

Evaluierung von Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich

Biochemie, Chemie, Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Sandra Kerstin Wittmann

aus Bad Dürkheim

Frankfurt am Main (2016)

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

2. Gutachter: Jun. Prof. Dr. Ewgenij Proschak

Datum der Disputation:

Meinen Eltern

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“ -

Marie Curie

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.2	Metabolisierung der Arachidonsäure.....	1
1.2.1	Cyclooxygenase-Weg.....	2
1.2.2	Zytochrom P-450 Weg.....	2
1.2.3	Lipoxygenase-Weg	3
1.3	Leukotrien A ₄ Hydrolase.....	5
1.3.1	Mechanismus der Hydrolase-Aktivität der LTA ₄ H.....	8
1.3.2	Mechanismus der Peptidase-Aktivität der LTA ₄ H	9
1.3.3	Inhibitoren der Leukotrien A ₄ Hydrolase	9
1.3.4	Assay Methoden der LTA ₄ H	11
2.	Motivation und Ziel der Arbeit	13
3.	Material und Methoden	15
3.2	Verwendete Materialien	15
3.2.1	Chemikalien	15
3.2.2	Geräte.....	16
3.2.3	Molekularbiologie	17
3.2.4	Primer	18
3.2.5	Bakterienstämme und Plasmide	18
3.2.6	Antikörper	18
3.2.7	Software	18
3.3	Methoden.....	19
3.3.1	Klonierung	19
3.3.2	Expression und Aufreinigung	22
3.3.3	Proteinanalyse.....	24
3.3.4	Differente Scanning Fluorimetrie (DSF)	26
3.3.5	Fluoreszenz basierter LTA ₄ H Assay.....	28
3.3.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	32

4.	Ergebnisse und Diskussion	35
4.2	Klonierung	35
4.2.1	PCR.....	35
4.2.2	Restriktionsverdau	35
4.2.3	Verifizierung der Klone.....	36
4.3	Expression und Aufreinigung.....	37
4.3.1	Expression	37
4.3.2	Aufreinigung und Verifizierung des Proteins	37
4.4	Fluoreszenzbasierter Assay für die humane Leukotrien A ₄ Hydrolase.....	39
4.4.1	Überprüfung des postulierten Mechanismus der Substratspaltung	39
4.4.2	Bestimmung geeigneter Assay Parameter	40
4.4.3	Entwicklung neuer Wirkstoffe der humanen Leukotrien A ₄ Hydrolase.....	46
4.5	Charakterisierung bekannter Inhibitoren der LTA ₄ H.....	53
4.5.1	IC ₅₀ der ausgewählten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A	54
4.5.2	Bestimmung der K _i -Werte der ausgewählten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A.....	55
4.5.3	Thermische Stabilität des Proteins in Abhängigkeit der untersuchten Liganden 58	
4.5.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante der untersuchten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A mittels Thermal Shift Assay.....	58
4.5.5	Isotherme Titrationscalorimetrie der Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A.....	61
5.	Zusammenfassung.....	69
6.	Abkürzungsverzeichnis	71
7.	Literaturverzeichnis.....	75
I.	Anhang.....	81
i.	Verwendete Wirkstoffe	81
ii.	Sequenzier-Ergebnisse	82
iii.	Physikalisch-chemische Eigenschaften der LTA ₄ H.....	85
iv.	Massenspektrometrische Analyse.....	88
v.	IC ₅₀ Werte der zu charakterisierenden Wirkstoffe bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.....	89

1. Einleitung

Die Entstehung und Kontrolle von Entzündungen werden von einem komplexen Netzwerk von zellulären Faktoren geregelt. Unter diesen sind die Eicosanoide, eine Klasse mit struktureller Verwandtschaft zu parakrinen Hormonen, welche durch die oxidative Metabolisierung der Arachidonsäure entstehen. Dies umfasst die Prostaglandine, die Thromboxane, die Lipoxine sowie die Leukotriene.

1.2 Metabolisierung der Arachidonsäure

Die Arachidonsäure (AA) ist eine semiessentielle, vielfach ungesättigte Fettsäure, welche über die Nahrung aufgenommen werden kann, oder über die essentielle Fettsäure Omega-6 Linolsäure gebildet wird. Im inaktiven Zustand liegt die Arachidonsäure als PE- (Phosphatidylethanolamin) oder als PC- (Phosphatidylcholin) Addukt fest in der Membran von Nerven- und Gehirnzellen verankert vor. Durch die Aktivierung des Enzyms zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂), welches die hydrolytische Abspaltung der Fettsäurekette vom C2-Atom des Phosphoglycerids katalysiert, findet die Freisetzung der AA aus der Membran statt. Die Aktivierung und Translokation von cPLA₂ zur Membran erfolgt durch den Influx von submikromolaren Mengen an Ca²⁺-Ionen¹. Die Metabolisierung der Arachidonsäure findet über drei unterschiedliche Metabolisierungswege statt (Abbildung 1).

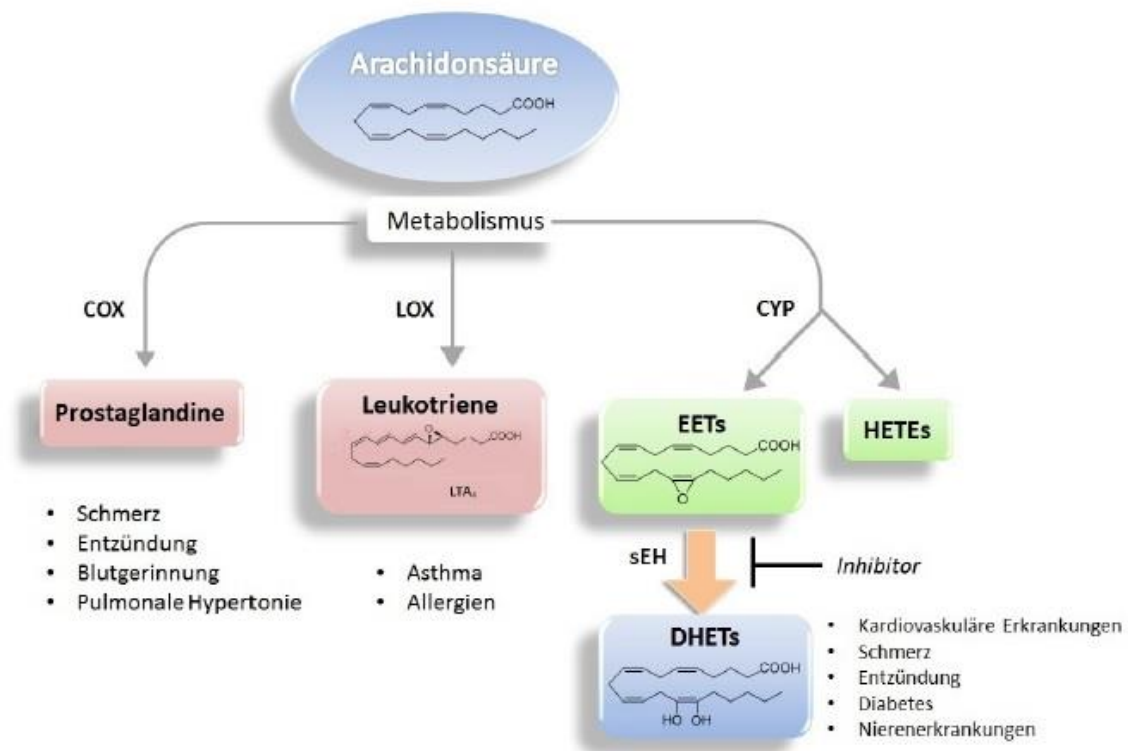


Abbildung 1: Schema der Arachidonsäurekaskade und ihrer Krankheitsbilder (nach Imig JD, 2009).

1.2.1 Cyclooxygenase-Weg

Die Bildung der Prostaglandine und Thromboxane wird von der Cyclooxygenase-(COX) katalysiert (Abbildung 1). Zum einen wird die Bildung durch die konstitutiv exprimierte COX-1, zum anderen durch die induzierbare Variante COX-2² katalysiert. Bei beiden Enzymen entsteht in einem ersten Zwischenschritt das instabile Lokalhormon Prostaglandin H₂ (PGH₂), welches über verschiedene Synthesen zu den jeweiligen Prostaglandinen und Thromboxanen umgewandelt wird. Prostaglandine spielen, neben ihrer Beteiligung bei Entzündungsreaktionen, eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation. Ebenso lösen sie Muskelkontraktionen aus und beeinflussen den Blutdruck. Dieser Metabolisierungsweg der Arachidonsäurekaskade ist bereits sehr gut erforscht. Es gibt viele bekannte zugelassene Inhibitoren wie die Analgetika Aspirin und Ibuprofen, welche die Aktivität der COX inhibieren³.

1.2.2 Cytochrom P-450 Weg

Der zweite Weg der Arachidonsäurekaskade führt über das Cytochrom P-450 abhängige Hämprotein (CYP) (Abbildung 1). Zum einen kann es zur Bildung der Hydroxyeicosatriensäuren (HETE s) kommen, welche durch die CYP-Hydrolase katalysiert wird. Zum anderen kann es zur

Bildung der Epoxyeicosatriensäuren (EETs) kommen, welche durch die CYP-Epoxygenasen synthetisiert werden. Diese EETs können im weiteren Verlauf durch die Addition eines Wassermoleküls zu den korrespondierenden vicinalen Diolen, den Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs) verstoffwechselt werden. Dieser Prozess wird von der löslichen Epoxidhydrolase (sEH) katalysiert⁴. EETs haben eine entgegengesetzte Wirkung zu den anderen Stoffwechselprodukten der Arachidonsäure, den Thromboxanen, Prostaglandinen, Lipoxinen und Leukotrienen. Sie wirken anti-inflammatorisch und stimulieren die Zellteilung sowie die Bildung neuer Blutgefäße, wodurch sie am Schutz des Herz-Kreislauf Systems beteiligt sind³. Durch die Verstoffwechslung der EETs durch die sEH sinkt der EET-Spiegel im Körper, wodurch die positiven anti-inflammatorischen Eigenschaften der EETs verringert werden. Ein erhöhter DHET-Spiegel wird unter anderem mit kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes, Entzündungen und Schmerzen in Verbindung gebracht. In einer Arbeit von Li et al.⁵ konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der löslichen Epoxidhydrolase zu einer Senkung des Blutdrucks führt. Hierfür gibt es bereits einige bekannte Inhibitoren mit einem Harnstoffgrundgerüst wie 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecan säure (AUDA)⁶. Ein weitere Inhibitor ist AR9281 von Arete Pharmaceuticals welcher in Phase II der klinischen Studien gescheitert ist⁷.

1.2.3 Lipoxygenase-Weg

Der dritte Metabolisierungsweg der Arachidonsäurekaskade wird durch die Lipoxygenasen (LOX) initiiert (Abbildung 2). Durch den 5-Lipoxygenase- (5-LO) abhängigen Weg werden Lipoxine sowie Leukotriene gebildet. In Säugetierzellen kann die Arachidonsäure außerdem über die 12- und 15-LO vorrangig zu Hydroperoxyeicosatrienen (HPETEs) sowie durch zusätzliche Einwirkung von Peroxidasen zu HETEs verstoffwechselt werden⁸.

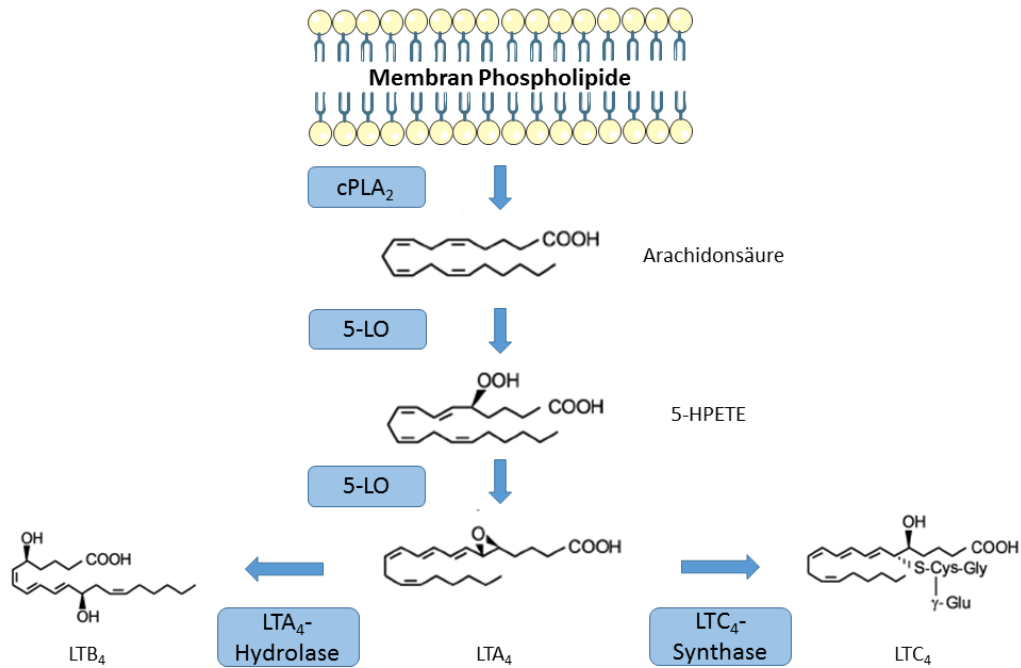


Abbildung 2: Biosynthese des Leukotrienstoffwechsels.

Die 5-LO katalysiert die ersten beiden Schritte in der Leukotrienbildung. Neben anderer Gewebe wird sie beim Menschen am stärksten in Leukozyten exprimiert. Im aktiven Zentrum ist ein Eisen-Ion lokalisiert, welches in seiner inaktiven Form als Fe²⁺ vorliegt und bei der Aktivierung durch Oxidation in Fe³⁺ überführt wird und für die katalytische Aktivität entscheidend ist⁹. Die 5-LO ist außerdem von dem 5-Lipoxygenase aktivierenden Protein (FLAP) abhängig. Es wird vermutet, dass FLAP die Arachidonsäure zur 5-LO transportiert¹⁰. Eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Im ersten Schritt der Umwandlung durch die 5-LO wird die freigesetzte Arachidonsäure zu dem Hydroperoxid 5-HPETE oxidiert (Abbildung 2). Im Anschluss findet die weitere Umsetzung durch Dehydratisierung in das instabile Intermediat Leukotrien A₄ (LTA₄) statt (Abbildung 2). Dieses kann entweder mittels Hydrolyse durch die LTA₄-Hydrolase in das stabile Leukotrien B₄ (LTB₄) überführt werden, oder, mittels der Leukotrien C₄-Synthase, in Leukotrien C₄ (LTC₄). Dieser Schritt erfolgt durch die Konjugation von LTA₄ mittels Glutathion. Die Überproduktion von LTB₄ konnte mit unterschiedlichen Krankheiten wie Sepsis¹¹, Schock¹², cystischer Fibrose¹³, Erkrankungen des Bindegewebes¹⁴, koronarer Herzkrankheit¹⁵ und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen¹⁶ in Verbindung gebracht werden.

1.3 Leukotrien A₄-Hydrolase

Die Leukotrien A₄-Hydrolase (LTA₄H) (EC 3.3.2.6) ist ein lösliches monomeres Enzym, welches die Umwandlung vom instabilen LTA₄ zum stabilen LTB₄ katalysiert. Das Enzym konnte in den meisten Säugetierzellen, Organen und Geweben nachgewiesen werden¹⁷. Lokalisiert ist es auf dem Chromosom 12q22. Im Blut konnte LTA₄H in Neutrophilen, Monozyten, Erythrozyten sowie in Lymphozyten in großen Mengen nachgewiesen werden. Blutplättchen hingegen weisen einen Mangel an LTA₄H auf. Auch in Zellen mit geringer 5-LO-Aktivität konnte LTA₄H nachgewiesen werden¹⁷. In den katalytischen Eigenschaften sowie den physikochemischen Eigenschaften der LTA₄H unterschiedlicher Säugetiere konnten keine Unterschiede festgestellt werden¹⁷. Über die zelluläre Regulation der LTA₄H ist bisher ebenfalls nicht viel bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Phosphorylierung keine Umwandlung des instabilen LTA₄ in das stabile LTB₄ mehr stattfinden konnte¹⁸.

Evans et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass es durch die Bindung des Substrats LTA₄ sowie durch strukturelle Isomere wie LTA₃ und LTA₅ zu einer Inaktivierung und Modifizierung der LTA₄H kommt.¹⁹ Durch die Isomere scheint die Inaktivierung noch effizienter zu sein, als durch das eigene Substrat LTA₄. Hierbei verhindert das LTA₃ die kovalente Kopplung des Substrats LTA an die LTA₄H. Durch die Blockierung der Bindung des LTA₄ an die LTA₄H kommt es zu einer Hemmung der LTB₄-Produktion.

Die LTA₄H ist ein Zink-abhängiges Enzym, welches ein Zink-Atom binden kann. Das Zink wird von den Aminosäuren His-295, His-299 und Glu-318 gebunden²⁰. Die katalytische Funktion des Zinks wurde von Haeggström et al. eingehend untersucht. Die Zugabe eines Zink-Chelators führt zur reversiblen Inaktivierung der LTA₄H. Durch erneuter Zugabe von stöchiometrischem Zn²⁺ konnte die vollständige Aktivität des Proteins wieder hergestellt werden²¹.

Neben der Hydrolase-Aktivität der LTA₄H, durch welche das instabile LTA₄ in LTB₄ umgewandelt wird, weist das Enzym noch eine Peptidase-Aktivität auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptidase-Aktivität der LTA₄H bevorzugt Peptide mit einer Länge von drei Aminosäuren hydrolysiert. Über die physiologische Funktion der Peptidase-Aktivität ist bisher wenig bekannt. In Mausstudien konnte als Substrat der Peptidase-Aktivität das chemotaktisch aktive Tripeptid Pro-Gly-Pro (PGP) identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Lunge zu einem Abbau des PGP durch die LTA₄H Peptidase-Aktivität kommt. Das Tripeptid

PGP ist für die Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge erforderlich und fördert Entzündungsreaktionen im Körper^{22,23}. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Peptidase-Aktivität der LTA₄H ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion einnimmt, diese ist jedoch gegensätzlich zu der, der Hydrolase-Aktivität. Auf der einen Seite wird durch die Hydrolase-Aktivität das entzündungsfördernde LTB₄ gebildet, auf der anderen Seite wird durch die Peptidase-Aktivität das entzündungsfördernde PGP abgebaut. Aus diesem Grund ist eine selektive Inhibition der Hydrolase-Aktivität erstrebenswert²⁴. In einer weiteren Studie von Orning et al.²⁵ konnte gezeigt werden, dass Tripeptide mit einem Arginin an der N-terminalen Position bevorzugt gespalten werden, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass es sich um eine Arg-Peptidase handelt. Die Stimulation der Peptidase-Aktivität der LTA₄H erfolgt durch mehrere monovalente Anionen wie zum Beispiel Chloride oder Bromide²⁶.

Aufgrund der Zink-Abhängigkeit des Proteins, der Aminopeptidaseaktivität sowie der Sequenz-Homologie wird die LTA₄H zur Familie der M1-Metallopeptidasen gezählt²⁷.

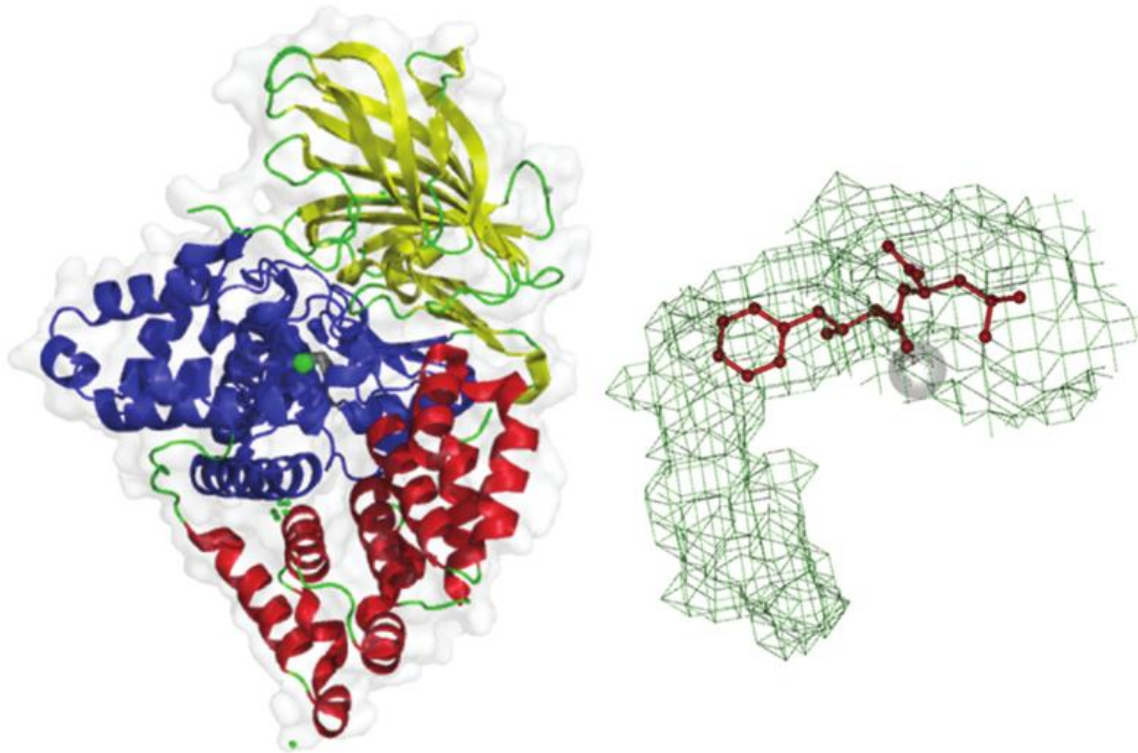


Abbildung 3: Kristallstruktur der hLTA₄H (PDB 1HS6) mit den drei Domänen: N-terminal in gelb, C-terminal in rot und die katalytische Domäne in blau. Das Zink ist in grün dargestellt. Auf der rechten Seite ist die L-förmige Bindetasche mit dem Inhibitor Bestatin gebunden (rot) dargestellt. (Abbildung Haeggström et al.²⁸).

Durch die pharmakologische Relevanz des Proteins wurden bisher viele Kristallstrukturen mit unterschiedlichen gebundenen Inhibitoren veröffentlicht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die LTA₄H in drei definierte Bereiche unterteilt ist. Diese sind eine N-terminale, eine C-terminale, sowie eine katalytische Domäne (Abbildung 3 links). Die Bindetasche der LTA₄H hat eine L-förmige Struktur mit einem hydrophilen Bereich an der Oberfläche und einem hydrophoben Tunnel welcher tiefer in das Protein hineinragt (Abbildung 3 rechts).

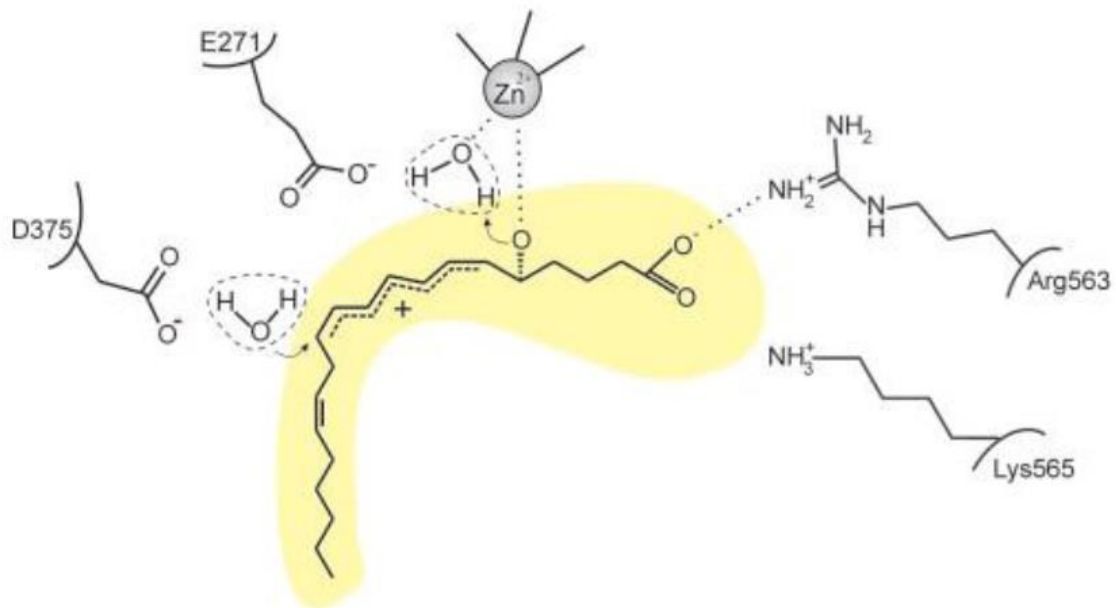
1.3.1 Mechanismus der Hydrolase-Aktivität der LTA₄H

Abbildung 4: Postulierter Mechanismus der Hydrolase-Aktivität der LTA₄H²⁹.

Durch die beiden Aminosäuren Arg-365 und Lys-565 bildet sich eine Erkennungsstelle für das Carboxylat, welche das Allylepoxid proximal zum katalytischen Zink in der Bindetasche ausrichtet. Das Zink-Ion kann dadurch als schwache Lewis-Säure fungieren, wodurch es die Öffnung des Epoxidrings katalysiert. Bei dem dadurch entstehenden Carbokation kann die Ladung über das konjugierte Triensystem (C6 bis C12) delokalisiert werden. Daraus resultierend kann es zu einem nukleophilen Angriff eines, durch die Aminosäure Asp-375 aktivierten Wassers, auf die C12 Position des Triensystems kommen. Somit kommt es zur Addition einer Hydroxygruppe an der C12 Position. Die Ausbildung der 6-cis-Doppelbindung wird über die Konformation bestimmt, mit der das Substrat LTA₄ an die LTA₄H bindet²⁹ (Abbildung 4).

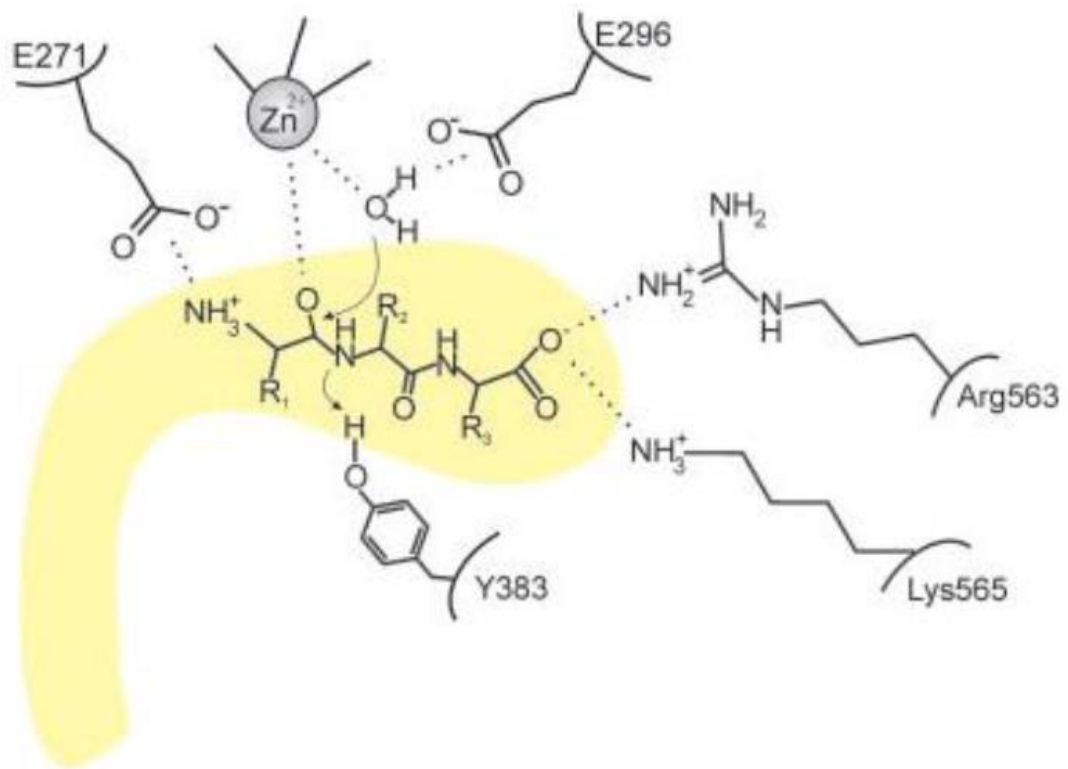
1.3.2 Mechanismus der Peptidase-Aktivität der LTA₄H

Abbildung 5: Postulierter Mechanismus der Peptidase-Aktivität der LTA₄H²⁹.

Im Ausgangszustand ist das Zink-Atom im aktiven Zentrum über die drei Aminosäuren Arg-563, Tyr-383 und Lys-565 koordiniert. Zusätzlich findet eine weitere Koordination zu einem Wassermolekül statt, welches bei der Bindung eines Tripeptids verdrängt wird. Das Peptid wird zusätzlich über seine N-terminale Aminogruppe an Glu-271 gebunden, was zu einer Stabilisation des Übergangszustands führt. Das koordinierte Wassermolekül kann durch die Stabilisation einen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidgruppe durchführen, was zur Spaltung der Peptidbindung führt. Über Tyr-383 erfolgt gleichzeitig die Protonierung des Stickstoffatoms des Spaltprodukts²⁹ (Abbildung 5).

1.3.3 Inhibitoren der Leukotrien A₄-Hydrolase

Einige der bereits bekannten Inhibitoren der LTA₄H nutzen die Tatsache, dass es sich bei dem Enzym um eine Zink-Protease handelt. Durch die Chelatisierung des Zink-Ions kommt es zu einem gleichzeitigen Aktivitätsverlust der LTA₄H. Dazu zählen zum Beispiel Bestatin³⁰ und Captopril³¹ sowie Kelatophan³² (Abbildung 6).

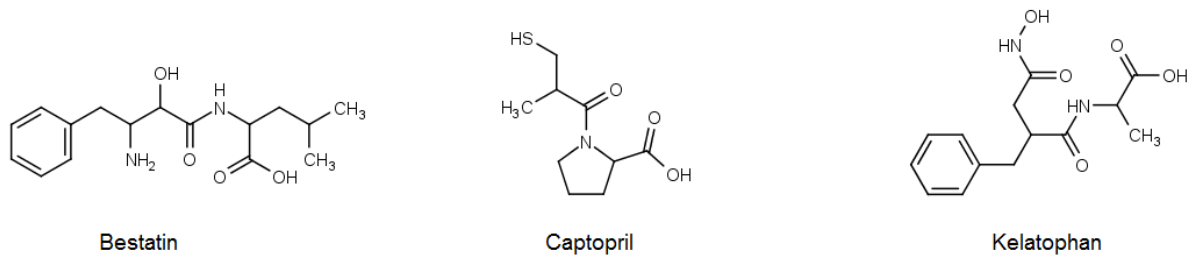


Abbildung 6: Beispiele von Zink-chelatisierenden Inhibitoren der LTA₄H Bestatin, Captopril und Kelatophan.

Dieser Ansatz zur Entwicklung neuer Inhibitoren kann nicht selektiv eine Seite des Enzyms adressieren, da sowohl die Peptidase- als auch die Hydrolase-Aktivität durch das Zink-Ion reguliert wird. Aus diesem Grund werden immer neue Ansätze zur Entwicklung neuer Inhibitoren verfolgt. Dazu zählen unter anderem die Identifikation von Substrat-Analoga sowie das fragmentbasierte Inhibitor-Design. Einen potentiellen Kandidaten, welcher in in-vitro Studien gute anti-inflammatorische Eigenschaften zeigte war SA-6541 (Santen Pharmaceuticals)³³. Dieser besteht aus einem dipeptischen Thiol-Grundgerüst (Abbildung 7). Ein weiterer, nicht-peptidischer, und nicht Zink-chelatisierender Inhibitor, wurde von Searle/Pharmacia veröffentlicht. Dieser Inhibitor (SC57461A) zeigte eine sehr gute Effizienz in Maus-Modellen zur LTB₄ Bildung im Blut. Ebenfalls zeigte er sehr gute Ergebnisse in Ionophor-induzierten Rattenmodellen zur Eicosanoid-Bildung im Bauchfell. Aufgrund der Langlebigkeit seiner Metabolite sowie der toxischen Eigenschaften wurde SC57461A nicht weiter verfolgt³⁴ (Abbildung 7).

Durch die Inhibition der hLTA₄H kommt es zu einer Anhäufung von LTA₄, welches über die 12- und 15-LO in anti-inflammatorische Lipoxine umgewandelt wird³⁵. Nichts desto trotz wird davon ausgegangen, dass die selektive Inhibition der Hydrolase-Aktivität der LTA₄H ein größeres therapeutisches Potential aufweist als Inhibitoren beider Aktivitäten. Bisher gibt es nicht viele zuverlässige Ansätze um selektive Inhibitoren der Hydrolase-Bindetasche zu generieren. Als erstes gelang Stsiapanava et al.³⁶ im Jahr 2014 die Entwicklung des ersten selektiven Hydrolase Inhibitors ARM1 (Abbildung 7).

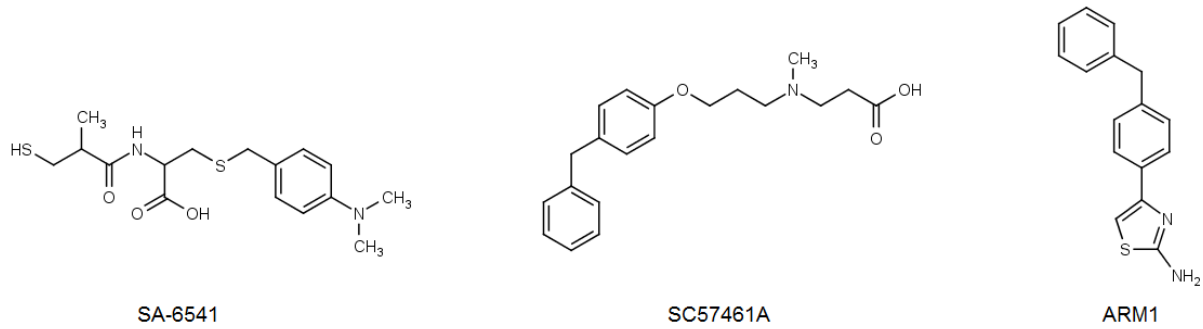


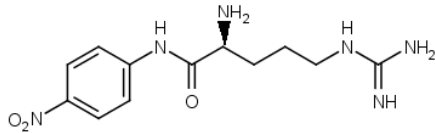
Abbildung 7: Beispiele von nicht Zink-chelatisierenden Inhibitoren. SA-6541, SC57461A und ARM1.

1.3.4 Assay-Methoden der LTA₄H

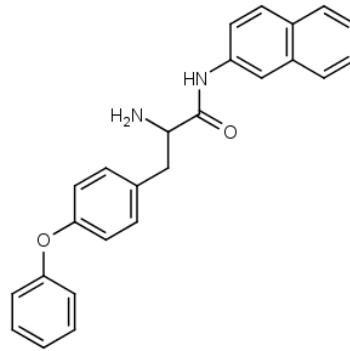
Die bisherigen Assaymethoden zur Untersuchung der LTA₄H-Aktivität sind nicht sehr zufriedenstellend. Die Methoden sind sehr zeitaufwendig und zum Teil sehr kostspielig. Zur Bestimmung der Hydrolaseaktivität wird die Umwandlung des instabilen LTA₄ in das stabile LTB₄ mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) oder ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) gemessen³⁷. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung (HTRF) für die Detektion der LTB₄-Produktion³⁸. Die Aminopeptidase-Assays für die LTA₄H erfolgen über die chromogene oder fluorogene Umsetzung von Substraten wie unterschiedlicher *para*-Nitroanilide, oder β -Naphthylamiden^{25,39,40}. Orning et al. konnten zeigen, dass unterschiedliche Aminosäuren, welche an *p*-Nitroanilide gekoppelt sind, durch die Aminopeptidase der LTA₄H an der Amidbindung gespalten werden können. Die Absorption der daraus resultierenden *p*-Nitroaniline kann bei 410 nm detektiert werden. Bei der Untersuchung mehrerer unterschiedlicher Aminosäuren stellte sich das L-Arginin-*p*-Nitroanilin als das beste Substrat heraus²⁵ (Abbildung 8).

