Die Zellen wurden mit frischem Medium auf etwa 1/10 der ursprünglichen Konzentration verdünnt und nach indizierter Zeit geerntet. (A) Zeitabhängige Untersuchung der 5-LO-Aktivität nach Umsetzen der B-Lymphozyten (Tag 0-10). Die 5-LO-Aktivität ist in Prozent vom Maximalwert (100%) angegeben. (B) Western blot-Analyse der Proteine 5-LO und β -Aktin (Kontrolle).

Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Abnahme der 5-LO-Aktivität mit einer Degradation des 5-LO-Proteins (78 kDa) korrelierte, wobei ein 5-LO-Spaltprodukt von 62 kDa-Größe in Western blot-Untersuchungen entdeckt wurde (Abbildung 10B).

Einfluss des Mediums auf die 5-LO-Regulation

Das Umsetzen von BL41-E95-A-Zellen ins frische Medium geht mit zwei wichtigen Veränderungen der Kultivierungsbedingungen einher: der Reduktion der Zelldichte und der Veränderung der Medium-Zusammensetzung. Einerseits werden die Zellen beim Passagieren verdünnt, wobei die bestehenden Zell-Zell-Kontakte unterbrochen werden. Andererseits werden die Zellen aus einem mit bestimmten Substanzen konditioniertem Medium in ein frisches, nährstoffhaltiges Medium gegeben.

Um den Effekt des Mediums auf die 5-LO-Regulation in BL41-E95-A-Zellen zu untersuchen, sind Zellen, die innerhalb von vier Tagen bis zu einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml angewachsen waren,

- (I) unbehandelt geblieben
- (II) in das gleiche konditionierte Medium verdünnt worden
- (III) unverdünnt ins frische Medium überführt worden
- (IV) verdünnt ins frische Medium überführt worden.

Nach 48 Stunden sind die Zellen geerntet und das 5-LO-Protein sowie die 5-LO-Aktivität in Zellhomogenaten untersucht worden. Hierbei zeigten sich Veränderungen bezüglich beider Parameter nur bei den Zellen, die 48 Stunden zuvor verdünnt ins frische Medium transferiert wurden (IV). Bei Zellen, die unter anderen Bedingungen kultiviert wurden (I, II, III) sind keine signifikanten Veränderungen bezüglich der 5-LO-Aktivität und der Spaltung des 5-LO-Proteins beobachtet worden (Abbildung 11). Folglich scheinen die Reduktion der Zelldichte und die Veränderung in der Zusammensetzung des Wachstumsmediums zur Herabregulation der 5-LO zu führen.

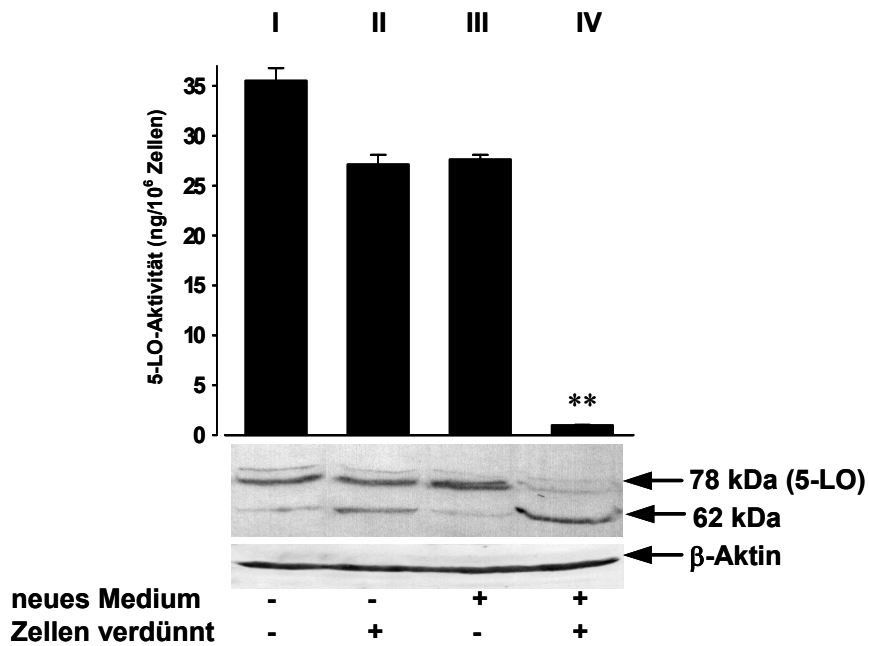


Abbildung 11: Umsetzen der Zellen ins frische Medium und Reduktion der Zelldichte sind für die Herabregulation der 5-LO notwendig. BL41-E95-A-Zellen, die nach vier Tagen auf 2×10^6 Zellen/ml angewachsen waren, sind unbehandelt geblieben (I), ins konditionierte Medium verdünnt worden (II), unverdünnt (III) oder verdünnt auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml (IV) ins frische Medium überführt worden. Bestimmung der 5-LO-Aktivität und der Proteine 5-LO und β -Aktin erfolgte nach weiteren 48 Stunden. **, $P < 0,01$, ermittelt durch Student's t-Test.

Zwei mögliche Szenarien sind dabei denkbar:

A: Während der Kultivierung sezernieren BL41-E95-A-Zellen einen bestimmten Faktor X ins Kulturmedium, welcher ab einer gewissen Konzentration (Tag 3-5) die 5-LO direkt oder indirekt vor dem Abbau schützt. Beim Passagieren der Zellen ins frische Medium kommt es zur Faktor X-Verdünnung und somit zur Aufhebung seiner Funktion. Erfolgt das Passagieren der Zellen in einer hohen Konzentration (III), bleibt die Spaltung der 5-LO aufgrund rasch erfolgter Konditionierung aus. Beim Umsetzen der Zellen ins bereits konditionierte Medium (II) bleibt der 5-LO-Abbau ebenfalls aus. Erst wenn die Zellen in einer geringen Zelldichte und ins frische Medium umgesetzt werden, tritt der Effekt aufgrund langsam erfolgter Konditionierung zeitverzögert auf.

B: BL41-E95-A-Zellen sezernieren einen bestimmten Faktor Y, der den Abbau des 5-LO-Proteins direkt oder indirekt begünstigt, wenn die Zellen in geringer Dichte ins frische Medium passagiert werden (IV). Dieser Faktor Y ist nur in unverbrauchtem Medium aktiv oder seine Sekretion ist nur unter nicht-konditionierten Bedingungen möglich.

Zur Aufklärung des Phänomens wurden zunächst Versuche unternommen um festzustellen, ob es sich bei dem vermuteten Mediator um ein Protein (Fällung der Proteine aus dem Medium mit Methanol) oder ein Lipid (Extraktion des Fällungsüberstandes mit Ether/Methanol) handelt [16]. Die Durchführung dieser Versuche erwies sich als äußerst zeitaufwendig und diente schließlich als Grundlage zur Etablierung des Protokolls für weitere Untersuchungen.

***De novo*-Proteinsynthese**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die *de novo*-Proteinsynthese durch das Passagieren von Zellen ausgelöst wird. Dazu wurden BL41-E95-A-Zellen, die sich bereits seit vier Tagen im Wachstumsmedium befanden, ins frische Medium umgesetzt oder im alten Medium weiter wachsen lassen, und für weitere 24 Stunden mit oder ohne Zusatz von 50 μ M des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) kultiviert. Anschließend wurden die 5-LO-Aktivität sowie die Menge des 5-LO-Proteins mittels Western blot bestimmt.

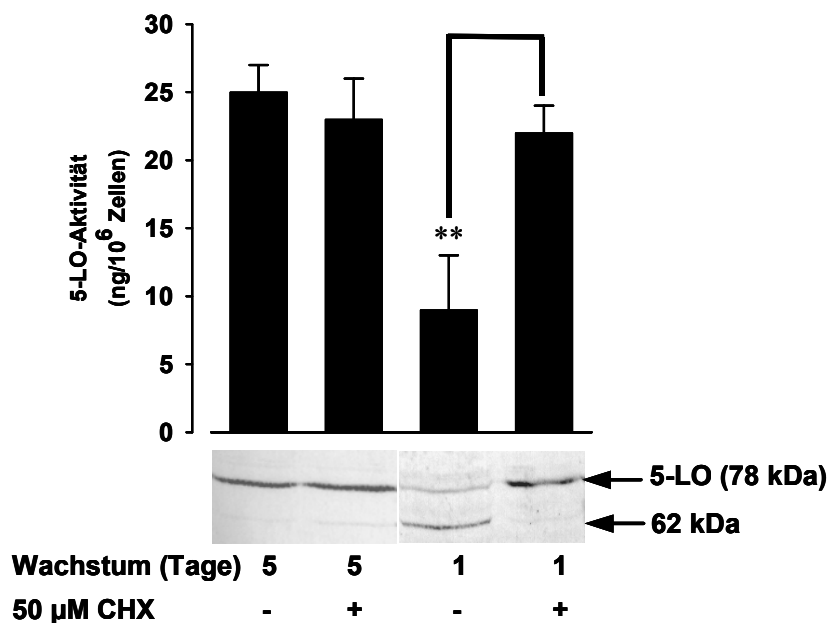


Abbildung 12: Auswirkung der CHX-Behandlung in BL41-E95-A-Zellen auf 5-LO-Aktivität (Graph) und -Proteinmenge (Western blot). Die Zellen wurden mit frischem Medium auf etwa 1/10 der ursprünglichen Konzentration verdünnt oder im konditionierten Medium wachsen lassen. Die Behandlungsdauer mit CHX (50 μ M) betrug 24 Stunden. **, $P < 0,01$, ermittelt durch Student's t-Test.

Auf Zellen, die sich 5 Tage lang in demselben Medium befanden, hatte CHX keinen signifikanten Effekt. In passagierten BL41-E95-A-Zellen verhinderte CHX dagegen sowohl die Reduktion der 5-LO-Aktivität als auch den Abbau des 5-LO-Proteins zu dem 62 kDa Spaltprodukt (Abbildung 12). Es scheint also, dass CHX die Synthese eines oder mehrerer Proteine, die am Abbau der 5-LO beteiligt sind, verhindert.

Caspasen-Aktivität

Die Suche nach Mediatoren, die für den 5-LO-Abbau verantwortlich sein könnten, führte zur Untersuchung der Caspase-Aktivität. In BL41-E95-A-Zellen, die 24 bzw. 48 Stunden nach Umsetzen ins frische Medium untersucht wurden, stellte man eine deutliche Erhöhung der Caspase-8-Aktivität fest. Gleichzeitig ist die Prozessierung der Caspase-8 zur aktiven Form im Western blot nachgewiesen worden (Abbildung 13A). Beide Effekte wurden allerdings nicht in Zellen beobachtet, die für den gesamten Zeitraum von 5 Tagen kontinuierlich in demselben Wachstumsmedium kultiviert wurden. Damit konnte eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität der Caspase-8 und dem Abbau des 5-LO-Proteins zum Spaltprodukt von 62 kDa Größe festgestellt werden (Abbildung 13A). Da die Aktivierung der Caspase-8 durch die CHX-Zugabe unterbunden werden konnte, lässt dies auf die Notwendigkeit der *de novo*-Proteinsynthese schließen. In Analogie zur Caspase-8-Aktivität konnte auch eine deutlich erhöhte Aktivität der nachgeschalteten effektorischen Caspase-6 nachgewiesen werden (Abbildung 13A). Auch dieser Effekt konnte durch die Zugabe von 50 μ M CHX zu passagierten Zellen verhindert werden. In zeitabhängigen Experimenten konnte letztendlich eine direkte Korrelation zwischen der Aktivierung der Caspase-8 und -6 und dem Abbau der 5-LO gezeigt werden (Abbildung 13B).

Untersuchungen mit zellpermeablen Inhibitoren der Caspase-8 (IETD-CHO) und Caspase-6 (VEID-CHO) (Calbiochem, Bab Soden, Deutschland) zeigten, dass beide Inhibitoren, getestet in angemessenen Konzentrationen, den Abbau der 5-LO vollständig verhinderten. Unter dem Einsatz der Caspasen-Inhibitoren wurde also kein Auftreten des 5-LO-Spaltproduktes beobachtet (Abbildung 13C).

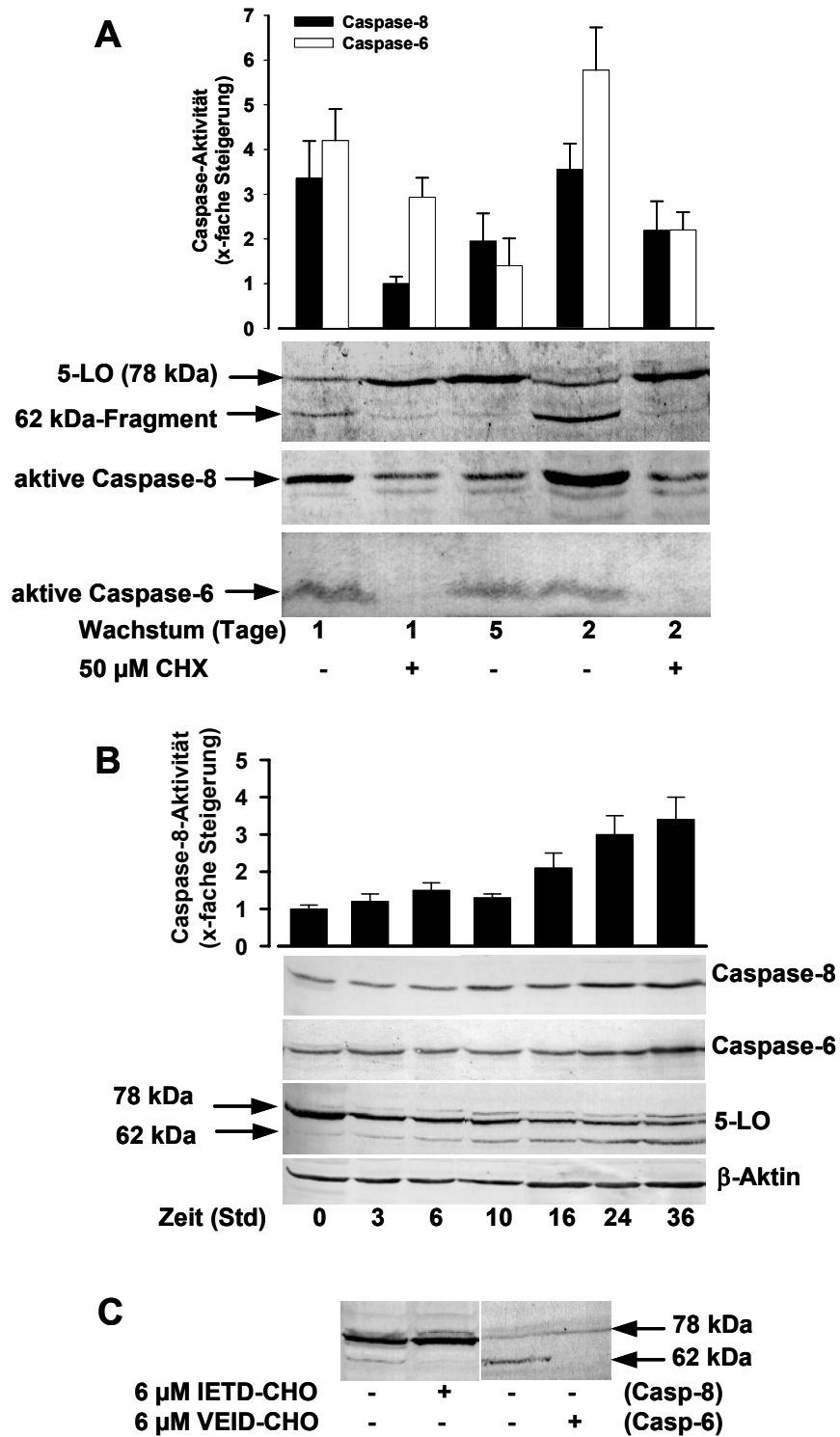


Abbildung 13: (A) Umsetzen der BL41-E95-A-Zellen induziert Aktivierung der Caspase-8 und -6. Aktivität der Caspase-8 und -6 (Graph) sowie aktive Formen der beiden Caspasen und 5-LO-Protein (Western blot) sind dargestellt. Effekt von CHX ist ebenfalls gezeigt. (B) Zeitkinetik der Caspase-8-Aktivität, der Prozessierung der Caspase-8 und -6 und des 5-LO-Proteinabbaus. (C) Effekt der Inhibitoren der Caspase-8 (IETD-CHO, 6 µM) und der Caspase-6 (VEID-CHO, 6 µM) auf die 5-LO-Degradation.

Zellproliferation

Eine weitere interessante Beobachtung betrifft das Zellwachstum der BL41-E95-A-Zellen. Innerhalb von 24-48 Stunden nach Umsetzen der Zellen ins frische Medium begannen diese zu proliferieren (Abbildung 14A), gefolgt von der Aktivierung der Caspasen und dem Abbau des 5-LO-Proteins. Steigende Zellmenge und Zellviabilität wurden, wie im Kapitel 0 beschrieben, nach Anfärben mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Der Caspase-6-Inhibitor VEID-CHO führte konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation und Hemmung der 5-LO-Spaltung (Abbildung 14B).

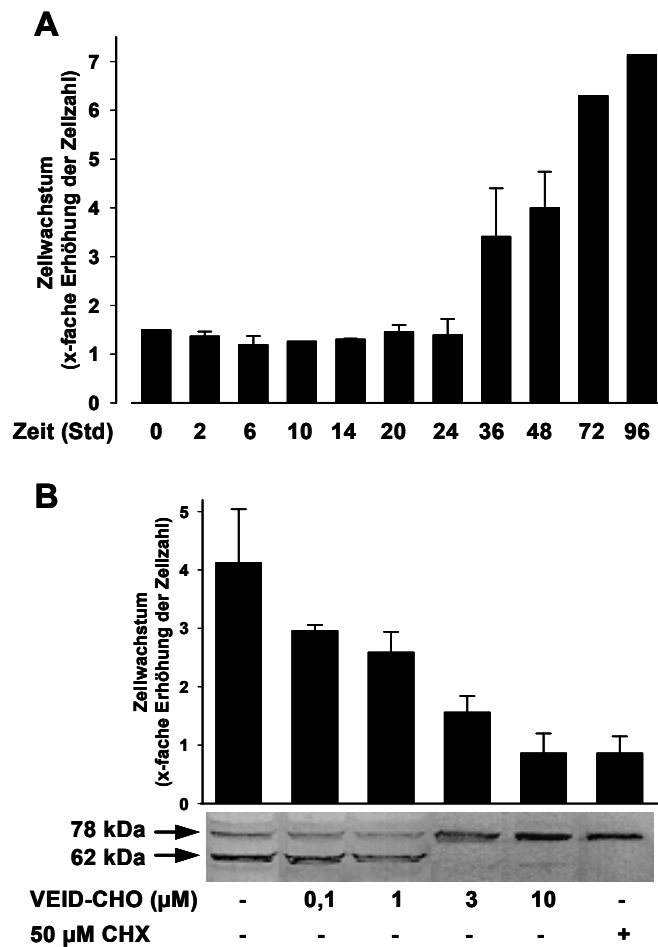


Abbildung 14: (A) Umsetzen von BL41-E95-A-Zellen führt zu einer erhöhten Zellproliferation. BL41-E95-A-Zellen, die innerhalb von vier Tagen auf 2×10^6 Zellen/ml angewachsen waren, sind mit frischem Medium auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt worden. Die Bestimmung der Zellmenge und -viabilität erfolgte im Lichtmikroskop nach Trypanblau-Färbung. (B) Konzentrations-abhängiger Effekt des Caspase-6-Inhibitors VEID-CHO auf die Zellproliferation (Graph) und die 5-LO-Degradation (Western blot) in BL41-E95-A-Zellen. Die Zugabe des Caspase-6-Inhibitors erfolgte zum Zeitpunkt der Zellumsetzung. Das Zellwachstum ist als x-fache Erhöhung der Zellzahl angegeben.

Alle Ergebnisse bezüglich der Regulation der 5-LO-Aktivität und -Spaltung, der Einflüsse des Proteinsyntheseinhibitors CHX und des Mediums sowie der Aktivierung der Caspase-6 und Caspase-8, die in diesem Kapitel an der B-lymphozytären Zelllinie BL41-E95-A gezeigt wurden, konnten in gleicher Weise auch für die BL41-Zellen (Zelllinie ohne Epstein-Barr Virus) beobachtet werden. Da es sich bei der BL41-Zelllinie nicht um apoptoseresistente Zellen handelt, führt die Behandlung der Zellen mit CHX für länger als 36 Stunden zu einem apoptotischen Tod der Zellen.

Untersuchungen an rekombinanter 5-LO *in vitro*

Spaltung der Wildtyp 5-LO *in vitro*

Expression und Aufreinigung humaner rekombinanter 5-LO erfolgten aus *E. coli* wie unter 0 beschrieben. Das isolierte 5-LO-Protein wurde bei 37°C mit 0,3 Units der rekombinanten Caspase-8 (Upstate) bzw. Caspase-6 (Sigma) inkubiert und nach 3 bzw. 16 Stunden mittels Western blot untersucht.

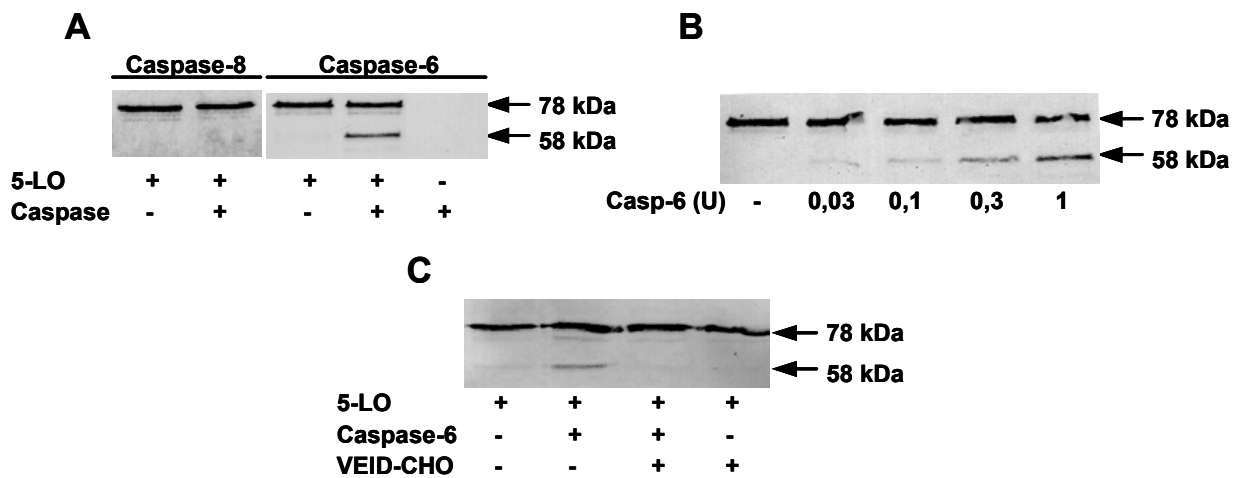


Abbildung 15: (A) Spaltung der 5-LO durch die rekombinante Caspase-6 *in vitro*. Aufgereinigtes 5-LO-Protein ist mit 0,3 Units der rekombinanten Caspase-8 oder -6 für 3 bzw. 16 Stunden inkubiert worden. Anschließend erfolgte die Western blot-Analyse des intakten (78 kDa) und des gespaltenen (58 kDa) 5-LO-Proteins. (B) Konzentrationsabhängiger 5-LO-Abbau durch Caspase-6 *in vitro*. Nach 16 Stunden erfolgte die Untersuchung des 5-LO-Proteins im Western blot. (C) Einfluss des Caspase-6-Inhibitors VEID-CHO auf die 5-LO-Spaltung durch Caspase-6 *in vitro*. Die aufgereinigte 5-LO ist mit 0,3 Units der rekombinanten Caspase-6 für 16 Stunden inkubiert worden. Die Zugabe des Caspase-6-Inhibitors VEID-CHO (0,5-1 µM) und die der Caspase-6 zum 5-LO-Protein erfolgten gleichzeitig.

Bereits nach 3 Stunden konnte ein deutlicher Abbau der 5-LO durch Caspase-6 detektiert werden, wohingegen die Inkubation der 5-LO mit Caspase-8 zu keinem Zeitpunkt zu einem Spaltfragment führte (Abbildung 15A). Die konzentrationsabhängige Spaltung der 5-LO durch Caspase-6 lieferte ein Spaltprodukt von ungefähr 58 kDa (Abbildung 15B) und konnte durch die Zugabe des Caspase-6-Inhibitors VEID-CHO (0,5-1 μ M) verhindert werden (Abbildung 15C).

Spaltung der mutierten 5-LO-Proteine *in vitro*

Das bevorzugte Erkennungsmotiv innerhalb der Substrate der Caspase-6 ist VEID, wobei der Aspartat-Rest essentiell für die Substraterkennung und -spaltung ist. Daher sollte die Mutation des Aspartats zu Alanin die Caspase-6 daran hindern, das entsprechende Substrat zu erkennen und zu prozessieren. Die Primärsequenz des 5-LO-Proteins enthält einige Konsensus-Tetrapeptide mit einer Homologie zum VEID-Motiv. Basierend auf dieser Homologie sowie auf der kalkulierten Masse des potentiellen Spaltfragmentes wurden folgende Motive innerhalb der 5-LO-Sequenz ausgesucht: LARD₁₂₁, ARDD₁₂₂, LSID₁₅₆, LPRD₁₆₆, IQFD₁₇₀, KGVD₁₇₆, DFAD₂₀₆, EVVD₄₉₀, YEGD₄₉₆, und VEED₅₀₂ (Abbildung 16A). In jedem dieser Motive wurde in einem *site-directed mutagenesis*-Verfahren die Aminosäure Aspartat durch Alanin ersetzt und die mutierten 5-LO-Proteine in *in vitro*-Studien mit rekombinanter Caspase-6 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass nur die mutierte 5-LO-D170A gegen den Angriff der Caspase-6 resistent war (Abbildung 16B). Alle anderen mutierten 5-LO-Proteine ließen sich in Analogie zur Wildtyp-5-LO durch die Caspase-6 zu einem 58 kDa-Spaltfragment abbauen. Die Caspase-6 scheint somit das Konsensus-Tetrapeptid IQFD₁₇₀ innerhalb der 5-LO als Spaltmotiv zu erkennen. In Kontrollexperimenten wurde ein synthetisches Peptid Ac-IQFD-*p*NA (Biosynthan GmbH, Berlin) durch die Caspase-6 prozessiert, während das Peptid Ac-IQFA-*p*NA (Biosynthan GmbH, Berlin) nicht als Substrat umgesetzt wurde (nicht gezeigt).

A

5-LO: 116 AKLAR**DD**QIHILKQHRRKELETRQKQYRWMEWNG
 151 FPL**S**IAKCHKD**LPRDIQFDSEKGVDFVL**NYSKAM
 187 ENLFINRFMHMQSSW**NDFAD**FEKIFVKISNTISERV
 485 TA**EVVDIYYEGDQVVEED**PELQDFVNDVYVYGM

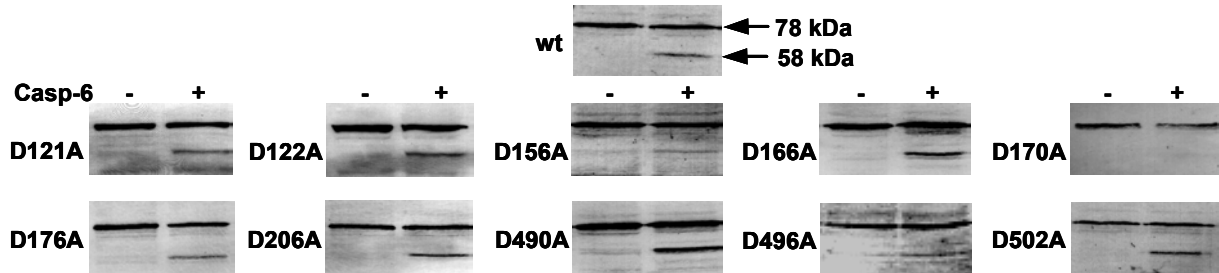
B

Abbildung 16: (A) Potentielle Erkennungssequenzen für Caspase-6 mit einer Homologie zum Tetrapeptid VEID innerhalb der 5-LO-Primärstruktur. (B) *In vitro*-Untersuchungen mutierter 5-LO-Proteine nach Austausch von Asp gegen Ala mit rekombinanter Caspase-6. Wildtyp-5-LO und mutierte 5-LO-Proteine sind nach Expression und Aufreinigung mit 0,3 Units Caspase-6 inkubiert worden. Nach 16 Stunden sind Probenaliquots bezüglich des intakten (78 kDa) und des gespaltenen (58 kDa) 5-LO-Proteins im Western blot untersucht worden.

Dieses Ergebnis wird durch das Homologie-basierte 3-dimensionale 5-LO-Modell unterstützt, welches vom Lutz Franke im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Schneider, Institut für Organische Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main entwickelt bzw. berechnet worden ist [23]. Das Modell basiert u. a. auf experimentellen Daten und auf der Röntgenstruktur einer retikulozytären Kaninchen-15-LO (Protein Data Bank ID code 1lox). In diesem Modell befindet sich das Asp170 im potentiellen Spaltmotiv für Caspase-6 auf der Oberfläche des Proteins in direkter Nachbarschaft zu der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO (Abbildung 17). Es scheint dem proteolytischen Angriff durch die Caspase-6 leicht zugänglich zu sein. Möglicherweise bildet die Erkennungssequenz IQFD eine Art Schleife (loop), die mit der C2-ähnlichen Domäne in Kontakt treten kann. Die Spaltung des Enzyms zwischen Asp170 und Ser171 würde zur Trennung der N-terminalen C2-ähnlichen Domäne der 5-LO von der katalytischen Domäne führen, was den Verlust der Enzymaktivität erklären würde.

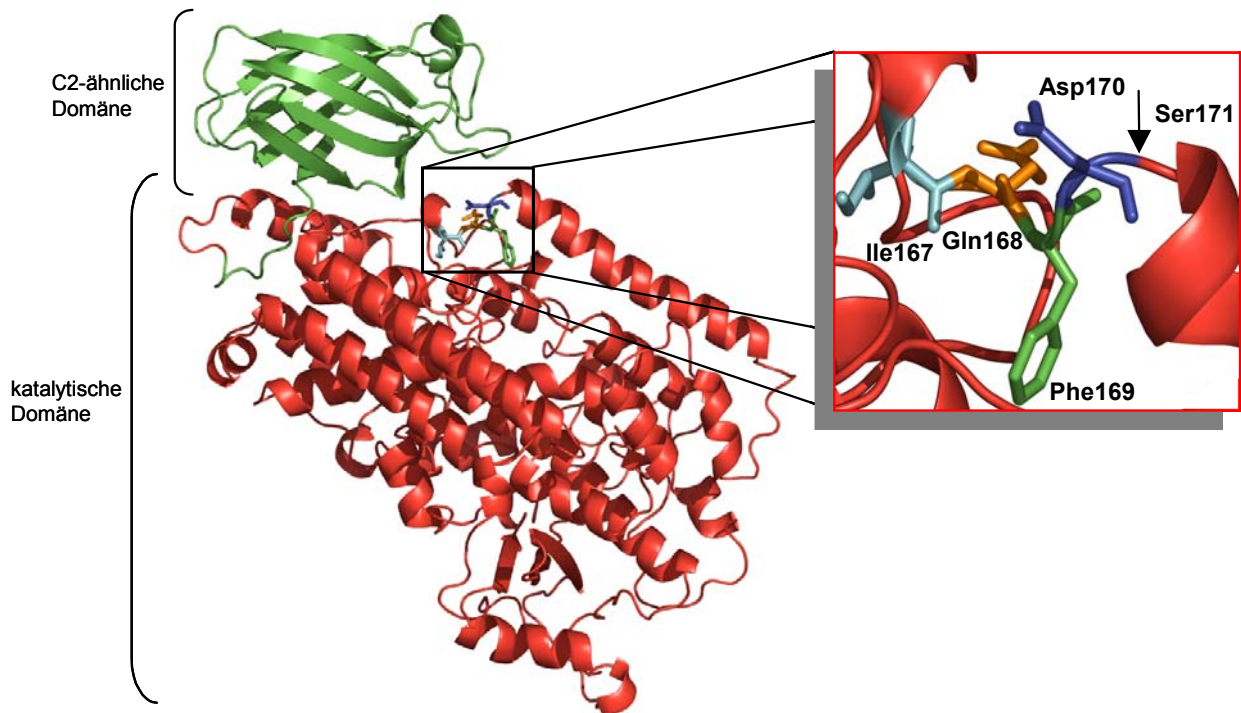


Abbildung 17: Homologie-basiertes 3-dimensionales 5-LO Modell [23]. Vergrößerte Darstellung des potentiellen Erkennungsmotivs IQFD innerhalb der 5-LO für Caspase-6. Die Spaltstelle befindet sich zwischen Asp170 und Ser171 und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Posttranslationale Modifikation (PTM) der 5-LO?

Untersuchungen der 5-LO-Spaltung *in vitro* belegten, dass die 5-LO tatsächlich ein Target für die Caspase-6 darstellt (siehe Kapitel 0 und 0). Dabei wurde ein 5-LO-Spaltprodukt von 58 kDa detektiert. Der Abbau der 5-LO in BL41-E95-A-Zellen resultiert aber in einem 62 kDa-Spaltprodukt. Es lag die Vermutung nahe, dass die prozessierte 5-LO in den B-Lymphozyten nachträglich posttranslational modifiziert wird. Alternativ könnte zunächst die intakte 5-LO einer Modifikation unterworfen werden, die möglicherweise als Signal für die 5-LO-Spaltung dient. Im Folgenden wurden einige Versuche unternommen, um dieses Phänomen aufzuklären.

Ubiquitinierung

BL41-E95-A-Zellen sind 24 Stunden nach dem Passagieren geerntet und die Zellsuspensionen homogenisiert worden. Homogenate, die sowohl das intakte als auch das gespaltene 5-LO-Protein enthielten, wurden mit rekombinanten Ubiquitin-abspaltenden

(deubiquitinierenden) Enzymen Isopeptidase-T (Ipase-T) und Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L3 (UCHL3) von Boston Biochem, Cambridge, MA in den angegebenen Konzentrationen für 0,5, 1 oder 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine aus *E. coli* gewonnene 5-LO, die zuvor in einem *in vitro*-Experiment durch rekombinante Caspase-6 zum 58 kDa-Fragment gespalten wurde, unter identischen Bedingungen mit Ipase-T bzw. UCHL3 behandelt. Anschließend wurden die Proben mittels Western blot untersucht.

Der Abbildung 18A kann entnommen werden, dass die Größe des 62 kDa-5-LO-Fragments aus BL41-E-95A-Zellen selbst nach zweistündiger Inkubation mit deubiquitinierenden Enzymen unverändert blieb. Der Größenunterschied der beiden 5-LO-Spaltfragmente (aus B-Lymphozyten verglichen mit rekombinanter 5-LO nach Spaltung *in vitro*) blieb weiterhin bestehen. Dieses Ergebnis lässt schlussfolgern, dass es sich bei der vermeintlichen posttranslationalen Modifikation des 5-LO-Spaltfragmentes nicht um Ubiquitinierung handelt. In der Literatur ist häufig über Schwierigkeiten berichtet worden, die eine solche PTM-Abspaltung *in vitro* bergen kann. Daher ist ein weiterer Versuch zur Bestätigung des Befundes vorgenommen worden.

Die 5-LO aus BL41-E95-A-Zellen wurde nach entsprechender Kultivierungszeit der Zellen (24 Stunden bzw. 5 Tage) mittels anti-5-LO-Serum (Maus-Serum stammte von Ilse Zündorf, Arbeitskreis Prof. Dr. Th. Dingermann, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main) und Protein A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) immunopräzipitiert. Durch Versetzen der Proben mit SDS-PAGE-Ladepuffer (1:1, V/V) und Erhitzen auf 95°C für 7 min sind alle Komplexe zerstört worden. Die Auswertung der Proben hinsichtlich 5-LO und Ubiquitin bzw. ubiquitiniertes Proteine (anti-Ubiquitin-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology) erfolgte mittels Western blot. Nach der Behandlung der Western blot-Membran mit anti-Ubiquitin-Antikörper (anti-UB-AK) konnten ein oder mehrere ubiquitinierte Proteine (Abbildung 18B, Darstellung links) von ca. 52-56 kDa Größe detektiert werden. Die anschließende Inkubation derselben Membran im anti-5-LO-Antikörper machte deutlich, dass es sich bei diesem/diesen ubiquitinierten Protein(en) nicht um die 5-LO handelt (Abbildung 18B, Darstellung rechts), da auf der Membran eine zusätzliche Bande von 78 kDa-Größe eindeutig als 5-LO-Protein identifiziert wurde.

Während der Durchführung der Immunopräzipitation zeigte sich allerdings folgende Schwierigkeit: das 5-LO-Protein konnte auch ohne die Zugabe des anti-5-LO-Serums eine direkte Bindung mit den Agarose-Beads eingehen. Aus diesem Grund konnte also keine Vorreinigung der Proben durchgeführt werden, um die an die Beads unspezifisch bindenden

Proteine zu entfernen, da das 5-LO-Protein offensichtlich selbst zu diesen Proteinen gehört. Weiterhin bestand die Möglichkeit, nur das intakte 5-LO-Protein der Immunopräzipitation zu unterwerfen, da das anti-5-LO-Mausserum die prozessierte 5-LO nicht erkennen kann. Der einzige Antikörper, der zum Nachweis prozessierter 5-LO zur Verfügung stand, war der am Karolinska-Institut in Schweden hergestellte anti-5-LO-Antikörper AK7, 1551. Zur Gewinnung dieses Antikörpers wurde das Kaninchen allerdings mit denaturierter 5-LO immunisiert, so dass es für die Immunopräzipitation des intakten 5-LO-Spaltfragmentes nicht geeignet ist.

Insgesamt lässt sich das durch die Immunopräzipitation erreichte Ergebnis trotzdem als befriedigend einstufen.

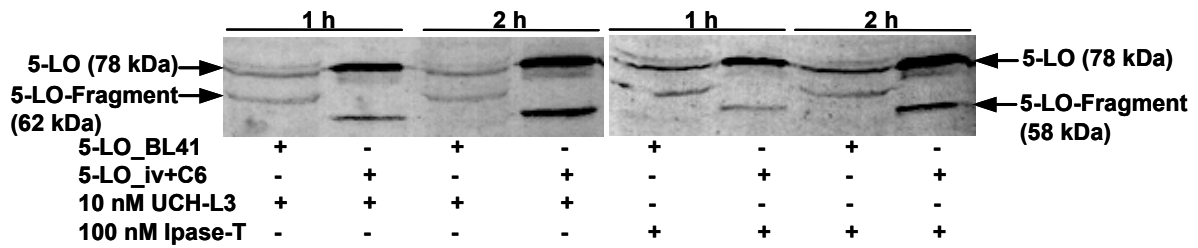
Glykosylierung

Das Migrationsverhalten der einzelnen Proteine in einem Polyacrylamidgel kann durch mögliche Proteinmodifikationen sowie Zusammensetzung des aufgetragenen Proteingemischs beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die vermeintliche posttranslationale Modifikation der 5-LO eine Konjugation mit Zucker-Resten darstellt, auch wenn eine reine Massenveränderung durch Glykosylierung sich vermutlich nicht in einem Größen-Shift von ca. 4 kDa in einem SDS-Polyacrylamidgel äußern würde.

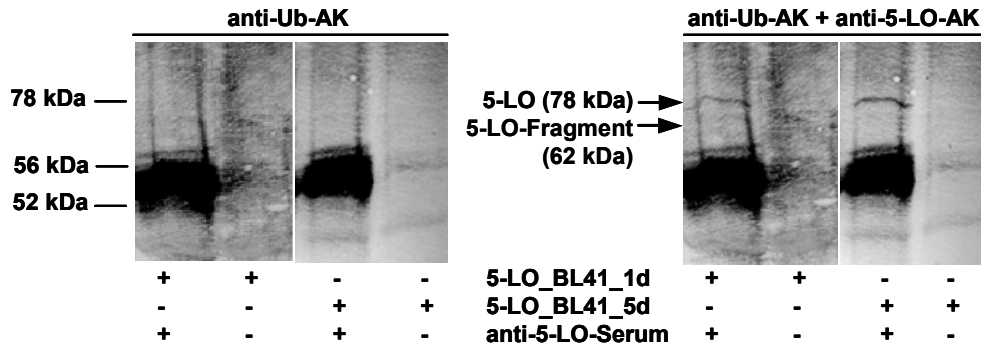
Homogenate von BL41-E95-A-Zellen (1 Tag und 5 Tage) wurden mit je 500 Units PNGase F (N-Glykosidase F, New England Biolabs) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine in *E. coli* gewonnene 5-LO, die zuvor in einem *in vitro*-Experiment mit rekombinanter Caspase-6 zum 58 kDa-Fragment gespalten wurde, unter identischen Bedingungen mit PNGase F behandelt. Anschließend sind die Proben mittels Western blot untersucht worden.

Der schwach erkennbare Massenshift, der in der Abbildung 18C nach der Behandlung der Probe BL41_1d mit PNGase F beobachtet werden kann (zweite Bande von links), spiegelt keinesfalls den zu untersuchenden Größenunterschied der 5-LO-Spaltfragmente wieder. Die gesuchte PTM scheint demnach nicht die Glykosylierung der 5-LO darzustellen.

A



B



C

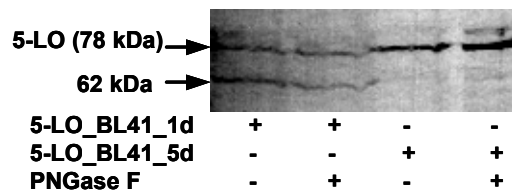


Abbildung 18: Untersuchungen möglicher posttranslationaler Modifikationen der 5-LO. (A) Größenvergleich der 5-LO-Spaltfragmente aus BL41-E95-A-Homogenaten (5-LO_BL41) und *in vitro*-Experimenten (5-LO_iv+C6) nach Inkubation mit deubiquitinierenden Enzymen UCH-L3 (10 nM) und Ipace-T (100 nM). Probenaliquots sind nach einer bzw. zwei Stunden mittels Western blot bezüglich der 5-LO untersucht worden. (B) Darstellung von ubiquitinierten Proteinen (Darstellung links) und 5-LO-Protein (Darstellung rechts) nach Immunopräzipitation der BL41-E95-A-Proben mit anti-5-LO-Mausserum. Es handelt sich dabei um die Immunopräzipitation intakter 5-LO aus BL41-E95-A-Zellen, die für einen Tag (5-LO_BL41_1d) oder 5 Tage (5-LO_BL41_5d) nach dem Umsetzen kultiviert wurden. (C) Größenvergleich der 5-LO-Spaltfragmente aus BL41-E95-A-Homogenaten nach Inkubation mit deglykosylierendem Enzym PNGase F (500 Units) für eine Stunde.

Phosphorylierung

In Zelllinien wie PMNL oder MM6 ist die Phosphorylierung der 5-LO nachgewiesen worden [58-60]. Drei potentielle Phosphorylierungsstellen am 5-LO-Protein sind bekannt (siehe auch Abbildung 1). Zwei dieser Stellen sind als aktivierend beschrieben worden: Ser271 [61] und

Ser663 [62]. Die Phosphorylierung am Ser523 scheint dagegen zu einer 5-LO-Inaktivierung zu führen [63].

Theoretisch sind die potentiell konjugierten Phosphat-Reste für den beobachteten Größenunterschied der beiden 5-LO-Spaltfragmente zu klein. Nichtsdestotrotz ist die Möglichkeit der 5-LO-Phosphorylierung in BL41-E95-A-Zellen untersucht worden.

Homogenate von BL41-E95-A-Zellen (1 Tag und 5 Tage) wurden entweder mit 3 Units der Protein-Phosphatase-1 (PP1, New England Biolabs) oder mit 25 Units der LAR Protein-Tyrosin-Phosphatase (LAR, New England Biolabs) für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine in *E. coli* gewonnene 5-LO, die zuvor in einem *in vitro*-Experiment durch rekombinante Caspase-6 zum 58 kDa-Fragment gespalten wurde, unter identischen Bedingungen mit PP1 bzw. LAR behandelt. Anschließend sind die Proben mittels Western blot untersucht worden. Diese Versuche zur Abspaltung von möglichen Phosphat-Resten zeigten ebenfalls keine signifikante Größenänderung des 5-LO-Spaltfragmentes aus B-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Zweidimensionale Elektrophorese

Die Möglichkeit der zweidimensionalen Elektrophorese (2-DE) mit anschließender Untersuchung des 5-LO-Proteins mittels MALDI-MS lieferte einen weiteren Ansatz zur Aufklärung der potentiellen PTM des Enzyms. Bis zu 120×10^6 der BL41-E95-A-Zellen sind in 125 µl Rehydrierungspuffer für IEP nach Amersham aufgenommen worden. Gleichzeitig ist auch die rekombinant hergestellte und anschließend im *in vitro*-Experiment gesplattene 5-LO für die IEF vorbereitet worden. Nach Auftragen der Proben auf die 7 cm IEP-Streifen (pH 3-10 linear bzw. pH 4-7 linear) und Rehydrierung bei Raumtemperatur für ca. 10 Stunden sind die Proben einer Isoelektrischen Fokussierung (Bedingungen nach Amersham) unterworfen worden. Für die zweite Dimension sind 10%-ige SDS-Acrylamidgele verwendet worden. Im Western blot-Verfahren erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran und das 5-LO-Protein wurde mittels anti-5-LO-Antikörper bzw. durch direktes Anfärben im Gel mit Silber nach Blum et al. [262] detektiert.

Basierend auf den Ergebnissen der 2-DE lässt sich festhalten, dass die BL41-E95-A-Zellen eine viel zu geringe Menge des 5-LO-Proteins enthalten, um dieses mittels Silberfärbung im Polyacrylamid-Gel darstellen zu können. Die Menge an 5-LO-Protein reichte demzufolge auch für die Untersuchungen mit MALDI-MS nach der 2-DE und anschließendem tryptischem Verdau nicht aus. Die Fokussierung der 5-LO war mit einigen technischen

Schwierigkeiten verbunden. Die 5-LO aus BL41-E95-A-Zellen wurde unter variierten Fokussierungsbedingungen im gesamten pH-Bereich (pH 3-10) wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei der 5-LO um ein, zumindest teilweise, membranständiges Protein handelt, war diese Tatsache nicht weiter verwunderlich.

Subzelluläre Lokalisation der 5-LO in B-Lymphozyten

In einigen Zelllinien, z. B. in primären Granulozyten (PMNL), transloziert die 5-LO während der Aktivierung aus dem Zytosol an die Kernmembran, wo sie letztendlich die Arachidonsäure als Substrat umsetzt. Die subzelluläre Verteilung der intakten und gespaltenen 5-LO in BL41-E95-A-Zellen war demnach von Interesse. BL41-E95-A-Zellen wurden für 24 Stunden ins frische Medium verdünnt (1 Tag) bzw. weiterhin im bereits konditionierten Medium für weitere 24 Stunden kultiviert (5 Tage). Je 20×10^6 Zellen wurden mittels NP40 (0,1%-ig) lysiert und wie unter 0 beschrieben einer Fraktionierung unterworfen. Anschließend wurde die zelluläre Lokalisation der 5-LO im Western blot untersucht. Wie der Abbildung 19A entnommen werden kann, befand sich die intakte 5-LO, unabhängig von der Wachstumsdauer der Zellen, in der zytosolischen Fraktion. Dabei schien sie zum Teil an die Plasmamembran gebunden zu sein (Fraktion PM), und zum Teil befand sie sich in löslicher Form im Zytosol (Fraktion Z). Das Spaltprodukt der 5-LO wurde erwartungsgemäß nur in frisch passagierten Zellen (1 Tag) beobachtet. Es ließ sich ausschließlich in der nukleären partikulären Fraktion detektieren (Fraktion NM), d.h. gebunden (direkt oder indirekt) an die Kernmembran. Die Aktivität der Caspase-8 und der Caspase -6 (Abbildung 19B, Graph) sowie die Proteine Caspase-8 und Caspase-6 (Abbildung 19B, Western blots) sind ausschließlich im Zytosol detektiert worden. Demnach scheint die intakte 5-LO im Zytosol gespalten worden zu sein, wobei das Spaltfragment anschließend an die Kernmembran gebunden vorliegt.

Die Frage der zellulären Verteilung intakter und gespaltenener 5-LO sollte zusätzlich nach immunohistochemischer Färbung der B-Lymphozyten unter einem konfokalen Lasermikroskop genauer untersucht werden. Diese Versuche sind aufgrund geringer 5-LO-Expression in BL41-E95-A-Zellen gescheitert, da man recht schnell an die Nachweisgrenze der Methode kam. Zum Nachweis prozessierter 5-LO stand außerdem nur ein Antikörper zur Verfügung, der ausschließlich denaturiertes 5-LO-Protein erkennen konnte (anti-5-LO-Antikörper AK7, 1551). Dieser Antikörper war zwar für Immundetektion bei Western blot-

Untersuchungen geeignet, konnte aber nicht zum Anfärben des gespaltenen Enzyms in intakten Zellen verwendet werden.

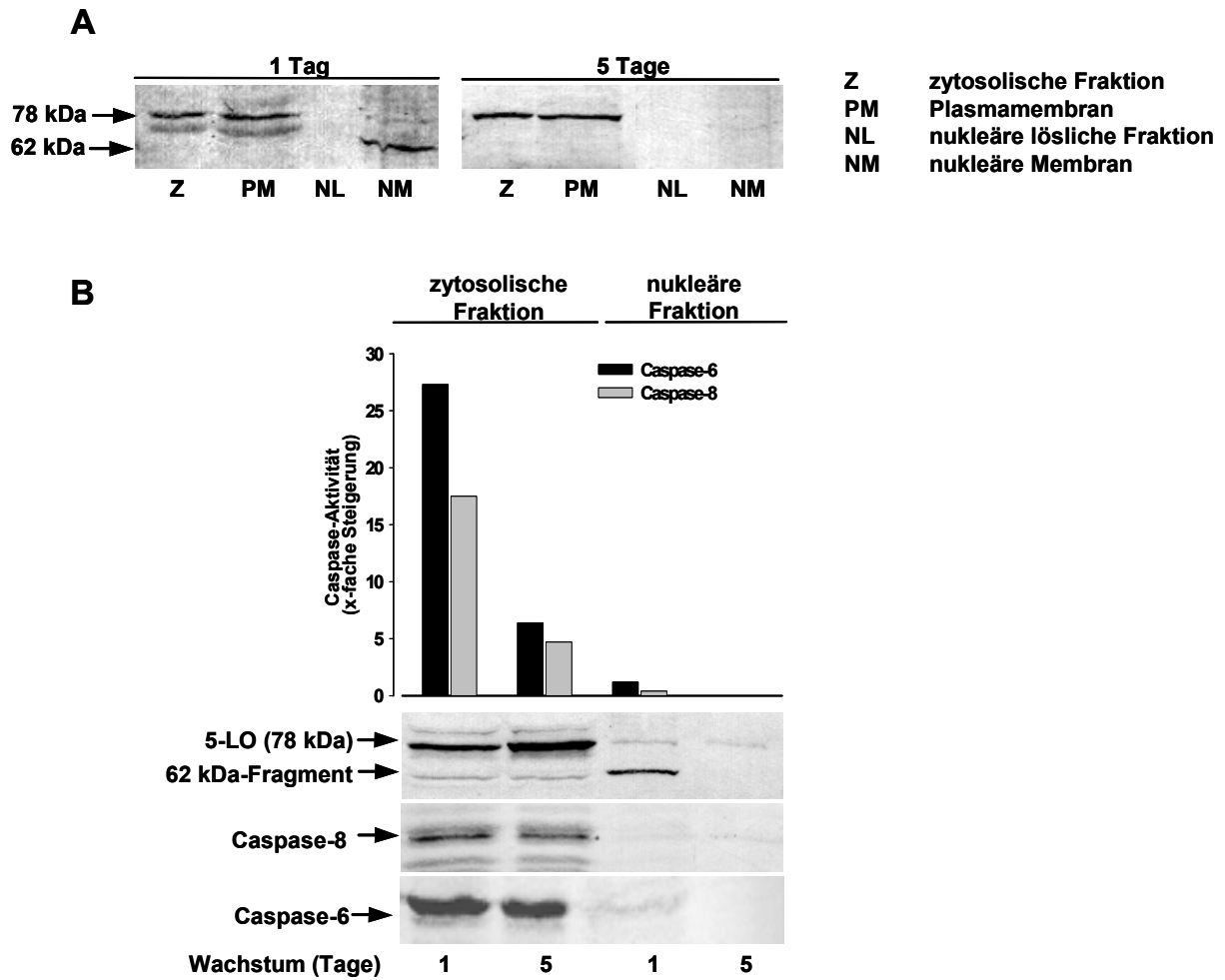


Abbildung 19: Zelluläre Lokalisation der 5-LO in B-Lymphozyten. (A) BL41-E95-A-Zellen sind 1 Tag oder 5 Tage nach Umsetzen der Zellen einer NP40-Lyse mit anschließender Fraktionierung der Proben unterworfen worden. Die Subzelluläre Verteilung der intakten und gespaltenen 5-LO aus BL41-E95-A-Zellen wurde mittels Western blot untersucht. (B) Bestimmung der Caspase-8- und -6-Aktivität (Graph) und der Proteinmenge (Western blot) sowie des 5-LO-Proteins in zytosolischen und nukleären Zellkompartimenten der BL41-E95-A-Zellen nach NP40-Lyse und Probenfraktionierung. Die Aktivitätsbestimmung der Caspase-8 und -6 (Graph) erfolgte in einem einmaligen Experiment und kann nicht als statistisch signifikant gewertet werden. Die im Western blot ermittelte Verteilung der Proteine 5-LO, Caspase-6 und Caspase-8 basiert auf Ergebnissen aus drei unabhängigen Experimenten.

5-LO in weiteren Zelllinien

Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (zu ca. 80% konfluent gewachsen) sind mit 10 µg des pcDNA-5LO-Plasmids [89] durch Calcium-Phosphat-Präzipitation transient transfiziert worden. Die Zellen sind für 16 Stunden mit dem Präzipitat inkubiert worden bevor dann das Wachstumsmedium durch frisches Medium ersetzt wurde. Zur Aktivierung der Caspasen sind gleichzeitig zu einem Teil der Zellen typische apoptotische Stimuli in indizierten Konzentrationen zugesetzt worden: TNF α (50 ng/ml), CHX (1 µg/ml), Daunorubicin (DR, 3 µM). Nach weiteren 24 Stunden sind die Zellen geerntet und bezüglich des 5-LO-Proteins im Western blot untersucht worden.

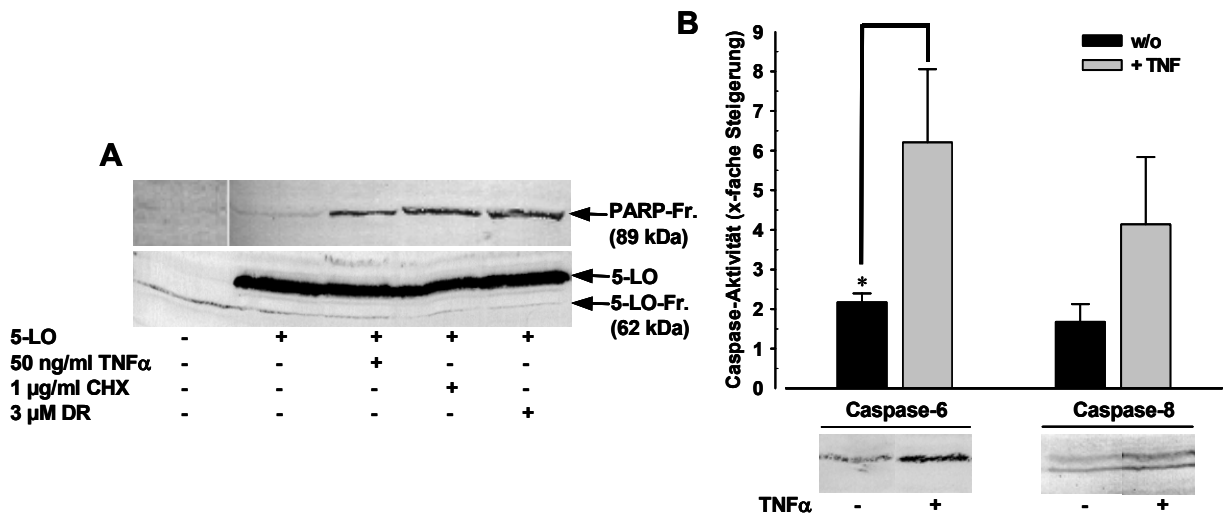


Abbildung 20: Überexpression der 5-LO in HeLa-Zellen. (A) Darstellung von 5-LO und PARP-Fragment nach Inkubation der HeLa-Zellen mit apoptotischen Stimuli. Nach der Transfektion der HeLa-Zellen mit 5-LO-Expressionsplasmid sind Zellen mit apoptotischen Agentien (TNF α , CHX, DR) in indizierten Konzentrationen inkubiert worden. Nach 24 Stunden erfolgte die Untersuchung von 5-LO und PARP im Western blot. (B) Überprüfung der Aktivität (Graph) und der Proteinmenge von Caspase-6 und -8 (Western blot) nach Behandlung der HeLa-Zellen mit 50 ng/ml TNF α für 24 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen (w/o). *, $P < 0,05$, ermittelt durch Student's t-Test.

Wie der Abbildung 20A entnommen werden kann, wurde in allen Zellen, behandelt wie unbehandelt, die intakte 5-LO exprimiert. In keiner der Proben ist allerdings eine 5-LO-Degradation detektiert worden. PARP, eine nukleäre Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, stellt ein typisches Substrat für die Caspasen während der Apoptose dar. In allen HeLa-Zellen, die mit apoptotischen Agentien stimuliert wurden, konnte im Gegensatz zur nicht gespaltenen

5-LO ein deutliches PARP-Spaltfragment von 89 kDa Größe detektiert werden (Abbildung 20A). Die Spaltung von PARP lässt somit auf die Anwesenheit aktiver Caspasen in stimulierten HeLa-Zellen schließen.

Die zusätzliche Überprüfung der Aktivität der Caspase-6 und Caspase-8 in HeLa-Zellen, die für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF α behandelt wurden, hat ergeben, dass die Aktivität der beiden Caspasen unter TNF α -Einfluss ungefähr auf das 3-fache anstieg (Abbildung 20B).

Da die Menge an endogener Caspase-6 in transfizierten HeLa-Zellen im Vergleich zum deutlich überexprimierten 5-LO-Protein möglicherweise für die Spaltung der 5-LO nicht ausreicht, wurde in folgenden Experimenten eine Kotransfektion von pcDNA-5LO und pSG5-Caspase-6 im Verhältnis 10:1 durchgeführt. Um die Aktivität der Caspase-6 eventuell noch zu verstärken, sind einige Proben zusätzlich mit 200 ng/ml TNF α behandelt worden. Wie in der Abbildung 21A deutlich zu erkennen exprimierten die mit dem Plasmid pSG5-Caspase-6 transfizierten HeLa-Zellen nun signifikant mehr Caspase-6. Die Aktivität der Caspase-6 korrelierte mit der Caspase-6-Proteinmenge und ließ sich durch TNF α -Behandlung der Zellen nicht signifikant steigern (Daten nicht gezeigt).

Die erhöhte Expression der Caspase-6 hatte keinen prozessierenden Einfluss auf die 5-LO, unabhängig von der Behandlung der Zellen mit TNF α (Abbildung 21A). Im Gegensatz dazu konnte in den HeLa-Zellen, die nach Transfektion mit pSG5-Caspase-6 nun deutlich mehr Caspase-6 enthielten, eine erhöhte Prozessierung von PARP zu dem 89 kDa-Spaltfragment detektiert werden (Abbildung 21A). Die PARP-Prozessierung konnte durch Behandlung der Zellen mit TNF α zusätzlich verstärkt werden.

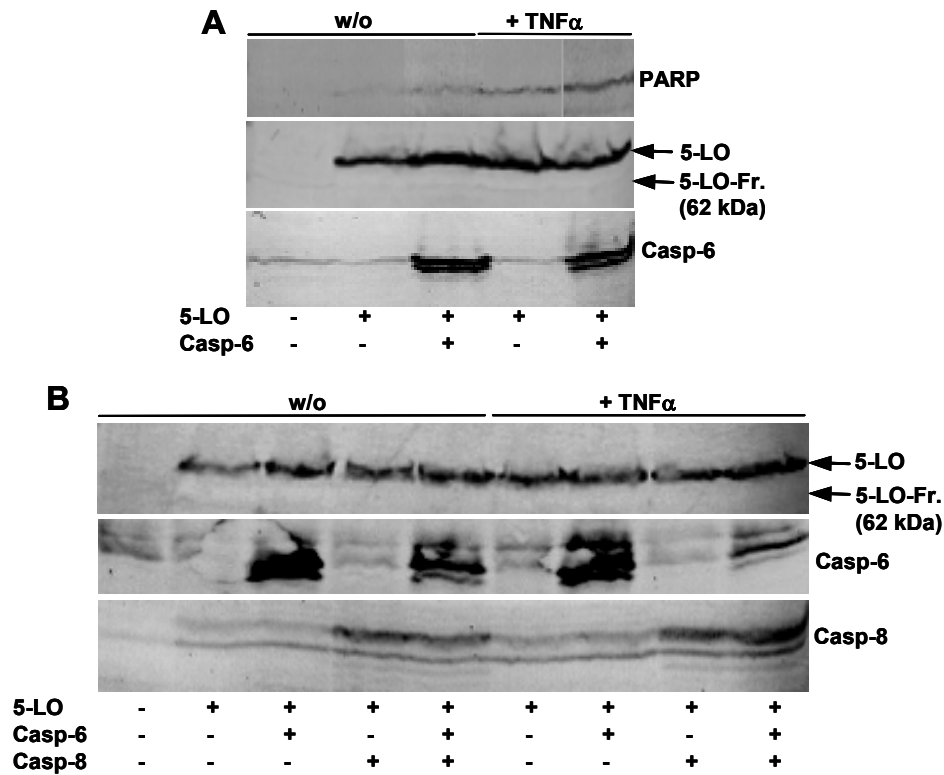


Abbildung 21: Kotransfektion der HeLa-Zellen mit 5-LO und Caspase-6 und/oder Caspase-8. (A) HeLa-Zellen sind mit Expressionsplasmiden für 5-LO und Caspase-6 transient transfiziert worden. Ein Teil der Zellen ist mit TNF α (200 ng/ml) für 24 Stunden behandelt worden. Die Überprüfung der Expression von 5-LO, Caspase-6 und PARP erfolgte via Western blot. (B) Überprüfung der Expression von 5-LO, Caspase-6 und Caspase-8 in HeLa-Zellen nach Kotransfektion der Zellen mit Expressionsplasmiden für alle drei Proteine mit und ohne TNF α -Behandlung für 24 Stunden.

Da für den Abbau der 5-LO eventuell der Zusammenspiel zweier Caspasen (initiatorische Caspase-8 und effektorische Caspase-6) benötigt wird, sind die HeLa-Zellen teilweise mit drei verschiedenen Plasmiden transient transfiziert worden: pcDNA-5LO, pSG5-Caspase-6 und pSG5-Caspase-8 (im Verhältnis 10:1:1). Ein Teil der Zellen ist mit 200 ng/ml TNF α zum Zeitpunkt des Mediumwechsels versetzt worden. Nach 24 Stunden ist die Expression von 5-LO, Caspase-6 und Caspase-8 im Western blot untersucht worden. In HeLa-Zellen konnte wiederum nur die Expression eines intakten 5-LO-Proteins detektiert werden (Abbildung 21B). Die verstärkte Expression von Caspase-6 und -8 in HeLa-Zellen führte nicht zum Abbau des 5-LO-Proteins und zum Auftreten eines 5-LO-Spaltfragmentes.

In Kontrollexperimenten ließ sich interessanterweise die von den HeLa-Zellen endogen exprimierte cPLA2 allein durch die Zugabe von TNF α bzw. CHX konzentrationsabhängig spalten (Abbildung 22A und B). Hierfür war keine Überexpression der verantwortlichen

Caspasen nötig [263, 264]. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte bereits der Nachweis der PARP-Spaltung durch die aktivierten Caspasen (vergl. Abbildung 20A und Abbildung 22B). Möglicherweise wird die 5-LO in den HeLa-Zellen durch einen Schutzmechanismus dem proteolytischen Angriff der Caspase-6 entzogen.

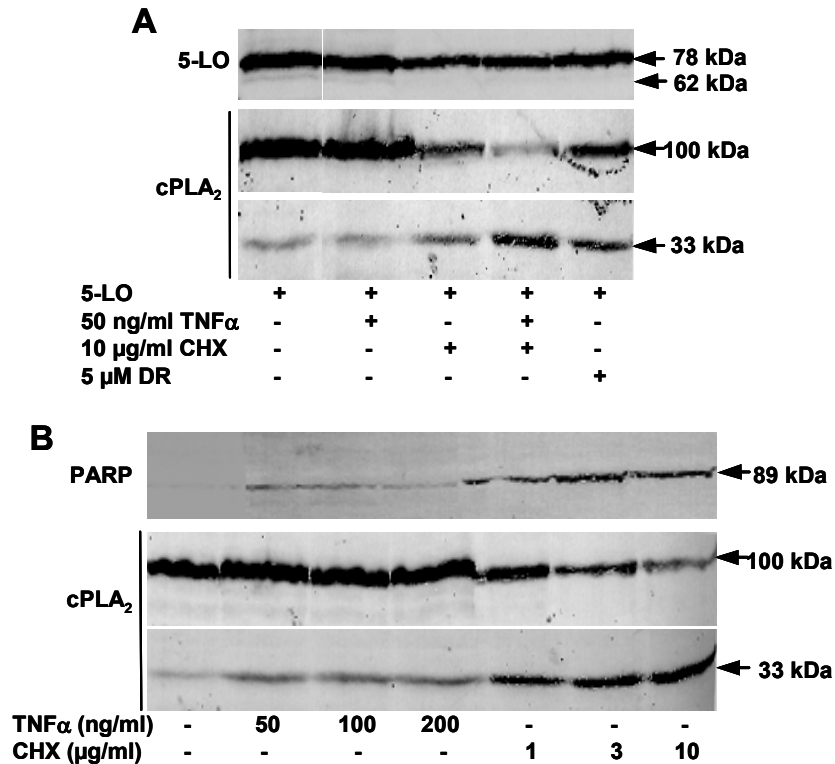


Abbildung 22: (A) Untersuchung der Prozessierung des überexprimierten 5-LO-Proteins in HeLa-Zellen nach Behandlung der Zellen mit apoptotischen Agentien (TNF α , CHX, DR). Spaltung von cPLA₂ (A und B) und PARP (B) in HeLa-Zellen nach Transfektion mit 5-LO-Expressionsplasmid und Inkubation der Zellen mit TNF α , CHX oder DR in indizierten Konzentrationen für 24 Stunden.