2013 veröffentlichte Poras et al.⁴¹ eine fluoreszenzbasierte Methode für selektive Hydrolase-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo*. Hierbei kommt das Substrat β -Naphthylamid zum Einsatz, welches mit Phenylalanin verbunden ist und mit zusätzlichen Seitenketten verlängert wurde. Diese Verlängerungen der Seitenketten lagern sich optimal in die tiefe Tasche der Hydrolase-Aktivität ein (Abbildung 8).

Bislang gibt es noch keine einheitliche Methode, mit welcher sowohl Inhibitoren der Hydrolase-Aktivität als auch Inhibitoren der Peptidase-Aktivität der LTA₄H vermessen werden können.



L-Arginin-p-Nitroanilin



L-(4-benzoyl)phenylalanin-β-naphtylamide

Abbildung 8: Beispiele unterschiedlicher bekannter Assay-Substrate der LTA₄H.

2. Motivation und Ziel der Arbeit

Aufgrund der Beteiligung an Entzündungsreaktionen stellt die LTA₄H ein interessantes Target für die Wirkstoffentwicklung dar. Um Wirkstoffe auf ihre Potenz hin untersuchen zu können, sind geeignete biochemische Testsysteme (Assays) notwendig. Hierüber lässt sich herausfinden, ob es sich bei der zu untersuchenden Substanz um einen Aktivator oder einen Hemmstoff (Inhibitor) des Proteins handelt. Mit Hilfe spektrometrischer Methoden ist es möglich, die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion zu detektieren und zu quantifizieren⁴².

Bei der Entwicklung orthogonaler Screeningmethoden gibt es eine Vielzahl von Ansätzen. Es gibt die Möglichkeit für radioaktive, lumineszente-, fluoreszente- oder direkte Bindungsassays. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mittels des zeitaufgelösten Förster-Resonanz Energietransfers oder mittels Anisotropie die Inhibitorwirkung zu untersuchen. Fluoreszenzbasierte- oder kalorimetrische Assaysysteme bieten den Vorteil, dass sie einfach und schnell durchzuführen sind. Des Weiteren sind sie meistens kostengünstiger als andere Methoden und bieten die Möglichkeit zur Automatisierung⁴³.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die LTA₄H zu klonieren, zu exprimieren und aufzureinigen, um anschließend einen fluoreszenzbasierten Assay für beide Aktivitäten der LTA₄H zu etablieren. Die Entscheidung für einen fluoreszenzbasierten Assay anstatt eines kolorimetrischen Systems ist durch die Tatsache begründet, dass fluoreszenzbasierte Assaysysteme wesentlich sensitiver sind als kolorimetrische. Des Weiteren ist die Gefahr einer Interaktion der gemessenen Wellenlänge mit der Testsubstanz bei einem fluoreszenzbasierten System geringer als bei einem kolorimetrischen⁴².

Zur Entwicklung neuer Inhibitoren wurde bei zahlreichen Studien eine Kombination von isothermer Titrationskalorimetrie sowie Röntgenkristallographie angewendet, um bei der Auswahl eines geeigneten Hits oder der Leitstrukturoptimierung behilflich zu sein⁴⁴. Die Daten sind oftmals abhängig vom untersuchten Protein-Ligand System⁴⁵ und können nicht verallgemeinert werden. Aufgrund der Größe der Bindetasche können mehrere kleine Untertaschen vermutet werden, weshalb eine gute Charakterisierung der Bindetasche

sinnvoll ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Inhibitoren der LTA₄H ausgewählt werden, deren Kristallstruktur bereits vorhanden ist. Dabei sollte ein möglichst breites Spektrum in der Bindetasche durch die unterschiedlichen Inhibitoren abgedeckt werden. Diese Inhibitoren sollten hinsichtlich ihrer thermodynamischen Eigenschaften charakterisiert werden, um neue Erkenntnisse für weitere mögliche Inhibitoren zu erhalten.

3. Material und Methoden

3.2 Verwendete Materialien

3.2.1 Chemikalien

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Katalognummer</i>
<i>2-Mercaptoethanol</i>	Sigma Aldrich	M6250
<i>Acrylamid 4K - Losung (30 %) - Mix 37,5 : 1</i>	AppliChem	A1672
<i>Agarose, Ultra Pure™</i>	Invitrogen	16500-500
<i>Ammoniumpersulfat (APS)</i>	Carl Roth	9592
<i>Blocking Reagenz</i>	LiCor	
<i>Bromphenolblau</i>	Merck	108122
<i>Centriprep® YM-10, 10 kDa NMGG</i>	Merck Millipore	4304
<i>Complete Mini Proteaseinhibitor-Mix, EDTA-frei</i>	Roche	11836170001
<i>Coomassie Brilliant Blau G-250</i>	AppliChem	A3480
<i>D-(+)-Glucose Monohydrat</i>	PanReac AppliChem	A1349
<i>DNase</i>	PanReac AppliChem	A3778
<i>Ethidiumbromid</i>	Carl Roth	2218
<i>Ethylendiamintetraacetat</i>	Merck	1.08418
<i>Glycerin, wasserfrei</i>	AppliChem	A3552
<i>Glycin</i>	AppliChem	A1377
<i>HiLoad 16/60 Superdex 200 pg</i>	GE Healthcare	28-9893-35
<i>HisTrap 5 mL</i>	Ge Healthcare	17-5248-01
<i>Imidazol</i>	Carl Roth	X998
<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>	PanReac AppliChem	A773
<i>Natriumacetat</i>	Carl Roth	X891
<i>Natriumchlorid</i>	Carl Roth	3957

<i>Phosphate buffered saline</i>	PAA Laboratories	H15-011
<i>Salzsäure, rauchend 37%</i>	Carl Roth	4625
<i>SDS</i>	AppliChem	A1502
<i>Sypro® Orange Protein Gel Stain (5000x)</i>	Invitrogen	S6650
<i>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</i>	AppliChem	A1148
<i>Tris</i>	PanReac AppliChem	A2264
<i>Tween-20</i>	Sigma Aldrich	274348

3.2.2 Geräte

	Geräte	Hersteller
	<i>96-well MicroAmp</i>	Invitrogen
	<i>ÄKTAPurifier</i>	GE Healthcare
	<i>FL-20-M Fluo-Link UV-Transilluminator</i>	MWG Biotech
	<i>I Cycler IQ Single-Color real time PCR</i>	BioRad
	<i>Inkubationsschüttler MaxQ 4000 SHKA4000</i>	Thermo Scientific
	<i>Labofuge 400 R Tischzentrifuge</i>	Heraeus Instruments
	<i>MicrCal VP ITC</i>	Malvern
	<i>Midi Elektrophorese Kammer</i>	Carl Roth
	<i>Mini Protean® Tetra Vertical electrophoresis cell</i>	BioRad
	<i>Nanophotometer</i>	Implen
	<i>Nitrocellulose Membrane Hybond-C extra</i>	Amersham Protran
	<i>Odyssey® Imager</i>	Li-Cor
	<i>peqSTAR 96 Universal Thermocycler</i>	PEQLAB Biotechnologies
	<i>Power Pac™ Basic Power Supply</i>	BioRad
	<i>PureLab Ultra MilliQ-Wasser Anlage</i>	Elga
	<i>Sample Loop 5 mL</i>	GE Healthcare
	<i>Sonoplus HD200 Ultraschall-Homogenisator</i>	Bandelin
	<i>Sonoplus Titan-Mikrospitze MS73</i>	Bandelin
	<i>Superloop 150 mL</i>	GE Healthcare
	<i>Tecan infinite 200 Pro</i>	Tecan
	<i>Thermomixer® Comfort</i>	Eppendorf

<i>UV Transilluminator</i>	Vilber Lourmat
<i>Wärmeschrank UN200</i>	Memmert
<i>Zelldisruptor</i>	Constant Systems Ltd
<i>Zentrifuge RC-5B Plus</i>	Sorvall

3.2.3 Molekularbiologie

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Katalognummer</i>
<i>1 kb DNA Ladder (GeneRuler)</i>	Fermentas	SM0311
<i>100 Bp DNA Ladder (GeneRuler)</i>	Fermentas	SM0241
<i>Agar-Agar, Kobe I</i>	Carl Roth	5210
<i>Antarctic Phosphatase</i>	New England Biolabs	M0289S
<i>BamHI</i>	New England Biolabs	R0136S
<i>CutSmart Puffer</i>	New Enland Biolabs	B7204S
<i>DMSO Molecular Biology Grade</i>	PanReac AppliChem	A3006,0100
<i>DNA Ladepuffer (6x)</i>	Fermentas	R0611
<i>dNTP Mix (10 mM)</i>	Bioline	Bio-39025
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs	R0101S
<i>GeneElute Gel Extraction Kit</i>	Sigma Aldrich	NA1111-1KT
<i>GeneElute PCR Clean up Kit</i>	Sigma Aldrich	NA1020
<i>GeneElute Plasmid Miniprep Kit</i>	Sigma Aldrich	PLN70
<i>Kanamycin</i>	PanReac AppliChem	A1493.0010
<i>Luria Broth Base</i>	Invitrogen	
<i>T4 DNA Ligase</i>	New England Biolabs	M0202T
<i>T4 DNA Ligase Puffer (10x)</i>	New England Biolabs	B0202S
<i>Taq Polymerase</i>	New England Biolabs	M0273S
<i>Taq Puffer (+ MgCl₂)</i>	New England Biolabs	B9014S
<i>XhoI</i>	New England Biolabs	R0146S

3.2.4 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
<i>LTA₄H_fwd</i>	AAAGGATCCATGCCCGAGATAGTGGATA (<i>Bam</i> H1 Schnittstelle)	Eurofins MWG Operon
<i>LTA₄H_rev neu KA</i>	AAACTCGAGGTCCACTTTTAAGTCTTTCCC (<i>Xho</i> I Schnittstelle)	Eurofins MWG Operon

3.2.5 Bakterienstämme und Plasmide

Bezeichnung	Quelle
<i>LTA₄ pN10 (KS73)</i>	Kirsten Stoffers, AK Steinhilber
<i>pET-24(+)</i>	Novagen, Darmstadt
Escherichia coli <i>DH5α</i>	Invitrogen, Darmstadt
Escherichia coli <i>Bl21(DE3)</i>	Novagen, Darmstadt

3.2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>IRDye 680LT Goat Anti-Rabbit</i>	LiCor
<i>LTA₄H Antibody (C-term)</i>	Abgent

3.2.7 Software

Software	Hersteller/ Link
<i>Geneious Pro 5.3.4</i>	Biomatters
<i>Graph Pad Prism 5.03</i>	Graph Pad Prism Software Inc.
<i>MyiQ Optical Software 1.0</i>	Biorad
<i>OdysseyR 2.1</i>	LiCor
<i>ProtParam</i>	http://web.expasy.org/protparam/
<i>Tecan I Control</i>	Tecan
<i>Unicorn 5.11</i>	GE Healthcare
<i>VisionCapt Image Master</i>	Vilber Lourmat

3.3 Methoden

3.3.1 Klonierung

3.3.1.1 PCR

Die proteincodierende cDNA Sequenz (Komplementäre DNA) für die hLTA₄H wurde aus dem von Kirsten Stoffers zur Verfügung gestellten Plasmid mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion) isoliert. Um die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I am 5` bzw. 3` Ende des Fragments einzuführen, wurden folgende Primer verwendet (Schnittstellen sind unterstrichen): 5`-AAAGGATCCATGCCCCGAGATAGTGGATA-3` sowie 5`-AAACTCGAGGTCCA~~CTTT~~AAGTCTTTCCC-3`. Die PCR wurde in einem Gesamtansatz von 50 µL durchgeführt. Hierzu wurden je 100 pmol der verwendeten Primerlösungen, 120 ng des Donorplasmids, 0,2 mM dNTP – Mix, 0,5 % DMSO, 1x Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂) sowie 1,25 Units Taq-Polymerase mit MQ-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Zur Amplifizierung des Gens wurde folgendes PCR-Programm verwendet (Tabelle 1):

Tabelle 1: PCR Programm zur Klonierung der LTA₄H.

2,30 min.	94 °C	
45 sek.	94 °C	} 35 Zyklen
2 min.	55 °C	
2,30 min.	72 °C	
10 min.	72 °C	

Die Größenauftrennung erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese. Hierbei wurde das PCR Produkt mit 10 µL eines 6x Ladepuffers versetzt und auf ein 1 % (w/v) Agarosegel mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid aufgetragen. Zur Durchführung (100 V, 45 min.) wurde ein Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (TAE) Puffer verwendet. Die Evaluierung der DNA-Banden erfolgte bei 285 nm am Transilluminator. Als Größenreferenz diente ein 1 kB DNA-Standard. Das PCR Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels eines Elutions-Kits aus dem Gel isoliert. Die finale Konzentration wurde an einem Nanophotometer ($\lambda=260$ nm) bestimmt.

3.3.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Um die isolierte cDNA der hLTA₄H sowie den Zielvektor pET24 a(+) für die Ligation vorzubereiten, mussten diese mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten werden. Die benötigte Menge an Restriktionsenzymen wurde mittels Formel 1 berechnet. Für beide Restriktionsenzyme wurde vom Hersteller λ-DNA (48502 bp) als Referenz angegeben. Somit ergibt sich für den Verdau von 1 µg des Vektors eine Restriktionsenzymmenge von jeweils 9 Units, sowie für den Verdau des Inserts 26 Units. Des Weiteren wurde der CutSmart Puffer 1-fach zugegeben und mit MQ- Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 95 °C (10 min.) wurden die Ansätze inaktiviert. Anschließend wurden zur Dephosphorylierung der 5`-Enden je 2 Units der Antarctic Phosphatase zugegeben und für weitere 30 min. bei 37 °C inkubiert bevor eine erneute Hitzeinaktivierung bei 70 °C (10 min.) folgte. Die Korrektheit des Verdau des Vektors wurde mittels einer Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese (1% w/v) verifiziert. Als Kontrolle wurde ebenfalls der ungeschnittene Vektor aufgetragen. Dazu wurden jeweils 10 µL mit 2 µL des 6-fachen Ladepuffers vermischt und das 1 % Agarosegel (mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid) für 60 min. bei 100 V Spannung angelegt. Ein 1 kB DNA Marker diente der Größenorientierung. Beide Restriktionsansätze wurden mittels eines PCR-Purifier Kits aufgereinigt. Die Bestimmung der DNA Konzentrationen erfolgte am Nanophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

$$cp * \frac{\left(\frac{lref * np}{lp * nref}\right)}{Zeit [h]} = Units$$

Formel 1 :Formel zur Berechnung der benötigten Menge an Restriktionsenzymen für den Restriktionsverdau.

Cp= Konzentration der Probe [µg], *lref* = Länge der Referenz des Herstellers [bp], *lp* = Länge der Probe [bp], *nref* = Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der Referenz des Herstellers, *np* = Anzahl der Schnittstellen in der Probe.

3.3.1.3 Ligation

Die korrespondierenden Enden des geschnittenen Vektors und des geschnittenen Inserts wurden in einem molaren Verhältnis von 1:10 miteinander ligiert. Hierzu wurden 50 ng des Vektors mit 160 ng des Inserts sowie 1-fach T4 DNA-Ligase Puffer und 400 Units T4 DNA Ligase in einem Gesamtansatz von 20 µL inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zur anschließenden Hitzeinaktivierung der T4 DNA-Ligase wurde der Ansatz für 10 min. bei 65 °C inkubiert.

3.3.1.4 Transformation in *Escherichia coli* DH5 α Zellen

Die Integration des Ligationsansatzes erfolgte zunächst in den Amplifikationsstamm *E. coli* (*Escherichia coli*) DH5 α . Hierzu wurde die Hitzeschock-Methode verwendet, um die Bakterienmembran durchlässig zu machen und die Aufnahme von Plasmiden zu ermöglichen. Es wurden 5 μ L des Ligationsansatzes zu 100 μ L kompetenten Zellen gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 2 min. bei 42 °C. Anschließend wurden 500 μ L LB (Luria broth base) Medium zugegeben und für weitere 30 min. bei 37 °C unter Schütteln mit 180 rpm (rounds per minute) inkubiert. Um eine stabilere Aufnahme des Plasmids zu gewährleisten, wurde zu den angewachsenen Bakterien weitere 500 μ L LB Medium mit Kanamycin (0,25 μ g/mL) zugegeben und abermals für 60 min. bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min. (Raumtemperatur (RT)) geerntet. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 μ L LB Medium resuspendiert und auf einer Kanamycin (50 μ g/mL) haltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.1.5 Vermehrung der Klone

Ein Klon wurde von der Platte gepickt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) in 5 mL LB Medium mit Kanamycin (Kan) (50 μ g/mL) kultiviert. Die Plasmidpräparation erfolgte mittels eines Mini-Präparation-Kits. Zur Elution wurden 50 μ L MQ-Wasser verwendet und die DNA Konzentration wurde am Nanophotometer bestimmt.

3.3.1.6 Identifizierung positiver Klone

Mittels eines Kontrollverdau mit *EcoRI* wurde überprüft, ob der Klon das transformierte Plasmid trägt. Als Kontrolle wurde der Ausgangsvektor pET24 a(+) ohne Plasmid ebenfalls verdaut. Für den Verdau wurde je 1 μ g mit 7 Units *EcoRI* für die Klone bzw. 9 Units für den Ausgangsvektor versetzt. Ebenso wurde der CutSmart Puffer (1-fach) eingesetzt und mit MQ-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 μ L ergänzt. Die Analyse erfolgte mittels eines 1 % (w/v) Agarosegels mit 0,5 μ g/mL Ethidiumbromid in TAE Puffer bei einer Bandengröße von 7066 Basenpaare (Bp). Als Referenz diente ein 1 kB DNA Marker. Die positiv evaluierten Klone wurden in einem weiteren Schritt mittels Sequenzierung (Sequence Laboratories, Göttingen) verifiziert. Zur Lagerung wurden Cryo-Kulturen der positiven Klone hergestellt.

3.3.1.7 Transformation in *E. coli* BL21- DE3 Zellen

Die Transformation des positiven Konstrukts in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-DE3 erfolgte analog zur Transformation in die *E. coli* DH5 α Zellen (Abschnitt 2.2.1.4). Zur Lagerung wurden ebenfalls Cryo-Kulturen angefertigt.

3.3.1.8 Plasmidkarte

Unter Abbildung 9 ist die Plasmidkarte des klonierten Konstrukts zu sehen. Die humane Leukotrien A4 Hydrolase (1858 bp) in pET24 a(+). Ebenfalls zu sehen ist der C-terminale His-

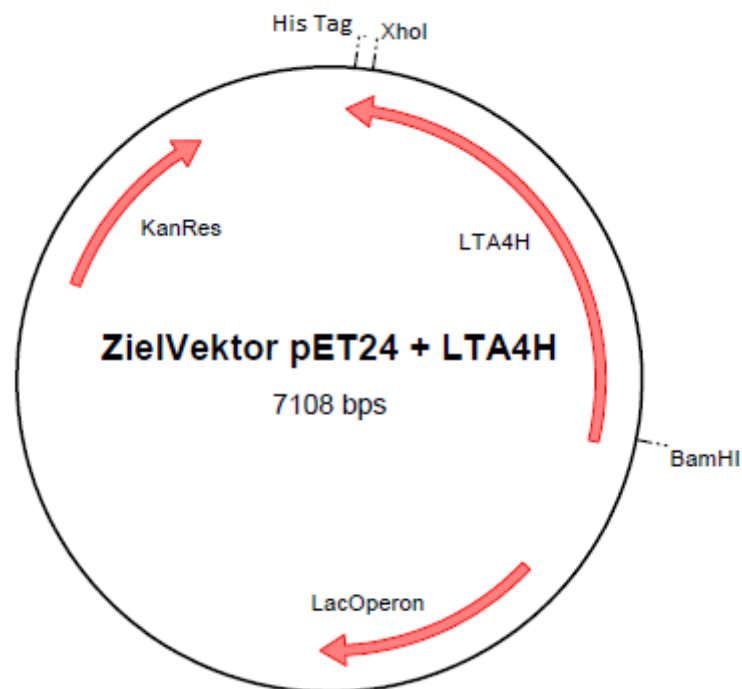


Abbildung 9: Plasmidkarte des Konstrukts LTA₄H in pET24a (+). Gezeigt sind die Restriktionsenzyme BamHI sowie XhoI und das Lac Operon und die Kanamycin Resistenz.

Tag sowie die beiden Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI. Des Weiteren ist die Lage des Resistenzgens für das Antibiotikum Kanamycin zu sehen, sowie das Lactose-Operon, welches für die Regulation der Induktion und Repression der Bakterien zuständig ist.

3.3.2 Expression und Aufreinigung

3.3.2.1 Expression

Zur Expression des hLTA₄H Konstrukts in pET24 a(+), wurde zunächst eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurden 25 mL LB Medium mit 50 μ g/mL Kanamycin und 4 mg/mL Glucose versetzt. Anschließend wurde eine Kolonie des positiven Klons zugegeben und über Nacht

bei 37 °C unter stetigem Schütteln (180 rpm) hochgezogen. Diese Vorkultur diente am nächsten Tag dazu, eine größere Kultur (500 mL oder 1 L) in einem Schikanekolben zu beimpfen. Zur Beimpfung wurden 1 % (v/v) verwendet. Die Expressionskultur wurde ebenfalls bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) für etwa 4 Stunden kultiviert. Zwischenzeitlich wurde stündlich die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt und eine Wachstumskurve aufgenommen. Nach Erreichen einer OD_{600} von etwa 0,8, wurden 400 μ M IPTG zugegeben. Dies diente der Induktion der Expression des rekombinanten Proteins. Gleichzeitig wurde die Temperatur auf 22 °C abgesenkt und die Kultur für weitere etwa 18 Stunden inkubiert. Zum Ernten wurde bei 5500 rpm und RT für 30 min. zentrifugiert und das entstandene Pellet bei -20 °C gelagert.

3.3.2.2 Lyse

Die Zellpellets wurden in 25 – 50 mL Lysepuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,01 % Tween-20, pH 8) resuspendiert. Um den Abbau des Proteins zu verhindern wurde 1 Tablette Complete mini Protease-inhibitor (EDTA-frei) zugegeben. Des Weiteren wurde noch eine Spatelspitze DNase I zugegeben, um die bakterielle DNA abzubauen und somit die Viskosität des Lysats zu erhöhen. Die Zelllyse erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen. Die Suspension wurde entweder am Zelldisruptor viermal bei 1000 bar (4°C), oder mittels Ultraschall-Sonifikation aufgeschlossen. Hierzu wurde die Lösung unter ständigem Kühlen in einem Eisbad für 20 min. (1 sek. Schallen, 1 sek. Pause) bei 60 Watt sonifiziert. Nach anschließender Zentrifugation (19000 rpm für 60 min., 4°C) zur Abtrennung der festen Zellbestandteile, wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.2.3 Nickel-Affinitätschromatographie

Der Überstand wurde zu präparativen und analytischen Zwecken auf eine 5 mL His-Trap Säule mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose aufgetragen. Der auf dem Plasmid codierte Hexa-Histidin-Tag (His-Tag) besitzt die Fähigkeit, Chelatkomplexe mit den zweiwertigen Nickel-Ionen zu bilden und somit konnte das LTA₄H-Protein von anderen Proteinen ohne His-Tag getrennt werden. Zur Etablierung der Aufreinigung wurde zuerst über einen Imidazol-Gradienten (0 - 404 mM) eluiert. Dazu enthielt der Auftrags- und Waschpuffer nur 4 mM Imidazol, da noch nicht bekannt war, bei welcher Imidazol-Konzentration das Protein eluiert. Nach dem evaluiert war, bei welcher Konzentration das Protein eluiert (ca. 30 mM), wurde der Auftrags- und Waschpuffer angepasst. Er setzt sich zusammen aus 50 mM Tris, 500 mM

NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8. Nach dem Auftragen auf die Säule wurde für 5 Säulenvolumina mit Waschpuffer und einem Gradient von 0,8 % Elutionspuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 8) gespült. Der finale Elutionsschritt mit 400 mM Imidazol (100 % Elutionspuffer) wurde für 7 Säulenvolumina durchgeführt. Sämtliche Schritte wurden mit einer konstanten Flussrate von 4 mL/min. durchgeführt. Die Absorption wurde mittels eines UV-Vis (Ultraviolettes Licht) Detektors (280 nm) überwacht. Die relevanten Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.3.3.1) analysiert.

3.3.2.4 Aufkonzentrieren

Die relevanten Fraktionen wurden mittels Konzentratoren (Amicon Centripreps) aufkonzentriert. Der cutoff der Membran lag bei 10 kDa. Zum Aufkonzentrieren wurden die Proben in mehreren Schritten für je 30 min. bei 2500 rpm (4°C) zentrifugiert.

3.3.2.5 Größenausschlusschromatographie

Um den Reinheitsgrad des Proteins weiter zu erhöhen, wurden die aufkonzentrierten Fraktionen mit Hilfe einer 5 mL Schleife auf eine Superdex 200 prep grade Gelfiltrationssäule aufgetragen. Der Fließmittelpuffer setzte sich aus 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 zusammen. Die Flussrate betrug beim Auftragen 0,5 mL/min. und wurde bei der Elution auf 1 mL/min. erhöht. Die Absorption wurde ebenfalls mittels eines UV-Vis Detektors (254 nm und 280 nm) kontrolliert. Die relevanten Fraktionen wurden ebenfalls mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und bis zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert (3.3.2.4).

3.3.3 Proteinanalyse

3.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der relevanten Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie bzw. der Größenausschlusschromatographie wurden diese in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dazu wurden 70 µL der jeweiligen Fraktion mit 20 µL eines 5-fach Ladepuffers (250 mM Tris pH 6.8, 5 mM EDTA, 10% SDS, 50% Glycerol, 0,05% Bromphenolblau) sowie 10 µL β-Mercaptoethanol versetzt. In Abhängigkeit der Taschengröße und des Proteingehalts wurden 7-18 µL der Proben auf ein Trenngel mit 10 % Acrylamid aufgetragen. Da es sich bei dem verwendeten Verfahren um eine diskontinuierliche Zonenelektrophorese handelte, wies das Sammelgel einen geringeren Acrylamidgehalt (4 %) auf. Als Größenreferenz

wurde ein *Precision Plus Protein Standard* aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei 80 V, sodass sich die Proben im Sammelgel konzentrieren konnten, anschließend wurde die Voltzahl für weitere 70 min auf 150 V erhöht. Ein Laufpuffer aus 25mM Tris, 190 mM Glycin und 3,5 mM SDS wurde verwendet.

3.3.3.2 Coomassie Brilliant Blau Färbung

Zur Visualisierung der Proteinbanden nach der SDS-Page wurde das Gel zunächst in MQ-Wasser für 2,30 min. in einer Mikrowelle erhitzt um die Banden zu fixieren. Anschließend wurde das MQ-Wasser durch 50 mL Coomassie Färbelösung (0,08 g Coomassie Brilliant Blue G-250 und 3 mL konzentrierte Salzsäure (37%) auf 1 L vollentsalztes Wasser) ersetzt und abermals für 2,5 min. in einer Mikrowelle erhitzt, um die Proteinbanden anzufärben. Um das Gel zu entfärben, wurde es mehrmals mit MQ-Wasser gewaschen. Die angefärbten Proteinbanden konnten mittels eines Odyssey Imagers bei 700 nm und einer Verstärkung von 5,5 gescannt werden.

3.3.3.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von spezifischen Proteinen. Die zuvor in der SDS-Page (3.3.3.1) nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine können durch die Bindung an einen spezifischen Antikörper dargestellt werden. Der Sekundärantikörper ist an einen Fluorophor gekoppelt, wodurch eine Identifizierung und Quantifizierung möglich ist. Die SDS-Page wurde nicht mit Coomassie Brillant Blau gefärbt, sondern auf einer Nitrozellulose-Membran zusammen mit mehreren Filtern in einer Gelapparatur platziert. Dazu wurde die Blotkammer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) befüllt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 80 min. bei 90 V und 225 Milliampere (mA). Um die transferierten Proteine auf der Membran zu fixieren wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur unter Rollen in Blockingpuffer (1:1 Blocking Reagenz (*Li-Cor*):PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti LTA₄H-Antikörper in Phosphate buffered saline (PBS) mit 0,09 % (w/v) Natriumazid 1:5000 verdünnt in Blockingpuffer mit 0,01 % Tween-20) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran 4-mal für je 5 min. in Blockingpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper (IRDye 680LT Goat Anti-Rabbit in PBS (pH 7,4), 10 mg/mL BSA, 0,01% Natriumazid) wurde 1:500 verdünnt in Blockingpuffer mit 0,01 % Tween-20) und für 45 min. bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran nochmal 4-mal für je 5 min. mit Blockingpuffer gewaschen. Um das restliche Tween-20 zu entfernen wurde der letzte Waschschrift lediglich mit PBS

durchgeführt. Die Detektion erfolgte an einem Odyssey Imager. Hierzu wurde die Membran bei einer Wellenlänge von 700 nm und einer Verstärkung von 5,0 gescannt.

3.3.3.4 Massenspektrometrische Proteinidentifikation

Zur weiteren Identifikation des aufgereinigten Proteins, wurde die jeweilige Bande aus dem mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Arbeitskreis von Prof. Karas wurde ein In-Gel Verdau mit Trypsin durchgeführt und anschließend eine MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie) Messung durchgeführt. Mittels einer *Mascot*-Suche wurden die Proteinfragmente identifiziert.

3.3.4 Differenziale Scanning Fluorimetrie (DSF)

Bei der Differential Scanning Fluorimetrie kommt ein fluoreszierender Farbstoff (*Sypro Orange*®) zum Einsatz, welcher eine hohe Affinität zu hydrophoben Bereichen von Proteinen aufweist. In einer wässrigen Umgebung findet eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs statt. Durch die Entfaltung von Proteinen bei steigender Temperatur werden die innen liegenden hydrophoben Bereiche freigesetzt sodass der Fluoreszenzfarbstoff binden kann, wodurch die Fluoreszenzlöschung aufgehoben wird. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals kann bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm detektiert werden. Der Schmelzpunkt (T_M) des Proteins ist hierbei definiert als die Temperatur bei der das Protein zu gleichen Teilen im gefalteten und ungefalteten Zustand vorliegt. Bei der Zugabe eines Liganden verschiebt sich der Schmelzpunkt (*Thermal Shift*) durch die Energie

die bei der Bindung frei wird ⁴⁶. Bei zunehmender Entfaltung dissoziiert das Sypro Orange wieder vom Protein (Abbildung 10).

Der Assay wurde in 96-well MicroAmp-Platten durchgeführt (Platten mit 96 Vertiefungen engl. well;). Dazu wurden 32 μL Proteinlösung (5 μM in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH8 mit 0,1 % Triton X-100) mit 4 μL des jeweiligen Inhibitors (1% DMSO) und 4 μL Sypro Orange[®] (2,5x Endkonzentration) in ein well pipettiert. Es wurde ebenfalls eine Pufferkontrolle mit DMSO und Triton X-100 (ohne Protein und Inhibitor) sowie eine Proteinkontrolle (ohne Inhibitor) mit aufgetragen. Vor der Messung wurde die Platte mit einer hitzebeständigen Klebefolie verschlossen und 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die relativen Fluoreszenzeinheiten wurden in einem Temperaturbereich von 23 °C – 90 °C gemessen (1 °C/min.). Alle Messpunkte wurden als Triplikate aufgetragen. Zur Auswertung wurde die erste Ableitung

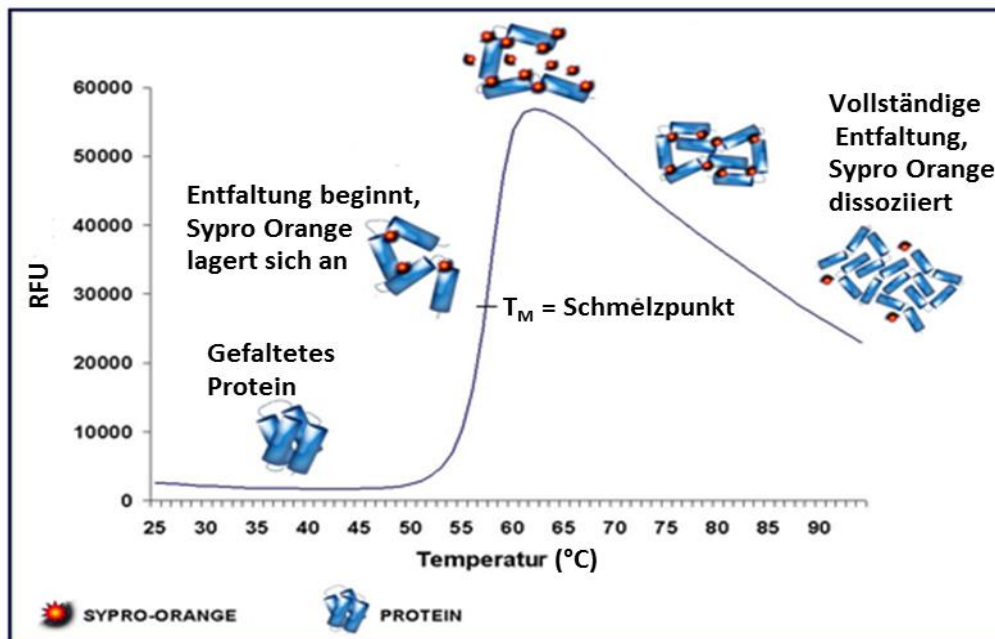


Abbildung 10: Schmelzkurve DSF- Assay (Abbildung nach U.S. Department of Energy Office of Science).

nach der Temperatur der jeweiligen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gebildet und diese mit einer Glättfunktion 2. Ordnung mit 6 Nachbarn gefittet (GraphPad Prism 5.0). Das Verfahren wurde des Weiteren verwendet um die optimalen Pufferbedingungen für das Enzym LTA₄H zu bestimmen. Dazu wurden 5 μM des Proteins in 50 mM Tris-HCl Puffer bei unterschiedlichen pH Werten (pH 7 – 9) sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl vermessen.

3.3.4.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) mittels Differential Scanning Fluorimetry

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit der Differential Scanning Fluorimetry Methode wurde der Assay wie beschrieben durchgeführt (3.3.4). Dabei wurden je Inhibitor 10 unterschiedliche Konzentrationen (Triplikate) aufgetragen. Abhängig vom jeweiligen Inhibitor erstreckte sich die Bandbreite an Konzentrationen von 0,005 μ M bis 1000 μ M. Nach der Bestimmung der Schmelzpunkte wurden die Daten anhand von Formel 2⁴⁷ mit Graph Pad Prism 5.0 gefittet.

$$Y = B + \left((T - B) * \left(1 - \left(\frac{P - Kd - x + \sqrt{(((P + X + Kd)^2) - (4 * P * X))}}{(2 * P)} \right) \right) \right)$$

Formel 2: Funktion zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels DSF-Assay. P : Proteinkonzentration, K_d : Dissoziationskonstante, x : jeweilige Ligandkonzentration, T : Höchster Schmelzpunkt, B : Niedrigster Schmelzpunkt.

3.3.5 Fluoreszenz basierter LTA₄H Assay

Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, spaltet die LTA₄H bevorzugt Tripeptide mit einem N-terminalen Argininrest²⁵. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass das Enzym p-Nitroanilide mit einem Argininrest am NH₂-Terminus hydrolysieren kann²⁵. Diese Informationen wurden genutzt und postuliert, dass die LTA₄H das nicht fluoreszierende Substrat L-Arginin-7-amido-4-Methylcoumarin spalten kann und somit das fluoreszierende Produkt 7-amino-4-Methylcoumarin entsteht. Die grundlegende Durchführung des Assays erfolgte in einer schwarzen 96-well Platte, in der das Protein zusammen mit dem Inhibitor

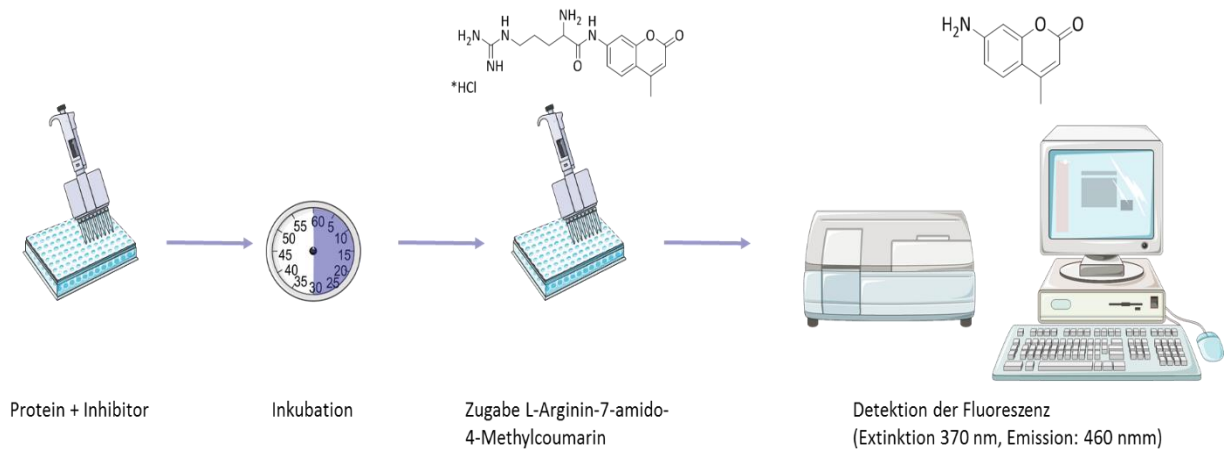


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Durchführungsprinzips des LTA4H Coumarin Assays.

vorinkubiert wurde. Nach anschließender Zugabe des Substrats konnte die Zunahme der Fluoreszenz bei einer Extinktion von 370 nm und einer Emission von 460 nm in einem Plattenleser detektiert werden (Abbildung 11). Die Umsatzrate des Substrats wurde über die Zeit detektiert. Dazu wurde 1 Messpunkt pro Minute für insgesamt 30 Minuten aufgenommen. Als Referenz wurden immer eine Pufferkontrolle (ohne Protein und Inhibitor) sowie eine Proteinkontrolle (ohne Inhibitor) mit aufgetragen. Die Messungen erfolgten immer in Triplikaten. Zur Berechnung der prozentualen Inhibition wurde zunächst die Steigung berechnet (Excel) und anschließend in Bezug zur Puffer und Proteinkontrolle gesetzt (Formel 3).

Formel 3: Formel zur Berechnung der % Inhibition

$$100 * \frac{\text{Steigung}_{\text{Inhibitor}} - \text{Steigung}_{\text{Pufferkontrolle}}}{\text{Steigung}_{\text{Proteinkontrolle}} - \text{Steigung}_{\text{Pufferkontrolle}}}$$

3.3.5.1 Bestimmung geeigneter Assay Parameter

Nachdem der am besten geeignete Assay-Puffer mittels Differential Scanning Fluorimetrie (3.3.4) bestimmt wurde, wurde zur Assay-Entwicklung in einem ersten Schritt ein Schachbrettartiges Muster (engl. checker board) mit 3 unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0,3 µM,

0,15 μM , 0,12 μM) sowie 6 unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0,02 mM – 2 mM) aufgetragen (Abbildung 12).

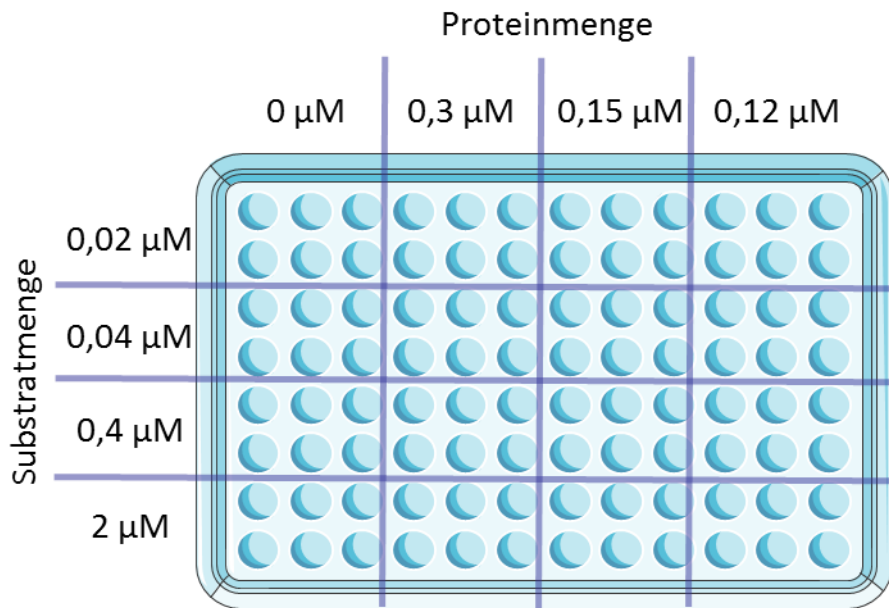


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Schachbrettmusters zur Bestimmung geeigneter Assay Konditionen.

Um die Güte der jeweiligen Bedingungen zu überprüfen, wurde von jeder Kombination der Z' -Faktor berechnet (Formel 4). Dieser lässt eine Aussage über die Güte des Assays in Abhängigkeit vom Signal zu Rauschverhältnis zu. Liegt der Z' -Faktor zwischen 0,5 und 1, dann sind die Bedingungen exzellent. Bei einem Z' -Faktor zwischen 0 und 0,5 sind die Bedingungen nicht optimal und bei einem Z' -Faktor < 0 lässt sich der Assay nicht quantitativ auswerten, da eine zu große Überlappung zwischen Pufferkontrolle und Proteinkontrolle vorliegt⁴⁸.

Formel 4: Formel zur Berechnung des Z' -Faktors. σ : Standardabweichung, μ : Mittelwert.

$$Z' - \text{Faktor} = 1 - \frac{3(\sigma_{\text{Proteinkontrolle}} + \sigma_{\text{Pufferkontrolle}})}{|\mu_{\text{Proteinkontrolle}} - \mu_{\text{Pufferkontrolle}}|}$$

Bei der optimalen Proteinkonzentration konnte in Abhängigkeit der unterschiedlichen Substratkonzentrationen die Michealis-Menten Konstante (K_m) bestimmt werden. Diese gibt die Substratkonzentration an, bei der die Geschwindigkeit der Umsetzung halbmaximal ist. Es ist sinnvoll die eingesetzte Substratmenge etwa gleich dem K_m zu wählen, da so sowohl

kompetitive als auch nicht kompetitive Wirkstoffe mit angemessener Sensitivität gemessen werden können⁴³.

3.3.5.2 Einfluss von DMSO und Detergenzien

Da viele der zu untersuchenden Moleküle eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen, wurden die Wirkstoffe immer in DMSO vorverdünnt. Um auszuschließen, dass das DMSO einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins, die Güte des Assays oder das Substrat hat, wurden unterschiedliche DMSO-Konzentrationen untersucht. Aufgrund der schlechten Löslichkeit mancher Moleküle können diese im Assay aggregieren. Dies würde zu falsch positiven Ergebnissen führen, da diese Aggregate die Bindetasche blockieren und es somit zu einer geringeren Substratumsetzung kommt. Durch Zugabe eines Detergens kann die Aggregatbildung der Moleküle verhindert werden⁴⁹. Bei der Wahl der Konzentration des Detergens ist zu beachten, dass dieses oberhalb einer bestimmten Konzentration Mizellen bilden kann (kritische Mizellkonzentration (CMC)). Zur Assay Etablierung wurden die nicht-ionischen Detergenzien Triton-X 100 und Tween-20 sowie das ionische Detergens SDS getestet. Die CMC von Triton-X 100 und Tween-20 liegt bei etwa 0,01 % (w/v) und bei SDS liegt die CMC etwa bei 0,2 % (w/v).

3.3.5.3 Proteinstabilitätstest

Um die Stabilität des Proteins vor oder nach dem Einfrieren bei -80 °C, sowie den Einfluss von 20 % Glycerin auf die Aktivität zu untersuchen, wurde eine Zeitreihe aufgenommen. Dazu wurde nach der Aufreinigung einer Charge an Protein ein Teil mit 20 % Glycerin versetzt, der andere Teil nicht. Von beiden Teilen wurde jeweils ein Teil mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C über Nacht gelagert. Insgesamt wurden 3 Messungen im Abstand von je 1 Woche durchgeführt um die Restaktivität des Proteins zu überprüfen.

3.3.5.4 Messung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀)

Die mittlere inhibitorischen Konzentration eines Inhibitors ist die Konzentration bei der das Enzym zu 50 % inhibiert wird. Zur Bestimmung wurden unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors (mindestens 5) im fluoreszenzbasierten Assay vermessen. Dabei wurden 0,3 µM Protein (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH8 mit 0,01 % Triton-X 100) sowie 200 µM Substrat verwendet. Für die ermittelten prozentualen Inhibitionen der einzelnen Konzentrationen wurde mittels GraphPad Prism der mittlere dekadische Logarithmus berechnet und eine

sigmoidale Dosis-Wirkungskurve angelegt. Der IC_{50} entspricht hierbei dem Wendepunkt der Kurve.

3.3.5.5 Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i)

Die Inhibitionskonstante (K_i) gilt als Maß für die Bindungsaffinität eines Inhibitors zum Rezeptor. Zur Bestimmung mittels des fluoreszenzbasierten LTA₄H-Assays wurden 6 verschiedene Inhibitor-Konzentrationen (Konzentrationen abhängig von der Aktivität des jeweiligen Liganden) mit jeweils 8 unterschiedlichen Substratkonzentrationen vermessen. Die Daten wurden in GraphPad Prism (5.0) mit einem Model für nichtkompetitive Wirkstoffe ausgewertet.

3.3.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine Methode um die Thermodynamik von molekularen Wechselwirkungen zu untersuchen. Sie wird üblicherweise für die Untersuchung der Bindungs-Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen verwendet. Bei jeder Reaktion kommt es zu einer Änderung der Enthalpie (ΔH). Dies kann durch Abgabe von Wärme an die Umgebung (exotherme Reaktion) oder durch Aufnahme von Wärme aus der Umgebung (endotherme Reaktion) geschehen. Diese Freisetzung oder Absorption der Wärme kann mittels ITC direkt gemessen werden. Die Methode bietet den Vorteil, dass keine Modifikationen mittels Fluoreszenzmarkern oder Immobilisierung auf einem Chip nötig ist, sondern das Protein in seinem nativen Zustand untersucht werden kann. Die Abschätzung der Stärke einer Interaktion von Ligand und Protein wird durch die Kenntnis der Bindungskonstanten (K) ermöglicht, welche mittels ITC ebenfalls direkt bestimmt werden kann. Des Weiteren liefert die Methode Aussagen zur Stöchiometrie der Bindung zwischen Enzym und Inhibitor. Neben der Enthalpie können Informationen über die Entropie (ΔS) und die Wärmekapazität abgeleitet werden. Das Gerät zur Messung der Isothermen Titrationskalorimetrie besteht aus einer Probe und einer Referenzzelle zwischen denen eine sehr kleine und genau messbare Temperaturdifferenz besteht. Über eine Spritze wird schrittweise eine definierte Menge an Ligand zum Protein hinzu gegeben (Abbildung 13A). Die

Referenzzelle dient als Referenzpunkt für die Temperaturänderung die in der Probenzelle bei Zugabe des Liganden erfolgt. Diese Temperaturänderung wird durch eine elektrische Heizleistung wieder ausgeglichen, sodass in der Probenzelle eine konstante Temperatur vorherrscht. Diese Heizleistung die aufgewendet werden muss lässt sich aufzeichnen und die freigesetzte Wärmemenge kann durch Integration erhalten werden und gegen das steigende Molare Verhältnis von Enzym und Ligand aufgetragen werden (Abbildung 13B)⁵⁰.

Die ITC Messungen wurden mit einem VP-ITC-Kalorimeter, ausgestattet mit einer 1,45 ml Probenzelle, durchgeführt. Die Messung wurde jeweils einmal bei 3 unterschiedlichen Umgebungstemperaturen durchgeführt (15 °C, 25 °C, 35 °C). Eine Referenzmessung ohne Protein wurde für jeden Liganden bei jeder Temperatur durchgeführt. Der verwendete Assay Puffer setzte sich aus 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH8 (HCl) zusammen, welcher mit 3 % DMSO versetzt wurde. Eine Ausnahme hierfür bildete Bestatin, welches ohne Zusatz von DMSO

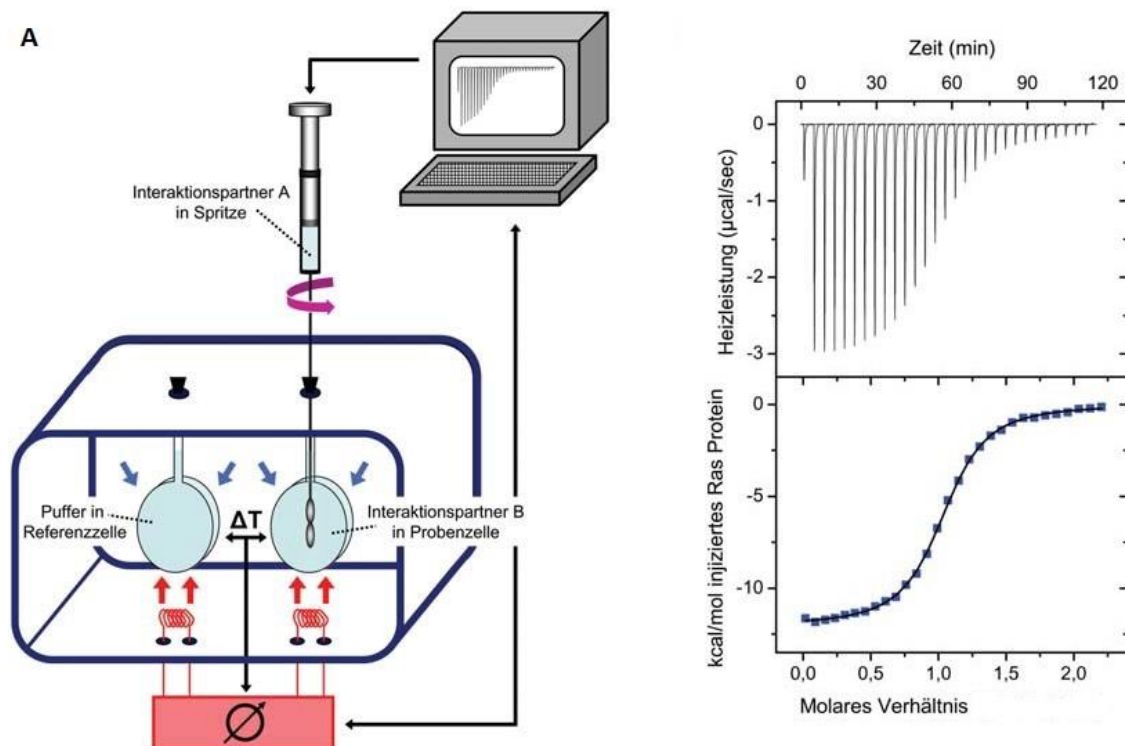


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer ITC Messung. A: ITC Anlage mit Probenzelle, Referenzzelle, Spritze und Wärmefluss. B: Integration der freigesetzten Wärmemenge und Auftragung gegen das molare Verhältnis Protein zu Ligand⁵⁰.

vermessen wurde. In jedem Fall wurde eine erste Injektion von 5 μL in 10 sek. gefolgt von 23 Injektionen mit 12 μL für 24 sek., getrennt durch 3 min. Pause um eine vollständige Equilibrierung sicherzustellen, durchgeführt. Die begrenzte Löslichkeit von ARM1 erfordert

eine andere Einstellung. Hierfür wurde der Inhibitor in der Probezelle vorgelegt und das Protein mittels der Spritze hinzutitriert (reverse Titration). Die jeweiligen Protein- und Inhibitorkonzentration, die für die einzelnen Messungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendete Proteinkonzentration und Inhibitor Menge zur Durchführung der Isothermen Titrationskalorimetrie.

<i>Inhibitor</i>	<i>Inhibitor Konzentration. [μM]</i>	<i>Protein Konzentration. [μM]</i>
<i>ARM1</i>	7	100
<i>Bestatin</i>	1500	100
<i>Captopril</i>	1500	100
<i>RB202</i>	750	50
<i>SC57461A</i>	1500	100

4. Ergebnisse und Diskussion

4.2 Klonierung

4.2.1 PCR

Die proteincodierende cDNA Sequenz der humanen Leukotrien A₄-Hydrolase wurde ausgehend vom Donorplasmid KS73 pN10 LTA₄H (zur Verfügung gestellt von K. Stoffers, AK Steinhilber) mittels PCR amplifiziert. Bei der Agarosegelelektrophorese nach der PCR ist eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von 1858 bp zu erkennen (Abbildung 14).

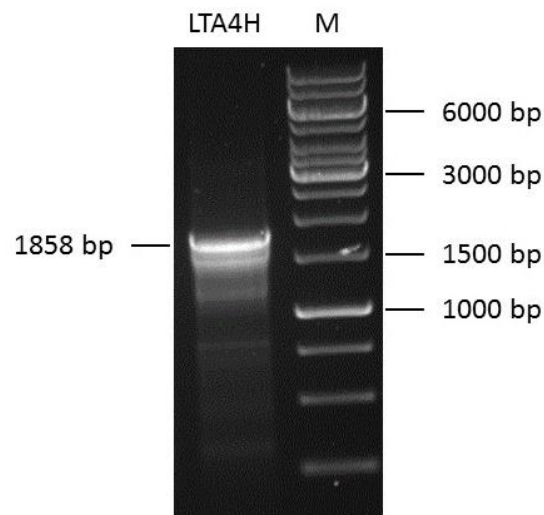


Abbildung 14: PCR der humanen Leukotrien A₄ Hydrolase. Auf der erwarteten Höhe von 1858 bp ist eine deutliche Bande des PCR Amplifikats zu erkennen. M: 1 kb DNA Marker als Größenreferenz.

4.2.2 Restriktionsverdau

Das amplifizierte PCR Produkt wurde mittels Gelelektion aus dem Agarosegel isoliert und anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI verdaut. Der Leervektor wurde ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen verdaut. Zur Analyse wurden die verdauten Proben auf ein analytisches Ethidiumbromidagarosegel aufgetragen. Es sind sowohl beim geschnittenen Vektor (5247 bp), als auch beim geschnittenen Insert (1842 bp) Banden auf der

erwarteten Höhe zu sehen (Abbildung 15). Somit konnte gezeigt werden, dass der Verdau des Vektors pET24 a(+) sowie der amplifizierten hLTA₄H erfolgreich durchgeführt wurde.

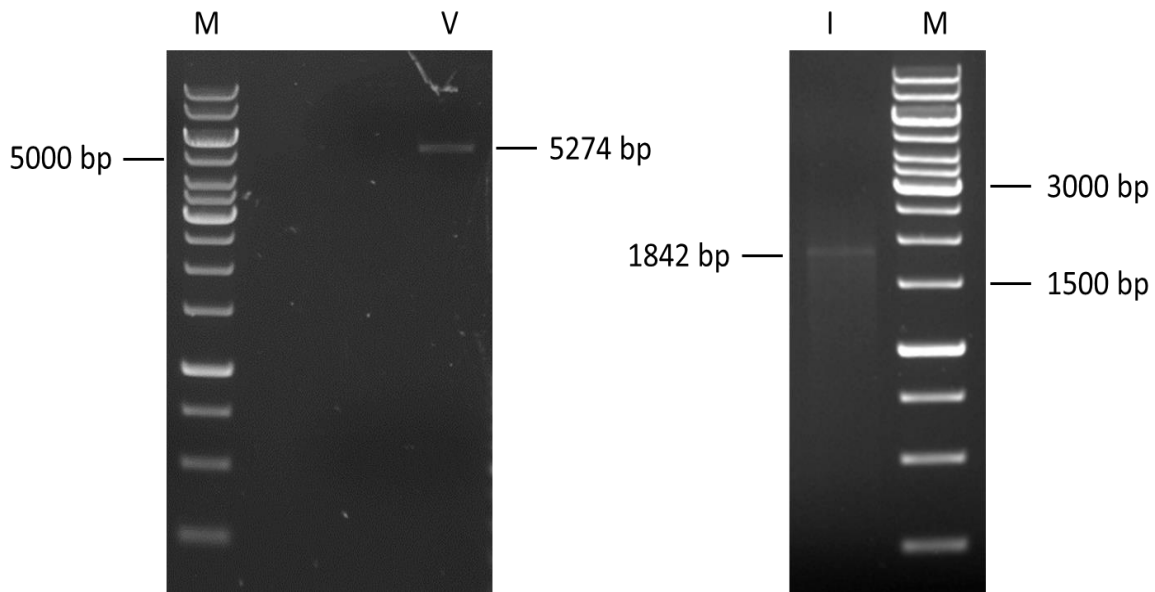


Abbildung 15: Agarosegel des Restriktionsverdaus mit BamHI und XhoI. M: 1 kb DNA Marker als Größenreferenz, V: Verdauter Vektor pET24 a(+), I: Verdautes Insert hLTA₄H.

4.2.3 Verifizierung der Klone

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Ansätze über ein PCR Cleanup Kit gereinigt und wie im Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben miteinander ligiert. Nach der Ligation wurde das Fusionskonstrukt hLTA₄H pET24 a(+) in kompetente *E.coli* DH5 α Zellen transformiert (3.3.1.4). Nachdem die Klone erfolgreich vermehrt wurden, wurde die Anwesenheit des Expressionsvectors in einem ersten Schritt mittels eines Testverdaus mit EcoRI verifiziert. In Abbildung 16 ist der Kontrollverdau von 4 unterschiedlichen Klonen (A – E) dargestellt. Wie man anhand der Bandenhöhe erkennen kann, zeigt Klon A eine Bande auf der Höhe des Fusionskonstrukts (7108 bp), wohingegen die anderen drei Klone lediglich eine Bande auf der Höhe des geschnittenen Vektors (5274 bp) zeigen. Klon A wurde zur Sequenzierung durch die Firma *SeqLab* abgegeben. Die Sequenzierung erfolgte mittels den Standard T7 Vorwärts- sowie T7 Rückwärtsprimern der Firma. Die Ergebnisse bestätigten die Korrektheit des Klons (Ergebnisse des Vorwärtsprimers siehe Abbildung A 1 - Abbildung A 5).

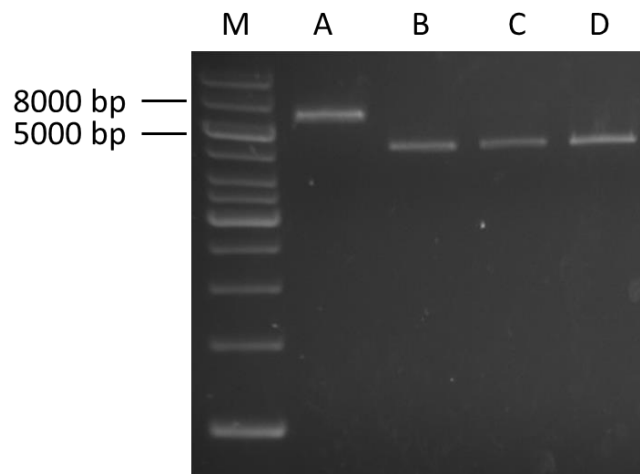


Abbildung 16: Agarosegel des Kontrollverdaus mit *EcoRI*. M: 1 kb DNA Marker als Größenreferenz, A - E: unterschiedliche Klone des Fusionsprodukts hLTA₄H pET24 a(+) in *E.coli* DH5 α .

4.3 Expression und Aufreinigung

4.3.1 Expression

Die hLTA₄H wurde in *E.coli* heterolog exprimiert. Nach der Induktion der Expression (3.3.2.1) und der Zellyse (3.3.2.2) wurde das Lysat zentrifugiert, um es von den restlichen Zellbestandteilen abzutrennen.

4.3.2 Aufreinigung und Verifizierung des Proteins

Der Überstand wurde auf eine Nickel-Affinitätssäule (His-Trap) aufgetragen, wobei es zu einer Chelatbildung der Ni²⁺ mit dem Hexa-Histidin-Tag am Protein kommt. Die Elution des Proteins erfolgte mittels Imidazol. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS Page analysiert. Es wurde ebenfalls eine Probe des Zellpellets sowie des Überstands vor der Affinitätschromatographie analysiert (Abbildung 17). Die hLTA₄H hat ein Molekulargewicht von 69,3 kDa (siehe Anhang iii, physikochemische Eigenschaften der hLTA₄H). Auf dieser Höhe ist im beispielhaft gezeigten Coomassie-gefärbten SDS-Gel deutlich zu sehen, dass im Pellet (P) nach der Zentrifugation, neben anderen Zellbestandteilen, immer noch ein großer Rest an hLTA₄H zu finden war. Aus diesem Grund wurde die Zellyse in den weiteren Aufreinigungen nicht mehr mit einem Ultraschall-Stab durch Sonifizierung, sondern mit einem Zelldisruptor durchgeführt. Es sind ebenfalls deutliche Proteinbanden (Abbildung 17) auf der erwarteten

Höhe in den Fraktionen 15 – 17 zu erkennen. Diese wurden vereinigt und auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufkonzentriert, um im nächsten Schritt eine weitere Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie durchzuführen.

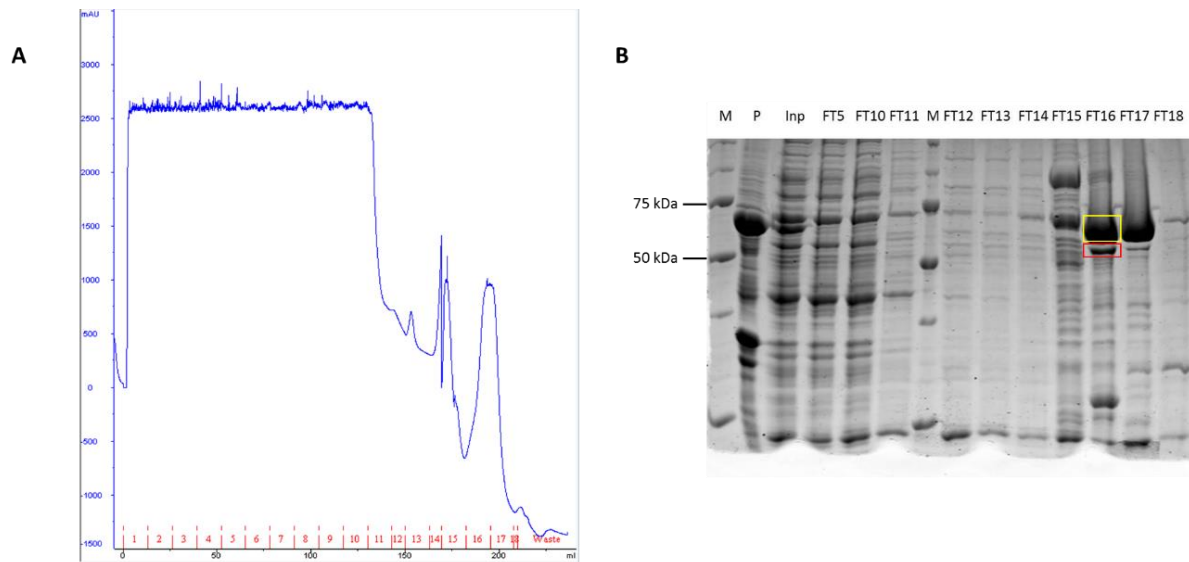


Abbildung 17: Beispielhafte Nickel-Affinitätschromatographie der hLTA₄H. A: Chromatogramm mit Absorption bei 280 nm. B: Coomassie gefärbte SDS Page des Pellets und des Überstands sowie ausgewählten Fraktionen der His-Trap. M: Precision AllBlue Marker. Die rotumrandete Bande entsprach der Probe 1 bei der massenspektrometrischen Analyse, die gelbumrandete Bande der Probe 2.

Wie in Abbildung 18 unter A zu sehen ist, ergab die Größenausschlusschromatographie einen einzelnen Peak, welcher bei 280 nm detektiert werden konnte. Das unter B dargestellte Coomassie gefärbte Gel zeigt, dass die Reinheit des Proteins nach der Gelfiltration im Vergleich zur Nickel-Affinitätschromatographie deutlich zugenommen hat. Durch den Westernblot mit spezifischem LTA₄H-Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den untersuchten Fraktionen um das Protein der humanen Leukotrien A₄-Hydrolase handelt. In FT 15 (Abbildung 17) ist deutlich zu sehen, dass auf der erwarteten Höhe der LTA₄H eine Doppel-Bande zu erkennen ist. Diese ist nach der Größenausschlusschromatographie nicht mehr erkennbar. Aus diesem Grund wurden jeweils eine Probe der beiden Banden massenspektrometrisch analysiert (3.3.3.4). Die untere, rotumrandete Bande, entsprach dabei der Probe 1 und die obere, gelbumrandete Bande, der Probe 2 (Abbildung 17) Die im AK Karas durchgeführte massenspektrometrische Analyse zeigte, dass es sich bei der unteren Bande (Probe 1) um das Chaperone Protein DnaK (*E. coli*) handelt und bei der oberen Bande (Probe 2) um die humane Leukotrien A₄-Hydrolase. Die Ergebnisse sind im Anhang iv dargestellt. Die Ausbeute dieser Aufreinigung (Pellet aus 1 L Kultur) lag bei etwa 4 mg. Nach

Umstellung der Lysemethode konnte die Ausbeute deutlich auf etwa 18 mg Protein pro Liter Kultur erhöht werden.

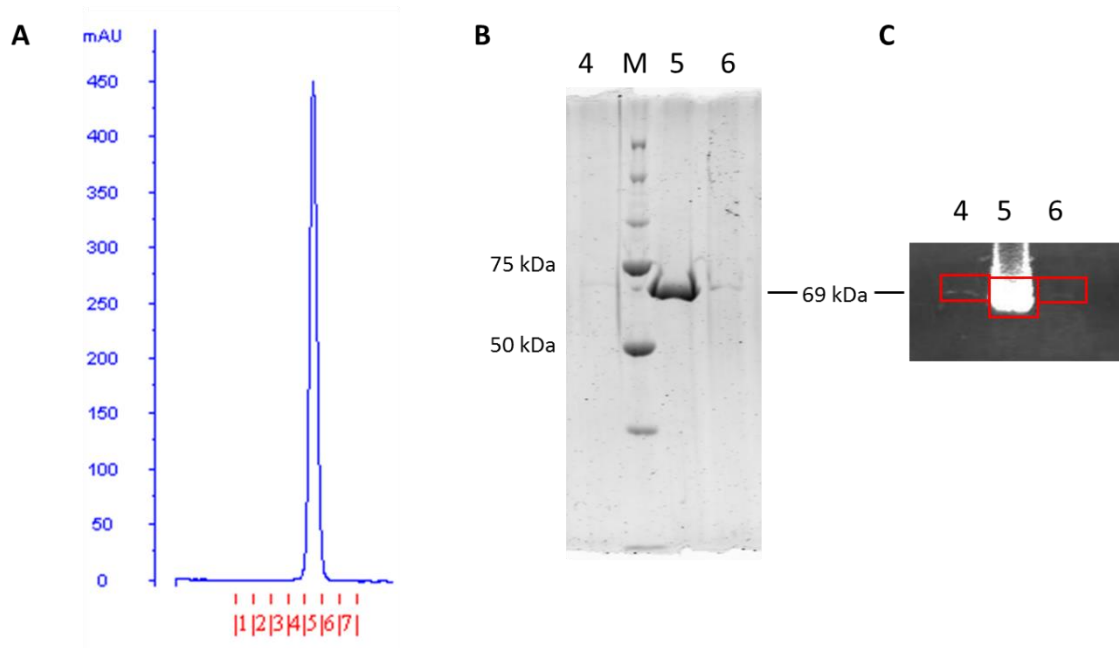


Abbildung 18: Beispielhafte Größenausschlusschromatographie der hLTA₄H. A: Chromatogramm bei 280 nm, B: Coomassie gefärbte SDS-Page der Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, C: Western Blot mit LTA₄H spezifischem Antikörper für die Elutionsfraktionen 4 – 6.

4.4 Fluoreszenzbasierter Assay für die humane Leukotrien A₄ Hydrolase

4.4.1 Überprüfung des postulierten Mechanismus der Substratspaltung

Wie zuvor beschrieben, spaltet die hLTA₄H bevorzugt Tripeptide mit einem L-Arginin am N-Terminus²⁵. Des Weiteren wurden bereits Assay-Systeme für die hLTA₄H publiziert, bei denen p-Nitroanilide mit Arginin am NH₂-Rest zum Einsatz kommen³¹. Aus diesem Grund wählten wir das nicht fluoreszierende Substrat L-Arginin-7-amido-4-methylcoumarin. Das Arginin kann durch die Peptidase-Aktivität der hLTA₄H abgespalten werden und es resultiert das fluoreszierende 7-Amino-4-methylcoumarin. Durch Docking in MOE (durchgeführt von Lena Kalinowsky) konnte angenommen werden, dass das Substrat wie erwartet in der Peptidase-Bindetasche der hLTA₄H zu liegen kommt, wobei ein Teil in die Hydrolase-Bindetasche

hineinragt. Somit ist es möglich, Wirkstoffe der Peptidase-Bindetasche, aber auch Wirkstoffe der Hydrolase-Bindetasche zu detektieren.

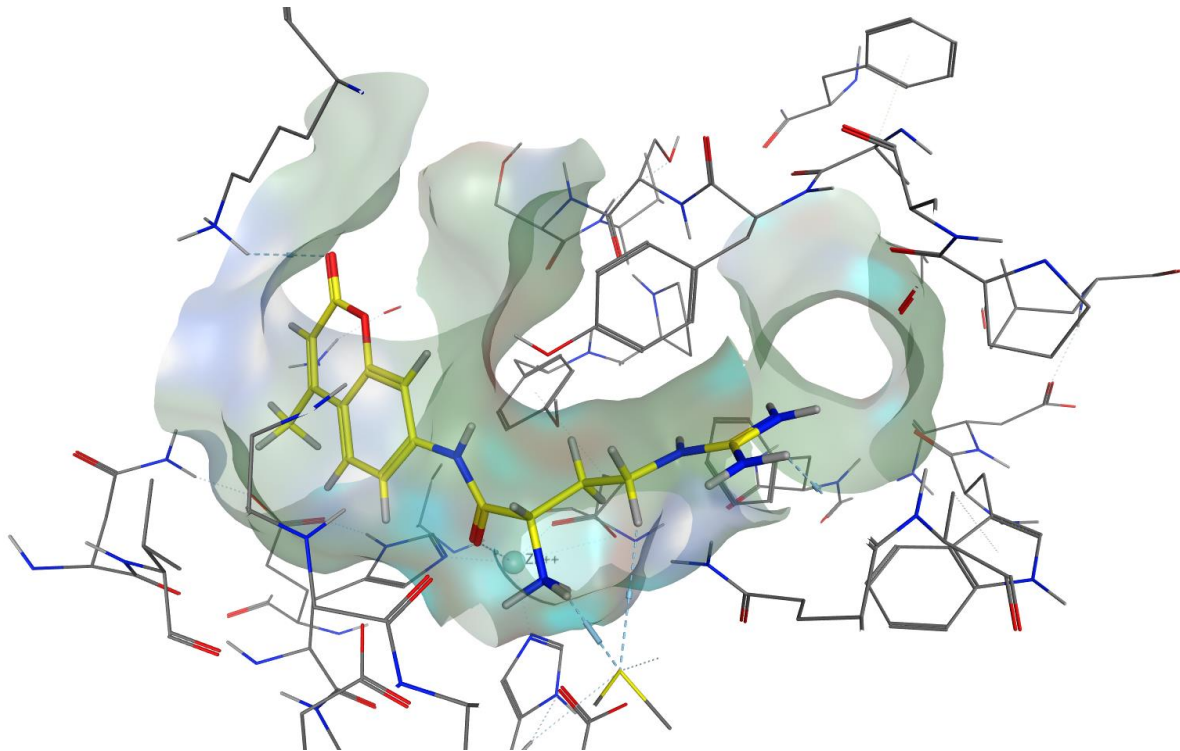


Abbildung 19: Docking Pose des Substrats L-Arginin-7-amido-4-methylcoumarin in die hLTA₄H apo Struktur (PDB 5FWQ). Links vom Zink ist die Peptidase-Bindetasche, rechts die Hydrolase-Bindetasche.