Für die Untersuchungen der subzellulären Verteilung der Proteine 5-LO und Caspase-6 wurden HeLa-Zellen mit pcDNA-5LO transfiziert und ein Teil der Zellen für 24 Stunden mit 100 ng/ml TNF α inkubiert. Die Zellen sind, wie unter 0 beschrieben, einer NP40-Lyse unterworfen und die Proteine in zytosolische und nukleäre getrennt worden. Western blot-Untersuchungen zufolge, verteilte sich die 5-LO zwischen den beiden Zellkompartimenten (Abbildung 23, Western blot). Die Aktivität der Caspase-6 (Abbildung 23, Graph) sowie die Proteine Caspase-6 und Caspase-8 (Abbildung 23, Western blot) wurden ebenfalls in unbehandelten Zellen und nach Inkubation mit 100 ng/ml TNF α für 24 Stunden sowohl in der zytosolischen als auch in der nukleären Fraktion detektiert

Die Proteine 5-LO und Caspase-6 bzw. Caspase-8 werden also nicht aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation räumlich voneinander getrennt. Diese Annahme liefert daher keine mögliche Erklärung für die fehlende Prozessierung der 5-LO durch die Caspase-6.

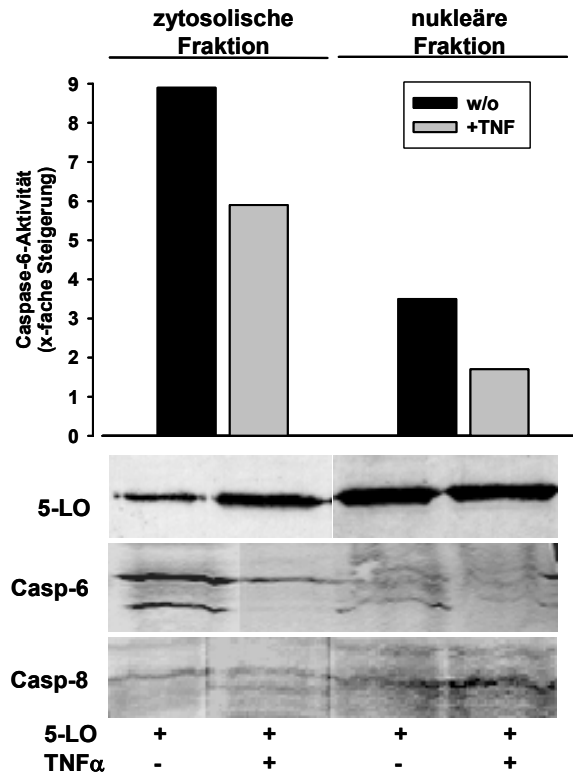


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation der 5-LO und der Caspase-6 und -8 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit dem 5-LO-Plasmid transient transfiziert und ein Teil der Zellen wurde für 24 Stunden mit 100 ng/ml TNF α behandelt. Nach NP40-Lyse und Fraktionierung subzellulärer Bestandteile ist die Aktivität der Caspase-6 (Graph) sowie die Proteinmenge von 5-LO, Caspase-6 und -8 (Western blot) in zytosolischer und nukleärer Fraktion ermittelt worden. Die Bestimmung der Caspase-6-Aktivität erfolgte in einem einmaligen Experiment und kann daher nicht als signifikant gewertet werden. Die mittels Western blot ermittelte Verteilung der Proteine 5-LO, Caspase-6 und Caspase-8 geht aus drei unabhängigen Experimenten hervor.

Experimente, in denen das Plasmid pcDNA3.1-5LO-D170A zur Transfektion von HeLa-Zellen verwendet wurde, führten zu einem vergleichbaren Ergebnis wie nach der Expression von WT-5-LO. Das verwendete Expressionsplasmid kodiert für das mutierte 5-LO-D170A-Protein, in dem die Aminosäure Aspartat in Position 170 durch Alanin ersetzt wurde. Wie bereits erwähnt, konnte durch *in vitro*-Experimente an der mutierten 5-LO-D170A gezeigt werden, dass die Spaltung der 5-LO durch die Caspase-6 offensichtlich hinter dem Asp170

erfolgt (siehe Kapitel 0). Die Spaltung der in den HeLa-Zellen überexprimierten Wildtyp-5-LO durch die Caspase-6 konnte unter keinen Bedingungen detektiert werden. Daher war es auch nicht möglich einen Unterschied in der Degradation der Wildtyp- und der mutierten 5-LO-D170A in HeLa-Zellen zu untersuchen (Daten nicht gezeigt).

5-LO in MM6-, RBL-1-, PMNL-Zellen

Der Einfluss des Zelltransfers ins frische Medium auf den 5-LO-Abbau ist in einigen weiteren Suspensions-Zelllinien untersucht worden.

Die humane monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) wurde durch die Zugabe von 2 ng/ml TGF β und 50 mM Calcitriol für vier Tage differenziert, wobei die Zellen unter diesen Bedingungen die 5-LO-Expression hoch regulieren. Anschließend sind die Zellen analog zu den Versuchen mit B-Lymphozyten ins frische Medium passagiert worden. Das Umsetzen der MM6-Zellen führte weder zur Aktivierung der Caspasen noch zur Spaltung des 5-LO-Proteins. In weiteren Experimenten sind die Zellen mit typischen apoptotischen Stimuli (CHX, TNF α) in indizierten Konzentrationen für 24 Stunden behandelt worden. Auch diese Behandlung hatte keine Spaltung der 5-LO zur Folge (nicht gezeigt).

In gleicher Weise ist auch mit RBL-1-Zellen (basophile Leukämiezellen der Ratte) verfahren worden. Die von den RBL-1-Zellen exprimierte 5-LO ließ sich auch weder durch Zellumsetzung noch durch Behandlung der Zellen mit CHX spalten (nicht gezeigt).

Die Kultivierung von primären Granulozyten (PMNL), die zuvor aus humanem Blut isoliert wurden, für bis zu 36 Stunden bei 37°C sowie entsprechende Behandlung dieser Zellen mit apoptotischen Agentien, resultierten erneut weder in der Aktivierung der Caspasen noch in der Spaltung des 5-LO-Proteins (nicht gezeigt).

Es ist denkbar, da auch in diesen untersuchten Zelllinien die 5-LO durch einen Schutzmechanismus dem Abbauprozess entzogen wird.

***In vitro*-Untersuchungen mit 5-LO aus humanen Zelllinien**

HeLa-Zellen, die zuvor mit 10 μ g des pcDNA-5LO-Plasmids transient transfiziert wurden, sind in PBS aufgenommen und mittels Ultraschall-Sonotrode homogenisiert worden. Nach einer Ultrazentrifugation (100.000 g, 70 min, 4°C) wurde der sogenannten 100.000 g-Überstand (S-100) gewonnen, welcher anschließend in einem *in vitro*-Experiment mit rekombinanter Caspase-6 inkubiert wurde (siehe Kapitel 0). Differenzierte MM6-Zellen (5-LO-positive Zellen) und BL41-E95-A-Zellen (5 Tage nach dem Passagieren) sind in gleicher Weise präpariert und mit je 0,3 Units Caspase-6 *in vitro* inkubiert worden. Als Kontrolle wurde die in *E. coli* rekombinant hergestellte und isolierte 5-LO unter identischen

Bedingungen mit Caspase-6 inkubiert. Probenaliquots sind nach 3 bzw. 18 Stunden Inkubationszeit entnommen und im Western blot auf die Spaltung des 5-LO-Proteins untersucht worden. Die aus *E. coli* gewonnene 5-LO konnte bereits nach 3 Stunden, die 5-LO aus dem S-100 der B-Lymphozyten nach 18 Stunden Inkubation mit Caspase-6 zu einem Spaltprodukt von 58 kDa Größe prozessiert werden. Dagegen blieb die in HeLa-Zellen exprimierte 5-LO sowie die 5-LO aus MM6-Zellen selbst nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden intakt (Abbildung 24) und es entstand kein 5-LO-Spaltfragment.

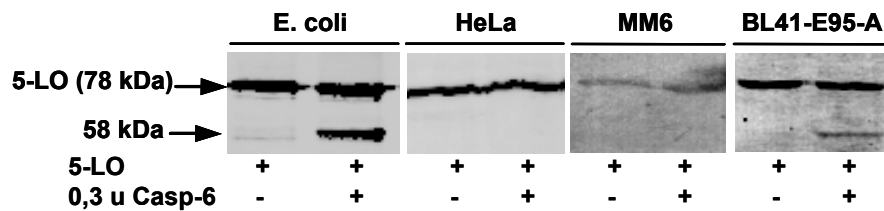


Abbildung 24: Spaltung der 5-LO durch Caspase-6 *in vitro*. Die 5-LO stammte entweder aus *E. coli* oder aus humanen Zelllinien HeLa (mit dem 5-LO-Expressionsplasmid transfiziert), MM6 (mit TGF β und Calcitriol differenziert) oder BL41-E95-A (5 Tage nach Passagieren ins neue Medium). Die 5-LO ist mit je 0,3 Units rekombinanter Caspase-6 für 3 bzw. 18 Stunden inkubiert und anschließend im Western blot untersucht worden.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der 5-LO-Spaltung mit rekombinanter Caspase-6 *in vitro* lieferten die Grundlage für die Annahme, dass die aus HeLa- und MM6-Zellen gewonnenen S-100 neben der 5-LO einen Faktor enthalten, der das 5-LO-Protein vor dem Abbau durch die Caspase-6 schützt. Dieser Schutz könnte sowohl in den Zellen (Kapitel 0 und 0) als auch in zellfreiem System (Kapitel 0) erfolgen.

Zur Aufklärung dieses Mechanismus sind einige weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt worden. BL41-E95-A-Zellen (nach 1 und 5 Tagen Wachstum in frischem Medium), HeLa-Zellen (5-LO-negative und 5-LO-positive, nach Transfektion mit dem pcDNA3.1-5LO-Plasmid) und MM6-Zellen (5-LO-negative und 5-LO-positive, nach Differenzierung mit TGF β und Calcitriol) wurden im Assaypuffer für *in vitro*-Experimente (siehe Kapitel 0) resuspendiert (40×10^6 Zellen in 100 μ l Puffer) und homogenisiert. Die gewonnenen 100.000 g-Überstände sind in steigender Konzentration, entsprechend 2,5, 5, 10, 20 und 30×10^6 Zellen, den *in vitro*-Inkubationsansätzen mit isolierter *E. coli*-5-LO und rekombinanter Caspase-6 zugesetzt worden. Nach 16 Stunden Inkubationszeit bei 37°C sind die Proben bezüglich der 5-LO-Prozessierung durch Caspase-6 im Western blot untersucht

worden. Die S-100 der BL41-E95-A-Zellen haben die Spaltung des 5-LO-Proteins durch die Caspase-6 nicht beeinflusst. Dieses Resultat war von der Kultivierungsdauer der B-Lymphozyten (1 Tag bzw. 5 Tage) unabhängig (Abbildung 25A, Darstellung links). Der S-100 der 5-LO-negativen HeLa-Zellen verhinderte die 5-LO-Spaltung *in vitro* ebenfalls nicht, während die 5-LO-Spaltung nach Zugabe von S-100-Aliquots aus 5-LO-positiven HeLa-Zellen ausblieb (Abbildung 25, Darstellung Mitte). Die Zugabe von MM6-S-100 (aus 5-LO-negativen und positiven Zellen) hatte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die 5-LO-Prozessierung durch die Caspase-6: in niedrigen Konzentrationen (entsprechend $2,5-10 \times 10^6$ Zellen) hatten die S-100-Zusätze keine protektive Wirkung auf die 5-LO, bei höheren Konzentrationen (entsprechend $20-30 \times 10^6$ Zellen), nahm die 5-LO-Prozessierung allerdings ab (5-LO-negative MM6) bzw. blieb ganz aus (5-LO-positive MM6) (Abbildung 25A, Darstellung rechts).

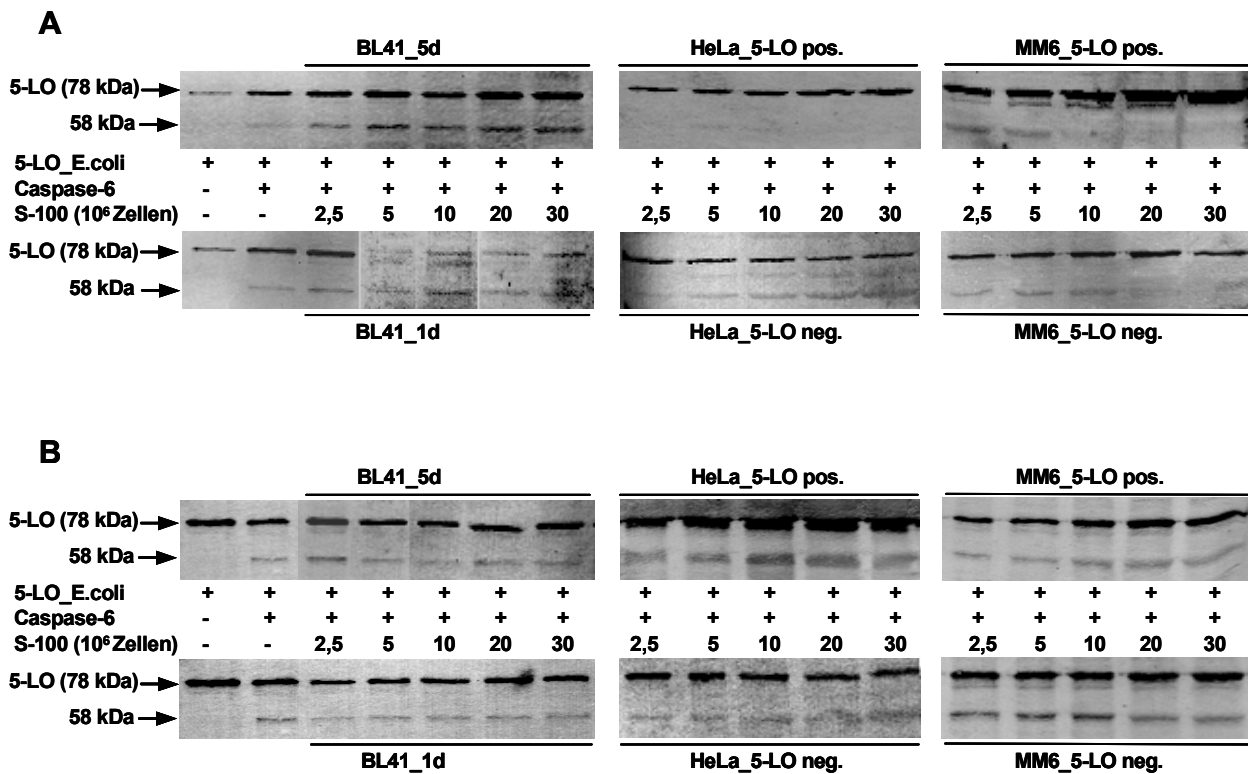


Abbildung 25: Spaltung der 5-LO aus *E. coli* durch rekombinante Caspase-6 *in vitro* unter Zusatz von S-100-Aliquots aus humanen 5-LO-positiven und -negativen Zelllinien in steigenden Konzentrationen (entsprechend $2,5-30 \times 10^6$ Zellen). (A) Gewinnung der S-100-Überstände humaner Zelllinien erfolgte unmittelbar von der Zugabe zu den Inkubationsansätzen der *in vitro*-Experimente. (B) S-100-Überstände wurden direkt nach der Gewinnung bei -20°C eingefroren und unmittelbar vor dem Einsatz in den *in vitro*-Experimenten aufgetaut.

Die S-100 5-LO-positiver HeLa- und MM6-Zellen scheinen einen Faktor zu enthalten, der (mit steigender Konzentration) die 5-LO vor dem Abbau schützt. Dieser Faktor scheint in den 5-LO-negativen MM6-Zellen ebenfalls vorhanden zu sein und kann bei Einsatz der S-100 in höheren Konzentrationen seine protektive Wirkung bezüglich der 5-LO-Spaltung entfalten (Abbildung 25A).

In Kontrollexperimenten wurde die Aktivität der Caspase-6 für alle untersuchten Zelllinien und alle eingesetzten Proben überprüft. Dabei konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Caspase-6-Aktivität beobachtet werden, der mit steigender Menge an eingesetzten S-100 in direkter Korrelation stand (Daten nicht gezeigt). Somit kann nicht fehlende Aktivität der Caspase-6 für das Ausbleiben der 5-LO-Spaltung in den entsprechenden Proben verantwortlich gemacht werden.

In Folgeversuchen wurde die aus *E. coli* isolierte und aufgereinigte 5-LO unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben mit rekombinanter Caspase-6 inkubiert. S-100 aus BL41-E95-A- (1 Tag und 5 Tage), HeLa- (5-LO-positiv und 5-LO-negativ) und MM6-Zellen (5-LO-positiv und 5-LO-negativ) in steigenden Konzentrationen (entsprechend $2,5\text{-}30 \times 10^6$ Zellen) sind erneut zu den *in vitro*-Inkubationsansätzen zugegeben worden. Diesmal sind die S-100-Aliquots direkt nach der Gewinnung bei -20°C eingefroren und unmittelbar vor der Zugabe zu den *in vitro*-Inkubaten aufgetaut worden.

In diesen Experimenten konnte in keiner Probe das Ausbleiben des 5-LO-Abbaus durch Caspase-6 beobachtet werden (Abbildung 25B). Auch die S-100, die in vorhergehenden Experimenten nach direkter Gewinnung eingesetzt wurden und die 5-LO-Spaltung verhinderten (S-100 aus 5-LO-positiven HeLa-Zellen sowie aus MM6-Zellen in höheren Konzentrationen), konnten nun den 5-LO-Abbau durch die Caspase-6 nicht hemmen.

Es ist zu vermuten, dass der von den HeLa- und MM6-Zellen exprimierte Faktor seine 5-LO-protektive Funktion nicht mehr ausüben konnte. Möglicherweise ist dieser Faktor temperaturempfindlich und verliert an Aktivität oder wird gänzlich zerstört bei einer Temperatur von -20°C oder beim Auftauen.

Eine Möglichkeit der 5-LO-Protektion vor dem Caspase-6-Angriff in HeLa-Zellen besteht in der direkten Bindung des schützenden Faktors an die 5-LO. Dadurch könnte das Erkennungstetrapeptid für die Caspase-6 innerhalb des 5-LO-Proteins verdeckt werden.

Das vom Lutz Fischer aus pcDNA3.1-5LO hergestellte Plasmid pcDNA3.1-5LO-3W (siehe Kapitel 0) kodiert für ein mutiertes 5-LO-Protein, in dem drei Tryptophan-Reste durch Alanin ersetzt wurden. Die Aminosäuren Trp13, Trp75 und Trp102 (vergl. Kapitel 0, Abbildung 2B)

werden für die Bindung der 5-LO an Phosphatidylcholin und Lipid-membranen verantwortlich gemacht [31, 35, 42, 47]. Das mutierte 5-LO-3W-Protein kann demnach keine Lipide mehr binden [31]. Ausgehend von der Annahme, dass die HeLa-Zellen einen Lipidfaktor exprimieren, der an die 5-LO bindet und das Protein dadurch vor Abbau durch die Caspase-6 schützt, dürfte seine Wirkung bei der Expression des mutierten 5-LO-3W-Proteins ausbleiben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sind HeLa-Zellen mit 10 µg des Plasmids pcDNA3.1-5LO-3W wie unter 0 beschrieben transfiziert worden. Beim Mediumwechsel 16 Stunden nach der Transfektion ist ein Teil der Zellen mit TNF α (100 ng/ml), CHX (10 µg/ml), oder DR (3 µM) versetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert worden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und bezüglich des 5-LO-Abbaus im Western blot untersucht.

Die Abbildung 26A (Darstellung links) zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit apoptotischen Stimuli keine Degradation des 5-LO-3W-Proteins verursachte, dagegen ist die PARP-Spaltung unter Behandlung mit TNF α , CHX oder DR deutlich zu sehen (Abbildung 26A, Darstellung links). Auch nach der Kotransfektion der HeLa-Zellen mit Plasmiden für 5-LO-3W und Caspase-6 konnte kein 5-LO-Abbauprodukt detektiert werden (Abbildung 26A, Darstellung rechts). Die PARP-Spaltung ist allerdings in den Caspase-6-überexprimierenden HeLa-Zellen nachgewiesen worden (Abbildung 26A, Darstellung rechts). Das mutierte 5-LO-Protein ist analog zur Wildtyp-5-LO vor dem Abbau durch die Caspase-6 geschützt worden.

Für die *in vitro*-Untersuchung der 5-LO-3W sind HeLa-Zellen mit dem pcDNA3.1-5LO-3W-Plasmid transfiziert und mittels Ultraschall-Sonotrode homogenisiert worden. Nach der Ultrazentrifugation (100.000 g, 70 min, 4°C) ist der resultierende S-100 mit 0,3 Units rekombinanter Caspase-6 für 18 Stunden inkubiert worden (siehe Kapitel 0). In Übereinstimmung mit Ergebnissen der *in vitro*-Untersuchungen an der Wildtyp-5-LO (siehe Abbildung 24) konnte die 5-LO-3W ebenfalls nicht durch die Caspase-6 prozessiert werden (Abbildung 26B, Darstellung links).

Die Zugabe der S-100-Aliquots aus 5-LO-3W-positiven HeLa-Zellen konnte zusätzlich die Spaltung der isolierten *E. coli*-5-LO durch die Caspase-6 verhindern (Abbildung 26B, Darstellung rechts). Lediglich nach Zugabe des S-100-Aliquots in niedriger Konzentration (entspr. $2,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen), konnte eine leichte Bande des 5-LO-Spaltfragmentes detektiert werden. Bei Einsatz höherer S-100-Konzentrationen konnte die *E. coli*-5-LO nicht mehr durch die Caspase-6 *in vitro* abgebaut werden.

In allen Experimenten ist das Verhalten des in HeLa-Zellen exprimierten 5-LO-3W-Proteins mit dem der Wildtyp-5-LO vergleichbar.

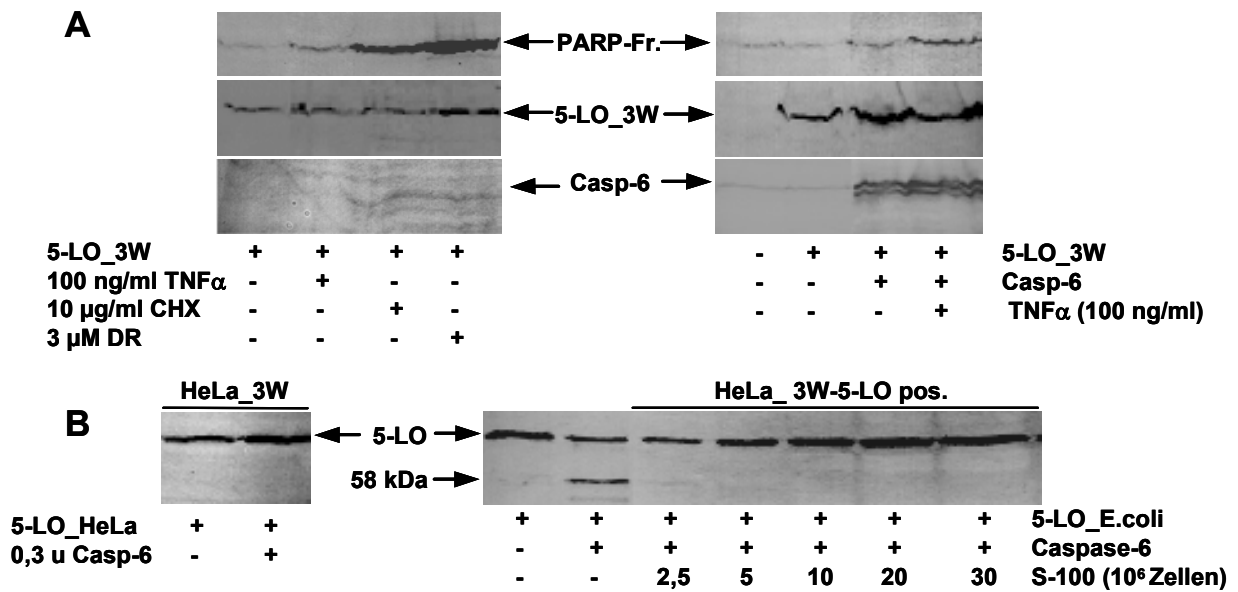


Abbildung 26: Untersuchungen am 5-LO-3W-Protein nach Expression in HeLa-Zellen. (A) HeLa-Zellen sind mit pcDNA3.1-5LO-3W transient transfiziert und für 24 Stunden mit apoptotischen Agentien behandelt worden (Darstellung links). Koftransfektion der HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden für 5-LO-3W und Caspase-6 (Darstellung rechts) mit und ohne TNF α -Inkubation für 24 Stunden. Die Expression von 5-LO, Caspase-6 und PARP-Spaltung sind mittels Western blot untersucht worden. (B) Ausbleibende Spaltung der 5-LO-3W durch rekombinante Caspase-6 (0,3 Units) *in vitro* (Darstellung links). Ausbleibende Spaltung der 5-LO aus *E. coli* durch rekombinante Caspase-6 (0,3 Units) *in vitro* nach Zusatz von S-100-Aliquots aus 5-LO-3W-positiven HeLa-Zellen (Darstellung rechts).

Hyperforin

Einfluss von Hyperforin auf die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen

BL41-E95-A-Zellen, die innerhalb von vier Tagen bis zu einer Konzentration von $1,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml angewachsen waren, sind auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt worden. Dabei wurde ein Teil der Zellen mit steigenden Konzentrationen Hyperforin (HP, 0,3-3 μ M, aus DMSO-Stock) behandelt. Nach 24 Stunden wurden Zellaliquots bezüglich des 5-LO-Proteins mittels Western blot untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Hyperforin bereits in Konzentrationen ab 3 μ M die 5-LO-Spaltung verhinderte (Abbildung 27, Western blot). Ab einer Konzentration von 10 μ M HP, wurde kaum noch das Spaltprodukt der 5-LO (62 kDa) detektiert. Darüber hinaus wurde durch Hyperforin das Wachstumsverhalten der B-Lymphozyten merklich beeinflusst. Eine starke Reduktion der Zellproliferation, und in

höheren Konzentrationen sogar eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Probe, konnten bereits bei 3 μM Hyperforin-Zusatz beobachten werden (Abbildung 27, Graph). Dieser Effekt lässt auf Zelltod unter Hyperforineinfluss schließen.

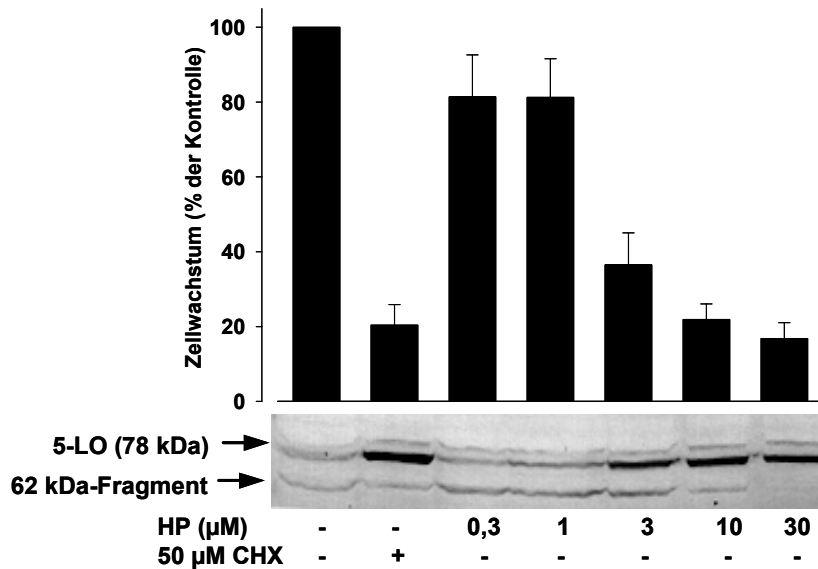


Abbildung 27: Einfluss von Hyperforin auf die Zellproliferation (Graph) und die 5-LO-Degradation (Western blot) in BL41-E95-A-Zellen. Die Zellen sind beim Umsetzen mit Hyperforin in steigenden Konzentrationen versetzt worden. Nach 24 Stunden sind Zellproliferation und -viabilität im Lichtmikroskop nach Trypanblau-Färbung untersucht und in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Probe (100%), angegeben worden. Die Bestimmung des 5-LO-Proteins erfolgte mittels Western blot.

In der Literatur ist die 5-LO als molekulares Target für Hyperforin beschrieben worden [135]. Da die Bindungsstelle für Hyperforin an der 5-LO sich räumlich in der Nähe der putativen Erkennungssequenz für Caspase-6 befindet [146], lag die Vermutung nahe, dass Hyperforin durch sterische Abschirmung der Spaltstellen die 5-LO vor dem Caspase-6-Angriff und dem Abbau schützt. Um diese Theorie zu überprüfen, ist rekombinante humane 5-LO in einem *in vitro*-Experiment mit rekombinanter Caspase-6 mit und ohne Hyperforin-Zusatz inkubiert worden. Die 5-LO ist dabei in allen Inkubaten, denen auch Caspase-6 zugesetzt wurde, zu dem 58 kDa-Spaltprodukt prozessiert worden. Der 5-LO-Abbau wurde sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Hyperforin beobachtet (Abbildung 28, Darstellung links). Auch eine Vorinkubation mit Hyperforin (15-20 min) vor der Zugabe der Caspase-6, konnte den 5-LO-Abbau nicht verhindern (Abbildung 28, Darstellung rechts). Der schützende Effekt des Hyperforins basiert somit nicht auf direkter Bindung an die 5-LO und sterischem Verdecken der Caspase-6-Erkennungsstelle innerhalb des 5-LO-Proteins.

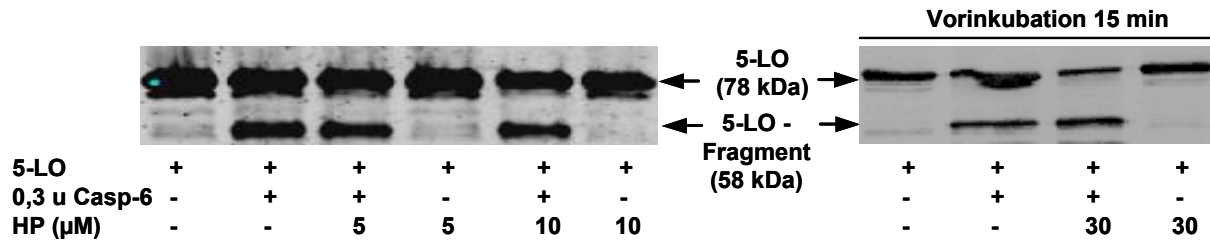


Abbildung 28: Einfluss von Hyperforin auf die 5-LO-Spaltung durch rekombinante Caspase-6 *in vitro*. Die aus *E. coli* isolierte und aufgereinigte 5-LO wurde mit rekombinanter Caspase-6 (0,3 Units) inkubiert. Die Proben sind mit Hyperforin versetzt und für bis zu 15 min vorinkubiert worden. Die Untersuchung des 5-LO-Proteins erfolgte nach 16 Stunden im Western blot.

Basierend auf den Erkenntnissen über die subzelluläre Lokalisation intakter und prozessierter 5-LO, ist als nächstes überprüft worden, ob Hyperforin die zelluläre Verteilung der 5-LO in BL41-E95-A-Zellen beeinflusst. Es wäre denkbar, dass durch den Einfluss von Hyperforin die 5-LO dem Caspase-6-haltigen Zellkompartiment entzogen wird und die Spaltung demnach nicht stattfinden kann. Die Zellen wurden beim Passagieren erneut mit Hyperforin behandelt (10 µM), nach 24 Stunden geerntet und die zelluläre Lokalisation der 5-LO wurde untersucht. Wie bereits der Abbildung 19A entnommen werden konnte, befindet sich die intakte 5-LO in BL41-E95-A-Zellen im Zytosol (Fraktionen Z und PM). Das Spaltprodukt der 5-LO ist in unbehandelten Zellen in der nukleären partikulären Fraktion (NM) zu finden. In Zellen, die mit Hyperforin behandelt worden sind, ist an dieser Stelle (Fraktion NM) nur die intakte 5-LO zu finden (Abbildung 29). Hyperforin schützt somit die 5-LO vor Abbau ohne die subzelluläre Lokalisation des Enzyms zu beeinflussen.