4.4.2 Bestimmung geeigneter Assay Parameter

Zur Etablierung eines fluoreszenzbasierten Aktivitätsassays für die hLTA₄H wurde in einem ersten Schritt nach den optimalen Puffer-Bedingungen für den Assay gesucht. In Anlehnung an andere Publikationen wurde als Grundpuffer ein 50 mM Tris-Puffer (HCl) gewählt. Mittels Differential Scanning Fluorimetrie wurden unterschiedliche pH-Werte sowie der Einfluss von NaCl getestet. Wie von Wetterholm et al.²⁶ zuvor beschrieben, soll das Protein in Abhängigkeit von NaCl eine höhere Aktivität aufweisen.

Tabelle 3: Übersicht der DSF Ergebnisse mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen und unterschiedlichen pH Werten.

	pH 7	pH 7,5	pH 8	pH 8,5	pH 9
50 mM Tris (HCl)	57,7	57,5	57,9	57,5	57,5
50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl	56,7	57,1	57,3	57,1	57,1
50 mM Tris (HCl), 500 mM NaCl	55,5	55,3	55,9	55,7	55,5

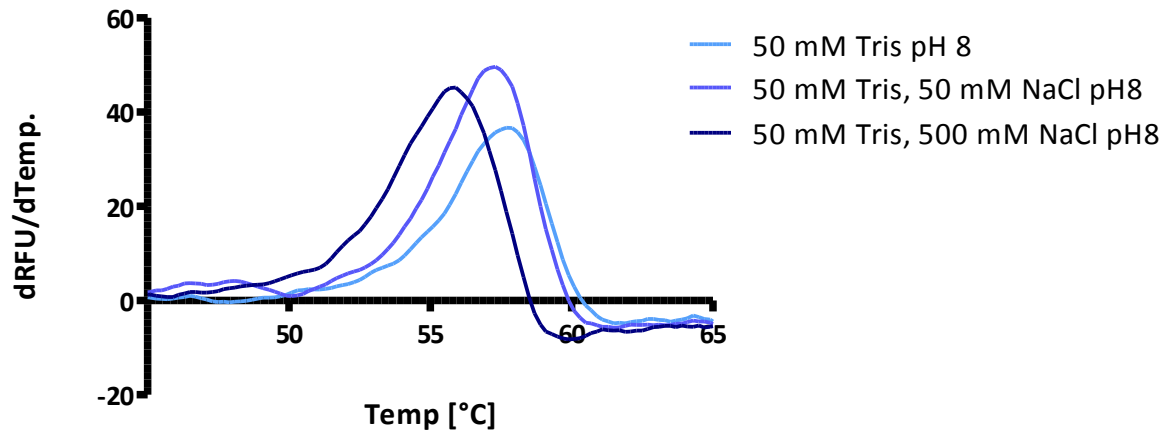


Abbildung 20: Beispielhafter Graph der DSF Messung in 50 mM Tris-Puffer (HCl) bei pH 8 und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich wird, zeigt das Protein in 50 mM Tris-Puffer (HCl) ohne NaCl bei pH 8 die größte Stabilität. Da die Aktivität der hLTA₄H mit NaCl jedoch höher ist²⁶, wurde als Assaypuffer ein 50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl Puffer bei pH 8 gewählt. Dies waren die Bedingungen mit NaCl, unter denen das Protein die größte Stabilität aufwies (Tabelle 3). In Abbildung 20 sind beispielhaft die drei unterschiedlichen Pufferbedingungen bei pH 8 dargestellt. Auch hierbei wird deutlich, dass das Protein ohne NaCl einen deutlich höheren Schmelzpunkt aufweist und mit 500 mM NaCl den niedrigsten. Die Bedingung 50 mM Tris, 50 mM NaCl zeigt einen etwas geringeren Schmelzpunkt als ohne NaCl.

Zur Bestimmung der geeigneten Proteinmenge wurden unterschiedliche Konzentrationen zusammen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen getestet. Die Auswertung erfolgte über die jeweilige Steigung der Fluoreszenzintensität über die Zeit (Abbildung 21). Des Weiteren wurde die Güte des Assays anhand des Z-Faktors bestimmt. Der Z-Faktor kann nicht größer als 1 sein, was dem bestmöglichen Ergebnis entspricht. Für einen sehr guten Assay sind Werte zwischen 0,5 und 1 notwendig. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, liegt der Z-Faktor bei 0,3 μ M Protein immer zwischen 0,5 und 1. Bei den beiden anderen getesteten Enzymkonzentrationen liegt er in Abhängigkeit der eingesetzten Substratmenge bei etwa 0,5 oder darunter. Aus diesem Grund wurde eine Proteinmenge von 0,3 μ M für die Durchführung der weiteren Assays verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der errechneten Z-Faktoren für die unterschiedlichen Kombinationen an Protein und Substrat.

	0,3 μM Protein	0,15 μM Protein	0,12 μM Protein
0,02 mM Substrat	0,84	0,58	0,55
0,04 mM Substrat	0,60	0,40	0,42
0,4 mM Substrat	0,79	0,74	0,42
2 mM Substrat	0,80	0,53	0,46

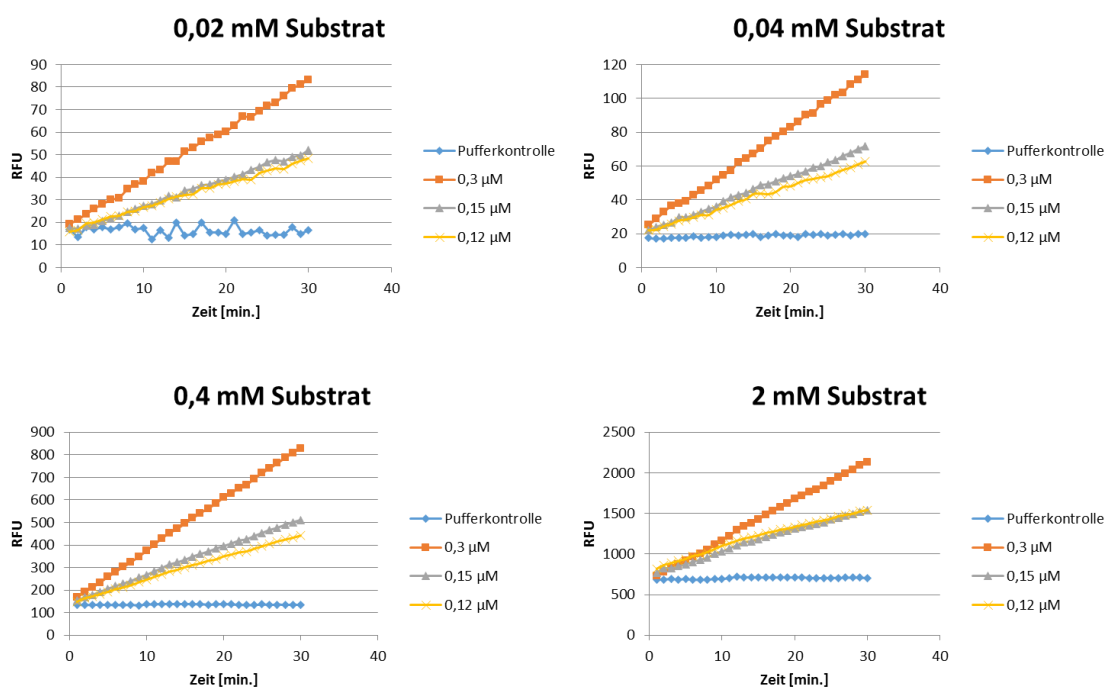


Abbildung 21: Auswertung des fluoreszenzbasierten Assays mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Aufgetragen ist die Zunahme der Fluoreszenz gegen die Zeit.

In einem nächsten Schritt wurde mit dem ausgewählten Puffer sowie der ausgewählten Proteinkonzentration der K_m -Wert des Substrats bestimmt, um die optimale Substratmenge bestimmen zu können. Der K_m -Wert lag proteinchargenabhängig zwischen 150 μM und 400 μM . Deshalb wurde für den Assay eine Substratkonzentration von 200 μM gewählt. In Abbildung 22 ist beispielhaft eine K_m -Wert-Bestimmung dargestellt.

Die zu testenden Wirkstoffe weisen oftmals eine sehr schlechte Löslichkeit im wässrigen Milieu auf, weshalb die Stocklösung in DMSO verdünnt wird. Des Weiteren soll dem Assay-System Detergens zugegeben werden, um eine mögliche Aggregation der schlecht wasserlöslichen Wirkstoffe zu vermeiden. Es wurde der Einfluss von 1 %, 5 % und 10 % (v/v) DMSO getestet, wobei sich zeigte, dass 1 % DMSO keinen Einfluss auf den Assay hat, jedoch 5

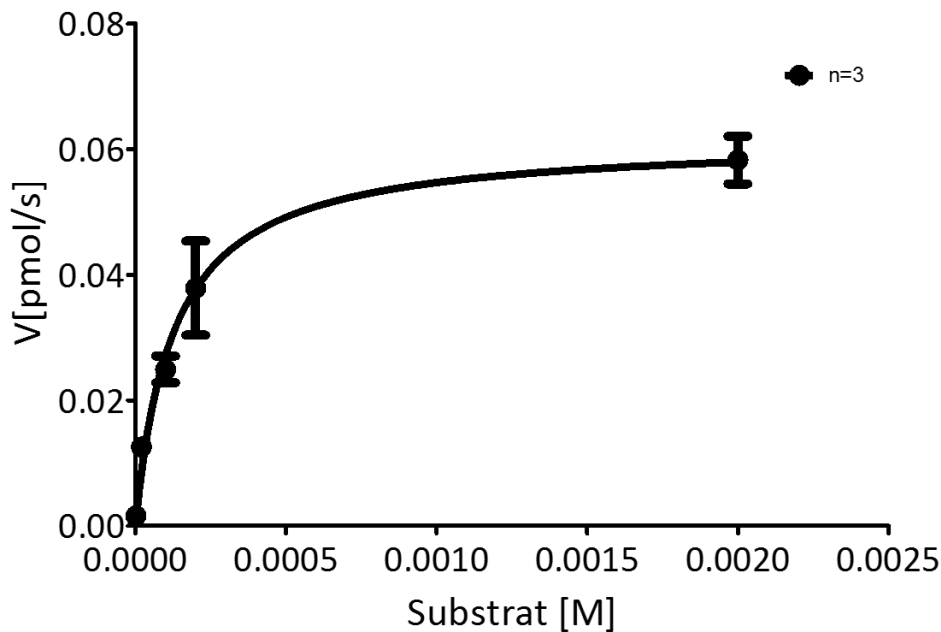


Abbildung 22: Bestimmung des K_m -Werts für das Substrat L-Arginin-7-amido-4-methylcoumarin.

% DMSO schon zu einer geringeren Aktivität des Proteins führte (85 % Restaktivität) und bei 10 % DMSO zeigte das Protein nur noch eine Restaktivität von etwa 70 %. Der Einfluss von den drei untersuchten Detergenzien wurde bei jeweils 0,01 % (w/v) getestet. Dabei zeigte sich, dass bei SDS kaum noch Restaktivität des Proteins vorhanden war (3 %) sowie bei Tween-20 nur noch eine Restaktivität von etwa 60 %. Triton-X 100 beeinflusst die Aktivität in dieser Konzentration nicht.

Im nächsten Schritt wurden die Stabilität des Proteins sowie der Einfluss von Glycerin getestet. Dazu wurde ein Teil des Proteins mit 20 % Glycerin versetzt und der andere Teil nicht. Jeweils ein Teil wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren, der andere bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Stabilität wurde über 3 Wochen geprüft. Dabei zeigte sich, dass das Protein durch die Zugabe von 20 % Glycerin einen Aktivitätsverlust von etwa 10 % aufweist. Ein Unterschied der Stabilität über die drei Wochen konnte nicht festgestellt werden. Es war außerdem kein Unterschied zwischen dem

eingefrorenen und bei 4 °C gelagertem Protein erkennbar. Aus diesem Grund wurde das Protein immer ohne Glycerin bei -80 °C gelagert.

Aufgrund der Ergebnisse ergab sich ein Standard Assay-System mit 0,3 μM Protein in einem Assay Puffer aus 50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl sowie 0,01 % Triton-X 100. Die Gesamtkonzentration von DMSO wurde auf 1 % (v/v) eingestellt und die Substratmenge auf eine Endkonzentration von 200 μM .

Um das Assay-System zu validieren, wurde eine Referenzsubstanz (RB202) (Abbildung 23) getestet. Dazu wurde eine Substanz gewählt, die ähnlich zu einer Substanz aus der Literatur ist⁵¹.

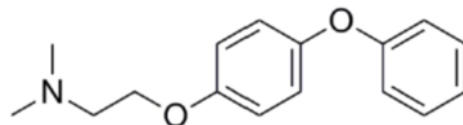


Abbildung 23: Referenzligand RB202.

Die IC_{50} -Werte der vergleichbaren Strukturen in der Literatur liegen zwischen 0,006 μM und 0,03 μM . In dem etablierten Assay-System konnte der Referenzligand RB202 mit einem IC_{50} -Wert von 0,06 μM gemessen werden und liegt somit im Bereich der erwarteten Werte⁵¹.

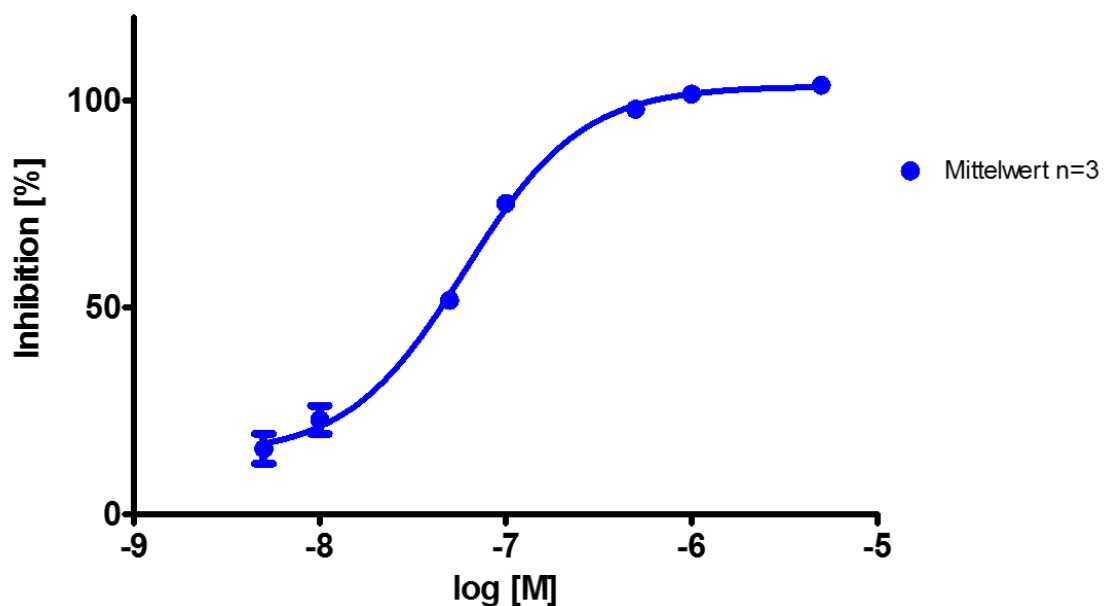
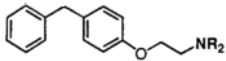











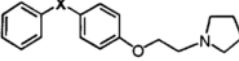
Abbildung 24: IC_{50} Wert Bestimmung des Referenzliganden RB202.



A



compd	-NR ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	
		hLTA ₄ hydrolase	human whole blood
2a		0.026	0.12
3a	-NH ₂	0.009	0.28
3b	-NMe ₂	0.006	0.073
3c	-NEt ₂	0.40 (2)	0.16
3d	-Ni-Pr ₂	0.10 (2)	0.14
3e		0.055 (2)	0.17
3f		0.037	0.12
3g		0.23	1.32
3h		0.075	0.62 (2)
3i		0.19	1.65
3j		0.02 (2)	0.18
3k		0.10	0.19
3l		0.017	0.41
	kelatorphan	0.005	>50
	zileuton	>100	0.85
	A-78773	>3	0.078

B



compd	-X-	IC ₅₀ (μM) ^{a,b}	
		hLTA ₄ hydrolase	human whole blood
1	"bond"	0.2 (2)	0.79
2a	-CH ₂ -	0.026	0.12
4a	-O-	0.03 (2)	0.079
5	-CF ₂ -	0.011	0.17
6	-C(O)-	1.8 (2)	-
7	-CH(OH)-	1.8 (2)	4.6 (2)
8	-CH ₂ CH ₂ -	0.22 (2)	0.22
9	-CH ₂ O-	0.03 (2)	0.31
10	-CH ₂ S-	0.15 (2)	0.31
11	-CH ₂ SO-	7.5 (2)	24.5 (2)
12	-CH ₂ SO ₂ -	4.0 (2)	7.7
13	-SCH ₂ -	0.067	0.19
14	-CH ₂ NH-	0.15 (2)	0.42
15	-NHCH ₂ -	0.027	0.15
16	-C(O)NH-	>25	-
17		1.35 (2)	1.5
18		>25	-

^a Average of at least three determinations except where noted in parentheses. ^b - = not determined.

^a Average of at least three determinations except where noted in parentheses.

Abbildung 25: Übersicht der IC₅₀ Werte der Liganden ähnlich zur Referenzverbindung RB202. A: getestete Modifikationen am Amin. B: getestete Modifikationen am Aryl-Linker. Aus Penning et al.⁵¹.

Die Referenzverbindung konnte mittels einer Kristallstruktur (Jan Kramer) ebenfalls validiert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass die Substanz in der Peptidase-Bindetasche der humanen Leukotrien A₄ Hydrolase liegt (Abbildung 26).

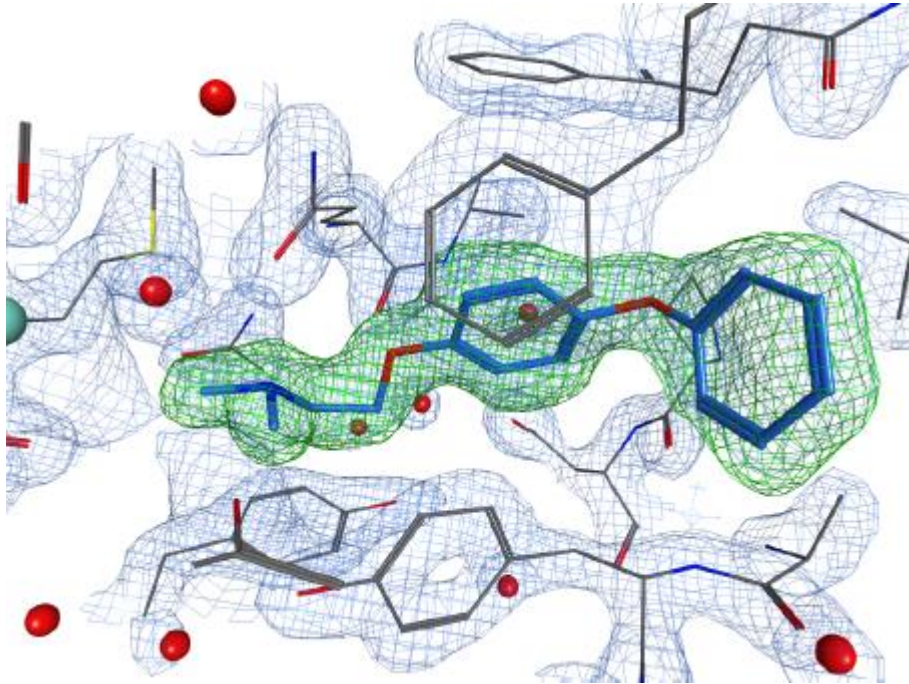


Abbildung 26: Kristallstruktur der Referenzverbindung RB202 in der humanen Leukotrien A₄-Hydrolase. PDB Code: 5AEN.

4.4.3 Entwicklung neuer Inhibitoren der humanen Leukotrien A₄-Hydrolase

Zur Identifizierung neuer Inhibitoren der humanen Leukotrien A₄-Hydrolase, wurde ein Neural Gas-Ansatz (PENG) verwendet. Bei diesem Ansatz handelt es sich um einen unüberwachten, kompetitiv lernenden Algorithmus welcher in der Lage ist, vektorielle Daten zu klassifizieren. Zur Extraktion der relevanten Funktionen eines Inhibitors wurde der bereits bekannte Neural Gas Ansatz mit selbst organisierenden Karten (Self-organising maps (SOM)) kombiniert (etabliert von Daniel Moser).

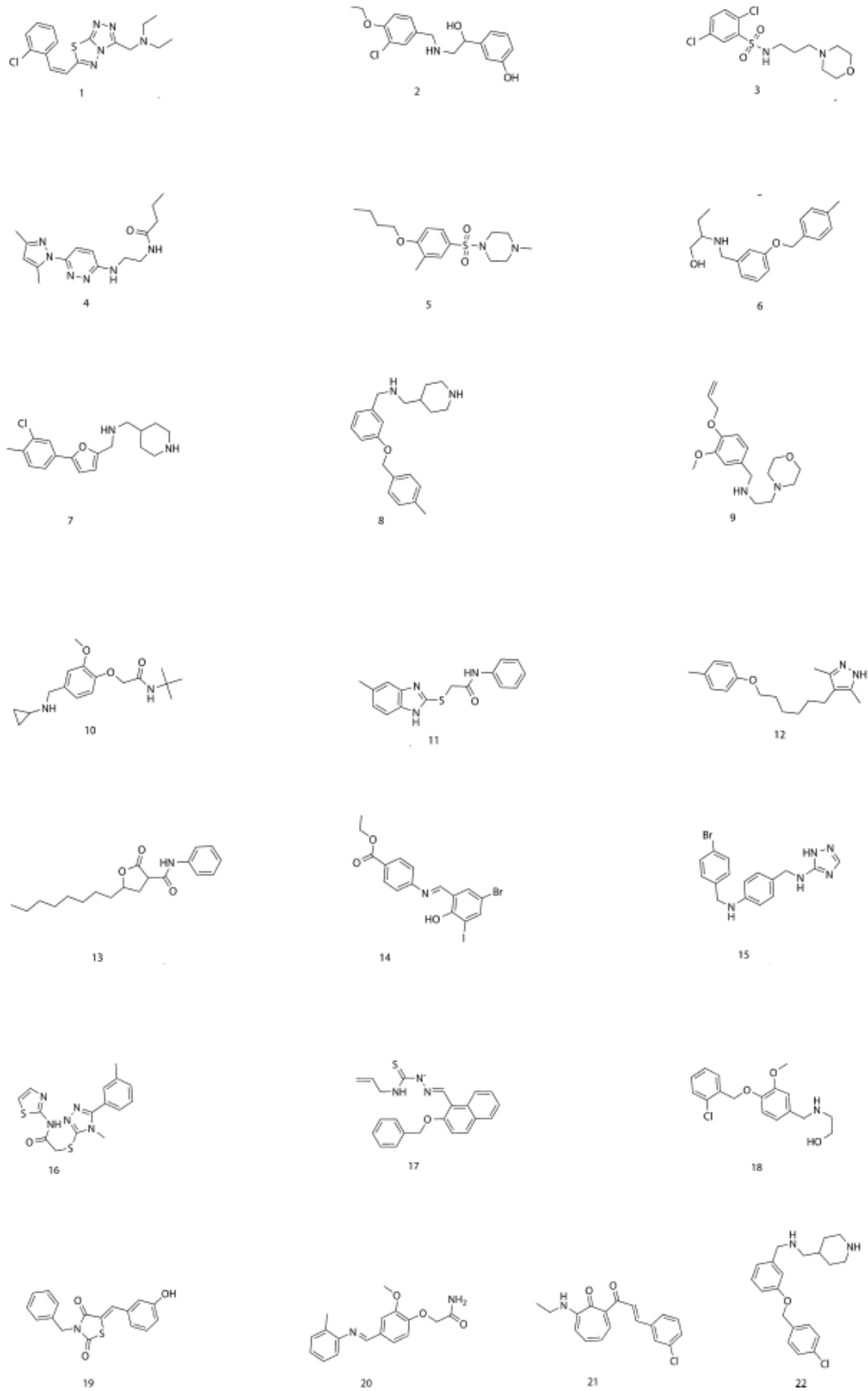


Abbildung 27: Strukturformeln der ausgewählten Wirkstoffe 1 – 22.

Mit Hilfe dieses Algorithmus wurde ein neues Pharmakophor-Modell erstellt. Anhand dieses Modells wurde die Specs-Datenbank (Zoetermeer, Niederlande) auf passende Moleküle hin untersucht. Die erhaltenen 3136 Wirkstoffe wurden anhand der Ähnlichkeit zum Pharmakophormodell weiter gefiltert. Aus den erhaltenen Clustern wurden 22 Strukturen (Abbildung 27) manuell ausgewählt. Diese Strukturen wurden *in vitro* im etablierten fluoreszenzbasierten Assay-System getestet. Dazu wurden alle Verbindungen in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt.

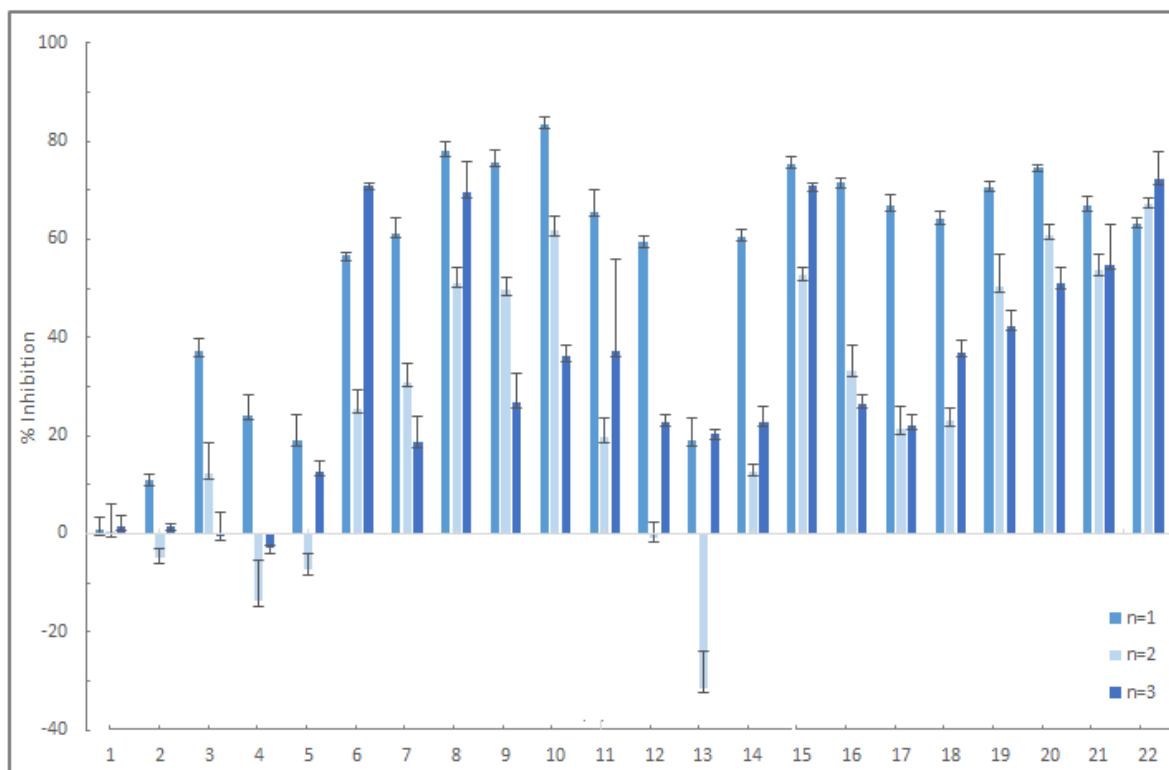


Abbildung 28: Testung der Wirkstoffe 1 – 22 im LTA4H-Assay. Gezeigt ist die Inhibition (%) der drei unterschiedlichen Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen der drei Messpunkte.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, zeigten die drei Messungen an unterschiedlichen Tagen bei einigen Wirkstoffe deutliche Unterschiede. Bei den Wirkstoffe 7, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20 sieht man eine Abnahme der % Inhibition über die Zeit. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die jeweiligen Wirkstoffe über die Zeit langsam zersetzen. Die Verbindung 6 zeigte bei weiteren Untersuchungen eine leichte Eigenfluoreszenz im Bereich der Detektionswellenlänge des Assays auf. Aus diesem Grund wurde diese Verbindung nicht weiter verfolgt. Die Wirkstoffe 1 -5 sowie 12 und 13 zeigten bei den getesteten 10 μM eine %

Inhibition unter 50% und wurden aus diesem Grund ebenfalls verworfen. Bei den verbleibenden Wirkstoffe 8, 15, 21 und 22 wurde versucht, die mittlere inhibitorische Konzentration zu bestimmen. Bei den Wirkstoffe 15 und 21 war keine Detektion des IC_{50} -Wertes möglich (Abbildung 29).

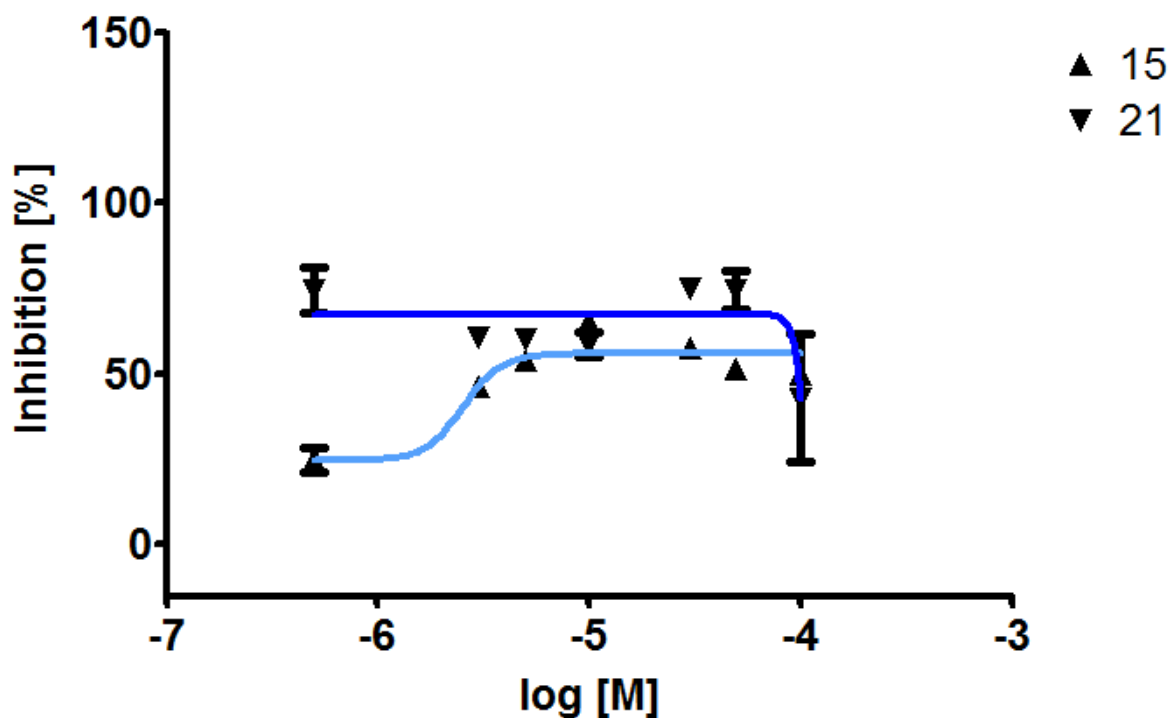


Abbildung 29: IC_{50} -Kurve der Verbindungen 15 und 21. Dargestellt ist die Inhibition in % aufgetragen gegen den Logarithmus der Konzentration.

Die Verbindungen weisen eine maximale Inhibition von etwa 50 % auf. Auch bei steigenden Konzentrationen kann keine Abhängigkeit der Inhibition von der Konzentration beobachtet werden. Die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration der Verbindungen 8 und 22 ist in Abbildung 30 gezeigt. Der Temperatur-Shift zwischen Protein ohne Inhibitor und Protein mit der jeweiligen Verbindung wurde außerdem mittels Differential Scanning Fluorimetrie bestimmt. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse beider Untersuchungen dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die IC_{50} Werte und die Verschiebung des Schmelzpunktes in Abhängigkeit der beiden untersuchten Wirkstoffe 8 und 22.

Compound	IC_{50} [μM] \pm SEM [μM]	Temperatur Shift [$^{\circ}C$] \pm SEM [μM]
8	$9 \pm 2,6$	$1,9 \pm 0,7$
22	$4 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,1$

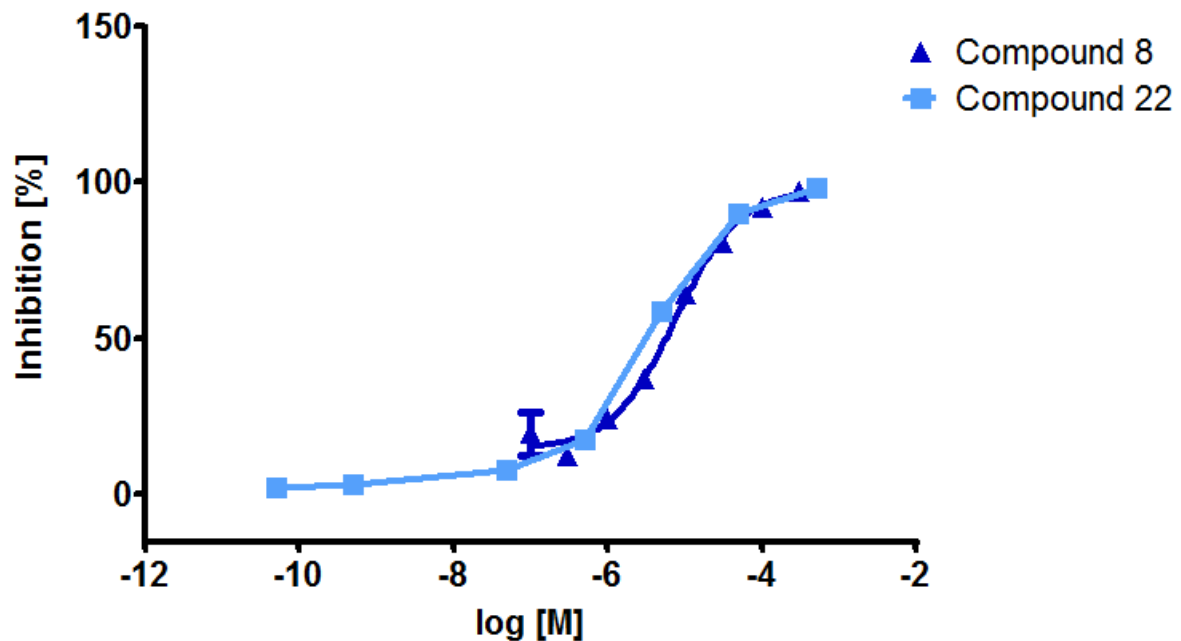


Abbildung 30: IC_{50} Kurve der Verbindungen 8 und 22. Dargestellt ist die Inhibition in % aufgetragen gegen den Logarithmus der Konzentration.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Verbindungen 8 und 22 wurden weitere Derivate getestet (Abbildung 32). Die Testung dieser Verbindungen bei 10 μ M ergab ein ähnliches Bild wie die Testung der zuerst getesteten Wirkstoffe. Die Compound 36 war bei der notwendigen Konzentration von 10 mM in DMSO nicht löslich, sodass sie nicht im vorhandenen Assay-System getestet werden konnte. Die restlichen Verbindungen zeigten, dass die mittlere inhibitorische Konzentration bei allen über 10 μ M lag, weshalb diese nicht bestimmt wurde. Nur der IC_{50} -Wert der Verbindung 38 hätte vielleicht bestimmt werden können, jedoch war

sie in Konzentrationen über 50 μM nicht löslich in dem verwendeten Assay-Puffer, weshalb eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes nicht möglich war.

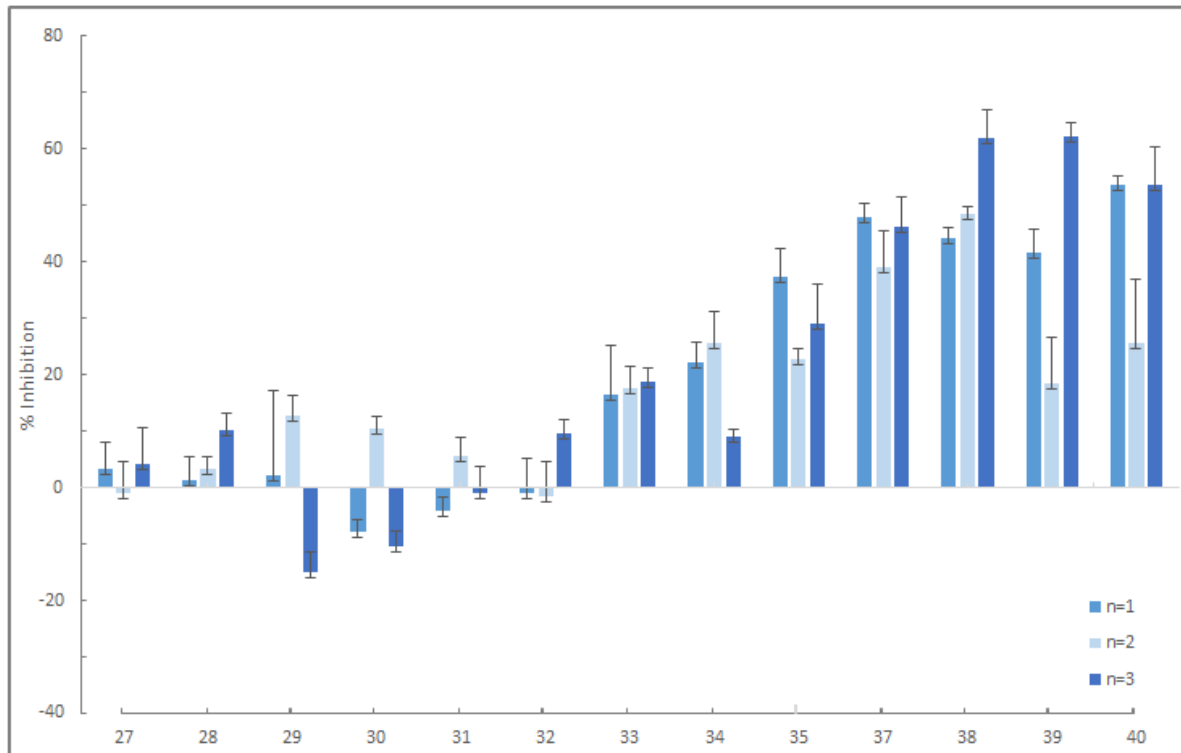


Abbildung 31: Testung der Wirkstoffe 27 – 40 im LTA₄H-Assay. Gezeigt ist die Inhibition (%) der drei unterschiedlichen Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen der drei Messpunkte.

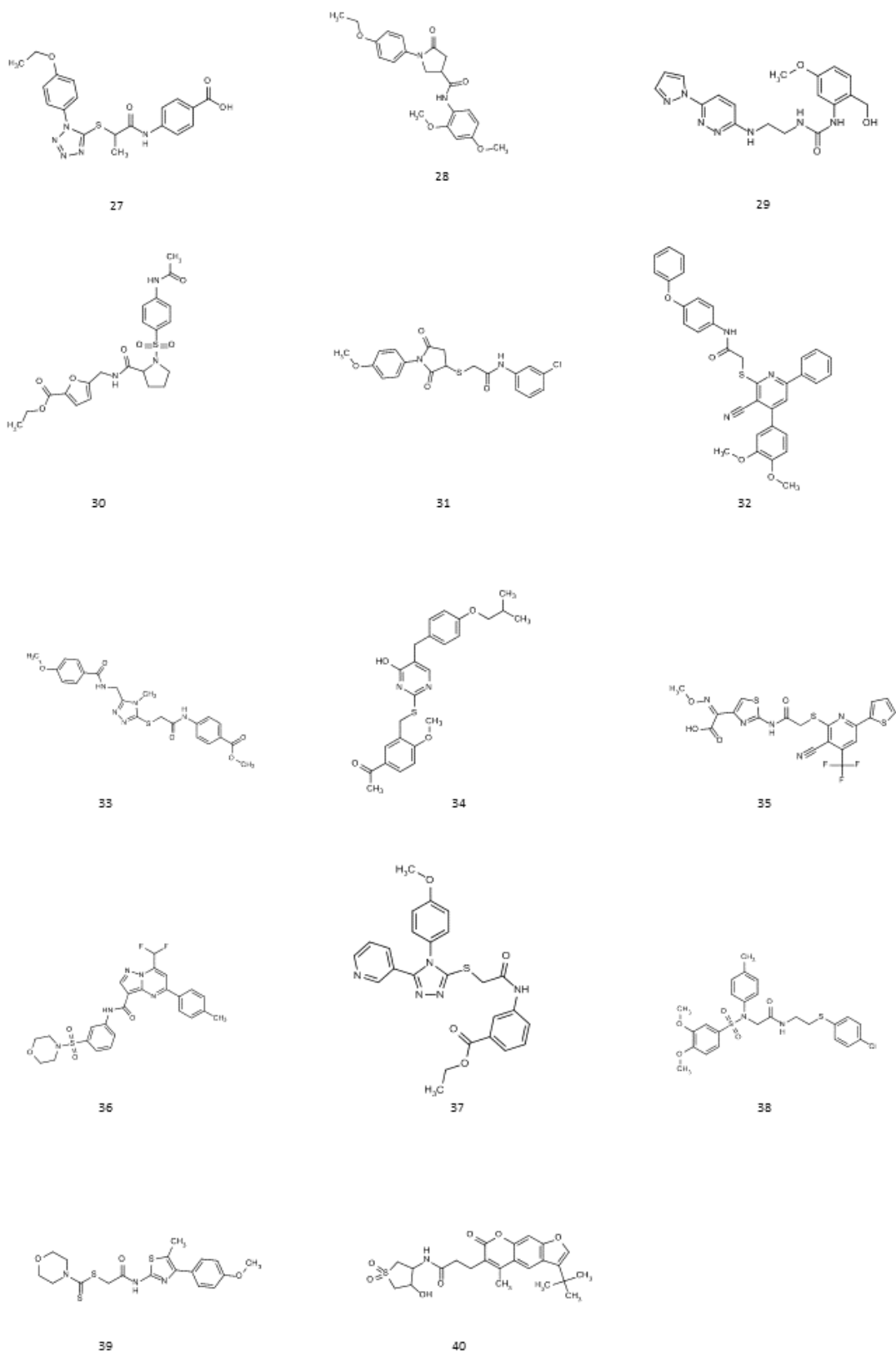


Abbildung 32: Strukturformeln der getesteten Wirkstoffe 27 – 40.

4.5 Charakterisierung bekannter Inhibitoren der LTA₄H

Aufgrund der nicht sehr großen Ausbeute an neuen Wirkstoffe durch den Neural Gas-basierten Ansatz, wurde in einem weiteren Schritt versucht, bereits bekannte Wirkstoffe thermodynamisch besser zu charakterisieren, um Erkenntnisse über die notwendigen Eigenschaften potentieller neue Liganden zu erhalten. Es wurden bereits zahlreiche Studien basierend auf der Kombination von Isothermer titrations calorimetry (ITC) und Röntgenkristallographie durchgeführt, um Protein-Ligand-Wechselwirkungen in Zusammenhang mit der Wirkstoffforschung zu analysieren⁴⁴. Es konnte gezeigt werden, dass die Beziehungen zwischen einer Struktur sowie den enthalpischen und entropischen Beiträge zur Ligandbindung abhängig von dem jeweiligen Protein-Ligand-System ist⁴⁵. Aus diesem Grund wurden aus der Literatur vier bereits bekannte Wirkstoffe der hLTA₄H ausgewählt, welche möglichst weit in der Bindetasche auseinander liegen.

Bei den ausgewählten Liganden handelt es sich um ARM1 (Abbildung 33 C), welches spezifisch an die Hydrolase-Domäne der LTA₄H bindet, Bestatin (Abbildung 33 F), welches eine Interaktion mit dem Zink in der Bindetasche eingeht und sowohl auf der Peptidase-Bindetasche, als auch in der Hydrolase-Bindetasche liegt. Ein weiterer ausgewählter Ligand ist Captopril (Abbildung 33 E), welches ebenfalls eine Interaktion mit dem Zink in der Bindetasche eingeht, aber ausschließlich in der Peptidase-Bindetasche der hLTA₄H liegt. Als dritter Inhibitor wurde SC57461A (Abbildung 33 D) ausgewählt, welches auch eine Interaktion mit dem Zink-Ion eingeht aber ausschließlich in der Hydrolase-Bindetasche liegt. Des Weiteren wurde der Referenzligand RB202 (Abbildung 33 B) ebenfalls weiter charakterisiert, welcher im vorderen Bereich der Hydrolase-Bindetasche liegt. In Abbildung 33 A ist außerdem die Bindetasche des apo-Proteins zu sehen. Auf der linken Seite befindet sich die hydrophile Peptidase-Bindetasche des Proteins und auf der rechten Seite die hydrophobe Hydrolase-Bindetasche.

Wie man deutlich sehen kann, wird durch die gewählten Wirkstoffe die gesamte L-förmige Bindetasche abgedeckt.

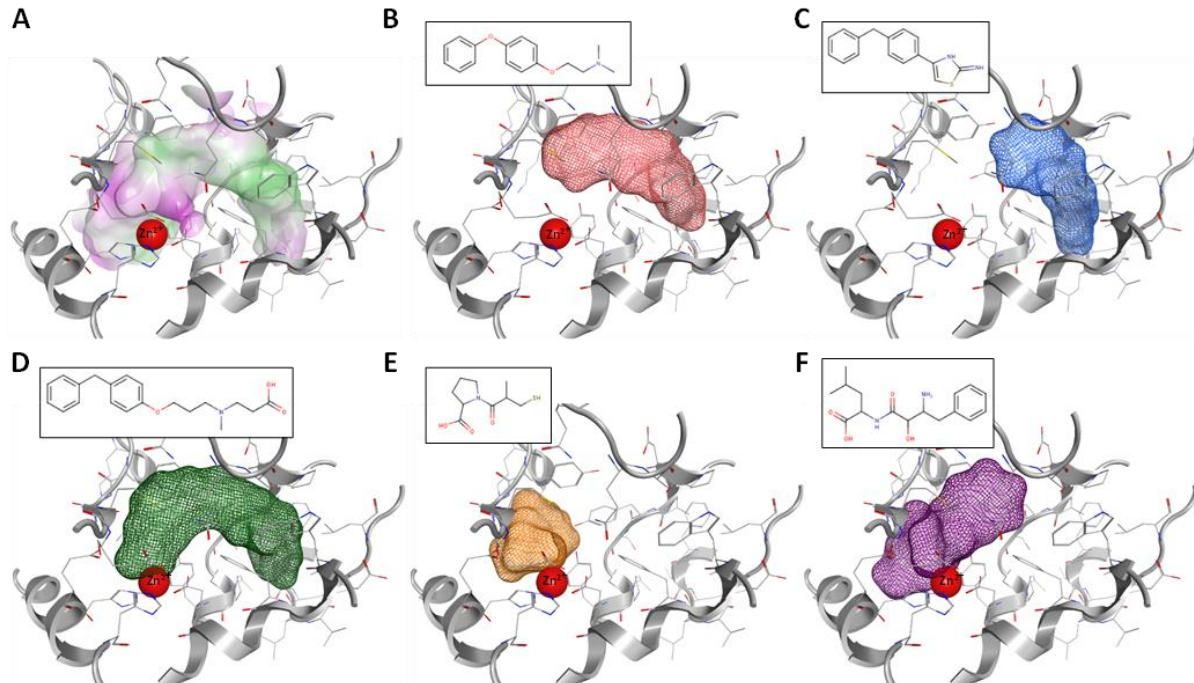


Abbildung 33: Bindetasche der apo LTA₄H Struktur (PDB 5FWQ). Auf der linken Seite ist die Peptidase-Bindetasche des Proteins und auf der rechten Seite die Hydrolase-Bindetasche dargestellt. A: Bindetasche mit Zn²⁺ (rot), hydrophile Bereiche (lila), neutral Bereiche (weiß) und hydrophobe Bereiche (grün). B: Überlagerung der apo LTA₄H Struktur mit dem Ligand RB202 (PDB 5AEN). C: Überlagerung der apo LTA₄H-Struktur mit ARM1 (PDB 4L2L). D: Überlagerung der apo LTA₄H Struktur mit dem Ligand SC57461A (PDB 3U9W). E: Überlagerung der apo LTA₄H Struktur mit dem Ligand Captopril (PDB 4DPR). F: Überlagerung der apo LTA₄H Struktur mit Bestatin (PDB 1HS6).

4.5.1 IC₅₀-Werte der ausgewählten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A

Zuerst wurden die IC₅₀-Werte dieser Wirkstoffe im fluoreszenzbasierten Aktivitätsassay bestimmt, um eine einheitliche Aussage über diese treffen zu können. Dabei zeigte sich, dass Bestatin auch kleinste Mengen an DMSO nicht toleriert, sodass bei den folgenden

Untersuchungen kein DMSO eingesetzt wurde. ARM1 erwies sich als schlecht löslich in wässrigen Systemen.

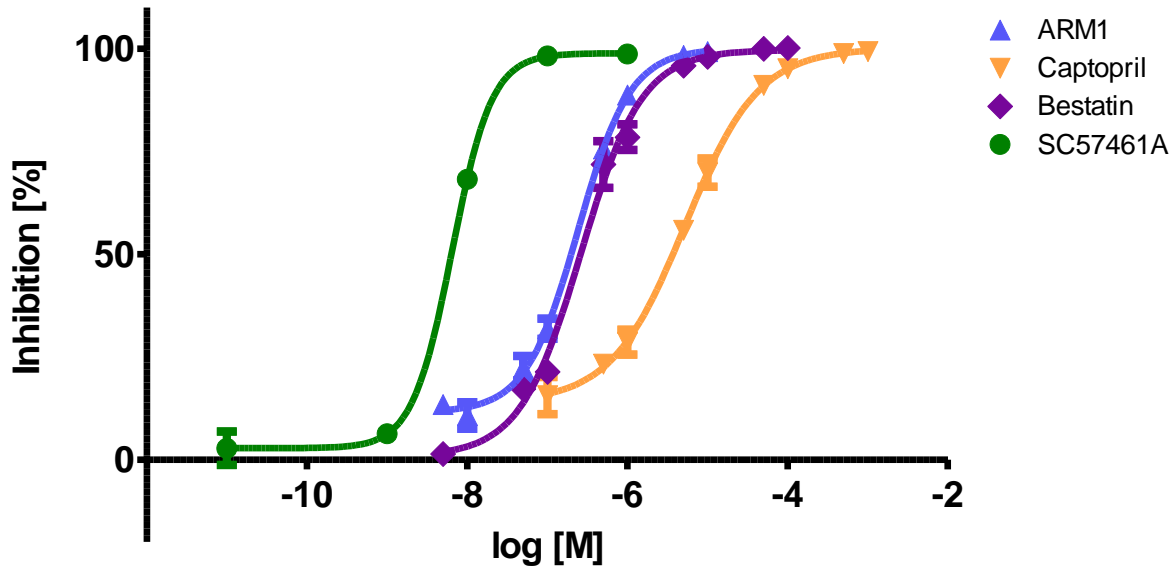


Abbildung 34: IC_{50} Kurven der zu charakterisierenden Liganden ARM1, Bestatin, Captopril, SC57461A. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unterschiedlichen Messungen, sowie der SEM.

In Abbildung 34 sind die IC_{50} -Kurven dargestellt. Dabei zeigt sich deutlich, dass es sich bei SC57461A um den potentesten und bei Captopril um den am wenigsten potenten Inhibitor handelt. Die Liganden ARM1 und Bestatin sind in etwa gleich potent auf der hLTA₄H. In Tabelle 6 sind die gemessenen Werte zusammengefasst.

4.5.2 Bestimmung der K_i -Werte der ausgewählten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A

Die Ermittlung des IC_{50} Wertes hat den Nachteil, dass der Wert von der eingesetzten Substratmenge abhängig ist. Somit ist ein Vergleich der IC_{50} Werte aus anderen Assay-Systemen oder anderen Laboren nicht möglich. Als quantitatives Maß für die Effizienz eines reversiblen Inhibitors dient die Inhibitionskonstante K_i . Diese wurde mittels des fluoreszenzbasierten Assays bestimmt. Pro Inhibitor wurden 6 unterschiedliche Konzentrationen mit jeweils 8 unterschiedlichen Substratkonzentrationen vermessen. Die Substratkonzentrationen lagen bei 400 μ M, 300 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 80 μ M, 60 μ M, 40 μ M, und 20 μ M. Die Ergebnisse wurden mittels GraphPad Prism (5.0) mit dem Modell für nicht-

kompetitive Wirkstoffe gefittet. Dass es sich bei den ausgewählten Wirkstoffe um nicht-kompetitive Wirkstoffe handelt, lässt sich an der Tatsache festmachen, dass die jeweiligen IC_{50} -Werte nicht von der Substratkonzentration abhängen (siehe Anhang v). Einzig bei SC57461A kommt es zu kleinen Abweichungen im IC_{50} -Wert in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Da aber V_{Max} bei steigender Inhibitor Konzentration verringert wird, wohingegen der K_M -Wert gleich bleibt, deutet dies auf einen nicht-kompetitiven Inhibitor hin. Bei einer kompetitiven Hemmung kommt es aufgrund der Inhibitor-Bindung zu einer Konformationsänderung des Proteins, was zu einem Aktivitätsverlust führt. Die Bindung des Inhibitors ist somit unabhängig vom Vorhandensein des Substrats.

Tabelle 6: Charakterisierung von LTA_4H -Wirkstoffe hinsichtlich der IC_{50} und K_i -Werte ermittelt aus dem fluoreszenzbasierten Aktivitätstest.

<i>Compound</i>	IC_{50} [μM]	K_i [μM]
ARM1	0,40 ± 0,01	0,36
Bestatin	0,30 ± 0,01	0,32
Captopril	3,60 ± 0,09	3,70
RB202	0.06 ± 0,01	0,16
SC57461A	0,006 ± 0,003	0,003

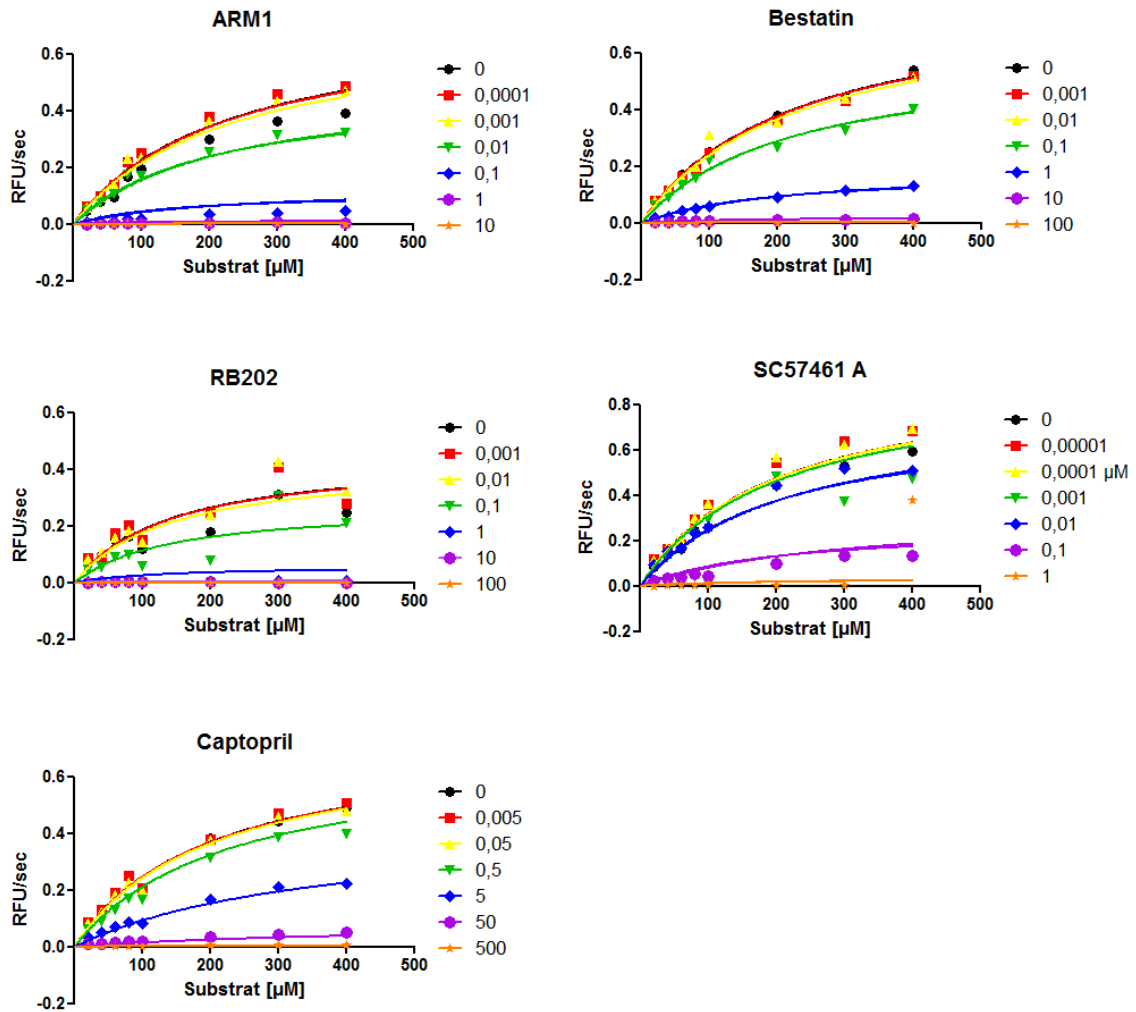


Abbildung 35: Darstellung von nicht-kompetitiven Fits zur Bestimmung der K_i -Werte von ARM1, Bestatin,, Captopril, RB202 und SC57461A. Gezeigt sind die jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen [µM] in Abhängigkeit der jeweiligen Substratkonzentrationen [µM].

In Abbildung 35 sind die Kurven zur Bestimmung der K_i -Werte mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Substratkonzentrationen dargestellt. Die entsprechenden K_i -Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Hemmwirkung eines Inhibitors ist umso größer, je kleiner der K_i -Wert ist. Bei den untersuchten Wirkstoffen hat sich gezeigt, dass der K_i -Wert in allen Fällen ungefähr mit dem gemessenen IC_{50} -Wert übereinstimmt.

4.5.3 Thermische Stabilität des Proteins in Abhängigkeit der untersuchten Liganden

In einem nächsten Schritt wurden die Wirkstoffe hinsichtlich ihres Einflusses auf die Stabilität des Proteins untersucht. Dazu wurde der Schmelzpunkt mit und ohne Inhibitor mittels Differential Scanning Fluorimetrie bestimmt. In Abbildung 36 sind die Schmelzpunktkurven der untersuchten Inhibitoren bei einer eingesetzten Konzentration von 500 μM dargestellt. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 8 aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass Captopril den geringsten Shift der untersuchten Inhibitoren verursacht, wohingegen die anderen 4 untersuchten Inhibitoren ungefähr im gleichen Bereich liegen.

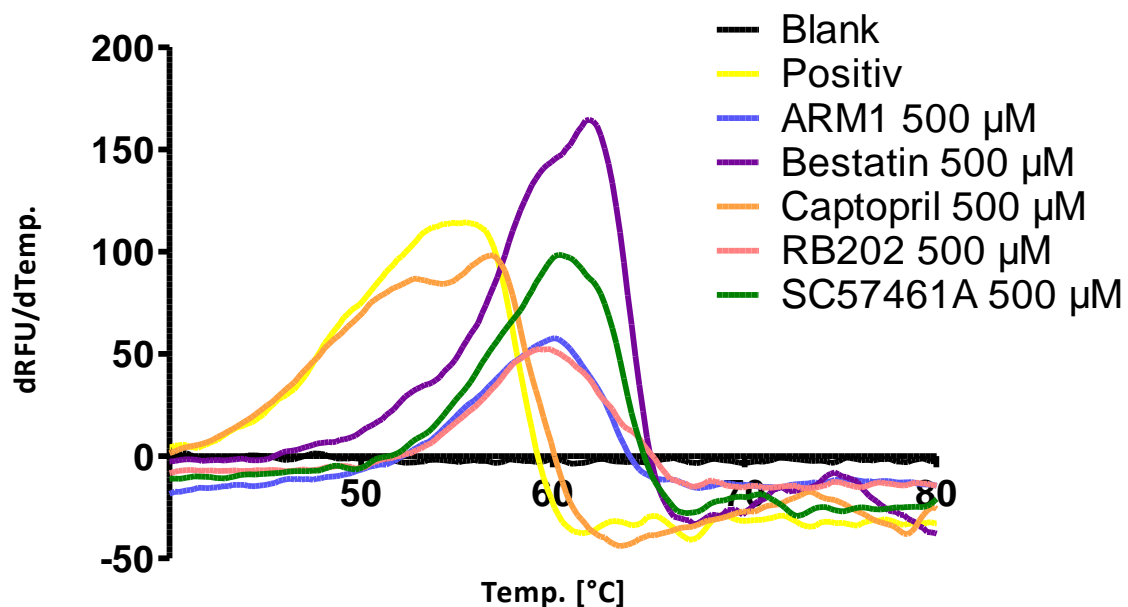


Abbildung 36: Schmelzpunktkurve der untersuchten Inhibitoren ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A bei einer eingesetzten Konzentration von 500 μM .

4.5.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante der untersuchten Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A mittels Differential Scanning Fluorimetrie Assay

In einem weiteren Schritt wurde die Dissoziationskonstante der untersuchten Wirkstoffe mittels DSF bestimmt. Diese ist ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym. Die Bindung des Inhibitors ist umso fester, je kleiner die Dissoziationskonstante ist. Zur Bestimmung wurden unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen eingesetzt und mittels Formel 2 in

GraphPad Prism (5.0) ausgewertete. In Abbildung 37 sind die jeweiligen Schmelzpunkte [°C] gegen die Inhibitorkonzentration [μM] aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass der Kurvenverlauf der Wirkstoffe ARM1, RB202 und SC57461A sehr steil ansteigt und ab einer Inhibitorkonzentration von etwa 100 μM ein Plateau erreichen. Die Kurve von Bestatin ist etwas flacher, erreicht aber am Ende auch ein Plateau. Captopril zeigt selbst bei hohen Konzentrationen fast gar keinen Temperaturunterschied im Schmelzpunkt zum apo-Protein.

Tabelle 7: K_d Wert Bestimmung der Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A mittels DSF.

Angegeben sind die K_d Werte [μM] sowie die Standardabweichung [μM] aus jeweils 3 unterschiedlichen Messungen.

<i>Compound</i>	<i>K_d Shift [μM] \pmSEM [μM]</i>
<i>ARM1</i>	<i>22 \pm 11,2</i>
<i>Bestatin</i>	<i>53 \pm 15,5</i>
<i>Captopril</i>	<i>Nicht bestimmbar</i>
<i>RB202</i>	<i>17 \pm 4,4</i>
<i>SC57461A</i>	<i>27 \pm 6,2</i>

In Tabelle 7 sind die berechneten K_d -Werte der untersuchten Wirkstoffe dargestellt. Captopril konnte aufgrund der niedrigen Schmelztemperatur, selbst bei großen Inhibitorkonzentrationen, nicht bestimmt werden. Die anderen Werte liegen alle etwa im selben Bereich von ungefähr 20 μM wobei sich zeigt, dass die Standardabweichung des Mittelwertes bei allen Wirkstoffen sehr hoch ist. Die Nachweisgrenze des DSF-Assays wird sowohl durch die Affinität der Protein-Ligand Wechselwirkung, als auch durch die eingesetzte Proteinkonzentration bestimmt. Niedrigere Proteinkonzentrationen verbessern die Nachweisgrenze des Systems. Die Durchführung des Assays bei niedrigeren Proteinkonzentrationen war nicht möglich, da die Qualität des Signals nicht mehr ausreichend war für eine zuverlässige Auswertung. Um die Limitierung der Methode zu überprüfen, wurde der Shift der Temperatur bei der Zugabe eines Inhibitors mittels CD-Spektroskopie gemessen (Dr. Jan Heering). Die Messung erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 10 μM in einem Puffer aus 10 mM NaPi pH 7.2 (NaOH). In Tabelle 8 sind die jeweiligen Temperaturshifts der Wirkstoffe bei 500 μM dargestellt. Wie man erkennen kann, unterscheiden sich die Werte für

ARM1 und Bestatin nicht von denen, die mittels Differential Scanning Fluorimetrie gemessen wurden. Auch Captopril zeigt bei der CD-Messung kaum einen Shift bei den eingesetzten 500 μM , ebenso wie bei der Differential Scanning Fluorimetrie. Bei RB202 und SC57461A konnten hingegen Schmelzpunkte mittels CD-Spektroskopie gemessen werden, die etwa 2,5x höher sind als die, die mittels Differential Scanning Fluorimetrie gemessen wurden.

Tabelle 8: Thermische Stabilität der LTA_4H durch Inhibitorbindung bestimmt durch DSF und CD-Spektroskopie. *: Geschätzte Genauigkeit $\pm 0,3$ $^\circ\text{C}$.

Compound	DSF ΔT_m [$^\circ\text{C}$]	CD ΔT_m [$^\circ\text{C}$] *
ARM1	5.3 ± 0.3	5.3
Bestatin	5.1 ± 1.0	5.2
Captopril	1.5 ± 0.3	0.7
RB202	5.0 ± 0.5	7.8
SC57461A	5.4 ± 0.7	8.9

Diese Diskrepanz zeigt die Grenzen des DSF-Assays auf, aufgrund der Verwendung des Farbstoffes Sypro orange⁵². Mittels CD-Spektroskopie wurden für RB202 und SC57461A auch wesentlich steilere Anstiege der entfalteten Fraktionen um den scheinbaren T_m beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Zunahme der Interaktionen zwischen Protein und Ligand beim Entfaltungsprozess hin. Diese Beobachtung könnte am besten durch die Tatsache erklärt werden, dass diese beiden Liganden Interaktionen zu Aminosäureresten eingehen, welche in der Proteinpolypeptidkette weit entfernt voneinander liegen. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Methode der Differential Scanning Fluorimetrie auch leicht zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, wie im Fall von Captopril, dessen Temperaturshift im Bereich der Standardabweichung liegt und aus diesem Grund wohl in einem ersten Schritt als möglicher Inhibitor nicht in Betracht gezogen worden wäre. Eine zuverlässige Aussage über die gemessenen K_d -Werte kann somit nicht getroffen werden.

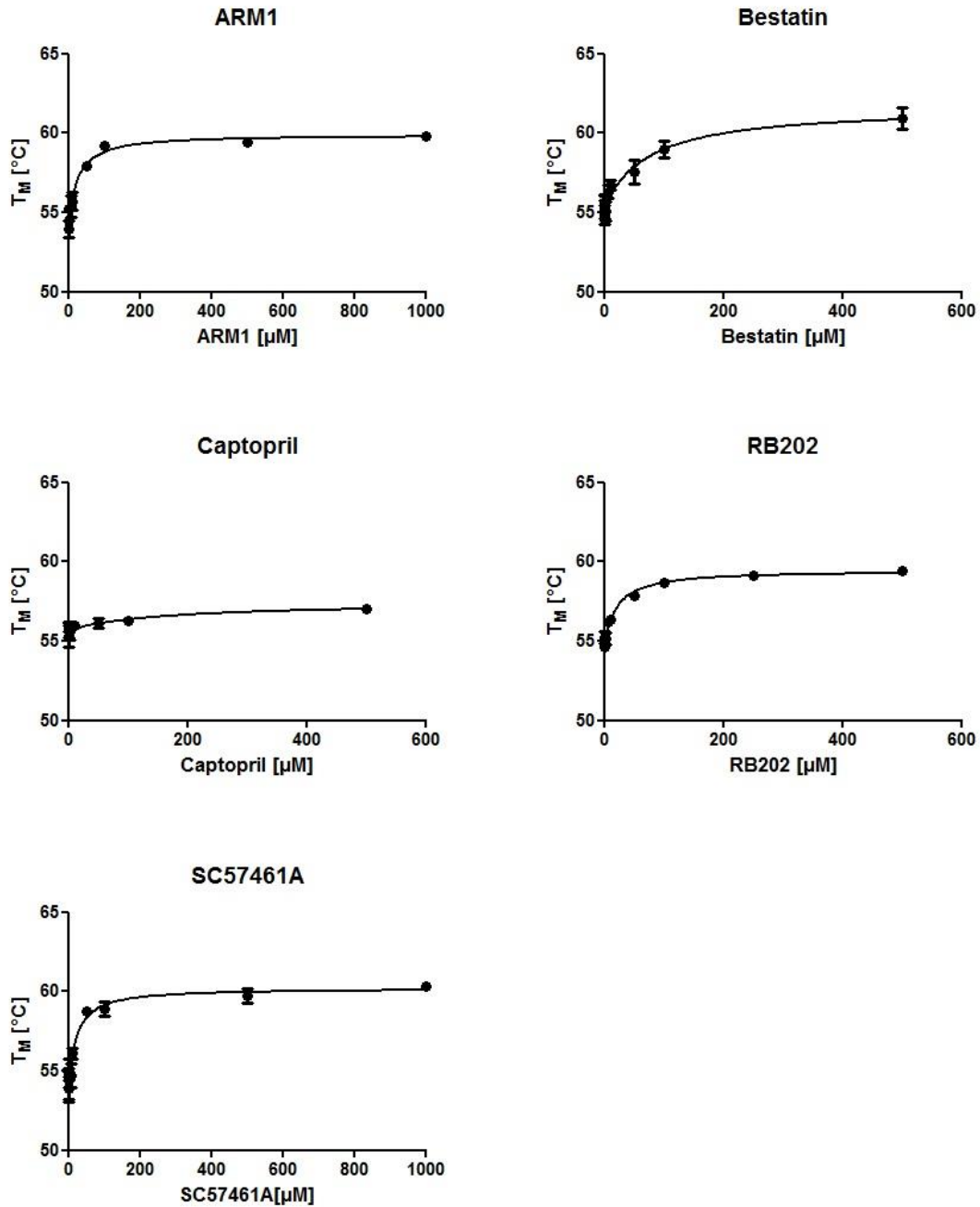


Abbildung 37: DSF-Assay der Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A bei unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die jeweiligen Schmelzpunkte [°C] gegen die Inhibitorkonzentration [μM].

4.5.5 Isotherme Titrationscalorimetrie der Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A

Die Isotherme Titrationscalorimetrie ermöglicht eine genaue und direkte Messung der Bindungskonstante sowie des enthalpischen Beitrags der Bindung. Um die

thermodynamischen Parameter der 5 ausgewählten Wirkstoffe der hLTA₄H zu bestimmen wurden ITC Experimente bei pH 8 und drei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse bei 15 °C gezeigt, in Abbildung 39 die Ergebnisse bei 25 °C und in Abbildung 40 die Ergebnisse bei 35 °C. Im oberen Teil sind die jeweils benötigten Leistungen (μcal) zur Aufrechterhaltung der Temperatur gegen die Zeit (sek.) aufgetragen. Die Fläche unter den jeweiligen Peaks entspricht der abgegebenen oder aufgenommenen Wärmemenge und kann durch Integration in Abhängigkeit der Zeit bestimmt werden. Dies wurde in den unteren Abbildungen als Funktion des molaren Verhältnisses von Protein und Inhibitor aufgetragen. Anhand der direkt gemessenen Bindungskonstanten K_d , der Enthalpie ΔH und des stöchiometrischen Faktors n lässt sich die Bindungsentropie ΔS sowie die Gibbs'sche Enthalpie ΔG berechnen. Zur Abschätzung sind die jeweiligen Werte im Balkendiagramm in den unteren Teilen der Abbildungen 28 - 30 dargestellt.