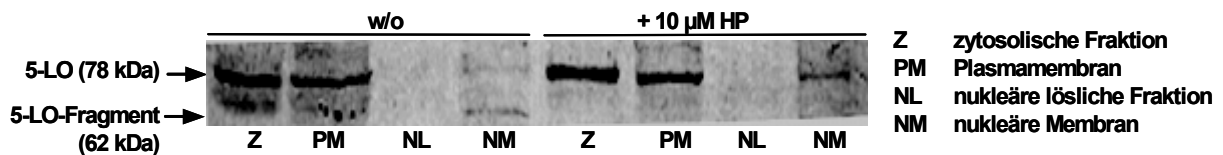


Abbildung 29: Einfluss von Hyperforin auf die subzelluläre Lokalisation intakter und gespaltenen 5-LO in BL41-E95-A-Zellen. Die Zellen sind beim Umsetzen ins frische Medium mit 10 µM Hyperforin versetzt worden. Nach NP40-Lyse und Fraktionierung subzellulärer Bestandteile ist das 5-LO-Protein im Western blot in der zytosolischen bzw. in der nukleären Fraktion untersucht worden.

Einfluss von Hyperforin auf Caspasen-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen

Wie aus bereits vorgestellten experimentellen Befunden hervorgeht, ist die Caspase-6 für die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen verantwortlich. Es wäre also denkbar, dass Hyperforin die Aktivität der Caspase-6 oder die der übergeordneten Caspase-8 beeinflusst, was in der fehlenden Spaltung der 5-LO in B-Lymphozyten nach Hyperforin-Zugabe resultieren würde. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind BL41-E95-A-Zellen beim Umsetzen ins frische Medium mit steigenden Mengen an Hyperforin für 24 Stunden behandelt worden. Untersuchungen der Caspasen-Aktivität zeigen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Aktivität der Caspase-6 bzw. der Caspase-8 in Abhängigkeit von der Hyperforin-Zugabe (Abbildung 30A).

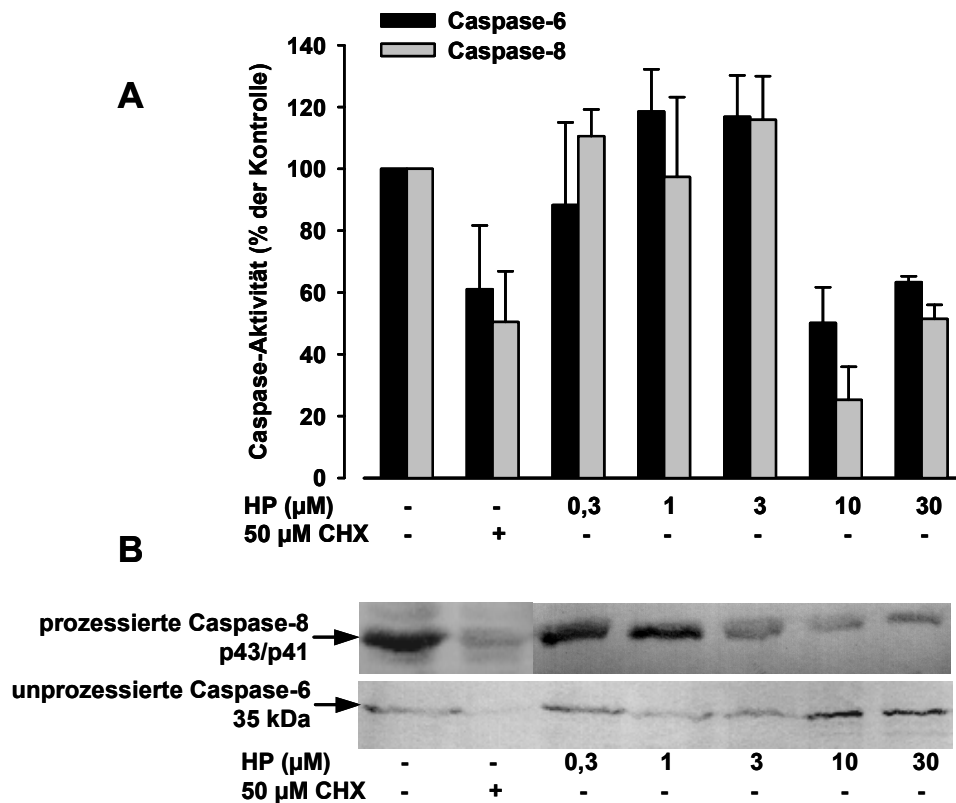


Abbildung 30: Einfluss von Hyperforin auf die Aktivität der Caspase-6 und -8 in BL41-E95-A-Zellen. (A) Inkubation der Zellen mit steigenden Hyperforin-Konzentrationen beim Umsetzen ins frische Medium führt zu einer Aktivitätserniedrigung der Caspase-6 und -8. Die Caspasen-Aktivität wurde in Prozent angegeben, bezogen auf die unbehandelte Probe (100%). (B) In BL41-E95-A-Zellen hemmt Hyperforin konzentrationsabhängig die Prozessierung von Caspase-8- und -6 zu ihren aktiven Formen.

In Western blot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Menge an prozessierter aktiver Caspase-8 mit steigenden Hyperforin-Konzentrationen abnimmt (Abbildung 30B) und

die Menge an unprozessierter inaktiver Caspase-6 bei Hyperforin-Konzentrationen von 10 und 30 μM deutlich höher ist als in unbehandelten Zellen (Abbildung 30B). Die Prozessierung der Caspase-8 und -6 zu ihren aktiven Formen ist also konzentrationsabhängig durch Hyperforin gehemmt worden. Hyperforin scheint somit den 5-LO-Abbau zu hemmen indem es die Aktivierung der Caspase-8 und -6 unterbindet.

In Folgeexperimenten sollte bestätigt werden, dass Hyperforin tatsächlich die Aktivierung der Caspase-8 und -6 in BL41-E95-A-Zellen hemmt, d. h. die Prozessierung der Caspasen zu ihren aktiven Formen verhindert, und keinen direkten hemmenden Einfluss auf die Aktivität der beiden Caspasen hat. Die Aktivität der Caspase-8 und -6 in BL41-E95-A-Zellen wurde gemessen, wobei die Zellhomogenate mit steigenden Konzentrationen Hyperforin unmittelbar vor der Zugabe der Caspasen-Substrate versetzt wurden. Tatsächlich bewirkte die Hyperforin-Zugabe keine Veränderung der Aktivität beider Caspasen (Abbildung 31).

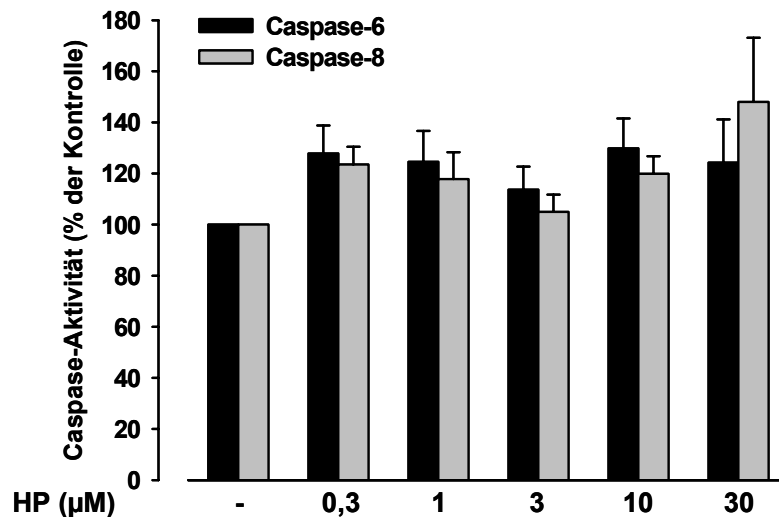


Abbildung 31: Direkter Effekt von Hyperforin auf die Aktivität der Caspase-6 und -8 aus Zellhomogenaten. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte in unbehandelten BL41-E95-A-Zellhomogenaten. Dabei ist Hyperforin in steigenden Konzentrationen unmittelbar vor der Substratzugabe für die jeweilige Caspase (Ac-IQFD-pNa bzw. Ac-VEID-pNa) den Proben zugesetzt worden. Die Caspasen-Aktivität wurde in Prozent angegeben, bezogen auf die Probe ohne Hyperforin-Zusatz (100%).

Trotz der Hemmung der Caspasen-Aktivierung durch Hyperforin in frisch passagierten BL41-E95-A-Zellen deutet eine deutliche Reduktion der Zellproliferation (siehe Abbildung 27, Graph) auf einen möglichen apoptotische Tod der Zellen unter Hyperforin-Einfluss hin.

BL41-E95-A-Zellen sind für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen an Hyperforin inkubiert und, wie unter 0 beschrieben, für eine Untersuchung der DNA im Agarosegel präpariert worden. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Hyperforin in Leukämie-Zelllinien Apoptose auslöst [147], sind HL-60-Zellen analog behandelt worden um als Kontrolle zu dienen. Die Abbildung 32A lässt in BL41-E95-A-Zellen, die mit Hyperforin behandelt wurden (1-10 μM) (Darstellung links), eine deutliche apoptotische Leiter erkennen. In HL-60-Zellen (Abbildung 32A, Darstellung rechts) hat Hyperforin in Analogie zum bekannten Apoptosestimulus CHX ebenfalls zur DNA-Degradation in oligonukleosomale Fragmente geführt, die im Agarosegel das typische Muster einer apoptotischen Leiter bilden [265].

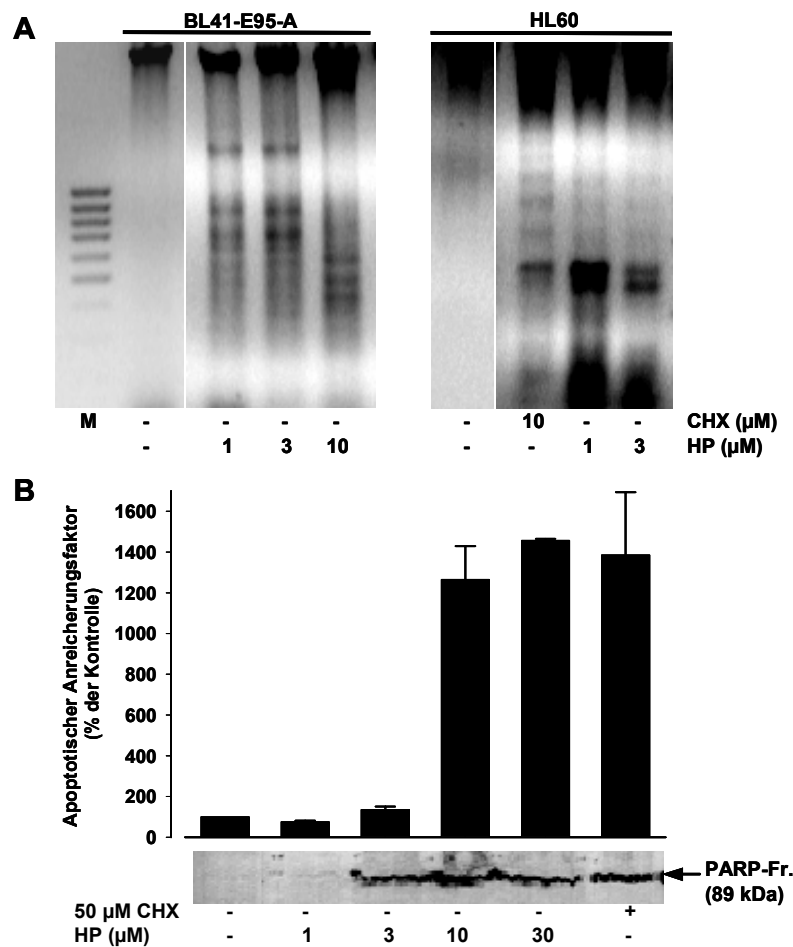


Abbildung 32: (A) Darstellung der apoptotischen Leiter in einem 2%-igen Agarosegel nach Behandlung der BL41-E95-A- und der HL-60-Zellen mit Hyperforin (1-10 μM) für 24 Stunden. M: 100 bp-Marker. CHX wurde als Kontrollsubstanz bei der Behandlung der HL-60-Zellen eingesetzt. (B) Bestimmung des apoptotischen Anreicherungsfaktors (AAF) in BL41-E95-A-Zellen (Graph) und der PARP-Spaltung (Western blot) nach Behandlung der Zellen mit steigenden Hyperforin-Konzentrationen. CHX diente als Kontrollsubstanz. AAF der unbehandelten Probe entspricht 100%.

Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA[®]-Kits von Roche Molecular Biochemicals konnte in den BL41-E95-A-Zellen nach Behandlung mit steigenden Hyperforin-Konzentrationen der apoptotische Anreicherungsfaktor (AAF) bestimmt werden (siehe dazu Kapitel 0). Da jede Zellpopulation einen gewissen Anteil apoptotischer Zellen enthält, wird bei der Auswertung der AAF der unbehandelten Probe mit 100% gleichgesetzt und die AAFs aller anderen Proben darauf bezogen. Die Abbildung 32B macht deutlich, dass die Apoptoserate in den B-Lymphozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μM Hyperforin um den Faktor 12 im Vergleich zu unbehandelten Zellen anstieg (Graph). Zusätzlich konnte in BL41-E95-A-Zellen ab einer Hyperforin-Konzentration von 3 μM eine signifikante PARP-Spaltung beobachtet werden (Abbildung 32B).

Trotz der hemmenden Wirkung auf die Caspasen-Aktivierung scheint Hyperforin in BL41-E95-A-Zellen Apoptose auszulösen.

LP-131 und LP-119 zeigen Hyperforin-ähnliche Wirkungen

Basierend auf der chemischen Struktur der Pirinixinsäure sind im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Schneider in einem virtuellen Screening-Verfahren einige Verbindungen als potentielle 5-LO-Inhibitoren identifiziert worden. Diese Verbindungen (Abbildung 33) wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec synthetisiert und bezüglich ihrer hemmenden Wirkung auf die 5-LO getestet.

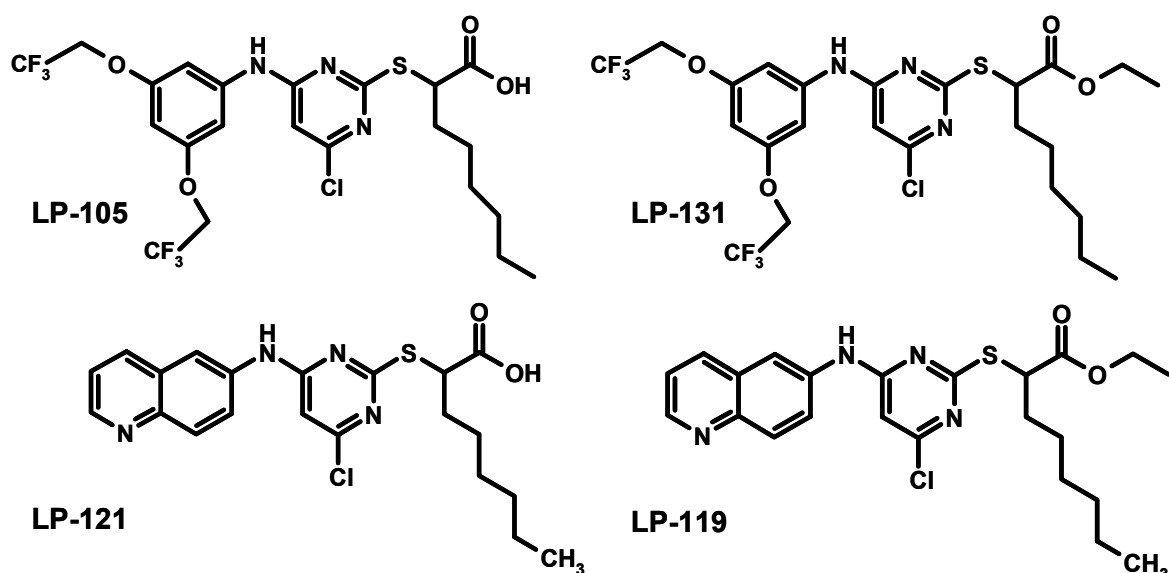


Abbildung 33: Chemische Strukturen der vier Pirinixinsäure-Analoga. Die Verbindungen LP-131 und LP-119 stellen jeweils die Ester von LP-105 bzw. LP-121 dar.

Es sollte nun evaluiert werden, inwiefern diese Verbindungen mit Hyperforin vergleichbare Effekte auf die 5-LO-Spaltung und auf die Caspasen-Aktivierung besitzen.

In Analogie zu Experimenten an BL41-E95-A-Zellen mit Hyperforin sind die Zellen beim Umsetzen ins frische Medium mit 10 bzw. 30 μM der Pirinixinsäure-Derivate LP-131 und LP-119 bzw. mit den dazugehörigen Säure-Verbindungen LP-105 und LP-121 versetzt und für 24 Stunden behandelt worden. In Zellaliquots wurde anschließend das 5-LO-Protein und die aktive Form der Caspase-8 mittels Western blot analysiert.

Wie der Abbildung 34 entnommen werden kann, hemmten die beiden Ester-Verbindungen LP-131 und LP-119 in Konzentrationen ab 10 μM die Spaltung der 5-LO in BL41-E95-A-Zellen. Zusätzlich konnte für LP-131 eine signifikante Reduktion der Caspase-8-Prozessierung zu den aktiven Fragmenten beobachtet werden. Die Säure-Verbindungen LP-105 und LP-121 zeigten diesbezüglich keinerlei Effekt. In Kontrollexperimenten wurde die Menge an β -Aktin ebenfalls im Western blot untersucht (Abbildung 34).

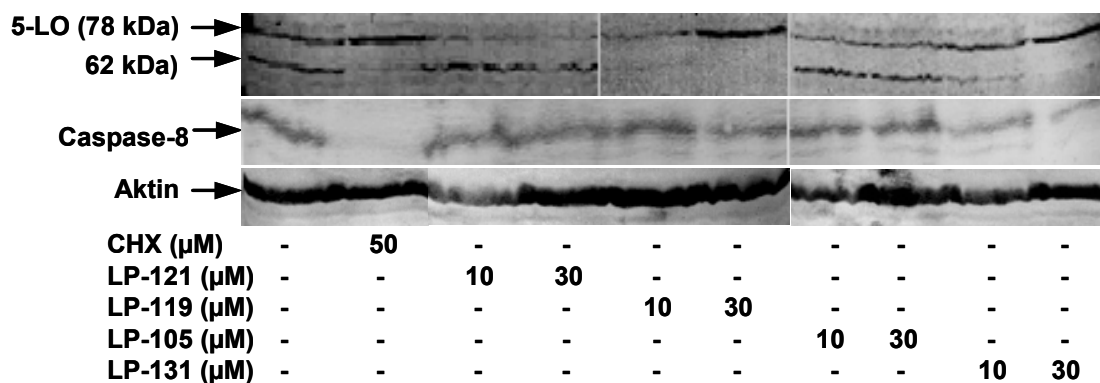


Abbildung 34: Einfluss der Pirinixinsäure-Analoga LP-121, LP-119, LP-105 und LP-131 auf die 5-LO-Degradation und Caspase-8-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen. Die Zellen sind nach dem Umsetzen für 24 Stunden mit 10 bzw. 30 μM der o. g. Substanzen inkubiert worden. Die Western blot-Untersuchungen zeigen den protektiven Einfluss der Verbindungen LP-119 und LP-131 auf den 5-LO-Abbau. β -Aktin ist als Kontrollprotein untersucht worden.

Einfluss von Hyperforin auf andere Zelllinien

Hyperforin führt in vielen Zelllinien zur Aktivierung der Caspasen [147, 149, 150]. Die Befunde an BL41-E95-A-Zellen präsentieren allerdings ein völlig anderes Bild bezüglich der Hyperforin-Wirkung auf die Caspasenaktivierung. Zur Bestätigung der Literatur-Daten wurde Hyperforin an zwei weiteren humanen Zelllinien HL-60 und MM6 getestet.

In beiden Zelllinien führte Hyperforin bereits in Konzentrationen von 3-10 μM zu einer deutlichen Aktivierung der Caspase-8 sowie zur Spaltung von PARP, die ein wichtiges Substrat für die aktive Caspase-3 darstellt (Abbildung 35 und Abbildung 36, Western blot). Durch Hyperforin kam es ebenfalls konzentrationsabhängig zur Aktivierung der Caspase-3, -6 und -9 (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich war das Zellwachstum der beiden Zelllinien unter Hyperforin-Zugabe stark beeinträchtigt (Abbildung 35 und Abbildung 36, Graph).

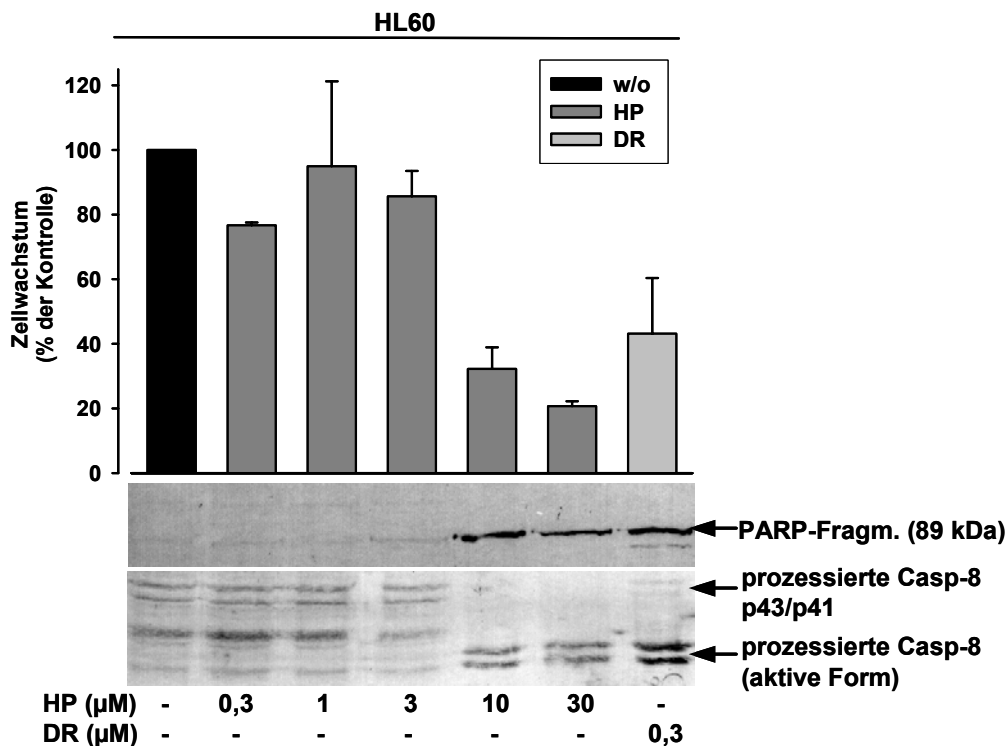


Abbildung 35: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Hyperforin auf die Zellproliferation und die Prozessierung von PARP und Caspase-8 in HL-60-Zellen. Die Zellen sind für 24 Stunden mit Hyperforin in indizierten Konzentrationen behandelt worden. Die Zellproliferation und -viabilität sind nach Trypanblau-Färbung im Lichtmikroskop bestimmt worden. Die Angaben erfolgen in Prozent, bezogen auf die unbehandelte (w/o) Probe (100%). Die Proteine PARP und Caspase-8 wurden mittels Western blot detektiert.

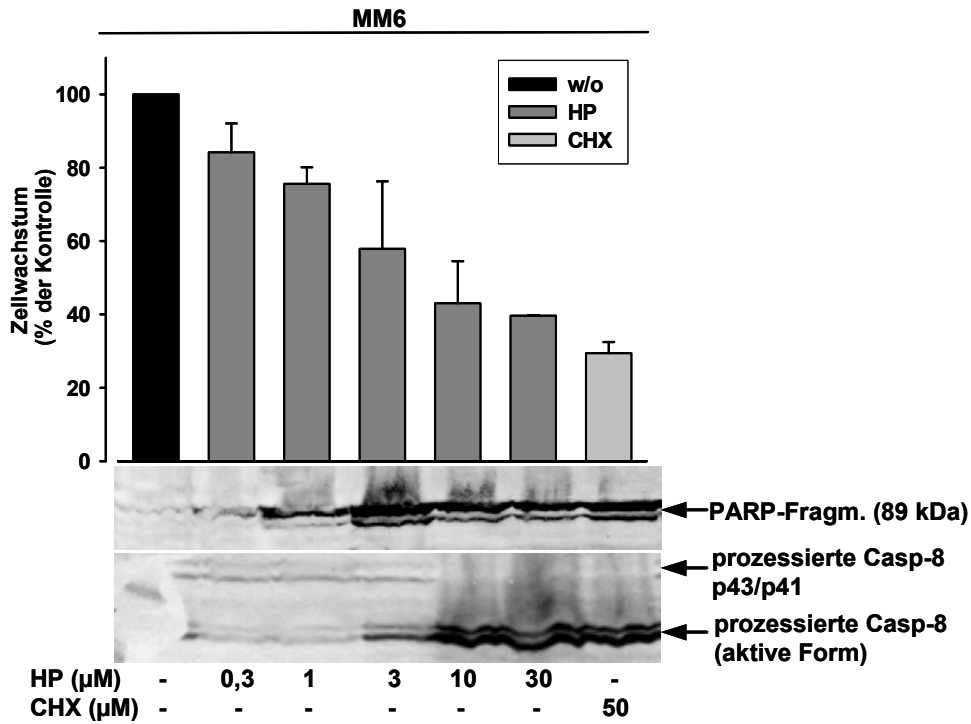


Abbildung 36: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Hyperforin auf die Zellproliferation und die Prozessierung von PARP und Caspase-8 in MM6-Zellen. Die Zellen sind für 24 Stunden mit Hyperforin in indizierten Konzentrationen behandelt worden. Die Bestimmung der Zellproliferation und -viabilität sowie der Proteine PARP und Caspase-8 erfolgten in Analogie zu HL-60-Zellen (siehe Abbildung 35).

Eine zeitabhängige Untersuchung an MM6-Zellen ist ebenfalls durchgeführt worden. Undifferenzierte MM6-Zellen wurden mit 3 µM Hyperforin versetzt, nach indizierter Zeit geerntet und im Western blot auf PARP-Spaltung und aktive Form der Caspase-8 untersucht. Abbildung 37 zeigt, dass die Aktivierung der Caspase-8 und die PARP-Spaltung bereits nach 12-stündiger Behandlung der MM6-Zellen mit Hyperforin auftraten.

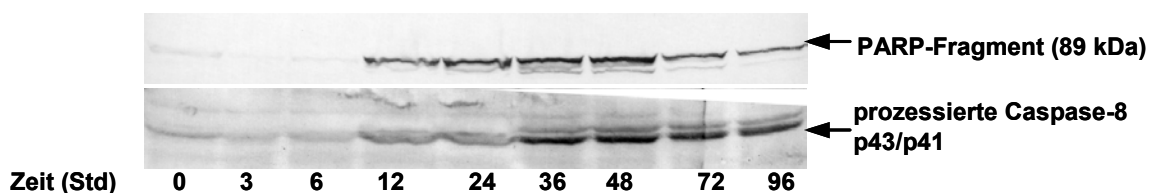


Abbildung 37: Zeitkinetik der Prozessierung von PARP und Caspase-8 nach Inkubation von MM6-Zellen mit 3 µM Hyperforin.

Diese Ergebnisse an HL-60- bzw. MM6-Zellen stimmen mit den bereits aus der Literatur bekannten Befunden überein. In BL41-E95-A-Zellen scheint Hyperforin dagegen die Aktivierung der Caspase-6 und der Caspase-8 zu hemmen.

Myrtucommulon

Einfluss von Myrtucommulon auf die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen

Im Folgenden wurde ein weiterer Pflanzeninhaltsstoff, das Myrtucommulon, mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu Hyperforin und sein Einfluss auf die BL41-E95-A-Zellen getestet (vergl. Strukturformeln in Kapitel 0 und Kapitel 0).

Beim Myrtucommulon, dem Hauptinhaltsstoff aus *Myrtus communis* (Myrthe), handelt es sich um ein nicht prenyliertes Acylphloroglycinol, das möglicherweise ähnliche Eigenschaften bezüglich der 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen wie das prenylierte Acylphloroglycinol Hyperforin aufweisen könnte.

In Analogie zu den Untersuchungen an B-Lymphozyten mit Hyperforin wurden BL41-E95-A-Zellen beim Umsetzen ins frische Wachstumsmedium mit steigenden Konzentrationen Myrtucommulon (MC, 0,3-3 μM , aus DMSO-Stock) behandelt und nach 24 bzw. 48 Stunden Wachstum bezüglich des 5-LO-Proteins untersucht.

Abbildung 38 zeigt, dass auch Myrtucommulon in Konzentrationen von 10 und 30 μM die 5-LO-Spaltung verhinderte (Abbildung 38B) und die Zellproliferation der BL41-E95-A signifikant reduzierte (Abbildung 38A). Interessanterweise schienen das MC-Derivat Semimyrtucommulon (S-MC) sowie der Isobutyrophenon-Kern, der als Grundgerüst in beiden Acylphloroglycinol-Verbindungen enthalten ist, auch in höheren Konzentrationen (30 μM) weder die Zellproliferation der B-Lymphozyten zu beeinflussen noch die 5-LO vor Abbau zu schützen (nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit 50 μM CHX für 24 bzw. 48 Stunden behandelt.

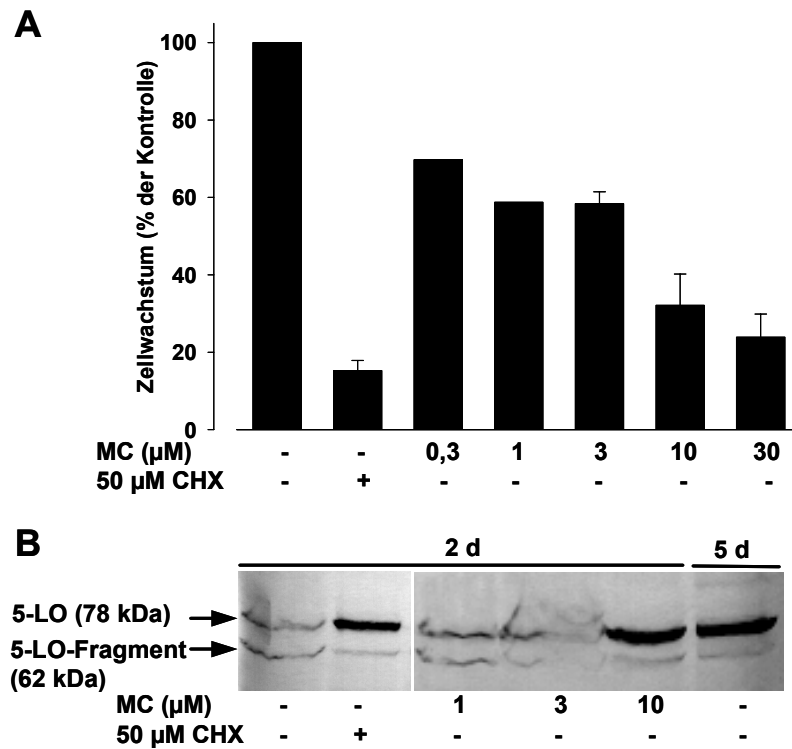


Abbildung 38: Einfluss von Myrtucommulon auf die Zellproliferation (A) und die 5-LO-Degradation (B) in BL41-E95-A-Zellen. Die Zellen sind beim Umsetzen ins frische Medium mit Myrtucommulon in steigenden Konzentrationen (0,3-30 µM) versetzt worden. CHX wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt. Nach 48 Stunden sind Zellproliferation und -viabilität mittels Lichtmikroskop und Trypanblau-Färbung untersucht worden. Die Angaben erfolgen Prozent, bezogen auf die unbehandelte Probe (100%). Das 5-LO-Protein ist mittels Western blot detektiert worden.

In *in vitro*-Untersuchungen ist isolierte aufgereinigte 5-LO mit 0,3 Units Caspase-6 unter dem Zusatz von 30 µM MC inkubiert worden. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der subzellulären Verteilung intakter und gespaltener 5-LO in BL41-E95-A-Zellen nach Inkubation mit 10 µM Myrtucommulon für 48 Stunden. Beide Untersuchungen haben gezeigt, dass der 5-LO-protective Effekt des Myrtucommulons weder auf der sterischen Abschirmung der putativen Schnittstellen innerhalb der 5-LO (Abbildung 39, Darstellung links) noch auf der Beeinflussung des Translokationsverhaltens der 5-LO (Abbildung 39, Darstellung rechts) beruht. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor beschriebenen Effekten des Hyperforins (siehe auch Kapitel 0).