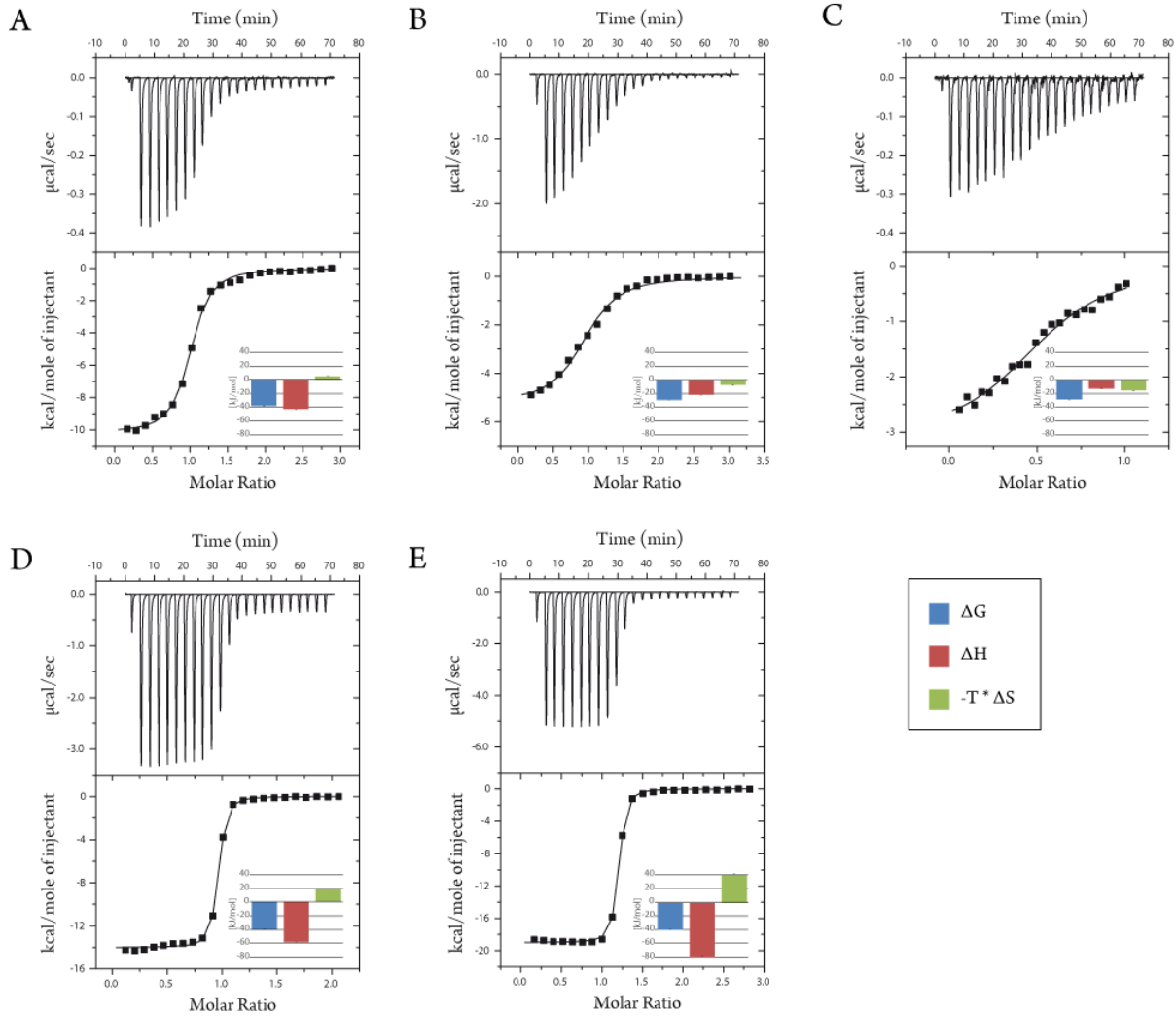


Abbildung 38: Kalorimetrische Untersuchung der Bindung der Liganden an LTA_4H bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Puffer (50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl pH 8,0) wurde mit 3% DMSO für alle Experimente mit Ausnahme Experiment B versetzt. A: $100\text{ }\mu\text{M}$ LTA_4H wurde in die Messzelle injiziert, welche $7\text{ }\mu\text{M}$ ARM1 enthielt. B, C, E: $1,5\text{ mM}$ des jeweiligen Liganden wurden in die Messzelle injiziert, welche $100\text{ }\mu\text{M}$ LTA_4H enthielt. B: Bestatin (Messung ohne DMSO), C: Captopril, E: SC57461A. D: $750\text{ }\mu\text{M}$ RB202 wurden in die Messzelle injiziert, welche $50\text{ }\mu\text{M}$ LTA_4H enthielt.

Die gemessenen und berechneten Werte der einzelnen Wirkstoffe bei den drei unterschiedlichen Temperaturen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Bindung von Bestatin und Captopril an die LTA_4H durch einen positiven entropischen Beitrag gekennzeichnet ist, wobei der von Captopril bei allen drei Temperaturen mindestens 2-fach höher ist als der entropische Beitrag von Bestatin.

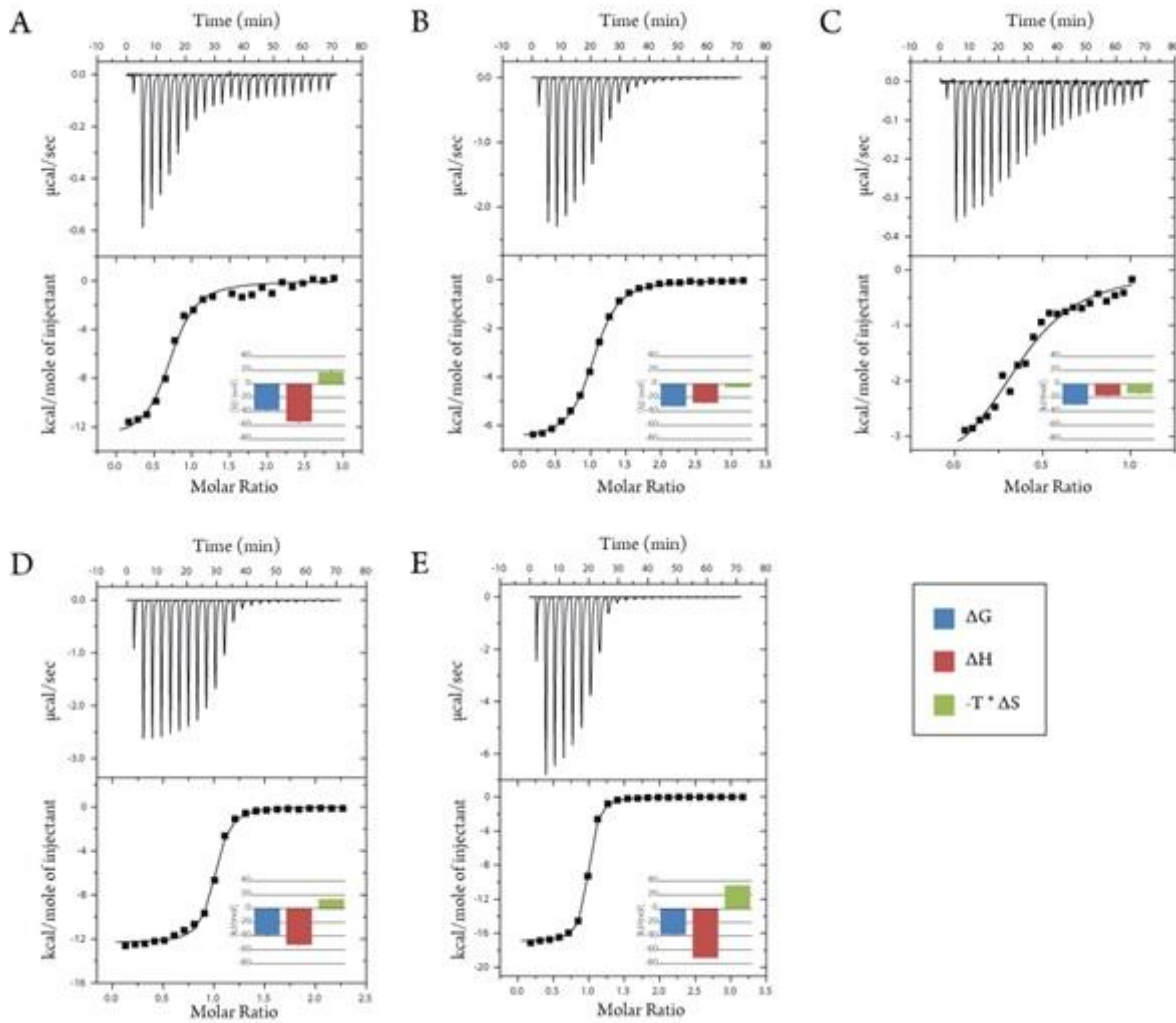


Abbildung 39: Kalorimetrische Untersuchung der Bindung der Liganden an LTA₄H bei 25 °C. Der Puffer (50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl pH 8,0) wurde mit 3% DMSO für alle Experimente mit Ausnahme Experiment B versetzt. A: 100 µM LTA₄H wurde in die Messzelle injiziert, welche 7 µM ARM1 enthielt. B, C, E: 1,5 mM des jeweiligen Liganden wurden in die Messzelle injiziert, welche 100 µM LTA₄H enthielt. B: Bestatin (Messung ohne DMSO), C: Captopril, E: SC57461A. D: 750 µM RB202 wurden in die Messzelle injiziert, welche 50 µM LTA₄H enthielt.

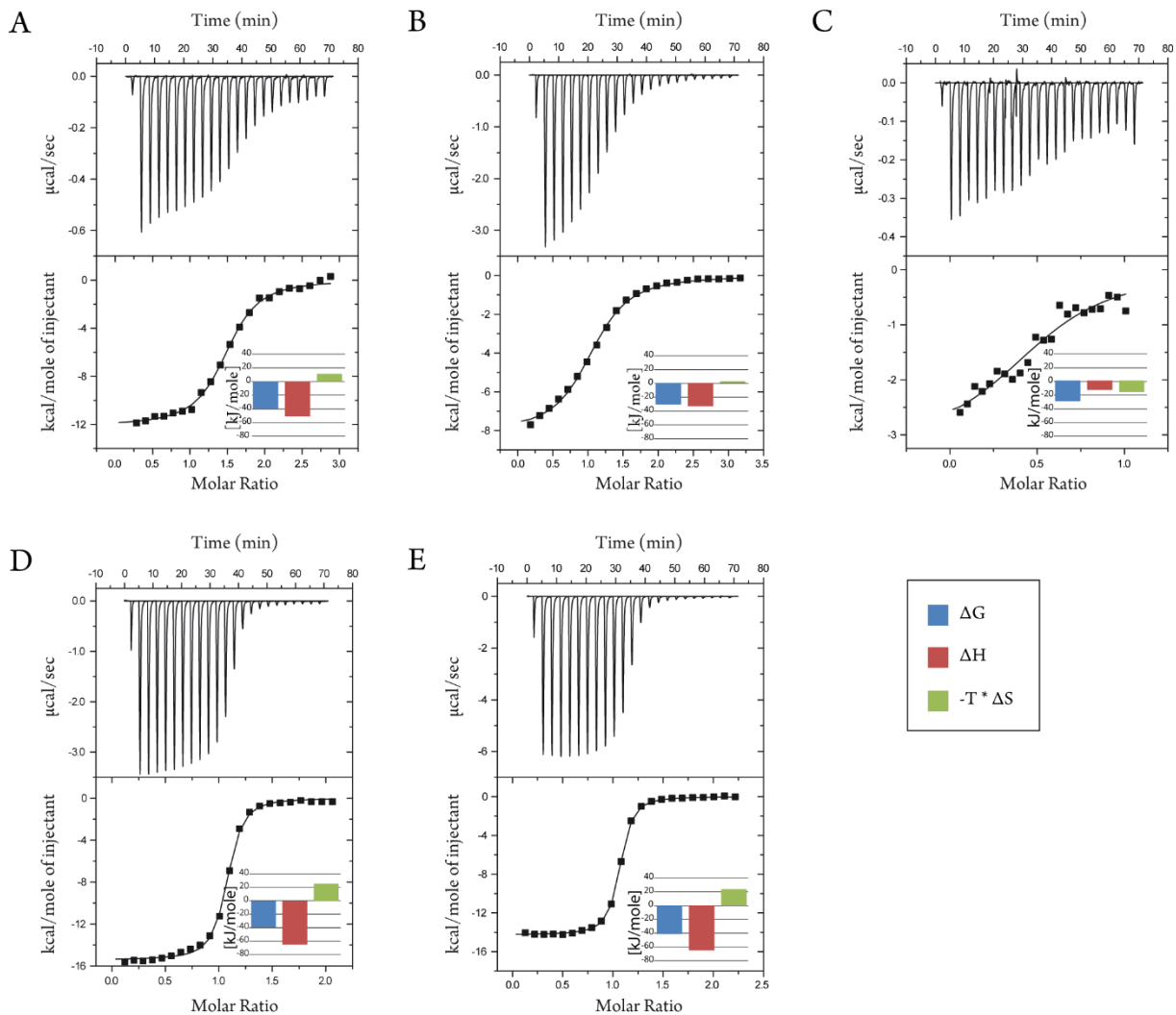


Abbildung 40: Kalorimetrische Untersuchung der Bindung der Liganden an LTA₄H bei 35 °C. Der Puffer (50 mM Tris (HCl), 50 mM NaCl pH 8,0) wurde mit 3% DMSO für alle Experimente mit Ausnahme Experiment B versetzt. A: 100 µM LTA₄H wurde in die Messzelle injiziert, welche 7 µM ARM1 enthielt. B, C, E: 1,5 mM des jeweiligen Liganden wurden in die Messzelle injiziert, welche 100 µM LTA₄H enthielt. B: Bestatin (Messung ohne DMSO), C: Captopril, E: SC57461A. D: 750 µM RB202 wurden in die Messzelle injiziert, welche 50 µM LTA₄H enthielt.

Es wird allgemein hin angenommen, dass sich Wasserstoffbrücken günstig auf die Bindungsenthalpie auswirken und hydrophobe Wechselwirkungen vorteilhafte entropische Beiträge zur Gibbs Energie beitragen. Dies lässt sich anhand der gemessenen Ergebnisse für Bestatin und Captopril nicht bestätigen. Bei beiden Wirkstoffen ist die hydrophobe Wechselwirkungsfläche sehr klein. Anhand der beiden Kristallstrukturen lässt sich feststellen, dass Captopril 5 Wasserstoffbrücken zur hLTA₄H ausbildet und mit dem Zink-Ion interagiert. Bestatin bildet sogar 9 Wasserstoffbrückenbindungen zur hLTA₄H aus und wechselwirkt ebenfalls mit dem Zink-Ion. Somit wäre eigentlich eine enthalpisch getriebene Bindung erwartungsgemäß gewesen. Im Gegensatz zu Bestatin bilden ARM1, RB202 und SC57461A

vergleichsweise wenige Wasserstoffbrückenbindungen zur hLTA₄H aus und die Bindung sollte daher eigentlich entropisch getrieben sein. Dies ist nicht der Fall. Arbeiten an anderen Protein/Ligandkomplexen zeigten vergleichbare thermodynamische Muster⁴⁴. Die Inhibitoren Bestatin und Captopril sind durch einen positiven entropischen Beitrag gekennzeichnet, wohingegen die Inhibitoren ARM1, RB202 und SC57461A durch einen positiven enthalpischen Beitrag gekennzeichnet sind. Für alle untersuchten Inhibitoren kann gesagt werden, dass es sich um exergone Reaktionen handelt.

Tabelle 9: Dissoziationskonstante, Bindungsentropien und Enthalpien der Wirkstoffe ARM1, Bestatin, Captopril, RB202 und SC57461A bei den drei gemessenen Temperaturen.

	ARM1	Bestatin	Captopril	RB202	SC57461A	
15 °C	K _d [μM]	0.13 ± 0.01	4.63 ± 0.62	6.37 ± 1.15	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	ΔG [KJ/mol]	-38.03 ± 0.25	-29.43 ± 0.32	-28.68 ± 0.43	-39.90 ± 0.25	-39.74 ± 0.24
	ΔH [KJ/mol]	-42.62 ± 0.46	-21.94 ± 0.55	-13.00 ± 0.64	-58.62 ± 0.23	-79.55 ± 0.28
	T*ΔS [KJ/mol]	-4,60 ± 0.53	7.49 ± 0.64	15.68 ± 0.78	-18.71 ± 0.34	-39.81 ± 0.37
	n	0.97	0.95	0.57	0.92	1.15
25 °C	K _d [μM]	0.31 ± 0.07	2.05 ± 0.09	6.25 ± 1.49	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.02
	ΔG [KJ/mol]	-37.19 ± 0.59	-32.46 ± 0.10	-29.71 ± 0.59	-37.53 ± 0.30	-37.33 ± 0.14
	ΔH [KJ/mol]	-54.60 ± 2.29	-27.58 ± 0.14	-16.37 ± 1.41	-51.92 ± 0.41	-71.18 ± 0.23
	T*ΔS [KJ/mol]	-17.41 ± 2.37	4.89 ± 0.18	13.34 ± 1.53	-14.39 ± 0.50	-33.84 ± 0.26
	n	0.70	1.00	0.41	0.97	0.94
35 °C	K _d [μM]	0.22 ± 0.02	5.15 ± 0.39	8.47 ± 3.12	0.27 ± 0.02	0.35 ± 0.01
	ΔG [KJ/mol]	-39.26 ± 0.24	-31.2 ± 0.19	-29.92 ± 0.94	-38.79 ± 0.23	-37.98 ± 0.10
	ΔH [KJ/mol]	-50.66 ± 0.55	-33.77 ± 0.47	-13.36 ± 1.58	-64.48 ± 0.36	-59.87 ± 0.13
	T*ΔS [KJ/mol]	-11.40 ± 0.60	-2.57 ± 0.50	16.56 ± 1.84	-25.69 ± 0.43	-21.90 ± 0.17
	n	1.46	1.06	0.57	1.04	1.03

Durch die Aufklärung der apo-Struktur der hLTA₄H (Jan Kramer) kann das thermodynamische Profil der untersuchten Wirkstoffe etwas besser erklärt werden. Mithilfe eines Solvent Analysis Tools in MOE konnten stabilisierte Wassermoleküle sowie destabilisierte Wassermoleküle in der apo-Kristallstruktur identifiziert werden (Lena Kalinowsky). Die

Verdrängung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem destabilisierten Wassermolekül liefern einen positiven Beitrag zu ΔG , wohingegen die Verdrängung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem stabilisierte Wassermoleküle einen negativen Beitrag zu ΔG liefern. Captopril und Bestatin interagieren beide mit dem Zink-Ion und beide verdrängen stabilisierte Wassermoleküle (siehe Abbildung 41). Diese stabilisierten Wassermoleküle (605, 574) liegen in der Peptidase-Bindetasche der LTA₄H. Des Weiteren verdrängt Captopril ein weiteres stabilisiertes Wassermolekül (606) in der Peptidase-Bindetasche, sowie ein destabilisiertes Wassermolekül (360) in der Peptidase-Bindetasche. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Bestatin und Captopril ist, dass Bestatin ein neutrales Wassermolekül (66) in der Hydrolase-Bindetasche verdrängt. Dadurch lässt sich erklären, dass trotz der vielen ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen von Bestatin und Captopril zur hLTA₄H statt einer erwartet enthalpisch getriebenen Bindung eine entropisch getriebene Bindung vorliegt. Die Wechselwirkung mit dem Zink-Ion erfolgt im Falle von Bestatin über die α -Hydroxycarbonylgruppe wohingegen sie bei Captopril über die Thiolgruppe erfolgt. In wie fern diese unterschiedlichen Wechselwirkungen der beiden Wirkstoffe mit dem Zink-Ion eine Rolle hinsichtlich des thermodynamischen Profils spielt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Der mit Abstand beste Inhibitor von den hier untersuchten ist SC57461A. Er zeigt einen starken Entropieverlust mit gleichzeitigem Enthalpiegewinn. Es fällt auf, dass die K_d -Werte von SC57461A sowie von RB202 identisch sind (0,06 μ M bei 15 °C) (Tabelle 9), wohingegen die gemessenen IC₅₀-Werte in einer Zehnerpotenz voneinander abweichen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass SC57461A über eine Carboxyl-Gruppe eine Interaktion mit dem Zink im aktiven Zentrum der LTA₄H eingeht. Dies könnte zu einer langsameren k_{off} -Rate führen, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, und somit zu einem besseren IC₅₀-Wert unter den gegebenen Assaybedingungen. K_d - und K_i -Werte beziehen sich auf die Gleichgewichtskonstante und werden somit verwendet, um einen Gleichgewichtszustand zu reflektieren. Im Gegensatz dazu erlauben die k_{on} - und k_{off} -Raten nicht nur die Vorhersage des Gleichgewichtszustands, sondern auch eine Vorhersage über die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration. Die Tatsache, dass ein höherer Schmelzpunkt mittels CD-Spektroskopie für den LTA₄H-SC57461A Komplex gemessen wurde, als für den LTA₄H-RB202 Komplex (Tabelle 8) unterstützt diese Vermutung. Wenn man die mittels ITC

gemessenen K_d -Werte mit denen mittels DSF gemessenen Werten vergleicht (Tabelle 7) wird deutlich, dass wie vermutet die Methode des DSF lediglich als grobe Einschätzung herangezogen werden kann, ob eine Interaktion zwischen Protein und Ligand stattfindet, jedoch nicht um präzise K_d -Werte zu bestimmen. Bei fast allen untersuchten Wirkstoffen weichen die, mittels DSF gemessenen K_d -Werte, fast 2 Zehnerpotenzen von den K_d -Werten, die mittels ITC gemessen wurden, ab. Eine Ausnahme bildet hier Bestatin, welches nur um eine Zehnerpotenz abweicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Positionierung eines Inhibitors in der hLTA₄H ein wichtiges Kriterium hinsichtlich des thermodynamischen Profils ist. Ein Inhibitor in der Hydrolase-Bindetasche des Proteins führt zu einem deutlich besseren enthalpischen Bindungsbeitrag als ein Inhibitor in der Peptidase-Bindetasche.

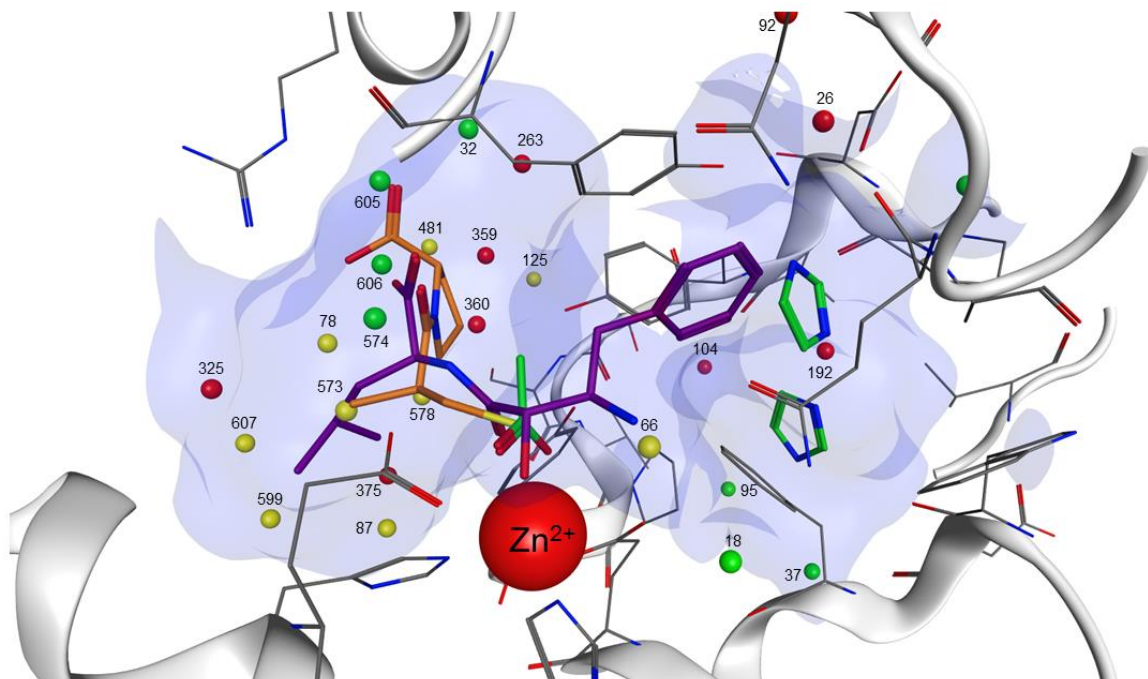


Abbildung 41: Apo-Kristallstruktur der LTA₄H mit den Wirkstoffe Bestatin (lila) und Captopril (orange). Stabilisierte Wassermoleküle sind in grün eingefärbt, destabilisierte Wassermoleküle in rot. Die gelben Wassermoleküle leisten einen neutralen Beitrag zu ΔG .

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Leukotrien A₄-Hydrolase untersucht.

Die hLTA₄H ist ein bifunktionelles Enzym, welches neben der Hydrolaseaktivität, welche für die Umwandlung des instabilen LTA₄ zu LTB₄ verantwortlich ist, auch eine Peptidaseaktivität aufweist. Beide Enzymaktivitäten spielen bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle, weshalb die LTA₄H ein interessantes pharmakologisches Target darstellt. Aufgrund der gegensätzlichen Eigenschaften der beiden Aktivitäten der LTA₄H (Produktion des proinflammatorischen LTB₄ durch die Hydrolase-Aktivität, sowie der Abbau des PGP-Tripeptids durch die Peptidase-Aktivität) wird deutlich, dass die Entwicklung selektiver Hydrolase-Inhibitoren von Vorteil ist.

Das Protein der humanen LTA₄H konnte erfolgreich kloniert werden und in *E. coli*-Zellen exprimiert werden. Zur Gewinnung des reinen rekombinanten Proteins konnte ein Aufreinigungsprotokoll mittels Nickel-Affinitätschromatographie sowie anschließender Größenausschlusschromatographie etabliert werden. Durch die Testung unterschiedlicher Lysemethoden konnte die Ausbeute deutlich erhöht werden.

Um herauszufinden, ob es durch den potentiellen Inhibitor zu einer Hemmung der Enzymaktivität kommt, muss diese detektiert werden können. Hierfür wurde ein geeignetes fluoreszenzbasiertes Testsystem zur Detektion der Enzymaktivität der hLTA₄H entwickelt. Dies lässt auch die Quantifizierung der Wirksamkeit der möglichen Inhibitoren zu. Mit Hilfe eines pharmakophorbasierten Ansatzes wurden 22 Testsubstanzen für die *in vitro* Testung ausgewählt. Nach der Evaluierung dieser Substanzen wurden weitere 14 Derivate der besten Verbindung ausgewählt und ihre inhibitorischen Eigenschaften an rekombinanter LTA₄H getestet. Die Ergebnisse wurden mittels Differential Scanning Fluorimetrie validiert, wofür ein einfaches Protokoll etabliert werden konnte.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin 5 bereits bekannte Inhibitoren der LTA₄H ausgewählt, um sie hinsichtlich ihres thermodynamischen Profils zu untersuchen. Hierzu wurden die ausgewählten Inhibitoren mittels Isothermer Titrationskalorimetrie vermessen. Die Dissoziationskonstanten der untersuchten Inhibitoren wurden ebenfalls mittels Differential Scanning Fluorimetrie bestimmt, wobei sich zeigte, dass diese Methode nicht zur präzisen Messung von Protein/Ligand Interaktionen herangezogen werden kann. Mittels eines *in silico* Ansatzes zur Vorhersage von stabilisierten und destabilisierten Wassermolekülen in der Bindetasche konnten die thermodynamischen Daten im strukturellen Kontext interpretiert werden. Durch diese Kombination konnten neue Erkenntnisse zum Design neuer Inhibitoren der LTA₄H gewonnen werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm, Mikrogramm
µL	Mikroliter
5-LO	5-Lipoxygenase
96-well	96 Vertiefungen (engl. well)
AA	Arachidonsäure (engl. Acid)
AUDA	12-(3-adamantan-1-yl-ureido) dodecanoid säure
cDNA	Komplementäre DNA
CMC	Kritische Mizellkonzentration (engl. Critical micelle concentration)
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CYP	Cytochrom P-450
DHETs	Dihydroxyeicosatriensäuren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)

Abkürzungsverzeichnis

DNase I	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSF	Differente Scanning Fluorimetrie
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EETs	Epoxyeicosatriensäuren
FLAP	5-LO aktivierendes Protein
g	Gramm
h	Stunde
HETEs	Hydroxyeicosatriensäuren
His-Tag	Hexa-Histidin Tag
hLTA4H	humane Leukotriene A4 Hydrolase
HPETEs	Hydroperoxyeicosatriene
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (engl. half maximal inhibitory concentration)
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (engl. isothermal titration calorimetry)
Kan	Kanamycin
kB	Kilobasen
K_d	Dissoziationskonstante
LB	Luria broth base
LOX	Lipoxygenase
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTA4H	Leukotrien A ₄ -Hydrolase
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄

Abkürzungsverzeichnis

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MQ-Wasser	Millipore destilliertes Wasser
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin (engl. Acid)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidyläthanolamin (engl. Acid)
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGP	Pro-Gly-Pro
pmol	Pikomol
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Rounds per Minute)
RT	Raumtemperatur
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
sek	Sekunde
TAE	Tris/Acetat/ Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _M	Schmelzpunkt (engl. Melting temperature)

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Vis	Ultraviolettes Licht
V	Volt

7. Literaturverzeichnis

1. Glover, S. *et al.* Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J. Biol. Chem.* **270**, 15359–67 (1995).
2. Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145–182 (2000).
3. Imig, J. D. & Hammock, B. D. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 794–805 (2009).
4. Oesch, F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica.* **3**, 305–40 (1973).
5. Li, J. *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibitor, AUDA, prevents early salt-sensitive hypertension. *Front. Biosci.* **13**, 3480–7 (2008).
6. Morisseau, C. *et al.* Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 1599–608 (2002).
7. Shen, H. C. & Hammock, B. D. Discovery of inhibitors of soluble epoxide hydrolase: a target with multiple potential therapeutic indications. *J. Med. Chem.* **55**, 1789–808 (2012).
8. Funk, C. D. The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1304**, 65–84 (1996).
9. Percival, M. D. Human 5-lipoxygenase contains an essential iron. *J. Biol. Chem.* **266**, 10058–61 (1991).
10. Mancini, J., Abramovitz, M., Cox, M. & Wong, E. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.* **318**, 277 – 281 (1993).
11. Alves-Filho, J. C., Benjamim, C., Tavares-Murta, B. M. & Cunha, F. Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* **100 Suppl** , 223–6 (2005).
12. Stojadinovic, A., Kiang, J., Smallridge, R., Galloway, R. & Shea-Donohue, T. Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology* **109**, 505–15 (1995).
13. Cromwell, O. *et al.* Identification of leukotrienes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Adv. Prostaglandin. Thromboxane. Leukot. Res.* **9**, 251–7 (1982).
14. Griffiths, R. J. *et al.* Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 517–21 (1995).
15. Hayashi, S. Effects of LT_{B4} receptor antagonist on myoneuropathic metabolic syndrome: an experimental study. *Kurume Med. J.* **47**, 63–72 (2000).

16. Stockley, R. A., Bayley, D. L., Unsal, I. & Dowson, L. J. The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 1494–8 (2002).
17. Wetterholm, A., Blomster, M. & Haeggström, J. Z. in *Eicosanoids* 1–12 (Springer US, 1996). doi:10.1007/978-1-4899-0200-9_1
18. Rybina, I. V., Liu, H., Gor, Y. & Feinmark, S. J. Regulation of leukotriene A4 hydrolase activity in endothelial cells by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 31865–71 (1997).
19. Evans, J. F., Nathaniel, D. J., Zamboni, R. J. & Ford-Hutchinson, A. W. Leukotriene A3. A poor substrate but a potent inhibitor of rat and human neutrophil leukotriene A4 hydrolase. *J. Biol. Chem.* **260**, 10966–70 (1985).
20. Medina, J. F. *et al.* Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7620–4 (1991).
21. Haeggström, J. Z., Wetterholm, A., Shapiro, R., Vallee, B. L. & Samuelsson, B. Leukotriene A4 hydrolase: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 965–970 (1990).
22. Snelgrove, R. J. *et al.* A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science* **330**, 90–4 (2010).
23. Weathington, N. M. *et al.* A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat. Med.* **12**, 317–23 (2006).
24. Khatami, M. *Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. (InTech, Chapters published, 2012). doi:10.5772/2436
25. Orning, L., Gierse, J. K. & Fitzpatrick, F. a. The bifunctional enzyme leukotriene-A4 hydrolase is an arginine aminopeptidase of high efficiency and specificity. *J. Biol. Chem.* **269**, 11269–73 (1994).
26. Wetterholm, a & Haeggström, J. Z. Leukotriene A4 hydrolase: an anion activated peptidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 275–81 (1992).
27. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. *Handbook of proteolytic enzymes*. 3rd ed. (Elsevier Academic Press, 2004).
28. Haeggström, J. Z. & Funk, C. D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem. Rev.* **111**, 5866–98 (2011).
29. Haeggström, J. Z. Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 50639–42 (2004).
30. Orning, L., Krivi, G. & Fitzpatrick, F. A. Leukotriene A4 hydrolase. Inhibition by bestatin and intrinsic aminopeptidase activity establish its functional resemblance to metallohydrolase enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 1375–8 (1991).
31. Orning, L. *et al.* Inhibition of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by captopril. *J. Biol. Chem.* **266**, 16507–16511 (1991).
32. Penning, T. D. *et al.* Kelatorphan and related analogs: potent and selective inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2517–2522 (1995).
33. Tsuji, F., Miyake, Y., Enomoto, H., Horiuchi, M. & Mita, S. Effects of SA6541, a leukotriene A4 hydrolase inhibitor, and indomethacin on carrageenan-induced murine

- dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **346**, 81–5 (1998).
34. Askonas, L. J. Pharmacological Characterization of SC-57461A (3-[Methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino]propanoic Acid HCl), a Potent and Selective Inhibitor of Leukotriene A4 Hydrolase I: In Vitro Studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 577–582 (2002).
 35. Rao, N. L. *et al.* Anti-inflammatory activity of a potent, selective leukotriene A4 hydrolase inhibitor in comparison with the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 1154–60 (2007).
 36. Stsiapanava, A. *et al.* Binding of Pro-Gly-Pro at the active site of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase and development of an epoxide hydrolase selective inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4227–32 (2014).
 37. Haeggström, J. Z. [36] Cytosolic liver Enzymes catalyzing hydrolysis of leukotriene A4 to leukotriene B4 and 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acid. *Methods Enzymol.* **187**, 324–334 (1990).
 38. Liang, A. M. *et al.* Development of a homogeneous time-resolved fluorescence leukotriene B4 assay for determining the activity of leukotriene A4 hydrolase. *J. Biomol. Screen.* **12**, 536–45 (2007).
 39. Minami, M. *et al.* Leukotriene A4 hydrolase is a zinc-containing aminopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 620–6 (1990).
 40. Haeggström, J. Z., Wetterholm, A., Vallee, B. L. & Samuelsson, B. Leukotriene A4 hydrolase: an epoxide hydrolase with peptidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 431–7 (1990).
 41. Poras, H. *et al.* A sensitive fluorogenic substrate for selective in vitro and in vivo assay of leukotriene A4 hydrolase activity. *Anal. Biochem.* **441**, 152–61 (2013).
 42. Inglese, J. *A Practical Guide to Assay Development and High-Throughput Screening in Drug Discovery. Edited by Taosheng Chen. ChemMedChem* **5**, (WILEY-VCH Verlag, 2010).
 43. Copeland, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem. Anal.* **46**, 178 – 206 (2005).
 44. Ladbury, J. E., Klebe, G. & Freire, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 23–7 (2010).
 45. Geschwindner, S., Ulander, J. & Johansson, P. Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? *J. Med. Chem.* **58**, 6321–35 (2015).
 46. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–21 (2007).
 47. Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A., Harmer, N. J. Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry. *J. Vis. Exp.* **91**, (2014).
 48. Iversen, P. W. A Comparison of Assay Performance Measures in Screening Assays: Signal Window, Z' Factor, and Assay Variability Ratio. *J. Biomol. Screen.* **11**, 247–252 (2006).

49. Ferreira, R. S. *et al.* Divergent Modes of Enzyme Inhibition in a Homologous Structure–Activity Series. *J. Med. Chem.* **52**, 5005–5008 (2009).
50. Praefcke, G. J. K. *Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) Wechselwirkungen Methoden. BIOSpektrum* (2005).
51. Penning, T. D. *et al.* Structure-activity relationship studies on 1-[2-(4-Phenylphenoxy)ethyl]pyrrolidine (SC-22716), a potent inhibitor of leukotriene A(4) (LTA(4)) hydrolase. *J. Med. Chem.* **43**, 721–35 (2000).
52. Lo, M.-C. *et al.* Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.* **332**, 153–159 (2004).

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung nicht vorgelegt worden.

Frankfurt am Main, den 23.06.2016

9. Publikationen

Moser, D., and Wittmann, S. K., Kramer, J., Blocher, R., Achenbach, J., Pogoryelov, D., and Proschak, E. (2015) PENG: a neural gas-based approach for pharmacophore elucidation. method design, validation, and virtual screening for novel ligands of LTA4H. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 284–293.

Meirer, K., Rödl, C. B., Wisniewska, J. M., George, S., Häfner, A.-K., Buscató, E., Klingler, F.-M., Hahn, S., Berresse, D., Wittmann, S. K., Steinhilber, D., Hofmann, B., and Proschak, E. (2013) Synthesis and structure-activity relationship studies of novel dual inhibitors of soluble epoxide hydrolase and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 56, 1777–81.

Klingler, F.-M., Wolf, M., Wittmann, S., Gribbon, P., and Proschak, E. (2016) Bacterial Expression and HTS Assessment of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase. *J. Biomol. Screen.* 1087057116637609

Blöcher, R., Lamers, C., Wittmann, S. K., Diehl, O., Hanke, T., Merk, D., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Kahnt, A. S., and Proschak, E. (2016) Design and synthesis of fused soluble epoxide hydrolase/peroxisome proliferator-activated receptor modulators. *Med. Chem. Commun.* 7, 1209–1216.

I. Anhang

i. Verwendete Wirkstoffe

Interner Name	Hersteller	Bestellnummer
1	Specs	AO-365/43463228
2	Specs	AN-465/43460907
3	Specs	AP-263/12104037
4	Specs	AQ-432/43400199
5	Specs	AP-263/43370616
6	Specs	AN-465/43369403
7	Specs	AN-465/43384086
8	Specs	AN-465/433840082
9	Specs	AN-465/42888324
10	Specs	AN-465/42888323
11	Specs	AG-690/11763247
12	Specs	AG-664/14117620
13	Specs	AE-562/12222604
14	Specs	AG-205/07862056
15	Specs	AP-970/42165760
16	Specs	AN-988/41909497
17	Specs	AM-879/41890843
18	Specs	AP-970/41681662
19	Specs	AN-989/41697765
20	Specs	AN-648/40682170
21	Specs	AP-355/42008314

22	Specs	AN-465/43384140
27	Specs	AS-871/43478504
28	Specs	AK-918/42814856
29	Specs	AQ-432/43400195
30	Specs	AO-080/43379033
31	Specs	AG-690/13702360
32	Specs	AG-690/13508154
33	Specs	AR-196/42202413
34	Specs	AL-281/42024032
35	Specs	AN-329/40826163
36	Specs	AK-968/41022455
37	Specs	AG-690/40754329
38	Specs	AG-690/12245213
39	Specs	AI-020/37280111
40	Specs	AO-022/43454462
RB202	AK Proschak René Blöcher	
ARM1	Axon MedChem	2307
Bestatin	Sigma Aldrich	B8385
Captopril	Sigma Aldrich	C4042
SC57461A	Tocris	3107

ii. Sequenzier-Ergebnisse

Die in den Abbildung A 1 - Abbildung A 5 gezeigten Ergebnisse der Sequenzierung von Klon A der LTA₄H in pET24 (*Subjct*) mit dem T7 Vorwärtsprimer wurden mit der erwarteten Sequenz (*Query*) aligniert.

Anhang

Query 3301	GTCCGGATATCTGGTAGTGGGATACAGAGATACAGAGCAGCTCATSTATAATCCCC	3360	Query 4141	ATTAATGTTCGAGATCTGATTCAGAGAGATGCTGACGATACGCTGAGGAGAGAGATAC	4200
Subject 3301	GTCCGGATATCTGGTAGTGGGATACAGAGATACAGAGCAGCTCATSTATAATCCCC	3360	Subject 4141	ATTAATGTTCGAGATCTGATTCAGAGAGATGCTGACGATACGCTGAGGAGAGAGATAC	4200
Query 3361	GTTAATGACATCACTAAGCAGATTTTCCTGCTGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3420	Query 4201	GTTAATGAG	4260
Subject 3361	GTTAATGACATCACTAAGCAGATTTTCCTGCTGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3420	Subject 4201	GTTAATGAG	4260
Query 3421	TGCAATCTCTCAGGGGCGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3480	Query 4261	ACGCGAG	4320
Subject 3421	TGCAATCTCTCAGGGGCGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3480	Subject 4261	ACGCGAG	4320
Query 3481	AAGAAAGAAATCACTCTGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3540	Query 4321	GSTAG	4380
Subject 3481	AAGAAAGAAATCACTCTGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3540	Subject 4321	GSTAG	4380
Query 3541	CATTATGACATGAG	3600	Query 4381	CCTTACAG	4440
Subject 3541	CATTATGACATGAG	3600	Subject 4381	CCTTACAG	4440
Query 3601	ATTAATGAG	3660	Query 4441	ATCAG	4500
Subject 3601	ATTAATGAG	3660	Subject 4441	ATCAG	4500
Query 3661	TTCAAG	3720	Query 4501	GCAG	4560
Subject 3661	TTCAAG	3720	Subject 4501	GCAG	4560
Query 3721	ACTGCTCTCTCTATCATCAATCACTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3780	Query 4561	CGTTGAG	4620
Subject 3721	ACTGCTCTCTCTATCATCAATCACTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	3780	Subject 4561	CGTTGAG	4620
Query 3781	GGAG	3840	Query 4621	TGTCTGAG	4680
Subject 3781	GGAG	3840	Subject 4621	TGTCTGAG	4680
Query 3841	ATCTGAG	3900	Query 4681	GGGTTGAG	4740
Subject 3841	ATCTGAG	3900	Subject 4681	GGGTTGAG	4740
Query 3901	AAG	3960	Query 4741	ACTAG	4800
Subject 3901	AAG	3960	Subject 4741	ACTAG	4800
Query 3961	TTAG	4020	Query 4801	GCAG	4860
Subject 3961	TTAG	4020	Subject 4801	GCAG	4860
Query 4021	GGAG	4080	Query 4861	CTGAG	4920
Subject 4021	GGAG	4080	Subject 4861	CTGAG	4920
Query 4081	ATGCTTCTGAG	4140	Query 4921	AGGTTTCTGAG	4980
Subject 4081	ATGCTTCTGAG	4140	Subject 4921	AGGTTTCTGAG	4980

Abbildung A 3 Sequenzierungsergebnisse LTA4H Klon A T7 Vorwärtsprimer Teil 3

Query 4981	AAGCCGAG	5040	Query 5821	ATAATGAG	5880
Subject 4981	AAGCCGAG	5040	Subject 5821	ATAATGAG	5880
Query 5041	TGAG	5100	Query 5881	AGTTTCTGAG	5940
Subject 5041	TGAG	5100	Subject 5881	AGTTTCTGAG	5940
Query 5101	AAGTACAG	5160	Query 5941	GACTAAG	6000
Subject 5101	AAGTACAG	5160	Subject 5941	GACTAAG	6000
Query 5161	GCTTACAG	5220	Query 6001	CTGAG	6060
Subject 5161	GCTTACAG	5220	Subject 6001	CTGAG	6060
Query 5221	AGCAG	5280	Query 6061	AAG	6120
Subject 5221	AGCAG	5280	Subject 6061	AAG	6120
Query 5281	ACCCGAG	5340	Query 6121	TGCAAG	6180
Subject 5281	ACCCGAG	5340	Subject 6121	TGCAAG	6180
Query 5341	GGTACAG	5400	Query 6181	AG	6240
Subject 5341	GGTACAG	5400	Subject 6181	AG	6240
Query 5401	GTATGAG	5460	Query 6241	ATGGAG	6300
Subject 5401	GTATGAG	5460	Subject 6241	ATGGAG	6300
Query 5461	GACAG	5520	Query 6301	ATTCAG	6360
Subject 5461	GACAG	5520	Subject 6301	ATTCAG	6360
Query 5521	CCTTACAG	5580	Query 6361	TAATAG	6420
Subject 5521	CCTTACAG	5580	Subject 6361	TAATAG	6420
Query 5581	GATTACAG	5640	Query 6421	TCTATGAG	6480
Subject 5581	GATTACAG	5640	Subject 6421	TCTATGAG	6480
Query 5641	CGCTCAG	5700	Query 6481	ATGAG	6540
Subject 5641	CGCTCAG	5700	Subject 6481	ATGAG	6540
Query 5701	CTTACAG	5760	Query 6541	TCTAG	6600
Subject 5701	CTTACAG	5760	Subject 6541	TCTAG	6600
Query 5761	CTAG	5820	Query 6601	GGAG	6660
Subject 5761	CTAG	5820	Subject 6601	GGAG	6660

Abbildung A 4 Sequenzierungsergebnisse LTA4H Klon A T7 Vorwärtsprimer Teil 4

Anhang

```
Query 6661 TTAATAATGCGTTAAATTTTSTTAATCGCTCATTTTTTAACCATAGGCGAAATC 6720
Sbjct 6661 TTAATAATGCGTTAAATTTTSTTAATCGCTCATTTTTTAACCATAGGCGAAATC 6720
Query 6721 GGCAGAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTT 6780
Sbjct 6721 GGCAGAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTT 6780
Query 6781 TGGACCAAGATCCACTATTAAAGAACTGGACTCCAACTCAAGGGGCGAAAACCGTC 6840
Sbjct 6781 TGGACCAAGATCCACTATTAAAGAACTGGACTCCAACTCAAGGGGCGAAAACCGTC 6840
Query 6841 TATCGGGGATGCGCCACTACGTGAACCATCACTAATCAAGTTTTTTTGGGGTCAAG 6900
Sbjct 6841 TATCGGGGATGCGCCACTACGTGAACCATCACTAATCAAGTTTTTTTGGGGTCAAG 6900
Query 6901 TGCGTAAAGCACTAATGSAACCTAAAGGAGCCCGCGATTAGAGCTTGAAGGGA 6960
Sbjct 6901 TGCGTAAAGCACTAATGSAACCTAAAGGAGCCCGCGATTAGAGCTTGAAGGGA 6960
Query 6961 AAGCGGCAACTGGCGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGA 7020
Sbjct 6961 AAGCGGCAACTGGCGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGA 7020
Query 7021 CTGGCAAGTGTAGCGTCACTGGCTGCACTTTCGTTAAGCAAGCAAGCCG 7080
Sbjct 7021 CTGGCAAGTGTAGCGTCACTGGCTGCACTTTCGTTAAGCAAGCAAGCCG 7080
Query 7081 GCGCTTAATGCGCCCTACAGGCGCGTCCCAITGCGCA 7119
Sbjct 7081 GCGCTTAATGCGCCCTACAGGCGCGTCCCAITGCGCA 7119
```

Abbildung A 5 Sequenzierungsergebnisse LTA₄H Klon A T7 Vorwärtsprimer Teil 5

iii. Physikalisch-chemische Eigenschaften der LTA₄H

ProtParam

User-provided sequence:

```

    10           20           30           40           50           60
MPEIVDTCSL ASPASVCRTK HLHLRCSVDF TRRTLGTAA LTVQSQEDNL RSLVLDTKDL

    70           80           90           100          110          120
TIEKVVINGQ EVKYALGERQ SYKGGSPMEIS LPIALSKNQE IVIEISFETS PKSSALQWLT

   130          140          150          160          170          180
PEQTSQKEHP YLFSQCQAIH CRAILPCQDT PSVKLTYTAE VSVPKELVAL MSAIRDGETP

   190          200          210          220          230          240
DPEDPSRKIY KFIQKVPIPC YLIALVVGAL ESRQIGPRTL VWSEKEQVEK SAYEFSETES

   250          260          270          280          290          300
MLKIAEDLGG PYVWGQYDLL VLPPSFYGG MENPCLTFVT PTLLAGDKSL SNVIAHEISH

   310          320          330          340          350          360
SWTGNLVTNK TWDHFWLNEG HTVYLERHIC GRLFGEKFRH FNALGGWGEL QNSVKTFGET

   370          380          390          400          410          420
HPFTKLVVDL TDIDPDVAYS SVPYEKGFAL LFYLEQLLGG PEIFLGFLKA YVEKFSYKSI

   430          440          450          460          470          480
TTDDWKDFLY SYFKDKVDVL NQVDNNAWLY SPGLPPIKPN YDMTLTNACI ALSQRWITAK

   490          500          510          520          530          540
EDDLNSFNAT DLKDLSSHQL NEFLAQLTQR APLPLGHIKR MQEVYFNFAI NNSEIRFRWL

   550          560          570          580          590          600
RLCIQSKWED AIPLALKMAT EQGRMKFTRP LFKDLAAFDK SHDQAVRQYQ EHKASMPVTV

   610
AMLVGKDLKV DS
```

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 612

Molecular weight: 69372.3

Theoretical pI: 5.79

Amino acid composition:

Ala (A)	38	6.2%
Arg (R)	23	3.8%
Asn (N)	21	3.4%
Asp (D)	34	5.6%
Cys (C)	11	1.8%
Gln (Q)	26	4.2%
Glu (E)	41	6.7%
Gly (G)	30	4.9%
His (H)	16	2.6%
Ile (I)	31	5.1%
Leu (L)	69	11.3%
Lys (K)	40	6.5%
Met (M)	11	1.8%
Phe (F)	27	4.4%
Pro (P)	35	5.7%
Ser (S)	46	7.5%
Thr (T)	40	6.5%
Trp (W)	13	2.1%
Tyr (Y)	22	3.6%
Val (V)	38	6.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 75

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 63

Atomic composition:

Carbon	C	3138
Hydrogen	H	4863
Nitrogen	N	813
Oxygen	O	918
Sulfur	S	22

Formula: C₃₁₃₈H₄₈₆₃N₈₁₃O₉₁₈S₂₂

Total number of atoms: 9754

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 104905

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.512, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Anhang

Ext. coefficient 104280
Abs 0.1% (=1 g/l) 1.503, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 40.28
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 87.94

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.257

iv. Massenspektrometrische Analyse

Sample 1

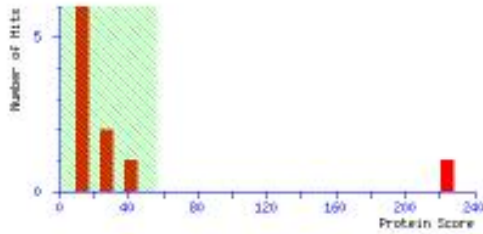
Mascot Search Results

User : Moritz
 Email :
 Search title :
 MS data file : 130820_Froschak_08.mgf
 Database : SwissProt 2013_08 (540732 sequences; 192091492 residues)
 Taxonomy : Escherichia coli (22941 sequences)
 Timestamp : 23 Aug 2013 at 12:09:28 GMT
 Top Score : 224 for **DNAK_EC024**, Chaperone protein DnaK OS=Escherichia

	SwissProt	Decoy
Protein hits above identity threshold	1	0
Highest scoring protein hit	224	21

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Protein ID	Mass	Score	Expect	Matches
DNAK_EC024	69120	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC017	69130	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (117187 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC009	69146	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC020	69120	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC018	69120	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC024	69120	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC016	69130	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC012	69130	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				
DNAK_EC020	69120	224	9.1e-059	25
Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (119182 unseq_826171 / ST02) OS=Esch PE=1 SV=1				

Sample 2

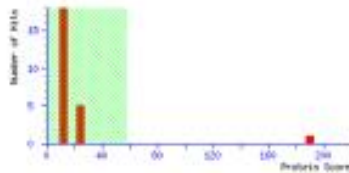
Mascot Search Results

User : Moritz
 Email :
 Search title :
 MS data file : 130820_Froschak_10.mgf
 Database : SwissProt_Human (human_30130704 | 156487 sequences; 22503857 residues)
 Timestamp : 23 Aug 2013 at 09:30:48 GMT
 Top Score : 190 for **P02940**, Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens (G1-LTAAH PE=1 SV=2)

	SwissProt_Human	Decoy
Protein hits above identity threshold	1	0
Highest scoring protein hit	190	41

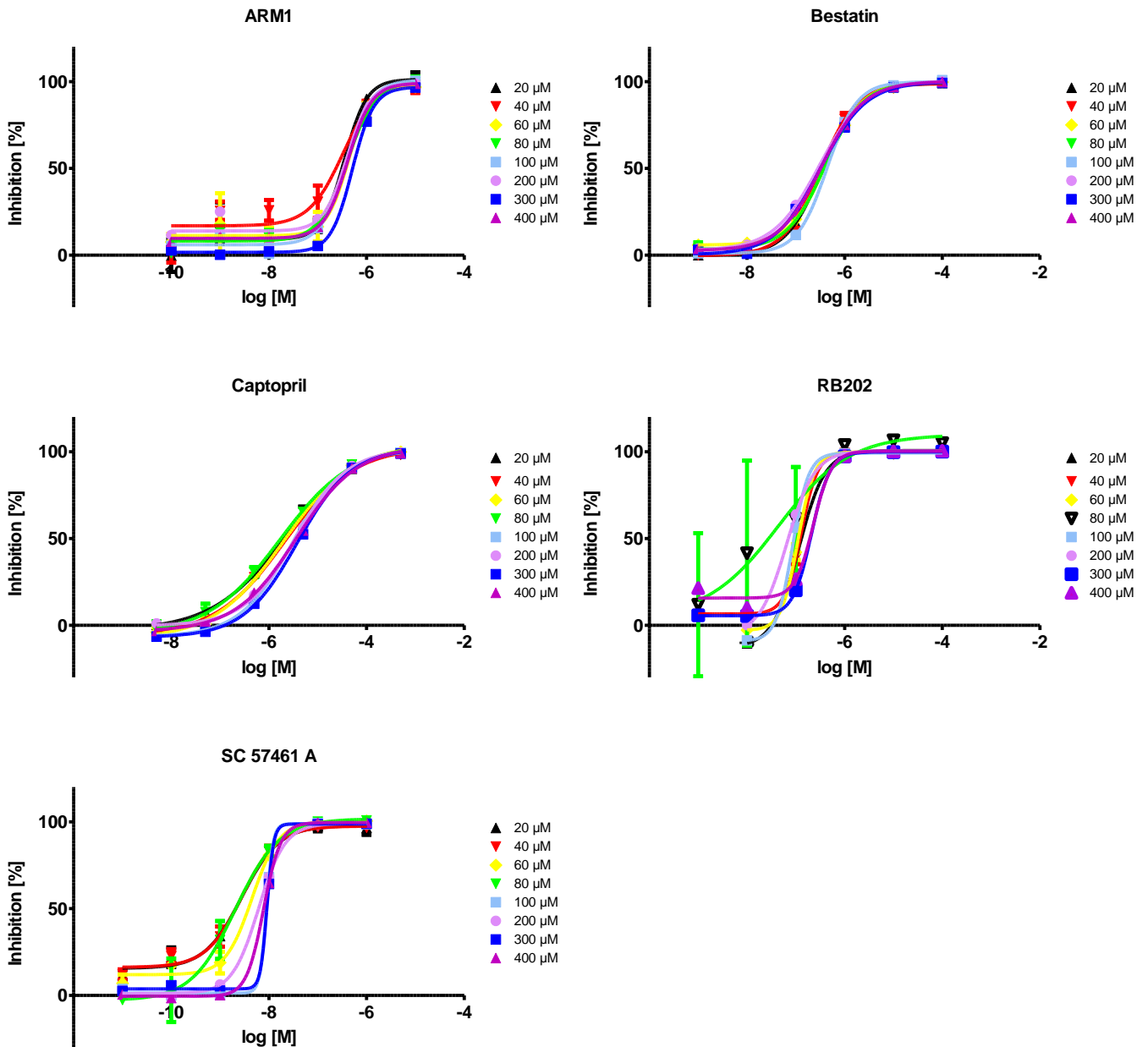
Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 58 are significant ($p < 0.05$).



Protein ID	Mass	Score	Expect	Matches
P02940	60665	190	1.5e-015	22
Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens (G1-LTAAH PE=1 SV=2)				
P02940-4	67268	180	2.3e-012	20
Isoform 4 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens (G1-LTAAH)				
P02940-2	60245	156	9.9e-011	17
Isoform 2 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens (G1-LTAAH)				
P02940-3	57662	129	5e-009	15
Isoform 3 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens (G1-LTAAH)				
P04823	8707	15	1.2e-023	1
Putative uncharacterized protein (G0G3012001) OS=Homo sapiens (E=5 SV=1)				
Q02023	29707	14	1.7e-022	2
Kallikrein-14 OS=Homo sapiens (G1-KL14 PE=1 SV=2)				
Q17174	12188	13	1.8e-022	1
Putative keratinocyte growth factor-like protein 1 OS=Homo sapiens (G1-KSLP1 PE=5 SV=1)				
Q06323-5	52551	13	1.0e-021	2
Isoform 5 of Recombining binding protein suppressor of hairless OS=Homo sapiens (G1-RBP1)				
Q06323-4	56903	13	1.3e-021	2
Isoform 4 of Recombining binding protein suppressor of hairless OS=Homo sapiens (G1-RBP1)				
Q06323-6	55123	13	1.9e-021	2
Isoform 6 of Recombining binding protein suppressor of hairless OS=Homo sapiens (G1-RBP1)				
Q06323-7	55033	13	1.0e-021	2
Isoform 7 of Recombining binding protein suppressor of hairless OS=Homo sapiens (G1-RBP1)				
Q12126-6	31132	13	2e-021	2
Isoform BNT of Septin-4 OS=Homo sapiens (G1-SEPT4)				
Q06323	54943	13	2e-021	2
Recombining binding protein suppressor of hairless OS=Homo sapiens (G1-RBP1 PE=1 SV=1)				
Q02022	50950	12	2.4e-021	2
Inositol-pentakisphosphate 2-kinase OS=Homo sapiens (G1-IPK2 PE=1 SV=1)				

v. IC_{50} Werte der zu charakterisierenden Wirkstoffe bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen



II. Publikation

PENG: A Neural Gas-Based Approach for Pharmacophore Elucidation. Method Design, Validation, and Virtual Screening for Novel Ligands of LTA4H

Daniel Moser,^{†,‡,§,#} Sandra K. Wittmann,^{†,#} Jan Kramer,[†] René Blöcher,[†] Janosch Achenbach,^{†,||} Denys Pogoryelov,[‡] and Ewgenij Proschak^{*,†,‡,§}


[†]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University, 60438 Frankfurt, Germany

[‡]German Cancer Consortium (DKTK), 60590 Frankfurt, Germany

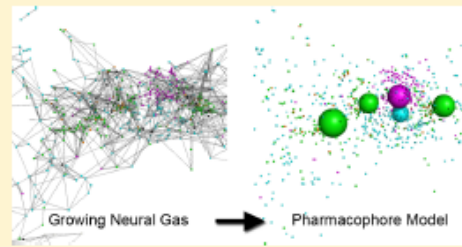
[§]German Cancer Research Center (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany

^{||}BASF SE, 67056 Ludwigshafen, Germany

^{*}Institute of Biochemistry, Goethe University, 60438 Frankfurt, Germany

 Supporting Information

ABSTRACT: The pharmacophore concept is commonly employed in virtual screening for hit identification. A pharmacophore is generally defined as the three-dimensional arrangement of the structural and physicochemical features of a compound responsible for its affinity to a pharmacological target. Given a number of active ligands binding to a particular target in the same manner, it can reasonably be assumed that they have some shared features, a common pharmacophore. We present a growing neural gas (GNG)-based approach for the extraction of the relevant features which we called PENG (pharmacophore elucidation by neural gas). Results of retrospective validation indicate an acceptable quality of the generated models. Additionally a prospective virtual screening for leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) inhibitors was performed. LTA4H is a bifunctional zinc metalloprotease which displays both epoxide hydrolase and aminopeptidase activity. We could show that the PENG approach is able to predict the binding mode of the ligand by X-ray crystallography. Furthermore, we identified a novel chemotype of LTA4H inhibitors.



INTRODUCTION

In general, methods used to search for novel ligands of a given target or to explain ligand–target interactions can be divided into structure-based design (SBD) and ligand-based design (LBD).¹ While SBD depends on the availability of a three-dimensional (3D) structure of the protein, LBD focuses solely on known active (and inactive) ligands and can therefore be used when a 3D structure of the protein is not available. A pharmacophore^{2,3} is a central concept in medicinal chemistry and is defined by IUPAC as an “ensemble of steric and electronic features that is necessary to ensure the optimal supramolecular interactions with a specific biological target structure and to trigger (or to block) its biological response”.⁴ A pharmacophore of a given target thus defines the structural requirements to a chemical structure which are necessary to ensure the binding properties. Pharmacophore models are assumptions which describe the pharmacophore of a target and are—while also applicable in SBD—a widely used concept in LBD to explain relevant structural and/or physicochemical features of known active molecules. Usually it is assumed that active ligands form similar interactions (i.e., have the same

binding mode) with the protein and therefore should have some shared features, i.e., a common pharmacophore (CP). A common pharmacophore induces an overlay of the ligands which hopefully resembles the conformations when bound to the target.⁵ Vice versa it is possible to deduce a CP from a given overlay of ligands. Numerous—commercial as well as freely available—approaches for creating such alignments and extracting a CP have emerged over the years,^{6,7} yet it remains a challenging topic and research is still ongoing. In this work we present an approach based on a growing neural gas (GNG)⁸ which we named PENG (pharmacophore elucidation by neural gas). The GNG can be seen as an extension of the general neural gas (NG) algorithm presented by Martinez and Schulten⁹ in the early 1990s, which in turn was inspired by self-organizing maps (SOMs).¹⁰ Self-organizing maps are artificial neural networks (ANNs) which are used in unsupervised machine learning. They consist of a predefined number of neurons which are typically arranged in the form of a

Received: October 14, 2014

Published: January 27, 2015

two-dimensional rectangular, hexagonal, or toroidal grid. Each neuron has an associated weight vector with the same dimensions as the input data, as well as its position in the grid. During training the neurons (i.e., the associated weight vectors) adapt to the input data; by using a neighborhood function the topology of the input space is preserved; i.e., for a given "winner" neuron (the neuron with the least distance to the presented data point) all of its topological neighbors are adapted, too. Since each neuron has a fixed topological position in the grid, a trained SOM represents a mapping from a high-dimensional to a lower-dimensional (usual 2D) space. These properties make SOMs particularly useful for visualization of high-dimensional data but also for clustering. In contrast to SOMs, a neural gas does not work with a predefined topological arrangement of neurons (but still with a fixed number). Instead of adapting the topological neighbors of a winner neuron, all neurons are adapted, depending on their actual distance to the presented data point. Between the winner and the second neuron an "aging" connection is formed. If the connection is not renewed after a certain time, for example because the second neuron "moved" away, it is removed again. This way the network "learns" the topology of the input data during the course of the training. However, both methods rely on a predefined number of neurons. Finding such a suitable number depends on the input data and may lead to unsatisfying results if chosen wrong. Therefore, Fritzsche⁸ proposed the GNG method which does not work with a fixed number of neurons but instead creates or removes neurons dynamically. GNGs are used in different application fields, for example, image processing,¹¹ cluster analysis,¹² and pattern recognition, but are also employed in cheminformatics-related questions.¹³

We validated our approach by (a) generating models based on co-crystallized ligands, searching a conformation database of these ligands, and calculating the root-mean-square deviation (RMSD) between the best-matching conformation and the co-crystallized pose, (b) performing retrospective virtual screenings and calculating the rate of correctly classified and misclassified compounds, and (c) performing a prospective virtual screening for novel ligands of the leukotriene A4 hydrolase. The leukotriene A4 hydrolase (LTA4H; EC 3.3.2.6) is a zinc metalloprotease which can act as an epoxide hydrolase as well as an aminopeptidase. It catalyzes the stereoselective hydrolysis of leukotriene A4 to the proinflammatory lipid mediator leukotriene B4 in a two-step reaction, as a part of the arachidonic acid cascade.^{14,15} It has previously been shown that the LTA4H preferably cleaves a tripeptide with an N-terminal arginine residue as well as the chemotactic tripeptide Pro-Gly-Pro which leads to its inactivation.¹⁶ LTA4H is an interesting target for the treatment of chronic inflammatory diseases where it plays contrary roles (production and inactivation of chemotactic agents¹⁶) and is linked to dermatitis, arthritis, cancer, osteoporosis, and atherosclerosis.¹⁷

METHODS

Pharmacophore Annotation and Output. PENG relies on pharmacophore annotation points as generated by the MOE (Molecular Operating Environment)¹⁸ software and outputs MOE *.ph4* models. In the present work we used the *Unified* annotation scheme including 19 different features. Internally these annotation points are stored as objects consisting of a coordinate vector v , a 19-dimensional bit-vector encoding the pharmacophore annotation f , and two integer ids for the corresponding molecule and the conformation, respectively.

Growing Neural Gas. For detection of common pharmacophore features a GNG is used. Our implementation follows the original design described by Fritzsche⁸ with slight modifications. In contrast to the classic neural gas algorithm⁹ which operates on a fixed number of neurons (units), the GNG algorithm creates or removes neurons dynamically by competitive Hebbian learning (CHL).¹⁹ As mentioned, each annotation point (i.e., data point/signal) as well as each neuron has two vectors: the coordinate vector, $v \in \mathbb{R}^3$, and the feature vector, $f \in \{0,1\}^{19}$. However, to allow a continuous adaption of the neurons during the training, the feature vector is treated as a real vector, i.e., $[0,1]^{19}$, instead of a binary one. As distance functions the Euclidean distance, $D(x,y)$, between two coordinate vectors x and y , and the Tanimoto similarity, $T(a,b)$, for two feature vectors a and b are used. We introduced a time-dependent factor $\omega_E = e^{(E/E_{\max})}$ for the current epoch E and a total of E_{\max} epochs, which gives the Euclidean distance more weight in the early phases of the training process. This helps to avoid the adaption of neurons to a "wrong" feature vector while there is still a lot of movement in the coordinate space during the early training. In later phases, with neurons being nearer to their final position in 3D space, the feature vector is then adapted and fine-tuned. In order to get a combined distance value, T is scaled by the factor $D_{\max} = \max(\{D(x,y) | x,y \in V_{\text{GNG}}\})$ to lie in the range of the Euclidean distance, where V_{GNG} is the set of all coordinate vectors of all data points in this GNG run. The distance between a data point ξ and a neuron s is then calculated as

$$d_{\xi,s} = (1 - T(f_{\xi}, f_s))(1 - \omega_E)D_{\max} + D(v_{\xi}, v_s)\omega_E$$

where f and v denote the respective feature and coordinate vectors. Likewise, neurons are adapted, i.e., moved toward ξ by fractions ϵ_s and ϵ_n , respectively, of the total distance:

$$\Delta v_s = \epsilon_n \omega_E (v_{\xi} - v_s)$$

$$\Delta f_s = \epsilon_s (1 - \omega_E) (f_{\xi} - f_s)$$

with $\epsilon = \epsilon_s$ if s is the nearest neuron and $\epsilon = \epsilon_n$ for all direct topological neighbors of s . The default values used are $\epsilon_s = 0.2$ and $\epsilon_n = 0.006$ as in the original work by Fritzsche.⁸ After running the GNG algorithm for E_{\max} epochs, i.e., having randomly presented all data points E_{\max} times, several merge steps are performed to remove unnecessary neurons as follows:

(1) Let S_{sorted} be the list of neurons, sorted by coverage. Since each data point $\xi \in P$ belongs to a molecule $m_{\xi} \in M$, the coverage c_s is calculated as the number of unique molecules w_s associated with a given neuron $s \in S$, i.e., data points with the least distance to the neuron, divided by the total number of molecules:

$$c_s = \frac{|\{m_{\xi} | \xi \in w_s\}|}{|M|}$$

with

$$w_s = \{\xi | d_{\xi,s} = \min_{t \in S} (d_{\xi,t})\}$$

(2) Mark all neurons $t \in S_{\text{sorted}}$ ($t \neq s, c_t \geq c_s$) for merge with $s \in S_{\text{sorted}}$ if their radii r (default 0.1 Å) overlap or their Euclidean distance and Tanimoto similarity are below respectively above two user-defined thresholds t_d and t_r :

$$M_t = (s) \cup \{t | r_t + r_s > D(v_t, v_s) \vee (D(v_t, v_s) \leq t_d \wedge T(f_t, f_s) \geq t_r)\} \quad (1)$$

Perform the actual merge by setting the coordinate vector of a temporary neuron s_{tmp} to a user-defined percentile (default median) p of all neurons $m \in M_s$. To incorporate the higher coverage of s , the new neuron is "moved" a fraction toward s , though, and its radius is adapted accordingly:

$$v_p = p(\{v_m | m \in M_s\})$$

$$v_{tmp} = v_p + (v_s - v_p) \zeta$$

$$r_{tmp} = \max(r_s, p(\{D(v_{tmp}, \xi) | \xi \in w_{tmp}\}))$$

The feature vector is updated in a similar manner. However, this time the feature vector of neurons within the p Euclidean distance to s_{tmp} is taken into account completely while neurons farther away contribute only a fraction depending on their distance.

$$d_p = p(\{D(v_{tmp}, v_m) | m \in M_s\})$$

$$f_{sum} = \sum_{m \in M} \begin{cases} v_m: & d_m^* \leq d_p \\ v_m e^{-(d_m^* - d_p)}: & d_m^* > d_p \end{cases}$$

$$f_{tmp} = \frac{f_{sum}}{|M_s|}$$

Since we use a growing neural gas, all neurons are linked with their topological neighbors. Therefore, these links are reconnected to the temporary neuron s_{tmp} . Let I_m be the list of topological neighbors of a neuron m . Then

$$I_{tmp} = \bigcup_{m \in M_s} I_m$$

$$I_n = I_n \cup \{s_{tmp}\} \setminus \{m | m \in M_s\}, \quad n \in S$$

reconnects all links. The final step in the merge process is to remove the merged neurons and make s_{tmp} permanent.

$$S = S \setminus M_s \cup s_{tmp}$$

(3) Remove all neurons (including newly created ones by merge) if their coverage is below a user-defined minimum coverage γ_n .

$$S = S \setminus \{t | c_t < \gamma_n, t \in S\}$$

(4) Repeat all steps described above once more. However, this time eq 1 becomes

$$M_s = \{s\} \cup \{t | r_t + d_{s,t} < r_s \text{ or } r_s + d_{s,t} < r_t\}$$

meaning that only neurons will be merged which are fully included in another neuron.

(5) Finalize all neurons by rounding every position of the feature vector to 0 or 1; i.e., make it a bit vector again. The distribution of the values for each position is shown for an exemplary run of the algorithm in Figure S1 in the Supporting Information.

Figure 1 shows an exemplary run of the GNG algorithm on 50 known active inhibitors of the soluble epoxide hydrolase.

Elucidation Algorithm. The elucidation algorithm generates up to *maxPh4* pharmacophore models (in parallel) using the following procedure. It expects a list $L = (V, F)$ of pharmacophore annotation points (signals) and two functions $c: L \rightarrow \mathbb{Z}^+$, $m: \mathbb{Z}^+ \rightarrow \mathbb{Z}^+$ as input, where $v_\xi \in V$ and $f_\xi \in F$

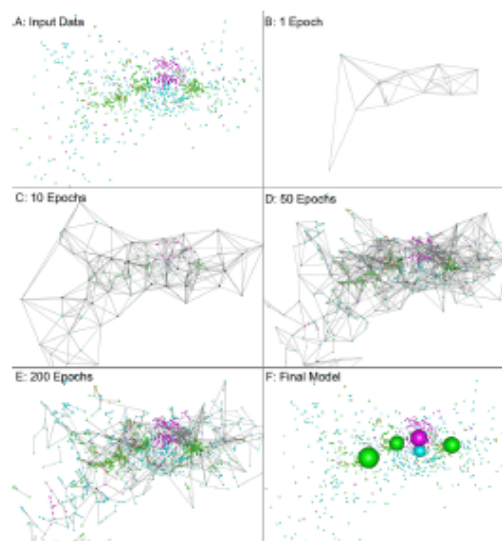


Figure 1. Pharmacophore extraction process with the GNG: (A) Aligned pharmacophore annotation points of the input data; (B–E) GNG after 1, 10, 50, and 200 epochs, respectively (input data not shown); (F) final pharmacophore model after neurons were merged and pruned shown together with the input data.

denote the coordinate and feature vectors of a signal $\xi \in L$ and $cand_m$ are functions mapping each annotation point to the corresponding conformation and subsequently compound identification (id). Additionally active/inactive information may be provided; if it is omitted all compounds are treated as active.