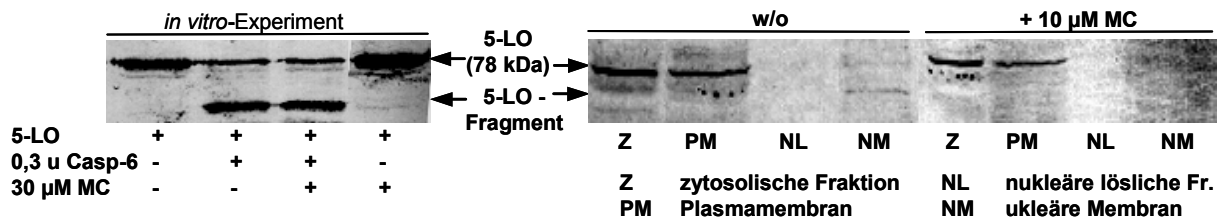


Abbildung 39: Darstellung links: Einfluss von Myrtucommulon auf die 5-LO-Spaltung durch rekombinante Caspase-6 *in vitro*. Die aus *E. coli* isolierte und aufgereinigte 5-LO wurde mit rekombinanter Caspase-6 (0,3 Units) inkubiert. Dabei ist ein Teil der Proben mit 30 µM Myrtucommulon versetzt worden. Die Untersuchung des 5-LO-Proteins erfolgte nach 16 Stunden via Western blot. Darstellung rechts: Untersuchung der subzellulären Lokalisation intakter und prozessierter 5-LO in BL41-E95-A-Zellen nach Inkubation der Zellen mit 10 µM Myrtucommulon für 24 Stunden und anschließender Fraktionierung subzellulärer Bestandteile.

Einfluss von Myrtucommulon auf Caspasen-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen

Basierend auf den bereits ermittelten Ergebnissen mit Hyperforin sollte evaluiert werden, ob Myrtucommulon in gleicher Weise die Aktivierung der Caspase-8 in BL41-E95-A-Zellen hemmt und dadurch die 5-LO vor Abbau schützt. Tatsächlich wurde die Prozessierung der Caspase-8 in die aktive Form bereits durch Zugabe von 3 µM Myrtucommulon verhindert (Abbildung 40, Darstellung oben). Der MC-Analogon Semimyrtucommulon und der Isobutyrophenon-Kern hatten auch in höheren Konzentrationen (30 µM) keinerlei Einfluss auf die Caspase-8-Aktivierung (Abbildung 40, Darstellung unten).

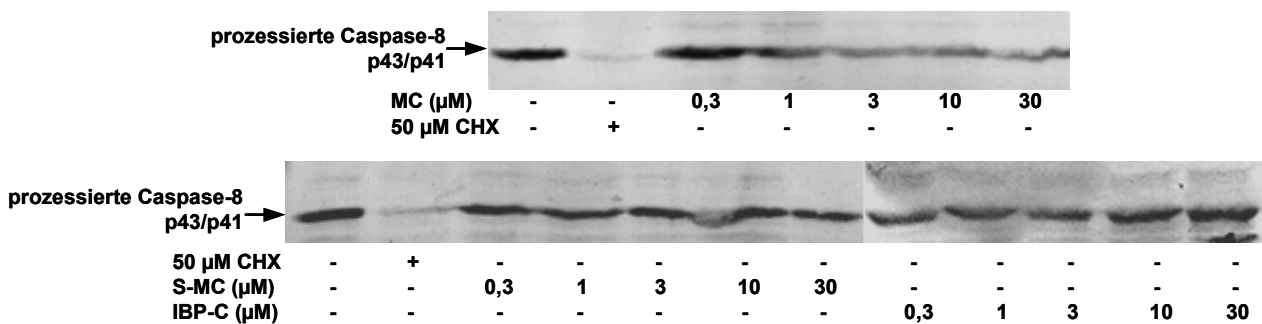


Abbildung 40: Effekt von MC, S-MC und IBP-C auf die Prozessierung der Caspase-8 in BL41-E95-A-Zellen. Die Zellen wurden beim Umsetzen mit steigenden Konz. MC, S-MC oder IBP-C (0,3-30 µM) versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Menge an aktiver Caspase-8 via Western blot untersucht.

Untersuchungen hinsichtlich des MC-Effektes auf die Caspasen-Aktivität (analog zu den Hyperforin-Experimenten) zeigten, dass MC in niedrigeren Konzentrationen (0,3-3 μM) zu einer leichten Aktivitätserhöhung beider Caspasen führte. Behandlung der BL41-E95-A-Zellen mit steigenden Myrtucommulon-Konzentrationen (10-30 μM) resultierte allerdings in einer leichten Reduktion der Aktivität der Caspase-8 und -6 (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität der Caspase-8 wurde dabei durch MC etwas stärker supprimiert als die Aktivität der Caspase-6. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Caspase-6 eine effektorische, der Caspase-8 nachgeschaltete Caspase darstellt, und ihre Aktivierung erst dann abzunehmen beginnt, wenn nicht mehr ausreichend aktive Caspase-8 zur Verfügung steht.

Myrtucommulon und Hyperforin scheinen also über den gleichen Mechanismus Einfluss auf die Aktivierung der Caspase-8 und -6 auszuüben, was sich schließlich hemmend auf den 5-LO-Abbau in BL41-E95-A-Zellen auswirkt.

Einfluss von Myrtucommulon auf andere Zelllinien

Die Behandlung einiger Zelllinien (BL41-E95-A-, HL-60-, MM6-Zellen) mit Hyperforin resultiert, wie bereits gezeigt (Kapitel 0 und 0), in einem apoptotischen Tod der Zellen. Dagegen ist über Myrtucommulon diesbezüglich noch kaum etwas bekannt. Es sollte folglich evaluiert werden, ob MC in humanen Zelllinien zur Apoptose via Caspasen-Aktivierung führt. Eine Ausnahme könnten hierbei die BL41-E95-A-Zellen darstellen, in denen MC zu einer Hemmung der Caspasen-Aktivierung führt.

Neun verschiedene Krebszelllinien wurden ausgesucht und die Effekte von MC, S-MC und IBP-C auf die Proliferation und Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay untersucht. Der Tabelle 4 können die IC_{50} -Werte für Myrtucommulon bezüglich der Reduktion der Zellviabilität entnommen werden. In allen getesteten Krebszelllinien führte Myrtucommulon zum Zelltod nach einer Behandlungsdauer von fünf Tagen, wobei die HL-60-Zellen am sensitivsten gegenüber dem MC-Einfluss (IC_{50} $3,26 \pm 0,51$ μM MC) waren. Dagegen zeigten humane Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) und primäre mononukleäre Blutzellen (HPBM-Zellen), die als nicht-transformierte Zellen keine Tumorzellen darstellen, kaum Sensitivität gegenüber Myrtucommulon. Die Analyse der HFF-Zellen erfolgte ebenfalls nach fünf Tagen, die der mononukleären Blutzellen bereits nach 40 Stunden und lieferte IC_{50} Werte, die oberhalb von 20 bzw. 30 μM MC lagen. MC scheint demnach vorwiegend in entarteten Zellen Apoptose zu induzieren.

Zelllinie	Zelltyp	IC ₅₀ (µM)
PC-3	Androgen-unabhängiges Prostatakarzinom	3,93 ± 0,54
LNCaP	Androgen-abhängiges Prostatakarzinom	8,86 ± 1,19
KFR	Rhabdomyosarcom	7,07 ± 1,05
UKF-NB-3	Neuroblastom	5,87 ± 0,88
HL-60	akute promyeloische Leukämie	3,26 ± 0,51
MM6	akute monozytische Leukämie	3,39 ± 0,66
H9	kutanes T-Zell-Lymphom	3,56 ± 0,50
DLD-1	kolorektales Adenokarzinom	8,75 ± 1,02
Jurkat	akutes T-Zell-Lymphom	4,01 ± 0,52
HFF	humane Vorhautfibroblasten	> 20
HPBMC	humane mononukleäre Zellen aus peripherem Blut	> 30

Tabelle 4: IC₅₀-Werte für Myrtucommulon bezüglich der Reduktion der Zellviabilität, ermittelt im MTT-Assay für neun verschiedene Krebszelllinien sowie humane nicht-transformierte Zellen.

Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität der MM6- und HL-60-Zellen wurde parallel mittels Lichtmikroskop und Trypanblau-Färbung durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem MTT-Assay reduzierte Myrtucommulon die Zellviabilität bereits nach 24 Stunden konzentrationsabhängig (Abbildung 41A). Die IC₅₀-Werte lagen dabei bei ca. 5 µM.

In Folgeversuchen ist überprüft worden, ob die Reduktion der Zellviabilität durch Myrtucommulon mit der Aktivierung der Caspasen einhergeht. Für diese Untersuchungen sind MM6- und HL-60-Zellen mit IBP-C (30 µM), S-MC (30 µM) und steigenden Konzentrationen an MC (0,3–30 µM) für 24 Stunden inkubiert worden. Abbildung 41B zeigt, dass in MM6-Zellen bereits ab einer Konzentration von 10 µM MC aktive Caspase-8, -3 und -9 detektiert werden konnten. Zusätzlich konnte eine signifikante Abnahme der inaktiven Formen der Caspase-3 und -9 sowie das Auftreten der durch die Caspase-3 prozessierten PARP nachgewiesen werden. Daunorubicin wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt, wobei die Wirksamkeit von 10 µM Myrtucommulon mit der des Daunorubicins (1 µM) vergleichbar ist. Die Behandlung von HL-60-Zellen mit Myrtucommulon führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen PARP-Spaltung und zu Caspasen-Aktivierung (Abbildung 41C

und Abbildung 41D). Im Gegensatz zu MC waren Semimyrtucommulon und der Isobutyrophenon-Kern auch bei 30 μM unwirksam (Abbildung 41D).

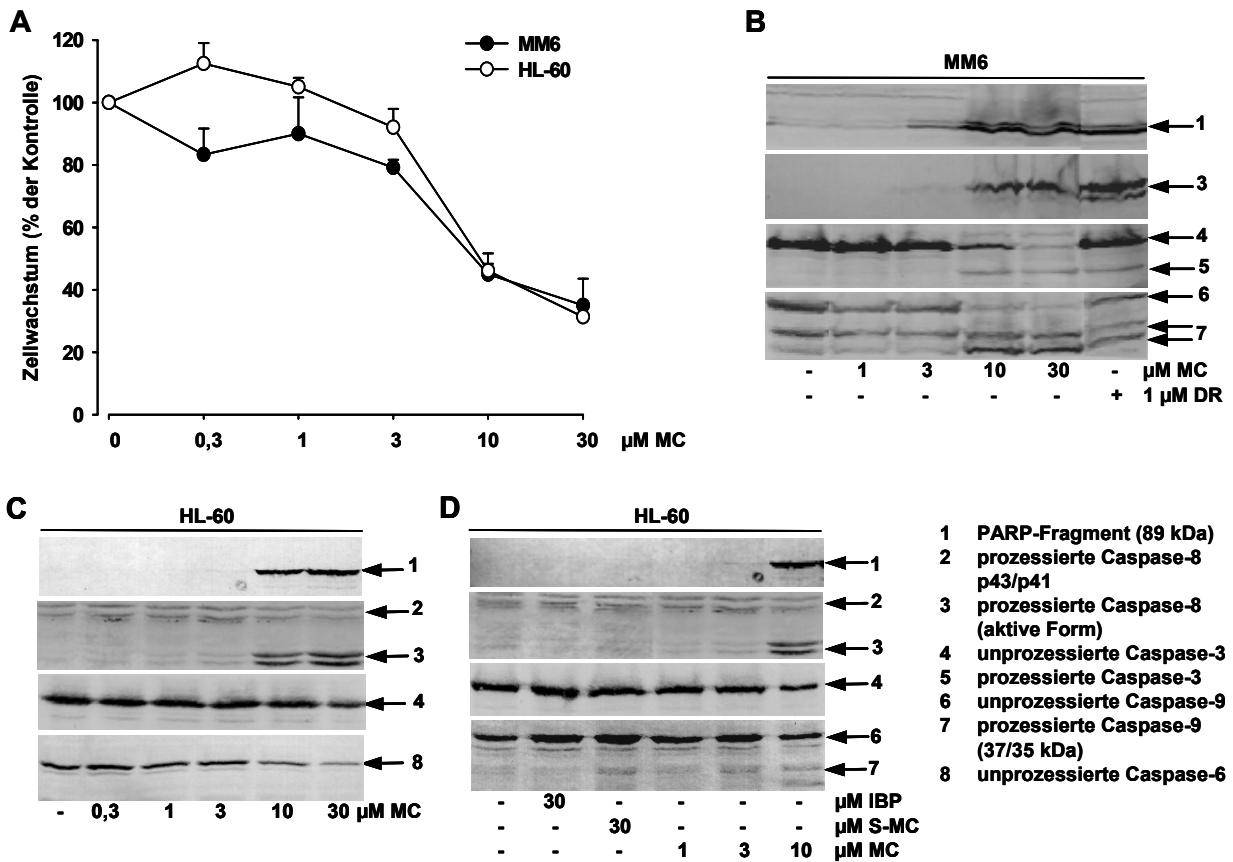


Abbildung 41: (A) Konzentrationsabhängige Reduktion der Zellproliferation und -viabilität von MM6- und HL-60-Zellen durch MC. Die Zellen sind für 24 Stunden mit MC in indizierten Konzentrationen (0,3-30 μM) behandelt und nach anschließender Trypanblau-Färbung im Lichtmikroskop untersucht worden. Das Zellwachstum wurde in Prozent angegeben, bezogen auf die unbehandelte Probe (100%). (B) Konzentrationsabhängige PARP-Spaltung und Aktivierung der Caspasen durch MC in MM6-Zellen nach 24 Stunden Behandlungsdauer. Daunorubicin (1 μM) wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt. (C und D) PARP-Spaltung und Caspasen-Aktivierung in HL-60-Zellen durch MC, nicht aber durch S-MC und IBP-C.

Um den zeitabhängigen Effekt von Myrtucommulon bzw. Daunorubicin auf die Zellproliferation und Aktivierung der Caspasen zu untersuchen, sind HL-60-Zellen mit 10 μM MC bzw. 1 μM DR für indizierte Zeit behandelt worden. Während unbehandelte Zellen (w/o) ihrem normalen Verhalten entsprechend unbeeinflusst proliferieren konnten und ihre Anzahl innerhalb von 48 Stunden auf mehr als das Doppelte anstieg, konnte eine deutliche Abnahme in der Proliferation und Viabilität der mit MC-behandelten Zellen bereits nach 3 Stunden

beobachtet werden (Abbildung 42A). Ähnliches Ergebnis wurde nach der Inkubation der Zellen mit Daunorubicin ermittelt. Western blot-Untersuchungen der mit MC behandelten HL-60-Zellen zeigen nach 24 Stunden das Auftreten aktiver Formen der Caspase-8, -3 und -9 sowie der PARP-Fragments (Abbildung 42B). Dieses Ergebnis lässt sich ebenfalls mit der Behandlung der Zellen mit DR (0,3 μ M) vergleichen.

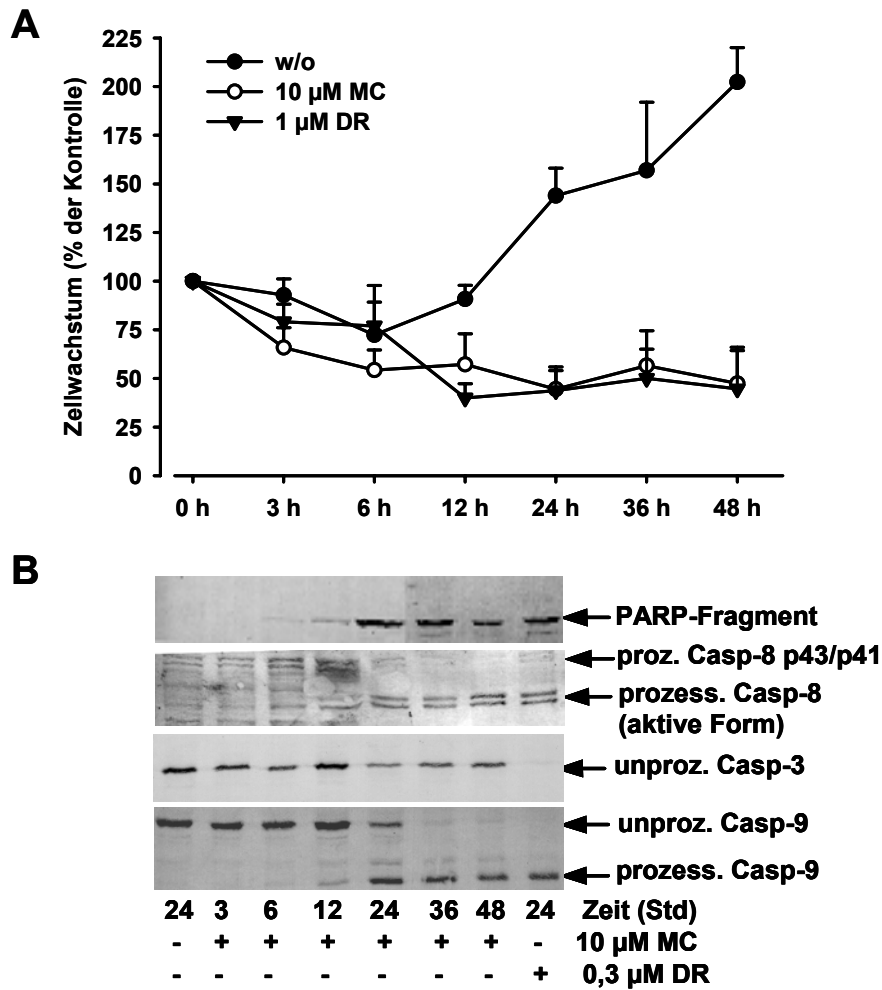


Abbildung 42: (A) Zeitabhängiger Einfluss von MC (10 μ M) und DR (1 μ M) auf HL-60-Zellen. Das Zellwachstum ist in Prozent der Kontrolle (unbehandelte Probe, 100%) angegeben und bezieht sich auf die Zellmenge zum Zeitpunkt der Umsetzung. (B) Zeitabhängige Untersuchung der PARP-Spaltung und der Caspasen-Aktivierung durch 10 μ M MC in HL-60-Zellen. Daunorubicin (0,3 μ M) wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt.

Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA[®]-Kits von Roche konnte schließlich gezeigt werden, dass die Reduktion der Zellproliferation und -viabilität durch Myrtucommulon, die in HL-60- und MM6-Zellen mit Caspasen-Aktivierung und PARP-Fragmentierung einhergeht,

im apoptotischen Tod der Zellen resultiert. Die Bildung von Mono- und Oligonukleosomen stellt ein typisches Merkmal apoptotischer Zellen dar. HL-60-Zellen wurden für 24 Stunden mit Myrtucommulon in steigenden Konzentrationen (0,3-10 μM) behandelt und für die Bestimmung des apoptotischen Anreicherungsfaktors (AAF) (siehe Kapitel 0) präpariert. Abbildung 43A zeigt, dass nach der Behandlung der Zellen mit 3 μM Myrtucommulon die Anzahl apoptotischer Zellen in der Zellkultur auf das 2,5-fache anstieg, während bei Verwendung von 10 μM Myrtucommulon die 6-fach höhere Menge apoptotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe detektiert wurde.

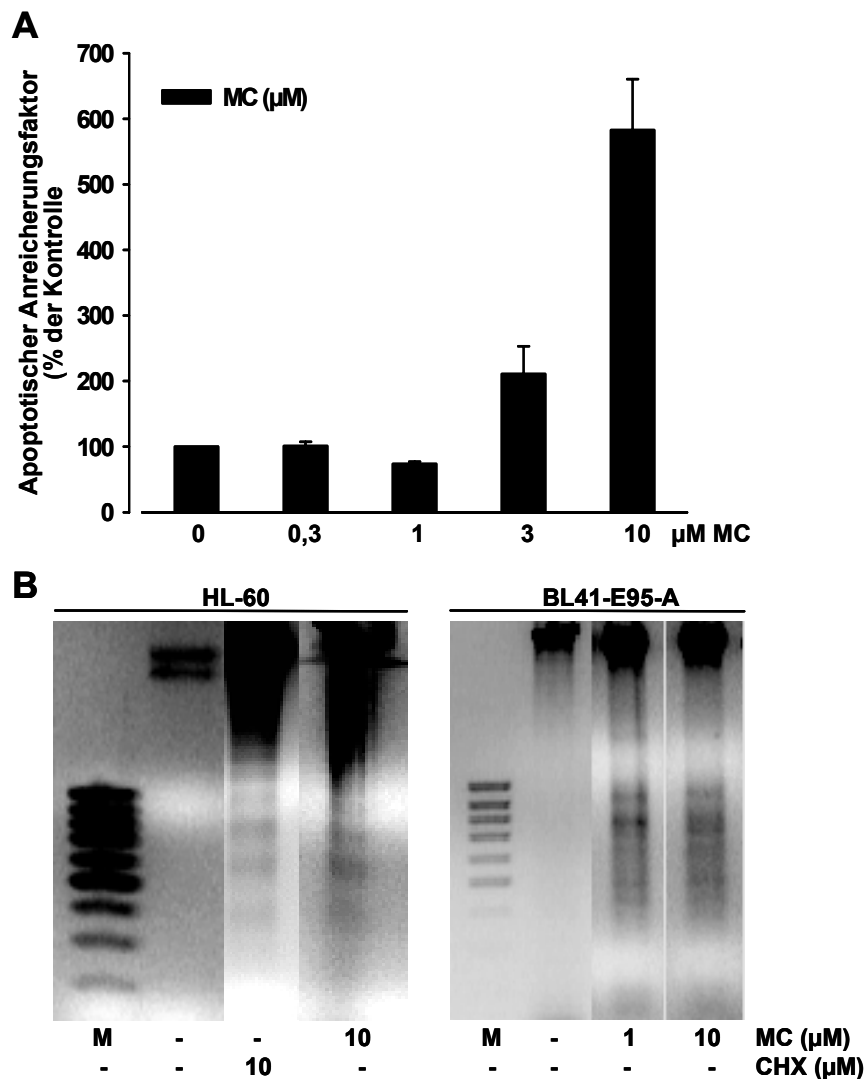


Abbildung 43: (A) Bestimmung des apoptotischen Anreicherungsfaktors (AAF) in HL-60-Zellen nach Behandlung mit steigenden MC-Konzentrationen für 24 Stunden. (B) Darstellung einer apoptotischen Leiter in HL-60- und BL41-E95-A-Zellen nach Behandlung mit MC in einem 2%-igen Agarosegel. CHX (10 μM) wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt. M: 100 bp-Marker.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Cell Death Detection ELISA[®]-Assay ist im 2%-igen Agarosegel fragmentierte DNA aus HL-60-Zellen nach der Inkubation mit 10 μM Myrtucommulon deutlich zu sehen (Abbildung 43B, Darstellung links). Dieser Myrtucommulon-Effekt ist mit dem des CHX (10 μM) vergleichbar.

In BL41-E95-A-Zellen führte Myrtucommulon bereits in der Konzentration von 1 μM zur Bildung einer DNA-Leiter (Abbildung 43B, Darstellung rechts).

Die Apoptose-Induktion in einer Zelle kann prinzipiell über zwei verschiedene (Haupt-) Signaltransduktionswege verlaufen: den intrinsischen und den extrinsische Signalweg (siehe auch Kapitel 0). Zur Aufklärung des MC-induzierten apoptotischen Mechanismus in Krebszelllinien wurden die T-lymphozytären Zelllinien Jurkat und Jurkat DD3 untersucht. Bei Jurkat DD3-Zellen handelt es sich um eine Leukämie-Zelllinie mit einer Mutation von Fas in der Todesdomäne. Damit wird in Jurkat DD3 vorwiegend der intrinsische, Cytochrom *c*-abhängige Weg aktiviert.

Beide T-Zelllinien sind für 24 Stunden mit Myrtucommulon in steigenden Konzentrationen (0,3-30 μM) behandelt worden. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen mit S-MC (30 μM , Negativkontrolle) oder IBP-C (30 μM , Negativkontrolle) bzw. mit Daunorubicin (0,3 μM , Positivkontrolle) behandelt. Untersuchungen der Zellproliferation und -viabilität nach Trypanblau Färbung mittels Lichtmikroskop haben für beide Zelllinien eine deutliche Abnahme im Zellwachstum nach Behandlung mit 10-30 μM Myrtucommulon ergeben (Abbildung 44, Graph).

Zusätzlich konnten die Spaltung von PARP und die Prozessierung der Caspase-8 und -9 zu den aktiven Formen ebenfalls für Jurkat und Jurkat DD3 ab einer MC-Konzentration von 10 μM detektiert werden (Abbildung 44, Western blot). Diese Ergebnisse sind mit den Effekten des Daunorubicins vergleichbar. Wie erwartet, hatten Semimyrtucommulon und der Isobutyrophenon-Kern in T-Lymphozyten keinen Effekt auf das Zellwachstum und die Caspasen-Prozessierung.

Laut Abbildung 44 zeigte sich der Einfluss des Myrtucommulons auf das Zellwachstum und die Caspasen-Aktivierung in gleicher Weise bei Jurkat- und bei Jurkat DD3-Zellen. Dieses Ergebnis lässt auf die vorwiegende Aktivierung des intrinsischen, Cytochrom *c*-abhängigen Weges in beiden T-lymphozytären Zelllinien durch das Myrtucommulon schließen.

Ergebnisse

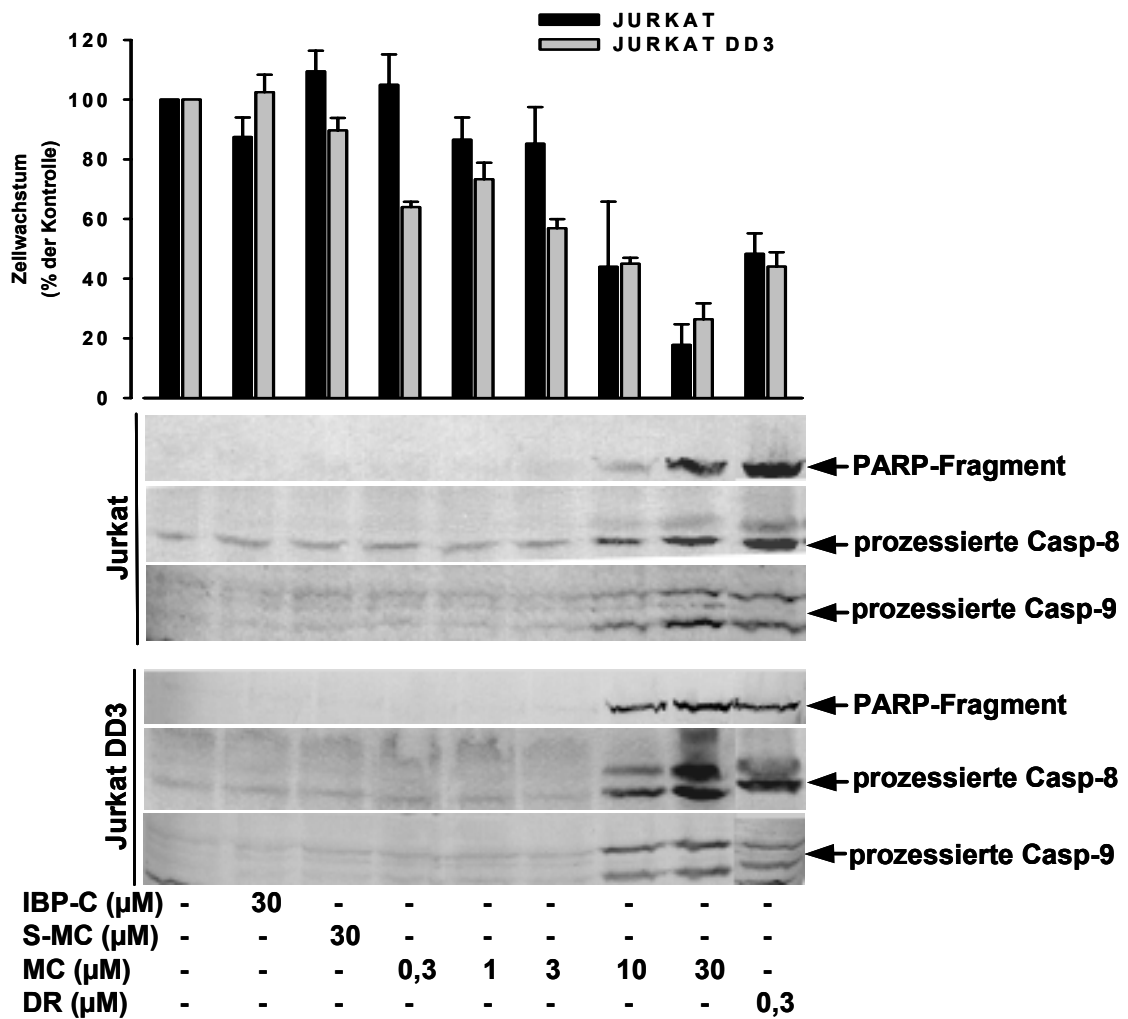


Abbildung 44: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Myrtucommulon auf Zellproliferation und -viabilität (Graph) sowie auf PARP-Spaltung und Prozessierung der Caspase-8 und -9 (Western blot) in Jurkat- und Jurkat DD3-Zellen. Die Zellen sind für 24 Stunden mit MC in indizierten Konzentrationen (0,3-30 µM) behandelt worden. S-MC und IBP-C (Negativkontrollen) sowie DR (Positivkontrolle) sind ebenfalls getestet worden. Das Zellwachstum wurde in Prozent angegeben und bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Zellprobe (100%).

Diskussion

Das Enzym 5-Lipoxygenase initiiert die Bildung bioaktiver Leukotriene aus Arachidonsäure durch die Katalyse der ersten beiden Syntheseschritte [11, 266]. In der B-lymphozytären Zelllinie BL41-E95-A wird die 5-LO konstitutiv exprimiert, wobei die 5-LO-Proteinmenge deutlich höher ist als in anderen B-Lymphozyten [254]. In der vorliegenden Arbeit ist zunächst das ungewöhnliche Verhalten der BL41-E95-A-Zellen bezüglich der 5-LO-Regulation unter bestimmten Zellkultur-Bedingungen untersucht worden.

5-LO in BL41-E95-A-Zellen

Bereits im Vorfeld ist beobachtet worden, dass nach dem Passagieren der BL41-E95-A-Zellen ein deutlicher Verlust in der Bildungskapazität für 5-LO-Metabolite in den Zellhomogenaten eintritt [250]. Dieser Effekt kann auf eine stark reduzierte 5-LO-Aktivität zurückgeführt werden, die mit dem Verlust des funktionellen 5-LO-Proteins einhergeht. Dabei wird das Auftreten eines 5-LO-Spaltfragmentes von 62 kDa Größe detektiert, das mit der Aktivierung der Caspase-8 und -6 korreliert [23]. Da das Passagieren von Zellen bereits innerhalb von 24 Stunden zu einem deutlichen Verlust des funktionellen 5-LO-Proteins führt (Reduktion um 80%), wird offensichtlich durch den Zelltransfer ins frische Medium eine effiziente 5-LO-Degradationsmaschinerie aktiviert.

Beim Passagieren der BL41-E95-A-Zellen besteht eine Korrelation zwischen der 5-LO-Prozessierung und der Aktivierung der Caspase-8 und -6. Nicht nur die Aktivität beider Caspasen steigt in B-Lymphozyten 24-48 Stunden nach Umsetzen ins frische Medium deutlich an, sondern auch die Menge an aktiven Caspase-Proteinen. Diese Resultate liefern die ersten Hinweise, dass Caspasen möglicherweise für den Abbau des 5-LO-Proteins verantwortlich sind.

Ein weiterer interessanter Befund betrifft den Einfluss des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) auf den 5-LO-Abbau. In passagierten BL41-E95-A-Zellen kann der Einsatz von CHX sowohl die Reduktion der 5-LO-Aktivität als auch den 5-LO-Abbau zum 62 kDa-Spaltfragment unterbinden. Da CHX ein Inhibitor der *de novo*-Proteinsynthese ist, scheint die Synthese von einem oder mehreren Proteinen am 5-LO-Abbau beteiligt zu sein. Obwohl das Passagieren von Zellen auch eine Reduktion der mRNA-Menge verursacht, kann diese nicht durch CHX-Einsatz wieder hergestellt werden. Somit ist nicht die erniedrigte Biosyntheserate für die Reduktion des 5-LO-Proteinlevels verantwortlich, sondern der Abbau des Proteins. Anderenfalls müsste durch das CHX die 5-LO-Menge in gleicher Weise

reduziert werden wie durch das Passagieren von BL41-E95-A-Zellen, was nicht beobachtet wird. Stattdessen scheint CHX in die Synthese des Proteins/der Proteine einzugreifen, die für den 5-LO-Abbau verantwortlich sind. Tatsächlich kann durch CHX die Prozessierung der Caspase-8 und -6 zu ihren aktiven Formen gehemmt werden, was die Beteiligung der *de novo*-Proteinsynthese an der Caspasen-Aktivierung und am 5-LO-Abbau vermuten lässt. Die genaue Identifizierung dieses(r) Proteins(e) und der detaillierte Mechanismus sind bis jetzt ungeklärt.

Die 5-LO stellt ein instabiles Enzym dar, dessen Aktivität auf die Hälfte innerhalb von 30 min bei 0°C und innerhalb von 24 Stunden bei 2°C absinkt [266]. Die Inaktivierung der 5-LO während der AA-Umsetzung kann eventuell auf Interaktionen mit den 5-LO-Metaboliten 5-HPETE und LTA₄ geführt werden [267, 268]. In Pulse-chase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des 5-LO-Proteins in differenzierten HL-60-Zellen circa 26 Stunden beträgt [269]. In passagierten BL41-E95-A-Zellen kann allerdings die Reduktion des funktionellen 5-LO-Proteins durch die Inhibition der *de novo*-Proteinsynthese durch CHX-Behandlung innerhalb von 24 Stunden verhindert werden. Dies spricht dafür, dass die $t_{1/2}$ der 5-LO in BL41-E95-A-Zellen im Vergleich zu HL-60-Zellen deutlich mehr als 26 Stunden beträgt.

Für den Abbau der 5-LO durch das Passagieren von BL41-E95-A-Zellen sind sowohl die Reduktion der Zelldichte als auch die Veränderung in der Mediumzusammensetzung notwendig. Dabei ist es denkbar, dass in den Zellen durch das Umsetzen eine bestimmte Maschinerie angeworfen wird, die zur Synthese eines Mediators/Proteins führt, der den 5-LO-Abbau begünstigt. Dieser kann dann möglicherweise für die Aktivierung der Caspasen sorgen, die ihrerseits für die 5-LO-Spaltung verantwortlich gemacht werden. Die Synthese dieses Proteins lässt sich möglicherweise durch den Einsatz von CHX unterbinden, was dann wiederum in ausbleibender Caspasen-Aktivierung und fehlendem 5-LO-Abbau resultiert.

Obwohl die Aktivierung der Caspasen in den meisten Fällen mit Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht wird [171, 181, 187], sind Caspasen auch an einer Vielzahl nicht-apoptotischer Vorgänge beteiligt [167, 172]. In BL41-E95-A-Zellen ist die Aktivierung der Caspase-8 und der Caspase-6 nach Umsetzen der Zellen nicht mit Apoptose assoziiert, sondern mit einer erhöhten Proliferation der Zellen. Die BL41-E95-A-Zellen sind ursprünglich durch die *in vitro*-Infektion der Burkitt's Lymphoma Zelllinie BL41 mit der B95-8 Variante des Epstein-Barr Virus erhalten worden [251]. Dadurch erhielten die Zellen neben dem malignen Phänotyp die Apoptoseresistenz, die auf EBV-kodierten kleinen RNAs, inaktivem Caspase-3-Signalweg, erhöhter Bcl-2-Expression und erniedrigter Expression des

proapoptotischen Bim basiert [255-258]. Die Aktivierung der Caspase-6 ist aufgrund fehlender aktiver Caspase-3 nicht ganz geklärt, allerdings haben spätere Untersuchungen an BL41-E95-A-Zellen gezeigt, dass das typische Caspase-3-Substrat PARP in den Zellen unter bestimmten Bedingungen trotz des inaktiven Caspase-3-Signalweges gespalten werden kann (siehe Kapitel 0, Abbildung 32B).

Interessanterweise proliferieren BL41-E95-A-Zellen 24-48 Stunden nach Umsetzen ins frische Medium nicht nur deutlich schneller als Zellen, die sich bereits seit 4-5 Tagen im konditionierten Wachstumsmedium befinden, sondern sind auch wesentlich größer. So haben Beobachtungen im konfokalen Mikroskop ergeben, dass frisch passagierte Zellen einen circa 2-3-fach größeren Durchmesser besitzen (15-20 μm) als BL41-E95-A-Zellen nach vier-tägigem Wachstum (6-10 μm).

In den BL41-E95-A-Zellen wird eine Korrelation zwischen der Caspasen-Aktivierung und der verstärkten Zellproliferation beobachtet. Die Inhibitoren der Caspase-8 und der Caspase-6 führen zu einer deutlichen Reduktion der durch das Umsetzen von Zellen induzierten Zellproliferation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen an dichten tonsillären B-Zellen, in denen die Caspase-8 und -6, nicht aber die Caspase-3, durch proliferative Stimuli aktiviert werden, um den Zellen den Eintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen [232]. Die wichtige Rolle der Caspase-6 an der Proliferation und dem Überleben von B-Zellen ist durch die Deletion des Caspase-6-Gens in einer Hühnerzelllinie gezeigt worden [270]. Zusätzlich konnte auch die positive Rolle der Caspasen während der Zellproliferation humaner T-Lymphozyten [271, 272] und anderer hematopoetischer Zellen [273, 274] demonstriert werden.

Es sind mehr als 280 Targets für verschiedene Caspasen identifiziert worden [214], wobei die Effizienz der Substratspaltung sehr stark variiert. Innerhalb der Substrate erkennen Caspasen ein Konsensus-Tetrapeptid (P4 bis P1) mit einem Aspartat-Rest in Position P1. Das Aspartat ist essentiell für die Substraterkennung und die Hydrolyse der Peptidbindung auf dessen Carboxylseite [164]. Während die Aminosäure in Position P4 für die Substratspezifität verantwortlich ist, kommt den Positionen P2 und P3 im Tetrapeptid eine geringe Bedeutung zu [183]. Darüber hinaus existieren spezifische Unterschiede zwischen den Spezies in der Umsetzung einiger Caspasen-Substrate [182].

Untersuchungen an isolierter aufgereinigter 5-LO *in vitro* haben ergeben, dass die Caspase-6, nicht aber die Caspase-8, für den 5-LO-Abbau zu einem 58 kDa-Spaltfragment verantwortlich ist. Diese Spaltung fällt unter experimentellen Bedingungen nach Zusatz von DTT oder GSH zum Inkubationsansatz noch deutlicher aus. In Übereinstimmung mit diesem Befund ist

mehrfach demonstriert worden, dass in zellfreien Systemen die Aktivität der Caspase-6 ein reduzierendes Milieu erfordert [275-278]. Da alle Caspase-6 in ihren aktiven Zentren Cysteine enthalten, ist die Entstehung von Disulfidbrücken eine mögliche Erklärung für verminderte bzw. fehlende Aktivität der Caspase-6 in Abwesenheit reduzierender Agentien, wie zum Beispiel Glutathion [277].

Die optimale Peptidsequenz für die Prozessierung der Substrate durch die Caspase-6 ist VEID, wie sie beispielsweise innerhalb der Struktur von Lamin A [279], einem typischen Substrat der Caspase-6, vorhanden ist. Andere verwandte Motive werden ebenfalls von der Caspase-6 erkannt, wie VEVD in Lamin B [280], VEMD in SATB1 [281], aber auch PEDD und EEED in der DNA-Topoisomerase I [282]. Basierend auf *in vitro*-Untersuchungen scheint die 5-LO das Tetrapeptid IQFD₁₇₀ als Erkennungsmotiv für die Caspase-6 zu enthalten. Von allen getesteten mutierten 5-LO-Proteinen, in denen das für die Spaltung essentielle Aspartat durch Alanin ausgetauscht wurde, kann nur die mutierte 5-LO-D170A durch die Caspase-6 *in vitro* nicht abgebaut werden. Die Tatsache, dass in der voraussichtlichen sekundären Struktur der 5-LO das Motiv IQFD auf der Oberfläche des Enzyms zu liegen scheint, ist von enormer Bedeutung. Das 3D-Homologiemodell der 5-LO [23] lässt eindeutig erkennen, dass der proteolytische Angriff der Caspase-6 am IQFD-Tetrapeptid leicht erfolgen kann und die Spaltung der 5-LO zwischen Asp170 und Ser171 sterisch nicht behindert wird. Diese Spaltung würde in der Trennung der katalytischen und der regulatorischen Domäne des Enzyms resultieren, was mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität der 5-LO einherginge. Ein weiteres, kurz zuvor veröffentlichtes 5-LO-Modell, bestätigt diese Ergebnisse [30, 283].

Die offensichtliche Diskrepanz in der molekularen Masse der 5-LO-Spaltfragmente aus BL41-E95-A-Zellen (ca. 62 kDa) und nach der Spaltung der aufgereinigten 5-LO durch die Caspase-6 *in vitro* (ca. 58 kDa) führte zu weiteren Untersuchungen. So liegt die Vermutung nahe, dass das 5-LO-Spaltprodukt in B-Lymphozyten posttranslational modifiziert wird. Es ist denkbar, dass die neu entstandene Oberfläche bzw. die nach der Spaltung veränderte Faltung des 5-LO-Fragments den Angriff modifizierender Enzyme begünstigt. Das 5-LO-Spaltprodukt könnte beispielsweise durch Ubiquitinierung, Glykosylierung, Phosphorylierung oder andere Modifikationen in seinem Gewicht bzw. seiner elektrophoretischen Mobilität verändert werden.

Für die mögliche Ubiquitinierung des 5-LO-Spaltfragmentes spricht die Tatsache, dass viele Proteine oder Proteinfragmente, die von der Zelle nicht verwendet werden können und/oder eine fehlerhafte Faltung/Struktur besitzen, im Proteasom abgebaut werden. Die dem Abbau

vorausgehende Markierung des Proteins erfolgt durch Anhängen eines oder meist mehrerer Ubiquitin-Reste [284, 285].

Um eine Polyubiquitinierung könnte es sich allerdings im Falle des 5-LO-Fragmentes aufgrund der PTM-Größe nicht handeln. Außerdem haben die vorgenommenen Untersuchungen mit dem zellpermeablen Proteasom-Inhibitor MG-132 nicht zu einer Anreicherung des 5-LO-Spaltfragmentes in der Zelle geführt (Daten nicht gezeigt). Es kommt also vermutlich nicht zu einem Abbau des 5-LO-Spaltproduktes im Proteasom der BL41-E95-A-Zellen.

Es ist mehrfach über ein enges Zusammenspiel zwischen Ubiquitinierung und Caspasenaktivierung bzw. apoptotischen Vorgängen berichtet worden [286-288]. Die kovalente Bindung eines Ubiquitin-Restes an ein Zielprotein kann aber auch an einer Vielzahl nicht-degradativer Prozesse beteiligt sein [289, 290], wie beispielsweise an der Regulation des Proteintransports innerhalb der Zelle oder an Protein-Protein-Interaktionen [291, 292].

Im Falle des 5-LO-Spaltfragmentes würde eine Monoubiquitinierung zu einer Gewichts-Änderung von ca. 8 kDa führen, was in einem SDS-Polyacrylamidgel eine etwas kleinere Größenverschiebung ergeben könnte. Die Untersuchung einer möglichen Ubiquitinierung des 5-LO-Spaltfragmentes mit deubiquitinierenden Enzymen UCHL3 und Ipaase-T haben nicht in einer Änderung des Molekulargewichts resultiert. Dies deutet auf die Modifikation der 5-LO durch ein von Ubiquitin verschiedenes Protein.

Eine weitere Möglichkeit könnte in der posttranslationalen Modifizierung des intakten 5-LO-Proteins bestehen, was eventuell als Signal für die Spaltung dienen könnte. Nach der Durchführung einer Immunopräzipitation mit einem geeigneten 5-LO-Antiserum konnten zwar ubiquitinierte Proteine im BL41-E95-A-Zellhomogenat detektiert werden, es handelt sich bei denen allerdings nicht um die 5-LO.

Eine Vielzahl Ubiquitin-ähnlicher Proteine kommt als potentielle posttranslationale Modifizierer der 5-LO ebenfalls in Frage, wie zum Beispiel Proteine der SUMO-Familie, NEDD8 oder Rub1 [293-296]. Allerdings weicht die Größe dieser Proteine (ca. 11 kDa bei SUMO-1 bzw. ca. 15 kDa bei SUMO 2/3) und somit die vermutete Veränderung im Laufverhalten des 5-LO-Fragmentes im SDS-Polyacrylamidgel stark von den experimentellen Befunden ab. Darüber hinaus ist die strukturelle Ähnlichkeit dieser Proteine und des Ubiquitins sehr groß, so dass die eingesetzten Deubiquitinierungsenzyme diese Proteine ebenfalls erkennen und von der 5-LO abspalten müssten [297, 298].

Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation der 5-LO bzw. des 5-LO-Spaltfragmentes könnte die Glykosylierung darstellen. Auch wenn die Konjugation mit einem

oder mehreren Zuckerresten vermutlich eine wesentlich kleinere Gewichtsänderung des Proteins als ca. 4 kDa verursachen würde, lässt sich die Änderung des Migrationsverhaltens im Gel nicht immer exakt voraussagen. Die Behandlung des 5-LO-Spaltfragmentes aus BL41-E95-A-Zellen mit der N-Glykosidase PNGase F hat allerdings nicht zur Größenanpassung dieses Spaltproduktes an die Größe des 5-LO-Fragments aus der Prozessierung *in vitro* geführt. Bei der gesuchten PTM scheint es sich also auch nicht um die Glykosylierung zu handeln.

Über die Phosphorylierung der 5-LO in PMNL oder MM6-Zellen [59], in B-Lymphozyten [60] und in *in vitro*-Studien [61, 62] ist mehrfach berichtet worden. Dabei wird in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen der 5-LO-Phosphorylierung und einer verstärkten Translokation und LT-Produktbildung beobachtet. Die Phosphorylierung der 5-LO durch die PKA am Ser523 führt allerdings zur Inhibition der Leukotrienbildung durch die 5-LO [63]. In passagierten BL41-E95-A-Zellen ist ebenfalls eine deutliche Reduktion der 5-LO-Aktivität beobachtet worden, allerdings wird diese auf den Verlust des funktionellen 5-LO-Proteins zurückgeführt. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass die intakte 5-LO oder das 5-LO-Abbauprodukt einer Phosphorylierung unterworfen werden.

Auch wenn das 5-LO-Spaltfragment durch die Phosphorylierung keine reine Gewichtszunahme von ca. 4 kDa erfahren würde (ein Phosphatrest wiegt ca. 80 Da), ist trotzdem überprüft worden, ob die Behandlung mit zwei verschiedenen Phosphatasen (LAR und PP1) zu einer Größenänderung des Proteins führt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei der potentiellen PTM auch nicht um die Phosphorylierung handelt.

Untersuchungen der subzellulären Lokalisation der 5-LO in unterschiedlichen Zelllinien haben ergeben, dass die 5-LO je nach Zelltyp und/oder Aktivierungszustand des Enzyms sich im Zytosol, an der äußeren oder inneren Kernmembran oder im Nukleus befinden kann [57, 71, 85]. In humanen tonsillären B-Lymphozyten und peripheren B-Lymphozyten der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell Typ (B-CLL Zellen) konnte die Lokalisation der 5-LO im Zellnukleus gezeigt werden [299]. In BL41-E95-A-Zellen wurde die 5-LO mittels Immunfärbung vorwiegend in Bereich der Kernmembran gefunden [299]. Laut Ergebnissen dieser Arbeit scheint sich die 5-LO in unpassagierten BL41-E95-A-Zellen (5 Tage nach Umsetzen) zwischen dem Zytosol und der Plasmamembran zu verteilen. In passagierten Zellen (24-48 Stunden nach Umsetzen) findet man die intakte 5-LO ebenfalls in löslicher Form im Zytosol sowie gebunden an die Plasmamembran, das 5-LO-Spaltfragment befindet sich dagegen in der partikulären nukleären Fraktion (Abbildung 19A). Da die Caspase-8 und die Caspase-6 in BL41-E95-A-Zellen jeweils in der

zytosolischen Fraktion gefunden wurden, erfolgt vermutlich auch die 5-LO-Spaltung, für die die Caspase-6 verantwortlich gemacht wird, im Zytosol. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die gespaltene 5-LO, die an der nukleären Membran akkumuliert, an die äußere Kernmembran gebunden vorliegt. Unklar ist allerdings, ob die intakte 5-LO zunächst an die nukleäre Membran bindet und anschließend die Spaltung zum 62 kDa-Degradationsfragment erfährt, oder ob die gespaltene, verkürzte 5-LO direkt an die Kernmembran bindet.

Interessanterweise ist bisher die N-terminale C2-ähnliche Domäne für die 5-LO-Bindung an membranäre Strukturen verantwortlich gemacht worden [31, 43, 44]. Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen aus *in vitro*-Studien an isolierter, aufgereinigter 5-LO erfolgt die Spaltung des Enzyms durch die Caspase-6 auf der Carboxylseite vom Asp170, was zur vollständigen Trennung der C2-ähnlichen Domäne vom Enzym führt. Überträgt man diese Resultate auf die 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen, kann die Bindung der gespaltenen 5-LO an die Kernmembran nicht den bisher vermuteten Trp13, Trp75 und Trp102 zugeschrieben werden [31, 33].

Ein weiteres denkbare Szenario besteht in der posttranslationalen Modifikation der intakten oder gespaltenen 5-LO durch ein Lipid bzw. eine lipophile Struktur. Diese könnte dann als eine Art Lipidanker fungieren und das 5-LO-Spaltprodukt an die nukleäre Membran binden [300]. Solche Reste wie Glykosylphosphatidylinositol (GPI), Farnesyl oder Stearyl könnten eventuell in Frage kommen, allerdings würden sie vom Molekulargewicht allein vermutlich nicht ausreichen, um eine Massenverschiebung von ca. 4 kDa auszulösen.

Das 5-LO-Spaltfragment aus B-Lymphozyten besitzt laut Westen blot-Untersuchungen ein Molekulargewicht von circa 62 kDa. Wird allerdings die intakte 5-LO aus den S-100 der BL41-E95-A-Zellen, die nach fünftägigem Wachstum im Kulturmedium und anschließender Homogenisierung und Ultrazentrifugation nur das intakte 5-LO-Protein enthalten, in *in vitro*-Experimenten einer Spaltung durch die Caspase-6 unterworfen, so lässt sich ein 5-LO-Abbauprodukt von circa 58 kDa-Größe detektieren (Abbildung 24). Die isolierte, aufgereinigte, rekombinant hergestellte 5-LO wird durch die Caspase-6 *in vitro* ebenfalls zu einem Abbaufragment von 58 kDa prozessiert. Basierend auf dieser Übereinstimmung, lässt sich festhalten, dass die intakte 5-LO in BL41-E95-A-Zellen die gleiche Größe/Masse besitzt wie das rekombinante 5-LO-Protein aus *E. coli* und nur die 5-LO-Abbaufragmente sich in der Größe unterscheiden. Demnach ist es denkbar, dass in B-Lymphozyten zunächst die Spaltung der 5-LO erfolgt, gefolgt von der nachträglichen Modifikation des entstandenen Spaltfragmentes.

Durch Isolierung des 5-LO-Spaltproduktes aus BL41-E95-A-Zellen und anschließende Untersuchung mittels MALDI-MS könnte möglicherweise die Frage der 5-LO-Modifikation geklärt werden. Die praktische Vorgehensweise wird allerdings dabei durch die geringe Menge des exprimierten 5-LO-Proteins in BL41-E95-A-Zellen deutlich erschwert.

5-LO in einigen weiteren Zelllinien

Es stellte sich natürlicherweise die Frage nach dem 5-LO-Abbau in anderen Zelllinien, die nicht den B-Lymphozyten angehören. So wurde die 5-LO in HeLa-Zellen überexprimiert und die mögliche Spaltung des Proteins untersucht. Die Aktivierung der Caspasen erreicht man in Apoptose-sensitiven HeLa-Zellen durch Stimulation der Zellen mit typischen Apoptose-Induktoren wie $\text{TNF}\alpha$, CHX oder Daunorubicin in indizierten Konzentrationen. Es ist bemerkenswert, dass weder die Aktivierung der Caspasen durch verschiedene Apoptosestimuli, noch die Überexpression zusätzlicher Caspase-6 zu einem Abbau des exprimierten 5-LO-Proteins führt. In Kontrollexperimenten kann allerdings unter analogen Bedingungen die Spaltung von PARP detektiert werden, die als typisches Substrat für aktive Caspasen (vorwiegend für Caspase-3) gilt und auf apoptotische Vorgänge in der Zelle schließen lässt. Die konzentrationsabhängige Spaltung der in HeLa-Zellen endogen vorhandenen zytosolischen Phospholipase A_2 , die vor einiger Zeit auch als Target für verschiedenen Caspasen identifiziert wurde [263, 264], kann ebenfalls nach Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ oder CHX detektiert werden.

Untersuchungen der subzellulären Verteilung der 5-LO und der Caspase-6 in HeLa-Zellen haben gezeigt, dass die ausbleibende Prozessierung der 5-LO nicht auf der räumlichen Trennung der beiden Proteine basiert. Sowohl die überexprimierte 5-LO als auch die endogene Caspase-6 und -8 können sowohl in der zytosolischen als auch in der nukleären Zellfraktion detektiert werden. Die für die potentielle Spaltung der 5-LO durch die Caspase-6 notwendige Anwesenheit beider Proteine in demselben Zellkompartiment ist also gewährleistet. Trotzdem wird die Spaltung der 5-LO in HeLa-Zellen unter keinen Bedingungen beobachtet.

In humanen Monozyten (MM6-Zellen), die zuvor mit $\text{TGF}\beta$ und Calcitriol über vier Tage differenziert wurden, in basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL-1) und in isolierten primären Granulozyten (PMNL) kann der 5-LO-Abbau weder durch das Passagieren von Zellen, noch durch die Behandlung mit apoptotischen Stimuli induziert werden.

Untersuchungen der 5-LO-Spaltung durch die rekombinante Caspase-6 *in vitro* haben ergeben, dass die in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte 5-LO und die 5-LO aus S-100 der

BL41-E95-A-Zellen durch die Caspase-6 zu einem Degradationsprodukt von 58 kDa prozessiert werden. Dagegen bleibt sowohl die in den HeLa-Zellen überexprimierte 5-LO, als auch die 5-LO aus differenzierten MM6-Zellen nach Inkubation von entsprechenden 100.000 g-Überständen mit rekombinanter Caspase-6 völlig intakt.

Einerseits scheinen die BL41-E95-A-Zellen über einen einzigartigen Mechanismus der Caspasen-Aktivierung und der Regulation des 5-LO-Abbaus zu verfügen. Andererseits exprimieren die anderen untersuchten eukaryontischen Zellen möglicherweise einen Faktor, der einen protektiven Effekt auf die 5-LO ausübt. Dies kann beispielsweise durch Bindung an das 5-LO-Enzym und Verdecken der potentiellen Erkennungs- und Spaltstelle für die Caspase-6 erreicht werden. Auf diese Weise könnte die 5-LO trotz Anwesenheit aktiver Caspasen vor dem proteolytischen Angriff der Caspase-6 geschützt werden.

Hinweise auf einen solchen Mechanismus sollten weitere *in vitro*-Untersuchungen liefern. Dabei wurde die aus *E. coli* isolierte, aufgereinigte 5-LO mit rekombinanter Caspase-6 inkubiert. Den Ansätzen sind S-100-Aliquots aus BL41-E95-A- (nach einem und fünf Tagen Wachstum in frischem Medium), HeLa- (5-LO-negative und -positive) oder MM6-Zellen (5-LO-negative und -positive) in steigenden Konzentrationen (entsprechend $2,5-30 \times 10^6$ Zellen) zugegeben worden, um den Einfluss der S-100 auf die 5-LO-Spaltung durch die Caspase-6 *in vitro* zu untersuchen.

Diesen Experimenten zufolge, haben die S-100 aus BL41-E95-A-Zellen (nach einem oder fünf Tagen Wachstum in frischem Medium) keinen hemmenden Effekt auf den 5-LO-Abbau durch die Caspase-6 *in vitro*, und zwar unabhängig von der Konzentration der Zellüberstände. Die S-100 aus 5-LO-negativen HeLa- oder MM6-Zellen verhindern die 5-LO-Spaltung ebenfalls nicht oder erst in höheren Konzentrationen (entsprechend $20-30 \times 10^6$ MM6-Zellen). Dagegen bleibt die 5-LO-Spaltung nach Zugabe von S-100 aus 5-LO-positiven HeLa-Zellen gänzlich aus. Die S-100 aus 5-LO-positiven MM6-Zellen haben nur in geringen Konzentrationen (entsprechend $2,5-5 \times 10^6$ Zellen) keinen 5-LO-protektiven Effekt, bei Zusatz der S-100 entsprechend $10-30 \times 10^6$ MM6-Zellen kann die 5-LO nicht mehr durch die Caspase-6 *in vitro* prozessiert werden.

Die Kontrollexperimente haben gezeigt, dass die Aktivität der Caspase-6 in allen Proben detektierbar war und mit steigenden S-100-Mengen ebenfalls konzentrationsabhängig zunahm. Daher kann bei diesen Experimenten nicht die fehlende Aktivität der Caspase-6 für das Ausbleiben der 5-LO-Prozessierung verantwortlich sein. Tatsächlich liefern diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass HeLa- und MM6-Zellen zusätzlich zur 5-LO einen Faktor zu exprimieren scheinen, der die 5-LO direkt oder indirekt vor dem proteolytischen Abbau

durch die Caspase-6 *in vitro* schützt. Interessanterweise scheint dieser Faktor temperaturempfindlich zu sein, da er sein 5-LO-protektives Potential durch das Einfrieren bei -20°C und das anschließende Auftauen verliert.

Bisher wird nur einigen wenigen Proteinen die 5-LO-Bindung zugesprochen. So ist beispielsweise über die Bindung der 5-LO an das GST-Grb2-Fusionsprotein berichtet worden [91]. TRAP-1, Dicer und CLP sind als mögliche 5-LO-Interaktionspartner im Yeast Two-Hybrid Verfahren identifiziert worden [88].

Eine direkte Bindung von Coactosin-like Protein (CLP) [301, 302] an die 5-LO ist vor einiger Zeit nachgewiesen worden [89]. In Abwesenheit von Membranen bzw. PC vermag CLP die 5-LO-Aktivität zu erhöhen [303]. Dabei scheint die Bindung des CLP innerhalb der regulatorischen β -Barrel-Domäne der 5-LO über die Tryptophane Trp13, Trp75 und Trp102 zu erfolgen [303]. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen der vermutlichen CLP-Bindungsstelle innerhalb des 5-LO-Proteins und der Erkennungssequenz für die Caspase-6, könnte die Bindung des CLP an die 5-LO die potentielle Erkennungs- und Spaltstelle für die Caspase-6 verdecken und auf diese Weise die 5-LO dem Abbau entziehen. Es bedarf weiterer Untersuchungen um festzustellen, ob CLP verstärkt in HeLa- und MM6-, nicht aber in BL41-E95-A-Zellen, exprimiert wird, und möglicherweise in diesen Zelllinien den 5-LO-Abbau durch die Caspase-6 verhindert. Die ersten Erkenntnisse über die protektive Rolle des CLP beim 5-LO-Abbau durch die Caspase-6 könnten in *in vitro*-Untersuchungen durch die Inkubation isolierter aufgereinigter 5-LO mit rekombinanter Caspase-6 unter dem Zusatz von isoliertem CLP gewonnen werden.

Die Bindung der 5-LO an (Phospho)Lipide sowie lipophile membranäre Strukturen ist ebenfalls erforscht worden [35, 41, 42, 47, 64]. Es wäre also möglich, dass der 5-LO-protektive Faktor ein Lipid ist, das an die 5-LO bindet und auf diese Weise den Zugang der Caspase-6 zu dem Konsensus-Tetrapeptid innerhalb der 5-LO blockiert. Die Bindung der 5-LO an Phospholipid-Membranen wird durch die Aminosäuren Trp13, Trp75 und Trp102 vermittelt [31]. Das mutierte 5-LO-3W-Protein, in dem alle drei Tryptophan-Reste durch Alanin ersetzt wurden, besitzt diese Fähigkeit dagegen nicht. Sollte ein Lipidfaktor den protektiven Effekt auf die 5-LO in HeLa-Zellen ausüben, so dürfte seine Wirkung bei der Expression des mutierten 5-LO-3W-Proteins ausbleiben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese ist die 5-LO-3W in HeLa-Zellen überexprimiert worden. Die Behandlung der Zellen mit den Apoptosestimuli TNF α , CHX und DR führt zwar zu Aktivierung der Caspasen, nicht aber zur Degradation des mutierten 5-LO-3W-Proteins. Auch die zusätzliche Expression der Caspase-6 resultiert in HeLa-Zellen nicht in einem 5-LO-3W-

Spaltfragment. In *in vitro*-Untersuchungen wird das mutierte 5-LO-3W-Protein analog zur Wildtyp-5-LO vor dem Abbau durch die Caspase-6 geschützt. Darüber hinaus können die S-100-Aliquots aus 5-LO-3W-positiven HeLa-Zellen die Spaltung isolierter aufgereinigter 5-LO durch die Caspase-6 *in vitro* hemmen. Das mutierte 5-LO-3W-Protein verhält sich somit in allen Experimenten analog zur Wildtyp-5-LO, was nicht für die Beteiligung der drei mutierten Tryptophan-Reste (Trp13, Trp75 und Trp102) an der 5-LO-Protektion spricht.

In einigen eukaryontischen Zelllinien (HeLa-, MM6-Zellen) scheint die Expression des 5-LO-Proteins mit der eines möglichen (neuen?) 5-LO-Interaktionspartners zu korrelieren. Bisher sind erst einige Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung dieses Faktors, der die 5-LO offensichtlich vor dem Abbau durch die Caspase-6 schützt, (zumindest in *in vitro*-Untersuchungen), vorgenommen worden. Weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet können zum Verständnis der 5-LO-Regulation und -Funktion maßgeblich beitragen.

Hyperforin-Effekt in BL41-E95-A-Zellen

Versuche zur Aufklärung des Regulationsmechanismus der Caspasen-Aktivierung mit anschließender Prozessierung des 5-LO-Proteins in BL41-E95-A-Zellen, haben zu Untersuchungen verschiedener Substanzen bezüglich ihrer Beeinflussung der 5-LO-Degradation geführt. Überraschenderweise sorgt Hyperforin konzentrationsabhängig für eine Hemmung des 5-LO-Abbaus in B-Lymphozyten. Die Spaltung der 5-LO kann bereits durch die Zugabe von 3 μ M Hyperforin supprimiert werden.

Hyperforin ist als dualer Inhibitor der 5-LO und der COX-1 beschrieben worden [135, 145], wobei seine inhibitorische Potenz auf die direkte Bindung an die 5-LO innerhalb der β -Barrel-Domäne des Enzyms zurückgeführt werden kann [146]. Die Bindung des Hyperforins an die 5-LO könnte die potentielle Erkennungsstelle für die Caspase-6 innerhalb des 5-LO-Proteins verdecken bzw. sterisch abschirmen und auf diese Weise die 5-LO-Spaltung verhindern. Untersuchungen an rekombinanter 5-LO unter Hyperforin-Zusatz *in vitro* haben allerdings keine Hemmung der 5-LO-Prozessierung durch die Caspase-6 gezeigt. Der Hyperforin-Effekt kann ebenfalls nicht auf die Beeinflussung der subzellulären Verteilung intakter und gespaltener 5-LO zurückgeführt werden. Vielmehr wird eine signifikante Reduktion der Aktivität der Caspase-6 und -8 unter Hyperforin-Einfluss beobachtet. Diese Aktivitätshemmung basiert nicht auf direkter Inhibition der katalytischen Caspasenaktivität durch das Hyperforin, sondern resultiert aus der reduzierten Prozessierung der beiden Caspasen zu ihren aktiven Formen.

In BL41-E95-A-Zellen führt Hyperforin demnach zu einer Hemmung der Aktivierung der Caspase-6 und -8, die letztendlich in einer supprimierten 5-LO-Degradation resultiert.

Interessanterweise führt Hyperforin in BL41-E95-A-Zellen konzentrationsabhängig nicht nur zu einer Hemmung der Zellproliferation, sondern, in höheren Konzentrationen, auch zu einer Reduktion der Zellzahlen. Der Nachweis der PARP-Spaltung, die Anreicherung von Oligonukleosomen aus dem DNA-Abbau sowie das Auftreten einer typischen apoptotischen DNA-Leiter in Hyperforin-behandelten Zellen, liefern genug Hinweise auf die proapoptische Wirkung des Hyperforins in BL41-E95-A-Zellen.

In Übereinstimmung mit bereits bekannten Ergebnissen, laut denen Hyperforin in einigen Krebszelllinien Apoptose durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade auslösen kann [148-150], führt Hyperforin in HL-60- und MM6-Zellen ebenfalls zu einem apoptotischen Zelltod. Als eindeutige Nachweise dienen hierbei die Reduktion der Proliferation und der Lebensfähigkeit der Zellen, die Aktivierung der Caspase-6 und -8 sowie die Spaltung von PARP. Zusätzlich kann in HL-60-Zellen der DNA-Abbau zu oligonukleosomalen Fragmenten in Form einer apoptotischen Leiter beobachtet werden.