Repeat until *maxPh4* models are created or no more templates are available:

(1) Choose a random conformation id t with corresponding annotation points (conformation) Ξ_t as a template and mark this conformation id as used.

$$t = \text{rand}(\{c(\xi) | c(\xi) \notin \text{used}, \xi \in L\})$$

$$\Xi_t = \{\xi | c(\xi) = t, \xi \in L\}$$

$$\text{used} = \text{used} \cup t$$

(2) Align all other conformations from different compounds (i.e., $m(c(\xi')) \neq m(t)$) onto this template using the Kabsch algorithm.^{20,21} The Kabsch algorithm requires as input the maximum cliques in an association graph and returns the optimal rotation matrices. For clique detection the Bron–Kerbosch algorithm^{22,23} is used, which expects an association graph as input. Therefore, we implicitly treat the conformations as undirected, complete graphs, i.e., $V = \Xi_t$ for some conformation x and $E = \{(u, v) | u, v \in V, u \neq v\}$. The nodes are labeled with the feature vector and the edges with the Euclidean distance between two annotation points. Let

$$G = (V, E, \mu, \epsilon) \quad \text{and} \quad G' = (V', E', \mu', \epsilon')$$

with

$$\mu^{(v)}(v) = f_v: \quad v \in V^{(v)}$$

$$\epsilon^{(c)}(e) = D(u, v): \quad e = (u, v) \in E^{(c)} \wedge u, v \in V^{(c)}$$

then the association graph is defined as $G_A = (V_A, E_A)$ with $V_A \subseteq VV'$ and $E_A \subseteq EE'$. A node is inserted in the association graph if both nodes of the parent graphs have the same properties, i.e., in our case some common bits in their feature vector.

$$V_A = \{(v, v') | v \in V, v' \in V', \mu(v) \text{ AND } \mu'(v')\}$$

where AND denotes the bitwise *and* operation. Between two association nodes an edge $e_A \in E_A$ with

$$E_A = \{(u_A, v_A) | u_A = (u, u'), v_A = (v, v')\}$$

is inserted if the following applies:

- $u \neq v$, and $u' \neq v'$.
- If an edge $e = (u, v) \in E$ exists, then an edge $e' = (u', v') \in E'$ exists and $|e(e) - e'(e')| \leq c$ for a user-defined constant c called the *distance cutoff*.
- If no edge $e = (u, v) \in E$ exists, then no edge $e' = (u', v') \in E'$ exists.

(3) Let $\text{cpds} = \{m(c(\xi)) | \xi \in L\}$ be the ids of all compounds and Ξ_{cpd} the conformation with the lowest RMSD for compound $\text{cpd} \in \text{cpds}$. Then

$$I_{\text{GNG}} = \bigcup_{\text{cpd} \in \text{cpds}} \Xi_{\text{cpd}}$$

is the list of aligned pharmacophore annotation points and $V_{\text{GNG}} \subset V$ and $F_{\text{GNG}} \subset F$ are the corresponding subsets of coordinate and feature vectors.

Run the GNG algorithm with these subsets. The GNG will return a list of neurons $S = (V_{\text{GNG}}, F_{\text{GNG}})$ (the pharmacophore model) with the same format as the annotation points; i.e., V_{GNG} is the set of coordinate vectors and F_{GNG} the set of feature vectors.

(4) Refine the alignments created in step 2 by realigning every Ξ_{cpd} onto the GNG neurons S .

(5) Repeat steps 3 and 4 once.

(6) Refine and score the generated model:

Let

$$P(s, \xi) = (D(v_s, v_\xi) - r_s \leq 0) \wedge (f_s \text{ AND } f_\xi > 0)$$

be a function determining if a neuron matches an annotation point. Then $\text{matches}(s)$ is the number of matched annotation points for a neuron $s \in S$.

$$\text{matches}(s) = \sum_{\text{cpd} \in \text{cpds}} \begin{cases} 1 & \exists \xi \in I_{\text{GNG}}: m(c(\xi)) = \text{cpd} \wedge P(s, \xi) \\ 0 & \text{else} \end{cases}$$

(a) Remove neurons not matching at least γ_f percent of compounds.

$$S = S \setminus \left\{ s \mid \frac{\text{matches}(s)}{|\text{cpds}|} < \gamma_f, s \in S \right\}$$

(b) If neurons were removed, recalculate the alignments as in step 4.

(c) Calculate the mean coverage of the model as

$$\text{mean}(S) = \frac{\sum_{s \in S} \text{matches}(s)}{|\text{cpds}| |S|}$$

(d) If active/inactive information was provided, calculate the overall accuracy m/N , the accuracy on actives $\text{acc}_1 = m_1/N_1$, and the accuracy on inactives $\text{acc}_0 = m_0/N_0$ with $N = N_1 + N_0$ and $m = m_1 + m_0$, where N_1 and N_0 are the number of active/

inactive molecules and m_1 and m_0 denote the number of active/inactive molecules matching/not matching the model.

Benchmark Compound Sets and Validation. All compounds have been prepared using the default *wash* routine in the MOE software. As comparison to our method, the *Pharmacophore Elucidation* routine of the MOE software was used with default parameters. Pharmacophore matching was performed with the *Pharmacophore search* of MOE.

Pose Reproduction Set. We used the PhamBench²⁴ data set to benchmark how well our algorithm performs in the creation of models able to reproduce the crystal structure pose. For each compound up to 50 conformations (RMSD limit, 0.25 Å; energy window, 7.0 kcal/mol) were created with the *Conformation Import* method of the MOE software. For each target the co-crystallized poses of the respective ligands were used to elucidate pharmacophore models. The best-scored model (in terms of accuracy) was selected and used to perform a pharmacophore search on the conformation database for this target. For each ligand the RMSD between the best-matching conformation and the co-crystallized pose was calculated.

Active/Inactive Set. We determined the ability of the generated models to distinguish between active and inactive compounds using targets from the data set described by Sutherland et al.²⁵ and the directory of useful decoys, enhanced (DUD-E).²⁶ For each compound up to 25 conformations (RMSD limit, 0.1 Å; energy window, 7.0 kcal/mol) were created with the *Conformation Import* method of the MOE software. Validation was performed using a 10-fold cross-validation (CV). In each iteration 90% of the active molecules were used to elucidate up to 10 pharmacophore models; the remaining 10% were mixed with the inactives as a test set. With the best-scored model a pharmacophore search on the test set was performed and the number of true positives (matching actives) and false positives (matching inactives) was calculated.

Protein Preparation. The coding sequence of human leukotriene A₄ hydrolase was inserted into the expression vector pET 24(+)⁺ (Novagen) with a hexahistidin tag at the C-terminus and a kanamycin resistance. The applied primers were as follows:

LTA4H fwd:

AAGGATCCATGCCCGAGATAGTGGATA

LTA4H rev:

AAACTCGAGGTCCACTTTTAAAGTCTTTCC

The forward primer includes the restriction site for XhoI and the reverse primer for BamHI. After the ligation the vector pET 24(+)⁺ with LTA4H coding sequence was transformed into competent *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α cells (Invitrogen). After the evaluation of the clone by sequencing with a T7 promoter and terminator primer (SRD, Bad Homburg), the plasmid was transformed and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3)RIPL-Codon Plus cells (Invitrogen). At an OD₆₀₀ of approximately 0.8 the induction was started with 300 μM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, AppliChem). After 4 h the cells were harvested by centrifugation (5500 rpm, 20 min). Approximately 0.5 μg of DNase (AppliChem) and an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free protease inhibitor complete tablet (Roche) were added. For crushing the lysate a cell disrupter (Constant Systems) was used (two times, 1 kbar). The purification of the protein was performed with a 5 mL His-Trap HP column (GE Healthcare) by immobilized metal ion affinity chromatography. A wash and loading buffer containing

50 mM Tris, 500 mM NaCl, and 4 mM imidazole with pH 8 was used and the protein was eluted with an amount of 60 mM imidazole. The fractions containing hLTA4H were analyzed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blot as well as in-gel digestion followed by mass spectroscopy. For separating contaminants the relevant fractions were pooled and purified with a Superdex200 column (GE Healthcare). A buffer containing 50 mM Tris-HCl and 50 mM NaCl was used for elution of the protein.

LTA4H Assay. The fluorescence-based LTA4H-assay system was performed in black polystyrol 96-well plates. The assays were performed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.01% Triton-X 100, and a final concentration of 1.4% dimethyl sulfoxide (DMSO). In the first step 10% of the compound solution with 10% DMSO was preincubated with 80 μ L of protein for 30 min at room temperature. The protein concentration was adapted to yield an average slope of 0.3 relative fluorescence units (RFU)/s as determined in a separate control. After incubation 10 μ L of the nonfluorescent substrate 7-amido-4-methylcoumarine hydrochloride was added with a final concentration of 300 μ M. A Tecan fluorescence plate reader (Infinite F200 pro) was used for measuring the fluorescence of the hydrolyzed substrate (excitation at 370 nm and emission at 460 nm) for 30 min (one point every minute) at room temperature. As blank and positive controls, samples without protein or compound, respectively, were used. The evaluation of the reaction was obtained by the slope, and the percentage inhibition of the compounds was calculated based on the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = 100 \left(1 - \frac{\text{slope}_{\text{compound}} - \text{slope}_{\text{blank}}}{\text{slope}_{\text{positive}} - \text{slope}_{\text{blank}}} \right)$$

IC_{50} values were determined with the GraphPad Prism Software (5.0) using a sigmoidal dose response curve fit (variable slope with four parameters).

Thermal Shift Assay. The differential scanning fluorimetry (DSF) is a screening method for investigating in vitro interactions between a purified protein and possible ligands. Their binding leads to a change in free enthalpy and thus goes hand in hand with the stability of the protein. The change in free enthalpy depends on the concentration as well as the affinity of the ligand to the target protein.²⁷ It correlates with the shift in temperature (therefore DSF is also called thermal shift assay) during the temperature-affected unfolding of the protein. The difference of the transition temperature in the presence or absence of an inhibitor can be considered as an indicator of the stabilizing interaction between protein and inhibitor. For the determination of the thermal shift, the fluorescent dye SYPRO Orange (Life Technologies) was used, which has a high, nonspecific binding affinity for hydrophobic regions but is strongly quenched by water. While the protein unfolds, more hydrophobic patches get exposed and can bind the dye, leading to an increase in fluorescence.²⁷

The thermal shift assay was carried out in a MicroAmp fast 96-well reaction plate. The assay buffer consists of 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 with a final concentration of 0.01% Triton X-100 and 1% DMSO per well. The total volume per well was 40 μ L, consisting of 32 μ L of LTA4H with a concentration of 14 μ g per well, 4 μ L of inhibitor solution, and 4 μ L of SYPRO Orange solution (1:200 with MQ-water). As blank and positive controls, samples without protein or compound, respectively,

were used. The relative fluorescence intensity (RFU) in dependence of the temperature was recorded with the iCycler IQ single-color real time polymerase chain reaction (PCR). The temperature was raised from 20 to 89.9 °C every 0.24 s by 0.2 °C. With Graph Pad Prism (5.0) the first derivation was formed and smoothed with a second order smoothing function considering six neighbors. Afterward the temperature with maximum fluorescence intensity was determined and the shift calculated as the difference of the positive control and the inhibitor.

Crystallization. For the crystallization of the LTA4H we adapted the conditions described by Davies et al.²⁸ Briefly, 1 μ L of protein solution containing 10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, and 4–8 mg/mL LTA4H (pH 8) was mixed at different ratios (0.5:1, 1:1, and 1:2) with precipitant solution containing 0.15 M imidazole, 0.1 M sodium acetate pH 6, 14% PEG-8000, and 5 mM YbCl₃, and crystallized at 17.4 °C for 2 weeks by hanging drop vapor-diffusion method. The resulting crystals were soaked in the precipitant solution containing 100 μ M inhibitor for at least 48 h prior to freezing. For data collection under cryonic conditions the soaked crystals were transferred for 20 s into the cryoprotecting solution (containing precipitant solution complemented with 25% PEG-400) before flash freezing in the liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected on the beamline station X06DA (PXII) at the Swiss Light Source (SLS, Paul Scherrer Institute, Villigen, Switzerland). All diffraction data were obtained from a single crystal and processed with the XDS software^{29,30} package.

RESULTS AND DISCUSSION

Pose Reproduction. For assessing the ability to reproduce the conformation of a co-crystallized ligand we selected the 20 proteins with the highest number of available crystal structures from the PharmBench data set. In the case of our algorithm, up to 20 pharmacophore models were created for each protein; in the case of MOE, no limit was specified. In either case, the model with the highest accuracy was used for pharmacophore search. For each ligand the best-matching pose was retained and the RMSD to the respective crystallized pose calculated. Figure 2 exemplary shows the model with the highest accuracy for target P39900 and the resulting alignment of the compounds. Despite the quite high standard deviations, the created models were suitable to find a conformation close to the crystallized pose with average RMSD values below 2 Å in 19 out of 20 cases (Figure 3 and Table 1). In the remaining case no model with

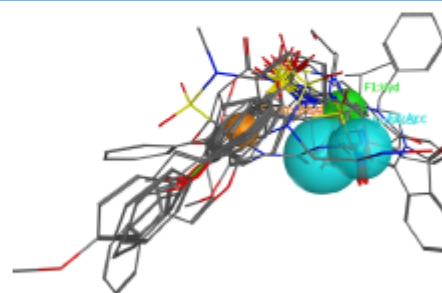


Figure 2. Exemplary pharmacophore model created with our method and resulting alignment of the compounds. Shown is the model with the highest accuracy for target P39900.

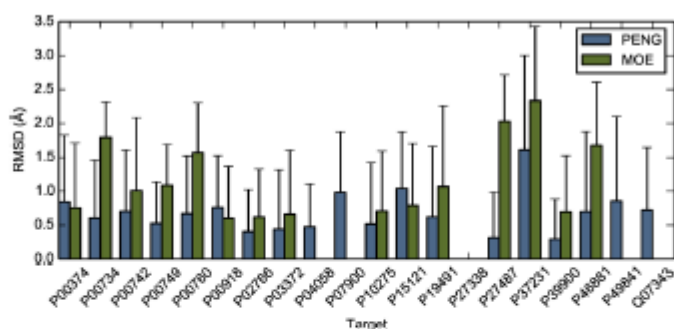


Figure 3. Results of the pose reproduction benchmark set. Shown are the average RMSD values and the positive standard deviation.

Table 1. Results of the Pose Reproduction Benchmark^a

protein	PENG			MOE		
	hitrate	RMSD	SD	hitrate	RMSD	SD
P00374	1.00	0.84	0.99	1.00	0.75	0.96
P00734	0.85	0.61	0.86	0.88	1.79	0.53
P00742	1.00	0.70	0.91	1.00	1.01	1.08
P00749	0.57	0.52	0.61	0.86	1.08	0.61
P00760	0.86	0.67	0.85	0.98	1.57	0.74
P00918	0.79	0.76	0.76	0.98	0.60	0.76
P02766	0.96	0.40	0.62	0.75	0.62	0.71
P03372	1.00	0.44	0.88	1.00	0.66	0.95
P04058	0.89	0.48	0.63	—	—	—
P07900	0.95	0.98	0.90	—	—	—
P10275	1.00	0.51	0.91	1.00	0.70	0.89
P15121	0.71	1.04	0.84	1.00	0.79	0.91
P19491	1.00	0.62	1.04	1.00	1.07	1.19
P27338	—	—	—	—	—	—
P27487	0.93	0.31	0.68	1.00	2.03	0.69
P37231	0.88	1.61	1.39	0.88	2.34	1.10
P39900	0.93	0.29	0.59	1.00	0.69	0.83
P46881	0.56	0.70	1.18	0.78	1.67	0.93
P49841	0.80	0.85	1.25	—	—	—
Q07343	1.00	0.72	0.92	—	—	—

^aShown is the hitrate (i.e., how many compounds were found divided by the total number of compounds), the average RMSD, and the standard deviation. In the cases in which “—” is shown, no model with more than two features could be created.

more than two features could be created, most probably because the prevalent pharmacophore of the actives indeed consists of two aromatic/hydrophobic features. However, MOE was unable to find a model, too.

Active/Inactive. For assessing the ability to separate actives from inactives we used the targets COX2, DHFR, and BZR from the Sutherland data set and FABP4 and INHA from the DUD-E database. For each target the actives were taken from the respective data set and inactives from the DUD-E database. In all cases the percentage of actives recovered is above 50% (Figure 4). However, while the models for targets of the Sutherland data set yield reasonable false positive rates, they are quite high for the DUD-E data set. The most likely reason for this is that the generated models for these targets are too small and therefore too common. Tuning of parameters, especially the distance threshold, t_p , and the percentile p used during the merge step may improve the results.

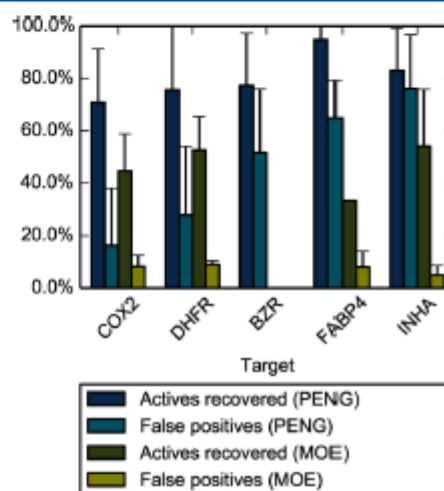


Figure 4. Results of the active/inactive benchmark set. Shown are the percent actives recovered, the percent false positives, and the respective positive standard deviations. For BZR MOE did not find a model.

Prospective Virtual Screening. Additionally we wanted to test PENG in a prospective virtual screening for new ligands of the leukotriene A4 hydrolase. Therefore, we used the co-crystallized ligands from 24 Protein Data Bank (PDB) structures (see Supporting Information) to elucidate pharmacophore models. Additionally an EShape3D fingerprint model was created with the MOE software. With this model we prefiltered the SPECS database for compounds with an average fingerprint similarity higher than 0.6, leading to 69,106 unique compounds. The three models with the highest accuracy from the pharmacophore elucidation were then used to search the filtered SPECS database. We subsequently focused on the smallest resulting database with 3,136 unique compounds. However, since many hits were very similar, we clustered them using the Butina³¹ algorithm as implemented in RDKit³² using the CATS³³ fingerprint, yielding 113 cluster centroids. From these structures we manually selected 21 compounds (Figure 5) based on diversity and price, ordered, and tested them in vitro. Figure 6B shows the corresponding pharmacophore model with our reference inhibitor 23 (Figure 6A, see Supporting Information for synthesis).

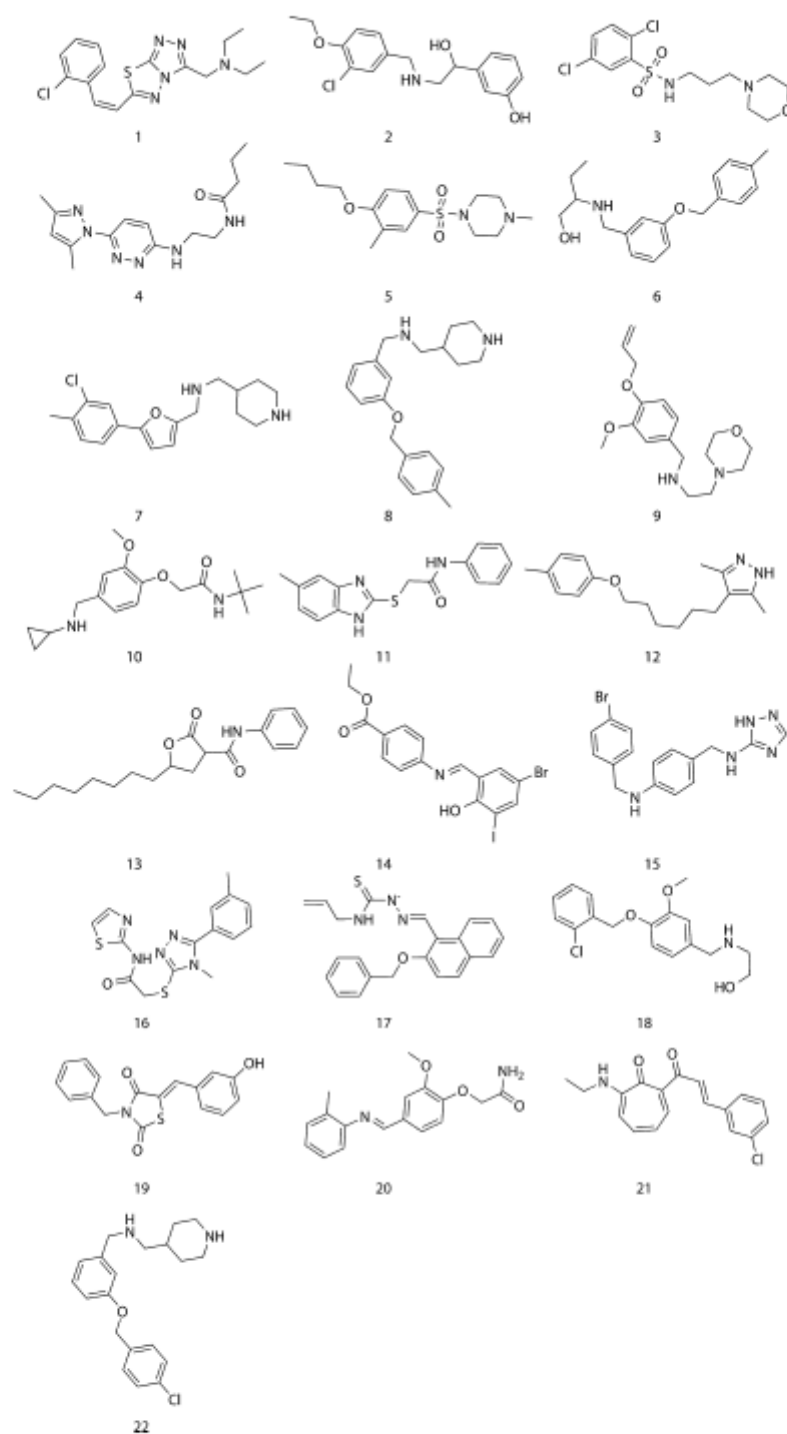


Figure 5. Overview of the ordered compounds (1–21) as well as one derivative of compound 8 (22). The compounds have been depicted to resemble the actual 3D conformation as well as possible using the “flatten” function of MOE.

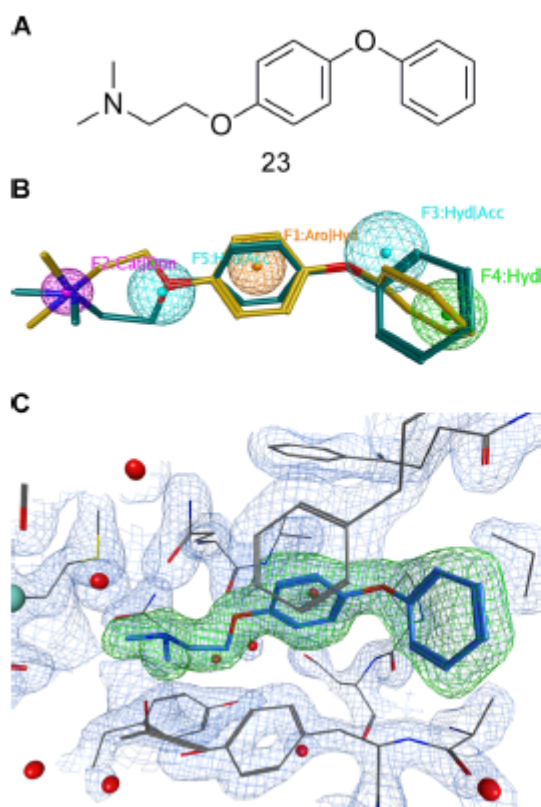


Figure 6. (A) Structure of the reference inhibitor 23. (B) Pharmacophore model used for selecting compounds with best-matching pose of our reference inhibitor (yellow) and actual crystallized pose (cyan). (C) Crystal structure of the reference ligand in the LTA4H pocket. The $F_o - F_c$ difference map was calculated from the model with the omitted ligand. Shown is the positive $F_o - F_c$ difference map contoured at 3.0σ within 2 Å around the ligand (green) and the $2F_o - F_c$ map of the receptor within 5.5 Å around the ligand, contoured at 1.5σ (blue).

LTA4H Assay. For validation of the assay system we synthesized a reference inhibitor (23) adopted from the literature.³⁴ We measured an IC_{50} value for this compound of 60 nM with a standard deviation of 8, which lies in the range of the ligands described by Penning et al.³⁴ The selected compounds from the virtual screening were tested in a first step with a final concentration of 10 μ M in the LTA4H-assay system. As Figure 7 shows, there is a high deviation between the single measurements for some compounds. A possible explanation for this issue could be the fact that the substances interact with the assay system or the solubility is not adequate. For this reason the five most consistent of these compounds were selected (compounds 8, 15, 19, 20, and 21) to determine the IC_{50} value. However, except for compound 8, no IC_{50} curve could be fitted. Again, the reason could be the solubility of the substances. For that issue other derivatives of compound 8 were ordered. Only one compound (22) showed the required potency (inhibition greater 50% at 10 μ M) and an IC_{50} curve could be determined (Figure 8). The IC_{50} value of compound 8

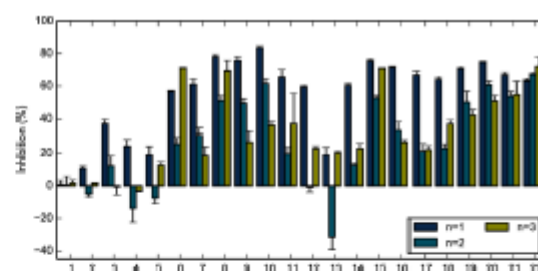


Figure 7. LTA4H assay with compounds at 10 μ M. Shown is each repetition of the experiments with the standard deviation of the respective triplicate.

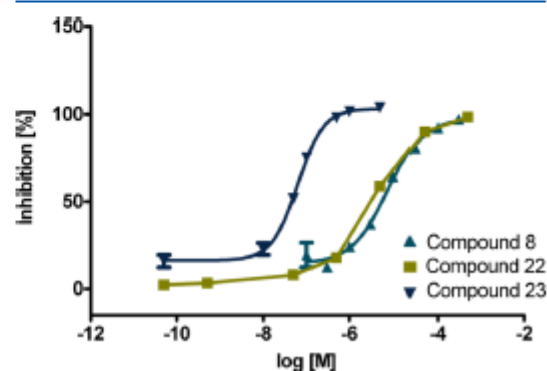


Figure 8. IC_{50} curve of compounds 8, 22, and 23.

Table 2. IC_{50} Values of the Compounds

compound	IC_{50} (μ M)	SEM (μ M)
8	8.5	2.6
22	3.8	0.7
23	0.060	0.009

was determined as 8.5 μ M and of compound 22 as 3.8 μ M (Table 2).

Thermal Shift Assay. In a further step the unfolding of the LTA4H was measured by thermal shift assay. Therefore, the inhibitor with a final concentration of 100 μ M was used. For the evaluation the respective melting point was determined, and afterward the shift of the positive control and the respective inhibitor was calculated (Table 3). Compound 8 shows a stronger shift than 22. However, both shifts are below a temperature of 2 $^{\circ}$ C indicating that there is not a very strong interaction between the protein and the inhibitors. Whereas compound 23 provides the strongest shift with a temperature of 3.6 $^{\circ}$ C which adverts to a strong interaction between the protein and the inhibitor.

Crystallization. We successfully crystallized compound 23 in the LTA4H binding site. The protein structure was

Table 3. Thermal Shift Values of the Compounds

compound	shift ($^{\circ}$ C)	SEM ($^{\circ}$ C)
8	1.9	0.7
22	1.3	0.1
23	3.6	0.3

determined at 1.864 Å by molecular replacement with PHASER using corresponding LTA4H protein atomic coordinates as a search model (PDB entry 1GW6). After iterative rounds of model building with COOT³⁵ into the $2F_o - F_c$ electron density map the model containing polypeptide chain and the ligands was refined to a final R and R_{free} factors of 0.1704 and 0.1888, respectively, using the PHENIX software package.³⁶ Statistics of data collection and structural refinement are summarized in Supporting Information Table S1. The coordinates and structure-factor amplitudes of the structure have been deposited in the Protein Data Bank as entry 5AEN. Figure 6C shows that the pose of the ligand and the positive $F_o - F_c$ electron density difference of the model without ligand are in good agreement. The conformation predicted by the pharmacophore model used for screening matches the crystallized pose with an RMSD of 1.1 Å (Figure 6A). We also tried to crystallize the two hits from the virtual screening (8 and 22). However, no significant electron density could be observed, probably due to the lower binding affinity.

CONCLUSION

In the present study we developed a novel method called PENG for automatic elucidation of pharmacophore models based on a growing neural gas algorithm. We have shown that the PENG method is capable of creating meaningful pharmacophore models. The method has been validated retrospectively with co-crystallized ligands from the PharmBench data set and known active ligands from the Sutherland and DUD-E data sets, as well as prospectively by a virtual screening for LTA4H ligands. We established a fluorescence-based assay with a novel substrate for LTA4H. The assay was validated with our reference inhibitor and shows comparable IC_{50} values as similar compounds described formerly by others.³⁴ Using the PENG method we were able to find novel ligands for LTA4H, including to our knowledge so far unknown chemotypes. The binding mode of the reference ligand determined by X-ray crystallography confirmed the pharmacophore model derived by the PENG method.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Text giving the complete list of PDB codes used in the virtual screening and synthesis of the reference ligand, figure showing the distribution of real values for each bit position, and table listing the data collection and refinement statistics. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de.

Author Contributions

[†]D.M. and S.K.W. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Sachbehilfe PR 1405/2-1 and SFB 1039 Teilprojekt A07). We gratefully thank Guido Kirsten (CCG) for the SVL script creating the pharmacophore annotation points. D.M. thanks the German Cancer Research Center

(DKFZ)/the German Consortium for Translational Cancer Research (DKTK), R.B. thanks the Else-Kröner-Fresenius Foundation Graduiertenkolleg TRIP for a scholarship. We acknowledge the Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland for provision of synchrotron radiation beamtime at beamline X06DA (PXIII) of the SLS and also thank Dr. Meitian Wang for assistance.

REFERENCES

- (1) Merz, J.; Ringe, D.; Reynolds, C. H., Eds. *Drug Design*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 2010.
- (2) Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 17–47.
- (3) Kier, L. B. Molecular Orbital Calculation of Preferred Conformations of Acetylcholine, Muscarine, and Muscarone. *Mol. Pharmacol.* **1967**, *3*, 487–494.
- (4) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129–1143.
- (5) Lemmen, C.; Lengauer, T. Computational Methods for the Structural Alignment of Molecules. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 215–232.
- (6) Leach, A. R.; Gillet, V. J.; Lewis, R. A.; Taylor, R. Three-dimensional Pharmacophore Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 539–558.
- (7) Giangreco, L.; Cosgrove, D. A.; Packer, M. J. An Extensive and Diverse Set of Molecular Overlays for the Validation of Pharmacophore Programs. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 852–866.
- (8) Fritske, B. A Growing Neural Gas Network Learns Topologies. *Adv. Neural Inf. Process. Syst.* **1995**, *7*, 625–632.
- (9) Martinetz, T.; Schulten, K. A "Neural-Gas" Network Learns Topologies. *Artif. Neural Networks* **1991**, *1*, 397–402.
- (10) Kohonen, T. Self-Organized Formation of Topologically Correct Feature Maps. *Biol. Cybern.* **1982**, *43*, 59–69.
- (11) Angelopoulou, A.; Psarrou, A.; Rodriguez, J.; Revett, K. In *Computer Vision for Biomedical Image Applications*; Liu, Y., Jiang, T., Zhang, C., Eds.; Lecture Notes in Computer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 2005; Vol. 3765, pp 210–219.
- (12) Canales, F.; Chacón, M. Progress in Pattern Recognition. In *Image Analysis and Applications*; Rueda, L., Mery, D., Kittler, J., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 4756, pp 684–693.
- (13) Weisel, M.; Kriegel, J.; Schneider, G. PocketGraph: Graph Representation of Binding Site Volumes. *Chem. Cent. J.* **2009**, *3*, No. P66.
- (14) Rudberg, P. C.; Tholander, F.; Thunnissen, M. M. G. M.; Haeggström, J. Z. Leukotriene A4 Hydrolase/Aminopeptidase. Glutamate 271 is a Catalytic Residue with Specific Roles in Two Distinct Enzyme Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1398–1404.
- (15) Shim, Y. M. S.; Paige, M. In *Inflammatory Diseases—Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*; Khatami, M., Ed.; 2012.
- (16) Stsiapanava, A.; Olsson, U.; Wan, M.; Kleinschmidt, T.; Rutishauser, D.; Zubarev, R. A.; Samuelson, B.; Rinaldo-Matthis, A.; Haeggström, J. Z. Binding of Pro-Gly-Pro at the Active Site of Leukotriene A4 Hydrolase/Aminopeptidase and Development of an Epoxide Hydrolase Selective Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 4227–4232.
- (17) Haeggström, J. Z. Leukotriene A4 Hydrolase/Aminopeptidase, the Gatekeeper of Chemotactic Leukotriene B4 Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50639–50642.
- (18) MOE, *Molecular Operating Environment*, 2012.10; Chemical Computing Group, Montreal, Canada, 2012.
- (19) Martinetz, T. Competitive Hebbian Learning Rule Forms Perfectly Topology Preserving Maps. *ICANN '93, Proceedings of the International Conference on Artificial Neural Networks*, 1993; pp 427–434.

- (20) Kabsch, W. A Solution for the Best Rotation to Relate Two Sets of Vectors. *Acta Crystallogr., Sect. A: Cryst Phys, Diff., Theor. Gen. Crystallogr.* 1976, 32, 922–923.
- (21) Kabsch, W. A Discussion of the Solution for the Best Rotation to Relate Two Sets of Vectors. *Acta Crystallogr., Sect. A: Cryst Phys, Diff., Theor. Gen. Crystallogr.* 1978, 34, 827–828.
- (22) Bron, C.; Kerbosch, J. Algorithm 457: Finding All Cliques of an Undirected Graph. *Commun. ACM* 1973, 16, 575–577.
- (23) Koch, I. Enumerating all Connected Maximal Common Subgraphs in two Graphs. *Theor. Comput. Sci.* 2001, 250, 1–30.
- (24) Cross, S.; Ortuso, F.; Baroni, M.; Costa, G.; Distinto, S.; Moraca, F.; Alcaro, S.; Cruciani, G. GRID-Based Three-Dimensional Pharmacophores II: PharmBench, a Benchmark Data Set for Evaluating Pharmacophore Elucidation Methods. *J. Chem. Inf. Model.* 2012, 52, 2599–2608.
- (25) Sutherland, J. J.; O'Brien, L. A.; Weaver, D. F. Spline-Fitting with a Genetic Algorithm: A Method for Developing Classification Structure-Activity Relationships. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 1906–1915.
- (26) Mysinger, M. M.; Carchia, M.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 6582–6594.
- (27) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry To Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2212–2221.
- (28) Davies, D. R.; Mannat, B.; Magnusson, O. T.; Christensen, J.; Haraldsson, M. H.; Mishra, R.; Pease, B.; Hansen, E.; Singh, J.; Zembower, D.; Kim, H.; Kiselyov, A. S.; Burgin, A. B.; Gurney, M. E.; Stewart, L. J. Discovery of Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitors Using Metabolomics Biased Fragment Crystallography. *J. Chem. Inf. Model.* 2009, 52, 4694–4715.
- (29) Kabsch, W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2010, 66, 133–144.
- (30) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2010, 66, 125–132.
- (31) Taylor, R. Simulation Analysis of Experimental Design Strategies for Screening Random Compounds as Potential New Drugs and Agrochemicals. *J. Chem. Inf. Model.* 1995, 35, 59–67.
- (32) RDKit, Open-Source Cheminformatics. <http://www.rdkit.org>.
- (33) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, 38, 2894–2896.
- (34) Penning, T. D.; Chandrakumar, N. S.; Chen, B. B.; Chen, H. Y.; Desai, B. N.; Djuric, S. W.; Docter, S. H.; Gasiecki, A. F.; Haack, R. A.; Miyashiro, J. M.; Russell, M. A.; Yu, S. S.; Corley, D. G.; Durley, R. C.; Kilpatrick, B. F.; Parnas, B. L.; Askonas, L. J.; Giese, J. K.; Harding, E. L.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Krivi, G. G.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Smith, W. G. Structure-Activity Relationship Studies on 1-[2-(4-Phenylphenoxy)ethyl]pyrrolidine (SC-22716), a Potent Inhibitor of Leukotriene A(4) (LTA(4)) Hydrolase. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 721–735.
- (35) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2004, 60, 2126–2132.
- (36) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2010, 66, 213–221.