Wie bereits diskutiert, führt das Passagieren von BL41-E95-A-Zellen zu einer Induktion der Caspasen-Prozessierung, die zum 5-LO-Abbau führt und mit einer verstärkten Proliferation der B-Lymphozyten assoziiert ist. Hyperforin scheint zu einer Hemmung dieser Caspasen-Aktivierung zu führen, mit anschließender Suppression des 5-LO-Abbaus. Trotz des hemmenden Hyperforin-Effektes auf die Caspasen-Aktivierung kann in BL41-E95-A-Zellen der Zelniedergang durch apoptotische Vorgänge eindeutig charakterisiert werden.

Die Apoptose-Induktion durch Hyperforin in scheinbar Apoptose-resistenten BL41-E95-A-Zellen verläuft offenbar über einen unbekanntem, einzigartigen Mechanismus. Die proapoptischen Eigenschaften des Hyperforins, kombiniert mit der antiangiogenetischen Aktivität in B-Zellen über die Hemmung der Sekretion der Matrix-Metalloprotease-9 [249], lassen Hyperforin als ein potentes Therapeutikum für Chemotherapie-resistente EBV-transformierte B-Lymphozyten vermuten.

Eine interessante Beobachtung betrifft Untersuchungen mit vier potentiellen 5-LO-Inhibitoren, die im AK von Prof. G. Schneider in einem virtuellen Screening-Verfahren entdeckt wurden und Pirinixinsäure-Derivate darstellen. Die Verbindungen besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit Hyperforin und stellen chemisch gesehen zwei Säure-Verbindungen (LP-105 und LP-121) und zwei dazu gehörende Ester-Derivate (LP-131 und LP-119) dar.

Untersuchungen an BL41-E95-A-Zellen haben ergeben, dass die beiden Ester-Verbindungen LP-131 und LP-119 in Analogie zu Hyperforin die 5-LO-Spaltung verhindern, wobei für LP-131 zusätzlich eine deutliche Reduktion der Caspase-8-Prozessierung beobachtet wird. Im Gegensatz dazu haben die Säure-Verbindungen LP-105 und LP-121 keinerlei Effekt auf den 5-LO-Abbau bzw. auf die Caspasen-Aktivierung. Alle Verbindungen sind in intakten B-Lymphozyten durch Zugabe zum Wachstumsmedium getestet worden, so dass zunächst die Vermutung nahe lag, dass die Säure-Derivate gar nicht erst in die Zellen gelangen konnten und ihre fehlende Wirkung darauf beruht. Durch einige weitere Experimente, in denen die hemmende Wirkung der LP-Substanzen auf die 5-LO-Aktivität evaluiert werden sollte, ließ sich diese Vermutung allerdings entkräften. In intakten Zellen können eindeutige Effekte der Säure-Derivate auf die Aktivität des 5-LO-Enzyms gezeigt werden.

Neben der strukturellen Ähnlichkeit zu Hyperforin, können die Verbindungen LP-131 und LP-119 auch als Lipidanaloga aufgefasst werden. Möglicherweise intervenieren Hyperforin und seine Analoga in die Caspasen-Kaskade bei der Apoptoseauslösung in den Krebszellen über eine Fettsäure-mimetische Wirkung [304, 305]. Die BL41-E95-A-Zellen könnten möglicherweise auch hierbei über einen einzigartigen Mechanismus verfügen.

Myrtucommulon-Effekt in BL41-E95-A-Zellen

Das nicht prenylierte Acylphloroglycinol Myrtucommulon [152] ist in Analogie zu Hyperforin als ein dualer Inhibitor der 5-LO und der COX-1 charakterisiert worden [151]. Für MC sind demnach ebenfalls Hyperforin-ähnlich Eigenschaften bezüglich der 5-LO-Spaltung in BL41-E95-A-Zellen vermutet worden.

Eine konzentrationsabhängige Hemmung des 5-LO-Abbaus durch MC kann tatsächlich in B-Lymphozyten beobachtet werden. Diese Hemmung basiert weder auf der sterischen Abschirmung der putativen Erkennungsstelle für die Caspase-6 innerhalb des 5-LO-Proteins, noch auf der Beeinflussung der subzellulären Lokalisation der 5-LO. Stattdessen wird eine mit Hyperforin vergleichbare konzentrationsabhängige Hemmung der Caspase-8-Prozessierung durch MC, nicht aber durch S-MC und IBP-C in BL41-E95-A-Zellen beobachtet. Die Inhibition der Caspase-8-Aktivierung durch MC steht in direkter Korrelation mit einer Reduktion der Zellproliferation bzw. mit dem Auftreten oligosomaler DNA-Fragmente, was auf den apoptotischen Tod der BL41-E95-A-Zellen schließen lässt.

Offensichtlich inhibieren Hyperforin und Myrtucommulon in gleicher Weise die durch das Passagieren von BL41-E95-A-Zellen ausgelöste Caspasen-Aktivierung, die in der Hemmung des 5-LO-Abbaus resultiert. Zusätzlich scheinen Hyperforin und Myrtucommulon auch über

den gleichen einzigartigen Mechanismus den apoptotischen Tod der B-Lymphozyten auszulösen, der trotz Hemmung der Caspasen-Aktivierung in den BL41-E95-A-Zellen vollzogen wird.

Myrtucommulon-Effekt in verschiedenen Krebszelllinien

Neben seinen Effekten in BL41-E95-A-Zellen konnte Myrtucommulon als potenter Apoptose-Induktor in diversen Krebszelllinien identifiziert werden. In allen neun getesteten malignen Zelllinien konnte mittels MTT-Test [259] apoptotischer Zelltod nach fünftägiger Behandlung mit MC detektiert werden. Von besonderer Bedeutung ist der fehlende zytotoxische Effekt des Myrtucommulons in „normalen“, nicht entarteten Zellen, wie humanen Vorhautfibroblasten (HFF) und primären mononukleären Blutzellen (HPBMC). Die proapoptische Potenz des Myrtucommulons ist zusätzlich mittels Trypanblau-Färbung und Untersuchung der Zellproliferation und -vitalität im Lichtmikroskop an den leukämischen HL-60- und MM6-Zellen bestätigt worden. In HL-60-Zellen führt MC konzentrationsabhängig zur Apoptose 24 Stunden nach Inkubationsbeginn. Im Gegensatz zum apoptotischen Zelltod, wird bei nekrotischen Zellen eine deutlich früher eintretende Membranpermeabilität für Trypanblau nach Einwirkung zytotoxischer Agentien beobachtet [306].

Spaltung von PARP und Aktivierung der Caspase-3, -8 und -9, die als typische Charakteristika für apoptotische Zellen dienen, wurden durch Behandlung der HL-60- und MM6-Zellen mit MC ebenfalls beobachtet. Zusätzlich kann in HL-60-Zellen die Bildung von Mono- und Oligonukleosomen in Form eines apoptotischen DNA-Leiters sowie durch den signifikanten Anstieg des apoptotischen Anreicherungsfaktors mittels Cell Death Detection ELISA[®] detektiert werden [265]. Diese Ergebnisse liefern eindeutige Hinweise auf die proapoptische Wirkung des Myrtucommulons in Tumorzellen.

In allen durchgeführten Untersuchungen zeigen weder S-MC noch IBP-C einen mit Myrtucommulon vergleichbaren apoptotischen Effekt. Die MC-induzierten apoptotischen Signale basieren daher offenbar nicht auf einer unspezifischen Wirkung des Acylphloroglycinol-Gerüsts, sondern benötigen eine definierte chemische Struktur.

Die ersten Experimente zur Aufklärung des apoptotischen MC-Mechanismus bzw. des Signaltransduktionsweges, lassen die Beteiligung des intrinsischen, Cytochrom *c*-abhängigen Signalweges vermuten. Einerseits aktiviert MC die Caspase-9, die typischerweise eine zentrale Rolle innerhalb der intrinsischen Signaltransduktionskaskade spielt und für die Aktivierung der nachgeschalteten effektorischen Caspase-3, -6 und -7 verantwortlich ist [185, 191]. Andererseits wird durch MC-Einwirkung der apoptotische Zelltod in Fas-

positiven Jurkat-Zellen und in Jurkat DD3-Zellen, die eine Mutation des Fas in der Todesdomäne aufweisen, gleichermaßen ausgelöst. Bei beiden T-Zelllinien wird kein Unterschied in der MC-induzierten Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung detektiert.

Die eindeutige MC-induzierte Prozessierung der Caspase-8, die normalerweise durch die Ligandenbindung an die Todesrezeptoren Fas oder TNFR ausgelöst wird [187, 189], kann auch über den intrinsischen Mitochondrien-abhängigen Signalweg erfolgen [193]. Die aktivierte Caspase-8 kann anschließend für die Spaltung von Bid zu t-Bid führen, welches dann die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien stimulieren kann [187, 198].

Zum ersten mal ist für die natürlich vorkommende Verbindung Myrtucommulon eine potente Apoptose-induzierende Wirkung mit einer bemerkenswerten Selektivität für Krebszelllinien und einer minimalen zytotoxischen Wirkung gegenüber normalen nicht-transformierten Zellen gezeigt worden.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur wenige Erkenntnisse über die pharmakologischen Wirkungen der Myrthe-Zubereitungen allgemein und der Myrthe-spezifischen Inhaltsstoffe gewonnen worden. Es bedarf einer Vielzahl weiterer Untersuchungen zu intrazellulären Effekten, pharmakokinetischem Verhalten, Funktionalität in Tiermodellen, um Myrtucommulon als ein geeignetes potentiell Therapeutikum zu bestätigen.

Zusammenfassung

In der Biosynthese der Leukotriene (LT) aus Arachidonsäure (AA) kommt der 5-Lipoxygenase (5-LO) eine Schlüsselrolle zu. Leukotriene sind bioaktive Lipidmediatoren, die an einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen wie Asthma, Psoriasis, allergische Rhinitis, Arthritis und Arthrose beteiligt sind. Zusätzlich konnten 5-LO-Metabolite bei der Entstehung von Atherosklerose, Osteoporose und einigen Krebsarten nachgewiesen werden.

Die 5-LO wird bevorzugt in Zellen myeloiden Ursprungs wie Granulozyten, Monozyten oder B-Lymphozyten exprimiert. Die Regulation der zellulären 5-LO-Aktivität ist sehr komplex und wird durch Ca^{2+} , ATP, Phosphatidylcholin (PC) und den zellulären Redoxstatus beeinflusst. Die subzelluläre Lokalisation der 5-LO sowie die Proteininteraktionen spielen ebenso eine wichtige Rolle für die Enzymaktivierung und -aktivität.

In der Epstein-Barr Virus-transformierten B-lymphozytären Zelllinie BL41-E95-A wird die 5-LO konstitutiv exprimiert. An der Regulation der zellulären 5-LO-Aktivität in den B-Lymphozyten sind Caspasen, Aspartat-spezifische Cysteinproteasen, beteiligt.

Durch das Passagieren der BL41-E95-A-Zellen in frisches Kulturmedium kommt es zu einem deutlichen Verlust der 5-LO-Aktivität, der mit dem Auftreten eines 62 kDa-Spaltfragmentes der 5-LO korreliert. Die Herabregulation der 5-LO erfolgt in B-Lymphozyten durch die Reduktion der Zelldichte mit gleichzeitiger Veränderung der Medium-Zusammensetzung. Zusätzlich wird eine signifikante Aktivitätserhöhung der Initiatorcaspase-8 und der ihr nachgeschalteten effektorischen Caspase-6 nachgewiesen, die in direkter Korrelation zum 5-LO-Abbau in BL41-E95-A-Zellen steht. Dabei ist die Aktivierung der Caspasen nicht mit der Apoptose der B-Lymphozyten assoziiert, sondern geht mit einer erhöhten Proliferation der Zellen einher.

Durch den Einsatz des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) lässt sich sowohl die 5-LO-Spaltung als auch die Caspasen-Aktivierung unterbinden, was für eine Beteiligung von *de novo*-Proteinsynthese am 5-LO-Abbau in BL41-E95-A-Zellen spricht. Offensichtlich lässt sich durch CHX die Synthese eines oder mehrerer Proteine hemmen, die für die Aktivierung der Caspasen sorgen, welche dann ihrerseits die 5-LO-Spaltung auslösen.

Untersuchungen an rekombinanter aufgereinigter 5-LO haben gezeigt, dass die Caspase-6, nicht jedoch die Caspase-8, die 5-LO zu einem 58 kDa-Fragment *in vitro* spaltet. Diese Spaltung erfolgt laut Ergebnissen aus *in vitro*-Studien an mutierten 5-LO-Proteinen zwischen dem Asp170 und dem Ser171, wobei das Tetrapeptid VEID₁₇₀ als Erkennungsmotiv für den Angriff der Caspase-6 dient. Die bisher existierenden Modelle des 5-LO-Proteins bestätigen, dass sich das Motiv VEID₁₇₀ auf der Oberfläche der 5-LO befindet und dem proteolytischen

Angriff der Caspase-6 frei zugänglich ist. Die Spaltung der 5-LO nach Asp170 führt zu einer Abtrennung der regulatorischen C2-ähnlichen Domäne von der katalytischen Domäne des Enzyms, was mit einem Verlust der katalytischen Aktivität der 5-LO einhergeht.

Die offensichtliche Diskrepanz in der Größe des 5-LO-Spaltproduktes aus BL41-E95-A-Zellen (62 kDa) im Vergleich zum Spaltfragment nach der Prozessierung rekombinanter 5-LO durch die Caspase-6 *in vitro* (58 kDa) lässt eine mögliche posttranslationale Modifikation (PTM) des 5-LO-Spaltfragmentes bzw. der intakten 5-LO in B-Lymphozyten vermuten. Laut Ergebnissen dieser Arbeit scheint diese PTM weder durch Ubiquitinierung, noch durch Glykosylierung oder Phosphorylierung der 5-LO zustande zu kommen.

Die intakte 5-LO befindet sich in den BL41-E95-A-Zellen im Zytosol, wobei sie teilweise in löslicher Form und teilweise an die Plasmamembran gebunden vorliegt. Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des 5-LO-Spaltfragmentes ergab die Bindung der gespaltenen 5-LO an die äußere Kernmembran. Die bisher für diese Bindung angenommene notwendige C2-ähnliche β -Barrel-Domäne der 5-LO wird allerdings durch die Caspase-6 vom Enzym abgetrennt, so dass nicht die Tryptophane Trp13, Trp75 und Trp102 für die Akkumulation des 5-LO-Spaltfragmentes an der Kernmembran verantwortlich sein können. Möglicherweise stellt die PTM des 5-LO-Spaltfragmentes ein Lipid dar, das wie ein Membran-Anker fungiert und die Bindung des verkürzten 5-LO-Proteins an die Kernmembran vermittelt.

In einigen weiteren untersuchten Zelllinien wie Mono Mac 6 (MM6), RBL-1 oder PMNL, die nicht den B-Lymphozyten angehören, konnte die 5-LO-Spaltung weder durch das Passagieren von Zellen noch durch die Behandlung mit diversen proapoptotischen Agentien ausgelöst werden. Die in den HeLa-Zellen überexprimierte 5-LO konnte ebenso trotz aktiver Caspasen nicht zu einem Spaltfragment abgebaut werden.

Werden Zellüberstände (S-100) der homogenisierten 5-LO-positiven HeLa- bzw. MM6-Zellen in höheren Konzentrationen mit rekombinanter, aufgereinigter 5-LO inkubiert, so bleibt die Spaltung der 5-LO durch die Caspase-6 *in vitro* aus. Einen solchen 5-LO-protektiven Effekt besitzen weder die S-100 der 5-LO-negativen HeLa- und MM6-Zellen, noch die S-100 der BL41-E95-A-Zellen. Es ist demnach denkbar, dass einige Zelllinien, wie beispielsweise HeLa- und MM6-Zellen, einen Faktor exprimieren, der die 5-LO direkt oder indirekt vor dem Angriff der Caspase-6 und anschließender Prozessierung schützt. Möglicherweise stellt dieser Faktor einen bereits bekannten Interaktionspartner der 5-LO dar. Die in den BL41-E95-A-Zellen beobachtete Aktivierung der Caspasen mit anschließender Prozessierung der 5-LO lässt sich durch zwei Pflanzeninhaltsstoffe supprimieren, das Hyperforin (HP) aus Johanniskraut-Extrakten und das Myrtucommulon (MC) aus Myrte-

Blättern. Beide Verbindungen sind vor kurzem als duale Inhibitoren der 5-LO und der COX-1 charakterisiert worden. Von großem Interesse ist die Tatsache, dass der 5-LO-protective Effekt von HP und MC in B-Lymphozyten weder durch direkte Bindung an das Enzym und sterisches Abschirmen der Caspase-6-Erkennungsstelle noch durch die Beeinflussung der zellulären Lokalisation der 5-LO zustande kommt. Vielmehr scheinen beide Verbindungen die Aktivierung der Caspasen zu hemmen, was wiederum in fehlendem 5-LO-Abbau resultiert.

Trotz des hemmenden Effektes auf die Caspasen-Aktivierung in BL41-E95-A-Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Hyperforin und Myrtucommulon in B-Lymphozyten zu einem apoptotischen Tod der Zellen führen. Offensichtlich wird dabei ein (unbekannter) einzigartiger Mechanismus der Apoptose-Induktion ausgelöst.

In Übereinstimmung mit den bereits aus der Literatur bekannten Befunden, wird durch Hyperforin in eukaryontischen Krebszelllinien HL-60 und MM6 ebenfalls Apoptose ausgelöst, die auf einer signifikanten Erhöhung der Caspasen-Aktivität beruht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine potente Apoptose-induzierende Wirkung des natürlich vorkommenden Myrtucommulons auf Krebszelllinien gezeigt werden.

In allen getesteten Krebszelllinien führte Myrtucommulon zum Zelltod, wobei die HL-60-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von $3,26 \pm 0,51 \mu\text{M}$ MC am sensitivsten gegenüber MC-Einfluss waren. Zusätzlich konnte in HL-60- und MM6-Zellen nach MC-Behandlung neben einer erhöhten Caspasen-Aktivität und PARP-Spaltung ein signifikanter DNA-Abbau in mono- und oligonukleosomale Fragmente detektiert werden.

Die ersten Erkenntnisse über den möglichen MC-vermittelten apoptotischen Signaltransduktionsweg lassen auf den intrinsischen, Cytochrom *c*-abhängigen Signalweg schließen, da die Jurkat DD3-Zellen, die eine Fas-Mutation aufweisen, nach MC-Behandlung in gleicher Weise Apoptose eingehen wie die Fas-positiven T-Lymphozyten (Jurkat).

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass die zytotoxische MC-Wirkung eine bemerkenswerte Selektivität für entartete Zelllinien zu besitzen scheint und gegenüber nicht-transfizierten Zellen minimal ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Kuhn, H. (2000) Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62, 255-270.
- [2] Brash, A.R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274, 23679-23682.
- [3] Ford-Hutchinson, A.W., Gresser, M. and Young, R.N. (1994) 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* 63, 383-417.
- [4] Theorell, H., Holman, R.T. and Akeson, A. (1947) Crystalline Lipoxydase. *Acta Chem Scand* 1, 571-574.
- [5] Hamberg, M. and Samuelsson, B. (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3400-3404.
- [6] Borgeat, P., Hamberg, M. and 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, 7816-7820.
- [7] Kuhn, H. and Thiele, B.J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 449, 7-11.
- [8] Funk, C.D., Matsumoto, T., Hoshiko, S., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1989) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19, 470-473.
- [9] Hoshiko, S., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1990) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9073-9077.
- [10] Silverman, E.S., Du, J., De Sanctis, G.T., Rådmark, O., Samuelsson, B., Drazen, J.M. and Collins, T. (1998) Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 316-323.
- [11] Werz, O. (2002) 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 23-44.
- [12] Matsumoto, T., Funk, C.D., Rådmark, O., Hoog, J.O., Jornvall, H. and Samuelsson, B. (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 26-30.
- [13] Steinhilber, D. (1994) 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm Acta Helv* 69, 3-14.
- [14] Janssen-Timmen, U., Vickers, P.J., Wittig, U., Lehmann, W.D., Stark, H.J., Fusenig, N.E., Rosenbach, T., Rådmark, O., Samuelsson, B. and Habenicht, A.J. (1995) Expression of

5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6966-6970.

[15] Spanbroek, R., Stark, H.J., Janssen-Timmen, U., Kraft, S., Hildner, M., Andl, T., Bosch, F.X., Fusenig, N.E., Bieber, T., Rådmark, O., Samuelsson, B. and Habenicht, A.J. (1998) 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 663-668.

[16] Steinhilber, D., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1993) Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5984-5988.

[17] Brungs, M., Rådmark, O., Samuelsson, B. and Steinhilber, D. (1994) On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D₃, retinoic acid, DMSO and TGF beta. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1572-1580.

[18] Brungs, M., Rådmark, O., Samuelsson, B. and Steinhilber, D. (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 U S A* 92, 107-111.

[19] Silverman, E.S. and Drazen, J.M. (1999) The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 525-536.

[20] Uhl, J., Klan, N., Rose, M., Entian, K.D., Werz, O. and Steinhilber, D. (2002) The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem* 277, 4374-4379.

[21] Klan, N., Seuter, S., Schnur, N., Jung, M. and Steinhilber, D. (2003) Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity. *Biol Chem* 384, 777-785.

[22] Hemak, J., Gale, D. and Brock, T.G. (2002) Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme. *J Mol Model (Online)* 8, 102-112.

[23] Werz, O., Tretiakova, I., Michel, A., Ulke-Lemee, A., Hornig, M., Franke, L., Schneider, G., Samuelsson, B., Rådmark, O. and Steinhilber, D. (2005) Caspase-mediated degradation of human 5-lipoxygenase in B lymphocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13164-13169.

[24] Hammarberg, T., Zhang, Y.Y., Lind, B., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1995) Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 230, 401-407.

- [25] Zhang, Y.Y., Lind, B., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1993) Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues. *J Biol Chem* 268, 2535-2541.
- [26] Hammarberg, T., Kuprin, S., Rådmark, O. and Holmgren, A. (2001) EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide. *Biochemistry* 40, 6371-6378.
- [27] Riendeau, D., Denis, D., Choo, L.Y. and Nathaniel, D.J. (1989) Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation. *Biochem J* 263, 565-572.
- [28] Rouzer, C.A. and Samuelsson, B. (1986) The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. *FEBS Lett* 204, 293-296.
- [29] Hatzelmann, A. and Ullrich, V. (1987) Regulation of 5-lipoxygenase activity by the glutathione status in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 169, 175-184.
- [30] Bindu, P.H., Sastry, G.M. and Sastry, G.N. (2004) Characterization of calcium and magnesium binding domains of human 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 461-467.
- [31] Kulkarni, S., Das, S., Funk, C.D., Murray, D. and Cho, W. (2002) Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 277, 13167-13174.
- [32] Hammarberg, T. and Rådmark, O. (1999) 5-lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry* 38, 4441-4447.
- [33] Chen, X.S. and Funk, C.D. (2001) The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 276, 811-818.
- [34] Hammarberg, T., Provost, P., Persson, B. and Rådmark, O. (2000) The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 275, 38787-38793.
- [35] Puustinen, T., Scheffer, M.M. and Samuelsson, B. (1988) Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca^{2+} levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 960, 261-267.
- [36] Schatz-Munding, M., Hatzelmann, A. and Ullrich, V. (1991) The involvement of extracellular calcium in the formation of 5-lipoxygenase metabolites by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 197, 487-493.

- [37] Wong, A., Cook, M.N., Foley, J.J., Sarau, H.M., Marshall, P. and Hwang, S.M. (1991) Influx of extracellular calcium is required for the membrane translocation of 5-lipoxygenase and leukotriene synthesis. *Biochemistry* 30, 9346-9354.
- [38] Jakschik, B.A., Sun, F.F., Lee, L. and Steinhoff, M.M. (1980) Calcium stimulation of a novel lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 103-110.
- [39] Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K. and Miyamoto, T. (1983) Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 258, 5754-5758.
- [40] Percival, M.D., Denis, D., Riendeau, D. and Gresser, M.J. (1992) Investigation of the mechanism of non-turnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase. Inactivation by H₂O₂ and inhibition by metal ions. *Eur J Biochem* 210, 109-117.
- [41] Reddy, K.V., Hammarberg, T. and Rådmark, O. (2000) Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry* 39, 1840-1848.
- [42] Noguchi, M., Miyano, M., Matsumoto, T. and Noma, M. (1994) Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA₄ synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* 1215, 300-306.
- [43] Rouzer, C.A. and Kargman, S. (1988) Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 263, 10980-10988.
- [44] Rouzer, C.A. and Samuelsson, B. (1987) Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7393-7397.
- [45] Rouzer, C.A., Shimizu, T. and Samuelsson, B. (1985) On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: characterization of a membrane-associated stimulatory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7505-7509.
- [46] Rouzer, C.A. and 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, 6040-6044.
- [47] Pande, A.H., Moe, D., Nemecek, K.N., Qin, S., Tan, S. and Tatulian, S.A. (2004) Modulation of human 5-lipoxygenase activity by membrane lipids. *Biochemistry* 43, 14653-14666.
- [48] Hurley, J.H. and Misra, S. (2000) Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 49-79.

- [49] Ron, D. and Kazanietz, M.G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J* 13, 1658-1676.
- [50] Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N. and Knopf, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051.
- [51] Bürkert, E., Arnold, C., Hammarberg, T., Rådmark, O., Steinhilber, D. and Werz, O. (2003) The C2-like beta-barrel domain mediates the Ca^{2+} -dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem* 278, 42846-42853.
- [52] Johnson, G.L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- [53] Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18, 567-577.
- [54] Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- [55] Roux, P.P. and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.
- [56] Lee, J.C., Kumar, S., Griswold, D.E., Underwood, D.C., Votta, B.J. and Adams, J.L. (2000) Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 47, 185-201.
- [57] Werz, O. (2004) 5-Lipoxygenase: Regulation and Pharmacology. *Medicinal Chemistry Reviews* 1, 201-223.
- [58] Werz, O., Klemm, J., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (2001) Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 97, 2487-2495.
- [59] Werz, O., Klemm, J., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (2000) 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5261-5266.
- [60] Werz, O., Klemm, J., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (2001) p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. *J Leukoc Biol* 70, 830-838.

- [61] Werz, O., Szellas, D., Steinhilber, D. and Rådmark, O. (2002) Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* 277, 14793-14800.
- [62] Werz, O., Burkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., Rådmark, O. and Steinhilber, D. (2002) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *Faseb J* 16, 1441-1443.
- [63] Luo, M., Jones, S.M., Phare, S.M., Coffey, M.J., Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2004) Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem* 279, 41512-41520.
- [64] Skorey, K.I. and Gresser, M.J. (1998) Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidyl choline vesicle concentrations. *Biochemistry* 37, 8027-8034.
- [65] Zhang, Y.Y., Hammarberg, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., Ng, C.F., Funk, C.D. and Loscalzo, J. (2000) Analysis of a nucleotide-binding site of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences. *Biochem J* 351 Pt 3, 697-707.
- [66] Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2003) 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69, 99-109.
- [67] Gillard, J., Ford-Hutchinson, A.W., Chan, C., Charleson, S., Denis, D., Foster, A., Fortin, R., Leger, S., McFarlane, C.S., Morton, H. and et al. (1989) L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* 67, 456-464.
- [68] Abramovitz, M., Wong, E., Cox, M.E., Richardson, C.D., Li, C. and Vickers, P.J. (1993) 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 215, 105-111.
- [69] Peters-Golden, M. and McNish, R.W. (1993) Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 147-153.
- [70] Pouliot, M., McDonald, P.P., Krump, E., Mancini, J.A., McColl, S.R., Weech, P.K. and Borgeat, P. (1996) Colocalization of cytosolic phospholipase A₂, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem* 238, 250-258.
- [71] Luo, M., Jones, S.M., Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2003) Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B₄ synthetic capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12165-12170.

- [72] Brock, T.G., McNish, R.W., Bailie, M.B. and Peters-Golden, M. (1997) Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence. *J Biol Chem* 272, 8276-8280.
- [73] Healy, A.M., Peters-Golden, M., Yao, J.P. and Brock, T.G. (1999) Identification of a bipartite nuclear localization sequence necessary for nuclear import of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 274, 29812-29818.
- [74] Chen, X.S., Zhang, Y.Y. and Funk, C.D. (1998) Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins. *J Biol Chem* 273, 31237-31244.
- [75] Jones, S.M., Luo, M., Healy, A.M., Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2002) Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* 277, 38550-38556.
- [76] Jones, S.M., Luo, M., Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2003) Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* 278, 10257-10263.
- [77] Luo, M., Pang, C.W., Gerken, A.E. and Brock, T.G. (2004) Multiple nuclear localization sequences allow modulation of 5-lipoxygenase nuclear import. *Traffic* 5, 847-854.
- [78] Werz, O., Burkert, E., Samuelsson, B., Rådmark, O. and Steinhilber, D. (2002) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99, 1044-1052.
- [79] Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 272, 16709-16712.
- [80] Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J. and Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature* 390, 618-622.
- [81] Gijon, M.A., Spencer, D.M., Siddiqi, A.R., Bonventre, J.V. and Leslie, C.C. (2000) Cytosolic phospholipase A₂ is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A₂ regulation. *J Biol Chem* 275, 20146-20156.
- [82] Gijon, M.A. and Leslie, C.C. (1999) Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukoc Biol* 65, 330-336.
- [83] Brock, T.G. and Healy, A.M. (2000) Nuclear import of arachidonate 5-lipoxygenase. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 481-486.

- [84] Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2001) Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett* 487, 323-326.
- [85] Brock, T.G. (2005) Regulating leukotriene synthesis: the role of nuclear 5-lipoxygenase. *J Cell Biochem* 96, 1203-1211.
- [86] Luo, M., Flamand, N. and Brock, T.G. (2006) Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleus. *Biochim Biophys Acta*.
- [87] Luo, M., Jones, S.M., Flamand, N., Aronoff, D.M., Peters-Golden, M. and Brock, T.G. (2005) Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 280, 40609-40616.
- [88] Provost, P., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (1999) Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1881-1885.
- [89] Provost, P., Doucet, J., Hammarberg, T., Gerisch, G., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (2001) 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem* 276, 16520-16527.
- [90] Tijsterman, M. and Plasterk, R.H. (2004) Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3.
- [91] Lepley, R.A. and Fitzpatrick, F.A. (1994) 5-Lipoxygenase contains a functional Src homology 3-binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 269, 24163-24168.
- [92] Albert, D., Buerkert, E., Steinhilber, D. and Werz, O. (2003) Induction of 5-lipoxygenase activation in polymorphonuclear leukocytes by 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol. *Biochim Biophys Acta* 1631, 85-93.
- [93] Hörnig, C., Albert, D., Fischer, L., Hornig, M., Rådmark, O., Steinhilber, D. and Werz, O. (2005) 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain. *J Biol Chem* 280, 26913-26921.
- [94] Corey, E.J. and Lansbury, P.T. (1983) Stereochemical course of 5-lipoxygenation of arachidonate by rat basophil leukemic cell (RBL-1) and potato enzymes. *J Am Chem Soc* 105, 4093-4094.
- [95] Rouzer, C.A., Matsumoto, T. and Samuelsson, B. (1986) Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 857-861.

- [96] Shimizu, T., Izumi, T., Seyama, Y., Tadokoro, K., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1986) Characterization of leukotriene A₄ synthase from murine mast cells: evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4175-4179.
- [97] Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A. and Serhan, C.N. (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237, 1171-1176.
- [98] Samuelsson, B. (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 568-575.
- [99] Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A. and Samuelsson, B. (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3887-3891.
- [100] Hafstrom, I., Palmblad, J., Malmsten, C.L., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1981) Leukotriene B₄ - a stereospecific stimulator for release of lysosomal enzymes from neutrophils. *FEBS Lett* 130, 146-148.
- [101] Mancuso, P., Standiford, T.J., Marshall, T. and Peters-Golden, M. (1998) 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 66, 5140-5146.
- [102] Mancuso, P., Nana-Sinkam, P. and Peters-Golden, M. (2001) Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 2011-2016.
- [103] Yamaoka, K.A., Dugas, B., Paul-Eugene, N., Mencia-Huerta, J.M., Braquet, P. and Kolb, J.P. (1994) Leukotriene B₄ enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes. *Cell Immunol* 156, 124-134.
- [104] Claesson, H.E., Odlander, B. and Jakobsson, P.J. (1992) Leukotriene B₄ in the immune system. *Int J Immunopharmacol* 14, 441-449.
- [105] Brach, M.A., de Vos, S., Arnold, C., Gruss, H.J., Mertelsmann, R. and Herrmann, F. (1992) Leukotriene B₄ transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NK- χ B and NF-IL6. *Eur J Immunol* 22, 2705-2711.
- [106] Samuelsson, B., Borgeat, P., Hammarstrom, S. and Murphy, R.C. (1979) Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 17, 785-787.
- [107] Dahlen, S.E., Hedqvist, P., Hammarstrom, S. and Samuelsson, B. (1980) Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288, 484-486.

- [108] Marom, Z., Shelhamer, J.H., Bach, M.K., Morton, D.R. and Kaliner, M. (1982) Slow-reacting substances, leukotrienes C₄ and D₄, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 126, 449-451.
- [109] Underwood, D.C., Osborn, R.R., Newsholme, S.J., Torphy, T.J. and Hay, D.W. (1996) Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D₄ administration in the guinea pig: modulation by the LTD₄ receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 850-857.
- [110] Claesson, H.E. and Dahlen, S.E. (1999) Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J Intern Med* 245, 205-227.
- [111] Funk, C.D., Kurre, U. and Griffis, G. (1994) Targeted gene disruption by homologous recombination. Toward an understanding of specific blood cell functions. *Ann N Y Acad Sci* 714, 253-258.
- [112] Goulet, J.L., Snouwaert, J.N., Latour, A.M., Coffman, T.M. and Koller, B.H. (1994) Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12852-12856.
- [113] Chen, X.S., Sheller, J.R., Johnson, E.N. and Funk, C.D. (1994) Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 372, 179-182.
- [114] Irvin, C.G., Tu, Y.P., Sheller, J.R. and Funk, C.D. (1997) 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am J Physiol* 272, L1053-1058.
- [115] Peters-Golden, M., Bailie, M., Marshall, T., Wilke, C., Phan, S.H., Toews, G.B. and Moore, B.B. (2002) Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 229-235.
- [116] Taylor, G.W., Taylor, I., Black, P., Maltby, N.H., Turner, N., Fuller, R.W. and Dollery, C.T. (1989) Urinary leukotriene E₄ after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis. *Lancet* 1, 584-588.
- [117] Talbot, S.F., Atkins, P.C., Goetzl, E.J. and Zweiman, B. (1985) Accumulation of leukotriene C₄ and histamine in human allergic skin reactions. *J Clin Invest* 76, 650-656.
- [118] Griffiths, R.J., Pettipher, E.R., Koch, K., Farrell, C.A., Breslow, R., Conklyn, M.J., Smith, M.A., Hackman, B.C., Wimberly, D.J., Milici, A.J. and et al. (1995) Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 517-521.
- [119] Zhao, L., Moos, M.P., Grabner, R., Pedrono, F., Fan, J., Kaiser, B., John, N., Schmidt, S., Spanbroek, R., Lotzer, K., Huang, L., Cui, J., Rader, D.J., Evans, J.F., Habenicht, A.J. and

- Funk, C.D. (2004) The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med* 10, 966-973.
- [120] Spanbroek, R., Grabner, R., Lotzer, K., Hildner, M., Urbach, A., Ruhling, K., Moos, M.P., Kaiser, B., Cohnert, T.U., Wahlers, T., Zieske, A., Plenz, G., Robenek, H., Salbach, P., Kuhn, H., Rådmark, O., Samuelsson, B. and Habenicht, A.J. (2003) Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1238-1243.
- [121] Ding, X.Z., Kuszynski, C.A., El-Metwally, T.H. and Adrian, T.E. (1999) Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 392-399.
- [122] Matsuyama, M., Yoshimura, R., Tsuchida, K., Takemoto, Y., Segawa, Y., Shinaka, T., Kawahito, Y., Sano, H. and Nakatani, T. (2004) Lipoxygenase inhibitors prevent urological cancer cell growth. *Int J Mol Med* 13, 665-668.
- [123] Leff, J.A., Busse, W.W., Pearlman, D., Bronsky, E.A., Kemp, J., Hendeles, L., Dockhorn, R., Kundu, S., Zhang, J., Seidenberg, B.C. and Reiss, T.F. (1998) Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med* 339, 147-152.
- [124] McMillan, R.M. and Walker, E.R. (1992) Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 13, 323-330.
- [125] Tateson, J.E., Randall, R.W., Reynolds, C.H., Jackson, W.P., Bhattacharjee, P., Salmon, J.A. and Garland, L.G. (1988) Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br J Pharmacol* 94, 528-539.
- [126] Liu, M.C., Dube, L.M. and Lancaster, J. (1996) Acute and chronic effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in asthma: a 6-month randomized multicenter trial. Zileuton Study Group. *J Allergy Clin Immunol* 98, 859-871.
- [127] Dahlen, B., Nizankowska, E., Szczeklik, A., Zetterstrom, O., Bochenek, G., Kumlin, M., Mastalerz, L., Pinis, G., Swanson, L.J., Boodhoo, T.I., Wright, S., Dube, L.M. and Dahlen, S.E. (1998) Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 1187-1194.
- [128] Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Coblyn, J.S., Helfgott, S., Maier, A.L., Petrillo, G., Henson, B., Rubin, P. and Sperling, R. (1992) Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19, 1537-1541.

- [129] Hawkey, C.J., Dube, L.M., Rountree, L.V., Linnen, P.J. and Lancaster, J.F. (1997) A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. The European Zileuton Study Group For Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 112, 718-724.
- [130] Lambert-van der Brempt, C., Bruneau, P., Lamorlette, M.A. and Foster, S.J. (1994) Conformational analysis of 5-lipoxygenase inhibitors: role of the substituents in chiral recognition and on the active conformations of the (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran series. *J Med Chem* 37, 113-124.
- [131] Turner, C.R., Smith, W.B., Andresen, C.J., Egger, J.F. and Watson, J.W. (1996) The effect of 5-lipoxygenase inhibition on Ascaris antigen (Ag)-induced responses in atopic monkeys. *Inflamm Res* 45, 42-49.
- [132] Werz, O., Szellas, D., Henseler, M. and Steinhilber, D. (1998) Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol Pharmacol* 54, 445-451.
- [133] Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M.I., Subramanian, L.R. and Ammon, H.P. (1992) Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 1143-1146.
- [134] Sailer, E.R., Schweizer, S., Boden, S.E., Ammon, H.P. and Safayhi, H. (1998) Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* 256, 364-368.
- [135] Albert, D., Zundorf, I., Dingermann, T., Muller, W.E., Steinhilber, D. and Werz, O. (2002) Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 64, 1767-1775.
- [136] Feisst, C., Franke, L., Appendino, G. and Werz, O. (2005) Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 389-396.
- [137] Aleksandrov, D.A., Zagryagkaya, A.N., Pushkareva, M.A., Bachschmid, M., Peters-Golden, M., Werz, O., Steinhilber, D. and Sud'ina, G.F. (2006) Cholesterol and its anionic derivatives inhibit 5-lipoxygenase activation in polymorphonuclear leukocytes and MonoMac6 cells. *Febs J* 273, 548-557.
- [138] Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A. and Muller, W.E. (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci* 63, 499-510.

- [139] Josey, E.S. and Tackett, R.L. (1999) St. John's wort: a new alternative for depression? *Int J Clin Pharmacol Ther* 37, 111-119.
- [140] Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T. and Kieser, M. (1998) St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1, 54-59.
- [141] Schempp, C.M., Windeck, T., Hezel, S. and Simon, J.C. (2003) Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 10 Suppl 4, 31-37.
- [142] Schempp, C.M., Hezel, S. and Simon, J.C. (2003) [Topical treatment of atopic dermatitis with Hypericum cream. A randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study]. *Hautarzt* 54, 248-253.
- [143] Saller, R., Melzer, J. and Reichling, J. (2003) [St. John's Wort (Hypericum perforatum): a plurivalent raw material for traditional and modern therapies]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 10 Suppl 1, 33-40.
- [144] Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schopf, E. and Simon, J.C. (1999) Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *Lancet* 353, 2129.
- [145] Feisst, C. and Werz, O. (2004) Suppression of receptor-mediated Ca^{2+} mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem Pharmacol* 67, 1531-1539.
- [146] Feisst, C., Hoffmann, M., Hoernig, C., Fischer, L., Steinhilber, D., Rådmark, O., Franke, L., Schneider, G. and Werz, O. (2006) Hyperforin inhibits 5-lipoxygenase by interference with a phospholipid-binding site within the C2-like beta-barrel domain. *Manuscript*.
- [147] Schempp, C.M., Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A., Kiss, J., Termeer, C.C., Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J.P. and Simon, J.C. (2002) Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21, 1242-1250.
- [148] Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M. and Saller, R. (2002) Aqueous ethanolic extract of St. John's wort (Hypericum perforatum L.) induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells in vitro. *Pharmazie* 57, 323-331.
- [149] Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M. and Saller, R. (2003) Hyperforin a constituent of St John's wort (Hypericum perforatum L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 56, 121-132.

- [150] Quiney, C., Billard, C., Faussat, A.M., Salanoubat, C., Ensaf, A., Nait-Si, Y., Fourneron, J.D. and Kolb, J.P. (2006) Pro-apoptotic properties of hyperforin in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*.
- [151] Feisst, C., Franke, L., Appendino, G. and Werz, O. (2005) Identification of Molecular Targets of the Oligomeric Nonprenylated Acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and Their Implication as Anti-Inflammatory Compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 389-396.
- [152] Appendino, G., Bianchi, F., Minassi, A., Sterner, O., Ballero, M. and Gibbons, S. (2002) Oligomeric acylphloroglucinols from myrtle (*Myrtus communis*). *J Nat Prod* 65, 334-338.
- [153] Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Corona, G., Appendino, G., Bianchi, F., Ballero, M. and Dessi, M.A. (2003) Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. *Free Radic Res* 37, 1013-1019.
- [154] Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F.F. and Franconi, F. (2004) Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic Res* 38, 97-103.
- [155] Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2004) Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutat Res* 564, 89-95.
- [156] Al-Saimary, I.E., Bakr, S.S., Jaffar, T., Al-Saimary, A.E., Salim, H. and Al-Muosawi, R. (2002) Effects of some plant extracts and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various burn cases. *Saudi Med J* 23, 802-805.
- [157] Bonjar, G.H. (2004) Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia* 75, 231-235.
- [158] Elfellah, M.S., Akhter, M.H. and Khan, M.T. (1984) Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol* 11, 275-281.
- [159] Sepici, A., Gurbuz, I., Cevik, C. and Yesilada, E. (2004) Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 93, 311-318.
- [160] Onal, S., Timur, S., Okutucu, B. and Zihnioglu, F. (2005) Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Prep Biochem Biotechnol* 35, 29-36.
- [161] Levesque, H. and Lafont, O. (2000) [Aspirin throughout the ages: a historical review]. *Rev Med Interne* 21 Suppl 1, 8s-17s.

- [162] Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (2003) Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299, 214-215.
- [163] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- [164] Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- [165] Thornberry, N.A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5, R97-103.
- [166] Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- [167] Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C. and Peter, M.E. (2002) Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14, 721-726.
- [168] Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- [169] Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. and et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- [170] Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- [171] Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- [172] Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E. and Garrido, C. (2005) Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24, 5137-5148.
- [173] Ramage, P., Cheneval, D., Chvei, M., Graff, P., Hemmig, R., Heng, R., Kocher, H.P., Mackenzie, A., Memmert, K., Revesz, L. and et al. (1995) Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J Biol Chem* 270, 9378-9383.
- [174] Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D. and et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78, 343-352.

- [175] Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S. and Liang, J. (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37, 719-727.
- [176] Ho, P.K. and Hawkins, C.J. (2005) Mammalian initiator apoptotic caspases. *Febs J* 272, 5436-5453.
- [177] Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J. (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- [178] Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- [179] Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. and Wallach, D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- [180] Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.
- [181] Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.
- [182] Ussat, S., Werner, U. and Adam-Klages, S. (2002) Species-specific differences in the usage of several caspase substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1186-1190.
- [183] Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. and Nicholson, D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.
- [184] Rano, T.A., Timkey, T., Peterson, E.P., Rotonda, J., Nicholson, D.W., Becker, J.W., Chapman, K.T. and Thornberry, N.A. (1997) A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol* 4, 149-155.
- [185] Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- [186] Wang, Z.B., Liu, Y.Q. and Cui, Y.F. (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29, 489-496.
- [187] Yan, N. and Shi, Y. (2005) Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 35-56.

- [188] Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- [189] Nagata, S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33, 29-55.
- [190] Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- [191] Chang, H.Y. and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-846.
- [192] Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- [193] Cowling, V. and Downward, J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ* 9, 1046-1056.
- [194] Kumar, S. and Vaux, D.L. (2002) Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage. *Science* 297, 1290-1291.
- [195] Lassus, P., Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y. (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-1354.
- [196] Yin, X.M. (2000) Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med* 78, 203-211.
- [197] Kim, T.H., Zhao, Y., Barber, M.J., Kuharsky, D.K. and Yin, X.M. (2000) Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 275, 39474-39481.
- [198] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- [199] Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- [200] Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- [201] Lei, K. and Davis, R.J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
- [202] Pinkoski, M.J., Waterhouse, N.J., Heibin, J.A., Wolf, B.B., Kuwana, T., Goldstein, J.C., Newmeyer, D.D., Bleackley, R.C. and Green, D.R. (2001) Granzyme B-mediated

apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 276, 12060-12067.

[203] Konno, R., Igarashi, T., Okamoto, S., Sato, S., Moriya, T., Sasano, H. and Yajima, A. (1999) Apoptosis of human endometrium mediated by perforin and granzyme B of NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Tohoku J Exp Med* 187, 149-155.

[204] Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R. and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 192, 1391-1402.

[205] Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M. and Trapani, J.A. (2003) Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18, 319-329.

[206] Villa, P., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22, 388-393.

[207] Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. and Salvesen, G.S. (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-7800.

[208] Clem, R.J. and Miller, L.K. (1994) Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* 14, 5212-5222.

[209] Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.

[210] Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. and Sasada, M. (1998) Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187, 587-600.

[211] Nobel, C.S., Kimland, M., Nicholson, D.W., Orrenius, S. and Slater, A.F. (1997) Disulfiram is a potent inhibitor of proteases of the caspase family. *Chem Res Toxicol* 10, 1319-1324.

[212] Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

[213] Fu, Y.F. and Fan, T.J. (2002) Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34, 389-394.

[214] Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.

[215] Ellis, R.E., Yuan, J.Y. and Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-698.

- [216] Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2239-2244.
- [217] Formigli, L., Conti, A. and Lippi, D. (2004) "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 95, 159-164.
- [218] Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- [219] Peter, M.E., Heufelder, A.E. and Hengartner, M.O. (1997) Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12736-12737.
- [220] Hinds, M.G. and Day, C.L. (2005) Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr Opin Struct Biol* 15, 690-699.
- [221] Fadeel, B. and Orrenius, S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258, 479-517.
- [222] Zimmermann, K.C. and Pinkoski, M.J. (2001) In the company of killers. *Trends Mol Med* 7, 195-197.
- [223] Mattson, M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 120-129.
- [224] Gill, C., Mestral, R. and Samali, A. (2002) Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *Faseb J* 16, 135-146.
- [225] O'Reilly, L.A. and Strasser, A. (1999) Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res* 48, 5-21.
- [226] Fulda, S. and Debatin, K.M. (2004) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 569-576.
- [227] Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- [228] Onteniente, B. (2004) Natural and synthetic inhibitors of caspases: targets for novel drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3, 333-340.
- [229] Garrido, C. and Kroemer, G. (2004) Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 16, 639-646.
- [230] Tinel, A. and Tschopp, J. (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- [231] Park, S.M., Schickel, R. and Peter, M.E. (2005) Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17, 610-616.

- [232] Olson, N.E., Graves, J.D., Shu, G.L., Ryan, E.J. and Clark, E.A. (2003) Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *J Immunol* 170, 6065-6072.
- [233] Siegel, R.M. (2006) Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 6, 308-317.
- [234] van Lent, P.L., Licht, R., Dijkman, H., Holthuysen, A.E., Berden, J.H. and van den Berg, W.B. (2001) Uptake of apoptotic leukocytes by synovial lining macrophages inhibits immune complex-mediated arthritis. *J Leukoc Biol* 70, 708-714.
- [235] Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. and Adjei, A.A. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55, 178-194.
- [236] Green, D.R. and Martin, S.J. (1995) The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol* 7, 694-703.
- [237] Ranga, R.S., Sowmyalakshmi, S., Burikhanov, R., Akbarsha, M.A. and Chendil, D. (2005) A herbal medicine for the treatment of lung cancer. *Mol Cell Biochem* 280, 125-133.
- [238] Vickers, A. (2002) Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer Invest* 20, 1069-1079.
- [239] Cragg, G.M. and Newman, D.J. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100, 72-79.
- [240] Milner, J.A. (2006) Preclinical perspectives on garlic and cancer. *J Nutr* 136, 827S-831S.
- [241] Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Benelli, R. and Albini, A. (1999) Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nat Med* 5, 1216.
- [242] Campbell, F.C. and Collett, G.P. (2005) Chemopreventive properties of curcumin. *Future Oncol* 1, 405-414.
- [243] Sirtori, C.R., Arnoldi, A. and Johnson, S.K. (2005) Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med* 37, 423-438.
- [244] Thelen, P., Seseke, F., Ringert, R.H., Wuttke, W. and Seidlova-Wuttke, D. (2006) [Pharmacological potential of phytoestrogens in the treatment of prostate cancer]. *Urologe A* 45, 195-196, 197-201.
- [245] Habeck, M. (2003) Mistletoe compound enters clinical trials. *Drug Discov Today* 8, 52-53.
- [246] Schoffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P., Campone, M., Bolte, O., Marreaud, S., Lacombe, D., Baron, B., Herold, M., Zwierzina, H., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H. and

- Twelves, C. (2004) Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Ann Oncol* 15, 1816-1824.
- [247] Dona, M., Dell'Aica, I., Pezzato, E., Sartor, L., Calabrese, F., Della Barbera, M., Donella-Deana, A., Appendino, G., Borsarini, A., Caniato, R. and Garbisa, S. (2004) Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 64, 6225-6232.
- [248] Martinez-Poveda, B., Quesada, A.R. and Medina, M.A. (2005) Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int J Cancer* 117, 775-780.
- [249] Quiney, C., Billard, C., Mirshahi, P., Fourneron, J.D. and Kolb, J.P. (2006) Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia* 20, 583-589.
- [250] Werz, O., Szellas, D. and Steinhilber, D. (2000) Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line. *Eur J Biochem* 267, 1263-1269.
- [251] Avila-Carino, J., Torsteinsdottir, S., Ehlin-Henriksson, B., Lenoir, G., Klein, G., Klein, E. and Masucci, M.G. (1987) Paired Epstein-Barr virus (EBV)-negative and EBV-converted Burkitt lymphoma lines: stimulatory capacity in allogeneic mixed lymphocyte cultures. *Int J Cancer* 40, 691-697.
- [252] Jakobsson, P.J., Odlander, B., Steinhilber, D., Rosen, A. and Claesson, H.E. (1991) Human B lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B₄. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 302-308.
- [253] Jakobsson, P.J., Steinhilber, D., Odlander, B., Rådmark, O., Claesson, H.E. and Samuelsson, B. (1992) On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3521-3525.
- [254] Jakobsson, P.J. (1994) in: Department of Medical Biochemistry and Biophysics Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- [255] Blood, A., Edwards, C.J., Ishii, H.H., Pat, B.K., Bryson, G., Sculley, T.B. and Gobe, G.C. (2004) Epstein-Barr virus-mediated protection against etoposide-induced apoptosis in BJA-B B cell lymphoma cells: role of Bcl-2 and caspase proteins. *Arch Virol* 149, 289-302.
- [256] Nanbo, A. and Takada, K. (2002) The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev Med Virol* 12, 321-326.
- [257] Komano, J. and Takada, K. (2001) Role of bcl-2 in Epstein-Barr virus-induced malignant conversion of Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 75, 1561-1564.

- [258] Clybouw, C., McHichi, B., Mouhamad, S., Auffredou, M.T., Bourgeade, M.F., Sharma, S., Leca, G. and Vazquez, A. (2005) EBV infection of human B lymphocytes leads to down-regulation of Bim expression: relationship to resistance to apoptosis. *J Immunol* 175, 2968-2973.
- [259] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- [260] Michaelis, M., Suhan, T., Cinatl, J., Driever, P.H. and Cinatl, J., Jr. (2004) Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 25, 1795-1799.
- [261] Zhang, Y.Y., Rådmark, O. and Samuelsson, B. (1992) Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 485-489.
- [262] Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- [263] Luschen, S., Ussat, S., Kronke, M. and Adam-Klages, S. (1998) Cleavage of human cytosolic phospholipase A₂ by caspase-1 (ICE) and caspase-8 (FLICE). *Biochem Biophys Res Commun* 253, 92-98.
- [264] Adam-Klages, S., Schwandner, R., Luschen, S., Ussat, S., Kreder, D. and Kronke, M. (1998) Caspase-mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A₂ during apoptosis. *J Immunol* 161, 5687-5694.
- [265] Loo, D.T. and Rillema, J.R. (1998) Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 57, 251-264.
- [266] Rådmark, O. (2002) Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 211-234.
- [267] Aharony, D., Redkar-Brown, D.G., Hubbs, S.J. and Stein, R.L. (1987) Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Prostaglandins* 33, 85-100.
- [268] Lepley, R.A. and Fitzpatrick, F.A. (1994) Irreversible inactivation of 5-lipoxygenase by leukotriene A₄. Characterization of product inactivation with purified enzyme and intact leukocytes. *J Biol Chem* 269, 2627-2631.
- [269] Kargman, S. and Rouzer, C.A. (1989) Studies on the regulation, biosynthesis, and activation of 5-lipoxygenase in differentiated HL60 cells. *J Biol Chem* 264, 13313-13320.

- [270] Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2002) Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* 21, 1967-1977.
- [271] Kennedy, N.J., Kataoka, T., Tschopp, J. and Budd, R.C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 190, 1891-1896.
- [272] Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F. and Diu-Hercend, A. (1997) Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272, 13459-13462.
- [273] Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E. and Dubrez-Daloz, L. (2002) Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100, 4446-4453.
- [274] Adam-Klages, S., Adam, D., Janssen, O. and Kabelitz, D. (2005) Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunol Res* 33, 149-166.
- [275] Hentze, H., Kunstle, G., Volbracht, C., Ertel, W. and Wendel, A. (1999) CD95-Mediated murine hepatic apoptosis requires an intact glutathione status. *Hepatology* 30, 177-185.
- [276] Hentze, H., Schmitz, I., Latta, M., Krueger, A., Krammer, P.H. and Wendel, A. (2002) Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 5588-5595.
- [277] Nobel, C.S., Burgess, D.H., Zhivotovsky, B., Burkitt, M.J., Orrenius, S. and Slater, A.F. (1997) Mechanism of dithiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by dithiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. *Chem Res Toxicol* 10, 636-643.
- [278] Hampton, M.B. and Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414, 552-556.
- [279] Rao, L., Perez, D. and White, E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455.
- [280] Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1995) Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9042-9046.
- [281] Galande, S., Dickinson, L.A., Mian, I.S., Sikorska, M. and Kohwi-Shigematsu, T. (2001) SATB1 cleavage by caspase 6 disrupts PDZ domain-mediated dimerization, causing detachment from chromatin early in T-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 5591-5604.

- [282] Samejima, K., Svingen, P.A., Basi, G.S., Kottke, T., Mesner, P.W., Jr., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G.G., Alnemri, E.S., Champoux, J.J., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1999) Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274, 4335-4340.
- [283] Lütteke, T., Krieg, P., Furstenberger, G. and von der Lieth, C.W. (2003) LOX-DB-database on lipoxygenases. *Bioinformatics* 19, 2482-2483.
- [284] Pickart, C.M. and Eddins, M.J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.
- [285] Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- [286] Drexler, H.C. (1998) Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis* 3, 1-7.
- [287] Friedman, J. and Xue, D. (2004) To live or die by the sword: the regulation of apoptosis by the proteasome. *Dev Cell* 6, 460-461.
- [288] Lee, J.C. and Peter, M.E. (2003) Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol Rev* 193, 39-47.
- [289] Haglund, K., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28, 598-603.
- [290] Muratani, M. and Tansey, W.P. (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- [291] Schnell, J.D. and Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278, 35857-35860.
- [292] Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-172.
- [293] Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.
- [294] Yeh, E.T., Gong, L. and Kamitani, T. (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.
- [295] Schwartz, D.C. and Hochstrasser, M. (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28, 321-328.
- [296] Zhao, Y., Kwon, S.W., Anselmo, A., Kaur, K. and White, M.A. (2004) Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem* 279, 20999-21002.
- [297] Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.

- [298] D'Andrea, A. and Pellman, D. (1998) Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 337-352.
- [299] Jakobsson, P.J., Shaskin, P., Larsson, P., Feltenmark, S., Odlander, B., Aguilar-Santelises, M., Jondal, M., Biberfeld, P. and Claesson, H.E. (1995) Studies on the regulation and localization of 5-lipoxygenase in human B-lymphocytes. *Eur J Biochem* 232, 37-46.
- [300] Resh, M.D. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37, 217-232.
- [301] Doucet, J., Provost, P., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (2002) Molecular cloning and functional characterization of mouse coactosin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 783-789.
- [302] Liu, L., Wang, Y., Zhang, P., Cheng, Z., Wan, M., Zhou, Z. and Gong, W. (2004) Expression, purification and preliminary crystallographic studies of human coactosin-like protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 1651-1653.
- [303] Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B. and Rådmark, O. (2006) Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A₄ production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13150-13155.
- [304] Listenberger, L.L. and Schaffer, J.E. (2002) Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 12, 134-138.
- [305] Unger, R.H. and Orci, L. (2002) Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* 1585, 202-212.
- [306] Perry, S.W., Epstein, L.G., Gelbard, H.A. (1997) Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Biotechniques* 22, 1102-1106.

Publikationen

Werz, O., Tretiakova, I., Michel, A., Ulke-Lemee, A., Hörnig, M., Franke, L., Schneider, G., Samuelsson, B., Rådmark, O., Steinhilber, D. (2005). Caspase-mediated degradation of human 5-lipoxygenase in B lymphocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13164-13169.

Tretiakova, I., Steinhilber, D., Werz, O. (2006). Cleavage of 5-lipoxygenase protein in B-lymphocytes versus other mammalian cells. Is there any 5-LO protection mechanism in HeLa cells? *Manuscript*.

Tretiakova, I., Blaesius, D., Appendino, G., Cinatl jr., J., Michaelis, M., Werz, O. (2006). Myrtucommulone as a novel anti cancer drug from *Myrtus communis*. *Manuscript*.

Posterpräsentationen:

Tretiakova, I., Michel, A., Ulke, A., Steinhilber, D., Werz, O. (2004). Caspase-6 regulates the metabolism of 5-lipoxygenase protein in proliferating B-lymphocytic cells. Poster; *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Regensburg, ausgezeichnet mit dem Lesmüller-Posterpreis.

Tretiakova, I., Michel, A., Hörnig, M., Franke, L., Schneider, G., Steinhilber, D., Werz, O. (2005). Caspase-6 cleaves 5-lipoxygenase protein in B-lymphocytic cells. Poster; *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Mainz.

Tretiakova, I., Steinhilber, D., Werz, O. (2006). Hyperforin prevents cleavage of 5-lipoxygenase protein in B-lymphocytic cells. Poster; *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und der Gesellschaft Deutscher Chemiker*, Frankfurt/Main.

Vorträge:

Tretiakova, I., Hörnig, M., Michel, A., Ulke-Lemee, A., Steinhilber, D., Werz, O. (2005). Spaltung der 5-Lipoxygenase durch Caspase-6 in proliferierenden B-Lymphozyten. Vortrag; *Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Leipzig.*

Strategies for the development of 5-lipoxygenase inhibitors: In vitro screening test system (2005). *Postgraduated Diploma Course Radiopharmaceutical Chemistry / Radiopharmacy, Frankfurt am Main.*

Caspase-vermittelte Spaltung der 5-Lipoxygenase in B-Lymphozyten (2005). *Akademische Feier des Fachbereichs Biochemie, Chemie und Pharmazie J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.*

Patentanmeldung:

Zubereitungen aus Myrte, ihren Inhaltsstoffen und / oder deren Derivaten zur Therapie von Krebserkrankungen (2006). Erfinder: Werz, O. und Tretiakova, I.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Irina Tretiakova

geboren 09.11.1977 in Kishinev, Moldawien (UdSSR)

ledig, deutsche Staatsangehörigkeit

Hochschulausbildung und beruflicher Werdegang

01/03 – 08/06 Promotion im Fach Pharmazeutische Chemie, Dissertation zum Thema „Regulation der 5-Lipoxygenase durch Caspase-6“.

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14), J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Betreuung des Praktikums „Biochemische Untersuchungsmethoden einschließlich Klinische Chemie“ im 5. Semester.

Ausbildung der Teilnehmer des „Postgraduated Diploma Course Radiopharmaceutical Chemistry / Radiopharmacy“.

2003 – 2006 Tätigkeit als Apothekerin in der Arnsburg-Apotheke, Frankfurt/Main

2003 – 2006 Tätigkeit als Apothekerin in der Katharinen-Apotheke, Frankfurt/Main

2003 - 2004 Tätigkeit als Apothekerin in der Schloss-Apotheke, Kronberg

01/03 Approbation als Apothekerin

12/02 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

05/02 – 11/02 Zweites Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin am Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Wien

11/01 – 04/02 Erstes Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Arnsburg-Apotheke, Frankfurt am Main

- 10.2001** Abschluss des Pharmaziestudiums mit dem Zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung nach 8 Semestern
- 1997 - 2001** Studium der Pharmazie an der J.W.Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 1998 - 2002** Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes während der gesamten Studiendauer und des Aufenthaltes an der Universität Wien

Schulbildung

- 1992 - 1997** Gymnasium in Frankfurt am Main, Abitur (Notendurchschnitt 1,0)
- 1991 - 1992** Gesamtschule (gymnasialer Zweig) in Frankfurt am Main, Deutsch-Intensivkurs
- 11/91** Einreise in die Bundesrepublik Deutschland
- 1984 - 1991** Mittelschule in Kishinev, Moldawien, UdSSR

Akademische Lehrer

- Prof. Dr. H. Blume
- Prof. Dr. Th. Dingermann
- Prof. Dr. J. Dressman
- Prof. Dr. E. Ehlers
- Prof. Dr. J. Kreuter
- Prof. Dr. G. Lambrecht
- Prof. Dr. W. E. Müller
- Prof. Dr. C. R. Noe
- Prof. Dr. M. Schubert-Szilavec
- Prof. Dr. D. Steinhilber
- Prof. Dr. O. Werz

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt

...Prof. Dr. Dieter Steinhilber für das Überlassen des spannenden Themas, die wertvollen Anregungen und die kompetente fachliche Betreuung. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an einigen Kongressen sowie Veranstaltungen des Graduiertenkollegs bedanken.

...Prof. Dr. Oliver Werz für die vielen fachlichen Diskussionen, die ausgezeichnete Betreuung von nah und fern und das immerwährende Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

...Angela Michel für das Einarbeiten in die komplexe Thematik der Caspasen, die Geheimnisse des Western blottings und für das jederzeit offene Ohr.

...Michael Hörnig für die stete Diskussionsbereitschaft, ein Feuerwerk an Ideen, nicht nur im Rahmen des 5-LO-Projektes, und die technischen Hilfestellungen im Kampf gegen den PC.

...Dr. Dana Albert für das superschnelle und akribische Korrekturlesen dieser Arbeit, die intensiven fachlichen und vor allem privaten Gespräche, die zahlreiche Tipps und Mittel zur Frustbekämpfung und für die Freundschaft.

...Dr. Beate Firla und Dr. Bernd Sorg für einige praktische und theoretische Hilfestellungen und manch konstruktive Kritik.

...Nicole Schnur für die ehrlichen Gespräche und viel Spaß und Kreativität bei den gemeinsamen Malabenden.

...Dr. Bernd Sorg und (Kr)Assistenten Angela Michel, Kirsten Stoffers und Ann-Kathrin Häfner für das stets lustige Aufgaben-Diskutieren, die unkomplizierte Unterstützung bei Problemen im Rahmen des Biochemiepraktikums und die schöne Zeit mit den Studies.

...Borostyan Hütter für die Unterstützung im Praktikum und die Hilfsbereitschaft.

...Carina Richter für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und die erbaulichen Gespräche.

...Dr. Bodo Lachmann für die Bestärkung in meinem Vorhaben wissenschaftlich zu arbeiten und die motivierenden Hinweise bezüglich der „großen Übung in Frustrationstoleranz“.

...Tina und Michael Hörnig für die gemeinsam gemeisterten Semester, „die man niemals schaffen kann“, während des Studiums, die schöne Zeit in Wien und den Rückhalt während der Promotion

...Dr. Ralf Brandes und Dr. Rolf Gräbner für das immunohistochemische Anfärben den unbändigen B-Lymphozyten.

...Lutz Franke für die schönen Abbildungen des 5-LO-Modells.

...Astrid Brüggerhoff, Anna-Maria Engin und Sven George für so mache Maxiprep und HeLa-Zellkulturplatte, Puffer und Bestellungen von Chemikalien sowie allgemeine Hilfestellungen im Laboralltag.

...Brigitte Welter für die Beschaffung von Literatur.

...allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen des Arbeitskreises und des Institutes für Pharmazeutische Chemie für die freundliche Aufnahme, Kollegialität und Hilfsbereitschaft.

...meinen Freunden und Freundinnen für die liebevolle Unterstützung.

...meinem Freund und Kollegen Dr. Wolfgang Schlags für die eine oder andere Idee, die unendliche Geduld und das Vertrauen in mich nicht nur als Wissenschaftlerin. Für die bedingungslose Unterstützung bei allen meinen Vorhaben und vor allem für die tiefe Freundschaft möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

...meiner Familie, bei der ich immer Rückhalt und liebevolle Unterstützung finde, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.